



V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA 05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

Otimização do meio de cultivo para produção de nattokinase por *Bacillus subtilis* natto

Mayara de Alencar Almeida¹, Laís Soares Medina¹, Jenifer Freitas da Silva¹, Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi¹ e Josiane Alessandra Vignoli¹.

¹Universidade Estadual de Londrina – Departamento de Bioquímica e Biotecnologia
Caixa Postal 10.011 – CEP 86057-970 Londrina – Paraná - E-mail: (mayaraalencaralmeida@gmail.com)

RESUMO

A nattokinase, uma enzima com atividade fibrinolítica, tem recebido destaque devido ao seu potencial no tratamento de trombose e doenças relacionadas. Esta enzima pode ser obtida por fermentação com o microrganismo *Bacillus subtilis*. A composição do meio de cultivo apresenta-se como um importante fator para o direcionamento do metabolismo deste microrganismo à produção da enzima nattokinase. Deste modo, este trabalho buscou otimizar a composição do meio de cultivo para produção de nattokinase por *Bacillus subtilis* natto, avaliando o efeito da concentração de glicose, peptona e dos sais CaCl_2 e MgSO_4 , por meio de um delineamento composto central. Pela análise dos resultados obtidos, observou-se que, para o intervalo estudado, apenas a concentração peptona e a interação entre as concentrações de glicose e peptona apresentaram efeito significativo sobre a produção da enzima nattokinase.

Palavras-chave: atividade fibrinolítica, glicose, CaCl_2 , MgSO_4 .

INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares são as principais causas de morte no mundo (Mine, Wong e Jiang, 2005). A trombose resulta do acúmulo de fibrina nos vasos sanguíneos decorrente de algumas desordens, levando ao infarto do miocárdio e outras doenças cardiovasculares. Ao longo dos anos, as terapias trombolíticas, via injeção ou administração oral de agentes trombolíticos, têm sido extensivamente investigadas. A enzima nattokinase tem sido mencionada por sua potente atividade fibrinolítica (Young Jang et. al, 2013).

Pode ser extraída a partir de um alimento fermentado japonês, o natto, ou também ser produzida por fermentação pelo microrganismo *Bacillus subtilis* natto. Pesquisas recentes estudam a otimização das condições do processo fermentativo para produção de nattokinase por *Bacillus subtilis*. Dentre estas condições destacam-se a composição do meio de fermentação, como fontes de carbono, nitrogênio e de alguns sais (Wang, Chiu, Hsieh, 2009). O estudo da presença de alguns sais no meio de cultivo, influenciando a produção de nattokinase, justifica-se pelo fato de íons metais como Ca^{2+} e Mg^{2+} ativarem esta enzima (Deepak et al., 2008). Deste modo, o trabalho em questão teve por objetivo otimizar a produção de nattokinase por *Bacillus subtilis* natto, através da manipulação dos componentes do meio de cultivo, avaliando o efeito de diferentes concentrações de glicose, peptona de soja, MgSO_4 e CaCl_2 na produção da enzima fibrinolítica nattokinase.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo: Utilizou-se a cepa de *Bacillus subtilis* adquirida da coleção de cultura tropical do Instituto André Tosello – Campinas S.P.

Meio para obtenção do inóculo: O meio para obtenção do inóculo foi preparado de acordo com o protocolo de CALAZANS et al., 2000. *Bacillus subtilis* foi incubado à temperatura de 37°C a 180rpm por 24horas.

Meios de fermentação para otimização da produção de nattokinase de acordo com a concentração de glicose, peptona de soja e sais: O efeito das concentrações de glicose, peptona e dos sais $MgSO_4$ e $CaCl_2$ foi avaliado por um delineamento composto central com repetições no ponto central, totalizando 28 ensaios (Tabela 1). A bactéria *Bacillus subtilis* foi inoculada nos diferentes meios na concentração de 0,2mg/mL de célula e incubada a temperatura de 37°C a 180rpm por 24horas.

Métodos Analíticos: Após a interrupção das fermentações, os cultivos foram centrifugados a 4°C a 9.000rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para determinar a atividade da enzima.

Determinação da atividade da enzima: A atividade de nattokinase foi medida pela hidrólise de fibrina. Uma mistura contendo 125µL de uma solução de fibrina 12g/L (pH 7,8); 325µL de tampão Tris-HCl 0,1M (contendo 10mM $CaCl_2$, pH 7,8) e 50µL da solução de enzima foi incubada a 37°C por 15 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 250µL de ácido tricloroacético 0,11M contendo 0,22M de acetato de sódio e 0,33M ácido acético. Após centrifugação a 10.000rpm por 10 minutos, a absorvância do sobrenadante foi determinada a 275 nm. Uma unidade fibrinolítica (U) foi definida como a quantidade de enzima requerida para produzir 1µg de tirosina/mL/minuto.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados de produção de nattokinase em diferentes concentrações de glicose, peptona de soja e dos sais $CaCl_2$ e $MgSO_4$. Como observado a maior produção (atividade enzimática), foi obtida no ensaio 8 (557,37U), onde as concentrações de peptona de soja, $CaCl_2$ e $MgSO_4$ estavam em seus níveis superiores (+1). Entretanto, após análise estatística dos resultados (Tabela 2) observou-se que somente a concentração de peptona e a interação entre concentrações de glicose e de peptona foram significativas ao nível de 5% de confiança. O modelo explicou 74% ($R^2 = 0,73652$) dos resultados e a falta de ajuste não foi significativa ($p > 0,05$), podendo-se concluir que os dados experimentais estão ajustados ao modelo obtido. Os resultados aqui encontrados estão em concordância com o estudo realizado Deepak et al. (2008); onde avaliou-se o efeito das variáveis glicose, peptona, $CaCl_2$ e $MgSO_4$ na produção de nattokinase por *Bacillus subtilis* a pH 7,5; encontrando a concentração de peptona com efeito significativo sobre a produção da enzima em questão. Estes autores observaram também um efeito significativo da interação das concentrações de peptona e $CaCl_2$ sobre a produção da nattokinase.

Em pesquisa desenvolvida por Wang, Chiu e Hsieh (2009), onde se investigou os efeitos de várias fontes de nitrogênio, carbono e sais inorgânicos para a produção de nattokinase por *Bacillus natto*; observou-se que glicose, KH_2PO_4 , e $MgSO_4$ afetaram significativamente a atividade da nattokinase, o que difere do trabalho em questão, onde a concentração de sais não apresentou efeito significativo dentro da faixa avaliada.

V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

Tabela 1. Efeito de diferentes componentes do meio na produção de nattokinase por *Bacillus subtilis* natto.

Ensaios	[Glicose]	[Peptona de soja]	[CaCl ₂]	[MgSO ₄]	U
1	-1	-1	-1	-1	112,55
2	-1	-1	-1	1	275,42
3	-1	-1	1	-1	126,67
4	-1	-1	1	1	121,96
5	-1	1	-1	-1	315,4
6	-1	1	-1	1	162,75
7	-1	1	1	-1	384,25
8	-1	1	1	1	557,37
9	1	-1	-1	-1	90,59
10	1	-1	-1	1	306,88
11	1	-1	1	-1	89,8
12	1	-1	1	1	281,96
13	1	1	-1	-1	151,76
14	1	1	-1	1	140
15	1	1	1	-1	198,04
16	1	1	1	1	183,06
17	-2	0	0	0	119,69
18	2	0	0	0	135,69
19	0	-2	0	0	59,45
20	0	2	0	0	432,77
21	0	0	-2	0	298,36
22	0	0	2	0	245,91
23	0	0	0	-2	129,41
24	0	0	0	2	155,14
25	0	0	0	0	227,48
26	0	0	0	0	172,37
27	0	0	0	0	147,48
28	0	0	0	0	156,02

Variáveis	Níveis de Variação				
	-2	-1	0	1	2
X1 [Glicose] %	1	2,5	4	5,5	7
X2 [Peptona de soja] %	1	2	3	4	5
X3 [CaCl ₂] %	0,1	0,3	0,5	0,7	0,9
X4 [MgSO ₄] %	0,04	0,12	0,2	0,28	0,36

V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

Tabela 2. Análise de Variância (ANOVA).

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Quadrado Médio	F	P
(1)Glicose (L)	2260,29	1	2260,29	1,94683	0,186308
Glicose (Q)	273,41	1	273,41	0,23549	0,635557
(2)Peptona (L)	13698,51	1	13698,51	11,79877	0,004435*
Peptona (Q)	1720,72	1	1720,72	1,48208	0,245087
(3)CaCl ₂ (L)	533,4	1	533,4	0,45943	0,509776
CaCl ₂ (Q)	2940,81	1	2940,81	2,53297	0,135504
(4)MgSO ₄ (L)	2495,21	1	2495,21	2,14917	0,166415
MgSO ₄ (Q)	88,14	1	88,14	0,07592	0,78724
1L by 2L	7735,97	1	7735,97	6,66312	0,0228*
1L by 3L	678,65	1	678,65	0,58454	0,458194
1L by 4L	412,38	1	412,38	0,35519	0,561424
2L by 3L	5153,26	1	5153,26	4,43859	0,055128
2L by 4L	3282,08	1	3282,08	2,82691	0,116549
3L by 4L	171,21	1	171,21	0,14746	0,70718
Erro	15093,16	13	1161,01		
Total SS	57283,88	27			

Lack of fit: $p=0,068066$; $R^2=0,73652$ *Significativo para valores de $p<0,05$; L=linear; Q=quadrático.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, observou-se que, para o intervalo estudado, apenas a concentração de peptona e a interação entre concentrações de glicose e de peptona apresentaram efeito significativo sobre a produção da enzima nattokinase.

Agências de Fomento: A aluna Mayara de Alencar Almeida agradece Fundação Araucária pela concessão da Bolsa de Iniciação Científica.

REFERÊNCIAS

- DEEPAK, V.; KALISHWARALAL, K.; RAMKUMARPANDIAN, S.; VENKATESH, B.S.; SENTHILKUMAR, S.R.; SANGILIYANDI, G. (2008). Optimization of media composition for Nattokinase production by *Bacillus subtilis* using response surface methodology. **Bioresource Technology**, 99: 8170-8174.
- MINE, Y.; WONG, A.H.K.; JIANG, B. (2005). Fibrinolytic enzymes in Asian traditional fermented foods. **Food Rev In** 38: 243-250.
- YOUNG, J.; KIM, T.S.; CAI, J.; KIM, J.; KIM, Y.; SHIN, K.; KIM, K.S.; PARK, S.K.; LEE, S.P.; CHOI, E.K.; RHEE, M.H.; KIM, Y.B. (2013). Nattokinase improves blood flow by inhibiting platelet aggregation and thrombus formation. **Lab Anim Res** 29(4), 221-225
- WANG, J.K.; CHIU, H.H.; HSIEH, C.S. (2009). Optimization of the Medium Components by Statistical Experimental Methods to Enhance Nattokinase Activity. **Food J Health Sci** ;1(1):21-27.