

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA TRIPSINA DO PEIXE
AMAZÔNICO TAMBACUI (*Colossoma macropomum*)

MARINA MARCUSCHI

RECIFE, 2010

MARINA MARCUSCHI

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA TRIPSINA DO PEIXE
AMAZÔNICO TAMBACUI (*Colossoma macropomum*)

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco

Orientador: Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra

Co-orientadora: Prof. Dra. Márcia Vanusa da Silva
(UFPE)

Co-orientador: Prof. Dr. Vitor Marcelo S.B.B. de
Oliveira (UNIFESP)

RECIFE, 2010

Marcuschi, Marina

Purificação e caracterização de uma tripsina do peixe amazônico tambaqui (*Colossoma macropomum*) / Marina Marcuschi. – Recife: O Autor, 2010.

97 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Ranilson de Souza Bezerra.

Co-orientadores: Márcia Vanusa da Silva e Vitor Marcelo S.B.B. de Oliveira

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica e Fisiologia, 2010.

Inclui bibliografia e apêndice.

1. Tambaqui 2. Tripsina 3. Peixes- 4. vísceras- 5. aplicação industrial I. Título.

572.7 CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2010-84

Ata da defesa de dissertação da mestranda **Marina Marcuschi**, realizada em 13 de janeiro de 2010, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco.

Às 14:30 horas, do dia 13 de janeiro de 2010, foi aberto no Auditório Prof. Marcionilo Lins do Depto. de Bioquímica/CCB/UFPE, o ato de defesa de dissertação da mestranda **Marina Marcuschi**, aluna do Curso de Mestrado em Bioquímica e Fisiologia/CCB/UFPE. Iniciando os trabalhos o Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra na qualidade de orientador da aluna, do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da UFPE, fez a apresentação da discente e da Banca Examinadora composta pelos professores doutores: Ranilson de Souza Bezerra, na qualidade de Presidente, Patrícia Maria Guedes Paiva, ambos do Depto. de Bioquímica da UFPE, Keila Aparecida Moreira, da Unidade Acadêmica de Garanhuns-UFRPE, e Victor Marcelo Silveira Bueno Brandão de Oliveira, do Departamento de Biofísica da UNIFESP. Após as apresentações, o Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra convidou a aluna para a apresentação de sua dissertação intitulada: "**Purificação e Caracterização de uma Tripsina do Peixe Amazônico Tambaqui (*Colossoma macropomum*)**", e informou que de acordo com o Regimento Interno do Curso, a candidata dispõe de até 50 (cinquenta) minutos para apresentação do trabalho e o tempo de arguição para cada examinador, juntamente com o tempo gasto pelo aluno para responder às perguntas será de 30 (trinta) minutos. O aluno procedeu a explanação e comentários acerca do tema em 40 (quarenta) minutos. Após a apresentação da mestranda, o Senhor Presidente convidou a Banca Examinadora para ocupar seus lugares e passou a palavra para o Prof. Dr. Victor Marcelo Silveira Bueno Brandão de Oliveira, que agradeceu ao convite, fez alguns comentários, deu algumas sugestões e iniciou sua arguição. Ao final, o referido professor deu-se por satisfeito. Daí o Senhor Presidente passou a palavra para a Profa. Dra. Keila Aparecida Moreira, que agradeceu ao convite, fez alguns comentários, deu algumas sugestões e iniciou sua arguição. Ao final, a referida professora deu-se por satisfeita. Em seguida, o Sr. Presidente passou a palavra para a Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva, que agradeceu ao convite, fez alguns comentários, deu algumas sugestões e iniciou sua arguição. Ao final, a referida professora deu-se por satisfeita. Continuando os trabalhos, o Senhor Presidente, na qualidade de orientador, usou da palavra para tecer alguns comentários a respeito do trabalho da aluna e agradeceu a Banca Examinadora. Finalmente a sessão foi suspensa para o julgamento pela Banca Examinadora, a qual se reuniu na Secretaria da Pós-Graduação. Após alguns comentários, a Banca decidiu, por unanimidade, conceder a menção "**Aprovada**". Nada mais havendo a tratar, lavrei a presente ata que vai assinada por mim, Presidente, e demais membros da Banca Examinadora. Recife, 13 de janeiro de 2010.

Patrícia Maria Guedes Paiva

ÍNDICE ANALÍTICO

AGRADECIMENTOS.....	VI
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE ABREVIACÕES	XII
RESUMO	XV
ABSTRACT	XVI
1. INTRODUÇÃO	17
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
2.1 Os resíduos da indústria pesqueira.....	19
2.2 Tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>).....	22
2.3 Peptidases e suas aplicações industriais	24
2.4 Tripsina	30
2.5 Purificação e caracterização de tripsinas de peixes	38
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
4. OBJETIVOS.....	55
4.1 Geral.....	55
4.2 Específicos.....	55
5. ARTIGO CIENTÍFICO.....	56
Abstract	57
1. Introduction	57
2. Materials and Methods.....	59
2.1. <i>Enzyme extraction</i>	59
2.2. <i>Enzyme purification</i>	59
2.3. <i>Enzyme activity and protein determination</i>	60
2.4. <i>Effect of pH and temperature</i>	62
2.5. <i>Thermal stability</i>	62
2.6. <i>Effect of metal ions</i>	63
2.7. <i>Effect of synthetic inhibitors</i>	63
2.8. <i>Determination of cleavage specificity</i>	64
2.9. <i>SDS-PAGE and mass spectrometer</i>	65
2.10. <i>Determination of NH₂-terminal amino acid sequence</i>	65

Índice analítico

2.11. <i>Compatibility with surfactants, oxidants and commercial detergents</i>	65
2.12. <i>Statistical analysis</i>	66
3. Results and discussion	66
3.1. <i>Enzyme purification</i>	66
3.2 <i>Trypsin Characterization</i>	67
3.3 <i>Compatibility with surfactants, oxidants and commercial detergents</i>	73
4. Conclusions	74
5. References	74
Figure Captions	80
Tables	81
Figures.....	85
6. CONCLUSÃO	88
7. ANEXOS	89
I. Instruções de autores do periódico do trabalho.....	89

Dedico à minha mãe, Beth Marcuschi, pelo apoio, amor e companheirismo nos momentos difíceis (e fáceis também). Você me guiou para que eu pudesse chegar onde estou hoje.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ranilson de S. Bezerra, o chefe da família LABENZ, por me inspirar, sendo um cientista com os dons empreendedores dos grandes homens sem perder a humildade, e por estar sempre próximo de seus orientandos, incentivando-os a crescer, aprender e nunca ceder frente às dificuldades.

À Profa. Dra. Márcia Vanusa da Silva por ter sido sempre prestativa e estar disponível para ouvir e tirar minhas dúvidas.

Ao Prof. Dr. Vitor Oliveira, por ter me recebido em seu laboratório em São Paulo de forma tão aberta e afetuosa e estar sempre disposto a responder minhas perguntas intermináveis.

Ao Prof. Dr. Luis Bezerra Jr., por sua ajuda durante a realização deste trabalho, assim como por suas palavras sábias repletas de ciência e bom humor.

À minha família, a começar por minha mãe Beth, mulher forte, carinhosa e inteligente, cujo apoio para mim é essencial. Meu pai, Luiz Antônio, pelo seu espírito guerreiro, que me inspira e me dá força para enfrentar o que vier pela frente. Ao meu irmão de sangue, Rodrigo e meu irmão de coração, Joffre Tennorio que, mesmo estando geograficamente longe, trazem alegria e leveza para a minha vida.

Aos meus amigos do peito, Thiago B. Cahú e Janilson Felix da Silva, com quem eu tive o prazer de dividir não só a bancada e o cotidiano do laboratório, mas também os interesses pessoais, cinematográficos, musicais, gastronômicos etc., pois como disse o filósofo, a felicidade só é real, quando é compartilhada.

Aos meus colegas e amigos de laboratório por todo o apoio diário, companheirismo e “auxílios experimentais”, Ana Linda, Augusto Vasconcelos, Caio Dias, Dárlio Teixeira, Douglas Henrique, Elba Matoso, Fábio Marcel, Gilmar Cezar, Helane Costa, Juliana Santos, Juliette Xavier, Karina Ribeiro, Karollina Lopes, Kelma Sirleide, Mirela Assunção, Patrícia Castro, Ricardo Guedes, Renata França, Robson Coelho, Rosiely Félix, Suzan Diniz, Talita Epósito, Vagne Melo e Werlayne Mendes, bem como aos distantes, mas sempre presentes, Diego Buarque e Ian Porto.

Aos amigos do IPA, Carol Malafaia, Daniel Amaral, Isabel Renata, Clébia Almeida e Túlio Diego por terem me ensinado, com tanta paciência, tudo que eu sei hoje sobre biologia molecular.

À Carolina Córdula e Valquíria Medeiros por terem me recebido tão bem em sua casa em São Paulo, me apoiando durante toda a minha estadia naquela cidade.

Aos amigos que encontrei no departamento de biofísica do INFAR, na UNIFESP, Izaura Hirata, Maurício Machado, Marcelo Machado e Marcelo Yudi, por terem facilitado e muito a minha vida por lá...vocês realmente são “cabras da peste”!

À turma da “época de faculdade”, que permanece unida até hoje, Flávio “Binho”, Carolina Nunes, Kelaine Demétrio, Michelle Morimura, Ng Haig They, Manuela Barreto, Marcos Gabriel, Natália Barros, Tarciana Leonídio, Tiago Rafael e Waleska Gusmão.

Aos grandes amigos, Rodrigo Purificação e Tiago “Mamu” Barbosa, pela amizade e companheirismo neste mundo afora. Às amigas, Sofia Arruda, Amanda Mansur, Raíssa Duarte e Natália Ferraz, por terem me acompanhado da infância à vida adulta, sempre com muito carinho e amizade.

À coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Profa. Dra. Vera Menezes e ao secretário Djalma Gomes por terem sido sempre tão prestativo e atencioso.

Aos técnicos do departamento de bioquímica, Albérico Espírito Santo, João Virgínio e Robson Liberal (*In memoriam*) pela ajuda prestada durante todos estes anos.

Aos funcionários do departamento de bioquímica, Miron Oliveira e Neide, Helena e Ademar por serem pessoas de grande coração, sempre atenciosas e dispostas a ajudar.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro, sem o qual não teria sido possível realizar este trabalho.

Aos tambaquis que deram suas vidas para a realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema dos principais produtos que podem ser obtidos do processamento dos pescados (BLANCO *et al*, 2007)..... 21
- Figura 2.** Espécime jovem de tambaqui (*Colossoma macropomum*). 22
- Figura 3.** Trato digestório do tambaqui: (1) estômago, (2) intestino, (3) cecos pilóricos... 22
- Figura 4.** Sistema digestório de peixes com diferentes hábitos alimentares (SMITH, 1989).
..... 23
- Figura 5.** Classificação de algumas peptidases de acordo com as reações que elas catalisam. Os peptídeos estão representados por esferas brancas (resíduos de aminoácidos) unidas por traços pretos (ligações peptídicas). As setas pretas representam a primeira ligação clivada e as setas brancas representam as clivagens subsequentes (RAWLINGS *et al*, 2007). 25
- Figura 6.** Representação esquemática do complexo enzima-substrato desenvolvida por Schechter e Berger em 1968. As posições dos substratos são representadas a partir do ponto de clivagem (entre P1 e P1'). Pn é a porção amina e Pm' é a porção carboxílica do substrato. Na peptidase, os aminoácidos que interagem com o substrato são designados a partir dos resíduos envolvidos na lise (S1-S1'). (Expasy, 2005)..... 26
- Figura 7.** Distribuição do percentual de enzimas comercializadas mundialmente de acordo com Rao *et al* (1998). O gráfico da esquerda indica a contribuição de várias classes de enzima no total de vendas anual e o gráfico à direita detalha as enzimas que compõem o contingente das peptidases e suas respectivas contribuições para o total 27
- Figura 8.** Aminoácidos que compõem a tríade catalítica do sítio ativo das serino peptidases (BERG *et al*, 2004). 30
- Figura 9.** Representação esquemática da interação dos aminoácidos P1 a P3 de um oligopeptídeo com o sítio ativo da tripsina. Os círculos pretos indicam os resíduos de aminoácido da enzima que compõem o sítio catalítico. Já os círculos vermelhos indicam os aminoácidos do sítio de ligação ao substrato. As linhas pontilhadas representam pontes de hidrogênio (PERONA e CRAIK, 1995)..... 31

- Figura 10.** Ressonância da ligação peptídica, que está marcada de vermelho. As setas verdes indicam o movimento de ressonância dos elétrons envolvidos na ligação. 32
- Figura 11.** Mecanismo de hidrólise das serino endopeptidases (BERG *et al*, 2004)..... 33
- Figura 12.** Curva de titulação do resíduo de aminoácido Histidina (NELSON e COX, 2008). 34
- Figura 13a.** Desenho esquemático do mecanismo de ação da tripsina sobre o substrato sintético N-benzoil-L-arginina etil éster (BAEE). No centro, o esquema mostra a reação em pH em torno de 8. À esquerda numa situação de pH extremamente ácido e à direita de pH extremamente básico. Apenas a reação central se completa com êxito (KASSERRA e LAIDLER, 1969)..... 35
- Figura 13b.** Continuação do desenho esquemático do mecanismo de ação da tripsina (KASSERRA e LAIDLER, 1969)..... 36
- Figura 14.** Sequência N-terminal da tripsina catiônica humana. O peptídeo sinal do pré-tripsinogênio está marcado em itálico. Em negrito está a sequência que caracteriza o tripsinogênio. A segunda seta vertical, da esquerda para a direita, indica o ponto de clivagem do tripsinogênio (P1), para liberação da tripsina. A tripsina propriamente dita se inicia a partir da Isoleucina (CHEN *et al*, 2003). 37
- Figura. 15.** Hidrólise do substrato BAPNA, formando o produto cromogênico p-Nitroalina (SIGMA, 2009)..... 42
- Figura 16.** Diagrama simplificado de Alexander Jablonski. A seta azul indica a absorção de um fóton, que faz com que o elétron sai do estado fundamental (S_0) para o estado excitado (S_2) e sua posterior liberação de luz fluorescente (<http://web.uvic.ca>)..... 43
- Figura 17.** Esquema representando o mecanismo de funcionamento do peptídeo FRET com Abz/EDDnp como par acceptor/doador. A fluorescência é liberada com a clivagem da ligação peptídica entre P1 e P1'. Os aminoácidos seguem a nomenclatura de Schechter and Berger (1968) (CARMONA *et al*, 2009). 44
- Figura 18.** Esquematização da liberação do aminoácido terminal através da degradação de Edman (BERG *et al*, 2004). 48

Figure 1: Molecular mass of the purified trypsin-like enzyme from the tambaqui; SDS-PAGE of the purified trypsin-like enzyme from the tambaqui; Line 1 - Pattern of standard proteins bands; Line 2 - Final purification step (affinity chromatography), showing a single band of 27.5 *kDa* (A); Mass spectrum from the purified enzyme, comprising of two main peaks – one with 24 *kDa* and the other with half this value (12 *kDa*) (B)..... 80

Figure 2: Physicochemical characterization of the trypsin-like enzyme from the tambaqui using z-FR-MCA and BAPNA as substrates: Effect of pH on second-order kinetic parameters (k_{cat}/K_m) using z-FR-MCA as substrate (A); Effect of pH on activity using BAPNA as substrate (B); Effect of temperature on second-order kinetic parameters (k_{cat}/K_m) using z-FR-MCA as substrate (C); Effect of temperature on activity using BAPNA as substrate (D); Thermal stability at temperature of 40 °C (-■-), 55 °C (-○-), 60 °C (-△-), 65 °C (-●-), 70 °C (-▲-) for 3 hours (E); Activity measured at 25 °C using z-FR-MCA as substrate; Thermal stability at temperatures of 4 °C (-□-), 30 °C (-◇-), 40 °C (-■-), 50 °C (-✱-), 60 °C (-△-), 70 °C (-▲-) for 3 hours (F); Activity measured at 25 °C using BAPNA as substrate..... 80

Figure 3: Alignment of the NH₂-terminal amino acid sequence in the trypsin-like enzyme from the tambaqui (*Colossoma macropomum*) as determined by Edman degradation and sequences from other vertebrates; For comparison, the dots represents the amino acid residues that are identical to the query sequence (tambaqui trypsin) and letters indicate the different residues..... 80

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Classificação das enzimas de acordo com o tipo de catálise realizada (retirado de VOET *et al*, 2000).....24
- Tabela 2.** Sítio específico de clivagem das peptidases mais importantes. A seta para baixo indica a posição em que a enzima cliva a ligação peptídica. O aminoácido Xaa representa qualquer um dos 20 resíduos de aminoácido (RAO *et al*, 1998). À esquerda encontra-se o aminoácido da posição P1 e à direita o aminoácido da posição P1'27
- Table 1.** Purification steps of trypsin-like from tambaqui pyloric caeca. Activities were measured with BAPNA at 25°C81
- Table 2.** Effect of ions and synthetic inhibitors on the trypsin-like from tambaqui, using using fluorescent (z-FR-mca) and chromogenic (BAPNA) substrates.82
- Table 3.** Kinetic parameters from the hydrolysis of two series of synthetic fluorogenic peptides substrates by trypsin-like from tambaqui. Abz-RXFK-EDDnp (X represents P1') and Abz-XRFK-EDDnp (X represents P2).83
- Table 4.** Stability of Alcalase[®] from Novozymes[®], Commercial Porcine Trypsin from Sigma[®] and Trypsin-like from tambaqui in the presence of commercial laundry detergents, surfactants and H₂O₂ for 60 min at 25 °C, using the chromogenic substrate Azocasein (1%).....84

LISTA DE ABREVIÇÕES

Abz - orto-aminobenzoil

Aminoácidos:

A – Ala, Alanina;

C – Cys, Cisteína;

D – Asp, Ácido aspártico;

E – Glu, Ácido glutâmico

F – Phe, fenilalanina;

G – Gly, Glicina;

H – His, Histidina;

I – Ile, Isoleucina;

K – Lys, Lisina;

L – Leu, Leucina;

M – Met, Metionina;

N – Asn, Asparagina;

P – Pro, Prolina

Q – Gln, Glutamina;

R – Arg, Arginina;

S – Ser, Serina;

T – Thr, Treonina;

V – Val, Valina;

W – Trp, Triptofano;

Y – Tyr, Tirosina;

BSA – Albumina do soro bovino

C-18 – Resina cromatográfica com grupamentos acoplados contendo 18 átomos de carbono cada

DMSO – Di-metil-sulfoxido

Dnp – 2,4-di-nitro-fenil

EC – Comitê enzimático

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

Inibidores:

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

PMSF - fluoreto de fenil-metil-sulfonil

TLCK – tosil - lisina clorometil cetona

TPCK – tosil - fenilalanina clorometil cetona

k_{cat} – Número de renovação (turnover)

kDa - Quilo Daltons

K_m – Constante de Michaelis e Menten

MALDI-TOF – Espectrometria de Massa por *Desorção-Ionização de Laser em Matriz* por Tempo de voo

M.M. – Massa molecular

NaOH – Hidróxido de sódio

NC-IUBMB - Comitê de nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular.

pH - (-log [H⁺])

Sais:

AlCl₃ – Cloreto de alumínio

BaCl₂ – Cloreto de bário

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

CdCl₂ – Cloreto de cádmio

CuSO₄ – Sulfato de cobre

HgCl₂ – Cloreto de mercúrio

KCl - Cloreto de potássio

MgCl₂ - Cloreto de magnésio

MnCl₂ – Cloreto de manganês

NaCl - Cloreto de sódio

NiCl₂ - Cloreto de níquel

Tris-HCl - hidrocloreto de 2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol

ZnCl₂ - Cloreto de zinco

SDS - dodecil sulfato de sódio

SDS - PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

Substratos:

z-FR-MCA - Carbobenzoxi-Phe-Arg-7-amido-4-metilcoumarina

BAEE – N-benzoil-L-arginina etil éster

BAPNA - N- α -benzoil-L-arginina *p*-nitroanilida

UV – Ultra violeta

V_{max} – Velocidade máxima

RESUMO

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é um peixe de importância comercial no Brasil e por isso, o estudo das biomoléculas obtidas a partir do processamento dos seus resíduos pode agregar valor à produção deste animal nativo dos rios e lagos amazônico. Dentre as biomoléculas de maior interesse comercial estão as peptidases alcalinas, como a tripsina, sendo elas aplicáveis em processos industriais e de biorremediação. Visando um aprofundamento do estudo das enzimas de peixes para aplicação comercial, o presente trabalho teve como objetivo purificar uma peptidase dos cecos pilóricos do tambaqui, através de um processo desenvolvido em quatro etapas (aquecimento, fracionamento salino, gel filtração e afinidade). A enzima purificada apresentou massa molecular de 23,9 *kDa* e sequência NH₂-terminal IVGGYECKAHSQPHVSLNI. Na caracterização físico-química desta enzima com z-FR-MCA (substrato fluorogênico), a atividade mais alta foi observada no pH e temperatura de 9,0 e 50°C, respectivamente. Já nos experimentos com o substrato cromogênico BAPNA, a atividade máxima da enzima foi encontrada na faixa de pH entre 7,5 to 11,5 e na temperatura de 70°C. Quanto à sua estabilidade térmica, a enzima manteve mais de 60% da sua atividade inicial após 3h a 60°C, mas foi completamente desnaturada após passar o mesmo tempo a 70°C. A enzima foi significativamente inibida por TLCK e benzamidina (inibidores específicos de tripsina), bem como por PMSF (inibidor de serino peptidases) e pelos íons Al⁺³, Cu⁺², Hg⁺², Pb⁺² Zn⁺² e Ni⁺². A especificidade de hidrólise desta enzima foi avaliada com duas séries de substratos fluorogênicos sintéticos (Abz-XRFK-Dnp-OH and Abz-RXFK-Dnp-OH), apresentando especificidade pelo aminoácido arginina na posição P1 e alta eficiência para a hidrólise de substratos com leucina (L) e lisina (K) na posição P2 e serina (S) e arginina (K) na posição P1', sendo também capaz de hidrolisar substratos com prolina (P) na posição P1'. Na presença dos sabões em pó Omo multi ação[®], Bem-te-vi[®], Minerva[®] e Ala[®], a enzima purificada do tambaqui manteve mais de 70% da sua atividade proteolítica, apresentando estabilidade semelhante à Alcalase[®] e sendo mais estável que a tripsina comercial de porco Sigma[®]. A enzima do tambaqui também se manteve estável na presença de tenso-ativos, como Triton X-100, SDS, Tween 20, Tween 80 e Chaps, bem como o agente oxidante, H₂O₂, em várias concentrações. Esses resultados indicam a versatilidade e estabilidade da tripsina-símile purificada.

Palavras chave: Tambaqui; Tripsina; Peixe; vísceras; aplicação industrial.

ABSTRACT

Tambaqui (*Colossoma macropomum*) is a fish of commercial significance in the Brazilian aquaculture. Thus, the study of the biomolecules that can be obtained from its residues, can add value to the production of this native amazonian fish. Among the biomolecules with greatest commercial value, are the alkaline peptidases, such as trypsin, that are enzymes with a wide range of biotechnological and environmental application. Therefore the main goal of the present work was to purify a trypsin-like isoform from the pyloric caeca from tambaqui, through a four-step procedure (heat treatment, salt fractionation, gel-filtration and affinity chromatographies). The purified enzyme had 23.9kDa and presented the N-terminal amino acid sequence IVGGYECKAHSQPHVSLNI. In the physico-chemical characterization with the fluorogenic substrate (z-FR-MCA), the optimum pH and temperature were 9.0 and 50°C, respectively. In the assays with the chromogenic substrate (BAPNA), the highest activities were found at a pH range from 7.5 to 11.5 and a temperature of 70°C. The enzyme was also able to maintain 60% from its initial activity for 3h at temperatures up to 60°C, but was completely denaturated at 70°C. The enzyme was significantly inhibited by TLCK and benzamidine (trypsin inhibitors), PMSF (serine peptidase inhibitor) and the ions Al^{+3} , Cu^{+2} , Hg^{+2} , Pb^{+2} , Zn^{+2} e Ni^{+2} . Using two series of internally quenched fluorogenic substrate (Abz-XRFK-Dnp-OH and Abz-RXFK-Dnp-OH), the tambaqui enzyme showed to be specific to arginine (R) at P1 and presented higher efficiencies when assayed with substrates containing leucine (L) and lysine (K) at P2 and serine (S) and arginine (K) at P1', being also able to hydrolyse substrates with proline (P) at P1'. The purified enzyme maintained up to 70% of its activity in the presence of various commercial laundry detergents, such as Omo multi ação[®], Bem-te-vi[®], Minerva[®], Ala[®], which was as stable as the classic detergent peptidase, Alcalase[®] and more stable than the porcine trypsin from Sigma[®]. The enzyme was also stable in the presence of surfactants such as Triton X-100, SDS, Tween 20, Tween 80 and Chaps, as well as oxidizing agents, hydrogen peroxide, in various concentrations. These results are evidence that the enzyme purified from the tambaqui viscera is a trypsin-like with versatility and stability to be used in the laundry detergent industry.

Keywords: Tambaqui; Trypsin; Fish; viscera; Industrial application.

1. INTRODUÇÃO

A pesca extrativista e a aquicultura são atividades econômicas de interesse para um país como o Brasil, que possui extensa área fluvial e costeira. Desde a criação da Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca (SEAP) em 2003, promovida a Ministério de Pesca e Aquicultura (MPA) em 2009, tem-se observado o desenvolvimento da produção nacional de pescados. Porém, atrelado a este crescimento, tem-se o aumento da geração de resíduos, tais como pele, ossos, vísceras, nadadeiras, cabeças, cascas e cauda de peixes e crustáceos. Para diminuir o ônus ambiental, estes subprodutos podem ser utilizados para a obtenção de moléculas biotecnologicamente relevantes, como por exemplo, enzimas, hidrolisados proteicos, farinhas, óleos, quitina e quitosana (SHAHIDI e JANAKKAMIL, 2001; ASPMO *et al*, 2005; BLANCO *et al*, 2007).

Dentre os peixes de importância comercial para as regiões norte e nordeste do Brasil, está o tambaqui (*Colossoma macropomum*). A fisiologia digestiva deste animal, bem como as peptidases do seu trato digestório vêm sendo estudadas no Laboratório de Enzimologia (LABENZ) da Universidade Federal de Pernambuco há cerca de 10 anos. A caracterização inicial das enzimas deste peixe foi realizada por Bezerra *et al* (2000). Neste trabalho, os autores observaram que as pepsinas-símiles são as principais peptidases ácidas e que as serino-peptidases representavam cerca de 60% das peptidases alcalinas nos cecos pilóricos do tambaqui. Levando-se em conta, principalmente, a estabilidade térmica observada para as enzimas alcalinas do tambaqui, Bezerra *et al* (2001) purificaram parcialmente uma isoforma de tripsina-símile dos cecos pilóricos deste peixe e descreveram os efeitos que o pH, temperatura e inibidores apresentaram sobre a sua atividade proteolítica. Em um trabalho mais recente, Espósito *et al* (2009) purificaram parcialmente as peptidases alcalinas das vísceras do tambaqui utilizando precipitação fracionada com etanol. Estas enzimas apresentaram pH ótimo entre 10 e 12, estabilidade térmica em temperaturas de até 60°C, bem como estabilidade na presença de surfactantes iônicos e não iônicos, peróxido de hidrogênio e vários detergentes comerciais.

No presente trabalho se propôs dar continuidade a uma das linhas de pesquisa do Laboratório de Enzimologia, purificando-se uma isoforma de tripsina dos cecos pilóricos do tambaqui. A tripsina é uma das principais enzimas do trato digestivo dos animais e esta peptidase pode ser utilizada em vários processos farmacológicos e laboratoriais, como por exemplo, no sequenciamento de outras proteínas, na remoção de

resíduos protéicos aderidos a vidros, tecidos ou plásticos e até mesmo na elaboração de remédios para inflamações, fungos, acne, dentre outros problemas dermatológicos (JÓNSDÓTTIR *et al*, 2004). A tripsina purificada do tabaqui foi caracterizada físico-quimicamente, obteve 20 dos seus aminoácidos N-terminal sequenciados e sua especificidade de hidrólise avaliada frente a substratos peptídicos fluorescentes sintéticos. Adicionalmente, foi testada a estabilidade desta enzima, na presença de surfactantes iônicos e não iônicos, peróxido de hidrogênio e vários detergentes comerciais. Os resultados foram comparados aos de outras enzimas comerciais.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Os resíduos da indústria pesqueira

Desde o período paleolítico, o homem já explorava os recursos aquáticos naturais através da pesca, sendo esta uma das atividades comerciais mais antigas do planeta (CHACON *et al*, 1988). Com o advento de novas tecnologias de captura e estocagem, no início do século XX, a exploração comercial da pesca cresceu de forma extraordinária (BLANCO *et al*, 2007), sendo ela, atualmente, subdividida em pesca extrativista e a aquicultura. Ambas as vertentes podem ser desenvolvidas tanto em águas marinhas quanto continental e envolvem a produção de peixes, crustáceos, moluscos e anfíbios (IBAMA, 2008).

Na pesca extrativista, os animais são obtidos de seus ambientes naturais, como rios, mares e mangues. A arte de pesca se iniciou com a invenção do anzol, que a princípio era reto, com duas pontas cortado em osso, amarrado a uma concha de moluscos ou fabricados com espinhos. Atualmente, as técnicas mais utilizadas são linhas e anzóis; tarrafas; bóia ou poita, espinhel de anzóis; arpão e espingarda-arpão, descarga elétrica e redes de arrasto e de espera (CHACON *et al*, 1988).

Já na aquicultura, os animais são cultivados em cativeiro, sendo este cultivo dividido em quatro formas principais (CHACON *et al*, 1988): **(i) Extensiva** - é praticado em locais onde ocorre o acúmulo natural de água, como açudes, lagoas, represas, lagos e outros mananciais. Neste tipo de cultivo se utilizam apenas alimentos naturais, sendo praticada mais comumente com atividade de subsistência por famílias que vivem no entorno dos locais de cultivo, sendo por isso considerada uma atividade de grande valor sócio-econômico; **(ii) Semi-extensivo** - é realizado em tanques ou viveiros e a importância do alimento natural passa a ser secundária, pois com o aumento da densidade de peixes, há a necessidade de se fornecer alimentos suplementares. Neste sistema ocorre maior intervenção do produtor durante o cultivo; **(iii) Intensivo** - é realizado em viveiros, com aplicação de fertilizantes minerais e orgânicos. O povoamento é feito em altas densidades e o produtor está intimamente ligado ao cultivo, havendo a preocupação de minimizar problemas de produção, favorecendo-se a obtenção de ganhos. Utilizam-se também rações balanceadas, que são a principal fonte de alimento para o animal; e **(iv) Superintensiva** - É realizado em gaiolas, tanques e viveiros com aeração e recirculação de água, no qual de uma a duas espécies são

cultivadas, em alta densidade (de 20 a 100 animais por metro cúbico). Não se busca fertilizar o solo para gerar alimentos naturais, provendo-se rações bem balanceadas e com altos teores protéicos e energéticos.

No Brasil, a implantação comercial da aquicultura é relativamente recente. Apesar de ter sido iniciada na década de 1930, esta atividade só começou a se intensificar a partir de 1970 e foi apenas em 1990 que ela se tornou economicamente significativa dentro do cenário nacional (SEAP, 2003). Entre os anos de 1990 e 2006 a produção de peixes no Brasil passou de 18.000,0 ton. para 190.161,5 ton. (IBAMA, 2008; FAO, 2009), ou seja, um aumento médio de aproximadamente 17% ao ano.

Mas, apesar da extensa área com potencial para cultivo, a piscicultura brasileira ainda não figura entre as 10 principais do mundo e atualmente produz menos de 1% do produzido pela líder China (FAO, 2009). Por isso, na tentativa de incentivar o crescimento desse setor econômico, o governo nacional criou, em 2003, a Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca (SEAP), promovida a Ministério de Pesca e Aquicultura (MPA), em 2009. Este Ministério tem atribuições de formular a política de fomento e desenvolvimento para a aquicultura e pesca no Brasil (SEAP, 2003). Desde então, o cultivo de organismos aquáticos tem sido muito visado no cenário comercial brasileiro.

Atualmente, a piscicultura brasileira, ainda se restringe às águas continentais. Até o ano de 2006, o IBAMA não registrou nenhuma ocorrência de cultivo de peixes marinhos, em escala comercial nas águas brasileiras. Já a aquicultura continental representou 15,7% da produção total de peixes do Brasil em 2006, demonstrando um crescimento de 6% em relação ao ano anterior. Dentre os principais peixes de água doce cultivados no Brasil está o tambaqui, que no ano de 2006, representou 14% da piscicultura nacional, ficando atrás apenas da tilápia (37,5%) e da carpa (24,1%) (IBAMA, 2008).

Contudo, é importante se destacar que o processamento em larga escala do pescado gera, além de lucros para as indústrias, uma quantidade significativa de resíduos. Segundo Arruda (2004), cerca de 50 % do pescado produzido é descartado na forma de resíduo. Considerando-se que em 2006 foram produzidas 156 milhões de toneladas de pescado no mundo (FAO, 2009), quase 80 toneladas de resíduos podem ter sido geradas a partir deste montante. Por isso, o desenvolvimento de técnicas visando o

aproveitamento desses recursos é de grande interesse econômico e ambiental (BLANCO *et al*, 2007).

Os produtos de descarte da indústria pesqueira envolvem desde a fauna acompanhante capturadas inadvertidamente na pesca extrativa até resíduos gerados durante o processamento do animal, como cabeça, víscera, pele, ossos e escamas. Apesar de muitos desses resíduos serem descartados sem tratamento nos rios e mares, alguns subprodutos já podem ser regularmente obtidos, como: hidrolisados protéicos, óleos e farinhas (SHAHIDI e JANAKKAMIL, 2001; ASPMO *et al*, 2005; BLANCO *et al*, 2007), enzimas (peptidases, lipases e carboidrases), (SHAHIDI e JANAKKAMIL, 2001; KIM e MENDIS, 2006; BLANCO *et al*, 2007) quitina e quitosana (SHAHIDI e JANAKKAMIL, 2001; KIM e MENDIS, 2006), carotenóides (RAVI-KUMAR, 2000), colágeno e gelatina (GONZÁLEZ *et al*, 2007; KIM e MENDIS, 2006; LEE *et al*, 2009), peptídeos bioativos com atividade anti-hipertensiva, antitrombótica, imunomoduladora e antioxidante (KIM e MENDIS, 2006) e couro de peixe (BLANCO *et al*, 2007). A Figura 1 resume, esquematicamente, os principais produtos que podem ser obtidos do processamento dos pescados.

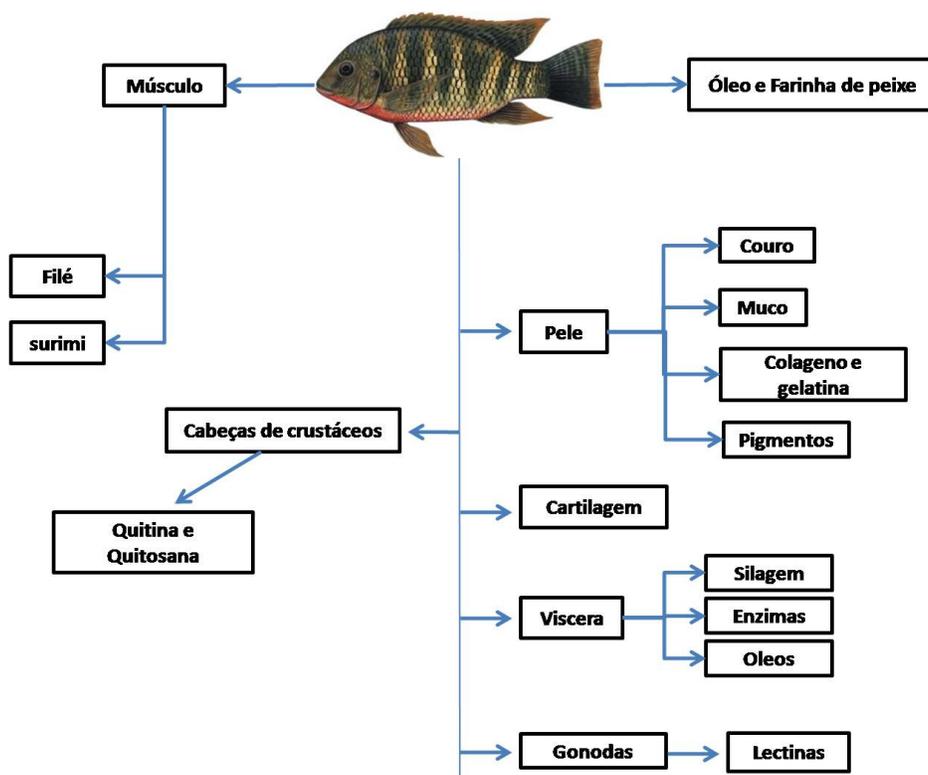


Figura 1. Esquema dos principais produtos que podem ser obtidos do processamento dos pescados (BLANCO *et al*, 2007).

2.2 Tambaqui (*Colossoma macropomum*)

O tambaqui (Figura 2), objeto de estudo do presente trabalho, é um integrante da família Characidae, nativo dos rios, lagos e regiões alagadas da floresta amazônica (ALMEIDA *et al*, 2006). Este peixe vive bem nos ambientes heterogêneos da Amazônia por ser um animal de hábito alimentar onívoro. Nos períodos de cheia ele consome sementes e frutos e nos períodos de seca, se alimenta de zooplâncton (BEZERRA *et al*, 2000; ALMEIDA *et al*, 2006). Adicionalmente, este animal também é versátil quanto às características ambientais que ele tolera, prosperando em águas com baixa concentração de oxigênio (SILVA *et al*, 2007) e com pH ácido (entre 3,8 e 4,9), como as do rio Negro (ARIDE *et al*, 2007). Na Figura 3, podem-se observar os principais órgãos digestórios do tambaqui.



Figura 2. Espécime jovem de tambaqui (*Colossoma macropomum*).

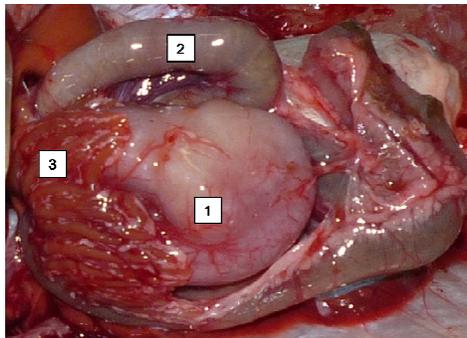


Figura 3. Trato digestório do tambaqui: (1) estômago, (2) intestino, (3) cecos pilóricos.

De acordo com o hábito alimentar que possuem, os peixes podem ser classificados em quatro categorias principais: detritívoros, herbívoros, onívoros e carnívoros, com diferenças anatômicas digestivas visíveis entre espécies de classes diferentes (Figura 4). Considerando-se a fisiologia e anatomia digestiva do tambaqui,

observa-se que seu trato digestório é semelhante ao de outros peixes onívoros, apresentando intestino mais curto que os herbívoros e mais longo que os carnívoros.

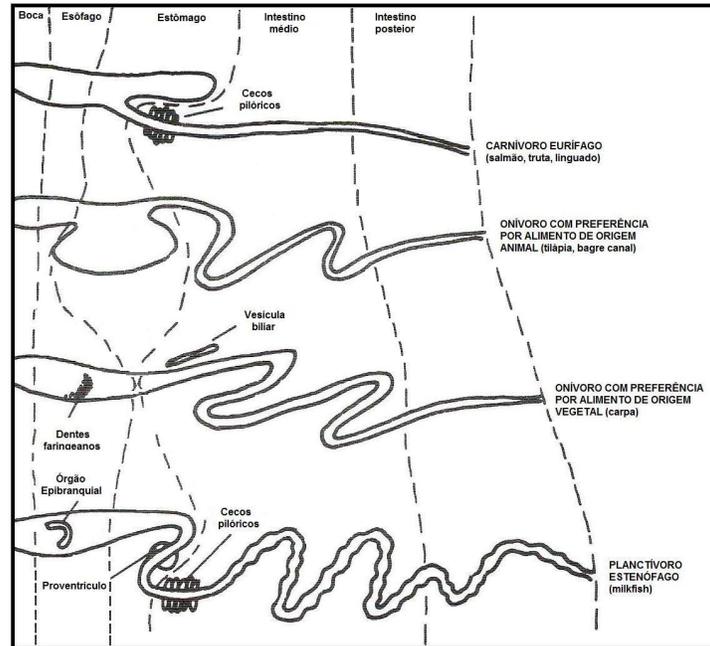


Figura 4. Sistema digestório de peixes com diferentes hábitos alimentares (SMITH, 1989).

Os órgãos digestórios dos peixes incluem o esôfago posterior, o estômago (nas espécies gástricas) ou bulbo intestinal (nas agástricas), o intestino superior e inferior e os cecos pilóricos. Como órgãos de suporte encontram-se o pâncreas, a vesícula biliar e o fígado.

O estômago tem a função de iniciar a transformação do alimento, liberando nutrientes solúveis. Nos peixes o estômago se divide em quatro camadas de tecido distintas: a mucosa, a submucosa, a muscular e a serosa (RUST, 2002). O intestino é um órgão relativamente simples, apresentando duas partes: o intestino médio, denominado também de intestino ascendente ou delgado; e o intestino posterior, conhecido também por intestino descendente ou grosso. É neste órgão onde ocorre a maior parte da absorção dos nutrientes, íons e água oriundos da dieta. Os cecos pilóricos são circundados por tecido pancreático e são responsáveis pela produção de enzimas digestivas como peptidases alcalinas, amilases e lipases e pela secreção de hormônios como a insulina, glucagon (RUST, 2002).

2.3 Peptidases e suas aplicações industriais

A aquisição e utilização de energia é um preceito básico para a manutenção da vida nos sistemas biológicos. O metabolismo dos organismos vivos é ditado por reações químicas que seguem as leis da termodinâmica e para que essas reações possam ocorrer com a rapidez necessária, elas são catalisadas por macromoléculas denominadas enzimas. Os catalisadores (químicos ou biológicos) são apenas facilitadores das reações. Eles não induzem reações energeticamente desfavoráveis nem atuam como reagentes ou produtos das reações que catalisam (VOET *et al*, 2000).

A ação catalisadora das enzimas é mais eficiente do que aquela observada nos catalisadores químicos comuns, já que as primeiras apresentam maior especificidade pelo substrato, geram menos subprodutos indesejados, aumentam muito mais a velocidade de reação e, em geral, não exigem temperaturas, pressão ou pH extremo para atuar (VOET *et al*, 2000). Por conta dessas características, o estudo desses catalisadores biológicos atrai grande interesse industrial, econômico e tecnológico.

De acordo com o órgão responsável pela classificação e nomenclatura das enzimas, o Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB), as enzimas são divididas em seis classes principais, de acordo com as reações que elas catalisam (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação das enzimas de acordo com o tipo de catálise realizada (retirado de VOET *et al*, 2000).

Classe	Tipo de Reação catalisada
1 Oxidorredutase	Reações de oxidação-redução
2 Transferases	Transferências de grupos funcionais
3 Hidrolases	Reações de hidrólises
4 Liases	Eliminação de grupos para formar ligações duplas
5 Isomerases	Isomerização
6 Ligases	Formação de ligações acopladas à hidrólise de ATP

Dentro do grupo das hidrolases (3), encontram-se as peptidases (EC 3.4), que são as enzimas responsáveis pela hidrólise de ligações peptídicas (NC-IUBMB, 2009). As peptidases são essenciais para a sobrevivência dos seres vivos, atuando na ativação de

zimogênios, digestão de proteínas provenientes da dieta e do próprio organismo, coagulação sanguínea etc. (RAO *et al*, 1998). As peptidases são subdivididas em dois grandes grupos, as exopeptidases (clivam ligações peptídicas próximas às extremidades amino e carboxiterminais do substrato) e endopeptidases (clivam as ligações peptídicas internas das cadeias polipeptídicas do substrato).

Segundo o NC-IUBMB (2009) as principais exopeptidases são: as aminopeptidases (atuam sobre o N-terminal dos peptídeos, liberando um resíduo de aminoácido - EC 3.4.11 - ou di e tripeptídeos - EC 3.4.14) e as carboxipeptidases (atuam sobre o C-terminal dos peptídeos, liberando um resíduo de aminoácido - EC 3.4.16-18 - ou dipeptídeos EC 3.4.15). Já as endopeptidases são divididas em subclasses de acordo com seus mecanismos de catálise: serino endopeptidases (apresentam um grupamento serina no sítio ativo EC 3.4.21), cisteino endopeptidases (apresentam grupamentos cisteína e histidina no sítio ativo EC 3.4.22), aspartato endopeptidases (apresentam um grupamento aspartato no sítio ativo EC 3.4.23) e metaloendopeptidases (necessitam de um íon metálico divalente como grupo prostético EC 3.4.24). O sítio de clivagem de algumas destas enzimas está representado na Figura 5.

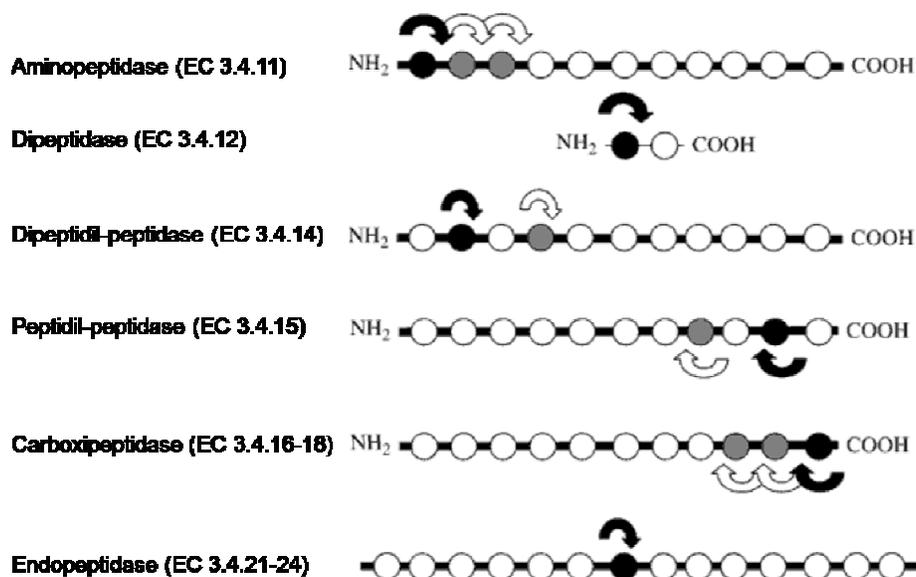


Figura 5. Classificação de algumas peptidases de acordo com as reações que elas catalisam. Os peptídeos estão representados por esferas brancas (resíduos de aminoácidos) unidas por traços pretos (ligações peptídicas). As setas pretas representam a primeira ligação clivada e as setas brancas representam as clivagens subsequentes (RAWLINGS *et al*, 2007).

Com o objetivo de padronizar a linguagem que descreve a especificidade da ligação peptidase-substrato, Schechter e Berger publicaram, em 1968, um modelo, que está apresentado na Figura 6. Neste modelo, os resíduos de aminoácido da enzima são numerados, a partir do sítio catalítico, de S1 a Sn (sendo Sn o aminoácido N-terminal) e de S1' a Sm' (sendo Sm' o aminoácido C-terminal). Já os resíduos de aminoácido do substrato para esta mesma enzima são numerados, a partir do sítio de clivagem de P1 a Pn (sendo Pn o aminoácido N-terminal) e de P1' a Pm' (sendo Pm' o aminoácido C-terminal).

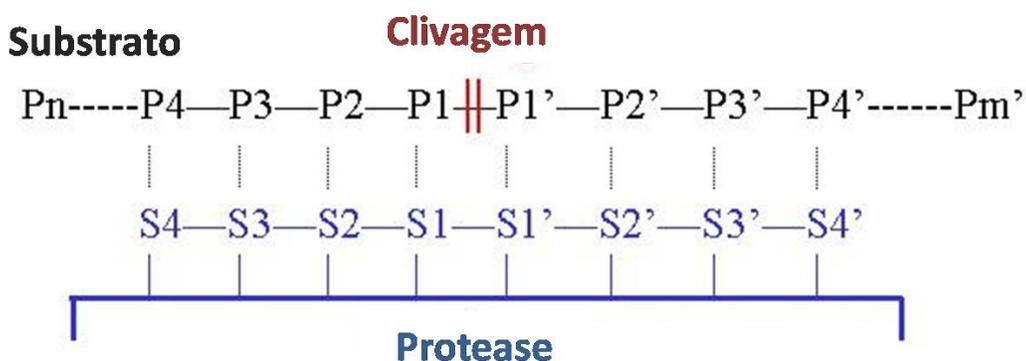


Figura 6. Representação esquemática do complexo enzima-substrato desenvolvida por Schechter e Berger em 1968. As posições dos substratos são representadas a partir do ponto de clivagem (entre P1 e P1'). Pn é a porção amina e Pm' é a porção carboxílica do substrato. Na peptidase, os aminoácidos que interagem com o substrato são designados a partir dos resíduos envolvidos na lise (S1-S1'). (Expasy, 2005)

Para exemplificar como se aplica esta simbologia na prática, tem-se, na Tabela 2, o sítio de clivagem (P1 e P1') de algumas das principais peptidases conhecidas.

Tabela 2. Sítio específico de clivagem de algumas peptidases. A seta para baixo indica a posição em que a enzima cliva a ligação peptídica. O aminoácido Xaa representa qualquer um dos 20 resíduos de aminoácido (RAO *et al*, 1998). À esquerda encontra-se o aminoácido da posição P1 e à direita o aminoácido da posição P1'.

Peptidase	Ligação peptídica alvo para clivagem
Tripsina	Lys (ou Arg) ↓ Xaa
Quimotripsina, subtilisina	Trp (ou Try, Phe, Leu) ↓ Xaa
Peptidase V8	Asp (ou Glu) ↓ Xaa
Papaina	Phe (ou Val, Leu) Xaa ↓ Xaa
Termolisina	Xaa ↓ Leu (ou Phe)
Pepsina	Phe (ou Tyr, Leu) ↓ Trp (ou Phe, Tyr)

Além de sua importância biológica, as peptidases também se encontram entre as principais enzimas comercializadas no mundo, representando cerca de 60% do contingente deste mercado (Figura 7).

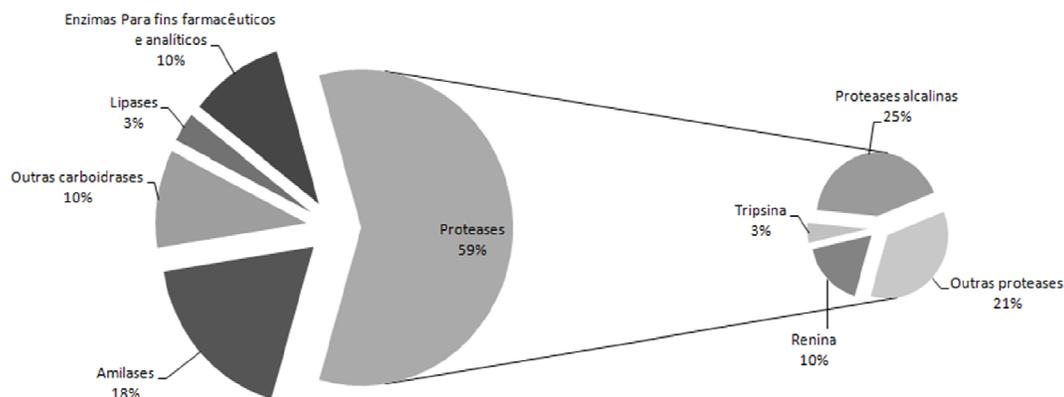


Figura 7. Distribuição do percentual de enzimas comercializadas mundialmente de acordo com Rao *et al* (1998). O gráfico da esquerda indica a contribuição de várias classes de enzima no total de vendas anual e o gráfico à direita detalha as enzimas que compõem o contingente das peptidases e suas respectivas contribuições para o total.

As peptidases podem ser aplicadas em vários processos industriais (RAO *et al*, 1998). Uma destas primeiras aplicações foi na fabricação de queijo, inicialmente utilizando-se sumo de plantas e posteriormente extratos de estômago de animais jovens (RAWLINGS *et al*, 2007). As principais aplicações das peptidases são nos seguimentos industriais listados abaixo (ANWAR e SALEEMUDDIN; 1998, RAO *et al*, 1998; MAURER, 2004; WOLFGANG, 2004; DAMHUS *et al*, 2008):

- (1) **Produção de laticínios:** Dentre os produtos derivados do leite, encontra-se a coalhada, da qual pode ser obtido o queijo, que consiste da coagulação da caseína (principal proteína do leite). Para a sua produção, pode-se tanto utilizar ácidos, gerando uma coalhada granulada e inelástica, quanto enzimas (principalmente peptidases), o que torna a coalhada mais macia, suave e elástica. As enzimas utilizadas no processo podem ser oriundas de extratos do estômago de animais lactantes (principalmente quimosina e pepsina de bezerros) ou de micro-organismos (*Rhizomucor michei*, *Rhizomucor pusillus*, *Cryphonectria parasitica*). Além da produção de queijo, as proteínas do leite, podem ser digeridas e aplicadas na produção de hidrolisados lácteos direcionada para infantes e indivíduos alérgicos.
- (2) **Outras aplicações na indústria alimentícia:** Na indústria panificadora, as peptidases podem ser utilizadas para hidrolisar parcialmente o glúten (proteína comumente encontrada no trigo), facilitando a manipulação e o processamento das massas. Outra aplicação é na produção de derivados de soja, como o molho shoyo, suplementos e hidrolisados protéicos e rações. Na indústria de processamento de carnes bovinas, suínas, etc., as peptidases têm sido aplicadas no amaciamento da carne, atuando principalmente na digestão das fibras musculares.
- (3) **Indústria têxtil e depilação de couro e pele:** O curtimento tradicional do couro é um processo caro e que envolve reagentes químicos nocivos para o meio ambiente. A remoção dos pêlos por via enzimática é exercida principalmente com o uso de peptidases que atuam sobre a queratina, assim como outras enzimas que hidrolisam proteínas não fibrosas como albumina e globulina. Na indústria têxtil, as peptidases são aplicadas no tratamento de lã (um tecido feito de proteína) e degomagem (remoção da sericina) da seda bruta.

- (4) **Formulação de detergentes:** Tem sido cada vez mais comum se encontrar enzimas na formulação de detergentes. Sua aplicação vem facilitar a solubilização de proteínas impregnadas no material sendo lavado. Por isso, peptidases aplicadas para este fim devem ser eficientes em hidrolisar proteínas ligadas à superfície de substratos sólidos e insolúveis, como os tecidos, dentaduras e lentes de contato. Adicionalmente a enzima precisa apresentar ampla especificidade de substrato, trabalhar bem em pH alcalino e em temperaturas em torno de 40°C, bem como ser compatível com os ingredientes dos detergentes, como agentes quelantes e oxidantes.

Dentre as aplicações descritas acima, a formulação de detergentes é um dos focos do presente trabalho. O emprego de peptidases na indústria de detergentes se iniciou em 1913, com o uso da tripsina extraída de pâncreas suíno (WOLFGANG, 2004). Contudo, esta prática só foi se intensificar a partir da década de 1960, com a introdução da Alcalase[®] (Novozymes), uma subtilisina extraída da bactéria *Bacillus licheniformis* (MAURER, 2004; WOLFGANG, 2004). Assim como a Alcalase[®], outras enzimas da família das subtilisinas são utilizadas na composição de detergentes (ANWAR e SALEEMUDDIN, 1998; RAWLINGS *et al*, 2007; MAURER, 2004).

Contudo, novas fontes de enzimas continuam sendo investigadas, como por exemplo, os organismos aquáticos. As peptidases desses animais podem ser utilizadas pelas indústrias de alimentos, detergentes, produtos farmacêuticos e couro, bem como em processos de biorremediação (SHAHIDI e KAMIL, 2001). A principal peptidase de aplicabilidade comercial encontrada nestes animais é a tripsina, que atualmente é, sobretudo, utilizada em processos farmacológicos e laboratoriais. Esta enzima pode ser aplicada, por exemplo, no sequenciamento de outras proteínas, na remoção de resíduos protéicos aderidos a vidros, tecidos ou plásticos e até mesmo na elaboração de remédios para inflamações, fungos, acne, dentre outros problemas dermatológicos (JÓNSDÓTTIR *et al*, 2004).

2.4 Tripsina

A tripsina (EC 3.4.21.4) é uma serino endopeptidase pertencente ao clã PA e à família S1, sendo a representante mais abundante deste grupo e podendo ser encontrada em organismos eucariotos, procariotos e vírus (POLGÁR, 2005). O termo tripsina foi cunhado em 1876 por W. F. Kune para nomear a substância responsável pela atividade proteolítica das secreções pancreáticas (NORIOKA e SAKIYAMA, 2004). Com o desenvolvimento dos processos de purificação e caracterização das proteínas, o termo “tripsina” passou a ser associado às enzimas que clivam ligações peptídicas na porção C-terminal dos resíduos de aminoácidos arginina e lisina (RAO *et al*, 1998; OLSEN *et al*, 2004; NORIOKA e SAKIYAMA, 2004; KISHIMURA *et al*, 2008; RODRIGUEZ *et al*, 2008).

As serino endopeptidases (Figura 8) são caracterizadas pela presença de um resíduo de aminoácido serina em seu sítio catalítico, além de dois outros resíduos de aminoácidos, que formam a tríade catalítica (Asp102/His57/Ser195, numeração de acordo com a quimotripsina bovina) (NORIOKA e SAKIYAMA, 2004).

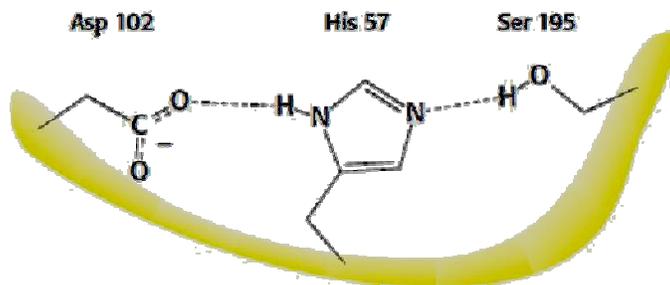


Figura 8. Aminoácidos que compõem a tríade catalítica do sítio ativo das serino peptidases (BERG *et al*, 2004).

Nas tripsinas, próximo ao sítio catalítico, encontra-se o sítio de ligação para o substrato (Asp189/Gly193/Ser214/Gly216), região que não participa ativamente da hidrólise, mas que facilita o reconhecimento do substrato pela enzima, conferindo-lhe especificidade (Figura 9) (PERONA e CRAIK, 1995). O resíduo de aminoácido Asp189 profere à tripsina a sua especificidade por peptídeos que contenham aminoácidos com cadeias laterais longas e carregadas positivamente na posição P1 (OLSEN *et al*, 2004). Por isso, esta enzima cliva apenas ligações peptídicas na porção C-terminal dos resíduos

de aminoácidos arginina e lisina (PERONA e CRAIK, 1995; OLSEN *et al*, 2004; NORIOKA e SAKIYAMA, 2004). Para substratos contendo arginina em P1, há uma interação direta entre o grupo guanidina da arginina e o grupo carboxila do Asp189. Já para substratos contendo lisina, a interação ocorre por intermédio de uma molécula de água (CHEN *et al*, 2003).

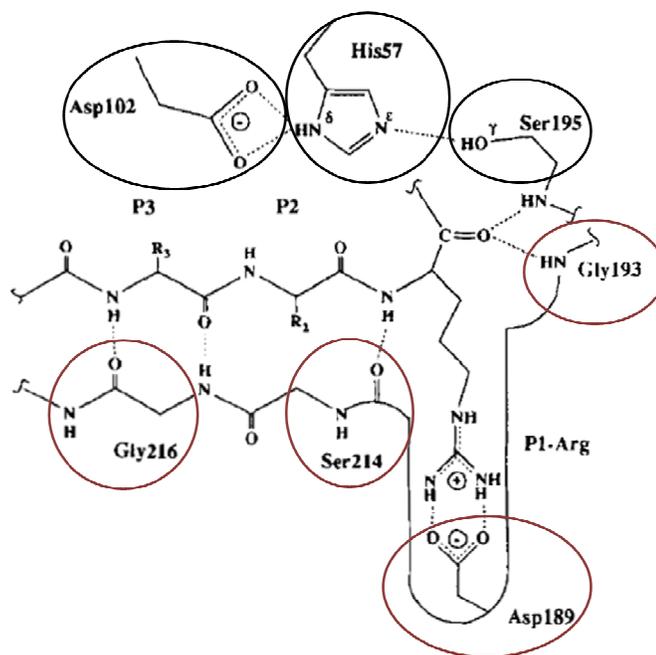


Figura 9. Representação esquemática da interação dos aminoácidos P1 a P3 de um oligopeptídeo com o sítio ativo da tripsina. Os círculos pretos indicam os resíduos de aminoácido da enzima que compõem o sítio catalítico. Já os círculos vermelhos indicam os aminoácidos do sítio de ligação ao substrato. As linhas pontilhadas representam pontes de hidrogênio (PERONA e CRAIK, 1995)

Além da presença de Arg e Lys na posição P1, a composição de aminoácidos das posições P2 e P3 também podem interferir na afinidade da tripsina pelo substrato e na eficiência da hidrólise (NORIOKA e SAKIYAMA, 2004). Para exemplificar, substratos cujos aminoácidos da posição P2 apresentem aminas carregadas na cadeia lateral (Lisina e Arginina) bem como grandes grupos hidrofóbicos (Isoleucina, Leucina, Fenilalanina, Triptofano e Tirosina), apresentam menor eficiência catalítica do que os demais (BAIRD *et al*, 2000).

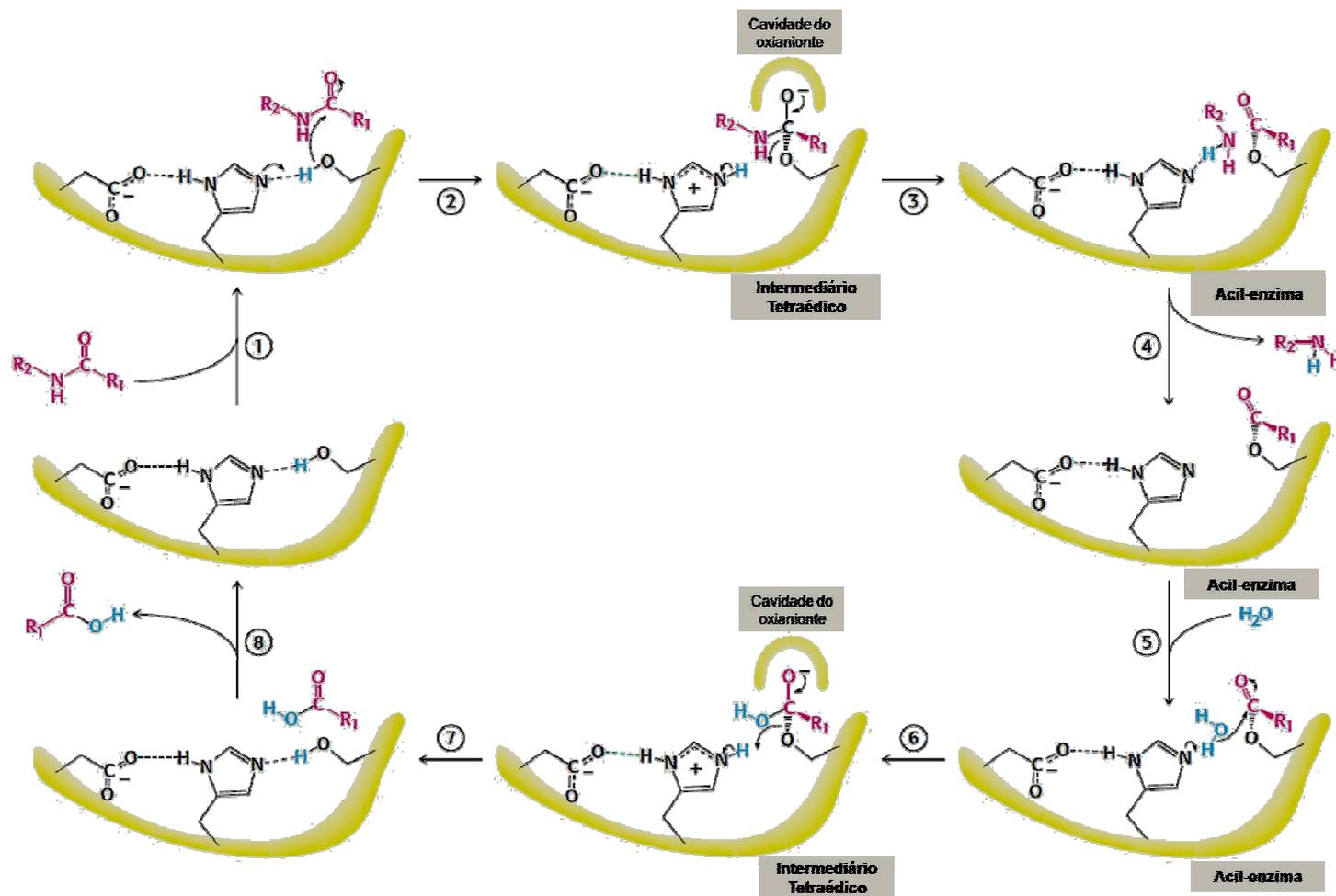


Figura 11. Mecanismo de hidrólise das serino endopeptidases (BERG *et al*, 2004).

Após o ataque nucleofílico da serina, a transferência de próton leva à formação de um complexo acil-enzima e à dissociação do primeiro produto de hidrólise (HEDSTROM, 2002; PERONA e CRAIK, 1995; POLGÁR, 2005). A reação de desacetilação para liberar a segunda parte do peptídeo formado na hidrólise ocorre por via de um segundo ataque nucleofílico, sendo este realizado por uma molécula de água. Este mecanismo acelera a quebra deste tipo de ligação peptídica em 10^9 vezes, se comparado à reação não catalisada pela enzima (PERONA e CRAIK, 1995). Através deste mecanismo a tripsina também pode hidrolisar outros compostos orgânicos, como amidas, anilidas, esters e tioesters (HEDSTROM, 2002).

Não há dúvidas de que o pH influencie na atividade das enzimas. No caso das tripsinas, é imprescindível que haja uma histidina não protonada no seu sítio ativo. Sabendo-se que o pK_R do anel imidazol da histidina situa-se em torno de 6,0 (figura 12), apenas em pH de neutro a alcalino, o anel estará não-protonado e será capaz de capturar o próton da serina, tornando-a reativa (KASSERRA e LAIDLE, 1969). Por essa razão que, como se vê no esquema da Figura 13a, em pH ácido a tripsina se torna inativa e em pH alcalino, a reação pode prosseguir normalmente (Figura 13b). Contudo, em pH extremamente alcalino, o aminoácido N-terminal (isoleucina) apresenta a sua amina desprotonada, o que perturba o sítio de ligação ao substrato tripsina, dificultando a ligação do substrato à enzima (Figura 13a).

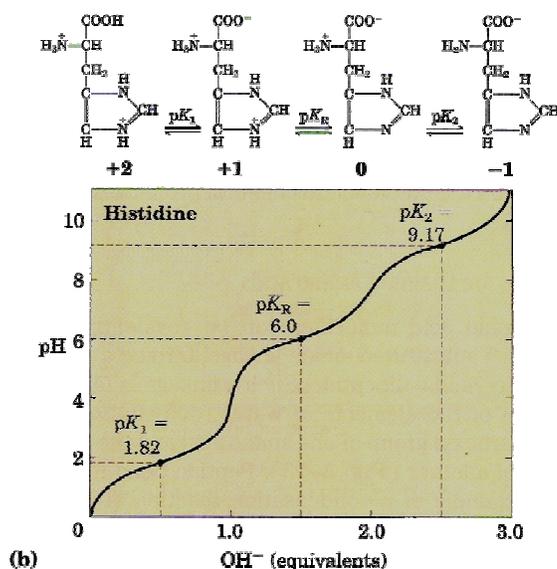


Figura 12. Curva de titulação do resíduo de aminoácido Histidina (NELSON e COX, 2008).

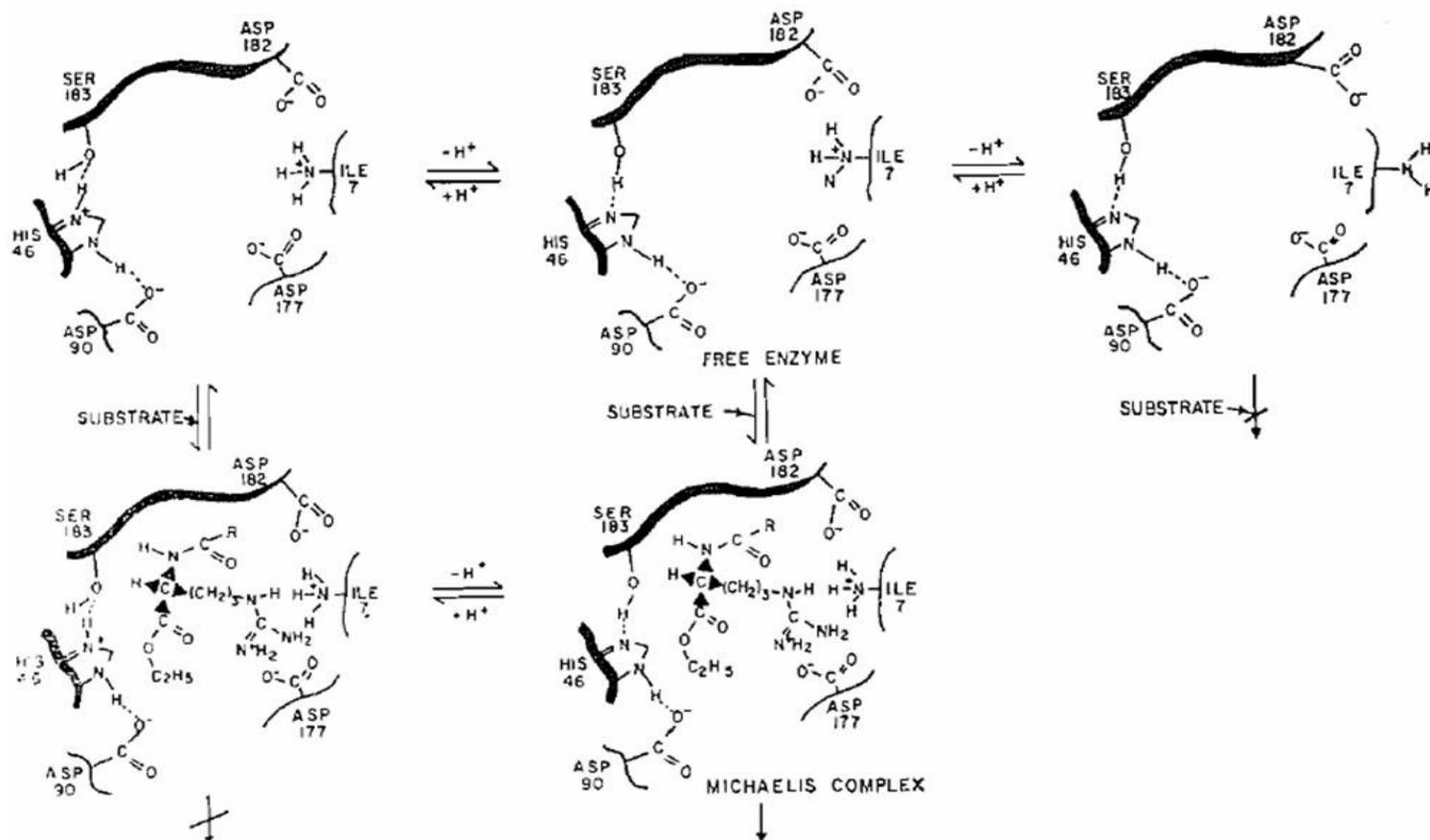


Figura 13a. Desenho esquemático do mecanismo de ação da tripsina sobre o substrato sintético N-benzoil-L-arginina etil éster (BAEE). No centro, o esquema mostra a reação em pH em torno de 8. À esquerda numa situação de pH extremamente ácido e à direita de pH extremamente básico. Apenas a reação central se completa com êxito (KASSERRA e LAIDLER, 1969).

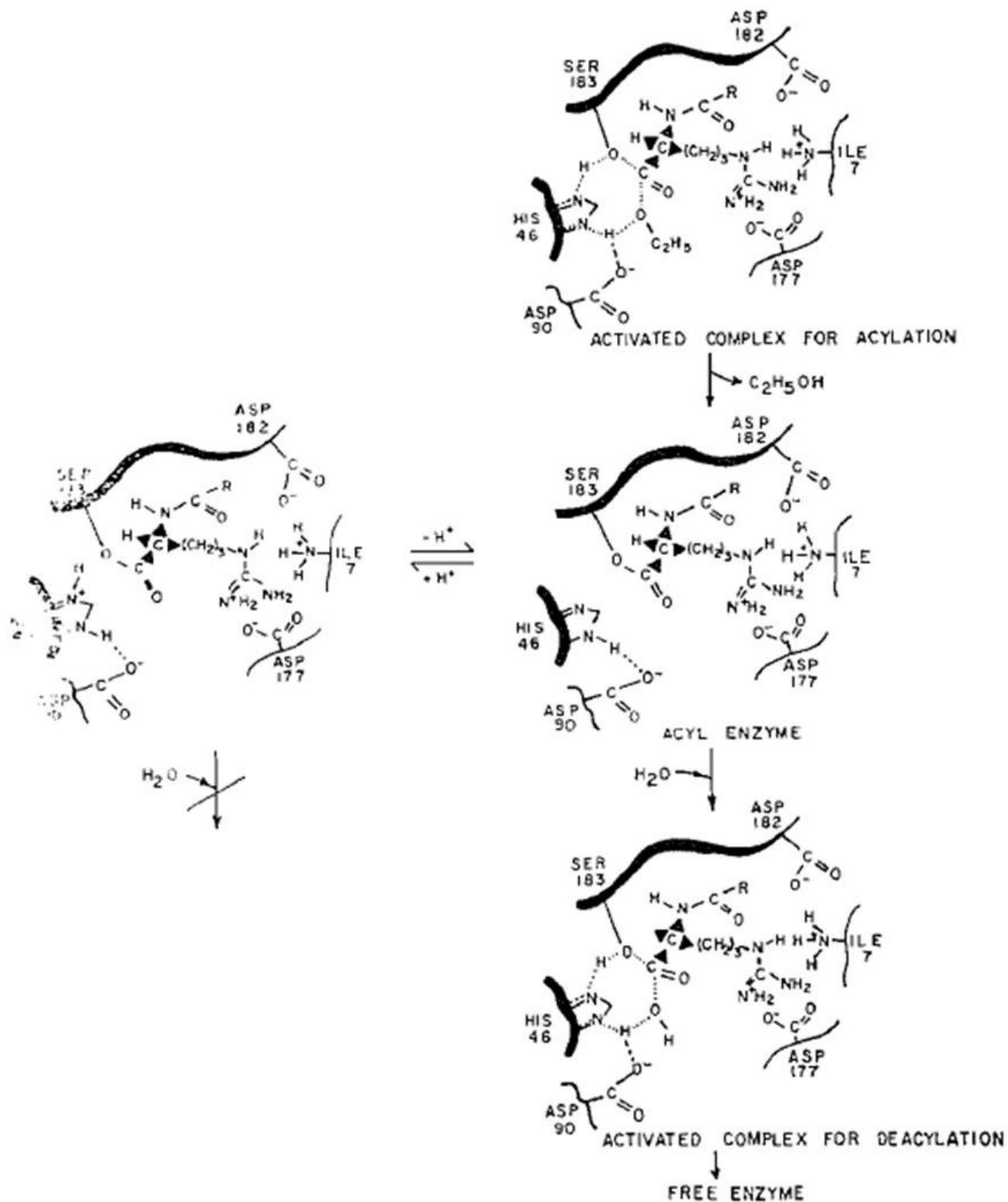


Figura 13b. Continuação do desenho esquemático do mecanismo de ação da tripsina (KASSERRA e LAIDLER, 1969).

2.5 Purificação e caracterização de tripsinas de peixes

Para que se possa realizar a caracterização de uma proteína, é preciso que primeiramente se efetue a sua purificação. A escolha da metodologia a ser empregada na purificação dependerá do conhecimento de algumas características químicas, físicas e biológicas da proteína, como: massa molecular, hidrofobicidade, carga líquida da superfície, solubilidade, bioespecificidade e modificações pós-traducionais. Com essas informações em mãos, pode-se escolher um ou mais métodos de purificação, estando os mais comuns listados abaixo (VOET *et al*, 2000; SILVA Jr., 2004):

(1) **Precipitação fracionada** – A solubilidade das proteínas depende de várias características do meio, como pH, temperatura, concentração de sais e polaridade dos solventes. A presença de uma quantidade mínima de sal no meio é essencial para que as proteínas se mantenham solúveis. Contudo, em altas concentrações de sal, as proteínas passam a competir com ele pela água de solvatação, até um ponto em que elas se tornam insolúveis e precipitam. Visto que a solubilidade das proteínas depende do seu tamanho e carga líquida, proteínas diferentes irão precipitar em concentrações diferentes de sal. Assim, com esta técnica, também conhecida como *salting out*, separa proteínas através do acréscimo gradual de sal, com subsequente centrifugação e retirada das proteínas insolúveis. Também é possível se realizar precipitação fracionada, através da alteração do pH do meio, bem como pela adição de solventes orgânicos, como o etanol.

(2) **Cromatografia de exclusão molecular** – Esta coluna separa as proteínas de acordo com a sua forma e a sua massa molecular. Para as proteínas globulares, a separação é uma função inversa do logaritmo de sua massa molecular, ou seja, proteínas de alta massa molecular irão percorrer os obstáculos impostos pela resina mais rapidamente do que as proteínas de menor massa molecular. Este tipo de cromatografia é composto de uma fase móvel (eluente), que em geral é um tampão, e uma fase fixa (resina). Neste caso, utilizam-se resinas inertes, como o Sephadex[®], que não interagem com as proteínas, sendo a separação realizada exclusivamente por massa molecular e independente de suas características químicas.

(3) **Cromatografia de troca iônica** – Existem, basicamente, dois tipos de trocadores iônicos. Os trocadores aniônicos e os catiônicos. Em ambos os casos, as proteínas irão interagir com a resina, de forma que a separação será realizada de acordo com a carga superficial líquida das proteínas. Se uma proteína apresentar carga superficial líquida positiva, ela se ligará à resina com carga negativa e vice-versa. Posteriormente, à ligação, as proteínas podem ser eluídas através da alteração na concentração de sal no meio, ou por mudança no pH. Quanto maior a afinidade da proteína pela coluna, maior será a sua carga e maior será a concentração de sal necessária para mudar a sua força iônica e desligá-la da resina. Dessa forma, é possível realizar uma eluição gradual, separando proteínas de acordo com a intensidade com que se ligam à coluna.

(4) **Cromatografia de interação hidrofóbica** – Nesse tipo de coluna, a resina é levemente enriquecida com grupamentos hidrofóbicos do tipo butil, octil ou fenil. O princípio químico da interação hidrofóbica consiste na tendência das proteínas exporem suas porções hidrofóbicas quando dissolvidas em soluções com alta concentração salina. Dessa forma, o pool de proteínas que se pretende separar é aplicado na coluna, dissolvido em solução salina e em seguida, eluído através da diminuição gradativa da concentração de sal no meio. Na interação hidrofóbica, a proteína se prende mais fracamente à resina do que nas cromatografias de fase reversa. Nesta última, a resina apresenta uma densidade maior de grupamentos apolares, o que permite que a amostra se ligue mais fortemente. Contudo, este tipo de cromatografia é pouco utilizado para purificação de proteínas, tendo em vista a necessidade de se aplicar solventes orgânicos na eluição das amostras.

(5) **Cromatografia de afinidade** – Este tipo de cromatografia envolve a interação entre a proteína sendo purificada e um ligante específico, presente na resina. Este ligante pode ser um antígeno, um inibidor, um substrato modificado ou algum composto químico pelo qual a proteína possua afinidade. A proteína alvo se ligará à resina, enquanto outras proteínas e contaminantes não irão interagir com ela, separando assim, apenas proteínas dentro da classe desejada. Após a aplicação da amostra, a coluna deve ser lavada com tampão para retirar as proteínas que não tenham afinidade com o ligante. Para se eluir as proteínas que se ligaram à resina pode-se utilizar tampões com pH extremamente ácido ou básico, assim liberando-a da resina. Podem-se utilizar também tampões com composto que concorram pela afinidade da enzima, induzindo assim a sua liberação.

Durante a purificação de proteínas, é importante que se acompanhe a evolução do processo, através de dosagens de concentração de proteína e atividade biológica, bem como eletroforeses em gel de poliacrilamida. Abaixo estão listadas quatro das técnicas mais utilizadas para a mensuração da concentração de proteínas nas amostras (SCOPES, 1993):

- **Biureto** – Este método envolve soluções de cobre, iodeto de potássio e hidróxido de sódio. No ambiente fortemente alcalino que se forma, o cobre forma um complexo com a ligação peptídica das proteínas, gerando uma coloração púrpura, cuja absorvância pode ser medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540nm. A intensidade da coloração é proporcional a concentração de proteínas na amostra. Desta forma, a dosagem é feita com base em uma curva de calibração preparada com concentrações conhecidas de uma solução padrão de proteína. A vantagem deste método é que a coloração não é afetada pela composição de aminoácidos da proteína. Sua maior desvantagem, porém é a baixa sensibilidade para amostras com pequenas quantidades de proteína, limitando a sua aplicação na rotina laboratorial.

- **Lowry** – Esta metodologia foi explanada pela primeira vez em 1951 no trabalho publicado por Oliver H. Lowry e colaboradores. Este método combina a reação cúprica do biureto com o reagente Folin-Ciocalteau, um composto fenólico que interage com a cadeia lateral de aminoácidos aromáticos (tirosina, triptofano e fenilalanina). A reação do composto Folin-cobre pode ser acompanhada em espectrofotômetro, com a amostra absorvendo luz em 750nm. A concentração de proteína na amostra é estimada por comparação com uma curva de calibração. A grande vantagem deste método é a sua sensibilidade para baixas concentrações de proteínas, sendo 100 vezes mais sensível que o método do biureto. Contudo, a sua grande desvantagem é que a intensidade da cor liberada varia com a composição de aminoácidos da proteína, tornando esta técnica menos constante que o biureto.

- **Bradford** – Esta é a metodologia mais utilizada atualmente e foi primeiramente descrita por Marion M. Bradford em 1976. A técnica envolve a ligação do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 dissolvido em ácido clorídrico à proteína. O corante se liga às proteínas carregadas positivamente, ocorrendo uma mudança no pKa do Coomassie Blue, que adquire uma coloração azulada. A absorvância do complexo corante-proteína é

dosada em 595nm e a concentração de proteína na amostra é estimada por comparação a uma curva de calibração preparada com proteína padrão. Esta metodologia é rápida, prática e tão sensível quando a técnica de Lowry. Contudo é importante que a amostra avaliada não contenha bases fortes nem detergentes, já que um pH elevado pode interferir na coloração. Adicionalmente, o reagente mancha as cubeta de plástico e vidro, é foto sensível e pode exigir a preparação rotineira de novas curvas de calibração.

- **Ultra-violeta** – A metodologia baseada na mensuração da absorbância na faixa de luz ultra-violeta vem sendo empregada desde a publicação do trabalho de Warburg e Christian (1941). Na técnica descrita por estes autores, leva-se em consideração a presença de ácidos nucléicos (que absorvem luz em 260nm) e proteínas (que absorve luz em 280nm) nas amostras. Para o cálculo da concentração protéica, os valores de absorbância nos dois comprimentos de onda são aplicados a uma fórmula que corrige a interferência dos ácidos nucléicos na absorbância das proteínas. Para amostras de proteínas purificadas, pode-se utilizar apenas a absorbância a 280nm. A concentração de proteína pode ser calculada com exatidão quando se tem o coeficiente de extinção molar da mesma. Este coeficiente varia de uma proteína para outra, pois depende da sua composição de aminoácidos aromáticos (triptofano, fenilalanina e tirosina), composto químico envolvido na absorbância de luz em 280nm. Apesar de simples e prático, este método tem grandes desvantagens, como o grande número de substâncias aromáticas e pigmentos que podem interferir na absorbância e a grande diferença de valores entre amostras de composições diferentes. Ainda dentro do espectro de luz ultra-violeta, pode-se realizar a dosagem em 205nm. Nesta faixa, depende-se menos da composição de aminoácidos da proteína e os valores não variam tanto de uma amostra para outra. Porém exige-se um espectrofotômetro bem calibrado e uma amostra livre de contaminantes que possam interferir na absorbância.

No que se refere ao acompanhamento da atividade biológica das proteínas, existem várias metodologia que podem ser utilizadas. No caso das peptidases, podem-se utilizar substratos cromogênicos inespecíficos, como a azocaseína ou específicos, como o BAPNA (Hidroclorodrato de Na-Benzoil-D,L-arginina p-nitroanilida) e o TAME (tosil arginina metil ester). O BAPNA, um dos substratos utilizados no presente trabalho, pode ser aplicado na caracterização de enzimas como tripsinas, amidases e balterobina. A sua hidrólise gera os produtos N α -Benzoil-L-arginina e p-nitroanilina (Figura 15). Este último

produto apresenta uma coloração amarelada cuja formação pode ser acompanhada em espectrofotometro na faixa de comprimento de 405nm. Quanto maior a hidrólise do substrato, maior será a intensidade da cor amarela formada.

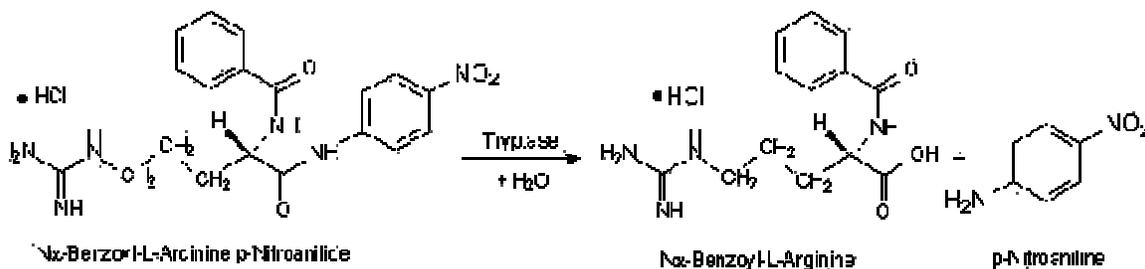


Figura. 15. Hidrólise do substrato BAPNA, formando o produto cromogênico p-Nitroalina (SIGMA, 2009).

Outro substrato cromogênico que foi utilizado no presente trabalho, é a azocaseína, um substrato direcionado para peptidases em geral. Este substrato é formado de caseína modificada pela adição de um grupamento azo. Este grupamento azo, quando entra em contato com uma solução alcalina, torna-se amarelo-alaranjada, sendo possível mensurar a sua liberação para o meio resultante da hidrólise da caseína.

Adicionalmente, podem-se utilizar substratos fluorescentes. O termo fluorescência foi cunhado em 1852 por George Gabriel Stoke, e apesar de apresentar o prefixo “fluor”, não possui nenhuma relação com o elemento químico homônimo. A origem deste termo reside na rocha fluorescente denominada, em inglês, “*fluorspar*”. Nesta rocha o prefixo “fluor” deriva do latim, que significa “fluir”, tendo sido assim chamada por conta da facilidade com a qual pode ser derretida. Este foi um dos primeiros materiais no qual a fluorescência foi descrita (VALEUR, 2001).

O fenômeno da fluorescência envolve a absorção e liberação de energia por um elétron reativo. Para tanto, é preciso que, primeiramente, este elétron se torne excitado e passe para um orbital energeticamente superior. Em seguida, esse elétron volta para o seu orbital inicial liberando assim a energia que absorveu, na forma de fóton, mas num comprimento de onda diferente daquele que lhe foi incidido (VALEUR, 2001). Na Figura

16, está representado o diagrama de Jablonski, que ilustra a transição de estado energético de um elétron, demonstrando a absorção de energia e a posterior liberação de fluorescência.

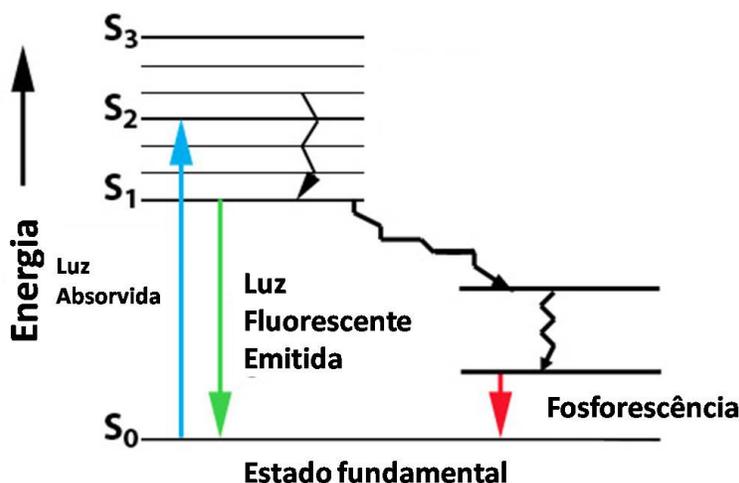


Figura 16. Diagrama simplificado de Alexander Jablonski. A seta azul indica a absorção de um fóton, que faz com que o elétron sai do estado fundamental (S₀) para o estado excitado (S₂) e sua posterior liberação de luz fluorescente (<http://web.uvic.ca>).

A fluorescência é uma característica típica de moléculas aromáticas, como por exemplo, os aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina (LAKOWICZ, 2006). Por isso, as proteínas apresentam uma fluorescência intrínseca, que pode ser mensurada e utilizada para se avaliar sítios de ligação, desnaturação, dinâmica, distância entre ligações e transições conformacionais em diferentes condições (VALEUR, 2001).

Além dos aminoácidos, outros compostos também possuem fluorescência intrínseca, que podem ser utilizados em diversos tipos de experimentos. Um fenômeno fluorescente bastante interessante é o de Transferência Ressonante de Energia de Fluorescência (FRET), que pode ser utilizado para se avaliar a atividade biológica de enzimas, como as peptidases. O FRET é um fenômeno eletrodinâmico no qual há um grupo doador de energia (molécula no estado excitado) e um grupo aceptor de energia (molécula no estado fundamental). O grupo doador emite naturalmente ondas curtas de fluorescência, que se sobrepõem ao espectro de absorção do aceptor. Ou seja, quando estes grupos estão próximos um do outro, a energia de fluorescência emitida pelo grupo fluorescente, doador, é “apagada” pelo grupo aceptor, que por sua vez absorve a energia que está sendo emitida pelo primeiro. Contudo, a

partir do momento em que o doador é afastado do acceptor, a fluorescência emitida pelo primeiro passa a ser detectável (LAKOWICZ, 2006).

Partindo destes preceitos envolvidos no fenômeno de FRET, o grupo de pesquisa do departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo, desenvolveu uma metodologia para sintetizar substratos fluorogênicos com o intuito de estudar a especificidade de hidrólise das peptidases. Para a síntese desses substratos, utiliza-se o ácido *ortho*-aminobenzoico (Abz) como grupo fluorescente e o 2,4-dinitrofenil (Dnp) ou N-(2,4-dinitrofenil) etilenodiamina (EDDnp) como grupo apagador (CARMONA *et al*, 2009).

A Figura 17 ilustra o mecanismo de funcionamento deste tipo de substrato. Tem-se o grupo doado (Abz) e o grupo acceptor (EDDnp), unidos por uma sequência peptídica. A partir do momento em que o peptídeo é hidrolisado, o substrato passa a emitir fluorescência, que pode ser acompanhada por um equipamento denominado fluorímetro. Assim, pode-se realizar cinéticas de substrato para se avaliar a eficiência de hidrólise e a afinidade da enzima pelo substrato (k_{cat} e K_m). Adicionalmente, pode-se variar a composição de aminoácidos na sequência peptídica para avaliar a preferência da enzima por certos aminoácidos em diferentes posições no substrato (CARMONA *et al*, 2009).

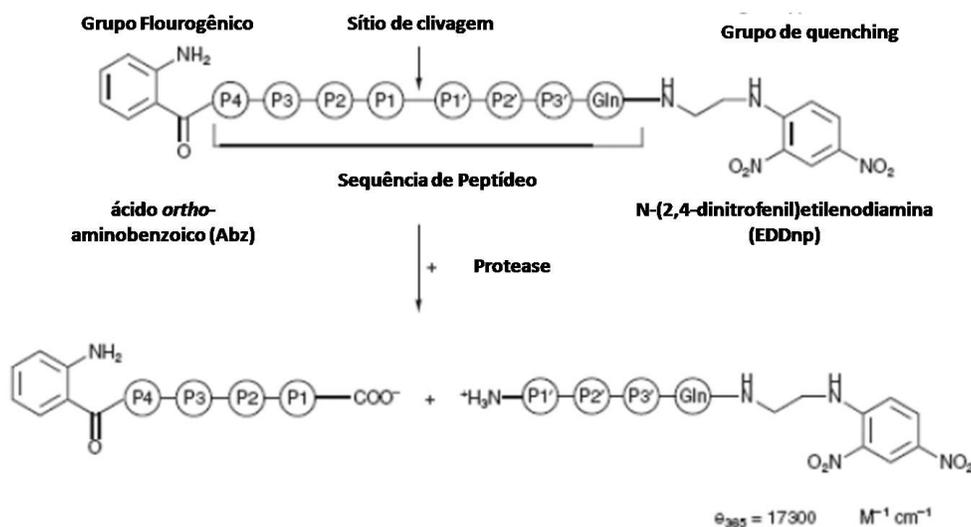


Figura 17. Esquema representando o mecanismo de funcionamento do peptídeo FRET com Abz/EDDnp como par receptor/doador. A fluorescência é liberada com a clivagem da ligação peptídica entre P1 e P1'. Os aminoácidos seguem a nomenclatura de Schechter and Berger (1968) (CARMONA *et al*, 2009).

Quando se está caracterizando uma enzima, é importante que se observe também a afinidade que ela possui pelos substratos avaliados. Para tanto, realizam-se estudos quanto aos seus parâmetros cinéticos. A cinética enzimática foi estudada a fundo pela primeira vez por Leonor Michaelis e Maud Menten, que avaliaram a atuação de uma concentração fixa de enzima, em condições de temperatura e pH constantes, sobre uma concentração variável de substratos. Com isso, eles obtiveram gráficos hiperbólicos, a partir dos quais desenvolveram os cálculos dos valores assintóticos, denominados constante de Michaelis (K_m) e velocidade máxima (V_{max}).

O valor de K_m de um substrato para uma enzima dependerá das condições do meio no qual a enzima se encontra, tais como pH, temperatura e força iônica. O K_m se refere à concentração de substrato na qual metade das enzimas em solução está com seu sítio ativo preenchido. Adicionalmente, K_m também indica a afinidade da enzima pelo substrato, de forma que quanto menor o K_m , maior a força da ligação do complexo [ES] e vice-versa.

Com a velocidade máxima (V_{max}) se pode calcular o número de *turnover* da enzima (k_{cat}), ou seja, o número de moléculas de substratos convertidas em produto por uma única molécula de enzima numa determinada unidade de tempo. A razão entre k_{cat} e K_m gera uma constante que irá indicar a interação entre substrato e enzima, que pode ser traduzida em eficiência catalítica, de forma que os valores de k_{cat}/K_m podem ser utilizados para se comparar a preferência de uma enzima por diferentes substratos (BERG *et al.*, 2004).

A partir do momento em que se obtém a enzima pura e se determina qual substrato será utilizado, passa-se para a etapa de estudo das suas características físico-químicas, avaliando-se a influência do pH, temperatura, inibidores e cofatores sobre a sua atividade biológica.

A composição de aminoácidos de uma proteína contribui de forma importante para o seu comportamento frente ao meio em que se encontra. Por isso, enzimas de dois organismos diferentes (ou até mesmo isoformas dentro de um mesmo organismo) podem apresentar atividades biológicas semelhantes, mas pH e temperatura ótimas diferentes ou variações na estabilidade frente a vários compostos químicos, pH e temperatura.

O pH atua sobre a cadeia lateral dos aminoácidos que formam as enzimas, afetando assim a ionização deles e conseqüentemente sua solubilidade, bem como as interações que

realizam uns com os outros. Dessa forma, alterações no pH pode afetar drasticamente a estrutura e a atividade das proteínas, sendo este um ponto chave na sua caracterização.

A ação da temperatura sobre as enzimas é um aspecto extremamente interessante da evolução dos organismos. É sabido que existem organismos que sobrevivem em temperaturas extremamente baixas ou altas e que apresentam proteínas ortólogas aos mesófilos, mas adaptadas à temperatura em que vivem. Acerca disso, Somero (2004) escreveu uma revisão que explana as adaptações bioquímicas das enzimas frente às diferentes temperaturas, que podem seguir três vias diferentes: (i) modificações adaptativas na concentração das enzimas no organismo; (ii) variação genética ligada a alteração de propriedades cinéticas, como o k_{cat} , por exemplo; ou (iii) modulação da atividade da enzimas por modificações na composição celular, alterações covalentes nas enzimas ou pelo uso de composto de baixa massa molecular.

Ademais, quando se está caracterizando uma enzima e se deseja saber exatamente a qual classe ela pertence, são utilizados vários tipos de inibidores, co-fatores e até mesmo o sequenciamento dos aminoácidos da proteína. Quanto aos inibidores, existem 3 tipos principais (BERG *et al*, 2004): (i) irreversíveis, que se ligam fortemente à enzima, podendo ser esta ligação covalentemente ou não; (ii) reversível competitiva, na qual o inibidor compete diretamente com o substrato pelo sítio ativo da enzima, diminuindo a sua velocidade de catálise. Esta inibição pode ser atenuada pelo aumento na concentração de substratos; (iii) reversível não competitiva, na qual o inibidor não compete com o substrato, pois se liga num sítio diferente do catalítico, de forma a diminuir a afinidade da enzima pelo substrato ou a sua capacidade de convertê-lo em produto.

O processo de purificação e caracterização das proteínas também pode ser acompanhado através da realização de eletroforeses em gel. A eletroforese consiste da migração de partículas eletricamente carregadas em um determinado meio sob a influência de uma diferença de potencial (SILVA Jr, 2001).

A forma mais comum de eletroforese utilizada na análise de proteínas é o PAGE (Eletroforese em gel de poliacrilamida). Este tipo de gel é formado pela polimerização da acrilamida interligada por etileno bis-acrilamida, que ocorre na presença de persulfato de amônio e TEMED (N,N,N',N'-Tetrametil etileno diamina) (BERG *et al*, 2004). Como este

gel forma uma malha, proteínas de carga igual tendem a migrar dentro do campo energético de acordo com a sua massa molecular.

As proteínas apresentam carga líquida em sua superfície, que pode variar de acordo com a sua composição de aminoácidos e com o meio no qual ela se encontra. Desta forma, para a realização da eletroforese, todas as proteínas precisam apresentar carga elétrica semelhante, para que migrem uniformemente. Para tanto, utiliza-se o detergente SDS (duodecil sulfato de sódio), que confere às proteínas uma carga negativa e permite que elas migrem do pólo negativo para o positivo do gel (VOET *et al*, 2000). Este tipo de eletroforese é comumente utilizada na avaliação da massa molecular das proteínas, mas também pode ser aplicada no estudo de sua estrutura quaternária, pois o SDS pode romper ligações fracas que unem subunidade, sendo assim observadas as várias subunidades na eletroforese. Caso a amostra apresente subunidades ligadas por pontes dissulfeto, podem-se utilizar agentes redutores, como o β -mercaptoetanol para quebrar estas ligações (BERG *et al*, 2004).

Contudo, quando se tem o objetivo de realizar uma caracterização estrutural mais aprofundada da proteína, deve-se inicialmente obter a sua sequência primária. Este tipo de estudo permite uma melhor compreensão da conservação dos aminoácidos da proteína em relação às suas ortólogas, bem como gera subsídios para a realização de estudo sobre a sua estrutura secundária, terciária e quaternária. Uma das metodologias clássicas utilizadas no sequenciamento de proteínas é a degradação de Eddman (Figura 18), que foi criada em 1950 por Pehr Eddman.

Esta metodologia consiste da remoção seriada dos aminoácidos da extremidade N-terminal de um peptídeo. Para tanto, utiliza-se o reagente isotiocianato de fenila (reagente de Edman), que em condições levemente alcalinas, reage com a amina do aminoácido N-terminal, formando um derivado de feniltiocarbamil. Posteriormente, esse peptídeo é submetido a um tratamento levemente ácido, em baixas temperaturas para que ocorra a remoção do resíduo N-terminal na forma de um derivado cíclico de feniltio-hidantionina (PTH), o qual é então identificado por cromatografia. A reação é então reiniciada para se processar o aminoácido seguinte da cadeia, até que se obtenha a sequência completa. No caso de sequências com mais de 50 aminoácidos, exige-se a realização de uma digestão

prévia, pois esta técnica se torna pouco confiável na análise de sequências muito longas (VOET *et al*, 2000; NELSON e COX, 2008).

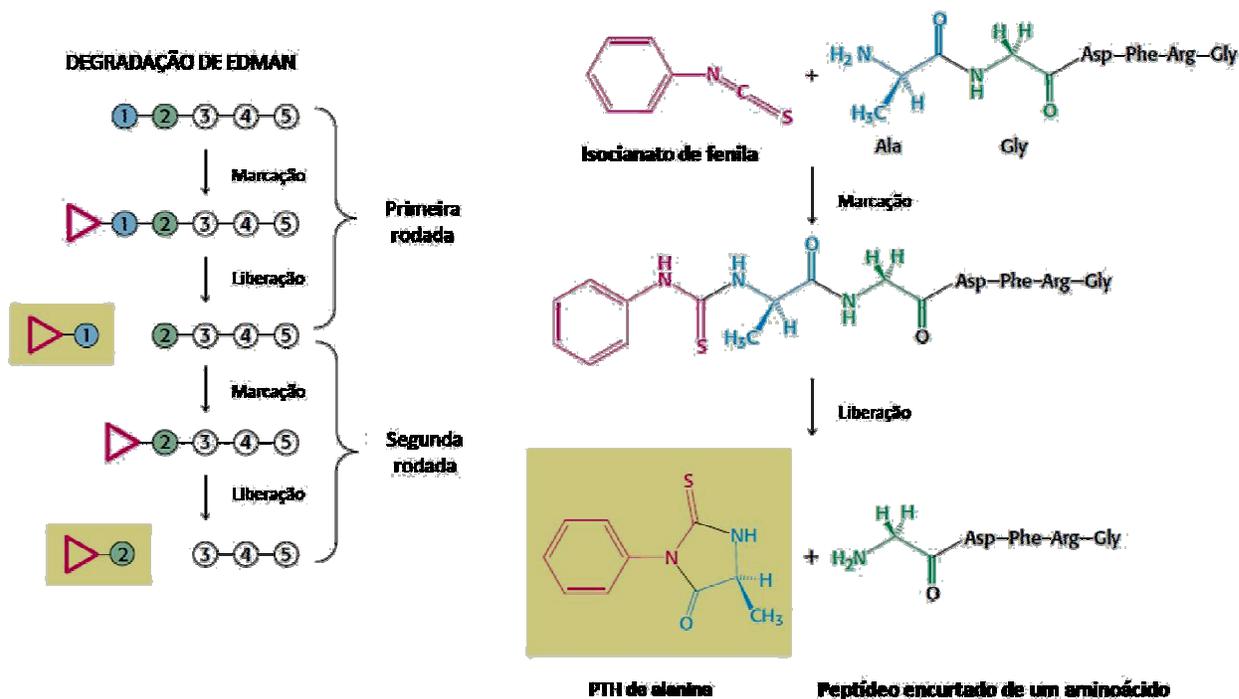


Figura 18. Esquematização da liberação do aminoácido terminal através da degradação de Edman (BERG *et al*, 2004).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, L.C.; LUNDSTEDT, L.M.; MORAES, G. (2006). Digestive enzyme responses of tambaqui (*Colossoma macropomum*) fed on different levels of protein and lipid. **Aquaculture Nutrition**. Vol. 12, pp. 443–450.
- ANWAR, A.; SALEEMUDDIN, M. (1998). Alkaline Peptidases: A Review. **Bioresource Technology**. Vol. 64, pp. 175-183.
- ARIDE, P.H.R.; ROUBACH, R.; VAL, A.L. (2007). Tolerance response of tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier) to water pH. **Aquaculture Research**. Vol. 38, pp. 588-594.
- ARRUDA, L. F. (2004). Aproveitamento do resíduo do beneficiamento da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) para obtenção de silagem e óleo como subprodutos. 78 f. **Dissertação (Mestrado)** - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- ASPMO, S.I., HORN, S.J., EIJSINK, V.G.H. (2005). Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. **Process Biochemistry**. Vol. 40; pp.1957-1966.
- BAIRD, T.; WANG, B; LODDER, M.; HECHT, S.M.; CRAIK, C.S. (2000). Generation of active trypsin by chemical cleavage. **Tetrahedron**. Vol. 56 pp. 9477-9485.
- BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. (2004). Bioquímica. Rio de Janeiro, **Editora Guanabara Koogan S.A.**. Quinta edição. pp. 996.
- BEZERRA, R.S.; SANTOS, J.F; CARVALHO Jr., L.B.; LINO, M.A.S.; VIEIRA, V.L.A. (2000). Characterization of stomach and pyloric caeca proteínases of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Journal of Food Biochemistry**, Vol. 24, pp. 189-199.
- BEZERRA, R.S.; SANTOS, J.F; PAIVA, P.M.G; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B.; VIEIRA, V.L.A.; CARVALHO Jr., L.B. (2001). Partial purification and characterization of a thermostable trypsin from pyloric caeca of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Journal of Food Biochemistry**. Vol. 25, pp. 199-210.

- BLANCO M.; SOTELO, C.G.; CHAPELA, M.J.; PÉREZ-MARTÍN, R.I. (2007). Towards sustainable and efficient use of fishery resources: present and future trends. **Trends in Food Science & Technology**. Vol. 18, pp. 29-36.
- 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**. Vol. 102, pp. 343-350.
- CARMONA, A.K.; JULIANO, M.A.; JULIANO, L. (2009). The use of Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) peptides for measurement of clinically important proteolytic enzymes. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. Vol. 81(3), pp. 381-392.
- CASTILLO-YAÑEZ, F.J., PACHECO-AGUILAR, R, GARCÍA-CARREÑO, F.L., NAVARRETE-DEL TORO, M.A. (2005). Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine *Sardinops sagax caerulea*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**. Vol. 140, pp 91-98.
- CHACON, J. O.; NEPOMUCENO, F.H.; GURGEL, J.J.S.; FARIAS, J.O. (1988). Manual sobre manejo de reservatórios para a produção de peixes: Aquila - atividades regionais de aquicultura para América Latina e o caribe. **Série: FAO Project reports - No.9 AB486/S**; 190 pp.
- CHEN, J.-M.; KUKOR, Z.; MARÉCHAL, C.; TÓTH, M.; TSAKIRIS, L; RAGUÉNÈS, O.; FÉREC, C.; MIKLO'S SAHIN-TÓTH, M. (2003). Evolution of Trypsinogen Activation Peptides. **Molecular Biology and Evolution**. Vol. 20 (11), pp. 1767–1777.
- DAMHUS, T.; KAASGAARD, S.; LUNDQUIST, H.; OLSEN, H.S. (2008). Novozymes Rethink tomorrow: Enzymes at work. 3rd edition. No. 2008-08235-01.
- 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 peptidases for laundry detergent. **Food Chemistry**, Vol. 112, pp. 125–130.
- ExPASy (2005). Accessed in: http://www.expasy.ch/tools/peptidecutter/peptidecutter_special_enzymes.html.

- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (2009). **FishStat Plus:** Universal software for fishery statistical time series. Disponível on-line: <http://www.fao.org>. Acessado em: 20/10/2009.
- 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**. Vol. 116, pp. 611-616.
- GONZÁLEZ, Y.; TANAKA, A.S.; HIRATA, L.Y.; DEL RIVERO, M.A.; OLIVA, M.L.; ARAÚJO, M.S.; CHAVEZ, M.A. (2007). Purification and partial characterization of human neutrophil elastase inhibitors from the marine snail *Cenchritis muricatus* (mollusca). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular Integration of Physiology**. Vol. 146, pp. 506-513.
- HEDSTROM, L. (2002). Serine Peptidase Mechanism and Specificity. **Chemical Reviews**, Vol. 102, pp. 4501-4523.
- JELLOULI, K., BOUGATEF, A., DAASSI, D., BALTI, R., BARKIA, A., NASRI, M. (2009). New alkaline trypsin from the intestine of grey triggerfish (*Balistes caprisus*) with high activity at low temperature: purification and characterisation. **Food Chemistry**. Vol. 116, pp. 644-650.
- IBAMA (2008) (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). Estatística da Pesca 2006.
- JÓNSDÓTTIR, G.; BJARNASON, J.B.; GUDMUNDSDÓTTIR, Á. (2004). Recombinant cold-adapted trypsin I from Atlantic cod—expression, purification, and identification **Protein Expression and Purification**. Vol. 33; pp. 110–122.
- KASSERRA H.P.; LAIDLER K.J. (1969). Mechanisms of action of trypsin and chymotrypsin. **Canadian Journal of Chemistry**. Vol. 47, pp. 4031 - 4039.
- KIM, S.K.; MENDIS, E. (2006). Bioactive compounds from marine processing byproducts – A review. **Food Research International**. Vol.39, pp. 383–393.

- KISHIMURA, H.; KLOMKLAO, S.; BENJAKUL, S.; CHUN, B.S. (2008). Characteristics of trypsin from the pyloric ceca of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*). **Food Chemistry**. Vol. 106, pp. 194-199.
- KLOMKLAO, S.; BENJAKUL, S.; VIESSANGUAN, W.; KISHIMURA, H.; SIMPSON, B.K.; SAEKI, H. (2006). Trypsins from yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) spleen: Purification and characterization. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**. Vol. 144, pp. 47–56.
- KLOMKLAO, S.; BENJAKUL, S.; VIESSANGUAN, W.; KISHIMURA, H.; SIMPSON, B.K. (2007). Trypsin from the pyloric caeca of bluefish (*Pomatomus saltatrix*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**. Vol. 148, pp. 382–389.
- KURTOVIC, I.; MARSHALL, S.N.; SIMPSON, B.K. (2006). Isolation and characterization of a trypsin fraction from the pyloric ceca of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**. Vol. 143, pp. 432–440.
- LAKOWICZ, J.R. (2006). Principles of Fluorescence Spectroscopy. Third Edition. **Springer**, pp. 960.
- LEE, .JK.; HONG, S.; JEON, J.K.; KIM, S.K.; BYUN, H.G. (2009). Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from the rotifer, *Brachionus rotundiformis*. **Bioresource Technology**. Vol. 100, pp. 5255-5259.
- 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. **Eur. J. Biochem**. Vol. 232, pp. 677-685.
- MAURER, K.H. (2004). Detergent peptidases. **Current Opinion in Biotechnology**. Vol. 15 pp. 330–334.
- NC-IUBMB, Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. (2009). Enzyme Nomenclature in: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/intro.html#EC34>
- NELSON, D.L.; COX, M.M. (2008). Lehninger Principles of Biochemistry. 5th Edition. New York, **W.H. Freeman and Company**.

- NORIOKA, S.; SAKIYAMA; F. (2004). Trypsin. In: Barrett, A. J.; Rawlings, N. D.; Woessner, J. F. Editors. Handbook of proteolytic enzymes. London, **Academic Press**. Vol. 2, pp. 1483-1488.
- OLSEN, J. V.; SHAO-EN, O., MANN, M. (2004). Trypsin Cleaves Exclusively C-terminal to Arginine and Lysine Residues. **Molecular & Cellular Proteomics**. Vol. 3.6, pp. 608 – 614.
- PERONA, J.J.; CRAIK, C.S. (1995). Review: Structural basis of substrate specificity in the serine peptidases. **Protein Science**, Vol. 4 pp. 337-360.
- POLGÁR, L. (2005). Review: The catalytic triad of serine peptidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**. Vol. 62, pp. 2161–2172.
- RAO, M.B.; TANKSALE, A.M.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V. (1998). Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Peptidases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. Vol. 62 (3), pp. 597–635.
- RAVI-KUMAR, M.N.V. (2000). A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Functional Polymers**. Vol. 46, pp. 1–27.
- RAWLINGS, N.D.; MORTON, F.R.; BARRETT, A.J. (2007). An introduction to peptidases and the *Merops* database. Chapter 10, p. 161-179 In: Polaina, J. and MacCabe, A.P (editores). Industrial enzymes: Structure, Function and application. **Springer**. 1^a edição.
- RODRIGUEZ, J.; GUPTA, N.; SMITH, R.D.; PEVZNER, P.A. (2008). Does Trypsin Cut Before Proline? **Journal of Proteome Research**, Vol. 7 (01), pp. 300–305.
- RUST, M.B. (2002). Nutritional Physiology. In: HALVER, J. E.; HARDY, R. W. (Ed.). *Fish Nutrition*. New York: Academic Press p. 367-452.
- SEAP (2003). Ministério de Pesca e Aquicultura – MPA. http://www.presidencia.gov.br/estrutura_presidencia/seap/ acessado em 24/10/2009.
- SHAHIDI, F.; JANAKKAMIL, Y.V.A. (2001). Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**. Vol. 12, pp. 435-464.

- SILVA Jr., J.G. (2001). Eletroforese de proteínas: Guia teórico e prático. **Editora Interciência, Rio de Janeiro**. 1ª edição, 125pp.
- SILVA Jr., J.G. (2004). Cromatografia de proteínas: Guia teórico e prático. **Editora Interciência, Rio de Janeiro**. 1ª edição, 111pp.
- SILVA, C.R.; GOMES, L.C.; BRANDÃO, F.R. (2007). Effect of feeding rate and frequency on tambaqui (*Colossoma macropomum*) growth, production and feeding costs during the first growth phase in cages. **Aquaculture**. Vol. 264, pp. 135–139.
- SMITH, L.S. (1989). Nutritional Bioenergetics. In: HALVER, J. E. (Ed.). *Fish Nutrition*. London: Academic Press, p. 798.
- SOMERO, G.N. (2004). Adaptation of enzymes to temperature: searching for basic “strategies”. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**. Vol. 139, pp. 321–333
- 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**. Vol. 100, pp. 1429-1434.
- VALEUR, B. (2001). Molecular Fluorescence Principles and Applications. **Wiley-VCH Verlag GmbH**. 399pp.
- VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. (2000). Fundamentos de Bioquímica. **Editora Artes médicas Sul LTDA**, São Paulo. 931 pp.
- WOLFGANG, A. (2004). Enzymes in household detergents, In *Enzymes in Industry*. 3ª edição, editora **Wiley-VCh**. Capítulo 5.2.1, pp.154-180.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Purificar e caracterizar uma isoforma de tripsina-símile dos cecos pilóricos do peixe tambaqui (*Colossoma macropomum*)

4.2 Específicos

- Purificar uma isoforma de tripsina-símile do tambaqui;
- Caracterizar a enzima quanto ao efeito de pH, temperatura, íons e inibidores;
- Identificar a especificidade de hidrólise da enzima purificada frente a substratos fluorogênicos sintéticos;
- Obter a sequência de aminoácidos amino terminal da enzima purificada;
- Avaliar a compatibilidade da enzima purificada frente a oxidantes, tenso-ativos e detergentes comerciais;

5. ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo a ser submetido à revista **Bioresource Technology**

**Trypsin-like enzyme from tambaqui (*Colossoma macropomum*):
Purification and characterization of an alkaline enzyme stable in the presence of
commercial detergents and oxidizing agents**

To be submitted to Bioresource Technology

Marina Marcuschi^a, Talita S. Espósito^a, Maurício F. M. Machado^b, Izaura Y. Hirata^b,
Marcelo F. M. Machado^b, Márcia V. Silva^a, Luiz B. Carvalho Jr^a, Vitor Oliveira^b, Ranilson
S. Bezerra^{a1}

^a Laboratório de Enzimologia (LABENZ), Departamento de Bioquímica (CCB) and
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de
Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50670-910 Recife,
Pernambuco, Brazil.

^b Departamento de Biofísica, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São
Paulo, Rua Três de Maio, 100, São Paulo 04044-020, Brazil.

¹Corresponding author. Tel.: +55 81 2126 8540; fax: +55 81 2126 84 85 / 85 76.
E-mail addresses: ransoube@uol.com.br (R.S.Bezerra).

Abstract

A trypsin-like enzyme was purified from the pyloric caecum of tambaqui (*Colossoma macropomum*) through heat treatment, ammonium sulfate fractionation, Sephadex® G-75 and benzamidine-agarose chromatography. The enzyme had a molecular mass of 23.9 kDa, N-terminal amino acid sequence of IVGGYECKAHSQPHVSLNI and substrate specificity for arginine at P1, efficiently hydrolyzing substrates with leucine and lysine at P2 and serine and arginine at P1'. Using the substrate z-FR-MCA, the enzyme exhibited greatest activity at pH 9.0 and 50 °C, whereas, with BAPNA, activity was greatest in a pH range of 7.5 to 11.5 and at 70 °C. The enzyme also maintained 60% of its activity after 3 h at 60 °C. The enzyme was significantly inhibited by TLCK and benzamidine (trypsin inhibitors), PMSF (serine protease inhibitor) and the ions Al⁺³, Cu⁺², Hg⁺², Pb⁺² Zn⁺² and Ni⁺². The enzyme was stable in the presence of commercial laundry detergents, surfactants and oxidants, showing similarity to Alcalase®.

Keywords: Laundry detergent, Substrate, Tambaqui (*Colossoma macropomum*), Tropical fish, Trypsin-like enzyme.

1. Introduction

The term trypsin was coined by W. F. Kühne in 1876 to describe the proteolytic activity found in the pancreas of animals. Trypsin-like enzymes (EC 3.4.21.4) are currently known as serine endoproteases that hydrolyze peptide bonds at the carboxylic end of the amino acid residues Arginine (R) and Lysine (K) (Norioka and Sakiyama, 2004). These enzymes are found in several organisms (animals, bacteria and viruses) and play a pivotal

role in digestive physiology (Hedstrom, 2002). In most teleost fish, trypsin is synthesized in the cells of the pyloric caecum as an inactive precursor (trypsinogen), which is then secreted into the intestinal lumen and activated by enteroproteases (Kapoor et al., 1975).

Proteinases such as trypsin have a number of biotechnological applications and are commonly used in laundry detergent, food production, leather goods, laboratorial applications and waste degradation processes (Anwar and Saleemuddin; 1998, Maurer, 2004). The most-targeted protease for detergent formulations is the microbial enzyme subtilisin (Wolfgang, 2004; Rawlings et al., 2007). However, there remain many important questions regarding storage, shelflife and production costs (Anwar and Saleemuddin, 1998). Thus, there is a demand for alternative sources of protease that are stable in mediums with alkaline pH, chelants and oxidant agents and are able to hydrolyze proteins bound to insoluble substrates, such as cloth, dentures and contact lenses (Wolfgang, 2004).

Fish viscera are a common by-product of the fishery industry and a possible enzyme source for biotechnological application. Proteases from tropical fish are generally thermostable, have a long shelflife and are highly active over a wide range of pH (Bezerra et al., 2001; 2005; Espósito et al., 2009a). In northern Brazil, one of the most important freshwater fish is the tambaqui (*Colossoma macropomum*), which is a characid found mainly in rivers, lakes and floodplains of the Amazon (Almeida et al., 2006). This tropical omnivore feeds mostly on seeds, fruit (in the flood season) and zooplankton (in the dry season) (Almeida et al., 2006).

Acid and alkaline proteases from the tambaqui were first characterized by Bezerra et al. (2000). A thermostable trypsin-like enzyme of 38.5 kDa from the pyloric caecum of this same fish was then partially purified and characterized (Bezerra et al., 2001). Alkaline proteases from tambaqui viscera have been extracted using ethanol as the precipitant agent

and their potential application as detergent additive has been investigated (Espósito et al., 2009a).

In the present work a trypsin-like isoform was purified from the pyloric caecum of the tambaqui. This enzyme was characterized with fluorogenic and chromogenic substrates, its N-terminal amino acid sequence was determined and its stability in the presence of detergent components was evaluated and compared with commercial alkaline proteases.

2. Materials and Methods

2.1. Enzyme extraction

Juvenile specimens of tambaqui (*Colossoma macropomum*), with an average total weight of 316.7 ± 73.2 g and total length of 24.9 ± 2.2 cm were kindly provided by the rearing units of the *Universidade Federal Rural de Pernambuco* (Brazil). The specimens were sacrificed in an ice bath and the pyloric caecum (mean of 0.7 ± 0.14 g per fish) was collected. Immediately after dissection, the tissues were homogenized in 10 mM Tris-HCl 15 mM NaCl pH 8.0 (200 mg of tissue/buffer mL), using a tissue homogenizer (IKA RW 20D S32, China). The resulting homogenate was centrifuged (Sorvall RC-6 Superspeed Centrifuge – North Carolina, USA) at 10,000 $\times g$ for 15 min at 4 °C to remove cell debris and nuclei. The supernatant (crude extract) was used for the further purification steps (Bezerra et al., 2005).

2.2. Enzyme purification

The enzyme was purified from the pyloric caecum using a four-step procedure. The crude extract was first incubated for 30 min at 45 °C (heat treatment) and centrifuged at 10,000 $\times g$ for 15 min at 4 °C, as described by Bezerra et al. (2001). The supernatant was

collected and fractionated with ammonium sulphate for 2 h at 4 °C for the final salt saturation of 0–30% (fraction F₁), 30–60% (fraction F₂) and final supernatant (protein soluble in 60% salt concentration). After each fractionation, the extract was centrifuged at 10,000 \times g for 15 min at 4 °C, the pellets (fractions F₁ and F₂) were collected, resuspended with 4 mL of 100 mM Tris-HCl pH 8.0 and dialysed against this same buffer for 24 h at 4 °C. Six mg of protein from the dialysed fraction F₂ were then applied on a gel filtration column (120 cm³ with 9 g Sephadex[®] G-75, Sigma[®]) at a flow rate of 0.4 ml/min (elution buffer 100 mM Tris-HCl pH 8.0). The fractions with tryptic activity were pooled (30 mL) and placed on an affinity column (2 cm³ with 1 mL of benzamidine-agarose, Sigma[®]) at a flow of 0.5 mL/min of binding buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0). When all non-ligand molecules were washed out, a 500 mM KCl-HCl pH 2.0 buffer was used to elute the enzyme. For each 1 mL fraction collected, 60 μ L of 1.5 M Tris-HCl pH 8.0 buffer was added to neutralize the sample pH. These fractions were pooled, dialysed against 100 mM Tris-HCl pH 8.0 buffer for 24 h at 4 °C and used in the following assays.

2.3. Enzyme activity and protein determination

2.3.1. Specific trypsin activity with chromogenic substrate

Tryptic activity was assayed with the chromogenic substrate N- α -benzoyl-L-arginine *p*-nitroanilide (BAPNA) prepared in Dimethylsulfoxide (DMSO). In a microplate, the reaction mixture was composed of 4 mM BAPNA (30 μ L), 100 mM Tris-HCl pH 8.0 (140 μ L) and sample (30 μ L). The release of *p*-nitroaniline (product) was monitored at λ 405 nm (25 °C) for 10 min by the increase in absorbance against a blank (reaction without enzyme) (triplicate) and the values were determined in a microplate reader (BioRad Model X-Mark[™], Brazil). One unit (U) of enzyme activity was defined as the amount of enzyme

capable of hydrolyzing one mmol of BAPNA per min under the established conditions, using the molar extinction coefficient of $9,100 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.3.2. Specific trypsin activity with fluorimetric substrate

Tryptic activity was also assayed using the fluorescence substrate carbobenzoxy-Phe-Arg-7-amido-4-methylcoumarin (z-FR-MCA) prepared in DMSO. The reaction mixture used to assay the effect of pH, temperature and metal ions was composed of $100 \mu\text{M}$ z-FR-MCA ($0.2 \mu\text{L}$), 100 mM Tris-HCl pH 8.0 (1 mL) and sample ($10 \mu\text{L}$). The mixture was kept under agitation in a Hitachi F-2500 (Tokyo, Japan) fluorimeter for 25 min and the release of free MCA (fluorophore) was continuously measured at λ_{EX} 380 nm and λ_{EM} 460 nm. The absorbance values were used to calculate the apparent second-order rate constant (k_{cat}/K_m) assayed under pseudo-first-order conditions, in which $[S] \ll K_m$, using the software Grafit 5.0.0 (Leatherbarrow, 2001). These values were later converted to relative percentage of k_{cat}/K_m .

Thermal stability and the effect of inhibitors were assayed with the same fluorescence substrate (z-FR-MCA), but only initial velocity values were obtained. The reaction mixture was composed of 1 mM z-FR-MCA ($1 \mu\text{L}$), 100 mM Tris-HCl pH 8.0 (1 mL) and sample ($1\text{-}2 \mu\text{L}$). The release of free MCA was monitored at λ_{EX} 380 nm and λ_{EM} 460 nm in a Hitachi F-2500 (Tokyo, Japan) fluorimeter for 90 seconds at $25 \text{ }^\circ\text{C}$. One unit (U) of enzyme activity was defined as the amount of enzyme capable of hydrolyzing one μmol of z-FR-MCA per second under the established conditions. The results were reported as the activity relative to the non-treated samples.

2.3.3. Nonspecific proteolytic activity

Nonspecific proteolytic activity was assayed following the procedure described by Bezerra et al. (2005). The reaction mixture was composed of 1% Azocasein ($50 \mu\text{L}$),

prepared in 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0 and enzyme sample (30 μ L). After 60 min of incubation at 25 $^{\circ}$ C, the reaction was stopped by the addition of 10% (w/v) trichloroacetic acid (240 μ L) and the mixture was centrifuged for 5 min at 8000 xg. The supernatant (70 μ L) was mixed with 1 M NaOH (130 μ L) and the released azo-dye (product) was measured against a blank at λ 450 nm using a microplate reader (BioRad Model X-MarkTM, Brazil). One unit (U) of proteolytic activity was defined as the amount of enzyme required to hydrolyze azocasein and cause an increase in the absorbance of 0.001 per min. The results were reported as the activity relative to the non-treated samples.

2.3.4. Protein determination

The total protein content of the samples was estimated following the procedure described by Bradford (1976), using bovine serum albumin (BSA) as the standard protein.

2.4. Effect of pH and temperature

The effect of pH on the purified enzyme was evaluated with BAPNA and z-FR-MCA (apparent second-order rate constant) at 25 $^{\circ}$ C in a range of 4 to 11 (100 mM Citrate-phosphate, Tris-HCl and Glycine-NaOH). The effect of temperature was evaluated in a range of 4 $^{\circ}$ C to 80 $^{\circ}$ C, using 100 mM Tris-HCl pH 8.0 as the buffer.

2.5. Thermal stability

Thermal stability of the purified enzyme was evaluated at temperatures ranging from 4 $^{\circ}$ C to 70 $^{\circ}$ C for 3 h. Samples were incubated at each temperature. An aliquot was collected every hour and mixed with 100 mM Tris-HCl pH 8.0 and BAPNA or z-FR-MCA (initial velocity values) to assay the residual activities.

2.6. *Effect of metal ions*

To assess the effect of metal ions on the activity of the purified enzyme, the following salts were used: AlCl_3 , BaCl_2 , CaCl_2 , CdCl_2 , CuSO_4 , HgCl_2 , MgCl_2 , MnCl_2 , NiCl_2 , NaCl , KCl , PbCOOH and ZnCl_2 . In the assay with z-FR-MCA (apparent second-order rate constant), samples (1 μL) of the purified enzyme were incubated with the salt solution in a final concentration of 5 to 10 mM, prepared in 100 mM Tris-HCl pH 8.0 (1 mL) at 25 °C for 30 minutes. One mM z-FR-MCA (1 μL) was then added to assess the residual second-order rate constant. In the assay with BAPNA, the samples (30 μL) were incubated with the salt solution (70 μL) in a final concentration of 3.5 mM at 25 °C for 30 min, then mixed with 100 mM Tris-HCl pH 8.0 (70 μL) and 4 mM BAPNA (30 μL) to assess the residual activity. The results were compared to a control assay under the same condition, but without the ions.

2.7. *Effect of synthetic inhibitors*

The effect of the following synthetic inhibitors on the purified enzyme was evaluated using z-FR-MCA (initial velocity values): 100 μM tosyl lysine chloromethyl ketone (TLCK), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 100 μM tosyl phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK), 10 μM O-Fenantrolina, 10 μM E-64 and the chelating reagent 10 mM ethylenediamine tetracetic acid (EDTA). The sample was incubated for 15 minutes with the inhibitors at a ratio of 1:1 (v/v). An aliquot was then withdrawn (1 μL) and mixed with 100 mM Tris-HCl pH 8.0 (1 mL) and 1 mM Z-FR-MCA (1 μL) to assay the residual activities. The following synthetic inhibitors were used for the assay with BAPNA: TLCK, PMSF, TPCK, Benzamidine and the reducing agent β -mercaptoethanol in a final concentration of 1 mM. The sample (25 μL) was incubated with 8 mM inhibitors (25

μL) for 30 minutes. 100 mM Tris-HCl pH 8.0 (120 μL) and 4mM BAPNA (30 μL) were then added to assay the residual activities.

2.8. Determination of cleavage specificity

To determine the substrate specificity of the purified enzyme, two series of fluorescence resonance energy transfer (FRET) peptides containing ortho-aminobenzoyl (Abz) and 2,4-dinitrophenyl (Dnp) were used. The general sequences were Abz-XRfK(Dnp)-OH and Abz-RXfK(Dnp)-OH, in which X denotes the position of the altered amino acid. The assay mixture was comprised of the sample (1 μL), 100 mM Tris-HCl pH 8.0 (1 mL) and substrate in an increasing final concentration ranging from 0.25 to 20.00 μM . The activity for each substrate concentration was assayed for 120 seconds at 25 °C (λ_{EX} 320 nm and λ_{EM} 420 nm). The kinetic parameters K_m and V_{max} were calculated by non-linear regression data analysis using the program Grafit 5.0.0 (Leatherbarrow, 2001). The turnover value (k_{cat}) was calculated by dividing the V_{max} value by the final concentration of enzyme in the reaction.

The specificity of the peptide bond cleavage was monitored through a HPLC System (Shimadzu LC-10AD, Tokyo, Japan) using a C-18 column (5 μm , 4.6 x 150mm). Two elution solvent systems were used: (A) trifluoroacetic acid and water (1:1000, v/v); (B) trifluoroacetic acid, methanol and water (1:900:100, v/v/v.), at a flow rate of 1.0 ml/min with a 0–90% gradient of solvent B over 60 min. The hydrolysis products were detected by UV λ 365 nm (for monitoring of the Dnp portion) and fluorimeter λ_{EX} 320 nm and λ_{EM} 420 nm (for monitoring of the Abz portion).

2.9. SDS-PAGE and mass spectrometer

Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was carried out following the procedure described by Laemmli (1970), using a 4% (w/v) stacking gel and a 12.5% (w/v) separation gel. The gel was stained for protein with 0.01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, dissolved in 10% (v/v) acetic acid with 25% (v/v) ethyl alcohol. The background of the gel was destained by washing with the same solution, but without Coomassie. The molecular mass and purity of the purified enzyme was also checked by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-TOF, TofSpec-E, Micromass).

2.10. Determination of NH₂-terminal amino acid sequence

The NH₂-terminal sequence was determined by the Edman degradation method, using a protein sequencer PPSQ-23 (Shimadzu Tokyo, Japan) and an isocratic HPLC system.

2.11. Compatibility with surfactants, oxidants and commercial detergents

The stability of three proteases (purified enzyme from tambaqui, Alcalase[®] from Novozymes[®] and porcine trypsin from Sigma[®]) was investigated in the presence of hydrogen peroxide (H₂O₂), ionic (Chaps) and non-ionic surfactants (SDS, Tween 20, Tween 80 and Triton x-100), following the procedure described by Moreira et al. (2002). For compatibility with laundry detergents, the proteases were incubated at 25 °C under agitation with commercially available detergents: Omo Multiação[®]; Minerva[®] - Unilever do Brasil; Ala[®] - Lever Igarassu; and Bem-te-vi[®] - ASA for a final concentration of 7 mg of detergent mL⁻¹. Aliquots (150 µL) were withdrawn after a 60 min of incubation and the residual proteolytic activity in each sample was determined at 25 °C with azocasein and

compared to a control without the additive. Additionally, two controls were prepared – one of the enzymes with water instead of the reagents (100% activity) and one of the reagents with no enzyme (blank).

2.12. Statistical analysis

The statistical analysis was performed on the Sigmastat 3.5 program, using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test ($p < 0.05$).

3. Results and discussion

3.1. Enzyme purification

The purification steps of the tambaqui enzyme are summarized in Table 1. Enzyme activity was measured with 4 mM BAPNA. The first step (heat treatment) has been used in other studies for the purification of tambaqui proteases (Bezerra et al., 2001; Espósito et al., 2009a). Although the heat treatment only caused 1.92-fold increase in specific enzyme activity, it is an important step, since it induces the denaturation and hydrolysis of undesired thermolabile contaminants (Bezerra et al., 2001; Bougatef et al., 2007). In the second purification step (ammonium sulphate fractionation), three fractions were obtained, the second of which (30-60%) exhibited the greatest specific activity (12.33 U mg^{-1}) and was therefore used in the following purification steps. The third step (size exclusion chromatography) was crucial to clearing the sample of contaminants, such as pigments, lipids and undesired proteins, which led to a 9.82-fold increase in specific enzyme activity. Size exclusion is one of the most commonly used chromatographies in fish trypsin purification procedures (Bezerra et al., 2001; Castillo-Yáñez et al., 2005; Klomklao et al., 2006; Bougatef et al., 2007; Souza et al., 2007; Fuchise et al., 2009; Jellouli et al., 2009).

The last step (affinity chromatography) provided an enzyme pool with a high purification yield (39.07%) and high specific activity (2262.96 U mg⁻¹), which was 371.04-fold higher than that of the crude extract.

3.2 Trypsin Characterization

The purified enzyme exhibited a single band of 27.5 kDa on the SDS-PAGE (Figure 1a) and a main peak of 23.9 kDa in the mass spectrum (Figure 1b). Other trypsins from different fish species have similar molecular mass results, such as 24 kDa in *Gadus macrocephalus*, 24 kDa in *Eleginus gracilis* (Fuchise et al., 2009), 23.2 kDa in *Balistes capriscus* (Jellouli et al., 2009), 24 kDa in *Theragra chalcogramma* (Kishimura et al., 2008), 24 kDa in *Sebastes schlegelii*, 24 kDa in *Alcichthys alcicornis* (Kishimura et al., 2007) and 24.5 kDa in *Pseudupeneus maculatus* (Souza et al., 2007).

In the assay using the fluorogenic substrate (z-FR-MCA), the purified enzyme was highly active in a pH range from 8.0 to 9.5, with the greatest activity at pH 9.0 (Figure 2a). Using the chromogenic substrate (BAPNA), the enzyme was more active in a pH range from 7.5 to 11.5 (Figure 2b). Using both substrates, enzyme activity at pH 6.0 was approximately 70% lower. A possible explanation for this is that the activity of trypsin-like enzymes is dependent of an unprotonated histidine in their active site (Kasserra and Laidler, 1969). At pH values around 6.0, the histidine becomes protonated and loses its capacity of capturing the serine proton, which impairs the nucleophilic attack to the scissile peptide bond performed by the serine residue, thereby not triggering the hydrolysis reaction. On the other hand, a high pH value also reduces the catalytic activity by promoting the deprotonation of the NH₂-terminal isoleucine and thereby disrupting the active center conformation (Kasserra and Laidler, 1969). However, using BAPNA, the catalytic activity

of the enzyme was not significantly reduced with the increase in pH value. It is possible that this substrate has greater affinity to the enzyme, sustaining its capability to bond with the active site even at high pH values. Similar results have been seen for other fish when this same substrate was used (Kurtovic et al., 2006; Klomklao et al., 2007a; Jellouli et al., 2009).

Using z-FR-MCA, the tambaqui enzyme was highly active at temperatures from 30 to 65 °C, with the greatest activity at 50 °C (Figure 2c). This is the same optimal temperature found for trypsin from a number of temperate fish, such as *Sardinops sagax caerulea* (Castillo-Yañez et al., 2005), *Alcichthys alcicornis* (Kishimura et al., 2007), *Gadus macrocephalus* and *Eleginus gracilis* (Fuchise et al., 2009). However, using BAPNA (Figure 2d), the greatest activity occurred at 70 °C. It is possible that the substrate itself provided thermostability to the enzyme, since using this same substrate, trypsin from other fish have also exhibited optimal activity at high temperatures, such as 60 °C for *Colossoma macropomum* (Bezerra et al., 2001), 60 °C for *Katsuwonus pelamis* (Klomklao et al., 2007b) and 60 °C for *Oncorhynchus tshawytscha* (Kurtovic et al., 2006).

The thermal stability of the tambaqui enzyme was similar when assayed with z-FR-MCA (Figure 2e) and BAPNA (Figure 2f). This result corroborates the hypothesis that the substrate BAPNA may help to stabilize the trypsin-like activity in higher temperatures. The enzyme maintained more than 60% of its initial activity after 3 h at 60 °C. However, the activity was reduced to 50% after 1 h at 65 °C and was completely lost after 3 h at 70 °C, possibly due to enzyme denaturation. Likewise, trypsin from other tropical fish, such as *Thunnus albacores* (Klomklao et al., 2006) and *Katsuwonus pelamis* (Klomklao et al., 2007b; Klomklao et al., 2009) are very stable at temperatures up to 60 °C, but rather unstable at temperatures higher than 70 °C. On the other hand, trypsin from the subtropical

fish *S. Pilchardus* (Bougatef et al., 2007), *S. caerulea* (Castillo-Yañez et al., 2005) and *B. capriscus* (Jellouli et al., 2009) as well as the temperate fish *S. schlegelii*, *A. alcicornis* (Kishimura et al., 2007) and *G. macrocephalus* (Fuchise et al., 2009) is stable at temperatures below 40 °C, but loses more than 80% of its activity at temperatures higher than 60 °C.

Kishimura et al. (2008) found a positive correlation between the temperature of the fish habitat and the thermal stability of trypsin. According to Gudmundsdóttir and Pálsdóttir (2005), trypsin from fish adapted to cold environments has greater catalytic efficiency and lesser thermal stability due to its molecular flexibility. On the other hand, trypsin from tropical fish is more stable due to the lesser surface hydrophilicity and stronger hydrophobic interactions in the protein center (Klomklao et al., 2007b; Klomklao et al., 2009). The stability at higher temperatures of the tambaqui enzyme may be related to thermal selection performed by the heat treatment step carried out during the purification process. This is an interesting characteristic for the detergent industry, since this type of application requires enzymes with a wide range of thermal stability for a long period of time (Moreira et al., 2002; Espósito et al., 2009a).

The effect of metal ions on the catalytic efficiency of the tambaqui enzyme was analyzed at pH 8.0 using z-FR-MCA and BAPNA (Table 2). The enzyme was strongly inhibited by Al^{+3} , Cu^{+2} , Hg^{+2} and Pb^{+2} at concentrations of 3.50 mM and Zn^{+2} and Ni^{+2} at 10 mM. Similar results have been found for trypsin from *Sardina pilchardus*, strongly inhibited by 2 mM Cu^{+2} and Zn^{+2} (Bougatef et al., 2007), *Siniperca chuatsi*, strongly inhibited by 5 mM Zn^{+2} (Lu et al., 2008) and *Pseudupeneus maculatus*, strongly inhibited by Al^{+3} , Zn^{+2} , Hg^{+2} and Cu^{+2} (Souza et al., 2007). According to Matsuo et al. (2005), soft

water fish are very susceptible to metal poisoning due to the low availability of other cations in this environment.

The ions K^+ and Na^+ had a milder inhibitory effect on the catalytic efficiency of the tambaqui trypsin at 10 mM. A slight increase in catalytic efficiency occurred in the presence of K^+ ions at concentrations of up to 5 mM. Slight inhibition in the presence of K^+ has been reported for trypsin from other fish (Souza et al., 2007). In the presence of Na^+ , a gradual decrease in tryptic activity has also observed for other fish, which may be related to an induced salting-out precipitation (Klomklao et al., 2009; Klomklao et al., 2007a). A significant increase in tambaqui trypsin activity occurred in the presence of 5 and 10 mM Ca^{+2} . This ion is known to enhance trypsin activity and protect it from autolysis, mainly in mammals (Lu et al., 2008). Many authors have shown that trypsin activity in fish may increase slightly (Lu et al., 2008; Bougateg et al., 2007) or remain the same in the presence of Ca^{+2} (Souza et al., 2007).

The effect of different proteases inhibitors on the activity of the tambaqui trypsin was also determined (Table 2). The enzyme was strongly inhibited by the trypsin inhibitors TLCK and benzamidine as well as the serine protease inhibitor PMSF. Similar results have been reported for the trypsin from other fish (Bougateg et al., 2007; Kishimura et al., 2007; Kishimura et al., 2008; Lu et al., 2008; Klomklao et al., 2009). The chelating agent EDTA and the reducing agent β -mercaptoethanol slightly inhibited the tambaqui trypsin activity, as also reported for other fish (Castillo-Yanez et al., 2005; Klomklao et al., 2006; Klomklao et al., 2007a; Kishimura et al., 2008). The inhibitors TPCK (quimotrypsin inhibitor), O-Fenantrolina (metallo-proteases inhibitor), E-64 (cystein protease inhibitor) had no significant effect on the tambaqui trypsin, as reported in the literature for other fish

(Castillo-Yanez et al., 2005; Klomklao et al., 2006; Kishimura et al., 2007; Klomklao et al., 2007a; Lu et al., 2008; Klomklao et al., 2009).

Table 3 displays the kinetic parameters, Michaelis constant (K_m), catalytic constant (k_{cat}) and catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) for the hydrolysis of two series of synthetic fluorogenic tetrapeptides. These substrates were used to determine the cleavage preferences of the tambaqui enzyme for positions P1' and P2. The nomenclature system used to indicate the position of the amino acid residue in the substrate was that formulated by Schechter and Berger (1968). Substrates hydrolysed by trypsins preferably present a lysine (K) or an arginine (R) at P1. In the present study, the HPLC analysis (data not shown) confirmed that the tambaqui enzyme cleaved only peptide bonds on the carboxyl site of arginine (R) and occasionally lysine (K), when it was available.

The tambaqui enzyme exhibited greater efficiency at hydrolyzing substrates with serine (S) and arginine (R) at P1'. Lesser affinities were found for glycine (G), valine (V), glutamine (Q), aspartic acid (D), glutamic acid (E) and proline (P) at P1'. One of the most interesting results was that the enzyme was able to hydrolyze the substrate with proline (P) at P1'. The turnover value for proline (P) at this position was low, but so was the K_m , which indicates that this enzyme is able to bind to this substrate, but does not cleave it in a rapid or efficient fashion. Although it is well reported that trypsin does not hydrolyze substrate with proline (P) at P1', a recent study has shown that it is possible for this to occur even with a commercial mammalian trypsin (Rodriguez et al., 2008). Regarding the P2 position, the tambaqui enzyme exhibited a preference for leucine (L) and lysine (K), whereas trypsin from rats (Baird et al., 2000) and cockroaches (Marana et al., 2002) exhibit very low affinities for these residues at this same position. The tambaqui trypsin also exhibited low

affinity for the substrates with glycine (G), glutamine (Q), tryptophan (W) and glutamic acid (E) at position P2.

Twenty amino acid residues (IVGGYECKAHSQPHVSLNI) were identified in the NH₂-terminal sequence of the tambaqui enzyme. In comparison to other vertebrates (Figure 3), the tambaqui exhibited greater NH₂-terminal homology to the tropical marine fish *Thunnus albacores* (Klomklao et al., 2006) and *Katsuwonus pelamis* (Klomklao et al., 2007b; Klomklao et al., 2009) as well as to the temperate fish *Sebastes schlegelii* (Kishimura et al., 2007) and the subtropical fish *Sardinops melanostictus* (Kishimura et al., 2006).

The alignment in Figure 3 indicates that the first seven NH₂-terminal amino acid residues (IVGGYEC) and the residues between positions 15 and 19 (QVSLN) are conserved in the trypsin of all vertebrates. However, in mammals, glutamic acid (E) in position 6 is replaced by a threonine (T). The conservation of the NH₂-terminal amino acid residues (isoleucine) is very important to trypsin activity, since it forms a salt bridge with the amino acid Asp-179 that promotes a molecular rearrangement, enabling the active conformation of the oxyanion hole in the trypsin (Hedstrom, 2002). Another important feature for proteins structures is the disulfide bonds. In the trypsin of vertebrates, there may be up to six bonds, one of which occurs between Cys-7 and Cys-142 (Roach et al., 1997). The conservation of a cysteine residue in position 7 is an indicator of the possible existence of a similar bond in the enzyme purified from tambaqui.

Significant differences were also found between the NH₂-terminal sequence in the tambaqui trypsin and that in other fish. In position 8, instead of the usual neutral side-chain amino acid residues, such as glutamine (Q) or threonine (T), the tambaqui enzyme exhibited a positively charged lysine (K). In position 20, while most trypsins have a serine

(S) residue, the tambaqui trypsin exhibited the apolar amino acid isoleucine (I). For the numbering applied here, the NH₂-terminal isoleucine was considered amino acid number one.

3.3 Compatibility with surfactants, oxidants and commercial detergents

As seen in previous studies, tambaqui proteases are potential additives for the laundry industry (Espósito et al., 2009a). In the present study, the stability of the tambaqui trypsin was compared to two commercial enzymes (Alcase[®] and porcine trypsin) in the presence of laundry detergents, surfactants and oxidants (Table 4). The residual activity of the tambaqui enzyme was significantly higher than that of the other enzymes when incubated for 1 h with Triton X-100 and Chaps and similar to Alcalase[®] in the presence of SDS, Tween 20 and 80. Proteases from *Bacillus* sp. are completely inhibited at concentrations of 0.3% SDS (Nascimento and Martins, 2006) and trypsin from the fish *Balistes capriscus* retains only 23.8% of its initial activity after 1 h of incubation at 40 °C with 0.5% SDS (Jellouli et al., 2009). It is likely that temperatures as high as 40 °C affect the stability of these enzymes in the presence of SDS. Hydrogen peroxide at concentrations ranging from 5 to 15% significantly increased the activity of the three enzymes tested. The same has not been observed for *Colossoma macropomum* (Espósito et al. 2009a) and *Cyprinus carpio* (Espósito et al. 2009b). In the presence of laundry detergents (Table 4), Alcalase[®] and the enzyme from tambaqui demonstrated considerable stability, whereas the porcine trypsin was completely denatured. Similar positive results have been found for trypsin from the fish *Balistes capriscus* subjugated to the same conditions for 1 h at 40 °C (Jellouli et al., 2009).

According to Mei & Jiang (2005), studies have been extensively carried out with alkaline proteases from microorganisms. However, very few published reports are available

on the compatibility of alkaline proteases with detergent ingredients. Studies on the use of fish enzymes as possible detergent additives are still very new, but have been achieving promising results (Espósito et al., 2009a; Espósito et al., 2009b). The interesting properties of the tambaqui enzyme make it an attractive biotechnological product with potential applicability in the detergent and food industries.

4. Conclusions

The NH₂-terminal sequence alignment, inhibition results and molecular weight indicate that the enzyme purified from tambaqui in this study is a trypsin-like enzyme. Moreover, the results regarding the stability of this enzyme in the presence surfactants, oxidizing agents and commercial detergents, combined with those of thermostability and pH range, ensures the possibility of the application of this enzyme as a detergent additive.

Acknowledgements

This study received funding from the Brazilian fostering agencies MPA, CNPq, FINEP, UFPE/FACEPE and PETROBRAS.

5. References

- Almeida, L.C., Lundstedt, L.M., Moraes, G., 2006. Digestive enzyme responses of tambaqui (*Colossoma macropomum*) fed on different levels of protein and lipid. *Aquaculture Nutrition* **12** (2006), pp. 443–450.
- Anwar, A., Saleemuddin, M., 1998. Alkaline peptidases: a review. *Bioresource Technology* **64** (1998), pp. 175-183.

Baird, T., Wang, B, Lodder, M., Hecht, S.M., Craik, C.S., 2000. Generation of active trypsin by chemical cleavage. *Tetrahedron* **56** (2000), pp. 9477-9485.

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

Bezerra, R.S., Santos, J.F., Paiva, P.M.G., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., Vieira, V.L.A., Carvalho Jr, L.B., 2001. Partial purification and characterization of a thermostable trypsin from pyloric caeca of tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Journal of Food Biochemistry* **25**(3) (2001), pp. 199-210.

Bezerra, R.S., Lins, E.J.F., Alencar, R.B., Paiva, P.M.G., Chaves, M.E.C., Coelho, L.C.B.B., Carvalho Júnior, L.B., 2005. Alkaline proteínase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Process Biochemistry* **40** (2005), pp. 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** (2007), pp. 343-350.

Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Analytical Biochemistry* **72** (1976), pp. 248.

Castillo-Yañez, F.J., Pacheco-Aguilar, R, García-Carreño, F.L., Navarrete-Del Toro, M.A., 2005. Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine *Sardinops sagax caerulea*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* **140** (2005), pp. 91-98.

- Espósito, T.S., Amaral, I.P.G., Buarque, D.S., Oliveira, G.B., Carvalho Jr., L.B., Bezerra, R.S., 2009a. Fish processing waste as a source of alkaline proteases for laundry detergent. *Food Chemistry* **112** (2009), pp. 125-130.
- Espósito, T.S.; Amaral, I.P.G.; Marcuschi, M.; Carvalho Jr.; Bezerra, R.S. 2009b. Surfactants- and oxidants-resistant alkaline proteases from common carp (*Cyprinus carpio* L) processing waste. *Journal of Food Biochemistry* **33** (2009), pp. 821-834.
- 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** (2009), pp. 611-616.
- Gudmundsdóttir, A., Pálsdóttir, H.M., 2005. Atlantic cod trypsins: from basic research to practical applications. *Marine biotechnology* **7** (2005), pp. 77-88.
- Hedstrom, L., 2002. Serine protease mechanism and specificity. *Chemical Reviews* **102** (2002), pp. 4501-4523.
- Jellouli, K., Bougatef, A., Daassi, D., Balti, R., Barkia, A., Nasri, M., 2009. New alkaline trypsin from the intestine of grey triggerfish (*Balistes caprisacus*) with high activity at low temperature: purification and characterisation. *Food Chemistry* **116** (2009), pp. 644-650.
- Kasserra, H.P., Laidler, K.J., 1969. Mechanisms of action of trypsin and chymotrypsin. *Canadian Journal of Chemistry* **47** (1969), pp. 4031-4039.
- Kapoor, B.G.; Smit, H.; Verighina, I.A., 1975. The alimentary canal and digestion in teleosts. *Advancens in marine biology* **13** (1975), pp. 109-239.
- Kishimura, H., Hayashi, K., Miyashita, Y., Nonami, Y., 2006. Characteristics of trypsins from the viscera of true sardine (*Sardinops melanostictus*) and the pyloric ceca of arabesque greenling (*Pleuroprammus azonus*). *Food Chemistry* **97** (2006), pp. 65-70.

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

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

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

Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura H., Simpson, B.K., 2007a. Trypsin from the pyloric caeca of bluefish (*Pomatomus saltatrix*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* **148** (2007), pp. 382-389.

Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., 2007b. Purification and characterisation of trypsins from the spleen of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Food Chemistry* **100** (2007), pp. 1580-1589.

Klomklao, S., Kishimura, H., Nonami, Y., Benjakul, S., 2009. Biochemical properties of two isoforms of trypsin purified from the Intestine of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Food Chemistry* **115** (2009), pp. 155-162.

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

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

Leatherbarrow, R.J., 2001. Grafit. Erithacus Software Limited.

- Lu, B.J, Zhou, L.G., Cai, Q.F., Hara, K., Maeda, A., Su, W.J., Cao, M.J., 2008. Purification and characterisation of trypsins from the pyloric caeca of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*). *Food Chemistry* **110** (2008), pp. 352-360.
- Marana, S.R., Lopes, A.R., Juliano, L., Juliano, M.A., Ferreira, C., Terra, W.R., 2002. Subsites of trypsin active site favor catalysis or substrate binding. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **290** (2002), pp. 494-497.
- Matsuo, A.Y.O., Wood, C.M., Val, A.L., 2005. Effects of copper and cadmium on ion transport and gill metal binding in the Amazonian teleost tambaqui (*Colossoma macropomum*) in extremely soft water. *Aquatic Toxicology* **74** (2005), pp. 351-364.
- Maurer, K.H., 2004. Detergent proteases. *Current Opinion in Biotechnology* **15** (2004), pp. 330-334.
- Mei, C.; Jiang, X., 2005. A novel surfactant- and oxidation-stable alkaline protease from *Vibrio metschnikovii* DL 33–51. *Process Biochemistry* **40** (2005), pp. 2167–2172.
- Moreira, K.A., Albuquerque, B.F., Teixeira, M.F.S., Porto, A.L.F., Lima Filho, J.L., 2002. Application of protease from *Nocardiosis* sp. as a laundry detergent additive. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **18** (2002), pp. 307-312.
- Nascimento, W.C.A.; Martins, M.L.L., 2006. Studies on the stability of protease from *Bacillus* sp. and its compatibility with commercial detergent. *Brazilian Journal of Microbiology* **37** (2006), pp. 307-311.
- Norioka, S., Sakiyama, F., 2004. Trypsin. In: Barrett, A. J., Rawlings, N. D., Woessner, J.F. (Eds). Handbook of Proteolytic Enzymes. *Academic Press*, London,. 2nd edition, (2004) pp. 1483-1488.

Rawlings, N.D., Morton, F.R., Barrett, A.J., 2007. An Introduction to Peptidases and the *Merops* Database. In: Polaina, J. and MacCabe, A.P (editores). *Industrial Enzymes: Structure, Function and Application*. Springer 1st edition. pp. 161-179

Roach, J.C., Wang, K., Gan, L., Hood, L., 1997. The molecular evolution of the vertebrate trypsinogens. *Journal of Molecular Evolution* **45** (1997), pp. 640-652.

Rodriguez, J., Gupta, N., Smith, R.D., Pevzner, P.A., 2008. Does trypsin cut before proline? *Journal of Proteome Research* **7**(1) (2008), pp. 300-305.

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** (2007), pp. 1429-1434.

Wolfgang, A., 2004. Enzymes in Household Detergents. In: *Enzymes in Industry*. 3rd edition, Wiley-VCh. (2004), pp. 154-180.

Figure Captions

Figure 1: Molecular mass of the purified trypsin-like enzyme from the tambaqui; SDS-PAGE of the purified trypsin-like enzyme from the tambaqui; Line 1 - Pattern of standard proteins bands; Line 2 - Final purification step (affinity chromatography), showing a single band of 27.5 *kDa* (A); Mass spectrum from the purified enzyme, comprising of two main peaks – one with 24 *kDa* and the other with half this value (12 *kDa*) (B)

Figure 2: Physicochemical characterization of the trypsin-like enzyme from the tambaqui using z-FR-MCA and BAPNA as substrates: Effect of pH on second-order kinetic parameters (k_{cat}/K_m) using z-FR-MCA as substrate (A); Effect of pH on activity using BAPNA as substrate (B); Effect of temperature on second-order kinetic parameters (k_{cat}/K_m) using z-FR-MCA as substrate (C); Effect of temperature on activity using BAPNA as substrate (D); Thermal stability at temperature of 40 °C (■), 55 °C (○), 60 °C (△), 65 °C (●), 70 °C (▲) for 3 hours (E); Activity measured at 25 °C using z-FR-MCA as substrate; Thermal stability at temperatures of 4 °C (□), 30 °C (◇), 40 °C (■), 50 °C (✱), 60 °C (△), 70 °C (▲) for 3 hours (F); Activity measured at 25 °C using BAPNA as substrate

Figure 3: Alignment of the NH₂-terminal amino acid sequence in the trypsin-like enzyme from the tambaqui (*Colossoma macropomum*) as determined by Edman degradation and sequences from other vertebrates; For comparison, the dots represents the amino acid residues that are identical to the query sequence (tambaqui trypsin) and letters indicate the different residues

Tables

Table 1: Purification steps of trypsin-like enzyme from the pyloric caecum of the tambaqui; Activities were determined using 0.6mM BAPNA as substrate at 25 °C in 100 mM Tris-HCl pH 8.0

Sample	Total protein (mg)	Total Enzyme activity (U mL ⁻¹)	Specific enzyme activity (U mL ⁻¹ mg ⁻¹)	Yield (%)	Purification
Crude extract	33.63	205.13	6.10	100.00	1.00
Step 1 – Heat treatment					
Heated Crude extract	24.51	287.74	11.74	140.27	1.92
Step 2 - Ammonium sulphate precipitation					
F1 - (NH ₄) ₂ SO ₄ (0-30%)	1.81	10.75	5.94	5.24	0.97
F2 - (NH ₄) ₂ SO ₄ (30-60%)	14.60	179.95	12.33	87.73	2.02
F3 - (NH ₄) ₂ SO ₄ (Final supernatant)	7.27	16.96	2.33	8.27	0.38
Step 3 - Size exclusion chromatography					
Sephadex [®] G-75	1.23	73.63	59.92	35.89	9.82
Step 4 - Affinity chromatography					
Benzamidine -agarose	0.04	80.15	2262.96	39.07	371.04

Table 2: Effect of ions and synthetic inhibitors on the trypsin-like enzyme from the tambaqui using 10 nM z-FR-MCA and 0.6 mM BAPNA as substrate at 25 °C in 100 mM Tris-HCl pH 8.0

IONS				
Ions	Residual activity (%)		Residual k_{cat}/K_m (%)	
	BAPNA		z-FR-MCA	
	3.50 mM		5.00 mM	10.00 mM
Al⁺³	0.00 ±0.00		NT*	NT*
Cu⁺²	1.81 ±0.31		59.43 ±0.28	32.00 ±0.06
Hg⁺²	3.80 ±0.00		NT*	NT*
Pb⁺²	26.23 ±2.31		NT*	NT*
Zn⁺²	36.63 ±4.71		35.43 ±0.07	29.71 ±0.57
Ni⁺²	NT*		45.71 ±0.09	34.29 ±0.23
Cd⁺²	48.39 ±1.85		NT*	NT*
Mn⁺²	76.70 ±4.29		NT*	NT*
Mg⁺²	76.15 ±5.91		82.29 ±0.60	92.00 ±2.86
Ba⁺²	73.94 ±10.17		NT*	NT*
Ca⁺²	76.88 ±2.51		162.86 ±0.34	140.00 ±0.32
Na⁺	NT*		91.43 ±0.58	78.57±1.31
KI⁺	NT*		110.86 ±3.43	62.86 ±1.14

INHIBITORS				
Inhibitors	Concentration	Residual activity (%)		
		BAPNA	z-FR-MCA	
TLCK	1 mM	0.00 ±0.10	100 µM	10.04% ± 0.09
Benzamidine	1 mM	1.05 ±1.24	NT*	NT*
PMSF	1 mM	14.55 ±1.47	1mM	27.20% ± 3.41
EDTA	NT*	NT*	10 mM	82.97% ± 4.31
β-mercaptoethanol	1 mM	86.09 ±1.41	NT*	NT*
TPCK	1 mM	96.29 ±1.64	100 µM	113.58% ± 5.31
E-64	NT*	NT*	10 µM	102.99% ± 2.85
O-Fenantroline	NT*	NT*	10 µM	110.69% ± 9.18

*NT – Not tested

Table 3: Kinetic parameters from the hydrolysis of two series of synthetic fluorogenic peptide substrates by trypsin-like enzyme from the tambaqui – Abz-RXFK-EDDnp (X represents P1') and Abz-XR↓FK-EDDnp (X represents P2); Activities were assayed for 120 seconds at 25 °C in 100 mM Tris-HCl pH 8.0 with a final substrate concentration ranging from 0.25 to 20.00 μM.

Abz-R↓XFK-Eddnp				Abz-XR↓FK-Eddnp			
Substrate	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (μM ⁻¹ s ⁻¹)	Substrate	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (μM ⁻¹ s ⁻¹)
RGFK	9.15	15.94	0.57	GRFK	31.94	16.30	1.960
RVFK	4.59	18.31	0.25	VRFK	46.57	2.87	16.22
RPFK	0.10	3.10	0.03	FRFK	8.87	0.53	16.68
RSFK	16.63	1.03	16.30	LRFK	53.23	1.01	52.60
RYFK	10.65	1.66	6.40	YRFK	27.72	5.57	4.98
RNFK	16.63	4.93	3.38	NRFK	30.61	7.44	4.12
RQFK	13.31	7.38	1.80	QRFK	12.64	8.93	1.42
RDFK	2.33	8.08	0.29	WRFK	6.32	3.26	1.94
REFK	7.49	12.89	0.58	ERFK	17.30	6.86	2.52
RRFK	26.61	1.69	16.46	KRFK	53.23	0.58	91.58
RHFK	8.32	1.85	4.49	HRFK	21.07	6.76	3.11
RTFK	18.30	3.25	5.63				

Table 4: Stability of Alcalase[®] from Novozymes[®], Commercial Porcine trypsin from Sigma[®] and trypsin-like enzyme from the tambaqui in the presence of commercial laundry detergents, surfactants and H₂O₂ for 60 min at 25 °C using the chromogenic substrate azocasein

Effectors	Alcalase[®] (%)	Porcine trypsin (%)	Tambaqui trypsin (%)
Commercial Detergent			
(7 mg/mL)			
Omo multi ação [®]	80.41 ± 3.50	0.00 ± 4.08	76.80 ± 0.73
Bem-te-vi [®]	92.27 ± 1.31	13.07 ± 5.55	89.86 ± 0.73
Minerva [®]	66.19 ± 2.70	0.00 ± 6.30	102.58 ± 3.64
Ala [®]	88.87 ± 2.23	0.00 ± 1.96	93.47 ± 4.37
Surfactants (1%)			
Triton X-100	101.85 ± 3.55	71.06 ± 2.59	125.78 ± 0.53
SDS	109.60 ± 3.14	82.09 ± 2.17	107.71 ± 0.43
Tween 20	111.27 ± 5.61	101.73 ± 3.42	129.75 ± 0.64
Tween 80	113.12 ± 4.28	102.08 ± 2.82	116.18 ± 0.36
Chaps	69.10 ± 4.01	99.43 ± 1.59	120.87 ± 0.42
Hidrogen Peroxide			
5%	134.63 ± 2.00	111.03 ± 3.47	121.67 ± 0.20
10%	138.11 ± 2.35	129.58 ± 3.34	130.8 ± 4.73
15%	177.46 ± 6.22	144.61 ± 3.20	138.3 ± 4.78

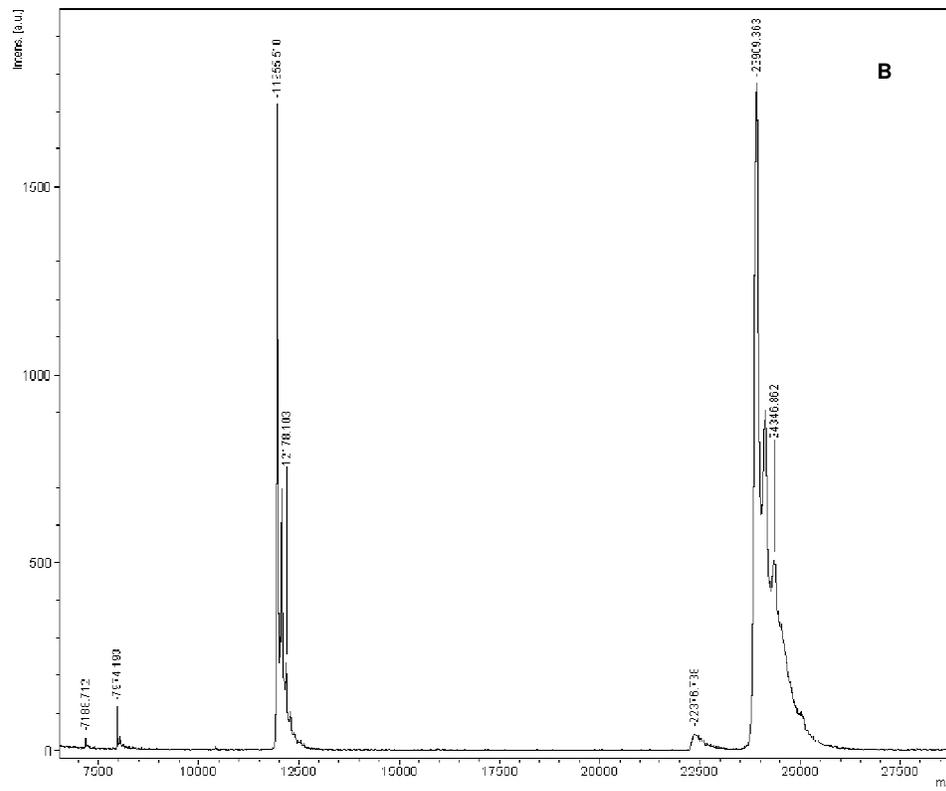
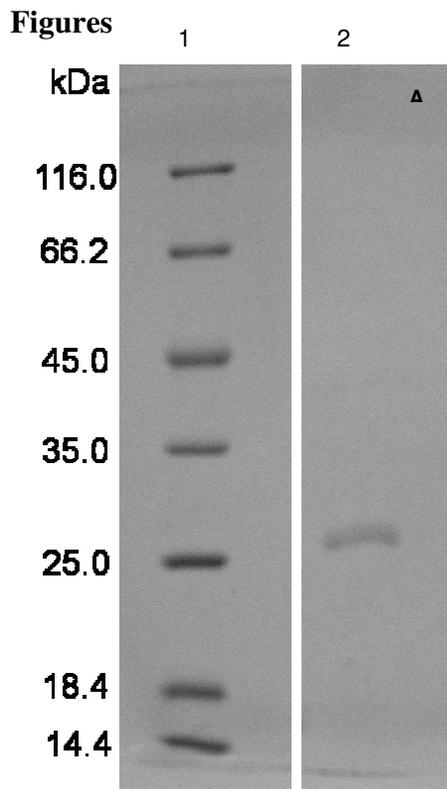


Figure 1A and B

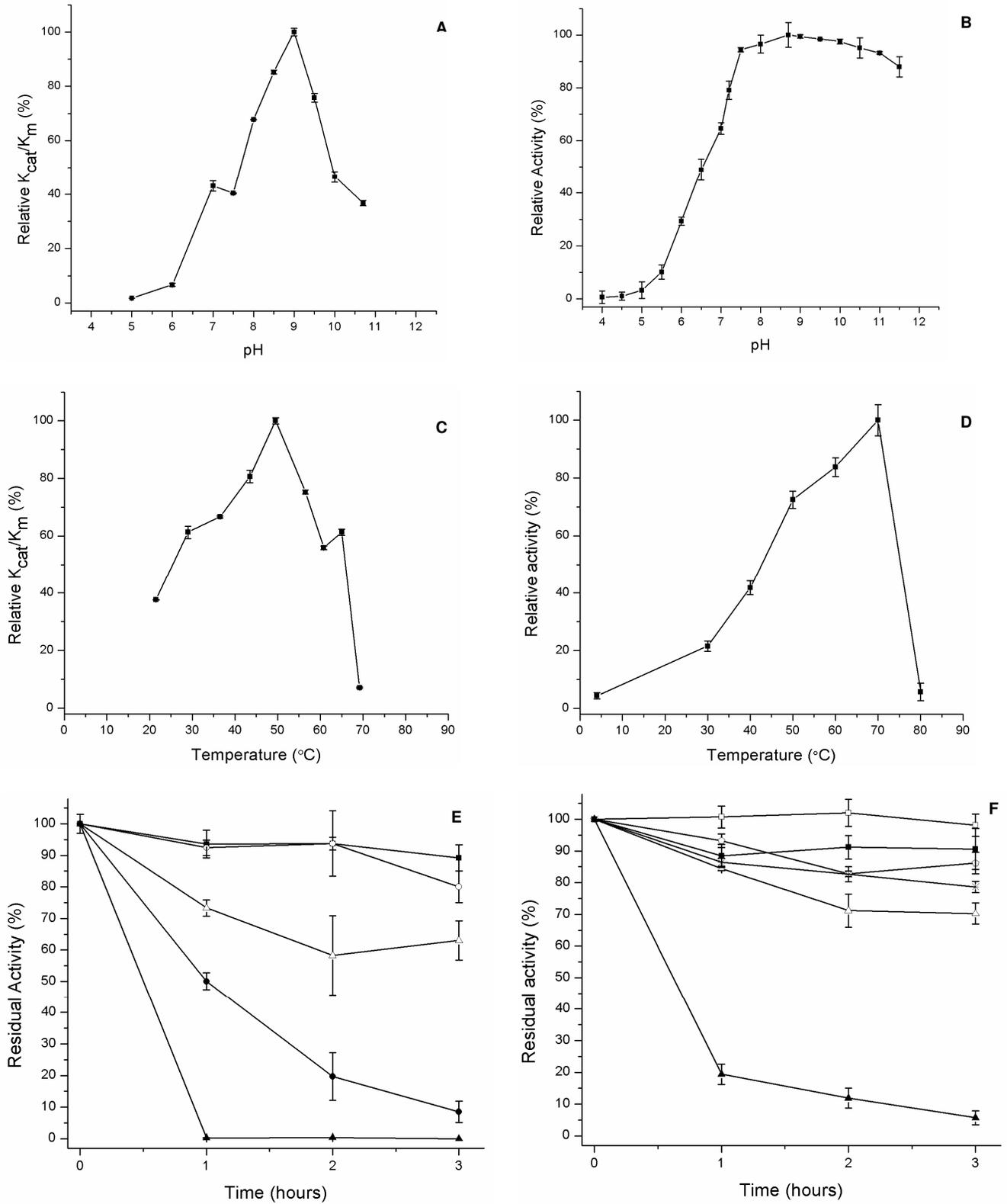


Figure 2 A, B, C, D, E and F

Species	10	20	Reference
<i>Colossoma macropomum</i>	I VGGY ECKAHS QPHQVSLN I		Present work
<i>Thunnus albacores A</i> Q	A	Klomklao et al , 2006
<i>Katsuwonus pelamis A</i> Q	S	Klomklao et al , 2007b
<i>Thunnus albacores B</i> Q P	A	Klomklao et al , 2006
<i>Katsuwonus pelamis B</i> Q P	A	Klomklao et al , 2009
<i>Katsuwonus pelamis C</i> Q P	S	Klomklao et al , 2009
<i>Sebastes schlegelii</i> P Y	S	Kishimura et al , 2007
<i>Sardinops melanostictus</i> Y W	S	Kishimura et al , 2006
<i>Gadus macrocephalus</i> T R A	S	Fuchise et al , 2009
<i>Eleginus gracilis</i> P R A	S	Fuchise et al , 2009
<i>Alicichthys alcicornis</i> T P A	S	Kishimura et al , 2007
<i>Theragra chalcogramma</i> T K A	S	Kishimura et al , 2008
<i>Pomatomus saltatrix</i> P K . A . V	L	Klomklao et al , 2007a
<i>Pleuroprammus azonus</i> T P . T . A	S	Kishimura et al , 2006
<i>Balistes caprisucus</i> T P N . T		Jellouli et al , 2009
<i>Sardina pilchardus</i> Q K Y . .		Bougatef et al , 2007
<i>Porcine</i> T . A . N . V . Y	S	Roach et al , 1997
<i>Bos taurus</i> T . A E N . V . Y	A	Huerou et al ,1990
<i>Homo sapiens</i> T . E E N . V . Y	S	Roach et al , 1997

Figure 3

6. CONCLUSÃO

Visto que a enzima purificada apresentou: (1) capacidade de hidrolisar substratos cromogênicos específicos para tripsinas e especificidade pelo aminoácido arginina (R) na posição P1 de substratos fluorogênicos; (2) atividade proteolítica inibida por inibidores específicos de serino peptidases e de tripina; e (3) sequência de aminoácidos NH₂-terminal com resíduos de aminoácidos extremamente conservados de tripsina, é possível se afirmar que a enzima purificada dos cecos pilóricos do tambaqui, no presente trabalho, é uma tripsina-símile.

A caracterização desta tripsina-símile tanto com substratos cromogênicos, quanto fluorescentes também demonstrou que ela é termoestável, mantém sua atividade máxima em uma ampla faixa de pH alcalino e é resistente a altas concentrações de íons, como Mn⁺², Mg⁺², Ba⁺², Ca⁺², Na⁺, K⁺, porém sensível a outros, como Al⁺³, Cu⁺², Hg⁺², Pb⁺², Zn⁺² e Ni⁺².

Adicionalmente, esta tripsina revelou-se como sendo bastante compatível com os detergentes, tenso-ativos e oxidantes estudados, indicando assim a sua aplicabilidade industrial em potencial.

7. ANEXOS

I. Instruções de autores do periódico do trabalho

Short Overview

When submitting a manuscript to the journal, authors must choose one or more classifications that best describe their manuscript. A list of classifications can be found [here](#)

Submission of papers: Papers from all over the World: Please use Elsevier's online submission system to submit to the journal. The direct link is <http://ees.elsevier.com/bite/>. Authors may choose among Dr. Ashok Pandey, Dr. Christian Larroche and Dr. Steve Ricke

Covering letter to the editor: When submitting the manuscript, it is mandatory to include a covering letter to the editor. The covering letter must state:

- (1) Subject Classification selected from the list (see guide for authors).
- (2) That all the authors mutually agree that it should be submitted to BITE.
- (3) It is the original work of the authors.
- (4) That the manuscript was not previously submitted to BITE.
- (5) State the novelty in results/ findings, or significance of results.

Submission language: English (Link to the Oxford English Dictionary <http://dictionary.oed.com/entrance.dtl>)

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.

Types of contributions: Original research papers, review articles, case studies, short communications, book reviews.

Review articles would be generally solicited by the editors from the experts. However, these can be contributed by others also. In this case, authors must consult the editor with an extended summary and outline before preparing the article.

Corresponding author: Clearly indicate who is responsible for correspondence at all stages of refereeing and publication, including post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.** Full postal addresses must be given for all co-authors. Please consult a recent journal paper for style if possible.

Original material: Submission of an article implies that the work described 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 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.

Editor's requirements: Nucleotide or protein sequences should be deposited in a publicly available database such as Genbank or EMBL before a manuscript is submitted for review in the journal. Accession numbers must be obtained and included in the manuscript before it is fully accepted for publication by the editor. **Detailed instructions on manuscript preparation and artwork instructions can be found below. The editor reserves the**

right to return manuscripts that do not conform to the instructions for manuscript preparation and artwork instruction, as well as paper that do not fit the scope of the journal, prior to refereeing. If at the time you submit your manuscript for review to *Bioresource Technology*, you also have other manuscripts in review (with other journals) that are similar to, or are pertinent to your *Bioresource Technology* manuscript, please send a copy of these manuscripts to the relevant handling editor, so that they may be able to conduct a full review on your *Bioresource Technology* manuscript. Manuscript Preparation:

General: Authors must follow guide for authors strictly, failing which the manuscripts would be rejected without review. Editors reserve the right to adjust the style to certain standards of uniformity. Please use Word, Word Perfect or LaTeX files for the text of your manuscript. (For further information about LaTeX submission, please go to <http://www.elsevier.com/locate/latex>.)

Structure: Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, Figure Captions, Tables and Figures. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be avoided. Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article and do not include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise.

Text Layout: Use double spacing and wide (3 cm) margins on white paper. (Avoid full justification, i.e., do not use a constant right-hand margin.) Ensure that each new paragraph is clearly indicated. Present tables and figure legends on separate pages at the end of the

manuscript. If possible, consult a recent issue of the journal to become familiar with layout and conventions. Number all pages consecutively, use 12 pt font size and standard fonts.

Page length: Maximum page length should be 12, 35 and 40 pages for Short Communication, Original article/case study and review paper, including text, references, tables and figures. Each figure and table must be put separately on a single page.

Corresponding author: Clearly indicate who is responsible for correspondence at all stages of refereeing and publication, including post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.** Full postal addresses must be given for all co-authors. Please consult a recent journal paper for style if possible.

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

Keywords: Immediately after the abstract, provide a maximum of five keywords (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible.

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 not be readily understood by an international readership, units should be put in full.

Units: Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). 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' is ambiguous and must not be used.

Maths: Authors should make clear any symbols (e.g. Greek characters, vectors, etc.) which may be confused with ordinary letters or characters. Duplicated use of symbols should be avoided where this may be misleading. Symbols should be defined as they arise in the text and separate Nomenclature should also be supplied.

References: All publications cited in the text should be presented in a list of references (maximum 20, 35 and 75 references for short communication, original research paper/case study and review papers, respectively) following the text of the manuscript.

Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by '*et al*' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer *et al* (2000) have recently shown"

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication: Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000.

The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51-59.

Reference to a book: Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book: Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

Colour Costs and Queries: For colour illustrations, a colour printing fee is charged to the author per colour unit. Further information concerning colour illustrations and costs is available from Author Support at authorsupport@elsevier.ie, and at <http://authors.elsevier.com/locate/authorartwork>.

FREE ONLINE COLOUR If, together with your accepted article, you submit usable colour and black/white 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. 'Usable' means the formats comply with our instructions. See the information about Illustrations at <http://authors.elsevier.com/locate/authorartwork>. For colour illustrations in the print journal see Colour Costs above.

Tables: Tables should be numbered consecutively and given suitable captions and each table should begin on a new page. No vertical rules should be used. Tables should not duplicate results presented elsewhere in the manuscript (for example, in graphs). Footnotes to tables should be typed below the table and should be referred to by superscript lowercase letters. Note that the maximum number of figures allowed for Original article, case study, and review papers is 6.

Figures: Please make sure that figure files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these

figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Note that the maximum number of figures allowed for Original article, case study, and review papers is 6. Multiple figures can be expressed as one figure (for e.g. 1a, 1b, 1c etc...), while retaining the maximum limit of 6.

Conclusions: State here the inferences drawn from the results, preferably in running text form, in maximum 100 words. No results should be given here.

Electronic Annexes: We strongly encourage you to submit electronic annexes, such as short videos, computer-enhanced images, audio clips and large databases. Please refer to the Artwork Instructions (Multimedia files) at <http://authors.elsevier.com/locate/authorartwork> for details on file types to be used. If you are submitting on hardcopy, please supply 3 disks/CD ROMs containing the electronic annex to the editor for review. In the text of your article you may wish to refer to the annex. This is not mandatory, however, if you do wish to refer to the annex in the text then please do so using this example: "?see Electronic Annex 1 in the online version of this article." Production will insert the relevant URL at the typesetting stage after this statement.

Notification: Authors will be notified of the acceptance of their paper by the editor. The Publisher will also send a notification of receipt of the paper in production.

Copyright: All authors must sign the Transfer of Copyright agreement before the article can be published. This transfer agreement enables Elsevier to protect the copyrighted material for the authors, but does not relinquish the authors' proprietary rights. The copyright transfer covers the exclusive rights to reproduce and distribute the article, including reprints, photographic reproductions, microfilm or any other reproductions of similar nature and translations. Authors are responsible for obtaining from the copyright holder permission to reproduce any figures for which copyright exists.

For more information please go to our copyright page <http://www.elsevier.com/copyright>

PDF Proofs:

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author, to be checked for typesetting/editing. The corrections should be returned within 48 hours. No changes in, or additions to, the accepted (and subsequently edited) manuscript will be allowed at this stage. Proofreading is solely the author's responsibility. Any queries should be answered in full. Please correct factual errors only, or errors introduced by typesetting.

For more information on proofreading please go to our proofreading page <http://authors.elsevier.com/quickguide>. Please note that once your paper has been proofed we publish the identical paper online as in print.

Author Benefits:

No page charges: Publication in this journal is free of charge.

Free 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.

Author discount: Contributors to Elsevier journals are entitled to a 30% discount on all Elsevier books. See <http://www.elsevier.com/homepage/booksbutler> for more information.

Online Paper Tracking: Authors can track the status of their accepted paper online at <http://authors.elsevier.com> using the reference supplied by the Publisher.