



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

ELLEN LEAL CLEMENTINO

PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO INTEGRADA DE PROTEASE FIBRINOLÍTICA POR
***Mucor subtilissimus* UCP 1262**

RECIFE
2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

ELLEN LEAL CLEMENTINO

**PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO INTEGRADA DE PROTEASE FIBRINOLÍTICA POR
Mucor subtilissimus UCP 1262**

Trabalho de dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biociência Animal.

Área de concentração: BIOTECNOLOGIA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. TATIANA SOUZA PORTO

RECIFE

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

C626p Clementino, Ellen Leal
Produção e purificação integrada de protease fibrinolítica por *Mucor subtilissimus*
UCP 1262 / Ellen Leal Clementino. – 2016.
45 f. : il.

Orientadora: Tatiana Souza Porto.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, BR-PE, 2016.
Inclui referências.

1. Protease fibrinolítica 2. *Mucor subtilissimus* 3. Farinha de soja 4. Fermentação extrativa 5. PEG 6. Sulfato de sódio I. Porto, Tatiana Souza, orient. II. Título

CDD 636.089

ELLEN LEAL CLEMENTINO

**PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO INTEGRADA DE PROTEASE FIBRINOLÍTICA POR
Mucor subtilissimus UCP 1262**

Trabalho de dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biociência Animal.

Área de concentração: Biotecnologia

Data da Defesa: 26 de Fevereiro de 2016.

Resultado: APROVADA

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Tatiana Souza Porto
Presidente

Prof^o. Dr. Bruno Severo Gomes
Membro Titular externo

Prof^o. Dr. Emmanuel Viana Pontual
Membro Titular externo

Dr^a. Márcia Nieves Carneiro da Cunha
Membro Titular interno

Prof^a. Dr^a. Camila Souza Porto
Membro Suplente

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 PROTEASES.....	3
2.1.1 Proteases fibrinolíticas.....	6
2.1.2 Aplicações de proteases fibrinolíticas	7
2.2 PRODUÇÃO DE PROTEASES POR MICRO-ORGANISMOS	8
2.2.1 Proteases fúngicas	9
2.3 PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO INTEGRADA DE PROTEASES POR SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS (SDFA)	11
3. OBJETIVOS.....	14
3.1 Geral	14
3.2 Específicos	14
REFERÊNCIAS	15
4. ARTIGO.....	20
PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO INTEGRADA DE PROTEASE FIBRINOLÍTICA de <i>Mucor subtilissimus</i> UCP 1262	21
RESUMO	21
ABSTRACT.....	21
INTRODUÇÃO.....	22
MATERIAL E MÉTODOS.....	23
RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
CONCLUSÃO	32
AGRADECIMENTOS.....	32
REFERÊNCIAS	32

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

TABELA 1. Aplicações das enzimas obtidas de plantas, animais e micro-organismos..... Pág 5

ARTIGO

TABELA 1. Níveis e valores das variáveis independentes do planejamento fatorial completo 2^3 para fermentação extrativa de protease fibrinolítica em PEG/Sulfato de sódio..... Pág 27

TABELA 2. Matriz do planejamento fatorial 2^3 e resultados para as variáveis respostas: atividade fibrinolítica na fase PEG e Sal (Sulfato de Sódio), coeficiente de partição (K), rendimento (Y) e atividade específicas (AE) na fase PEG e Sal das fermentações extrativas. C = ensaios de níveis centrais.....Pág 34

TABELA 3: Efeito de íons na atividade proteásica da protease de *Mucor subtilissimus* UCP 1262 em Fermentação extrativa utilizando PEG/Sulfato de sódio.....Pág 40

TABELA 4: Efeito dos surfactantes na atividade proteásica da protease produzida por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 em Fermentação extrativa utilizando PEG/Sulfato de sódio.....Pág 41

TABELA 5: Efeito dos inibidores na atividade da protease fibrinolítica produzida por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 em Fermentação extrativa utilizando PEG/Sulfato de sódio.....Pág 41

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 1: Esquemática da formação de uma ligação peptídica entre dois aminoácidos.....Pág 3

FIGURA 2: Vista microscópica de um trombo sanguíneo e seus componentes (elementos figurados do sangue e fibrina).....Pág. 6

FIGURA 3. (A) e (B): Vista macroscópica e; (C), (D) e (E): microscópica do fungo do gênero *Mucor*.....Pág 10

FIGURA 4. Representação simplificada do processo integrado do SDFA e fermentação para produtos extracelulares. Fonte: Rito-Palomares (2004).....Pág 12

ARTIGO

FIGURA 1. Curva de crescimento e produção de protease fibrinolítica ao longo de 120 horas por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 em farinha de soja (Biomassa: \blacktriangle ; Atividade Fibrinolítica: \blacktriangle) e farinha de trigo (Biomassa: \square ; Atividade fibrinolítica: \blacksquare), 1% de glicose, 120rpm e 30°C.....Pág 32

FIGURA 2.(A) Gráfico de Pareto dos principais efeitos das variáveis independentes (1: Massa molar PEG – M_{PEG} ; 2: Concentração de PEG – C_{PEG} ; 3: Concentração de Na_2SO_4 – $C_{Na_2SO_4}$) para a recuperação enzimática (Y); **(B)** Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos da interação entre Concentração (C_{PEG}) e Massa Molar do PEG (M_{PEG}) tendo como variável resposta o rendimento (Y)...Pág 36

FIGURA 3. Representação da eletroforese SDS-PAGE (12%) e do zimograma de fibrina. (1) Marcador de massa molecular da proteína; (2) Fase sal da fermentação extrativa com PEG 8.000 e Sulfato de sódio; (3) Extrato bruto obtido através da fermentação homogênea; (4) Zimograma de fibrina da fase sal da fermentação extrativa, a seta indica a zona de degradação da fibrina (área clara).....Pág 37

FIGURA 4: Temperatura ótima da protease fibrinolítica produzida por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 em Fermentação extrativa utilizando PEG/Sulfato de sódio.....Pág 38

FIGURA 5: Estabilidade a várias temperaturas da protease fibrinolítica produzida por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 em Fermentação extrativa utilizando PEG/Sulfato de sódio (após 60 minutos de reação).....Pág 38

FIGURA 6: pH ótimo da protease fibrinolítica produzida por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 em Fermentação extrativa utilizando PEG/Sulfato de sódio.....Pág 39

FIGURA 7: Estabilidade aos vários pH da protease fibrinolítica produzida por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 em Fermentação extrativa utilizando PEG/Sulfato de sódio (após 60 minutos de reação).....Pág 39

RESUMO

As proteases fibrinolíticas, em virtude do seu potencial para uso no tratamento de trombose, têm chamado a atenção de pesquisadores, pois tal doença é uma das principais causas de morte no mundo. O objetivo desta pesquisa foi produzir e extrair de forma integrada a protease fibrinolítica por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 através de fermentação extrativa utilizando Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFA) PEG/Sulfato de sódio. Foram realizadas fermentações homogêneas alterando a fonte de nitrogênio (farinha de soja ou trigo - 1%), fonte de carbono com 1% de glicose, agitação de 120 rpm e temperatura de 30°C. Os ensaios das fermentações extrativas foram constituídos através de um planejamento fatorial 2³, modificando a massa molar do PEG (4000, 6000 e 8000 g/mol), concentração do PEG (18, 24 e 30%) e concentração do sal (10; 11,5 e 13%). Após 72 horas de fermentação, a protease fibrinolítica teve sua melhor produção na farinha de soja obtendo 13,43 U/mL e com atividade específica de 749,27 U/mg em cultivos homogêneos. No entanto na fermentação extrativa, a fase rica em sulfato de sódio apresentou 15,40 U/mL de atividade fibrinolítica e 34,17 U/mg de atividade específica no ensaio composto por concentração de sulfato de sódio (10%) e de PEG (18%) e massa molar do PEG (8000 g/mol), tendo recuperação (Y) de 80% da protease fibrinolítica. A protease tem pH ótimo 7,0 e estabilidade entre os valores de pH 6,0 e 8,5, e temperatura ótima aos 50°C, sendo estável entre 10°C a 50°C. Tem especificidade semelhante à enzima quimiotripsina e foi classificada como uma serino protease, apresentando massa molar de 52kDa. Deste modo foi possível pré-purificar a protease fibrinolítica com um processo de baixo custo e de considerável rapidez quando comparado a outras técnicas de produção e purificação isoladas substituindo etapas iniciais de processos de separação convencionais.

Palavras-chave: protease fibrinolítica, *Mucor subtilissimus*, fermentação extrativa, PEG, Sulfato de sódio, SDFA.

ABSTRACT

The fibrinolytic proteases, due to its potential use in the treatment of thrombosis, have drawn attention from researchers because such diseases are a leading cause of death worldwide. The objective of this research was to produce and extract simultaneously the fibrinolytic protease by *Mucor subtilissimus* UCP 1262 through extractive fermentation with PEG/sodium sulfate. Homogeneous fermentations were carried out by changing the nitrogen source (soybean flour or wheat -1%), carbon source with 1% glucose, agitation 120 rpm and 30°C. Extractive fermentation assays were made using a 2³ factorial design, changing the PEG molar mass (4,000, 6,000 and 8,000 g/mol), the PEG concentration (18, 24 and 30%) and salt concentration (10; 11,5; 13%). After 72 hours fermentation, the fibrinolytic protease had its best output in soy flour obtaining 13.43 U/mL and specific activity 749.27 U/mg in homogeneous cultures. However in the extractive fermentation, the sodium sulfate rich phase showed 15.40 U/mL fibrinolytic activity and 34.17 U/mg for specific activity in the assay comprises of sodium sulphate concentration (10%) and PEG (18%) and PEG molar mass (8000g/mol) and yields (Y) of 80% of the fibrinolytic protease. The protease has a pH optimum between 7.0 and stability pH 6.0 to 8.5 and optimum temperature 50°C, stable between 10°C to 50°C. It has similar specificity to chymotrypsin enzyme it has been classified as a serine protease having molecular weight of 52-kDa. Thus it was possible to pre-purify the fibrinolytic protease having a low cost process and considerably faster when compared to other isolated production and purification techniques by replacing the initial stages of conventional separation processes.

Keywords: fibrinolytic protease, *Mucor subtilissimus*, extractive fermentation, PEG, sodium sulphate, ATPS.

1. INTRODUÇÃO

Devido as suas diversas aplicabilidades na área médica e industrial, as proteases têm conquistado um amplo espaço no comércio de enzimas em todo mundo, representando cerca de 60% do total das vendas nesse setor. Já existe uma grande variedade de proteases utilizadas comercialmente que variam de aditivos implementados em detergentes à proteases eficazes na indústria terapêutica. As proteases terapêuticas têm sido alvo de vários estudos onde, geralmente são bem avaliadas devido a sua alta especificidade (LI, 2013). Dentre essas proteases encontra-se um grupo que é capaz de degradar a fibrina, o principal componente proteico dos coágulos de sangue, e por ter essa capacidade são denominadas proteases fibrinolíticas. Estas enzimas são utilizadas na prevenção e tratamento de doenças trombóticas através da degradação de coágulos, conservando assim o trânsito sanguíneo em locais com lesão vascular (CHOI et al, 2014).

O uso de ativadores de plasminogênio para o tratamento de doenças trombóticas tem sido utilizado como alternativa para a terapia fibrinolítica a mais de 30 anos (DRAXLER et al, 2015). Tais ativadores são sintetizados pela engenharia genética e possuem alta afinidade com a fibrina se tornando um agente de origem humana seguro, entretanto, de alto custo (TIAN et al, 2015). Diante dessa dificuldade têm-se estimulado a utilização de micro-organismos para se obter as proteases fibrinolíticas que tenham alta eficácia, baixo custo e maior capacidade de produção (DEEPAK et al, 2011).

As indústrias têm buscado eficiência industrial e econômica nos processos de separação e purificação de biomoléculas que garantam grandes rendimentos e pureza (NALINANON et al, 2009). A fermentação extrativa utilizando Sistemas de Duas Fases Aquosas (SDFA) tem sido sugerida como solução para superar a inibição dos produtos e a baixa produtividade dos processos biotecnológicos (DELOISA et al, 2009).

O SDFA é formado por mútua incompatibilidade entre dois polímeros ou um polímero e um sal em solução aquosa (ALBERTSSON, 1986) e fornece uma alternativa eficiente para a purificação de biomoléculas por partição entre duas fases líquidas. Esses sistemas contêm cerca de 80-90% de água e, assim, proporcionam um excelente ambiente para células, organelas celulares e substâncias biologicamente ativas (BANIK et al, 2003).

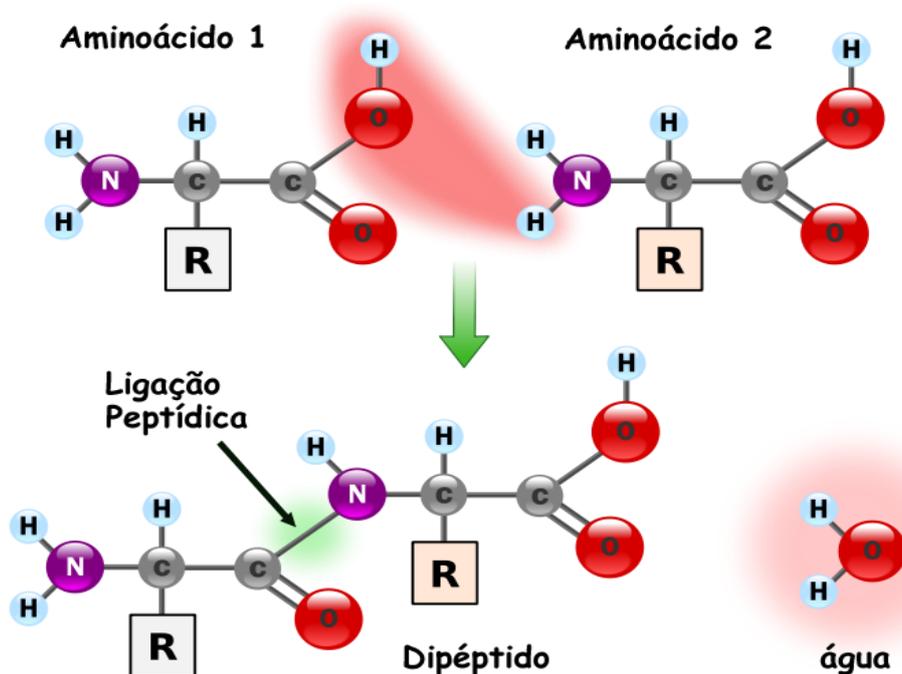
Desta forma, considerando o potencial biotecnológico dos produtos bioativos produzidos por espécies fúngicas, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção e purificação integrada de protease fibrinolítica por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 utilizando fermentação extrativa, além de caracterizar bioquimicamente a protease fibrinolítica extraída.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PROTEASES

As proteases ou peptidases, enzimas que hidrolisam ligações peptídicas em proteínas e fragmentos de proteínas (Figura 1), são catalisadores eficientes e específicos (BIN, 2009). Constituem uma grande família de enzimas (EC 3.4), dividida em endopeptidases (EC 3.4.21-99) e exopeptidases (EC 3.4.11-19), classificadas de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada. Também podem ser classificadas de acordo com a faixa de pH em que apresentam maior atividade: ácidas (pH 2,0-6,0), neutras (pH 6,0-8,0) e alcalinas (pH 8,0-13,0) (SOUZA et al, 2015). Tais proteases causam modificações irreversíveis em seus substratos que podem ter importância biológica de diferentes maneiras (KOTB, 2013).

FIGURA 1: Esquemática da formação de uma ligação peptídica entre dois aminoácidos.



A função dessas proteínas é essencial para muitos processos fisiológicos e patológicos, como o catabolismo de proteínas, coagulação do sangue, crescimento e migração celular, inflamação, diferenciação de tecidos, crescimento de tumores e metástases, liberação de hormônios peptídeos farmacologicamente ativos a partir de proteínas precursoras, ativação de neurotransmissores e transporte e secreção de

proteínas através da membrana (RAWLINGS, MORTON e BARRET, 2007). Portanto, as proteases extracelulares catalisam a hidrólise de proteínas em peptídeos para posterior absorção pela célula, enquanto as proteases intracelulares possuem um papel importante na regulação do organismo (SOUZA et al., 2015). Desta forma, o interesse pelas proteases tem-se aumentado, visto que podem ser alvo para desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (BAJAJ et al, 2013).

Considerando que as proteases são fisiologicamente necessárias à sobrevivência de todos os seres vivos, elas podem ser obtidas de diferentes fontes, como plantas, animais e micro-organismos e têm aplicações em diversas indústrias (Tabela 1).

As proteases provenientes de organismos vegetais requerem um processo de obtenção mais demorado, em virtude da disponibilidade da área para cultivo e também das condições climáticas. Em destaque, tem-se a papaína, extraída do mamão e a bromelina, extraída do abacaxi. As proteases de origem animal dependem da disponibilidade dos animais para o abate, tornando o processo oneroso (RAO et al., 2007; COELHO et al., 2013). Já as proteases produzidas por micro-organismos são as mais desejáveis uma vez que elas possuem todas as características essenciais para aplicações biotecnológicas, onde através dos micro-organismos pode-se aumentar a produção das proteases, permitindo um menor tempo de geração da enzima através da manipulação genética (COELHO et al., 2013).

TABELA 1. Aplicações das enzimas obtidas de plantas, animais e micro-organismos.

ENZIMA	FONTE DE OBTENÇÃO	APLICAÇÃO	REFERÊNCIAS
Estreptoquinase e uroquinase	<i>Pichia pastoris</i> recombinada; urina humana e fibroblastos	Tratamento de tromboembolias incluindo infarto do miocárdio, por via intravenosa	Zimmer et al, 2009
Papaína e quimopapaína	Extraídas do látex do mamão	Usadas no debridamento de feridas, escaras e enxerto de pele; tratamento de hérnia de disco	Zimmer et al, 2009 e Lima et al, 2011
Proteases como tripsina e quimotripsina	Pâncreas bovino e suíno	Usadas associadas a analgésicos ou antibióticos para tratamento de condições inflamatórias	Coelho et al, 2013
Amilases, bromelina	Pâncreas bovino e suíno; abacaxi	Auxiliar digestivo	Coelho et al, 2013
Hialuronidase	Testículos de bovinos	Agente dispersante e para infecções	Coelho et al, 2013
Proteases alcalinas	<i>Aspergillus melleus</i> , <i>Mucor miehei</i> , <i>Mucor pusillus</i>	Manufatura de queijo (coagulação do leite)	Sathya et al, 2010
Protease fibrinolítica	<i>Bacillus</i> sp. UFPEDA 485	Degradação de coágulos sanguíneos	Sales et al, 2013
Protease fibrinolítica	<i>Mucor subtilissimus</i> UCP 1262	Degradação de coágulos sanguíneos	Nascimento et al, 2015

Nos últimos anos as proteases têm sido bastante utilizadas nas indústrias farmacêuticas devido a sua alta atividade catalítica que permite a administração de menores doses nos tratamentos, além de ter uma melhor eficácia e menos efeitos colaterais do que os medicamentos já disponíveis (LI et al., 2013).

Essas enzimas terapêuticas têm se representado como alvo de drogas potenciais no combate a doenças, estudos sugerem que cerca de 60 proteases humanas são alvos de drogas, por exemplo, no retardo da AIDS demonstrando um sucesso terapêutico substancial nos últimos anos e também no combate a doenças

cardiovasculares (CASTRO et al., 2011; RAVIKUMAR et al., 2012), câncer, e na ação contra parasitas e outros vírus (ZIMMER et al., 2009).

2.1.1 Proteases fibrinolíticas

A fibrina é o principal componente dos coágulos sanguíneos (Figura 2), que são formadas a partir da ativação do fibrinogênio pela ação da trombina. Durante a degradação, a fibrina insolúvel é hidrolisada em produtos de fibrina degradados por plasmina (KIM et al., 2011).

FIGURA 2: Vista microscópica de um trombo sanguíneo e seus componentes (elementos figurados do sangue e fibrina).



Existem mais de vinte enzimas no corpo que contribuem com a coagulação do sangue enquanto que apenas uma, a plasmina, pode quebrar e remover o coágulo. As enzimas dependentes de plasminogênio para a sua atividade são enzimas que inicialmente precisam ativar o plasminogênio sanguíneo formando consequentemente a plasmina que hidrolisa as redes de fibrina (CHITTE et al., 2011).

Há necessidade de se investigar enzimas fibrinolíticas específicas que superem as desvantagens dos agentes trombolíticos já disponíveis no mercado, como alto custo e efeitos colaterais como hemorragia intestinal quando administrados oralmente (DEEPAK, 2011). Entretanto, para o sucesso da aplicação na indústria, apesar da facilidade de obtenção e produção de enzimas fibrinolíticas

por micro-organismos ainda tem um fator limitante: sua extração e purificação, devido, principalmente, aos altos custos que essas etapas possuem.

2.1.2 Aplicações de proteases fibrinolíticas

Para o tratamento de doenças envolvendo distúrbios cardiovasculares, a aplicação de proteases com atividade fibrinolítica tem sido de grande importância (LU et al., 2010), na indústria alimentícia, de cosméticos e em vários processos biotecnológicos e em produtos já comercialmente estáveis e difundidos pelo mundo, como as pomadas cicatrizantes, que em sua composição existem enzimas fibrinolíticas (GIRÓN et al, 2013).

As doenças cardiovasculares como infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e doenças tromboembólicas venosas são a principal causa de morte em todo o mundo. No Brasil, são responsáveis por 30% de todas as mortes registradas em um ano no país, isso significa que mais de 308 mil pessoas faleceram por causa das doenças cardiovasculares. A alta frequência do problema coloca o Brasil entre os 10 países com maior índice de mortes por doenças cardiovasculares (BRASIL, 2014). Tais doenças dependem de fatores e heranças genéticas e estilo de vida, principalmente aos costumes relacionados à alimentação e prática de exercícios físicos. Nesse aspecto, os jovens merecem destaque, por razão do sedentarismo e hábitos dietéticos errôneos ocasionando obesidade, um dos maiores fatores de risco para síndromes cardiovasculares, como por exemplo, anginas, embolias, infartos e trombose (BRASIL, 2014).

Uma das principais doenças cardiovasculares que ocorrem mais comumente é a trombose. Ela atinge cerca de 1,5 milhão de brasileiros e é responsável por cerca de 20% dos casos de AVC (Acidente Vascular Cerebral) registrados (BRASIL, 2014). A trombose é provocada por uma falha no sistema fibrinolítico, e é uma doença frequentemente letal, responsável pelo aumento do número de mortes a cada ano e que surge como consequência de doenças, ou de procedimentos cirúrgicos ou de acidentes (LU et al., 2010).

Os trombos são compostos por fibrina e elementos figurados do sangue. Um coágulo sanguíneo desenvolvido no sistema cardiovascular pode causar bloqueio vascular levando a sérias consequências, inclusive à morte. Um sistema hemostático saudável suprime o desenvolvimento de coágulos de sangue na circulação normal, mas reage ativamente caso haja injúria vascular (LU et al., 2010).

O uso de enzimas na produção de medicamentos e a utilização desses produtos como fatores terapêuticos compreende uma grande parcela do mercado farmacêutico global, com probabilidades de crescimento, já que, se faz necessário conhecer novas informações sobre como essas moléculas funcionam nos processos clínicos a que são empregadas (CHITTE et al., 2011).

2.2 PRODUÇÃO DE PROTEASES POR MICRO-ORGANISMOS

Os micro-organismos são uma excelente fonte de proteases devido à sua variedade bioquímica de seus produtos e à manipulação genética, bem como a facilidade de serem cultivados em larga escala e proporcionando altos rendimentos (KUMAR et al., 2011; SOUZA et al., 2015). Devido à maioria das proteases serem secretadas extracelularmente, ou seja, diretamente no caldo fermentado, o processo de recuperação e purificação torna-se mais simples e sendo assim mais rápido, mais fácil e com menor custo. Além disso, as proteases microbianas são importantes devido a sua aplicabilidade e atuação sobre diversos substratos específicos (KUMAR et al., 2011).

O processo fermentativo, em síntese, consiste na mistura de um micro-organismo selecionado a um substrato específico por um determinado tempo com temperatura e pH adequados, para que o micro-organismo degrade o substrato e se reproduza às custas da utilização dos nutrientes disponíveis, sendo a composição do meio um fator de fundamental importância para o desenvolvimento do cultivo (RAO et al., 2007).

A utilização de derivados da soja, como a farinha de soja e proteína de soja tem sido excelentes fontes de nitrogênio (ALI, 2008; KUMAR et al., 2011), além de também ser necessário para o micro-organismo a utilização de fontes de carbono e sais minerais. Os componentes do meio de cultivo podem ser combinados com parâmetros operacionais do processo tais como temperatura, agitação e aeração para obtenção da molécula alvo (KUMAR et al., 2011).

Processos fermentativos envolvendo micro-organismos têm sido amplamente estudados devido a seu potencial em produzir proteases. Comumente, os micro-organismos são os mais escolhidos quando comparado a outras fontes produtoras de proteases, devido ao seu rápido crescimento e cultivo, e à grande atividade que possuem (RAO et al., 2007). O fato das proteases serem produzidas por uma

variedade de bactérias, vírus e fungos, torna os micro-organismos os maiores responsáveis pela produção de proteases utilizadas nas indústrias (MUKHERJEE e RAI, 2012).

2.2.1 Proteases fúngicas

Por produzirem diversas enzimas e metabólitos, os fungos filamentosos são utilizados em vários processos industriais (SOUZA et al., 2015). Calcula-se que aproximadamente 60% das enzimas que são comercializadas, tem origem fúngica (ERJAVEC et al., 2012), sendo estas de fácil obtenção e reguladas, em primeira instância, a partir da constituição das fontes de carbono, nitrogênio, além do pH do meio de cultivo (YIKE, 2011).

Os fungos filamentosos têm a capacidade de se propagar em meios de baixo custo, em especial as espécies do gênero *Aspergillus* que são alvo de estudos por produzirem grandes quantidades de enzimas quando cultivados em fermentação submersa (SHIRASAKA et al, 2012). Já os fungos do gênero *Penicillium* são conhecidos devido a sua grande capacidade de secretar proteases, principalmente proteases alcalinas em meio líquido (SOUZA et al., 2015).

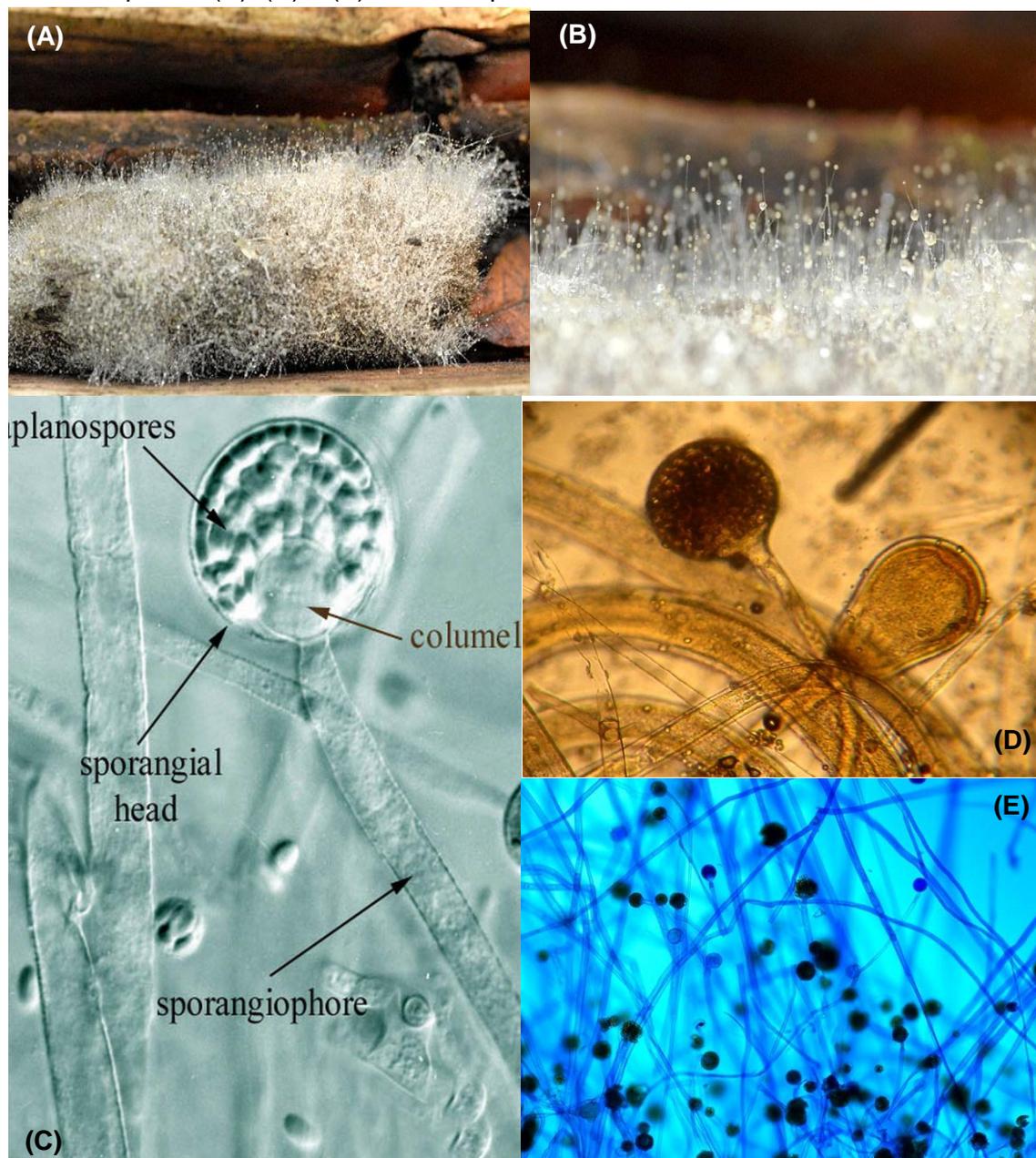
O gênero *Mucor*, e suas espécies são utilizadas na fermentação de alimentos de soja em países orientais (ZHANG et al., 2013), e também são fortemente aplicados na coagulação do leite, na indústria do queijo, na produção de etanol e na produção de proteases (SOUZA et al., 2015), sendo também um grande produtor de protease fibrinolítica (NASCIMENTO et al., 2015).

O gênero *Mucor* possui aproximadamente 3 mil espécies, distribuídas no solo, nas plantas, nos vegetais em decomposição e até nas fezes de animais herbívoros (ZHANG et al., 2013). Reproduzem-se de forma assexuada por aplanósporos formados nos esporângios e clamidósporos e sexuadamente pela fusão de dois gametângios originando o zigósporo, estando os gametângios no mesmo micélio ou de micélios diferentes (ALVES et al, 2005).

A espécie *Mucor subtilissimus* (Figura 2), integra a ordem Mucorales, que pertence a um grupo filogeneticamente antigo de fungos, também pertencentes os gêneros *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Absidia*, *Lichtheimia*, *Corymbifera*, *Cunninghamella* e *Blakeslea* (PHULPIN-WEIBEL et al, 2013), e pode ser reconhecida macroscopicamente pela formação de suas colônias com aparência de lã com

pequenos pontos (Figura 3 A e B), denominados esporângios, após alguns dias de cultivo, indicando o início da esporulação, e microscopicamente por apresentar hifas grossas e asseptadas (Figura 3 C, D e E), com esporângios circulares, medindo cerca de 20 a 80 μ m, contendo em seu interior esporangiosporos ramificados e sem rizóides, com 3 a 5 μ m de diâmetro (SHARIFIA, 2007).

FIGURA 3. Prancha de fotos referentes ao do fungo do gênero *Mucor* (A) e (B): Vista macroscópica e; (C), (D) e (E): microscópica.



O grande potencial biotecnológico dos representantes do gênero *Mucor* é evidenciado através de vários estudos já mencionados, porém é necessário salienta

que em qualquer processo de produção de biomoléculas existe uma fase de produção do produto, e outra fase relativa à recuperação e a purificação desse produto. Enzimas produzidas por fungos, geralmente são secretadas de forma extracelular e tal maneira, facilita a etapa do processo de recuperação (YEGIN et al, 2011).

2.3 PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO INTEGRADA DE PROTEASES POR SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS (SDFAs)

A partir da década de 80, a biotecnologia e seus processos se tornavam cada vez mais importantes por oferecer diversas vantagens sobre a composição química e separação de biomoléculas, porém ainda de forma limitada (WETHEARLY, 2014). Ao decorrer dos anos, o desenvolvimento de técnicas de separação e purificação de biomoléculas ganhou um grande espaço para estudos e se tornou um importante critério para a maioria dos estudos na área de biotecnologia. Uma técnica de extração e purificação que tem sido estudada ao longo de vários anos, alinha baixo custo e altos rendimentos envolve a partição de biomoléculas por duas ou mais fases imiscíveis nos sistemas aquosos (ROSA et al., 2010).

O Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFAs) é uma técnica multifuncional para separação de moléculas químicas ou de origem biológica. São formados pela mistura de dois polímeros de cadeias flexíveis em água ou de um polímero e um sal em determinadas concentrações (ROSA et al., 2010; ASENJO; ANDREWS, 2012). No processo de partição as interações hidrofóbicas e hidrofílicas provenientes do sistema com o produto são de fundamental importância, pois são elas que auxiliarão a molécula a migrar para uma das fases de acordo com suas propriedades físico-químicas (ROSA et al., 2010).

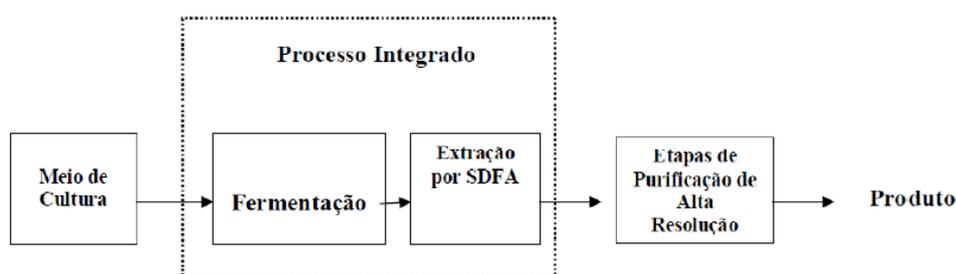
Como vantagens, os SDFAs alinham a facilidade no aumento da escala, rápida transferência de massa, equilíbrio alcançado com recursos de baixa energia na forma de mistura mecânica, possibilidade de operação rápida e seletiva, possibilidade de manuseio à temperatura ambiente, além de ser mais econômico que outros processos de separação (ALBERTSSON, 1986). Outra vantagem desse sistema é a alta quantidade de água utilizada, que varia de, aproximadamente, 85 - 99%, permitindo a partição de biomoléculas e partículas celulares sem desnaturá-las. Alterando a concentração e a composição dos polímeros e dos sais, pode-se

modificar as propriedades físicas dos sistemas, o que auxilia uma melhor partição de compostos (GAVASANE; GAIKAR, 2013).

Nos sistemas bifásicos aquosos existem variáveis que podem induzir a separação das moléculas entre as fases, podendo ser classificadas como inerentes ao próprio sistema, como os componentes do sistema, massa molar do polímero, concentração do polímero ou do sal, pH e temperatura, ou variáveis referentes à molécula alvo, como a hidrofobicidade, distribuição de cargas, ponto isoelétrico e massa molar (BANIK E SANTHIAGU, 2012). Além disso, as forças de Van de Waals, ligações de hidrogênio e interações iônicas das moléculas interferem na migração no sistema (ROSA et al., 2010). Por isso é necessário conhecer tais variáveis para que se obtenha sucesso no processo de separação da molécula alvo.

Apesar de o S DFA ser comumente usado em processos de purificação pós-fermentativo, seu uso pode ser ampliado quando envolvido no próprio processo de fermentação, através da fermentação extrativa. Nesse processo de fermentação existe a integração entre a secreção do produto e sua purificação em uma única etapa. Sendo assim, a fermentação extrativa é o processo pelo qual ocorre a integração entre a produção e a recuperação da molécula *in situ* (Figura 4) (BANIK; SANTHIAGU, 2012).

FIGURA 4. Representação simplificada do processo integrado do S DFA e fermentação para produtos extracelulares. Fonte: Rito-Palomares (2004).



Devido à alta concentração de água no S DFA, o meio se torna compatível para o cultivo de células microbianas, além de ter baixa tensão interfacial (LEE et al., 2012; CHEN; LEE, 2012). Ainda assim, é necessário observar a concentração dos polímeros e sais utilizados para não influenciar na taxa de oxigênio dissolvido, pois é um fator importante. O aumento da quantidade de polímero e de sais causa a

diminuição da taxa de transferência de oxigênio no meio de cultivo, reduzindo a difusão e solubilidade do oxigênio e limitando o crescimento celular (CHEN; LEE, 2012).

O resultado ideal que se espera na fermentação extrativa é que as células se concentrem de preferência em uma das fases do sistema, ao mesmo tempo em que a biomolécula alvo se concentre na fase oposta. Nessa situação padrão a obtenção do produto seria facilitada, eliminando a interferência de inibidores sobre a biomolécula produzida (PARK et al, 2012).

Quando o produto é uma enzima, o alto custo da sua purificação é um dos principais obstáculos para sua comercialização (PARK et al, 2012). Pesquisas realizadas e têm buscado a redução de custos de produção e extração de enzimas (RODRIGUEZ-COUTO e SANROMAN, 2011). Por consequência disso, a utilização da fermentação extrativa com sistema de duas fases aquosas, também reduziria os custos provenientes da produção e purificação da enzima já que essas etapas seriam feitas de forma simultânea (DHAMOLE et al., 2012).

Sendo um processo em crescente desenvolvimento e propício para diversas biomoléculas e os mais variados micro-organismos, a fermentação extrativa em duas fases aquosas vem sendo aplicada na produção e purificação de enzimas como: lipase (OOI et al., 2011, SHOW et al., 2012), fosfatase alcalina (PANDEY; BANIK, 2011), tanase (RODRÍGUEZ-DURÁN et al., 2013), protease alcalina (LEE et al., 2012) e enzimas fibrinolíticas (ASHIPALA; HE, 2008, SALES et al., 2013).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Produzir e purificar de forma integrada proteases fibrinolíticas de *Mucor subtilissimus* UCP 1262 utilizando Sistemas de Duas Fases Aquosas (SDFA).

3.2 Específicos

- Produzir proteases fibrinolíticas por fermentação submersa e fermentação extrativa utilizando *Mucor subtilissimus* UCP 1262;
- Determinar as condições mais adequadas de produção e extração integradas utilizando Sistemas de Duas Fases Aquosas (PEG/Sais) através de planejamento fatorial;
- Analisar as respostas do processo de purificação por fermentação extrativa (coeficiente de partição, recuperação e aumento de pureza) para determinar a melhor condição de produção integrada e purificação com SDFA;
- Avaliar o perfil eletroforético e zimograma da protease fibrinolítica produzida na fermentação extrativa;
- Caracterizar bioquimicamente a protease fibrinolítica purificada por SDFA, quanto ao pH, temperatura, íons, surfactantes e inibidores.

REFERÊNCIAS

- ALBERTSSON, P. A. Partition of cell particles and macromolecules. **Wiley-Interscience**, New York, p. 346, 1986.
- ALI, U. F.; IBRAHIM, Z. M. Production and some properties of fibrinolytic enzyme from *Rhizomucor miehei* (Cooney & Emerson) Schipper. **Journal of Applied Science Reserach**, v. 4, p. 892-899, 2008.
- ALVES, M.H., CAMPOS-TAKAKI, G.M., OKADA, K., PESSOA, I.H.F. AND MILANEZ, A.I. Detection of Extracellular Protease in *Mucor* Species. **Revista Ibero Americana de Micologia**, 22, 114-117, 2005.
- ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: a perspective. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 8826 - 8835, 2012.
- ASHIPALA, O. K; HE, Q. Optimization of fibrinolytic enzyme production by *Bacillus subtilis* DC-2 in aqueous two-phase system (poly-ethylene glycol 4000 and sodium sulfate). **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4112–4119, 2008.
- BAJAJ, B. K.; SHARMA, N.; SINGH, S. Enhanced production of fibrinolytic protease from *Bacillus cereus* NS-2 using cotton seed cake as nitrogen source. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 204–209, 2013.
- BANIK, I.; SAIN, M. M. Water-blown soy polyol based polyurethane foams modified by cellulosic materials obtained from different sources, **Journal of Applied Polymer Science**, 112, 1974-1987, 2003.
- BANIK, R. M.; SANTHIAGU, A. Extractive fermentation for enhanced gellanhydrolysing enzyme production by *Bacillus thuringiensis* H14. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 715–720, 2012.
- BRASIL**. Radílson Carlos Gomes / Ministério da Saúde. Publicado:06/09/2011, 18h32. Última modificação:28/07/2014 12h56.
- CASTRO, H. C.; ABREU, P. A; GERALDO, R. B. Looking at the proteases from a simple perspective. **Journal of molecular recognition (JMR)**, v. 24, n. 2, p. 165–81, 2011.
- COELHO, D. F.; SILVEIRA, E.; PESSOA JUNIOR, A; TAMBOURGI, E. B. Bromelain purification through unconventional aqueous two-phase system (PEG/ammonium sulfate). **Bioprocess and Biosystems engineering**, v. 36, n. 2, p. 185–92, 2013.
- CHEN, J. P.; LEE, M. S. Enhanced production of *Serratia marcescens* chitinase in PEG/dextran aqueous two-phase systems. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 17, p. 1021–1027, 2012.

CHITTE, R. R.; DESHMUKH, S. V. Production, Purification, and Biochemical Characterization of a Fibrinolytic Enzyme from Thermophilic *Streptomyces* sp. MCMB-379. **Applied Biochemistry Biotechnology** , v.165, p. 1406–1413, 2011.

CHOI, J.H; SAPKOTA, K.; KIM, S.; KIM, S.J. Starase: A bi-functional fibrinolytic protease from hepatic caeca of *Asterina pectinifera* displays antithrombotic potential. **Biochimie**. p. 1-13, 2014.

DEEPAK, V.; PANDIAN, S.R.; KALISHWARALAL, K.; GURUNATHAN, S. Purification, immobilization, and characterization of nattokinase on PHB nanoparticles. **Bioresource. Technology** 100, 6644-6646, 2011.

DELOISA, K.M.; TREJO-HERNÁNDE, M.D.R.; RITO-PALOMARES. M. Recovery of laccase from the residual compost of *Agaricus bisporus* in aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**. 44(4), 435- 439, 2009.

DHAMOLE, P. B.; WANGA, Z.; LIU, Y.; WANGA, B.; FENG, H. Extractive fermentation with non-ionic surfactants to enhance butanol production. **Biomass and bioenergy**, v.40, p. 112 -119, 2012.

DRAHLER, D.F.; MEDCALF, R.L. The Fibrinolytic System—More Than Fibrinolysis?. **Transfusion Medicine Reviews** v.29, p. 102 -109, 2015.

ERJAVEC, J.; KOS, J.; RAVNIKAR, M.; DREO, T.; SABOTIČ, J. Proteins of higher fungi--from forest to application. **Trends in biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 259–73, 2012.

GAVASANE, M. R.; GAIKAR, V. G. Aqueous two-phase affinity partitioning of Penicillin acylase from *E. coli* in presence of PEG-derivatives. **Enzyme and Microbial Technology**, v.32, p. 665-675, 2013.

GIRÓN, M. E.; GUERRERO, B.; SALAZAR, A. M.; SÁNCHEZ, E. E.; ALVAREZ, M.; RODRÍGUEZACOSTA, A. Functional characterization of fibrinolytic metalloproteinases (colombienases) isolated from *Bothrops colombiensis* venom. **Toxicon**, v. 74, p.116–126, 2013.

http://2.bp.blogspot.com/-Kj58MiVYwGM/TZjDidiqxAI/AAAAAAAAAGac/Nz9TAI4HRm0/s1600/Mucor%2Bspecies%2BNo3_100X.jpg. Acesso em 11/02/2016, às 23h33.

FIGURA 1: http://www.explicatorium.com/quimica/images/formacao_da_ligacao_peptidica.png. Acesso em 11/02/2016, às 23h17.

FIGURA 2: <http://www.invitra.pt/wp-content/uploads/2014/12/Co%C3%A1gulos-de-sangue.jpg>. Acesso em 11/02/2016, às 23h23

FIGURA 3: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/08/Mucor_spec._-_Lindsey_1b.jpg. Acesso em 11/02/2016, às 23h42.

KIM, H. C.; CHOI, B. S.; SAPKOTA, K.; KIM, S.; LEE, H. J.; CHEO, J.; KIM, S. J. Purification and characterization of a novel, highly potent fibrinolytic enzyme from *Paecilomyces tenuipes*. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1545–1553, 2011.

KOTB, E.; ABOUEL-HAWA, M.I.; TOHAMY, E.Y.; EL-MSALAMY, K. Purification of toxic protease from *Brevibacterium otitidis* KB76 with both metal and hydrosulfuryl at the active site. **Versita, Biologia** 68/5: 797—802, 2013.

KUMAR, K. R.; VENNILA, R.; KANCHANA, S.; ARUMUGAM, M.; BALASUBRAMANIAM, T. Fibrinogenolytic and anticoagulant activities in the tissue covering the stingers of marine stingrays *Dasyatissephenand Aetobatisnarinari*. **Journal of thrombosis and thrombolysis**, v. 31, n. 4, p. 464–71, 2011.

LEE, J. S.; BAIK, H. S.; PARK, S. S. Purification and Characterization of Two Novel Fibrinolytic Proteases from Mushroom, *Fomitellafraxinea*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.16, p. 264-271, 2012.

LI, J. Synthesis of polyethyleneglycols (PEGs): Derivatives and applications in biomaterials. **BME**, 430, 2013.

LI, Q.; YI, L.; MAREK, P.; IVERSON, B. L. Commercial proteases: present and future. **FEBS letters**, v. 587, n. 8, p. 1155–63, 2013.

LIMA, C. A.; FILHO, J. L. L.; NETO, B. B.; et al. Production and characterization of a study. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 16, n. 3, p. 549–560, 2011.

LU, C.; WANGY, J.; CHENZ, S. Protease Purified from *Schizophyllum commune* Culture Broth Digests Fibrins Without Activating Plasminogen. **American Journal of Chinese Medicine**; 38, (6), 1223–1231, 2010.

MUKHERJEE, A.K., RAI, S.K., THAKUR, R., CHATTOPADHYAY, P. AND KAR, S.K. Bafibrinase: A Non-Toxic, Non- Hemorrhagic, Direct-Acting Fibrinolytic Serine Protease from *Bacillus* sp. Strain AS-S20-I Exhibits *in Vivo* Anticoagulant Activity and Thrombolytic Potency. **Biochimie**, 94, 1300-1308, 2012.

NALINANON, S.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; KISHIMURA, H. Partitioning of protease from stomach of albacore tuna (*Thunnusalalunga*) by aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v.44, n.4, p.471-476, 2009.

NASCIMENTO, T.P.; SALES, A.E.; PORTO, C.S.; BRANDÃO, R.M.P; CAMPOSTAKAKI, G.M.; TEIXEIRA, J.A.C.; PORTO, T.S.; PORTO, A.L.F. Production and Characterization of New Fibrinolytic Protease from *Mucor substillissimus* UCP 1262 in Solid-State Fermentation. **Advances in Enzyme Research**, v. 3, p. 81-91, 2015.

OOI, C. W.; HII, S. L.; KAMALA, S. M. M.; ARIFF, A.; LING, T. C. Extractive purification of fermentation using aqueous two-phase systems for integrated production and extracellular lipase derived from *Burkholderia pseudomallei*. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 68.73, 2011.

PANDEY, S. K.; BANIK, R. M. Extractive fermentation for enhanced production of alkaline phosphatase from *Bacillus licheniformis* MTCC 1483 using aqueous two-phase systems. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 4226–4231, 2011.

PARK, J. E.; CHOI, H. K.; JUNG, T. W.; YOON, S. M.; LEE, J. S. Purification and characterization of three thermostable alkaline fibrinolytic serine proteases from the polychaete *Cirriiformia tentaculata*. **Process Biochemistry**, v.48, p. 979-987, 2012.

PHULPIN-WEIBEL, A.; RIVIER, A.; LEBLANC, T.; BERTRAND, Y.; CHASTAGNER, P. Focus on invasive mucormycosis in paediatric haematology oncology patients: a series of 11 cases. **Mycoses**, v. 56, p. 236–240, 2013.

RAO, K.; NARASU, M. L. Alkaline Protease from *Bacillus firmus* 7728. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 21, p. 2493–2496, 2007.

RAVIKUMAR, G.; GOMATHI, D.; KALAISELVI, M.; UMA, C. A protease from the medicinal mushroom *Pleurotus sajor-caju*; production, purification and partial characterization. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 1, p. S411–S417, 2012.

RAWLINGS, N.D., MORTON, F.R., BARRETT, A. J. An Introduction to Peptidases and the *Merops* Database. **Industrial Enzymes**. Chapter. pp 161-179, 2007.

RITO-PALOMARES, M. Practical application of aqueous two-phases partition to process development for the recovery of biological products: review. **Journal of chromatography B: Analytical technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 807, n.1, p. 3-11, 2004.

RODRIGUEZ-COUTO, S.; SANROMAN, M. A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. **Biochemistry Engineering Journal**, v. 22, p. 211-219, 2011.

RODRÍGUEZ-DURÁN, L. V.; SPELZINIB, D.; BOERISB, V.; AGUILARA, C. N.; PICÓB, G. A. Partition in aqueous two-phase system: Its application in downstream processing of tannase from *Aspergillus niger*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, p. 392– 397, 2013.

ROSA, P. A. J.; FERREIRA, I. F.; AZEVEDO, A. M.; AIRES-BARROS, M. R. J. Aqueous two-phase systems: a viable platform in the manufacturing of biopharmaceuticals. **Journal Chromatography A**, v. 1217, p. 2296, 2010.

SALES, A. E.; SOUZA, F. A. S. D. DE; TEIXEIRA, J. A.; PORTO, T. S.; PORTO, A. L. F. Integrated Process Production and Extraction of the Fibrinolytic Protease from *Bacillus* sp. UFPEDA 485. **Applied biochemistry and biotechnology**, 2013.

SATHYA, R.; PRADEEP, B. V.; ANGAYARKANNI, J.; PALANISWAMY, M. Production of milk clotting protease by a local isolate of *Mucor circinelloides* under SSF using agro-industrial wastes. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 14, n. 6, p. 788–794, 2010.

SHARIFIA, M. Production of ethanol by different morphology of *Mucor indicus*, MSc Thesis, Department of Chemical Engineering. **Isfahan University of Technology**, 2007

SHIRASAKA, N., NAITOU, M., OKAMURA, K., KUSUDA, M., FUKUTA, Y. AND TERASHITA, T. Purification and Characterization of a Fibrinolytic Protease from *Aspergillus oryzae* KSK-3. **Mycoscience**, 53, 354-364, 2012.

SHOW, P. L.; TAN, C. P.; SHAMSUL ANUAR, M.; et al. Extractive fermentation for improved production and recovery of lipase derived from *Burkholderia cepacia* using a thermo separating polymer in aqueous two-phase systems. **Bioresource technology**, v. 116, p. 226–33, 2012.

SOUZA, P.M.; BITTENCOURT, M.L.A.; CAPRARA, C.C.; FREITAS, M.; ALMEIDA, R.P.C.; SILVEIRA, D.; FONSECA, Y.M.; FERREIRA-FILHO, E.X.; PESSOA-JUNIOR, A.; MAGALHÃES, P.O. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology** 46, 2, 337-346, 2015.

TIAN, Z.; LIA, B.; GUO, L.; WU, M.; FUA, T.; CHENG, H.; ZHU, H. Purification and biochemical characterization of a novel fibrinolytic enzyme, PSLTro01, from a medicinal animal *Porcellio scaber* Latreille. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2015

WETHEARLY, L. R. Engineering processes for bioseparations. **Butterworth-Heinemann Ltd**; 2014.

YEGIN, S.; FERNANDEZ-LAHORE, M.; JOSE GAMA SALGADO, A. Aspartic proteinases from *Mucor* spp. in cheese manufacturing. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 89, n. 4, p. 949–60, 2011.

YIKE, I. Fungal proteases and their pathophysiological effects. **Mycopathologia**, v. 171, n. 5, p. 299–323, 2011.

ZHANG, X.; YUN, L.; PENG, L. Optimization of Douchi fibrinolytic enzyme production by statistical experimental methods. Journal of Huazhong University of Science and Technology. **Medical sciences**, v. 33, n. 1, p. 153–8, 2013.

ZIMMER, K. R.; BORRÉ, G. L.; TRENTIN, D. S.; WOICICKOSKI-JÚNIOR, C.; FRASSON, A. P.; GRAEFF, A. A.; GOMES, P.; MACEDO, A. J. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 10, n. 14, p. 123-137, jul./dez. 2009.

4. ARTIGO

**PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO INTEGRADA DE PROTEASE FIBRINOLÍTICA DE
Mucor subtilissimus UCP 1262**

**INTEGRATED PRODUCTION AND PURIFICATION OF FIBRINOLYTIC
PROTEASE FROM *Mucor subtilissimus* UCP 1262**

**Submetido no Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia
Qualis A2 - Medicina Veterinária**

1 **PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO INTEGRADA DE PROTEASE FIBRINOLÍTICA DE**
2 ***Mucor subtilissimus* UCP 1262**
3 **INTEGRATED PRODUCTION AND PURIFICATION OF FIBRINOLYTIC**
4 **PROTEASE FROM *Mucor subtilissimus* UCP 1262**

5
6 Ellen Leal Clementino¹, Amanda Emmanuelle Sales¹, Márcia Carneiro da Cunha¹, Ana Lúcia
7 Figueiredo Porto¹, Tatiana Souza Porto^{2*}

8
9 ¹Universidade Federal Rural de Pernambuco - Departamento de Morfologia e Fisiologia
10 Animal.

11 ²Universidade Federal Rural de Pernambuco - Unidade Acadêmica de Garanhuns.

12 *Autor de Correspondência: Endereço: Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos,
13 Recife – Pernambuco. CEP: 52.171-900. Tel: (81) 3320.6345. E-mail: portots@yahoo.com.br

14
15 **RESUMO**

16 As enzimas fibrinolíticas apresentam-se como uma alternativa na terapia de doenças
17 trombolíticas na medicina humana e veterinária. Desta forma, este trabalho objetivou avaliar a
18 produção e extração integrada da protease fibrinolítica de *Mucor subtilissimus* UCP 1262. O
19 processo integrado de produção e purificação foi realizado para avaliar a produção, partição e
20 recuperação de protease fibrinolítica segundo um planejamento experimental 2³, utilizando
21 como variáveis independentes a massa molar do PEG, concentração do PEG, e a concentração
22 do sal. O maior valor em atividade fibrinolítica (15,40 U/mL) foi obtido na fase rica em
23 sulfato de sódio no ensaio composto por 10% de sal e 18% de PEG e massa molar do PEG
24 8000 (g/mol), e foram obtidos recuperações superiores a 80%. A protease fibrinolítica
25 apresentou pH ótimo 7,0, estabilidade entre os pH 6,0 e 8,5, temperatura ótima 50°C, sendo
26 estável de 10°C a 50°C. A protease avaliada é uma serino protease, com massa molecular de
27 52kDa. Deste modo, é possível pré-purificar a protease fibrinolítica com um processo de
28 baixo custo e de considerável rapidez quando comparado a outras técnicas de produção e
29 purificação isoladas substituindo etapas iniciais de processos de separação convencionais
30 **Palavras-chave:** *Mucor subtilissimus*, protease fibrinolítica, fermentação extrativa, S DFA.

31 **ABSTRACT**

32 Fibrinolytic enzymes are alternative in therapy of thrombolytic diseases in human and
33 veterinary medicin. Thus, this study aimed to evaluate the fibrinolytic protease production and
34 integrated extraction from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 by extractive fermentation. The

35 integrated process of production and purification was carried out to evaluate the production,
36 partition and enzyme recovery according to a 2³ experimental design, using as independent
37 variables PEG molar mass, PEG concentration, and salt concentration. The highest value for
38 fibrinolytic activity (15.40 U/mL) was obtained in sodium sulfate rich phase in the assay
39 comprising 10% of salt and 18% of PEG and PEG molar mass 8000 (g/mol). Recovery
40 obtained were greater than 80%. Fibrinolytic protease presented optimum pH 7.0 and stability
41 between pH 6.0 and 8.5, and optimum temperature 50°C, stable between 10°C to 50°C.
42 Protease is a serine-protease with molecular weight at 52kDa. Therefore, it is possible to pre-
43 purify the fibrinolytic protease with a low cost process and considerably faster when
44 compared to other isolated production and purification techniques by replacing the initial
45 stages of conventional separation processes.

46 **Keywords:** *Mucor subtilissimus*, fibrinolytic protease, extractive fermentation.

47

48 INTRODUÇÃO

49 A trombose é provocada por uma falha no sistema fibrinolítico, e é uma doença
50 frequentemente letal, responsável pelo aumento do número de mortes a cada ano e que surge
51 como consequência de doenças, ou de procedimentos cirúrgicos ou de acidentes (Lu et al.,
52 2010).

53 As doenças vasculares também são relevantes na medicina veterinária, a tromboflebite
54 jugular em equinos é um exemplo de doença vascular com alta incidência, definida como a
55 obstrução completa ou parcial do fluxo sanguíneo secundária à formação de trombo,
56 acompanhada de inflamação da parede do vaso, em geral, está associado ao uso substâncias
57 endovenosas irritantes, cateterizações e traumas mecânicos (Dombusch et al., 2000; Feliciano
58 et al., 2014).

59 Segundo Dombusch (2000) o tratamento da tromboflebite jugular em equinos consiste
60 na retirada do cateter intravenoso, na utilização de anti-inflamatórios por via oral e tópica, e
61 em alguns casos, utilização de antibiótico-terapia sistêmica e/ou intervenção cirúrgica. Uma
62 medida menos invasiva para o animal seria a tentativa de solubilizar o trombo com fármacos
63 ativadores de plasminogênio, que, convertido em plasmina, degrada a fibrina, processo
64 conhecido como fibrinólise. A estreptoquinase, enzima bacteriana muito utilizada em
65 medicina humana para a trombólise medicamentosa, não é efetiva em ativar o plasminogênio
66 no equino, restando, portanto, a uroquinase, apesar de seu custo elevado e difícil obtenção.

67 Proteases fibrinolíticas degradam a fibrina, a proteína que é o maior componente dos
68 coágulos de sangue. Ela é dissolvida pela enzima fibrinolítica, plasmina (EC 3.4.21.7) que

69 mantém o fluxo sanguíneo em sítios de lesão vascular (Choi et al., 2009; Wang et al., 2011).
70 A formação do coágulo de fibrina é normalmente regulada pelo sistema biológico. Entretanto,
71 quando a fibrina não é hidrolisada em seu estado desequilibrado, ocorre a trombose, bem
72 como outros distúrbios cardiovasculares (Choi, 2011).

73 Atualmente as indústrias têm buscado eficiência industrial e econômica nos
74 processos de separação e purificação de biomoléculas que garantam rendimento e pureza
75 elevados (Nalinanon et al., 2009). Fermentação extrativa ou recuperação do produto “*in situ*”
76 tem sido sugerida como solução para superar a inibição dos produtos e baixa produtividade
77 dos processos biotecnológicos (Ashipala e He, 2008; Deloisa et al., 2009).

78 Na Fermentação Extrativa utilizando Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFa), as
79 células são particionadas em uma das fases do sistema e o produto desejado é particionado
80 para a outra fase. Uma vez que os processos de produção e separação do produto estão
81 ocorrendo simultaneamente, a compreensão dos mecanismos é essencial para a elaboração de
82 um sistema bem-sucedido (Banik et al., 2003).

83 O desenvolvimento eficiente de bioprocessos para a recuperação e purificação de
84 produtos biológicos representa uma das principais preocupações para a indústria
85 biotecnológica. A necessidade crescente por compostos de alto valor na indústria alimentícia,
86 farmacêutica e de cosméticos tem chamado a atenção para novas estratégias de
87 desenvolvimento e produção de biomoléculas de interesse (Chavez-Santoscoy et al., 2010).

88 Diante disso, o objetivo desse trabalho foi produzir e purificar protease com atividade
89 fibrinolítica de *Mucor subtilissimus* UCP 1262 através de fermentação extrativa utilizando
90 PEG e sulfato de sódio, bem como a caracterização bioquímica da enzima, visando uma
91 possível aplicação em tromboflebite jugular em equinos.

92

93 MATERIAL E MÉTODOS

94 O fungo *Mucor subtilissimus* UCP 1262 isolado do solo da Caatinga, obtido através do
95 Projeto RENNORFUN/CNPq/FACEPE, e autenticado taxonômicamente pela Universidade
96 Católica de Pernambuco (UNICAP). A linhagem fúngica foi mantida e repicada em Czapek
97 Dox Agar, incubada em estufa microbiológica a 30°C e preservada em óleo mineral.

98 Para a produção foi utilizado o meio MS-2 (Porto et al, 1996) composto por: 2,0%
99 (p/v) de farinha de soja, 0,06% (p/v) de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1% (p/v) de NH_4Cl , 0,435% (p/v) de
100 K_2HPO_4 e 0,1 mL de solução mineral (100mg de $FeSO_4$, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $ZnSO_4$, $CaCl_2 \cdot H_2O$ em
101 100 mL de água destilada, com pH inicial 7,2). E uma variação alterando o substrato de soja
102 por trigo. A autoclavagem do meio de cultivo foi a 121°C/ 1 atm de pressão, durante 20

103 minutos. Logo após utilizou-se Erlenmeyer (125 ml) contendo 50 ml de meio de produção,
104 sendo o inóculo correspondente a 10^4 esporos/mL. A fermentação homogênea foi realizada
105 em agitador orbital a 120rpm, 30°C, por 72 horas. O líquido metabólico obtido após
106 centrifugação foi utilizado para determinações analíticas.

107 A fermentação extrativa utilizando Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFA) foi
108 realizada misturando-se diferentes concentrações de PEG e sulfato de sódio (Na_2SO_4) de
109 acordo com o planejamento experimental 2^3 (Tab. 1) em que se utilizou como variáveis
110 independentes a massa molar do PEG, concentração do PEG e concentração do sal. O
111 planejamento fatorial foi composto por 8 ensaios e 4 repetições do ponto central, totalizando
112 12 ensaios. As repetições do ponto central foram feitas para possibilitar o cálculo do erro
113 experimental. Foi utilizado o meio MS-2 descrito por Porto et al. (1996), autoclavado a 121°C
114 por 20 minutos. Ao meio de soja (MS-2) foi adicionado concentrações determinadas dos
115 componentes das fases do sistema de extração (PEG e sal) para que seja composto o sistema
116 para a fermentação extrativa.

117 A fermentação extrativa foi realizada em agitador orbital a 120rpm, 30°C, por 72
118 horas. Após o período de cultivo, os ensaios da fermentação extrativa foram mantidos em
119 repouso por uma hora em temperatura ambiente para separação das fases. Após a separação
120 das fases, verificou-se os volumes das mesmas, as separou em tubos e centrifugou-as para
121 garantir a idoneidade da amostra, assegurando amostras somente com fase PEG ou amostras
122 somente com fase sal do sistema. Já as amostras da fermentação normal foram centrifugadas
123 para separação da biomassa. Todas as análises estatísticas e gráficos foram realizadas com o
124 auxílio do programa Statistica 8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

125 A determinação da atividade fibrinolítica foi realizada de acordo com a metodologia
126 descrita por Wang et al., (2011). Em que consiste, inicialmente por 0,4 mL de fibrinogênio a
127 0,72%, 0,1mL de tampão fosfato de sódio a 245 mM em pH 7, inserido em banho-maria por 5
128 minutos a 37°C. Logo após coloca-se 0,1ml de trombina equivalente a 20U/mL, por fim esta
129 solução foi incubada a 37°C por 10 minutos. Depois disto insere-se 0,1mL do líquido
130 metabólito livre de células, após 60 minutos adiciona-se 0,7mL TCA a 0,2M na reação e esta
131 será centrifugada a 12.000 rpm por 20 minutos. Por fim, retira-se 1mL do sobrenadante para a
132 leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda a 275nm, portanto 1 unidade de
133 atividade enzimática (U) é definida como a variação da absorbância de 0,01 por minuto. O
134 teor de proteínas dos extratos brutos foi determinado através do método de Bradford (1976),
135 utilizando-se albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

136 A quantificação proteásica foi determinada pelo método de Ginther (1979), que utiliza

137 azocaseína a 1% como substrato para reação, tendo como 1 unidade de atividade enzimática
138 (U) a variação de 0,01 na absorbância a 420nm por 1 hora.

139 A atividade amidolítica foi determinada pelo método de Chong et al. (2002),
140 utilizando o substrato cromogênico SApNA (succinyl phenylalanine proline alanine
141 aminotransferase p-nitroanilide) para reação. Após a incubação por 10 minutos, a 37°C. A
142 quantidade de p-nitroanilina liberada por minuto foi mensurada pela variação da
143 absorbância a 405nm, sendo 1 unidade (U) de atividade enzimática definida pela quantidade
144 de enzima requerida para a produção de 1 mol de p-nitroanilina por minuto.

145 O coeficiente de partição da protease fibrinolítica (K) foi determinado pela razão entre
146 as atividades da protease fibrinolítica na fase superior (AF_{superior}) e na fase inferior (AF_{inferior})

$$K = \frac{AF_{\text{superior}}}{AF_{\text{inferior}}}$$

147 A recuperação enzimática (Y) foi determinada por Chouyyok et al., (2005) de acordo
148 com a equação seguinte:

$$Y = \frac{100}{1 + \left(\frac{1}{Vr}\right) \times \left(\frac{1}{K}\right)}$$

149 Sendo Vr, a razão entre os volumes das fases superior e inferior.

150 Para estudo do efeito do pH na reação, o substrato para a atividade proteásica foi
151 solubilizado em diferentes tampões - acetato de sódio (pH 3,0-5,0), fosfato-citrato (pH 5,0-
152 7,0), TRIS-HCl (pH 7,0-8,5) e NaOH-glicina (pH 8,5-11,0), enquanto que no estudo da
153 estabilidade ao pH, o extrato enzimático purificado foi exposto aos mesmos tampões na
154 proporção de 1:100 e incubados a 37°C por 2h, sendo retirada alíquotas a cada 30 minutos. O
155 efeito da temperatura foi determinado pela incubação da reação para determinar a atividade
156 proteásica em temperaturas variando entre 10 e 100°C, por um período de 1h. Para
157 determinação da estabilidade à temperatura, foram retiradas alíquotas a cada 30min, durante
158 um período de exposição de 2h a várias temperaturas. Todas as alíquotas foram submetidas a
159 determinação da atividade proteásica pelo método de Ginther (1979).

160 A influência das soluções iônicas foi avaliada na concentração de 2,5mM, 5mM e
161 10mM. O extrato enzimático purificado foi exposto aos seguintes íons: sulfato de zinco
162 [(ZnSO₄).7H₂O], sulfato de magnésio [MgSO₄], sulfato de cobre [CuSO₄], sulfato de ferro
163 [FeSO₄], cloreto de cálcio [CaCl₂], cloreto de potássio [KCl], cloreto de sódio (NaCl), cloreto
164 de ferro (FeCl₃), cloreto de zinco (ZnCl₂), e incubados a 37°C por 1h. Os íons foram
165 dissolvidos em tampão TRIS-HCl NaCl pH 7,75 a 0,15 M. A atividade proteásica foi
166 determinada segundo Ginther (1979).

167 Foram realizados ensaios para avaliar o efeito de algumas substâncias na atividade da
168 enzima. O extrato enzimático purificado foi exposto a diferentes inibidores: PMSF (*fluoreto*
169 *de metilfenilsulfonil* - $C_7H_7FO_2S$), Pepstatina A ($C_{34}H_{63}N_5O_9$), β -mercaptoetanol (β -Hidroxi-
170 1-etanol - C_2H_6SO) e EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético - $C_{10}H_{16}N_2O_8$) e incubados
171 por 1h a 37°C. Os inibidores foram dissolvidos em tampão TRIS-HCl NaCl pH 7,75 a 0,15
172 M, a concentração das soluções foi padronizada em 10mM. A metodologia de determinação
173 da atividade proteásica foi determinada pelo método de Ginther (1979).

174 A influência do SDS (dodecil sulfato de sódio - $C_{12}H_{25}SO_4Na$) foi estudada nas
175 concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0 mM; O efeito do Triton X-100 ($C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$), Tween 20
176 (monopalmitato de polioxietileno sorbitano - $C_{58}H_{114}O_{26}$) e Tween 80 (monopalmitato de
177 polioxietileno sorbitano - $C_{64}H_{124}O_{26}$), foram testados a 0,5; 1,0 e 2,0%. O extrato enzimático
178 purificado foi exposto aos surfactantes e incubados a 37°C por 1h. Os surfactantes foram
179 dissolvidos em tampão Tris-HCl NaCl pH 7,75 a 0,15 M. A atividade proteásica foi
180 determinada pelo método de Ginther (1979).

181 A eletroforese SDS-PAGE foi determinada utilizando-se gel de concentração com 5%
182 de poliácridamida e gel de corrida com 12% de poliácridamida. A corrida foi realizada a
183 25mA, segundo Laemmli (1970). A coloração das proteínas foi realizada pela imersão do gel
184 por 2h em uma solução contendo 0,1% de Coomassie Blue R-250 (Fluka Fine Chemical Co.,
185 Ltd., Tokyo, Japan). Para descoloração, o gel foi imerso em uma solução de ácido acético,
186 metanol e água, na proporção de 7:40:53.

187 O zimograma foi realizado em gel de fibrina a 11% contendo 0,12% (p/v) de
188 fibrinogênio e solução de trombina (1 unidade/mL) (Kim, 1998). Após a corrida da
189 eletroforese, o gel foi lavado com uma solução 2,5% de Triton X-100 durante 1 hora, sendo
190 submetido a lavagem com água destilada por 3 vezes e incubado em tampão de reação (0,1M
191 de glicina, pH 8,4) a 37°C, por 18h. Os procedimentos de coloração e descoloração foram
192 como descrito para a SDS-PAGE.

193

194 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

195 Os resultados do crescimento da biomassa na fermentação homogênea, contendo como
196 fonte de nitrogênio a farinha de soja ou a farinha de trigo, por *Mucor subtilissimus* UCP 1262
197 durante 120 horas. Houve um aumento na produção de proteases, juntamente com a produção
198 da protease fibrinolítica. A produção de protease obteve valores entre 9,33 e 64,3 U/mL, no
199 decorrer do cultivo de 120 horas com farinha de trigo e 50,67 e 77,0 U/mL, no cultivo com
200 farinha de soja, sendo o melhor valor (77,0 U/mL) de atividade proteásica obtida com 72h em

201 meio contendo farinha de soja. Os resultados encontrados por Palanivel et al. (2013) foram
202 semelhantes aos obtidos neste trabalho, tais autores avaliaram a produção de protease
203 extracelular, e obtiveram valores de atividade proteásica de 80 U/mL, 40 U/mL e 35 U/mL
204 para os gêneros *Aspergillus*, *Mucor* e *Curvularia*, respectivamente, após 168 horas, com
205 agitação de 220 rpm, a 37°C. Deste modo, com o mesmo gênero, o presente trabalho obteve
206 quase o dobro da atividade e menos da metade do tempo de fermentação.

207 Em relação à atividade fibrinolítica total no cultivo submerso homogêneo, o melhor
208 valor para fermentação com farinha de trigo foi de 4,83 U/mL, após 96 horas. Enquanto que
209 na fermentação com farinha de soja, o pico da produção da protease fibrinolítica foi de
210 13,43U/mL e atividade específica de 749,27U/mg após 72 horas de cultivo. Bajaj et al.
211 (2014), avaliando a otimização de uma protease fibrinolítica produzida por *Bacillus subtilis* I-
212 2, obteve 280,2U/mg de atividade fibrinolítica em seu extrato bruto contendo soja, após 24
213 horas de cultivo sob agitação de 180rpm e 37°C.

214 O grande potencial para produção de proteases pelo gênero *Mucor* já foi descrito por
215 inúmeros autores, como Yegin et al (2012) que usou *Mucor mucedo* DSM 809 para produção
216 de protease aspártica extracelular, Santos-Ribeiro et al., (2015) que produziram e
217 caracterizaram protease de *Mucor hiemalis* URM3773, e Nascimento et al., (2015) obtiveram
218 êxito ao utilizar o *Mucor subtilissimus* UCP 1262 para produção de protease com atividade
219 fibrinolítica em fermentações em estado sólido utilizando resíduos agro-industriais. Desta
220 forma os resultados desta etapa reforçam o potencial deste gênero como produtor de proteases
221 fibrinolítica.

222 Sistemas de duas fases aquosas compostos por PEG e sulfato de sódio (Na₂SO₄) foram
223 utilizados para a fermentação extrativa visando a produção e o particionamento da protease
224 fibrinolítica de forma integrada em uma única etapa, como mostra a matriz do planejamento
225 com os resultados (Tab. 1). Foi observado que a biomassa migrou para fase PEG e em todos
226 os experimentos foram obtidas atividades fibrinolíticas. Apesar de alguns autores relatarem
227 que a presença do polímero (PEG) pode desacelerar o crescimento das células microbianas,
228 ou seja, ocorrendo a fase estacionária tardiamente e possivelmente diminuição na produção de
229 protease (Yasinok et al., 2010), este fenômeno não interferiu no desempenho de crescimento
230 do *Mucor subtilissimus* UCP 1262, o qual manteve a produção da protease fibrinolítica no
231 mesmo tempo que a fermentação homogênea.

232 A protease fibrinolítica particionou preferencialmente para a fase superior do sistema
233 (rica em PEG) na maioria dos ensaios do planejamento, tendo valores de coeficiente de
234 partição maiores que 1 ($K \geq 1$) (Tab. 1), estatisticamente as variáveis estudadas não foram

235 significativas para esta variável resposta. Entretanto, o maior valor em atividade fibrinolítica
 236 (15,40 U/mL) foi obtido na fase inferior do sistema rica em sulfato de sódio no ensaio 2 (Tab.
 237 1).

238 Ashipala e He (2008) ao verificarem a produção da protease fibrinolítica por *Bacillus*
 239 *subtilis* DC-2 em fermentação extrativa utilizando PEG e sulfato de sódio, apresentaram
 240 resultados semelhantes aos obtidos no presente trabalho. Os autores também relataram que o
 241 aumento da atividade foi atribuído a uma maior secreção da protease na presença de PEG.
 242 Embora o PEG seja necessário para a liberação da protease, sua presença em concentrações
 243 mais altas pode ser um fator limitante na produção, pois tal molécula restringe o crescimento
 244 do micro-organismo.

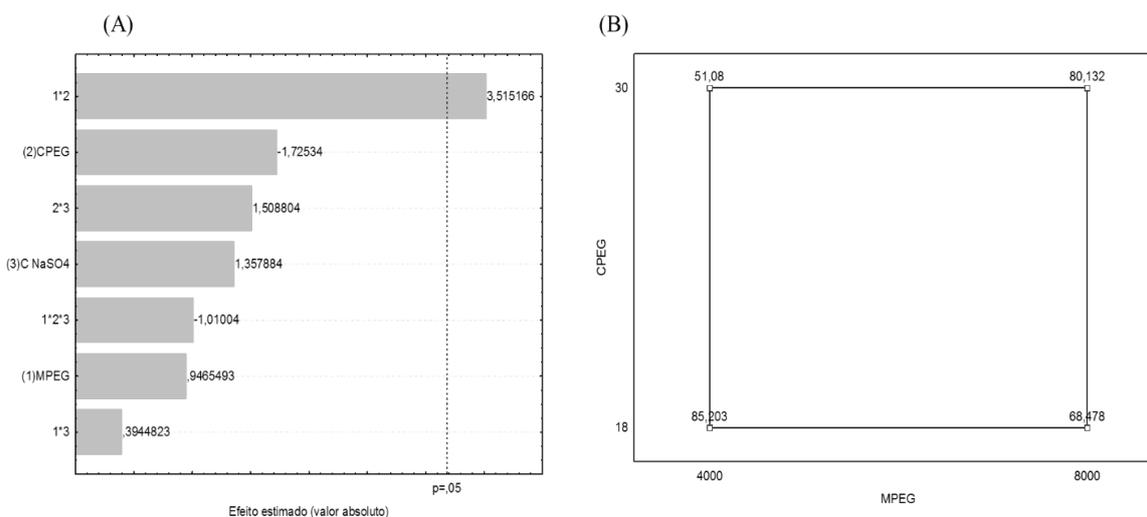
245 Os índices de recuperação enzimática (Y) indicam uma alta recuperação da protease
 246 fibrinolítica atingindo rendimentos com mais de 80% (Tab. 1). Dentre as variáveis
 247 independentes utilizadas nesse processo, estatisticamente, apenas a interação entre a massa
 248 molar do PEG (M_{PEG}) e a concentração de PEG (C_{PEG}) teve efeito significativo e positivo
 249 (Fig. 1A), ou seja, o sinergismo entre os maiores valores dessas variáveis contribuiu para o
 250 aumento do rendimento enzimático (Fig. 1B), sendo assim, quando combinadas as menores
 251 concentrações de M_{PEG} e da C_{PEG} , obteve-se maiores valores de rendimento.

252

253 **Tabela 2.** Resultados do planejamento fatorial 2^3 para produção e extração integrada de
 254 protease fibrinolítica produzida por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 por fermentação extrativa
 255 (PEG/Sulfato de Sódio).

Ensaio	M_{PEG} (g/mol)	C_{PEG} (%)	C_{SAL} (%)	AF PEG (U/mL)	AF SAL (U/mL)	K_{AF}	Y (%)	AE PEG (U/mg)	AE SAL (U/mg)
1	4000	18	10	11,21	9,00	1,25	89,21	3,68	3,00
2	8000	18	10	10,47	15,40	0,68	63,34	4,60	5,37
3	4000	30	10	9,88	7,83	1,26	38,68	5,79	4,54
4	8000	30	10	11,12	10,16	1,09	71,74	4,48	7,81
5	4000	18	13	12,91	6,71	1,92	79,08	8,37	3,06
6	8000	18	13	11,61	7,38	1,57	71,50	4,07	3,16
7	4000	30	13	13,12	12,39	1,06	61,36	5,21	16,16
8	8000	30	13	11,49	10,25	1,12	86,40	3,41	34,17
9 C	6000	24	11,5	11,04	7,43	1,49	79,33	6,50	4,13
10 C	6000	24	11,5	10,68	9,02	1,18	76,95	5,60	4,90
11 C	6000	24	11,5	11,28	8,55	1,32	77,48	6,50	5,03
12 C	6000	24	11,5	11,41	12,32	0,93	59,62	6,65	13,20

256 AF - atividade fibrinolítica na fase PEG e Sal (Sulfato de Sódio), coeficiente de partição (K),
 257 rendimento (Y), atividade específicas (AE) nas fases PEG e Sal, e C = pontos centrais.



258

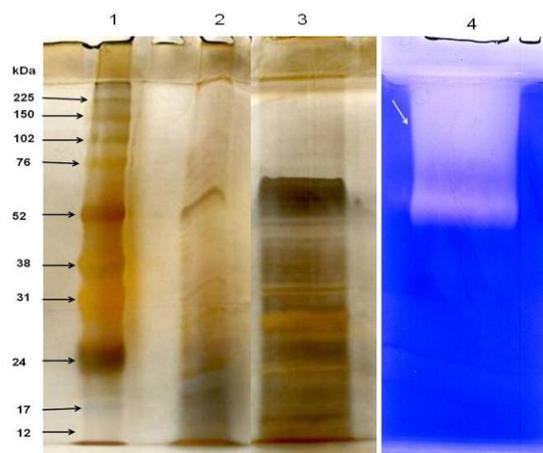
259 **Figura 1.** (A) Gráfico de Pareto dos principais efeitos das variáveis independentes e suas
 260 interações (Massa molar PEG – MPEG; Concentração de PEG – CPEG; Concentração de
 261 Na₂SO₄ – CNa₂SO₄) para a recuperação enzimática (Y); (B) Diagrama para interpretação
 262 geométrica dos efeitos da interação entre Concentração (CPEG) e Massa Molar do PEG
 263 (MPEG) tendo como variável resposta o rendimento (Y).

264

265 Para verificar a pureza da protease fibrinolítica produzida por *Mucor subtilissimus*
 266 UCP 1262 em fermentação extrativa foi realizado uma eletroforese SDS-PAGE e um
 267 zimograma de fibrina (Fig. 2). Verificou-se que após a corrida no gel que a banda referente a
 268 protease fibrinolítica ficou entre os marcadores de massa molecular 52 e 76 kDa, sendo
 269 calculado como 52kDa, utilizando-se a fase rica em sal (sulfato de sódio). Pode-se observar a
 270 área clara no zimograma de fibrina correspondente a protease fibrinolítica. Tal massa está de
 271 acordo com o valor obtido de uma protease com atividade fibrinolítica de *Asterina pectinifera*
 272 (40 a 55 kDa) (Choi et al, 2014) e da enzima fibrinolítica produzida por *Petasites japonicus*
 273 (50 a 70 kDa) (Kim et al, 2015).

274

275 **Figura 2.** Representação da eletroforese SDS-PAGE (12%) e do zimograma de fibrina. (1)
 276 Marcador de massa molecular da proteína; (2) Fase sal da fermentação extrativa com PEG
 277 8.000 e Sulfato de sódio; (3) Extrato bruto obtido através da fermentação homogênea; (4)
 278 Zimograma de fibrina da fase sal da fermentação extrativa, a seta indica a zona de degradação
 279 da fibrina (área clara).



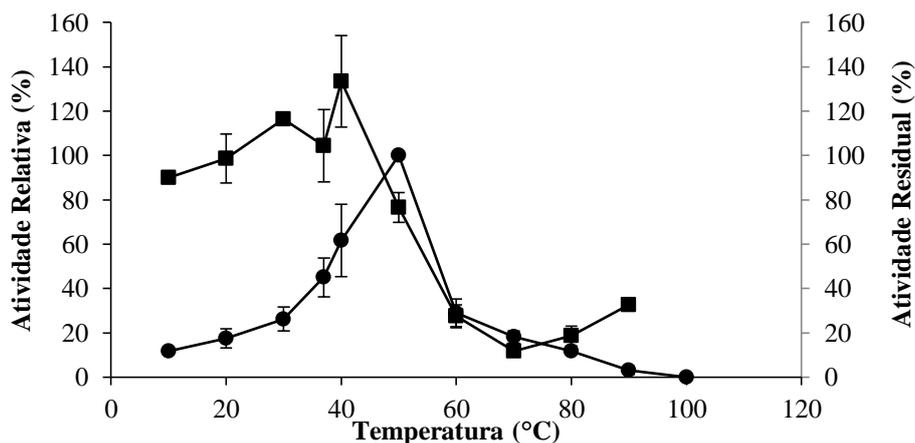
280

281

282 Comparando o perfil eletroforético da fermentação homogênea e da fase sal da
 283 fermentação extrativa, observa-se uma diminuição do conteúdo protéico indicando que houve
 284 uma seleção das biomoléculas produzidas pelo micro-organismo. Através do zimograma de
 285 fibrina pode-se confirmar que a protease pré-purificada pela fermentação extrativa é ativa e
 286 tem atividade fibrinolítica degradando o substrato até o peso molecular correspondente a
 287 protease no gel SDS-PAGE.

288 Foi verificado com o substrato SApNA que a protease fibrinolítica produzida por
 289 *Mucor subtilissimus* UCP 1262 apresenta especificidade semelhante à enzima quimiotripsina,
 290 obtendo atividade de 20,03U/mg. Majumdar et al (2014), também comprovou que a protease
 291 fibrinolítica obtida de *Brevibacillus brevis* FF02B possui características semelhantes às da
 292 quimiotripsina quando obteve 14,3U/mg de atividade amidolítica ao utilizar o substrato
 293 SApNA. Choi et al. (2011) pesquisando enzima fibrinolítica extraída de estruturas de
 294 frutificação do *Cordyceps militaris* também verificou que ação específica para o substrato N-
 295 succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, que a caracteriza como uma quimiotripsina.

296 Em relação à caracterização bioquímica, a protease fibrinolítica purificada atuou em
 297 sua máxima eficiência na temperatura de 50°C (Fig. 3). A atividade da protease foi mantida
 298 no intervalo entre 10°C e 50°C, mantendo-se estável por 60 minutos a 37°C com atividade
 299 residual de 110,62%. Devido ao aumento de temperatura (maior ou igual 60°C), aos 15
 300 minutos, a protease sofreu uma redução de 19% da sua atividade devido à desnaturação.



301

302

303

304

305

306

307

308

309

310

311

312

313

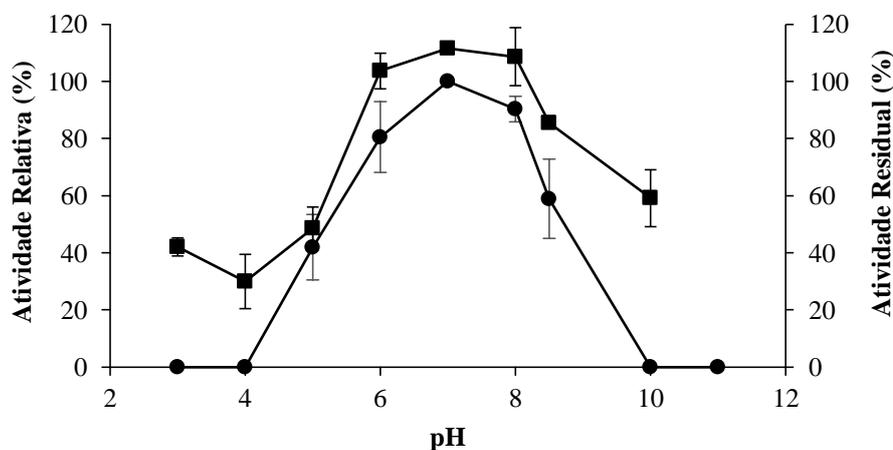
314

315

Figura 3: Efeito da temperatura sobre a atividade da protease fibrinolítica produzida por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 na fase sal da Fermentação extrativa utilizando PEG/Sulfato de sódio. (●) Temperatura ótima e (■) estabilidade enzimática em 60 min

O pH ótimo foi 7,0, obtido no tampão citrato-fosfato (atividade residual de 136,58%) (Fig. 4). A atividade da protease foi conservada no intervalo entre o pH 6,0 e 8,5, sendo a atividade residual em torno dos 100% após 60 minutos de reação. Em pH muito ácido ou muito básico nota-se a diminuição da atividade residual da protease que tem seu ponto mínimo com pH 4,0.

A enzima fibrinolítica do *Bacillus subtilis* TKU007 apresentou pH ótimo de 8,0 e temperatura ótima de 40°C. A protease foi estável entre os pH 4,0 e 11,0, conservando sua atividade em temperaturas próximas à 50°C (Lu et al., 2010). Kim et al., (2015), utilizando uma protease fibrinolítica produzida por *Petasites japonicus* obtiveram um pH ótimo em torno de 7,0, sendo estável entre o pH 5,0 e 8,0. Em relação à temperatura, conseguiram máxima eficiência com 60°C e estabilidade entre 30°C e 60°C.



316

317

318

319

Figura 4: Efeito do pH sobre a atividade da protease fibrinolítica produzida por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 na fase sal da Fermentação extrativa utilizando PEG/Sulfato de sódio. (●) pH ótimo e (■) estabilidade enzimática em 60 min.

320

321 O efeito dos íons foi avaliado sobre a atividade enzimática e observou-se que todos os
322 íons, na concentração de 2,5mM, estimularam o aumento da atividade da protease. A inibição
323 da atividade foi verificada ao utilizar os íons de Sulfato de Zinco ((ZnSO₄).7H₂O) (89,56% e
324 54,52%), Sulfato de cobre (CuSO₄) (93,46%), Cloreto de ferro (FeCl₃) (84,89%) e Cloreto de
325 zinco (ZnCl₂) (56,07%) nas concentrações de 5mM e 10mM.

326 O efeito dos surfactantes sobre a atividade proteásica foi avaliado e verificou-se que
327 com o aumento da concentração do surfactante, a atividade residual diminui. Esse efeito
328 inibitório apenas não aconteceu com o SDS (dodecil sulfato de sódio - C₁₂H₂₅SO₄Na).

329 A inibição da atividade da protease foi observada e constatou-se a seguinte ordem de
330 inibição: PMSF (55,61%), β-Mercaptoetanol (47,82%) e EDTA (5,76%). A Pepstatina A e
331 Ácido Iodoacético não apresentaram ação inibitória sobre a atividade da protease. Os índices
332 de inibição sugerem que a protease avaliada seja pertencente à classe das serino-proteases.
333 Tais resultados corroboram com os resultados apresentados por Nascimento et al (2015), que
334 caracterizou a protease fibrinolítica produzida por *Mucor subtilissimus* UCP 1262, obtida
335 através da fermentação em estado sólido, o qual observou também uma significativa inibição
336 por PMSF de 81%.

337

338 CONCLUSÃO

339 Considerando as potenciais aplicações protease fibrinolíticas no tratamento de doenças
340 trombolíticas, foram obtidos resultados promissores com a produção e extração integrada de
341 protease fibrinolítica por *Mucor subtilissimus* UCP 1262. É possível produzir enzima
342 fibrinolítica em um processo de baixo custo e de considerável rapidez quando comparado a
343 outras técnicas de produção e purificação isoladas. A protease fibrinolítica é ativa e estável
344 em pH e temperatura fisiológicos o que propicia uma possível aplicação como terapia
345 enzimática.

346 AGRADECIMENTOS

347 Os autores agradecem o financiamento da CAPES e CNPq e a bolsa de mestrado da
348 FACEPE.

349 REFERÊNCIAS

350 ASHIPALA, O. K; HE, Q. Optimization of fibrinolytic enzyme production by *Bacillus*
351 *subtilis* DC-2 in aqueous two-phase system (poly-ethylene glycol 4000 and sodium sulfate).
352 **Bio. Technol.** v. 99, p. 4112–4119, 2008.

- 353 BAJAJ, B.K.; SINGH, S.; KHULLAR, M.; SINGH, K.; BHARDWAJ, S. Optimization of
354 fibrinolytic protease production from *Bacillus subtilis* I-2 using agro-residues. **Braz. arch.**
355 **biol. technol.** v.5, n. 5, 2014.
- 356 BANIK, I.; SAIN, M. M. Water-blown soy polioliol based polyurethane foams modified by
357 cellulosic materials obtained from different sources, **J. Appl. Polym. Sci.**, v. 112, p. 1974-
358 1987, 2003.
- 359 BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of protein utilizing
360 the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 148-254, 1976.
- 361 CHAVEZ-SANTOSCOY, A.; BENAVIDES, J.; VERMAAS, W.; RITO-PALOMARES, M.
362 Application of Aqueous Two-Phase Systems for the Potential Extractive Fermentation of
363 Cyanobacterial Products. **Chem. Eng. Technol.**, v. 33, n. 1, p. 177–182, 2010.
- 364 CHOI, D., CHA, W., PARK, N., KIMB, H., LEE J. H., PARK, J. S., PARK, S. S. Purification
365 and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from fruiting bodies of Korean *Cordyceps*
366 *militaris*. **Bioresour. Technol.**, v. 102, p. 3279-3285, 2011.
- 367 CHOI, J.H; SAPKOTA, K.; KIM, S.; KIM, S.J. Starase: A bi-functional fibrinolytic protease
368 from hepatic caeca of *Asterina pectinifera* displays antithrombotic potential. **Biochem.** p.1-
369 13, 2014.
- 370 CHONG, A.S.C.; HASHIM, R.; CHOW-YANG, L.;ALI, A.B. Partial characterization and
371 activities of proteases from the digestive tract of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*).
372 **Aquaculture.** v. 203, p.321–333, 2002.
- 373 CHOUYYOK, W.; WONGMONGKOL, N.; SIWARUNGSON, N.; PRICHANONT, S.
374 Extraction of alkaline protease using an aqueous two-phase system from cell free *Bacillus*
375 *subtilis* TISTR 25 fermentation broth. **Process Biochem.**, v. 40, p. 3514–3518, 2005.
- 376 DELOISA, K.M.; TREJO-HERNÁNDE, M.D.R.; RITO-PALOMARES. M. Recovery of
377 laccase from the residual compost of *Agaricusbisporus* in aqueous two-phase systems.
378 **Process Biochem.** v. 44, n.4, p. 435- 439, 2009.
- 379 DOMBUSCH, P. T.; HUSSUN, C. A.; IHEMASSÍAN, A.; ALVES, A. G.; NICOLETTI, J.
380 L. M.; Tromboflebite jugular nos equinos, **Rev. Ed. Cont.** v. 3, n. 2, p.47 - 53, 2000.
- 381 FELICIANA, C. B. O., CASTRO, M. L., SILVA, J. R., BASSO, F. Z., DESCONTO, I.,
382 DORNBUSCH, P. T. Trombectomia jugular em um cavalo – Relato de Caso, **Ciênc. Vet.**
383 **Trop.** v. 17, n. 3, p. 133, 2014.

- 384 GINTHER, C.L. Sporulation and the Production of Serine Protease and Cephamycin C by
385 *Streptomyces lactamdurans*. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 15, p. 522-526, 1979.
- 386 KIM D.W., CHOI J.H., PARK S.E., KIM S., SAPKOTA, K., KIM, S.J. Purification and
387 characterization of a fibrinolytic enzyme from *Petasites japonicus*. **Int. J. Biol. Macromol.**
388 **v. 72**, p. 1159–116, 2015.
- 389 LU, C.; WANGY, J.; CHENZ, S. Protease Purified from *Schizophyllum commune* Culture
390 Broth Digests Fibrins Without Activating Plasminogen. **Am J Chin Med.**; v. 38, n. 6, p.
391 1223–1231, 2010.
- 392 MAJUMDAR A.S., SARMAH A.B., GOGOI A.D., BANERJEE B.S., GHOSH B.S.S.,
393 BANERJEE C.S., CHATTOPADHYAY C.P., MUKHERJEE, A.K.. Characterization,
394 mechanism of anticoagulant action, and assessment of therapeutic potential of a fibrinolytic
395 serine protease (Brevithrombolase) purified from *Brevibacillus brevis* strain FF02B. **Biochim.**
396 p.1-11, 2014.
- 397 NALINANON, S.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; KISHIMURA, H. Partitioning
398 of protease from stomach of albacore tuna (*Thunnusalalunga*) by aqueous two-phase systems.
399 **Process Biochem.** v.44, n.4, p.471-476, 2009.
- 400 NASCIMENTO, T.P.; SALES, A.E.; PORTO, C.S.; BRANDÃO, R.M.P; CAMPOS-
401 TAKAKI, G.M.; TEIXEIRA, J.A.C.; PORTO, T.S.; PORTO, A.L.F. Production and
402 Characterization of New Fibrinolytic Protease from *Mucor subullissimus* UCP 1262 in Solid-
403 State Fermentation. **Adv Enzyme Research**, v.3, p.81-91, 2015.
- 404 OOI, C. W.; HUI, S. L.; KAMALA, S. M. M.; ARIFF, A.; LING, T. C. Extractive
405 fermentation using aqueous two-phase systems for integrated production and purification of
406 extracellular lipase derived from *Burkholderia pseudomallei*. **Process Biochem**, v. 46, p. 68–
407 73, 2011.
- 408 PALANIVEL, P.; ASHOKKUMAR, L.; BALAGURUNATHAN, R. Production, purification
409 and fibrinolytic characterization of alkaline protease from extremophilic soil fungi. **Int J**
410 **Pharm Bio Sci.** v. 4, n. 2, p.101 – 110, 2013.
- 411 PORTO, A.L.F.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; LIMA FILHO, J.L. Effects of culture conditions
412 on protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing on the soy bean flour medium.
413 **Appl. Biochem. Biotechnol.** v. 60, p. 115-122. 1996.

- 414 SANTOS-RIBEIRO, R.C.; RIBEIRO, T.R.S.; SOUZA-MOTTA, C.M.; MEDEIROS, E.V.;
415 MOREIRA, K.A. Production and partial characterization of proteases from *Mucor hiemalis*
416 URM3773. **Acta Scientia**. v. 37, n. 1, 2015.
- 417 Statsoft Inc., 2008. Statistica (Data Analysis Software Systems) Version 8.0.
- 418 WANG, S., WU, Y., LIANG, T. Purification and biochemical characterization of a
419 nattokinase by conversion of shrimp shell with *Bacillus subtilis* TKU007. **New Biotechnol.** v.
420 28, p.2, 2011.
- 421 YASINOK, A.E.; BIRAN, S.; KOCABAS, A.; BAKIR, U. Xylanase from a soil isolate,
422 *Bacillus pumilus*: gene isolation, enzyme production, purification, characterization and one-
423 step separation by aqueous-two-phase system. **World J. Microbiol. Biotechnol.** v. 26, p
424 1641-1652, 2010.
- 425 YEGIN, S.; GOKSUNGUR, Y.; FERNANDEZ-LAHORE, M. Purification, structural
426 characterization, and technological properties of an aspartyl proteinase from submerged
427 cultures of *Mucor mucedo* DSM 809. **Food Chem.** v. 133, p. 1312–1319, 2012