

Produção e caracterização de protease fibrinolítica de *Streptomyces parvulus* DPUA 1573

[Production and characterization of fibrinolytic protease from *Streptomyces parvulus* DPUA 1573]

J.M.S. Batista¹, E.L. Clementino¹, T.P. Nascimento², G.M.S. Lima², T.S. Porto³,
A.L.F. Porto^{1*} C.S. Porto⁴

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco – Recife, PE

² Universidade Federal de Pernambuco – Recife, PE

³ Unidade Acadêmica de Garanhuns, UFRPE – Garanhuns, PE

⁴ Universidade Federal de Alagoas, UFAL – Penedo, AL

RESUMO

As proteases fibrinolíticas são capazes de degradar coágulos de fibrina formados dentro dos vasos sanguíneos, evitando a trombose intravascular. Em animais, a tromboflebite, que acomete frequentemente os equinos, ocasiona, em seus casos graves, a obstrução jugular e também um edema de laringe, derivando a obstrução das vias aéreas, o que possibilita um edema cerebral, ocorrendo o óbito do animal. Devido ao fato de o tratamento ser de custo elevado, faz-se necessária a investigação de outras fontes de proteases fibrinolíticas com custos menores e com menos efeitos colaterais. Diante disso, este estudo tem como objetivo produzir e caracterizar proteases fibrinolíticas obtidas de *Streptomyces parvulus* DPUA 1573. Para produção da enzima, foi utilizado um planejamento fatorial 2⁴ avaliando a concentração da farinha de soja (0,5, 1,0 e 1,5%) e da glicose (0, 0,5 e 1,0g/L), temperatura (28, 32 e 37°C) e agitação (150, 200 e 250rpm) sobre a biomassa e a atividade fibrinolítica. Pode-se verificar que a protease fibrinolítica apresentou atividade máxima (835U/mL) nas condições de concentração de 1,5% de soja, 1g/L de glicose, 28°C e 150rpm com 48 horas de fermentação. A protease fibrinolítica obtida teve temperatura e pH ótimos de 55°C e pH 9,0, respectivamente. A atividade enzimática foi inibida pelo EDTA, pelo íon Fe²⁺ e pelo SDS, o que indicou a enzima ser uma metaloprotease. A linhagem *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 foi capaz de produzir protease fibrinolítica, possuindo características bioquímicas favoráveis à aplicação na medicina veterinária e possivelmente humana.

Palavras-chave: *Streptomyces parvulus*, proteases fibrinolíticas, fermentação submersa

ABSTRACT

*Fibrinolytic proteases are able to degrade fibrin clot formed in the blood vessel, avoiding intravascular thrombosis. In animals, thrombophlebitis often affects horses, and in severe cases causes obstruction of the jugular and laryngeal edema leading to airway obstruction allowing cerebral edema resulting in the death of the animal. Since treatment is costly, the investigation of other sources of fibrinolytic proteases at lower cost and with fewer side effects is needed. Thus, this study aims to produce and characterize fibrinolytic proteases from *Streptomyces parvulus* DPUA 1573. For enzyme production, a factorial design was performed to evaluate 2⁴ soybean flour concentration (0.5, 1.0 and 1.5%) and glucose (0, 0.5 and 1.0g/L), temperature (28, 32 and 37°C) and agitation (150, 200 and 250rpm) on biomass and fibrinolytic activity. Fibrinolytic protease showed maximum activity (835 U/mL) under these conditions: 1.5% soybean flour, 1g/L glucose, 28°C, and 150rpm 48 hours of fermentation. The optimal temperature was 55°C and optimal pH was 9.0. Fibrinolytic protease activity was inhibited by EDTA, the ion Fe²⁺, and by SDS, which indicated that the enzyme is a metalloprotease. The strain *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 was able to produce fibrinolytic protease with biochemical characteristics favorable for application in veterinary and human medicine.*

Keywords: *Streptomyces parvulus*, fibrinolytic protease, submerged fermentation

Recebido em 22 de julho de 2015

Aceito em 9 de agosto de 2016

*Autor para correspondência (corresponding author)

E-mail: analuporto@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

As proteases são importantes, pois atuam no metabolismo e na regulação metabólica, podendo ser encontradas em diferentes organismos, e seu mecanismo envolve a capacidade de hidrolisar ligações peptídicas (Castro *et al.*, 2011). Entre as proteases, destacam-se as com potencial fibrinolítico, que são enzimas com capacidade de degradar a fibrina, proteína de maior componente dos coágulos sanguíneos. A formação do coágulo de fibrina é normalmente regulada pelo sistema biológico. Entretanto, quando a fibrina não é hidrolisada, ocorre a trombose, bem como outros distúrbios cardiovasculares (Choi *et al.*, 2011; Nascimento *et al.*, 2016).

Os distúrbios cardiovasculares também são relevantes na medicina veterinária. Os equinos são afetados por processos trombolíticos, entre estes se destacam a trombose aortoiliaca e a tromboflebite (Oyamada *et al.*, 2007; Sobreira *et al.*, 2008; Escodro *et al.*, 2010). A tromboflebite é ocasionada pelo uso prolongado de cateteres venosos ou de injeções intravenosas que causam lesão mecânica ou química na parede do vaso, resultando em oclusão completa da veia. Para o tratamento dessa doença, a medicina veterinária utiliza antitrombóticos, antiagregantes plaquetários e anti-inflamatórios. No entanto, há uma carência em medicamentos mais acessíveis, com baixo custo, e também de tratamentos mais eficazes (Barbosa *et al.*, 2009). Em humanos, o tratamento é realizado com agentes trombolíticos, tais como t-PA (ativador plasminogênio tecidual) e uroquinase (Cicha, 2015). Considerando-se a necessidade de buscar novos agentes fibrinolíticos seguros e de baixo custo e de evitar cirurgia no caso dos equinos, estudos estão sendo realizados sobre novas proteases fibrinolíticas.

As bactérias são utilizadas biotecnologicamente, destacando as actinobactérias do gênero *Streptomyces*, devido a sua capacidade de

produzir enzimas extracelulares, como proteases fibrinolíticas (Silva *et al.*, 2016) e biocompostos com variadas atividades biológicas, como antibacterianos e antiparasitários (Demir *et al.*, 2015; Balachandran *et al.*, 2016). Este trabalho teve como objetivo produzir e caracterizar proteases fibrinolíticas obtidas de *Streptomyces parvulus* DPUA 1573.

MATERIAL E MÉTODOS

A linhagem de *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 foi isolada de líquens da Região Amazônica e pertence à coleção de culturas DPUA (Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas), gentilmente cedida pela prof.^a Maria Francisca Simas Teixeira. O micro-organismo isolado foi mantido no meio ISP-2 (Pridham *et al.*, 1957), com glicerol 10%, a -20°C.

Para a produção de protease fibrinolítica, foi utilizado o meio MS-2 (Porto *et al.*, 1996), pH 7 autoclavado a 121°C/1atm, por 20 minutos. Foram utilizados Erlenmeyers (125mL) contendo 50mL de meio de cultura, sendo o inóculo correspondente a 10⁸UFC/mL. O crescimento celular, a curva de pH, a determinação da atividade fibrinolítica e a atividade proteásica foram determinados a cada 24 horas até 120 horas de fermentação. Para determinar a melhor condição para produção da protease fibrinolítica, utilizou-se um planejamento fatorial 2⁴, conforme a Tab. 1, considerando-se como variáveis independentes a concentração da fonte de nitrogênio (soja), a concentração da fonte de carbono (glicose), a temperatura e a agitação. Consideraram-se como variáveis respostas os valores da biomassa e a atividade fibrinolítica. As condições estudadas, bem como possíveis interações, foram analisadas estatisticamente com o auxílio do programa *Statistica 8.0* (Statistica, 2008) com nível de significância de 95%.

Tabela 1. Níveis das variáveis do planejamento fatorial 2⁴ para produção de protease fibrinolítica por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573

Variáveis	Níveis		
	Menor (-1)	Central (0)	Maior (+1)
Concentração do filtrado de soja (%)	0,5	1	1,5
Concentração de glicose (g/L)	0	0,5	1
Agitação (rpm)	150	200	250
Temperatura (°C)	28	32	37

A determinação da atividade proteásica foi realizada pelo método de Ginther (1979), e a atividade fibrinolítica foi realizada de acordo com Wang *et al.* (2011). Na caracterização enzimática, foram avaliados o efeito e a estabilidade do pH e da temperatura, os íons metálicos, surfactantes e os inibidores sobre a atividade proteásica. Para estudo do efeito ao pH, o extrato enzimático foi incubado a diferentes tampões: citrato-fosfato (pH 4,0 a 6,0), fosfato de sódio (pH 6,0 e 7,0), Tris-HCl (pH 7,0, 8,0 e 9,0), carbonato-bicarbonato (pH 9,0 e 10,0) a 37°C por uma hora. O efeito da temperatura foi determinado pela incubação do extrato enzimático em temperaturas variando entre 10°C e 100°C, por um período de uma hora. Para a estabilidade à temperatura, a incubação ocorreu durante três horas, sendo sua atividade enzimática determinada a cada 30 minutos. Em relação ao efeito dos íons e de inibidores, estes foram escolhidos e realizados de acordo com Nascimento *et al.* (2016).

Os surfactantes testados foram SDS (dodecilsulfato de sódio – $C_{12}H_{25}SO_4Na$), Triton X – 100 ($C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$), Tween 20 (monopalmitato de polioxietileno sorbitano – $C_{58}H_{114}O_{26}$) e Tween 80 (monopalmitato de polioxietileno sorbitano – $C_{64}H_{124}O_{26}$),

estudados nas seguintes concentrações: 0,5%; 1,0%, 1,5% e 2,0%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento da linhagem *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 (Fig. 1) não apresentou fase lag, uma vez que a concentração do inóculo facilitou sua adaptação ao meio de produção. A fase logarítmica ocorreu 48h de fermentação, a fase estacionária em que o crescimento é desacelerado (96h), devido à diminuição de nutrientes no meio. A fase de declínio foi observada a partir de 120h, todos esses fenômenos foram semelhantes ao estudo de Narayana e Vijayalakshmi (2008), no qual descreve-se a produção da enzima amilase pelo *Streptomyces albidoflavus* com a produção máxima de biomassa com 96 horas.

Durante o processo de fermentação, o pH variou de 7,0 (0h) para 9,0 (120h). Essa alteração pode ser resultante da formação de amônia no meio fermentativo, possivelmente pela desaminação das proteínas existentes na fonte de nitrogênio (farinha de soja). Silva *et al.* (2016), ao estudarem a produção de protease fibrinolítica por *Streptomyces* sp. DPUA 1576 utilizando o mesmo meio de produção, observaram que o aumento do pH favorece a produção enzimática.

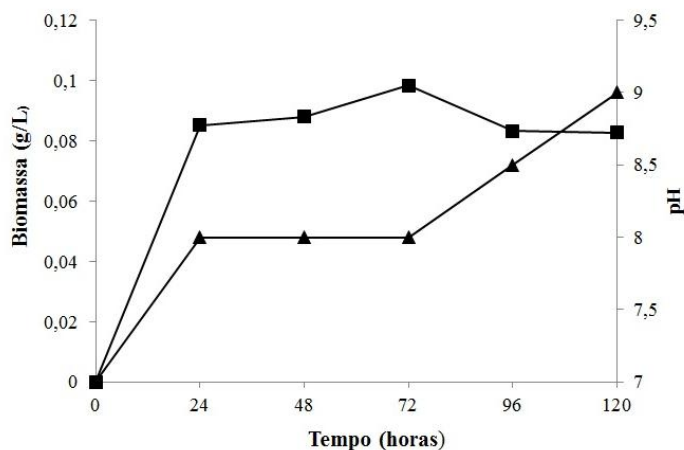


Figura 1. Curvas de pH(▲) e crescimento do micro-organismo(■) *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 no meio MS-2.

No presente estudo, verificaram-se 48h como o melhor tempo de produção da enzima. Esse curto tempo se torna atrativo para a indústria pelos custos menores na produção da enzima de interesse. O contrário foi visto por Silva *et al.* (2016), os quais, ao estudarem o tempo de

produção da protease fibrinolítica por *Streptomyces* sp. DPUA 1576, observaram que, a partir de 72h, foram obtidos maiores valores em atividade fibrinolítica.

Os valores de atividade fibrinolítica no planejamento fatorial variaram de 625,0 a 835,0 U/mL (Tab. 2). A condição que apresentou maior valor em atividade fibrinolítica (835,0 U/mL) com 48 horas de fermentação foi com 1,5% de

farina de soja, 1g/L de glicose, 28°C e 150rpm. Esses resultados de atividade fibrinolítica foram superiores aos apresentados por *Streptomyces venezuelae* (16U/mL) (Bhavani et al., 2012).

Tabela 2. Resultados de atividade fibrinolítica obtidos no planejamento fatorial 2⁴ com 48 horas de fermentação produzidas pelo *Streptomyces parvulus* DPUA 1573.

Ensaio	Soja (%)	Glicose (g/L)	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Atividade fibrinolítica (U/mL)
1	0,5	0	28	150	632,5
2	1,5	0	28	150	655,0
3	0,5	1	28	150	752,5
4	1,5	1	28	150	835,0
5	0,5	0	37	150	822,5
6	1,5	0	37	150	662,5
7	0,5	1	37	150	667,5
8	1,5	1	37	150	702,5
9	0,5	0	28	250	677,5
10	1,5	0	28	250	732,5
11	0,5	1	28	250	625,0
12	1,5	1	28	250	772,5
13	0,5	0	37	250	692,5
14	1,5	0	37	250	685,0
15	0,5	1	37	250	727,5
16	1,5	1	37	250	747,5
17 C	1,0	0,5	32	200	680,0
18 C	1,0	0,5	32	200	672,5
19 C	1,0	0,5	32	200	697,5
20 C	1,0	0,5	32	200	655,0

A variável independente que isoladamente teve significância foi a concentração de glicose, a qual influenciou positivamente a produção da protease fibrinolítica (Fig. 2A). Sanchez e Demain (2002) afirmaram que as fontes de carbono, como a glicose, são comumente utilizadas para favorecer o crescimento do micro-organismo, melhorando, assim, a produção de enzimas e metabólitos secundários. Por outro lado, Silva et al. (2015), ao estudarem a produção de protease fibrinolítica por *Streptomyces* sp. DPUA 1576, descreveram que apenas a fonte de nitrogênio (soja) foi significativa.

A interação das variáveis independentes, concentração da fonte de carbono (glicose), temperatura e agitação, apresentou um efeito significativo e positivo (Fig. 3A), indicando que as melhores condições de produção da enzima fibrinolítica foram encontradas em 1% de glicose, 28°C e 150rpm (Fig. 3B). O estudo realizado por Bhavani et al. (2012) com a linhagem mutante *Streptomyces venezuelae* obteve melhor resultado na produção da protease fibrinolítica a 40°C, apresentando atividade de 16 U/mL, enquanto neste trabalho a temperatura selecionada foi de 28°C.

Produção e caracterização...

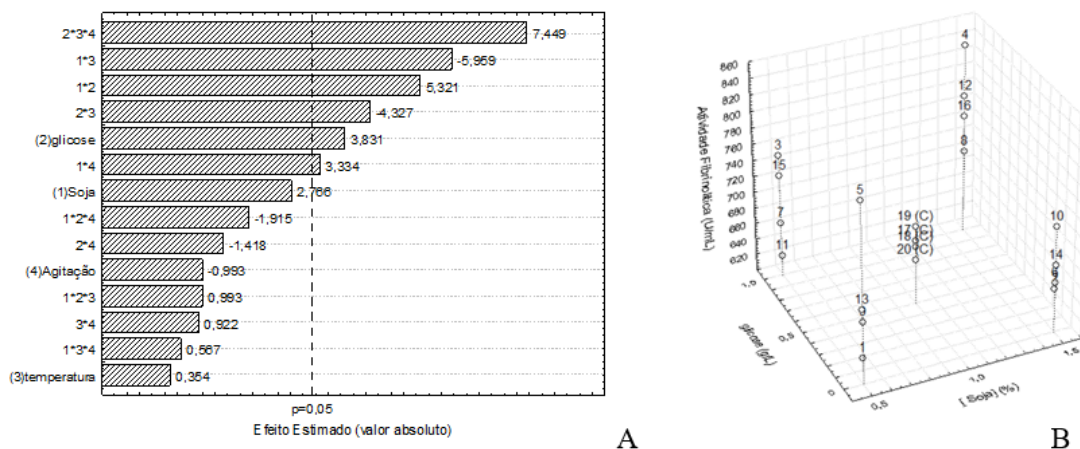


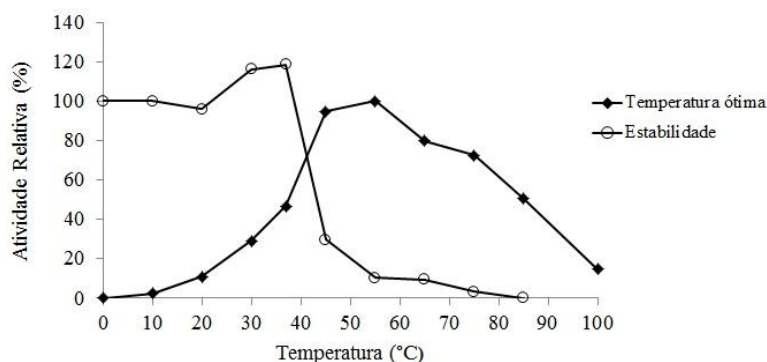
Figura 2. A – Gráfico de Pareto na produção de protease fibrinolítica por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573. B – Representação gráfica tridimensional da relação entre a concentração de soja e de glicose na produção de protease fibrinolítica por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 no tempo de 48h.

Na caracterização da protease, a temperatura ótima foi de 55°C (Fig.3A). Entretanto, observa-se que a atividade da enzima se manteve estável, com temperaturas até 40°C, sendo conservadas 100% de sua atividade por um período de três horas. Esses dados são semelhantes aos resultados obtidos por Ju *et al.*(2012), que estudaram a enzima fibrinolítica produzida pelo *Streptomyces* sp., a qual se manteve estável também a 30°C.

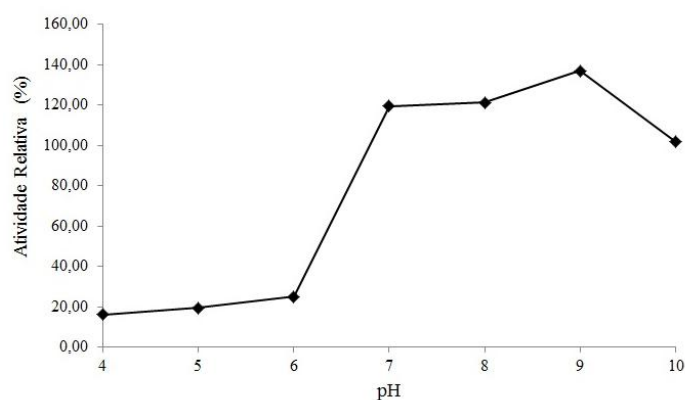
Em relação ao efeito do pH, a protease em estudo se manteve estável em valores de pH entre 7,0 e 9,0 (Fig. 3B). Adicionalmente, foi observado que no pH 9,0 a atividade proteásica foi máxima, caracterizando o pH ótimo. Simkhada *et al.* (2010) afirmam que a faixa de pH neutro ou alcalino apresentou melhores resultados para a produção de uma protease fibrinolítica produzida pelo *Streptomyces* sp. CS684; além disso, as proteases alcalinas obtidas por micro-organismos têm atraído grande atenção das indústrias devido a sua elevada atividade catalítica e ao alto grau de especificidade ao substrato.

Nos ensaios de inibição, ocorreu redução da atividade da protease com presença de EDTA (31,84%) e β-mercaptoetanol (2,02%) (Tab. 3). Os resultados indicaram que a protease estudada pertence à classe das metaloproteases. As proteases fibrinolíticas que pertencem a esta classe exigem metal bivalente para suas atividades, de modo que estas podem ser inibidas por agentes quelantes, como o EDTA (Mander *et al.*, 2011). Nos estudos de caracterização realizados por Ju *et al.* (2012), o EDTA foi o principal agente inibidor. Mander *et al.* (2011) também verificaram a ação inibitória do EDTA, classificando a enzima como metaloprotease.

Diante dos íons estudados, foi observado que o íon Ca²⁺ nas concentrações de 10 e 20mM obteve a ativação superior a 22%, porém não sofreu inibição pelo íon K. Entretanto, a atividade proteásica sofreu maior inibição (42,3%) pelo íon Zn²⁺, corroborando os resultados obtidos por Simkhada *et al.* (2010), que também tiveram a mesma inibição para a protease fibrinolítica produzida pelo *Streptomyces* sp. CS684.



A



B

Figura 3. A – Temperatura ótima e estabilidade da protease fibrinolítica. B – Curva do pH ótimo da protease obtida por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 no tempo de 48h.

Tabela 3. Efeito de inibidores na atividade de proteases produzida por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573

Inibidores	Atividade proteásica residual (%)
Controle	100,0
EDTA	68,1
PMSF	168,2
Pepstatina A	121,4
β -mercaptoetanol	97,9
Ácido iodoacético	189,5

Dos surfactantes avaliados, a atividade da protease foi ativada pelo Tween 80 (11,33%) e principalmente pelo SDS (51,78%), ambos com concentração de 2%. Esses resultados são semelhantes ao do estudo de Wang *et al.* (2011), pelo qual o SDS teve um efeito estimulador sobre a atividade da enzima fibrinolítica

produzida por *Bacillus subtilis* TKU007, podendo ser justificado pela alteração na conformação da enzima, aumentando, assim, a sua acessibilidade com o substrato.

CONCLUSÕES

A linhagem *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 foi capaz de produzir protease fibrinolítica em todas as condições de fermentação. No entanto, a protease fibrinolítica apresenta atividade máxima (835U/mL) nas condições de concentração de 1,5% de soja, 1g/L de glicose, 28°C e 150rpm com 48 horas de fermentação. A protease produzida pelo *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 é estável na faixa de pH entre 7 e 9, apresentando propriedades interessantes para a indústria farmacêutica, visando a possíveis aplicações na área de medicina veterinária.

REFERÊNCIAS

- BALACHANDRAN, C.; DURAI PANDIYAN, V.; ARUN, Y. *et al.* Isolation and characterization of 2-hydroxy-9,10-anthraquinone from *Streptomyces olivochromogenes* (ERINLG-261) with antimicrobial and antiproliferative properties. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v.26, p.285-295, 2016.
- BARBOSA, R.G.; BORGHESAN, A.C.; CERQUEIRA, N.F. *et al.* Fisiopatologia da trombose da veia jugular em equinos: revisão. *Vet. Zootec.* v.16, p.26-37, 2009.
- BHAVANI, B.; NAVEENA, B.; PARTHA, N. Strain improvement of *Streptomyces venezuelae* for enhanced fibrinolytic enzyme production. *Adv. Mater. Res.*, v.584, p.440-444, 2012.
- CASTRO, H.C.; ABREU, P.A.; GERALDO, R.B. *et al.* Looking at the proteases from a simple perspective. *J. Mol. Recognit.*, v.24, p.165-181, 2011.
- CHOI, D.; CHA, W.; PARK, N. *et al.* Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from fruiting bodies of Korean *Cordyceps militaris*. *Bioresour. Technol.*, v.102, p.3279-3285, 2011.
- CICHA, I. Thrombosis: novel nanomedical concepts of diagnosis and treatment. *World J. Cardiol.*, v.7, p.434-441, 2015.
- DEMIR, T.; HAMES, E.E.; SUPHI, S.O. *et al.* An optimization approach to scale up keratinase production by *Streptomyces* sp. 2M21 by utilizing chicken feather. *Int. Biodeter. Biodegr.*, v.103, p.134-140, 2015.
- ESCODRO, P.B.; LOPES, P.F.R.; GIANINI, C.G. *et al.* Diagnóstico diferencial de trombose artiofálica e mieloencefalite protozoária equina: relato de caso. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.62, p.1048-1053, 2010.
- GINTHER, C. L. Sporulation and the production of serine protease and cephamycin C by *Streptomyces lactamdurans*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.15, p.522-526, 1979.
- JU, X.; CAO, X.; SUN, Y. *et al.* Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from *Streptomyces* sp. XZNUM 00004. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v.28, p.2479-2486, 2012.
- MANDER, P.; CHO, S.S.; SIMKHADA, J.R. *et al.* A low molecular weight chymotrypsin-like novel fibrinolytic enzyme from *Streptomyces* sp. CS624. *Process Biochem.*, v.46, p.1449-1455, 2011.
- NARAYANA, K.; VIJAYALAKSHMI, M. Optimization of antimicrobial metabolites production by *Streptomyces albidoflavus*. *Res. J. Pharmacol.*, v.2, p.4-7, 2008.
- NASCIMENTO, T.P.; SALES, A.E.; PORTO, C.S. *et al.* Purification of a fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 by aqueous two-phase systems (PEG/sulfate). *J. Chromatogr. B.*, v.1025, p.16-24, 2016.
- OYAMADA, T.; SAIGAMI, K.; PARK, C. *et al.* Pathology of aortic-iliac thrombosis in two horses. *J. Equine Vet. Sci.*, v.18, p.59-65, 2007.
- PORTO, A.L.F.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; LIMA FILHO, J.L. Effects of culture conditions on protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing on the soy bean flour medium. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v.60, p.115-122, 1996.
- PRIDHAM, T.G.; ADERSON, P.; FOLEY, C. *et al.* Selection of media for maintenance and taxonomic study of *Streptomyces*. *Antibiot. Ann.*, p.947-953, 1957.
- SANCHEZ, S.; DEMAIN, A.L. Metabolic regulation of fermentation processes. *Enzyme Microb. Technol.*, v.31, p.895-906, 2002.
- SILVA, G.M.M.; BEZERRA, R.P.; TEIXEIRA, J.A. *et al.* Fibrinolytic protease production by new *Streptomyces* sp. DPUA 1576. *Electron. J. Biotechnol.*, v.18, p.16-19, 2015.
- SILVA, G.M.M.; BEZERRA, R.P.; TEIXEIRA, J.A. *et al.* Screening, production and biochemical characterization of a new fibrinolytic enzyme produced by *Streptomyces* sp. (Streptomycetaceae) isolated from Amazonian lichens. *Acta Amaz.*, v.46, p.301-310, 2016.
- SIMKHADA, J.R.; MANDER, P.; CHO, S.S. *et al.* A novel fibrinolytic protease from *Streptomyces* sp. CS684. *Process Biochem.*, v.45, p.88-93, 2010.
- SOBREIRA, M.L.; YOSHIDA, W.M.; LASTÓRIA, S. Tromboflebite superficial: epidemiologia, fisiopatologia, diagnóstico e tratamento. *J. Vasc. Bras.*, v.40, p.131-143, 2008.
- STATISTICA for Windows: data analysis software system. Version 8.0. Tulsa: Statsoft., 2008. 298 p.
- WANG, S.; WU, Y.; LIANG, T. Purification and biochemical characterization of a nattokinase by conversion of shrimp shell with *Bacillus subtilis* TKU007. *N. Biotechnol.*, v.28, p.196-202, 2011.