

## **Produção de Nattokinase por *Bacillus subtilis* natto em Diferentes Fontes de Carbono e Nitrogênio**

**Laís Soares Medina<sup>1</sup>, Mayara de Alencar Almeida<sup>1</sup>, Jenifer Freitas da Silva<sup>1</sup>, Marcelo Rodrigues de Melo<sup>1</sup>, Maria Antonia P. C. Celligoi<sup>1</sup> e Josiane Alessandra Vignoli<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Londrina – Departamento de Bioquímica e Biotecnologia  
Caixa Postal 10.011 – CEP 86057-970 Londrina – Paraná - E-mail: (lais.s.medina@gmail.com)

### **RESUMO**

*O grande número de óbitos no mundo, devido a complicações cardiovasculares, tem impulsionado cada vez mais pesquisas sobre agentes trombolíticos. A nattokinase, uma enzima microbiana, tem mostrado alta eficiência na lise de coágulos, sendo considerada promissora na terapia da trombose e doenças relacionadas. Esta enzima é produzida pelo microrganismo *Bacillus subtilis* natto por processo fermentativo em condições de cultivo adequadas. De acordo com alguns autores, a composição do meio de cultivo tem sido considerada um dos fatores primordiais para a produção de nattokinase pela bactéria. Dentro desse contexto, esse trabalho avaliou o efeito de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na produção de nattokinase por *Bacillus subtilis* utilizando um planejamento fatorial fracionado 2<sup>(8-4)</sup>. Dentre as fontes de carbono avaliadas, glicose e maltose mostraram um efeito significativo e positivo sobre a produção da enzima. Das fontes de nitrogênio selecionadas, apenas peptona de soja foi significativa para produção de nattokinase.*

**Palavras-chave:** glicose, maltose, peptona de soja e enzima fibrinolítica.

### **INTRODUÇÃO**

De acordo com a organização mundial da saúde (OMS), milhões de pessoas morrem todos os anos vítimas de doenças cardiovasculares, sendo grande parte destas complicações ocasionadas pela trombose (PENG; YANG; ZHANG, 2005).

Atualmente, a enzima fibrinolítica nattokinase em atraído grande atenção de pesquisadores devido à baixa taxa de efeitos colaterais e seu baixo custo, diferentemente, dos agentes trombolíticos comumente utilizados em tratamentos (DEEPAK et al., 2008). A enzima nattokinase melhora o fluxo sanguíneo pela inibição da agregação de plaquetas e da formação de trombos (Young-Jang et. al, 2013).

A nattokinase pode ser extraída a partir do natto, um alimento fermentado japonês ou ser obtida por fermentação do microrganismo *Bacillus subtilis* natto em condições adequadas. De acordo com Deepak et al., (2008) os componentes do meio podem afetar significativamente o rendimento do produto. Deste modo, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na produção de nattokinase por *Bacillus subtilis* natto.

### **MATERIAL E MÉTODOS**

**Microrganismo:** *Bacillus subtilis* natto adquirida da coleção de cultura tropical do Instituto André Tosello – Campinas SP. O microrganismo foi preservado em meio contendo (g/L): agar, 20; extrato de carne, 30 e peptona, 50; a 4°C (CALAZANS et al., 2000).

**Inóculo:** O inóculo foi adquirido através da fermentação por batelada em erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL do meio de crescimento (CALAZANS et al., 2000) durante 24 horas a 37°C e 180 rpm. Após esse tempo, o meio foi centrifugado por 10 minutos, e o precipitado de células ressuspenso, assepticamente, em solução salina (NaCl 0,9%) para leitura de células em espectrofotômetro a 600 nm. As absorvâncias foram correlacionadas com a curva de biomassa e o inóculo foi padronizado a 0,2 g/L.

**Cultivo:** As fermentações foram realizadas em shaker a 37°C e 180 rpm por 24 horas em erlenmeyers de 125 mL com 25 mL de meio contendo em (g/L): glicose- 10, peptona- 20; CaCl<sub>2</sub>- 5,0; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O- 5,0. As diferentes fontes de carbono e nitrogênio foram alternadas com glicose e peptona de acordo com a Tabela 1. O pH do meio foi ajustado para 7,5.

**Atividade da enzima:** A nattokinase foi quantificada através da hidrólise de fibrina. Uma mistura contendo 125 µL de solução de fibrina 12g/L (pH 7,8), 325 µL de tampão Tris-HCl 0,1M (com 10mM de CaCl<sub>2</sub>, pH 7,8) e 50 µL de solução de enzima (sobrenadante das fermentações) foi incubada a 37°C por 15 minutos. Interrompeu-se a reação pela adição de 250 µL de ácido tricloroacético 0,11M com 0,22M de acetato de sódio e 0,33M ácido acético. Posteriormente a mistura foi centrifugada e a absorvância do sobrenadante avaliada a 275 nm. As leituras foram relacionados à concentração de tirosina, obtida por uma curva de calibração. Uma unidade fibrinolítica (U) foi definida como a quantidade de tirosina (µg) liberada por mL de extrato bruto/minuto.

**Análise Estatística:** Para definição das melhores fontes de carbono e nitrogênio foi usado delineamento fatorial fracionado 2<sup>(8-4)</sup>. Os resultados dos ensaios foram analisados pelo programa Statistica 7.0, avaliando as variáveis significativas por análise de variância (ANOVA) ao nível de significância de 5%.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A Tabela 1 apresenta a produção de nattokinase (em U) obtida nos ensaios com diferentes fontes de carbono e nitrogênio em variadas concentrações. Como observado, a maior produção de nattokinase (atividade máxima de 950,11 U- ensaio 16) foi obtida quando o meio continha a quantidade máxima, dentro da faixa estudada, de todos seus componentes. Altas produções também foram obtidas nos ensaios 4 e 10, atingindo 740,37 e 747,12 U, respectivamente.

Quando os resultados foram submetidos a análise estatística notou-se que as variáveis significativas foram glicose (X2) (p=0,046685), maltose (X4) (p=0,014680) e peptona de soja (X5) (p=0,013186) para p≤0,05 (Tabela 2). De acordo com estes resultados, maiores concentrações desses componentes levam a maiores produções da enzima nattokinase. O modelo explicou 82% dos resultados (R<sup>2</sup>=0,82509) e a falta de ajuste não foi significativa (p>0,05), mostrando que os dados experimentais estão bem ajustados ao modelo obtido. Os resultados estão em concordância com Deepak et al. (2008) que estudou o efeito das variáveis glicose e peptona de soja com sais, a pH 7,5 e observou que a concentração de peptona teve um efeito significativo e positivo sobre a produção de nattokinase. Efeito positivo de glicose e maltose também foi observado por Jau-Kai et. al (2009) comparando sacarose, glicose, maltose e açúcar cristal. O estudo mostrou que a produção de nattokinase foi aumentada quando a fonte de carbono era maltose ou glicose.

**Tabela 1 –** Produção de nattokinase por *Bacillus subtilis* natto variando a concentração de diferentes fontes de carbono e nitrogênio

Ensaio	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	U
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	264,57
2	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	225,62
3	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	458,58
4	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	740,37
5	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	437,23
6	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	369,81
7	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	329,74
8	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	561,57
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	610,04
10	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	747,12
11	-1	1	-1	1	-1	1	1	-1	531,61
12	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	538,13
13	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	479,18
14	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	439,25
15	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	569,59
16	1	1	1	1	1	1	1	1	950,11

Variáveis		Níveis	
		-1	1
Concentração (%)			
X1	Sacarose	1	5
X2	Glicose	1	5
X3	Glicerol	1	5
X4	Maltose	1	5
X5	Peptona de soja	1	2
X6	Caseína	1	2
X7	Extrato de levedura	0,2	0,5
X8	Glutamato de sódio	2	4

(\*) Os ensaios foram realizados aleatoriamente

**Tabela 2 – Análise de variância (ANOVA)**

<b>Fonte de variação</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Grau de liberdade</b>	<b>Quadrado médio</b>	<b>F</b>	<b>P-valor</b>
Sacarose	7947,02	1	7947,02	3,77133	0,093261
Glicose	12252,09	1	12252,09	5,81434	0,046685*
Glicerol	4,18	1	4,18	0,00198	0,965712
Maltose	21830,89	1	21830,89	10,36005	0,014680*
Peptona de soja	22897,24	1	22897,24	10,86609	0,013186*
Caseína	758,62	1	758,62	0,36001	0,567408
Extrato de levedura	2803,84	1	2803,84	1,33059	0,286561
Glutamina	1089,74	1	1089,74	0,51715	0,495361
Erro	14750,54	7	2107,22		
Total SS	84334,16	15			

$R^2=0,82509$  (\*) Significativos para valores de  $p<0,05$

### CONCLUSÕES

Dentre as fontes de carbono e nitrogênio estudadas, apenas glicose, maltose e peptona de soja apresentaram efeito significativo na produção de nattokinase por *Bacillus subtilis* natto. Estas variáveis mostraram um efeito positivo, sendo que maiores concentrações desses componentes elevam a produção de nattokinase.

**Agências de Fomento:** UEL- Bolsa de Iniciação Científica da aluna Laís Soares Medina.

### REFERÊNCIAS

- DEEPAK, V.; KALISHWARALAL, K.; RAMKUMARPANDIAN, S.; BABU, S. V.; SENTHILKUMAR, S. R.; SANGILIYANDI, G. Optimization of media composition for Nattokinase production by *Bacillus subtilis* using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 8170-8174, 2008.
- JANG, Y.; 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. Nattokinase improves blood flow by inhibiting platelet aggregation and thrombus formation. **Laboratory Animal Research**, v. 29, n. 4, p. 221-225, 2013.
- PENG, Y.; YANG, X.; ZHANG, Y. Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity in vivo. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, n. 2, p. 126-132, 2005.
- WANG, J.K.; CHIU, H.H.; HSIEH, C.S. Optimization of the Medium Components by Statistical Experimental Methods to Enhance Nattokinase Activity. **Fooyin Journal of Health Science**, v. 1, n. 1, p. 21-27, 2009.