



JANILSON FELIX DA SILVA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA PROTEASE
ALCALINA DO RESÍDUO DE PROCESSAMENTO DA
CARAPEBA PRATEADA (*Diapterus rhombeus*)**

Recife-PE
Agosto, 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE PESCA E AQUICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA PROTEASE
ALCALINA DO RESÍDUO DE PROCESSAMENTO DA
CARAPEBA PRATEADA (*Diapterus rhombeus*)**

Janilson Felix da Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau mestre em Recursos Pesqueiros e Aquicultura.

Orientador: Prof.Dr. Ranilson de Souza Bezerra
Co-Orientador: Prof.Dr. Ronaldo O. Cavalli

Recife, PE
Agosto, 2009

Ficha catalográfica

5586p Silva, Janilson Felix da
Purificação e caracterização de uma protease alcalina
do resíduo de processamento da Carapeba prateada
(*Diapterus rhombeus*) / Janilson Felix da Silva. -2009.
71 f. : il.

Orientador: Ranilson de Souza Bezerra
Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e
Aqüicultura). – Universidade Federal Rural de Pernambuco.
Departamento de Pesca.
Inclui referências e anexo.

CDD 639

1. *Diapterus rhombeus*
2. Protease
3. Tripsina
4. Peixe
5. Carapeba prateada
 - I. Bezerra, Ranilson de Souza
 - II. Título

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA PROTEASE ALCALINA DO
RESÍDUO DE PROCESSAMENTO DA CARAPEBA PRATEADA (*Diapterus
rhombeus*)**

JANILSON FELIX DA SILVA

Esta dissertação foi julgada para a obtenção do título de

Mestre em Recursos Pesqueiros e Aquicultura

E aprovada em ____/____/____ pelo Programa de Pós Graduação em Recursos
Pesqueiros e Aquicultura em sua forma final.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra - Orientador
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Karina Ribeiro – Membro externo
Universidade Federal da Pernambuco

Dra. Patrícia Fernandes de Castro - Membro externo
EMBRAPA Meio - Norte

Prof. Dr. Ronaldo O. Cavalli – Membro interno
Universidade Federal Rural de Pernambuco

"A persistência é o caminho do êxito."

Charles Chaplin

Dedicatória

À Maria de Lourdes Gomes Pordeus (minha madrinha do coração) que sempre que pode fez o possível por mim.

Agradecimentos

Ao Senhor Jesus que sempre me fortaleceu ao longo da minha vida;

Ao Professor Dr. Ranilson de Souza Bezerra pela sua dedicação na orientação deste trabalho;

Aos meus familiares, especialmente, os meus irmãos Jair e Jailson e a minha irmã Sandra, que sempre torceram por mim;

Aos Membros da Banca Examinadora: Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra, Prof. Dr. Ronaldo de Oliveira Cavalli, Dra. Patrícia Fernandes de Castro e Dra. Karina Ribeiro pelas oportunas sugestões para melhora deste trabalho;

Aos Docentes do Curso de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura pela transferência de conhecimento e vivências durante as aulas ministradas.

Às funcionárias Selma e Telma da UFRPE pelos grandes favores prestados durante o curso do Mestrado.

Aos colegas do Laboratório de Enzimologia (LABENZ): Amanda, Anderson, Augusto, Caio, Carolina, Dárlío, Diego, Douglas, Fábio, Fernanda, Gilmar, Helane, Juarez, Juliana, Juliatt, Karina, Karoll, Kelma, Marina, Mirella, Moisés, Patrícia, Renata, Ricardo, Robson, Suzan, Talita, Thiago, Vagne e Werlayne pelo convívio, auxílio nas etapas experimentais e sugestões para o aprimoramento dos conhecimentos científicos;

Às professoras Betty Rose e Mariana Guimaraens pelo apoio que me fez entrar no Curso de Mestrado. Além disso, pelos conhecimentos passados nas aulas de graduação, na orientação de monitoria e nos projetos de pesquisas. As duas minha sincera gratidão.

Aos colegas e amigos da turma de Recursos Pesqueiros e Aquicultura 2008 pela convivência, troca de conhecimentos e pelos momentos de descontração nas horas vagas. Sorte para todos!

Aos amigos e vizinhos: Ana Catarina, Marcelo, Gerlaine, Igor, Jaqueline, Paula, Maria José, Thiago, Ramon e Adilson que sempre me apoiaram;

À Maria Gabriela, Catarina Gomes, o Carlos, Indra e Karla Mirela pela nossa amizade que vem sendo construída desde a Graduação. Saúde, paz e progresso para todos nós com a benção de Deus!

A todos meu MUITO OBRIGADO.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIII
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XVI
1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo geral.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3. REVISÃO DA LITERATURA	21
3.2 Processos de purificação de proteínas	24
3.3. Estudo do grupo N-terminal em proteínas de peixes	26
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
5. ARTIGO CIENTÍFICO.....	38
RESUMO	40
INTRODUÇÃO	41
MATERIAL E MÉTODOS.....	43
Obtenção dos exemplares	43
Extrato enzimático	43
Ensaio enzimático e dosagem protéica.....	43
Processos da purificação enzimática	44
Eletroforese.....	45
Efeitos de pH	45

Efeitos de temperatura.....	46
Efeitos de inibidores.....	46
Efeitos dos íons metálicos	47
Parâmetros cinéticos.....	47
Obtenção da sequência amino-terminal.....	48
RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
7. ANEXO	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS-PAGE da tripsina purificada da carapeba prateada (*D. rhombeus*). No poço 1 está o padrão de peso molecular e no poço 2 o fração obtida da coluna de afinidade..... 61

Figura 2 – Efeito do pH sobre a atividade da tripsina da carapeba prateada (*D. rhombeus*). Os tampões utilizados no ensaio foram fosfato (■, pH 4,0 a 7,5), Tris- HCl (○, pH 7,2 a 8,5), Glicina-NaOH (▲, pH 8,7 a 11,0) (A), Efeito da temperatura sobre a atividade da tripsina da carapeba prateada (*D. rhombeus*). O valor mais alto de atividade enzimática específica obtida a 55°C, foi estipulada como o 100% (B), Efeito da temperatura sobre a estabilidade da tripsina da carapeba prateada (*D. rhombeus*) (C).. 62

Figura 3 - Alinhamento da sequência N-terminal da tripsina símile da carapeba prateada (*Diapterus rhombeus*) com outras de tripsina de peixes e uma tripsina bovina. Os pontos representam resíduos de aminoácido iguais à sequência principal (presente trabalho) e as letras indicam os aminoácidos que são diferentes..... 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeito de íons e inibidores de protease sobre a atividade da tripsina purificada da carapeba prateada (*D. rhombeus*).....59

Tabela 2: Parâmetros cinéticos para a tripsina da carapeba prateada (*D. rhombeus*), utilizando o substrato BAPNA60

LISTA DE ABREVIATURAS

pH - potencial hidrogeniônico

kDa - quilo Daltons

SDS - dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida utilizando SDS

PMSF - fenil-metil-sulfonil-fluoreto

TPCK - tosil-amido-2-feniletíl clorometil cetona

TLCK - tosil-lisina clorometil cetona

BAPNA - benzoil arginina ρ -nitroanilida

SUCPHEPNAN - succinil fenilalanina ρ -nitroanilida

RESUMO

A Carapeba prateada (*Diapterus rhombeus*) é uma espécie de relevante representatividade dentre a comunidade pesqueira da região nordeste do Brasil. Ainda nessa região, a pesca artesanal é a mais representativa apesar de registros de cultivo da carapeba em sistemas extensivos. Dentre as partes do peixe não consumidas encontram-se as vísceras que correspondem a 5% do peso total dos animais. Desta forma, ao serem descartadas, sem tratamento, esses resíduos representam grave problema ambiental. Entretanto, por serem ricas em enzimas digestivas, viáveis para utilização em determinados processos biotecnológicos essas vísceras representam uma importante fonte alternativa de enzimas industriais. Visando essas informações, o objetivo do presente trabalho foi purificar e caracterizar uma protease alcalina das vísceras de *D. rhombeus*. Para tanto, vísceras de carapeba prateada foram utilizadas para obtenção de um extrato bruto posteriormente utilizado para purificação enzimática. O processo de purificação foi realizado em três etapas: tratamento térmico (45°C por 30min), precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-75). Ao final do processo de purificação obteve-se um incremento de 86,80 vezes na atividade específica e um rendimento de 22,34%. Uma alíquota do extrato purificado foi aplicada em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e o seu peso foi estimado em 24,5 kDa. O pH ótimo e a temperatura ótima para a atividade enzimática foram 8,5 e 55 °C, respectivamente. A enzima demonstrou ser sensível a temperaturas superiores a 45 °C, após incubação por 30 min, perdendo 100% de sua atividade. Os valores de K_m e do K_{cat} da protease foram 0,266 mM e $0,116 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$, respectivamente, usando benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida (BAPNA) como substrato. Sua atividade foi aumentada na presença dos íons K^+ , Li^+ , Ca^{2+} , Mn^{2+} e Ba^{2+} e inibidas pelos íons Fe^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} e Pb^{2+} . Testes com inibidores de proteases mostraram que a enzima foi

fortemente inibida por TLCK e benzamidina, inibidores clássicos de tripsina. A sequência dos 15 primeiros aminoácidos do N-terminal da protease foi IVGGYECTMHSEAHE e mostrou alta homologia com tripsinas de diversas espécies de peixes. Os dados obtidos demonstram que enzima purificada é uma tripsina com características compatíveis para ser empregada na indústria biotecnológica.

Palavras-chaves: protease, tripsina, peixe, carapeba prateada, *Diapterus rhombeus*

ABSTRACT

The silver mojarra (*Diapterus rhombeus*) is specie of relevant representation among the fishing community in northeastern Brazil. Also in this region, the fishing is the most representative records despite growing carapeba in extensive systems. Among the parts of the fish are not consumed are the viscera which represent 5% of the total weight of the animals. Thus, to be discarded without treatment, these wastes pose serious environmental problem. However, because they are rich in digestive enzymes, viable for use in certain biotechnological processes these viscera represent an important alternative source of industrial enzymes. Based on this information, the purpose of this study was to purify and characterize an alkaline protease from the viscera of *D. rhombeus*. Therefore, viscera silver mojarra were used to obtain a crude extract and thereafter used for enzyme purification. The purification process was carried out in three steps: heat treatment (45°C for 30 minutes), precipitation with ammonium sulfate and molecular exclusion chromatography (Sephadex G-75). At the end of the purification process, achieved an increase of 86.80-fold in the specific activity and a yield of 22.34%. An aliquot of purified extract was applied to gel electrophoresis (SDS-PAGE) and its molecular weight was estimated at 24.5 kDa. The optimum pH and optimum temperature for enzyme activity were 8.5 and 55°C, respectively. The enzyme was shown to be sensitive to temperatures above 45°C, after incubation for 30 min, losing 100% of its activity. The values of K_m and K_{cat} of the protease were 0.266 mM and $0.116 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectively, using benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) as substrate. Its activity was increased in the presence of ions K^+ , Li^+ , Ca^{2+} , Mn^{2+} and Ba^{2+} ions and inhibited by Fe^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} and Pb^{2+} . Tests with protease inhibitors showed that the enzyme was strongly inhibited by TLCK and benzamidine,

classic inhibitors of trypsin. The sequence of the first 15 amino acid N-terminal protease was IVGGYECTMHSEAHE and showed high homology with trypsins of various species of fish. The data show that the purified enzyme is one trypsin-like with characteristics compatible to be used in the biotechnology industry.

Keywords: protease, trypsin, fish, silver mojarra, *Diapterus rhombeus*

1. INTRODUÇÃO

A piscicultura é um ramo da aquicultura que cresce em todo o mundo, tornando-se necessária para compensar a demanda por produtos pesqueiros, uma vez que os recursos naturais estão cada vez mais escassos. O aumento da produção de pescado, invariavelmente, resulta na produção de resíduos ligados a esta atividade agroindustrial. Estes subprodutos representam um desafio para empresários do setor aquícola e para a comunidade científica interessada em buscar estratégias que tornem esta atividade sustentável e ecologicamente viável (BEZERRA et al., 2001a).

As vísceras compõem os resíduos oriundos do processamento do pescado e correspondem a 5% do peso total do animal (SIMPSON e HAARD, 1987). Ao serem descartados sem qualquer tratamento, estes resíduos representam um grave problema ambiental. Por outro lado, por serem ricos em biomoléculas viáveis para utilização em determinados processos biotecnológicos, representam uma importante fonte alternativa de enzimas industriais (BEZERRA et al., 2001b).

As enzimas são proteínas catalisadoras que aumentam a velocidade das reações nos sistemas biológicos sem serem alteradas no processo, canalizando seletivamente os substratos para rotas úteis (CHAMPE e HARVEY, 1996). Desta maneira, essas moléculas desempenham um importante papel nas funções fisiológicas determinantes para a sobrevivência dos organismos (GUPTA et al., 2002). No trato digestório dos peixes, uma das principais enzimas encontradas são as tripsinas. Estas enzimas desempenham uma função chave na digestão de proteínas advindas da dieta, sendo responsável também pela ativação do tripsinogênio e de outros zimogênios (KLOMKLAO et al., 2007a). Devido à sua ampla utilização em processos biotecnológicos, como em indústrias de panificação, de queijo e cerveja, para melhorar a qualidade, a estabilidade e a solubilidade destes produtos, entre outras aplicabilidades,

grande atenção tem sido dada para o estudo desta enzima (GUIZANI et al., 1991; SHI, et al., 2007).

Dentre as espécies de maior representatividade para a pesca no litoral da região Nordeste do Brasil, a carapeba prateada (*Diapterus rhombeus*) merece destaque (BELTRÃO, 1988). Pertencente à família Gerreidae, estes animais podem ser encontrados em regiões costeiras estuarinas nas águas tropicais do Oceano Atlântico (AUSTIN, 1973). *D. rhombeus*, em conjunto com representantes dos gêneros *Eucinostomus*, *Eugerres* e *Gerres*, apresenta um papel relevante tanto na ictiofauna estuarina quanto na pesca de subsistência de algumas localidades (CHEN et al., 2007). Apesar de registros de cultivos de carapebas em sistemas extensivos nas zonas estuarinas nesta região do país (CERQUEIRA, 2004), a pesca artesanal ainda é a mais representativa. De acordo com os dados do IBAMA (2008), em 2006, na região Nordeste do Brasil foram capturadas 2.080t de Gerrídeos oriundos da pesca extrativa marinha artesanal. Toda esta produção gera um descarte anual estimado de aproximadamente 100t de vísceras. A identificação de biomoléculas presentes nestes resíduos, com características promissoras para aplicação biotecnológicas pode otimizar o aproveitamento do pescado, agregando valor a subprodutos da indústria pesqueira.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Purificar e caracterizar a tripsina da carapeba prateada (*D. rhombeus*).

2.2 Objetivos específicos

- Investigar tripsina no intestino de exemplares adultos da carapeba prateada (*Diapterus rhombeus*);
- Purificar uma tripsina;
- Caracterizar a enzima utilizando SDS-PAGE;
- Definir parâmetros físico-químicos e cinéticos dessa enzima;
- Obter a seqüência da porção amino-terminal dessa tripsina;

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Enzimas

As enzimas são proteínas que desempenham importante papel como catalisadores em diversas reações bioquímicas. São fundamentais para o metabolismo biológicos dos seres vivos, visto que, sem a catálise, as reações não ocorreriam em uma escala de tempo útil. Agindo em seqüências organizadas, as enzimas catalisam centenas de reações sucessivas pelas quais as moléculas de nutrientes são degradadas, aumentando a velocidade das reações, sem afetar o seu equilíbrio. Existe uma correlação entre a estrutura das proteínas e os peptídeos que fazem parte da molécula enzimática e suas propriedades biológicas. Provavelmente, apenas uma fração da molécula denominada sítio ativo é a responsável pela ligação da enzima ao substrato, e essa fração determina a especificidade enzimática (NELSON e COX, 2004).

Dentre as enzimas de grande importância biológica têm-se as proteases. Estas ocorrem naturalmente em todos os organismos e correspondem a 1-5% de seus conteúdos genéticos. Essas enzimas estão envolvidas numa grande variedade de reações metabólicas e processos biotecnológicos. Por apresentarem aplicabilidade industrial as proteases é um dos grupos mais importantes e representam 60% das enzimas comercializadas (GUPTA et al., 2002).

De uma maneira geral, as proteases podem ser divididas em exopeptidases e as endopeptidases. As primeiras atuam próximo das extremidades das cadeias enquanto as outras atuam preferencialmente nas regiões internas das cadeias polipeptídicas (RAO et al., 1998), entre as endopeptidases encontram-se as principais proteases industriais como as tripsinas.

A produção e excreção das proteases digestivas dos peixes são semelhantes ao observado em mamíferos (KOLODZIEJSKA e SIKORSKI, 1996). O estômago, além

de secretar HCl, contém pepsina, produzida no epitélio sob a forma de pepsinogênios. No pâncreas as proteases são produzidas sob a forma de zimogênios e são ativadas no lúmen do intestino pela ação da enteroquinase uma protease do intestino delgado. Esta por sua vez, hidrolisa as ligações peptídicas específicas dos tripsinogênios, transformando-os em tripsina ativa. A partir disto, as moléculas de enteroquinase juntamente com as de tripsina (recém ativadas) promovem um efeito cascata, responsável pela ativação de novos tripsinogênios e outros zimogênios (BRODY, 1994). Segundo Glass et al. (1989), certas espécies de teleósteos apresentam o pâncreas difuso a outros órgãos, como nos cecos pilóricos.

Desde a década de 40, quando uma pepsina de salmão foi cristalizada (NORRIS e ELAM, 1940), proteases digestivas de peixes de águas temperadas vêm sendo comumente estudadas. Estudos de isolamento e caracterização de proteases digestivas como as pepsinas de peixes são comuns na literatura onde reportou-se que as pepsinas são geralmente ativadas em valores de pH ligeiramente mais elevados e apresentam maior atividade específica que as de mamíferos (OWEN e WIGGS, 1971; NODA e MURAKAMI, 1981; TWINING et al., 1983; BREWER et al., 1984; MARTINEZ e OLSEN, 1989; MUNILLA-MORÁN e SABORIDO-REY, 1996; DIAZ-LÓPES et al., 1998; KUROKAWA et al., 2005).

A atividade da tripsina sempre foi alvo de estudos em diferentes espécies de peixes de clima temperado com em *Salmo gairdneri* (KITAMIKADO e TACHINO, 1960), *Gadus morhua* (ASGEIRSSON et al., 1989; OVERNELL, 1973), *Sardinops melanostia* (NODA e MURAKAMI, 1981), *Mallotus villosus* (HJELMELAND e RAA, 1982), *Protoptera aethiopicus* (DE HAEN et al., 1977), *Parasilurus asotus* (YOSHINAKA et al., 1984), *Tautogolabrus adspersus* (SIMPSON e HAARD, 1985), *Salmo solar* (STOCKNES e RUSTAD, 1995), *Oncorhynchus mykiss*

(KRISTJANSSON, 1991), *Siganus canaliculatus* (SABAPATHY e TEO, 1995). O pH ótimo das tripsinas desses peixes é alcalino, similarmente ao encontrado em tripsinas de invertebrados e de outros vertebrados. Estudos demonstram seu importante papel na preparação e processamento de arenques (OREJANA e LISTON, 1981), pois tripsinas de bacalhau, quando adicionadas no processo de aceleração da fermentação do arenque promoveram maior solubilização das proteínas quando comparado com a tripsina bovina (SIMPSON e HAARD, 1987).

Overnell (1973) foi o primeiro autor a relatar a atividade da quimotripsina em extratos brutos dos cecos pilóricos de *Gadus mohua*, posteriormente essas enzimas foram purificadas por asgeirsson e bjarnasson (1993). Estudos de caracterização de quimotripsinas de vísceras de *Oncorhynchus mykiss* demonstraram que esta enzima apresenta características alcalinas similarmente ao encontrado em quimotripsinas de bovinos (KRISTJÁNSSON e NIELSEN, 1992).

A elastase pancreática pertence à família das serinoproteases e apresenta a característica de digerir especificamente a elastina. Elastases de *Gadus mohua* foram as primeiras a serem purificadas e caracterizadas (RAA e WALTHER, 1989; GILDBERG e ØVERBØ, 1990; ASGEIRSSON e BJARNASSON, 1993; KRISTJÁNSSON et al., 1995).

Recentemente, a caracterização e purificação de proteases alcalinas extraídas das vísceras de peixes tropicais e de clima temperado vêm sendo realizadas. Os resultados destas pesquisas demonstram que as proteases apresentam características peculiares para aplicações biotecnológicas (SOUZA et al., 2007; ALENCAR et al., 2003; BEZERRA et al., 2000; 2001b; 2005; ARANISHI et al., 1998 e JÓNÁS et al. (1983). Essas diversidades biológicas permite grande variedade de proteases com propriedades únicas (DE VECCHI e COPPE, 1996).

3.2 Processos de purificação de proteínas

O processo de purificação requer a separação das proteínas dos componentes celulares, os quais são rompidos em solução tampão, de forma que se evite a desnaturação da proteína formando uma mistura denominada extrato bruto (BRACHT e ISHII-IWAMOTO, 2002). Os processos de purificação podem ocorrer de acordo com diferentes métodos baseados nas diferenças físicas, no tamanho da molécula protéica, na carga elétrica e na afinidade com outras moléculas (NELSON e COX, 2004).

A primeira etapa em um típico protocolo de purificação de proteína é a centrifugação que separa partículas com diferentes massas ou densidades, promovendo a obtenção de partículas em suspensão e de fundo em diferentes índices (DEVLIN, 1998). A força centrífuga e a duração da centrifugação são ajustadas para assegurar a sedimentação de materiais insolúveis, formando precipitados. Assim, as proteínas solúveis, que constituem o sobrenadante podem ser separadas por outros métodos de purificação (NELSON e COX, 2004).

As proteínas em solução apresentam alterações na solubilidade em função do pH, força iônica, propriedades dielétricas do solvente e temperatura (CHAMPE e HARVEY, 1996). Desta forma, podem ser separadas em função de seu ponto isoelétrico ou ponto isolítico, definido como o pH em que a molécula não apresenta carga elétrica efetiva sendo assim incapaz de migrar ou deslocar-se num campo elétrico. Misturas de proteínas em pH isoelétrico precipitam e não perdem sua conformação nativa, e assim, são ressuspensas em meio que apresente pH e concentração de sal adequados (NELSON e COX, 2004; VOET e VOET, 2005).

O uso de solventes orgânicos, como o etanol e a acetona, reduzem a solubilidade das proteínas, podendo desnaturá-las se usado em elevadas temperaturas. Desta forma,

neste procedimento faz-se necessário o controle da temperatura (CAMPBELL, 2001). Devido a sua baixa constante dielétrica (quando comparado com a água), solventes orgânicos são capazes de precipitar as enzimas, pois aumentam a atração entre as moléculas de proteínas removendo a água de solvatação da proteína. Desta forma, as forças eletrostáticas induzem regiões de cargas opostas da proteína a se atraírem, assim, a água é removida tanto pelo solvente orgânico, como pela estruturação ao redor da molécula orgânica e a constante dielétrica é diminuída (SCOPES, 1988; WANG et al., 1979; HARRISON, 1993).

Os sais neutros têm efeito pronunciado sobre a solubilidade de proteínas, desta forma, os sais de íons divalentes, tais como cloreto de magnésio ($MgCl_2$) e sulfato de amônio ($(NH_4)_2SO_4$), são muito mais eficientes na solubilização do que os sais de íons monovalentes como o cloreto de Sódio (NaCl) (Nelson e Cox, 2004). Com o uso dos sais ocorre o aumento ou perda da solubilidade, promovendo o fenômeno de *salting in* e *salting out*, respectivamente.

Bezerra et al. (2001b) determinaram um método para purificação de enzimas baseada na termoestabilidade da tripsina de tabaqui (*Colossoma macropomum*). Este método é composto por três etapas: tratamento térmico, fracionamento com sulfato de amônio e filtração em gel Sephadex.

As determinações de pureza e do peso molecular da biomolécula purificada são feitas mais comumente por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes. Assim, ocorrerá a separação de moléculas que, sob influência de um campo elétrico, se movem ou migram em uma velocidade determinada por sua carga: razão de massa (BRACHT e ISHII-IWAMOTO, 2002).

Em uma das formas de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), o detergente dodecilsulfato de sódio (SDS) é usado para desnaturar as proteínas. Desta

forma, moléculas anfifílicas, como o SDS, interferem nas interações hidrofóbicas que normalmente estabilizam as proteínas. A carga negativa que o SDS transfere mascara a carga intrínseca da proteína como resultado as proteínas tratadas com SDS possuirão formas similares e razões carga/massa parecidas. Em consequência disso, a SDS-PAGE separa as proteínas de acordo com a massa molecular (VOET e VOET, 2005).

A cromatografia de afinidade baseia-se na separação de proteínas de acordo com sua capacidade ligação não-covalente a uma matriz como ligante. Desta forma, a proteína de interesse se liga à matriz (ligante) e as outras proteínas passam livremente pela coluna. Posteriormente, as proteínas ligadas à coluna são, então, desprendidas da matriz pela mudança na concentração de sal ou pH (DEVLIN, 1998).

Os parâmetros de solubilidade para separar proteínas são usados, sobretudo nas fases iniciais de purificação protéica, mas eles não fornecem a resolução elevada dos métodos cromatográficos e eletroforéticos, bem mais precisos em relação às impurezas remanescentes (DEVLIN, 1998).

Não existe uma seqüência exata dos métodos de purificação a serem usados em todas as proteínas. Desta forma, deve-se escolher uma seqüência de técnicas de purificação e de métodos sensíveis e específicos que resultem em alto grau de purificação e rendimento (DEVLIN, 1998; VOET e VOET, 2005).

3.3. Estudo do grupo N-terminal em proteínas de peixes

A seqüência da estrutura primária da insulina bovina permitiu o desenvolvimento de métodos efetivos na identificação de grupos terminais dos polipeptídios. Dentre os métodos mais utilizados destaca-se o da degradação de Edman, neste método cada aminoácido é individualmente removido da extremidade amínica do peptídeo. Para tanto, fenilisotiocinato (reagente de Edman) reage com o grupo amino n-

terminal do peptídeo. Posteriormente, esse peptídeo é submetido a tratamento com ácido diluído em baixas temperaturas para que ocorra a remoção do resíduo n-terminal como um derivado fenilhidantoínico, o qual pode ser identificado por cromatografia. O restante da cadeia é submetido à outra série destas reações, permitindo a identificação de novos resíduos n-terminal e determinando seqüência do peptídeo. Atualmente, utilizam-se seqüenciadores para processar toda a reação (VOET e VOET, 2005; NELSON e COX, 2004).

A informação da estrutura desses resíduos é de fundamental importância para o conhecimento do mecanismo molecular de ação do peptídeo, da comparação de seqüências entre proteínas análogas de um mesmo indivíduo, de membros da mesma espécie e de espécies relacionadas. Com base nestas informações muitas enzimas digestivas, principalmente as serino proteases como a tripsina, de peixes marinhos já foram submetidas aos métodos de identificação e tiveram os seus grupamentos n-terminal seqüenciados. Dentre os animais já analisados podemos citar: o salmão do Atlântico (*Salmo salar*) (MALE et al., 1995); as anchovas *Engraulis japonicus* (AHSAN & WATABE, 2001) e *Pomatomus saltatrix* (KLOMKLAO et al., 2007a); a sardinha (*Sardina pilchardus*) (BOUGATEF et al., 2007); o jacobever (*Sebastes schlegelii*) e o sculpin (*Alcichthys alcicornis*) (KISHIMURA et al., 2007)

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHSAN, M. N., WATANABE, S. (2005). Kinetic and Structural Properties of Two Isoforms of trypsin Isolated from the Viscera of Japanese Anchovy, *Engraulis japonicus*. **Journal of Protein Chemistry**, 20(1), 49-58.

ALENCAR, R.B., BIONDI, M. M., PAIVA, P.M.G., VIEIRA, V.L.A., CARVALHO JR., L.B., BEZERRA, R.S. (2003). Alkaline proteases from digestive tract of four tropical fishes. **Brazilian Journal of Food Technology**. 6, 279-284.

ARANISHI, F., WATANABE, T., OSATOMI, K., CAO, M., HARA, K. AND ISHIHARA, T. (1998). Purification and characterization of thermostable dipeptidase from carp intestine. **Journal of marine biotechnology**, 6, 116-123.

ASGEIRSSON, B., FOX, J.W., BJARNASON, J. (1989). Purification and characterization of trypsin from the poikilotherm *Gadus morhua*. **European Journal of Biochemistry**, 180, 85-94.

ASGEIRSSON, B., BJARNASSON, J. B. (1993). Properties of elastase from Atlantic cod, a cold adapted proteinase. **Biochemistry Biophysic Acta**, 1164, 91-100.

AUSTIN, H. M. (1973). Northern range extension of the rhomboid mojarra, *Diapterus rhombeus* Cuvier and Valenciennes (Gerreidae). **Chesapeake Science**, 3, 222.

BELTRÃO, A. C. M. Pisces Gerreidae Gunther (1862) de alguns estuários do estado de Pernambuco. Recife, 1988, 120p. **Dissertação** (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Oceanografia.

BEZERRA, R. S.; SANTOS, J. F.; SILVA LINO, M. A.; VIEIRA V. L. A.; CARVALHO, L. B. JR.; (2000). Characterization of stomach and piloric caeca proteinases of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Journal of Food Biochemistry**, 24, 198-199.

BEZERRA, R. S., LINS E. J. F., ALENCAR R. B., PAIVA, P. M. G., CHAVES, M. E. C., COELHO L. C. B. B., CARVALHO JR L. B. (2005). Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Process Biochemistry**, 40, 1829-1834.

BEZERRA, R. S., VIEIRA V. L. A., CARVALHO JR., L. B. (2001b). Proteases no trato digestivo de peixes: Tripsina do tambaqui (*Colossoma macropomum*), modelo alternativo para o aproveitamento de sub-produtos na indústria pesqueira. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 22, setembro/outubro.

BEZERRA, R. S., VIEIRA, V. L. A., SANTOS, A. J. G. (2001a). Ciclo reprodutivo da carapeba prateada *Diapterus rhombeus* (Cuvier, 1829), no litoral de Pernambuco. **Tropical Oceanography**, 1, 67-78.

BOUGATEF, A., SOUISSI, N., FAKHFAKH, N., ELLOUZ-TRIKI, Y., NASRI, M. (2000). Purification and characterization of trypsin from the viscera of sardine (*Sardina pilchardus*). **Food Chemistry**, 102, 343-350.

BRACHT, A., ISHII-IWAMOTO, E. L. **Métodos de Laboratório em Bioquímica**. Barueri: Manole, 2002. p.77-192.

BREWER, P., HELBIG, N., HAARD, N. F. (1984). Atlantic cod pepsin. Characterization and use as a rennet substitute. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**. 17, 38-43.

BRODY, T. **Nutritional Biochemistry**. USA: Academic Press, 1994. 657p.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2001. 752p.

CERQUEIRA, V. R. Cultivo de peixes marinhos. In: POLI, C. R.; POLI, A. T. B.; ANDREATA, E.; BELTRAME, E. **Aquicultura. Experiências brasileiras**. Ed. Multitarefa, 2004, 445p.

CHAMPE, P. C., HARVEY, R. A. **Bioquímica Ilustrada**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 1996, 446P.

CHEN, W. J., RUIZ-CARUS, R., ORTI, G. (2007). Relationships among four genera of mojarras (Teleostei: Perciformes: Gerreidae) from the western Atlantic and their tentative placement among percomorph fishes. **Journal of Fish Biology**, 70B, 202-218.

DE VECCHI, S., COPPES, Z. (1996). Marine fish digestive proteases – relevance to food industry and the South-West Atlantic region – A review. **Journal of food Biochemistry**, 20, 193- 214.

DEVLIN, T. M. **Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas**. 4 ed. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 1998. 971p.

DÍAZ-LÓPEZ, M. et al. Characterization of fish acid proteases by substrate–gel electrophoresis. **Comparative Biochemistry and Physiology (Part B)**, 121, 369-377, 1998.

GILDBERG, A., ØVERBØ, K. (1990). Purification and characterization of pancreatic elastase from atlantic cod (*Gadus morhua*). **Comparative Biochemistry and Physiology (Part B)**, 97, 775-782.

GLASS, H. J., MACDONALD, N.L., MORAN, R.M., STARK, J.R. (1989) Digestion of protein in different marine species. **Comparative Biochemistry and Physiology (Part B)**, 94, 607-611.

GUIZANI, N., ROLLE, R. S., MARSHALL, M.R., WEI, C. I. (1991). Isolation, purification and characterization of a trypsin from the pyloric caeca of mullet (*Mugil cephalus*). **Comparative Biochemistry Physiology, Part B**, 98(4), 517-521.

GUPTA, R., BEG, Q. K., LARENZ, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 59, 15-32.

HARRISON, R. G. **Protein Purification Process Engineering**. New York: Marcel Dekker, 1993. 381 p.

HJELMELAND, K., RAA, J. (1982). A modified spectrophotometric determination of two chymotrypsin type isozymes isolated from the Arctic fish capelin (*Mallotus villosus*). **Comparative Biochemistry and Physiology (Part B)**, 71, 557-562.

IBAMA. **Estatística da pesca 2006 Brasil**: Grandes regiões e unidades da federação. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Brasília-DF, dezembro de 2008, 174p.

JÓNÁS, E. RÁGYANSZKI, M., OLÁH, J., BOROSS, L. (1983). Proteolytic digestive enzymes of carnivorous (*Silurus glanis* L.), herbivorous (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) and omnivorous (*Cyprinus carpio* L.) fishes. **Aquaculture**, 30, 145-154.

KHISHIMURA, H., TOKUDA, Y., KLOMKLAO, S., BENJAKUL, S., ANDO, S. (2007). Trypsins from the pyloric caeca of jacobever (*Sebastes schlegelii*) and elkhorn sculpin (*Alcichthys alcicornis*): isolation and characterization. **Food Chemistry**, 100, 1490-1495.

KITAMIKADO, M., TACHINO, S. (1960). Studies on the digestive enzymes of rainbow trout-II. Proteases. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, 26, 685-690.

KLOMKLAO, S., BENJAKUL, S., VISESSANGUAN, W. KHISHIMURA, H., SIMPSOM, B. K. (2007a). Trypsina from the pyloric ceca of bluefish (*Pomatomus saltatrix*). **Comparative Biochemistry Physiology, Part B**, 148, 382-389.

KOŁODZIEJSKA, I., SIKORSKI, Z. E. (1996). The digestive protease of marine fish and invertebrates. **Bulletin Sea Fish Institute**, 51-56.

KRISTJÁNSSON, M. M. GUDMUNDSDÓTTIR, S., FOX, J. W., BJARNASON, J. B. (1995). Characterization of a collagenolytic serine proteinase from the Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Comparative Biochemistry and Physiology (Part B)**, 110, 707-717.

KRISTJÁNSSON, M. M. (1991). Purification and characterization of trypsin from the pyloric caeca of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 39, 1738-1742.

KRISTJÁNSSON, M. M., NIELSEN, H. H. (1992). Purification and characterization of two chymotrypsin-like proteases from the pyloric caeca of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Comparative Biochemistry and Physiology (Part B)**, 101, 247-253.

KUROKAWA, T., UJI, S., SUZUKI, T. (2005). Identification of pepsinogen gene in the genome of stomachless fish, *Takifugu rubripes*. **Comparative Biochemistry and Physiology (Part B)**, 140, 133-140.

MALE, R., LORENS, J. B., SMALAS A. O., TORRISSEN, K. R. (1995). Molecular cloning and characterization of anionic and cationic variants of trypsin from Atlantic salmon. **European Journal of Biochemistry**, 232, 677-685.

MARTINEZ, A., OLSEN, R. L. (1989). Characterization of pepsins from cod. **U.S. Biochemistry**, Corporation (Editorial comments), 16, 22-23.

MUNILLA-MORÁN, R., SABORIDO-REY, F. (1996). Digestive enzymes in marine species. I. Proteinase activities in gut from redfish (*Sebastes mentella*), seabream (*Sparus aurata*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). **Comparative Biochemistry and Physiology (Part B)**, 113, 395-402.

NELSON, D. L., COX, M. M. **Lenhinger: Principios de Bioquímica**. 4 ed. São Paulo: Savier. 1119p, 2004.

NODA, M., MURAKAMI, K. (1981). Studies on proteinases from the digestive organs of sardine. II. Purification and characterization of two acid poteinases from the stomach. **Biochemistry Biophysic Acta (Part B)**, 65, 27-34.

NORRIS, E. R., ELAM, D. W. (1940). Preparation and properties of crystalline salmon pepsin. **Journal of Biological Chemistry**, 134, 443-454.

OREJANA, F. M., LISTON, J. (1981). Agents of proteolysis and its inhibition in patis (fish sauce) fermentation. **Journal of Food Science**, 47, 198-203.

OVERNELL, J. (1973). Digestive enzymes of the pyloric ceca and of their associated mesentery in the cod (*Gadus ogac*). **Comparative Biochemistry and Physiology (Part B)**, 46, 519- 531.

OWEN, T. G., WIGGS, G. J. (1971). Thermal compensation in the stomach of the brook trout. **Comparative Biochemistry and Physiology (Part B)**, 40, 465-473.

RAA, J., WALTHER, B. T. (1989). Purification and characterization of chymotrypsin, trypsin and elastase like proteinases from cod (*Gadus mohua*). **Comparative Biochemistry and Physiology (Part B)**, 93, 317-324.

RAO, M. B., TANKSALE, A.M., GHATGE, M.S. AND DESHPANDE, V. V. (1998) Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 62, 597-635.

SABAPATHY, U., TEO, L. H. (1995). Some properties of the intestinal proteases of the rabbitfish, *Siganus canaliculatus* (Park). **Fish Physiology and Biochemistry**, 14(3), 215-221.

SCOPES, R.K. **Protein Purification Principles and Practice**. 2 ed. New York: Springer- Verlag. 1988. 329 p.

SHI, C., MARSHALL, S. N., SIMPSON, B. K. (2007). Purification and characterization of trypsin from the ceca of the New Zealand hoki fish (*Macruronus novaezealandiae*). **Journal of Food Biochemistry**, 31, 772-796.

SIMPSON, B.K., HAARD, N.F. (1987). Trypsin and trypsin-like enzymes from the stomach less cunner (*Tautoglabrus adspersus*): catalytic and other physical characteristics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 35, 652-656.

SOUZA, A.A.G., AMARAL, I.P.G., SANTO, A.R.E., CARVALHO Jr, L.B., BEZERRA, R.S. (2007). Trypsin-like enzyme from intestine and pyloric caeca of spotted goatfish (*Pseudupeneus maculatus*). **Food Chemistry**, 100, 429-434.

STOCKNES, I., RUSTAD, T. (1995). Purification and characterization of multicatalytic proteinase from Atlantic Salmon (*Salmo salar*). **Comparative Biochemistry and Physiology (Part B)**, 4, 587-595.

TWINING, S. S., ALEXANDER, P. A., GLICK, D. M. (1983). A pepsinogen from rainbow trout. **Comparative Biochemistry and Physiology (Part B)**, 75(1), 109-112.

VOET, D., VOET, J.G. **Biochemistry**. 3 ed. USA: John Wiley & Sons, 2005. 1616 p.

WANG, D.J.C. et al. **Fermentation and Enzyme Technology**. New York: John Wiley & Sons. Inc, 1979. 374 p.

YOSHINAKA, R., SATO, M., SUZUKI, T., IKEDA, S. (1984). Enzymatic characterization of anionic trypsin of the catfish *Parasilurus asotus*. **Comparative Biochemistry and Physiology (Part B)**, 77, 1-6.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados obtidos do trabalho experimental dessa dissertação são apresentados no artigo intitulado **“Purificação e caracterização de uma protease alcalina do resíduo de processamento da carapeba prateada (*Diapterus rhombeus*)”** (manuscrito), que se encontra anexado e será submetido à Revista Food Chemistry (ISSN: 0308-8146), após tradução para língua inglesa.

Purificação e caracterização de uma protease alcalina do resíduo de processamento da carapeba prateada (*Diapterus rhombeus*)

Janilson F. Silva^a, Talita S. Espósito^a, Marina Marcuschi^a, Karina Ribeiro^a, Ronaldo O. Cavalli^b, Ranilson S. Bezerra^{a,*}.

^aLaboratório de Enzimologia (LABENZ), Departamento de Bioquímica e Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brasil.

^bDepartamento de Pesca e Aquicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

Autor para correspondência

Ranilson S. Bezerra

Laboratório de Enzimologia (LABENZ), Departamento de Bioquímica e Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brasil.

Tel, +55 81 21268540; Fax, +55 81 21268576

email: ransoube@uol.com.br

RESUMO

Uma protease alcalina foi encontrada nas vísceras da carapeba prateada (*Diapterus rhombeus*) obtendo-se um incremento de 86,80 vezes na atividade específica e um rendimento de 22,34%. O processo de purificação foi realizado em três etapas: tratamento térmico (45°C por 30min), precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-75). Uma alíquota do extrato purificado foi aplicada em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e o seu peso foi estimado em 24,5 kDa. O pH ótimo e a temperatura ótima para a atividade enzimática foram 8,5 e 55 °C, respectivamente. A enzima demonstrou ser sensível a temperaturas superiores a 45 °C, após incubação por 30 min, perdendo 100% de sua atividade. Os valores de K_m e do K_{cat} da protease foram 0,266 mM e $0,116 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$, respectivamente, usando benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida (BAPNA) como substrato. Sua atividade foi aumentada na presença dos íons K^+ , Li^+ e Ca^{2+} e inibidas pelos íons Fe^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} e Pb^{2+} . Testes com inibidores de proteases mostraram que a enzima foi fortemente inibida por TLCK e benzamidina, inibidores clássicos de tripsina. A sequência dos 15 primeiros aminoácidos do N-terminal da protease foi IVGGYECTMHSEAHE e mostrou alta homologia com tripsinas de várias espécies de peixes.

Palavras-chaves: protease, tripsina, peixe, carapeba prateada, *Diapterus rhombeus*

INTRODUÇÃO

A piscicultura é um ramo da aquicultura que cresce em todo o mundo, tornando-se necessária para compensar a demanda por produtos pesqueiros, uma vez que os recursos naturais estão cada vez mais escassos. O aumento da produção de pescado invariavelmente resulta na produção de resíduos ligados a esta atividade agroindustrial. As vísceras estão entre as partes do peixe que não são consumidas e correspondem por 5% do peso total do animal (Simpson & Haard, 1987). Ao serem eliminados sem qualquer tratamento, estes resíduos representam um grave problema ambiental. De acordo com Bezerra et al. (2001a), as vísceras dos peixes são conhecidas por serem ricas em enzimas digestivas viáveis para utilização em determinados processos biotecnológicos, o que as tornam uma importante fonte de enzimas de interesse industrial.

No trato digestório dos peixes, uma das principais enzimas é a tripsina, uma endopeptidase da classe das serinoprotease, que cliva ligações peptídicas na extremidade carboxi-terminal dos resíduos de aminoácido arginina e lisina (Kishimura et al., 2007). Esta enzima desempenha uma função chave na digestão de proteínas advindas da dieta, sendo responsável também pela ativação do tripsinogênio e de outros zimogênios (Klomklao et al., 2007a). Devido à sua ampla aplicabilidade em processos biotecnológicos, grande atenção tem sido dada para o estudo desta enzima (SHI, et al., 2007).

Várias isoformas de tripsina de diversas espécies de peixes, têm sido purificadas e caracterizadas. Trabalhos com *Cyprinus carpio* (Cao et al., 2000), *Colossoma macropomum* (Bezerra et al., 2001b), *Oreochromis niloticus* (Bezerra et al., 2005), *Sardinops sagax caerulea* (Castillo-Yañez et al., 2005), *Scomber australasicus* (Kishimura et al., 2006), *Sardinops melanostictus* e *Pleuroprammus azonus* (Kishimura

et al., 2006), *Oncorhynchus tshawytscha* (Kurtovic et al., 2006), *Pricanthus macracanthus* (Hau & Benjakul, 2006), *Macruronus novaezealandiae* (Shi et al., 2007), *Pomatomus saltatrix* (Klomklao et al., 2007a), *Sarda sarda* (Klomklao et al., 2007b), *Sebastes schlegelii* e *Alcichthys alcicornis* (Kishimura et al., 2007c), *Ctenopharyngodon idellus* (Liu et al., 2007), *Sardina pilchardus* (Bougatef et al., 2007) e *Theragra chalcogramma* (Kishimura et al., 2008) ressaltam características nestas enzimas que as tornam passíveis de utilização em processos industriais relevantes, tais como aditivo para sabão em pó (Espósito et al 2009) e produção de alimentos (Shahidi et al 2001).

Uma espécie muito importante para a pesca no litoral da região Nordeste do Brasil é a carapeba prateada (*Diapterus rhombeus*) (Beltrão, 1988). Pertencente à família Gerreidae, ela pode ser encontrada em regiões costeiras estuarinas nas águas tropicais do Oceano Atlântico (Austin, 1973). Esta espécie, em conjunto com representantes dos gêneros *Eucinostomus*, *Eugerres* e *Gerres*, apresenta um papel relevante tanto na ictiofauna estuarina quanto na pesca de subsistência de algumas localidades (Chen et al., 2007). Apesar de registros de cultivos de carapebas em sistemas extensivos nas zonas estuarinas nesta região do país (Cerqueira, 2004), a pesca artesanal é mais representativa. De acordo com os dados do IBAMA (2008), em 2006, esta região capturou 2.080t de Gerrídeos oriundos da pesca extrativa marinha artesanal. Toda esta produção gera um descarte anual estimado de aproximadamente 100t de vísceras. A investigação de enzimas presentes nestes resíduos pode otimizar o aproveitamento do pescado e, conseqüentemente, reduzir o desperdício de produtos da aquicultura ou da pesca e agregar valor ao pescado.

Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo purificar uma tripsina do trato digestório da carapeba prateada e caracterizá-la quanto as suas propriedades físicas

e químicas, como efeito de temperatura, pH, íons, inibidores, concentração de substrato e sequências de aminoácidos N-terminal.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos exemplares

Espécimes de *D. rhombeus* foram obtidos de uma comunidade pesqueira localizada no município de Itapissuma-PE, Brasil. Os peixes foram acondicionados em gelo e transportados para o Laboratório de Enzimologia da Universidade Federal de Pernambuco (LABENZ - UFPE). No laboratório os peixes foram pesados e medidos e apresentaram peso e comprimento médio de 350 ± 20 g e 28 ± 2 cm, respectivamente. Os exemplares foram dissecados para retirada do intestino e cecos, obtendo-se um total de 30g de vísceras. Estas foram armazenadas em freezer a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento das análises.

Extrato enzimático

O material foi descongelado e homogeneizado na concentração de 40mg/mL (peso/volume) de tecido em solução de Tris-HCl 0,01M, pH 8,0 com 0,9% NaCl. Para tanto, utilizou-se um homogeneizador de tecidos (Bodine Electric Company – Chicago, EUA). O homogeneizado foi então centrifugado a $9.000\times g$ por 25 minutos a 4°C para remoção das partículas insolúveis. O sobrenadante obtido (extrato bruto) foi coletado e armazenado em freezer a -25°C para ser utilizado nos processos de purificação.

Ensaio enzimático e dosagem protéica

As atividades enzimáticas foram realizadas utilizando o BAPNA (N α -benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida) como substrato específico para tripsina. O ensaio foi realizado em triplicata, utilizando-se 30 μ L de BAPNA 8mM dissolvido em DMSO

(Dimetilsulfóxido), 140µL de Tris-HCl 0,1M pH 8,0 e 30µL da amostra. A liberação do produto (p-nitroanilina) foi acompanhada em espectrofotômetro de microplaca (xMark™ BIORAD) a λ 405nm por 10 minutos a 25°C. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar o BAPNA, produzindo 0,001 de mudança na absorbância por minuto sob as condições estabelecidas, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $9,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ padrão para este substrato. O conteúdo protéico foi obtido a partir da mensuração da absorbância das amostras em 260 e 280nm, usando a equação:

$$[\text{proteína}] \text{ mg/mL} = A_{280\text{nm}} \times 1,5 - A_{260\text{nm}} \times 0,75 \text{ (Warburg \& Christian, 1941).}$$

Processos da purificação enzimática

O extrato bruto foi acondicionado por 30min em banho maria a 45°C e, posteriormente, colocado no gelo para resfriamento rápido. Esse material foi centrifugado a 9.000xg durante 25 min a 4°C, o precipitado foi descartado e o sobrenadante (146mL) coletado e utilizado como extrato bruto aquecido (EBA). Posteriormente, o EBA foi submetido à precipitação com sulfato de amônio obtendo-se as frações 0-30%, 30-60% e 60-90% de saturação salina. Para tanto, o sal foi lentamente adicionado ao extrato sob agitação. Após a solubilização total do sal, o extrato permaneceu em repouso por 4h a 4°C. Posteriormente o material foi centrifugado a 9.000xg durante 25 min a 4°C e o precipitado, ressuspendido com 38,5mL de solução tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,0. Em seguida realizou-se a atividade específica para tripsina das frações para definição do material a ser utilizado nas demais etapas de purificação. O material obtido foi dialisado em solução tampão Tris-HCl 0,01M, pH 8,0 por um período de 24h. Após a diálise, o material foi liofilizado para obtenção de 10mg de proteína e ressuspendidos em 500µL de Tris-HCl 0,1M pH 8,0 para aplicação em coluna de gel filtração Sephadex G-75 pré-equilibrada com solução tampão Tris-HCl

0,1M pH 8,0. Mantendo-se um fluxo de 20mL/h coletaram-se alíquotas de 2mL, as quais foram então analisadas quanto ao conteúdo protéico e atividade enzimática específica.

Para a atividade enzimática específica das frações calculou-se a unidade da atividade enzimática (U), utilizando-se o substrato BAPNA 8mM, dividido pela concentração de proteína (mg) encontrada na amostra. O resultado foi demonstrado em U/mg de proteína.

Eletroforese

Uma alíquota do “pool” com maior atividade específica da coluna de Sephadex-G75 foi liofilizada e utilizada para eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), seguindo metodologia descrita por Laemmli (1970), usando gel de concentração a 4% e gel de separação a 15%. O gel foi corado com uma solução composta de 0,01% de Azul brilhante de Coomassie, 25%, metanol e 10% ácido acético e foi descorado em uma solução com a mesma composição, mas desprovida do corante.

O peso molecular da banda da proteína purificada foi estimado por comparação com um padrão de peso molecular (Amersham Biosciences – Reino Unido) composto por miosina (205 kDa), B-galactosidase (116 kDa), fosforilase b (97 kDa), transferrina (80 kDa), BSA (66 kDa), glutamato dihidrogenase (55 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa) e inibidor de tripsina (21 kDa).

Efeitos de pH

A atividade da tripsina frente a variações de pH, na faixa de 4,0 a 11,0, foi mensurada utilizando BApNA a 8 mM (30µL) como substrato específico. Para tanto, 30µL da amostra foi adicionado a 140µL de solução tampão Citrato-Fosfato 0,1M para a faixa de pH de 4,0 a 7,5; Tris-HCl 0,1M com pH variando de 7,2 a 8,5 e Glicina-

NaOH 0,1M com pH variando de 8,6 a 11,0. Após 10min, foi mensurada a absorbância em espectrofotômetro de microplaca (xMarktm BIORAD) a λ 405nm a 25°C. No resultados, foi estipulada como sendo o 100%, o valor mais alto de atividade enzimática específica obtida no experimento.

Efeitos de temperatura

A temperatura ótima e a estabilidade térmica da enzima purificada foram avaliadas perante diferentes temperaturas que variaram de 25° a 80°C, com intervalos de 5°C. O perfil da atividade proteolítica frente à variação de temperatura foi avaliado incubando-se a amostra (30 μ L) com o tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0 (140 μ L) e BAPNA 8mM (30 μ L) em banho maria por 10min. No ensaio de estabilidade térmica, para cada temperatura, a enzima foi incubada por 30min em banho maria. Em seguida, a atividade residual da enzima foi aferida por 10min a 25°C. Para tanto, foi adicionado 30 μ L da enzima incubada a 140 μ L de Tris-HCl 0,1M pH 8,0 e 30 μ L de BAPNA 8mM. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e acompanhados em espectrofotômetro de microplaca (xMarktm BIORAD) a 405nm.

Efeitos de inibidores

Os testes de inibição foram realizados segundo metodologia adaptada por Alencar et al. (2003) e Bezerra et al. (2005). Para tanto, 30 μ L de enzima purificada foram incubados em microplacas durante 30min com 30 μ L de diferentes inibidores de protease mantendo uma concentração final de 4mM. Assim, para o referido ensaio foi empregado o ácido etilenodiamino tetra-acético – EDTA (inibidor de metaloproteases), o β -mercaptoetanol (reduzidor de grupos S-S), o fluoreto de fenilmetilsulfonil – PMSF (inibidor de serino-proteases), a benzamidina (inibidor de tripsina), o tosil lisina

clorometil cetona – TLCK (inibidor de tripsina) e o tosil fenilalanil clorometil cetona – TPCK (inibidor de quimotripsina). Posteriormente, adicionou-se 110µL de solução tampão Tris-HCl 0,1M e 30µL de BAPNA. Após 10min, a leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de microplacas (xMark™ BIORAD), em um comprimento de onda de 405nm.

Efeitos dos íons metálicos

Alíquotas de 30µL da enzima purificada foram incubados com 30µL de diferentes sais metálicos (AlCl₃, BaCl₂, CaCl₂, CdCl₂, CuCl₂, FeCl₂, HgCl₂, KCl, LiCl, MnCl₂, PbCl₂, ZnCl₂), por 30min em microplacas com concentração final de 1mM. Em seguida, foi adicionado 110µL de Tris-HCl 0,1M pH 8,0 e 30µL do substrato BAPNA. Após 10min de reação, foi dosada a atividade enzimática em um leitor de microplaca a 405nm.

Parâmetros cinéticos

O substrato utilizado no ensaio cinético foi BAPNA (concentração final de 0 a 4,8mM), preparado com DMSO (Dimetilsulfóxido). A reação foi realizada em triplicata em microplaca e consistiu da mistura de 30µL de solução da enzima purificada (109µg proteína/mL), com 140µL de Tris-HCl 0,1M em pH 8,0 e 30µL de substrato. A liberação do produto (*p*-nitroanilina) foi acompanhada por intermédio de um leitor de microplacas a 405nm. Os valores de atividade (U s⁻¹) obtidos para cada concentração de substrato foram plotados num gráfico e os parâmetros assintóticos da cinética de Michaelis-Mente (V_{max} e K_m) foram calculados empregando o programa Microcal™ Origin™ versão 6.0 (Software, Inc, EUA). A constante catalítica da taxa da enzima (K_{cat}) foi calculada dividindo-se o valor de V_{max} (s⁻¹) pela concentração final de enzima

na reação (mM). Adicionalmente foi calculado o valor de K_{cat}/K_m , o qual representa a eficiência catalítica da reação.

Obtenção da sequência amino-terminal

A tripsina purificada foi sequenciada no Laboratório de Bioquímica da Escola Paulista de Medicina – UNIFESP. A sequência amino-terminal foi obtida através da degradação de Edman utilizando um sequenciador modelo PPSQ-23 (Shimadzu, Tóquio, Japão).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma tripsina dos cecos pilóricos e intestino da carapeba prateada (*D. rhombeus*) foi isolada utilizando diferentes etapas de purificação. A primeira etapa da purificação foi o aquecimento do extrato bruto, que resultou em um aumento discreto do rendimento da purificação. Na segunda etapa (fracionamento com sulfato de amônio) a fração com maior atividade específica foi a de 30% a 60%. Após a passagem pela coluna de gel filtração (Sephadex-G75), o pool obtido apresentou um grau de purificação 86,80 vezes maior em relação ao extrato bruto. A fração recuperada desta cromatografia, quando aplicada ao gel SDS – PAGE, mostrou a migração de uma única banda com peso molecular estimado em 26,54 kDa (Figura 1). Resultados similares foram observados em outras espécies isoladas de peixes como a enguia (*Anguilla japonica* 26 kDa) (Yoshinaka et al., 1985), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss* 26 kDa) (Kristjansson, 1991), hoki fish (*Macruronus novaezealandiae* 26 kDa) (Shi et al., 2007) e carpa (*Ctenopharyngodon idellus* 26,4 kDa) (Liu et al., 2007), nos quais também foram avaliadas outras tripsinas isoladas.

O protocolo aqui empregado tem sido eficiente na purificação de tripsina de peixes tropicais (Bezerra et al. 2001b; 2005; Souza et al. 2007). Bezerra et al. (2001b) reportam a importância da etapa de aquecimento na purificação de uma tripsina do tambaqui (*Colossoma macropomum*). Apesar do baixo fator de purificação obtido nesta etapa, o aquecimento elimina as proteínas termolábeis e também promove uma hidrólise das proteínas contaminantes, tornando-as peptídeos que são mais hidrofílicos. Esta propriedade melhora o desempenho das etapas posteriores de precipitação por sulfato de amônio e cromatografia em gel de filtração (Sephadex-G75).

Após a purificação avaliaram-se as características físico-químicas da tripsina isolada do trato digestório de *D. rhombeus*. Os testes para definição do pH ótimo revelaram maior atividade enzimática na faixa de pH alcalino (7,5-11,0), mostrando um pico de atividade em 8,5 (Fig. 2A). Este resultado é comum para a atividade de enzimas digestivas de peixes (Castillo-Yáñez et al., 2005) como reportado em Walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) (Kishimura et al., 2008), bluefish (*Pomatomus saltatrix*) (Klomklo et al., 2007a), hoki fish (*Macruronus novaezealandiae*) (Shi et al., 2007), salmão (*Onchorhynchus tshawytscha*) (Kurtovic et al., 2006) e tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Bezerra et al., 2005) que apresentaram atividade ótima na faixa de pH de 8,0 a 9,0.

A temperatura ótima da enzima purificada (Fig. 2B) foi 55 °C, sendo idêntica à encontrada para a tainha (*Mugil cephalus*) (Guizani et al., 1991) e semelhantes as tripsinas de outros peixes tropicais como tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Bezerra et al., 2000), tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Bezerra et al., 2005) e saramunete (*Pseudopenaeus maculatus*) que apresentaram maior atividade proteolítica a 60 °C, 50 °C e 52 °C, respectivamente. Quanto à termoestabilidade, a tripsina destes peixes também

apresentou-se sensível em temperaturas acima de 45 °C, o que se assemelha ao resultado encontrado no presente estudo (Fig. 2C).

O efeito de íons metálicos (1mM) sobre a atividade da tripsina de *D. rhombeus* está apresentado na Tabela 2. A atividade da enzima foi aumentada em relação ao controle (100%) quando a mesma foi incubada na presença dos íons K⁺ (34%), Li⁺ (46%) e Ca²⁺ (83%). O cálcio é um ativador clássico para tripsina de mamíferos (Souza et al., 2007). No entanto, Bezerra et al. (2005) e Souza et al. (2007) encontraram que a tripsina da tilápia do Nilo e saramunete sofreram inibição pelo cálcio. Este fato sugere diferenças no sítio que liga o cálcio à enzima dos referidos peixes. A atividade da tripsina da tilápia do Nilo e do saramunete também foi inibida na presença dos íons Mn²⁺ e Ba²⁺. Entretanto, a tripsina isolada da espécie estudada não demonstrou traços de inibição enzimática para esses íons. Os íons Fe²⁺, Cd²⁺, Cu²⁺, Al³⁺ diminuíram em torno de 20 a 35% a atividade da enzima analisada, já o Hg²⁺ e o Zn²⁺ inibiram a atividade da tripsina em 53,11% e 71,23%, respectivamente. Não obstante, estes valores de inibição são menos expressivos do que os descritos para o saramunete. Na presença do Pb²⁺, constatou-se a inativação total da enzima purificada do *D. rhombeus*.

A influência de diversos inibidores específicos sobre a atividade da enzima purificada do *D. rhombeus* está apresentada na Tabela 1. A enzima foi completamente inibida por TLCK. Estudos com Tilápia do Nilo (Bezerra et al., 2005), bluefish (Klomklao et al., 2007a), atum (*Thunnus albacores*) (Klomklao et al., 2006) e bonito do Atlântico (*Sarda sarda*) (Klomklao et al., 2007b) também demonstraram inibição pelo TLCK. Estes resultados estão relacionados com o fato do TLCK ser um inibidor específico de tripsina, além de inativar enzimas com atividade similares. Essa inibição ocorre a partir da ligação covalente com o resíduo de histidina na porção catalítica da

molécula, bloqueando, assim, a ligação do substrato ao centro ativo da enzima (Jeong et al., 2000).

A bezamidina (inibidor de tripsina) inibiu 75% da atividade enzimática. Quando incubada com β -mercaptoetanol, ocorreu uma redução de 36% da atividade residual da enzima. Na presença de PMSF em concentrações de 2 mM e 4 mM, a tripsina foi inibida em 22,8% e 71,36% respectivamente. O EDTA inibiu apenas 21,5% da atividade enzimática da tripsina. A enzima não sofreu nenhum efeito na sua atividade proteolítica quando exposta ao TPCK.

Os parâmetros cinéticos da tripsina do *D. rhombeus* para o substrato BAPNA (específico para tripsina) estão apresentados na Tabela 2. Dentre os parâmetros analisados, têm-se a constante de Michaelis (K_m) que é um indicador da afinidade da enzima pelo substrato e a eficiência catalítica (K_{cat}), que indica o número de moléculas de substrato convertidas em produto por segundo. Os valores de K_m e do K_{cat} foram 0,266 mM e 0,930 s⁻¹, respectivamente. O valor do K_m da tripsina do *D. rhombeus* foi mais baixo que aqueles encontrados para bigeye snapper (*Priacanthus macranchantus*) (Hau e Benjakul, 2006) e tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Bezerra et al., 2005) mostrando maior afinidade pelo substrato BAPNA. Valores de K_m inferiores ao encontrado neste trabalho foram relatados para sardinha Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) (Castillo-Yáñez et al., 2005) e anchova (*Engraulis japonica*) (Heu et al., 1995).

Para o sequenciamento do N-terminal da tripsina do *D. rhombeus* foram identificados 15 aminoácidos, compondo a seqüência IVGGYECTMHSEAHE, a qual foi alinhada com outras seqüências de peixes e uma bovina (Fig. 3). De acordo com Cao et al. (2000), geralmente os sete primeiros resíduos de aminoácidos (IVGGYEC) do N-terminal de tripsina de peixes demonstram alta homologia. Além disso, todas as tripsinas de peixes apresentam um resíduo de Glu na posição 6, enquanto em

mamíferos, é comum a presença de Thr, em tripsinas pancreáticas. Como mostrado na Figura 3, a tripsina do *D. rhombeus* exibiu esses padrões e apresentou uma maior homologia com os peixes *Gadus macrocephalus* (Fuchise et al., 2009), *Alcichthys alcicornis* (Kishimura et al., 2007), *Theragra chalcogramma* (Kishimura et al., 2008), *Eleginus gracilis* (Fuchise et al., 2009) e *Pleuroprammus azonus* (Kishimura et al., 2006).

Os dados obtidos sugerem que a protease purificada é uma tripsina símile. Esta enzima apresentou características compatíveis para sua utilização em processos industriais (Ex.: indústria alimentícia e detergentes comerciais), demonstrando assim, a viabilidade da utilização dos resíduos do peixe *D. rhombeus* como fonte de biomoléculas de interesses biotecnológicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alencar, R.B., Biondi, M. M., Paiva, P.M.G., Vieira, V.L.A., Carvalho JR., L.B., Bezerra, R.S. (2003) Alkaline proteases from digestive tract of four tropical fishes. *Brazilian Journal of Food Technology*. 6, 279-284.

Austin, H. M. (1973) Northern range extension of the rhomboid mojarra, *Diapterus rhombeus* Cuvier and Valenciennes (Gerreidae). *Chesapeake Science*, 3, 222.

Bezerra, R.S., Santos, J.F., Lino, M.A.S., Vieira, V.L.A., Carvalho Jr.,L.B. (2000) Characterization of stomach and pyloric caeca of tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Journal of Food Biochemistry*, 2000, 24 189-199.

Beltrão, A. C. M. (1988) Pisces Gerreidae Gunther (1862) de alguns estuários do estado de Pernambuco. Recife, 1988, 120p. **Dissertação** (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Oceanografia.

Bezerra, R. S., Vieira, V. L. A., Santos, A. J. G. (2001a) Clico reprodutivo da carapeba prateada *Diapterus rhombeus* (Cuvier, 1829), no litoral de Pernambuco. *Tropical Oceanography*, 1, 67-78.

Bezerra, R. S., Vieira V. L. A., Carvalho JR., L. B. (2001b) Proteases no trato digestivo de peixes: Tripsina do tambaqui (*Colossoma macropomum*), modelo alternativo para o aproveitamento de sub-produtos na indústria pesqueira. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, n. 22, setembro/outubro.

Bezerra, R. S., Lins E. J. F., Alencar R. B., Paiva, P. M. G., Chaves, M. E. C., Coelho L. C. B. B., Carvalho Jr L. B. (2005) Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Process Biochemistry*, 40, 1829-1834.

Bougatef, A., Souissi, N., Fakhfakh, N., Ellouz-Triki, Y., Nasri, M. (2007) Purification and characterization of trypsin from the viscera of sardine (*Sardina pilchardus*). *Food Chemistry*, 102, 343-350.

Cao, M. J., Osatomi, K., Suzuki, M., Hara, K., Tachibana, K., Ishihara, T. (2000) Purification and characterization of two anionic trypsins from the hepatopancreas of carp. *Fisheries Science*, 66, 1172-1179.

Castillo-Yáñez, F.J., Pacheco-Aguiar, R., García-Carreño, F.L., Toro, M.A.N. (2005) Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterrey sardine *Sardinops sagax caerulea*. *Comparative Biochemistry Physiology, Part B*, 140, 91-98.

Cerqueira, V. R. (2004) Cultivo de peixes marinhos. In Poli, C. R.; Poli, A. T. B.; Andreato, E.; Beltrame, E. *Aquicultura. Experiências brasileiras*. (pp. 445). Ed. Multitarefa.

Chen, W. J., Ruiz-Carus, R., Orti, G. (2007) Relationships among four genera of mojarras (Teleostei: Perciformes: Gerreidae) from the western Atlantic and their tentative placement among percomorph fishes. *Journal of Fish Biology*, 70B, 202–218.

Espósito, T.S., Amaral, I.P.G., Buarque, D.S., Oliveira, G.B., Carvalho Jr., L.B., Bezerra, R.S. (2009) Fish processing waste as a source of alkaline proteases for laundry detergent. *Food Chemistry*, 112, 125–130.

Fuchise, T., Kishimura, H., Sekizaki, H., Nonami, Y., Kanno, G., Klomklao, S., Benjakul, S., Chun, B. S. (2009) Purification and characteristics of trypsins from cold-zone fish, Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) and saffron cod (*Eleginus gracilis*). *Food Chemistry*, 116 (3), 611-616.

Guizani, N., Rolle, R. S., Marshall, M.R., Wei, C. I. (1991) Isolation, purification and characterization of a trypsin from the pyloric caeca of mullet (*Mugil cephalus*). *Comparative Biochemistry Physiology, Part B*, 98 (4), 517-521.

Hau, P. V., Benjakul, S. (2006) Purification and characterization of trypsin from caeca of bigeye snapper (*Priganthus macracanthus*). *Journal of Food Biochemistry*, 30, 478-495.

Heu, M.S., Kim, H.R., Pyeun, J. H. (1995) Comparison of trypsin and chymotrypsin from viscera of anchovy (*Engraulis japonica*). *Comparative Biochemistry Physiology, Part B*, 112, 557-568.

IBAMA. (2008). Estatística da pesca 2006 Brasil: Grandes regiões e unidades da federação. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (PP. 174). Brasília-DF.

Jeong, Y., Wei, C.I., Preston, J.F., Marshall, M. R. (2000) Purification and characterization of proteases from hepatopacreas of crawfish (*Procambarus clarkii*). *Comparative Biochemistry Physiology, Part B*, 24, 311-332.

Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, W. Khishimura, H., Simpsom, B. K. (2007a) Trypsina from the pyloric ceca of bluefish (*Pomatomus saltatrix*). *Comparative Biochemistry Physiology, Part B*, 148, 382-389.

Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H., Simpsom, B. K., Saeki, H. (2006) Trypsins from yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) spleen: purification and characterization. *Comparative Biochemistry Physiology, Part B*, 144, 47-56.

Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H., Simpsom, B. K. (2007b) 29 kDa trypsin from the pyloric ceca of Atlantic bonito (*Sarda sarda*): recovery and characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4548-4553.

Kishimura, H., Tokuda, Y., Yabe, M., Klomklao, S., Benjakul, S., Ando, S. (2007) Trypsin from the ceca of jacobever (*Sebastes schlegelii*) and elkorn sculpin (*Alcichthys alcicornis*): Isolation and characterization. *Food Chemistry*, 100, 1490-1495.

Kishimura, H. Klomklao, S., Benjakul, S, Chun, B. S. (2008) Characteristics of trypsin from ceca of walleye pollock (*Teragra chalcogramma*). *Food Chemistry*, 106, 194-199.

Kishimura, H., Tokuda, Y., Klomklao, S., Benjakul, S., Ando, S. (2006a) Enzymatic characteristics of trypsin from pyloric ceca of spotted mackerel (*Scomber australasicus*). *Journal of Food Biochemistry*, 30, 466-477.

Kishimura, H., Hayashi, K., Miyashita, Y., Nonami, Y. (2006b) Characteristic of trypsins from the viscera of true sadine (*Sardinops melanostictus*) and the pyloric ceca of arabesque greeling (*Pleuroprammus azonus*). *Food Chemistry*, 97, 65-70.

Kristjánsson, M. M. (1991) Purification and characterization of trypsin from the pyloric caeca of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1738-1742.

Kurtovic, I., Marshall, S. N., Simpson, B. K. (2006) Isolation and characterization of a trypsin fraction from the yloric ceca of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 143, 432-440.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227. 680-685.

Liu, Z. Y., Wang, Z., Xu, S. Y. (2007) Two trypsin from the intestin of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Comparative Biochemistry Physiology, Part B*, 177, 655-666.

Shahidi, F., Kamil, Y.V.A.J. (2001) Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 12, 435-464.

Shi, C., Marshall, S. N., Simpsom, B. K. (2007) Purification and characterization of trypsin from the ceca of the New Zealand hoki fish (*Macruronus novaezealandiae*). *Journal of Food Biochemistry*, 31, 772-796.

Simpson, B.K., Haard, N.F. (1987) Trypsin and trypsin-like enzymes from the stomachless cunner (*Tautoglabrus adspersus*): catalytic and other physical characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35, 652-656.

Souza, A.A.G., Amaral, I.P.G., Santo, A.R.E., Carvalho Jr, L.B., Bezerra, R.S. (2007) Trypsin-like enzyme from intestine and pyloric caeca of spotted goatfish (*Pseudupeneus maculatus*). *Food Chemistry*, 100, 1429-1434.

Warburg, O., Christian, W. (1941) Isolierung und kristallisation des garungs ferments enolasc. *Biochemical Zeitschrift*, 310, 384-421.

Yoshinaka, R., Sato, M., Suzuki, T., Ikeda, S. (1985) Characterization of an anionic trypsin from the eel (*Anguilla japonica*). *Comparative Biochemistry Physiology, Part B*, 80, 11-14.

Tabela 1 – Efeito de íons e inibidores de protease sobre a atividade da tripsina purificada da carapeba prateada (*D. rhombeus*).

Atividade residual (%)	
Controle	100,00
Íons (1mM)	
Ca ²⁺	183,13 ± 0,75
Li ⁺	146,18 ± 14,32
K ⁺	134,46 ± 3,77
Ba ²⁺	108,35 ± 4,52
Mn ²⁺	101,24 ± 4,52
Fe ²⁺	79,57 ± 8,53
Cd ²⁺	78,69 ± 0,75
Cu ²⁺	69,27 ± 0,00
Al ³⁺	66,96 ± 0,75
Hg ²⁺	46,89 ± 4,52
Zn ²⁺	28,77 ± 13,41
Pb ²⁺	0,00 ± 0,00
Inibidores (2mM)	
PMSF	77,40 ± 7,37
PMSF (4mM)	32,64 ± 3,03
TPCK	103,64 ± 13,03
TLCK	0,00 ± 0,00
Benzamidina	25,01 ± 0,47
EDTA	78,51 ± 11,09
β-mercaptoetanol	64,61 ± 1,87

Tabela 2 – Parâmetros cinéticos para a tripsina da carapeba prateada (*D. rhombeus*), utilizando o substrato BAPNA.

Espécies	Parâmetros			Referências
	K_m (mM)	K_{cat} (s ⁻¹)	K_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)	
Carapeba (<i>D. rhombeus</i>)	0,266	0,93	3,48	Este trabalho
Anchova (<i>E. japonica</i>)	0,049	1,55	31,00	HEU et al., 1995
Sépie (<i>S. officinalis</i>)	0,064	2,32	36,25	BALTI et al., 2009
Bigeye snapper (<i>P. macracanthus</i>)	0,312	1,06	3,40	HAU e BENJAKUL, 2006
Bacalhau (<i>G. morhua</i>)	0,102	0,70	6,80	ASGEIRSSON et al., 1989
Bovina	0,650	2,00	3,10	ASGEIRSSON et al., 1989
Suína	0,820	1,55	1,89	OUTZEN et al., 1996
Salmão (<i>S. salar</i>)	0,300	0,80	2,67	OUTZEN et al., 1996

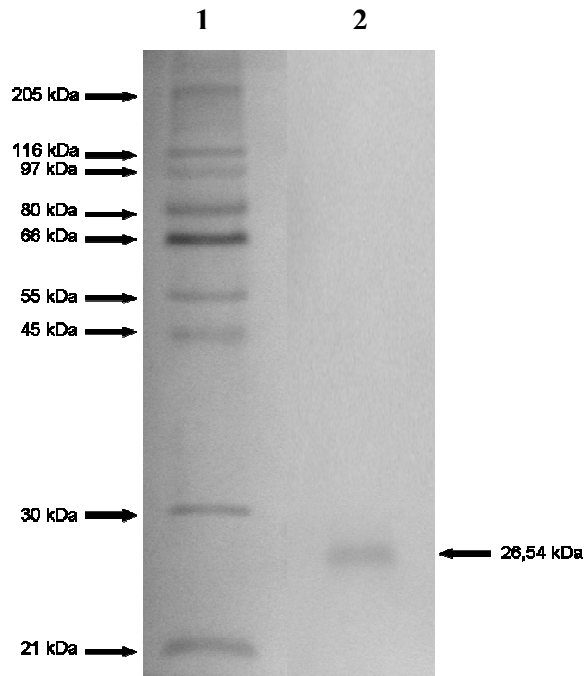


Figura 1 - Eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS-PAGE da tripsina purificada da carapeba prateada (*D. rhombeus*). No poço 1 está o padrão de peso molecular e no poço 2 o fração obtida da coluna de afinidade.

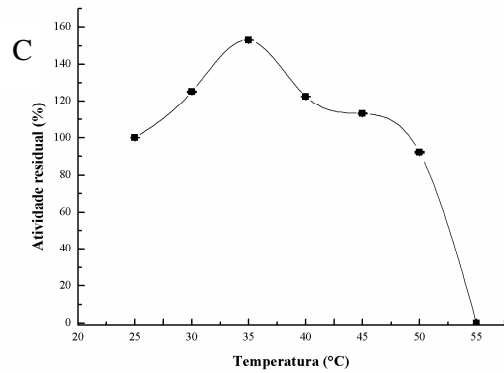
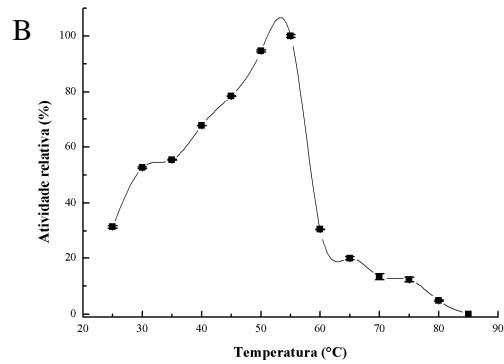
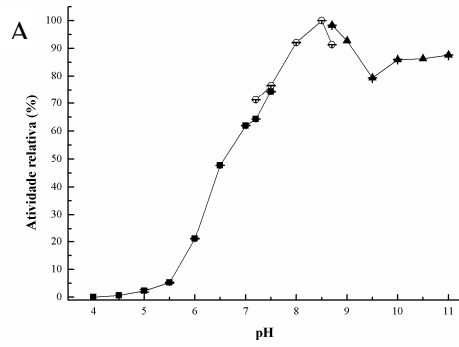


Figura 2 – Efeito do pH sobre a atividade da tripsina da carapeba prateada (*D. rhombeus*). Os tampões utilizados no ensaio foram fosfato (■, pH 4,0 a 7,5), Tris- HCl (○, pH 7,2 a 8,5), Glicina-NaOH (▲, pH 8,7 a 11,0) (A), Efeito da temperatura sobre a atividade da tripsina da carapeba prateada (*D. rhombeus*). O valor mais alto de atividade enzimática específica obtida a 55°C, foi estipulada como o 100% (B), Efeito da temperatura sobre a estabilidade da tripsina da carapeba prateada (*D. rhombeus*) (C).

Referências	Espécies	10
Presente trabalho	<i>Diapterus rhombeus</i>	I V G G Y E C T M H S E A H E
Li, J.-S. et al., 2004	<i>Oreochromis niloticus</i> A K N . V P Y M
Jiang et al., 2008	<i>Danio rerio</i> K N G V P Y Q
Fuchise et al., 2009	<i>Gadus macrocephalus</i> R . . Q . . Q
Fuchise et al., 2009	<i>Eleginus gracilis</i> P R . . Q . . Q
Klomklao et al., 2009	<i>Katsuwonus pelamis</i> Q A . . Q P P Q
Kishimura et al., 2006	<i>Sardinops melanostictus</i> K A Y . Q P W Q
Kishimura et al., 2006	<i>Pleuroprammus azonus</i> P . T Q . . Q
Klomklao et al., 2006	<i>Thunnus albacores</i> Q A . . Q P . Q
Kishimura et al., 2007	<i>Alcichthys alcicornis</i> P . . Q . . Q
Kishimura et al., 2008	<i>Theragra chalcogramma</i> K . . Q . . Q
Klomklao et al., 2007	<i>Pomatomus saltatrix</i> K P K . A P V Q
Kishimura et al., 2007	<i>Sebastes schlegelii</i> K P Y . Q P . Q
Bougatef et al., 2007	<i>Sardina pilchardus</i> Q K Y . Q
Le Huerou et al., 1990	<i>Bos taurus</i> T . A E N V P Y Q L

Figura 3 - Alinhamento da sequência N-terminal da tripsina símile da carapeba prateada (*Diapterus rhombeus*) com outras de tripsina de peixes e uma tripsina bovina. Os pontos representam resíduos de aminoácido iguais à sequência principal (presente trabalho) e as letras indicam os aminoácidos que são diferentes.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A protease alcalina obtida a partir dos cecos pilóricos e intestinos de *D. rhombeus*, após ser purificada, constitui uma tripsina com características gerais a de outras tripsinas de peixes;
- As características físico-química da tripsina purificada evidenciaram que a referida enzima apresenta características compatíveis para ser empregada na indústria biotecnológica;
- Os resultados demonstraram que as vísceras de *D. rhombeus* proveniente de seu processamento são fonte de protease digestiva que pode ser utilizada como fonte alternativa de enzimas industriais. Desta forma o uso destes resíduos contribui não só para a sustentabilidade da cadeia produtiva, por ser mais um subproduto, como também para a diminuição na eliminação de resíduos no ambiente.

7. ANEXO

Guide for Authors

Submission of Papers

All manuscripts for Food Chemistry should be submitted online via EES - Elsevier Editorial System - <http://ees.elsevier.com/foodchem> . **This is the preferred method of submission, and facilitates processing of your manuscript.** Only in exceptional cases where the authors have no electronic facilities whatsoever, the author should submit one original copy of the manuscript, plus two photocopies and a copy on disk, to the Managing Editor:

Professor Gordon Birch

School of Food Biosciences

University of Reading

Whiteknights, PO Box 226

Reading RG6 6AP, UK

Authors are required to submit, with their manuscripts, the names and full contact details (including e-mail address) of 3 potential referees (who should not come from the same institute).

It is the author's responsibility to ensure that papers are written in clear and comprehensible English. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission. English language help service: Upon request, Elsevier will direct authors to an agent who can check and improve the English of their paper (before submission). Please contact authorsupport@elsevier.com for further information.

Submission of a paper implies that it has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the Publisher.

Review Policy

A peer review system involving two or three reviewers is used to ensure high quality of manuscripts accepted for publication. The Managing Editor and Editors have the right to decline formal review of a manuscript when it is deemed that the manuscript is 1) on a topic outside the scope of the Journal; 2) lacking technical merit; 3) focused on foods or processes that are of narrow regional scope and significance; 4) fragmentary and providing marginally incremental results; or 5) is poorly written.

Types of Contributions

Original research papers; review articles; rapid communications; short communications; viewpoints; letters to the Editor; book reviews.

1. *Research papers* - original full-length research papers which have not been published previously, except in a preliminary form, and should not exceed 7,500 words (including allowance for no more than 6 tables and illustrations).

2. *Review articles* - will be accepted in areas of topical interest, will normally focus on literature published over the previous five years, and should not exceed 10,000 words (including allowance for no more than 6 tables and illustrations).

3. *Rapid communications* - an original research paper reporting a major scientific result or finding with significant implications for the research community, designated by the Editor.

4. *Short communications* - Short communications of up to 3000 words, describing work that may be of a preliminary nature but which merits immediate publication.

5. *Viewpoints* - Authors may submit viewpoints of about 1200 words on any subject covered by the Aims and Scope.

6. *Letters to the Editor* - Letters are published from time to time on matters of topical interest.

7. *Book reviews*

Manuscript Preparation

General: Manuscripts must be typewritten, double-spaced with wide margins on one side of white paper. Each page must be numbered, and lines must be consecutively numbered from the start to the end of the manuscript. Good quality printouts with a font size of 12 or 10 pt are required. The corresponding author should be identified (include a Fax number and E-mail address). Full postal addresses must be given for all co-authors. Authors should consult a recent issue of the journal for style if possible. An electronic copy of the paper should accompany the final version. The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity. Authors should retain a copy of their manuscript since we cannot accept responsibility for damage or loss of papers. Original manuscripts are discarded one month after publication unless the Publisher is asked to return original material after use.

Abstracts: Each paper should be provided with an abstract of 100-150 words, reporting concisely on the purpose and results of the paper.

Text: Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text, Acknowledgements, Appendix, References, Vitae, Figure Captions and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers. The title of the paper should unambiguously reflect its contents. Where the title exceeds 70 characters a suggestion for an abbreviated running title should be given.

Units: The SI system should be used for all scientific and laboratory data; if, in certain instances, it is necessary to quote other units, these should be added in parentheses. Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' (10^9 in America, 10^{12} in Europe) is ambiguous and should not be used.

Symbols: Abbreviations for units should follow the suggestions of the British Standards publication BS 1991. The full stop should not be included in abbreviations, e.g. m (not m.), ppm (not p.p.m.), % and '/' should be used in preference to 'per cent' and 'per'.

Where abbreviations are likely to cause ambiguity or may not be readily understood by an international readership, units should be put in full.

Current recognised (IUPAC) chemical nomenclature should be used, although commonly accepted trivial names may be used where there is no risk of ambiguity.

The use of proprietary names should be avoided. Papers essentially of an advertising nature will not be accepted.

References: All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. No more than 30 references should be cited in your manuscript. In the text refer to the author's name (without initials) and year of publication (e.g. "Steventon, Donald and Gladden (1994) studied the effects..." or "...similar to values reported by others (Anderson, Douglas, Morrison & Weiping, 1990)..."). For 2-6 authors all authors are to be listed at first citation. At subsequent citations use first author et al.. When there are more than 6 authors, first author et al. should be used throughout the text. The list of references should be arranged alphabetically by authors' names and should be as full as possible, listing all authors, the full title of articles and journals, publisher and year. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.

References should be given in the following form:

Ahmed, I. A., & Robinson, R. K. (1999). The ability of date extracts to support the production of aflatoxins. *Food Chemistry*, 66(3), 307-312.

Marasas, W. F. O. (1996). Fumonisin: History, worldwide occurrence and impact. In L. S. Jackson, J. W. DeVries, & L. B. Bullerman, *Fumonisin in food, advances in experimental medicine and biology*, vol. 392 (pp. 1-18). New York: Plenum Press.

Massart, D. L., & Kauffmann, L. (1983). *Interpretation of analytical data by use of cluster analysis*. New York: Wiley.

Noel, S., & Collin, S. (1995). Trans-2-nonenal degradation products during mashing. In *Proceedings of the 25th European brewery convention congress* (pp. 483-490). Oxford: IRL Press.

Citing and listing of web references. As a minimum, the full URL should be given. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly "Articles in Press" because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

Illustrations

Photographs, charts and diagrams are all to be referred to as "Figure(s)" and should be numbered consecutively in the order to which they are referred. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. All illustrations should be clearly marked with the figure number and the author's name. All figures are to have a caption. Captions should be supplied on a separate sheet. Tables should be numbered consecutively and given a suitable caption and each table typed on a separate sheet. Footnotes to tables should be typed below the table and should be referred to by superscript lowercase letters. No vertical rules should be used. Tables should not duplicate results presented elsewhere in the manuscript (e.g. in graphs).

If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version should you not opt for colour in print) please submit in addition usable black and white prints corresponding to all the colour illustrations. As only one figure caption may be used for both colour and black and white versions of figures, please ensure that the figure captions are meaningful for both versions, if applicable.

Preparation of electronic illustrations

Submitting your artwork in an electronic format helps us to produce your work to the best possible standards, ensuring accuracy, clarity and a high level of detail.

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Helvetica, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide all illustrations as separate files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions> . You are urged to visit this site.

Preparation of Supplementary Data

Elsevier now accepts electronic supplementary material (e-components) to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the Author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the final version of the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Proofs

When your manuscript is received at the Publisher it is considered to be in its final form. Proofs are not to be regarded as 'drafts'. One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author, to be checked for typesetting/editing. No changes in, or additions to, the accepted (and subsequently edited) manuscript will be allowed at this stage. Proofreading is solely your responsibility. A form with queries from the copy editor may accompany your proofs. Please answer all queries and make any corrections or additions required. The Publisher reserves the right to proceed with publication if corrections are not communicated. Return corrections within two working days of receipt of the proofs. Should there be no corrections, please confirm this. Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. In order to do this we need your help. When you receive the (PDF) proof of your article for correction, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections will not be possible, so please ensure your first sending is complete. Note that this does not mean you have any less time to make your corrections, just that only one set of corrections will be accepted. Proofs are to be returned to the Log-in Department, Elsevier Ltd, Bampfylde Street, Exeter, EX1 2AH, UK, fax +44 (0)1392 425370.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Copies of the issue can be ordered at a specially reduced rate using the order form sent to the corresponding author after the manuscript has been accepted.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to transfer copyright (for more information on copyright see <http://authors.elsevier.com>). This transfer will ensure the widest possible dissemination of information. A letter will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript. A form facilitating transfer of copyright will be provided. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: contact Elsevier Ltd., Global Rights Department, The Boulevard, Langford Lane, Oxford, OX5 1GB, UK; phone: (+44) 1865 843830, fax: (+44) 1865 853333, e-mail: permissions@elsevier.com

Author Enquiries

Authors can keep a track on the progress of their accepted article, by visiting <http://www.elsevier.com/trackarticle>. Other questions or queries will also be dealt with via the website <http://authors.elsevier.com>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided when an article is accepted for publication. Do not contact the editors - they do not have access to this information.

Food Chemistry carries no page charges