



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ESPECIFICIDADE AO SUBSTRATO DE
UMA TRIPSINA-SÍMILE DA TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)**

LIDIANE CRISTINA PINHO NASCIMENTO

RECIFE

2016

LIDIANE CRISTINA PINHO NASCIMENTO

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ESPECIFICIDADE AO SUBSTRATO DE
UMA TRIPSINA-SÍMILE DA TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)**

Dissertação apresentada para o cumprimento
parcial das exigências para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade
Federal de Pernambuco

Orientador: Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra (UFPE)

Co-orientadora: Dra. Marina Marcuschi (UFPE)

RECIFE

2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Nascimento, Lidiane Cristina Pinho

Caracterização bioquímica e especificidade ao substrato de uma tripsina-símile da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) / Lidiane Cristina Pinho Nascimento – Recife: O Autor, 2016.

73 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Ranilson de Souza Bezerra

Coorientadora: Marina Marcuschi

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Ciências Biológicas, 2016.

Inclui referências, apêndice e anexos

- 1. Enzimas proteolíticas 2. Tilápia (peixe) 3. Biotecnologia-indústria I. Bezerra, Ranilson de Souza (orientador) II. Marcuschi, Marina (coorientadora) IV. Título**

572.76

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-109

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ESPECIFICIDADE AO SUBSTRATO DE
UMA TRIPSINA-SÍMILE DA TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)**

Dissertação apresentada para o cumprimento
parcial das exigências para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade
Federal de Pernambuco

Data de aprovação: 24/02/2016

Banca examinadora:

Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra
(Universidade Federal de Pernambuco, UFPE)

Prof. Dr. Vitor Oliveira
(Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP)

Prof. Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral
(Universidade Federal da Paraíba, UFPB)

Dedico esta dissertação a minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por todas as bênçãos que alcancei por Suas mãos. Sem Ele e sem a intercessão da Virgem Maria eu não teria chegado tão longe.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Ao Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra que aceitou orientar-me, sempre acreditando no meu trabalho e me incentivando na pesquisa. Além de inspirar a todos do Laboratório de Enzimologia a se tornarem grandes profissionais, com humildade e empatia.

À Dra. Marina Marcuschi que sempre me apoiou em minhas decisões e me ajudou, pacientemente, a entender um pouco mais sobre a bioquímica. Agradeço por me acompanhar desde a graduação e desejo um dia ser ao menos um terço da pessoa e profissional que é.

À minha família, que é tudo para mim e que fazem a minha vida mais feliz. Agradeço por todo apoio e força que me dão em minhas escolhas. Em especial, agradeço a minha mãe, que é um presente de Deus na minha vida, que me inspira a ser alguém melhor a cada dia e que está sempre ao meu lado, com muito carinho e paciência.

Aos meus amigos que compartilharam comigo todas as alegrias e tristezas ao longo desta caminhada. Em especial aos amigos que fiz no Laboratório de Enzimologia que sempre me ajudaram e me apoiaram na realização dos meus experimentos, além dos momentos de descontração nas horas vagas: Raquel Pereira, Milena Márcia, Janilson Felix, Flávia Thuane, Andreia Cybelle, Rafael David, Nathalia Roberto, Thiago Cahú, Paula Rayane, Douglas Andrade, Amália Medeiros, Fábio Marcel, Robson Coelho, Renata Nascimento, Werlayne Mendes, Juliett Xavier, Kelma Souza, Vagne Oliveira, Karollina Lopes, Luís Lino, Lilliane Moreira, Kívia Falcão, Célio Henrique, Juliana Santos entre outros.

Ao prof. Dr. Vitor de Oliveira que aceitou gentilmente me orientar na minha passagem em seu laboratório no Departamento de Biofísica na UNIFESP, e não mediu esforços e tempo para auxiliar-me na pesquisa. Além de todos os colegas que fiz em São Paulo, que me auxiliaram nas atividades e a amenizar a saudade de casa: Felipe Bronze, Marcelo Yudi, Sarah Maluf, Alyne Marem, Caio Andreatta, Taíse Ferrara, Raquel Leão, Gabrielly Denadai, e Pollyana Saud.

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.”

Isaac Newton

RESUMO

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é um dos peixes mais importantes para a aquicultura brasileira, apresentando-se como o mais cultivado no país. Suas vísceras têm sido estudadas para obtenção de biomoléculas, especialmente as proteases digestivas que apresentam alta eficiência catalítica e estabilidade em diferentes condições. Dentre as proteases digestivas da tilápia do Nilo, destaca-se a tripsina, que apresenta características favoráveis a sua aplicação na área biotecnológica e industrial. Com o propósito de ampliar o conhecimento acerca desta enzima, o presente trabalho objetivou purificar e caracterizar bioquimicamente uma tripsina-símile do intestino de *O. niloticus*. A purificação da enzima foi realizada seguindo quatro etapas: aquecimento a 45 °C, fracionamento com sulfato de amônio e cromatografias de exclusão molecular e afinidade. A pureza da tripsina foi verificada através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e o peso molecular de 23,9 kDa foi confirmado a partir da espectrometria de massa (MALDI-TOF). A atividade da enzima foi testada na presença de inibidores específicos para proteases, com forte inibição de sua atividade por TLCK e PMSF. Ademais, a tripsina da tilápia apresentou atividade em ampla faixa de pH (7,0 a 12,0) e manteve-se ativa a altas temperaturas, conservando sua atividade até 60 °C. O íon cálcio e o polietilenoglicol (PEG), em diferentes concentrações, apresentaram efeito ativador da enzima. A tripsina manteve atividade residual acima de 70 % na presença de surfactantes (Tween 20, Triton x-100, Triton X-450 e saponina), exceto na presença de SDS, que foi responsável por uma redução acima de 50% na atividade da enzima. A tripsina-símile da tilápia apresentou eficiência na hidrólise de substratos com asparaginina (N) e treonina (T) na posição P₁' e isoleucina (I), leucina (L) e ácido aspártico (D) na posição P₂. Considerando os resultados, foi possível verificar o potencial da tripsina da tilápia do Nilo para aplicações industriais e biotecnológicas, que necessitem da presença de agentes surfactantes, íons e ampla faixa de pH e temperaturas.

Palavras chave: Termoestabilidade, íon cálcio, surfactantes, protease alcalina.

ABSTRACT

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is the most farmed fish in Brazil. Its viscera had been studied to obtain biomolecules, mainly digestive proteases which present high catalytic efficiency and stability at different conditions. Among Nile tilapia digestive proteases, with emphasis to a trypsin, which shows favorable characteristics for its biotechnological and industrial application. In order to increase the knowledge about this enzyme, the present work aimed to purify and characterize biochemically a trypsin-like from *O. niloticus* intestine. The enzyme purification was carried out following four-step: heating at 45 °C, ammonium sulphate fractionation and size exclusion and affinity chromatography. Trypsin purity was checked by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and the molecular weight of 23.9 kDa was confirmed by mass spectrometry (MALDI-TOF). The enzyme activity was tested on the presence of specific protease inhibitors, with stronger inhibition by TLCK and PMSF. Furthermore, tilapia's trypsin showed activity in a wide pH range (7.0 to 12.0) and high temperatures, keeping its activity until 60 °C. Calcium ion and polyethylene glycol (PEG), at different concentrations presented activator effect on the enzyme. The trypsin kept over 70 % of its activity in surfactants (Tween 20, Triton x-100, Triton X-450 and saponin). SDS was an exception, since it diminished the enzyme activity below 50 %. Moreover, trypsin-like from tilapia showed efficiency by hydrolyzing substrates presenting asparagine (N) and treonine (T) residues at P₁' position and isoleucine (I), leucine (L) and aspartic acid (D) at P₂ position. Considering these results, it was possible to determine the potential of Nile tilapia trypsin to industrial and biotechnological applications that require surfactants agents and ion presence, wide pH range and high temperature.

Keywords: Thermo stability, calcium ion, surfactants, alkaline proteases.

Lista de ilustrações

Revisão bibliográfica

	Página
Figura 1. Crescimento da produção aquícola mundial nas últimas cinco décadas (FAO, 2014).	17
Figura 2. Produção de pescado (t) nacional em 2010 e 2011 discriminada por região (MPA, 2013).	18
Figura 3. Esquema dos principais produtos que podem ser obtidos do processamento do pescado (BLANCO <i>et al.</i> , 2007).	19
Figura 4. Espécime de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) juvenil.	20
Figura 5. Cultivo de tilápias em tanques-rede. Fonte: Panorama da Aquicultura.	21
Figura 6. Clivagem do substrato pelas Endopeptidases e Exopeptidases indicando o ponto específico da hidrólise por cada subclasse (TURK, 2006).	22
Figura 7. Representação esquemática do complexo enzima-subtrato (TURK, 2006).	22
Figura 8. 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 <i>et al.</i> , 2003).	25
Figura 9. Precipitação de proteínas a partir da adição crescente de sal (<i>salting out</i>). (VOET; VOET, 2008).	28
Figura 10. Representação do modelo teórico da tripsina de sardinha (<i>Sardinops sagax caerulea</i>) Try I, com características estruturais indicadas (ARVIZU-FLORES <i>et al.</i> , 2012).	30

Artigo científico

	Página
Figure 1. SDS-PAGE Electrophoresis of purified trypsin from tilapia; Line 1 – Pattern of standard protein bands; Line 2 – purified trypsin (final step – Size exclusion column)..	58
Figure 2. Mass spectrum (MALDI TOF) from the purified enzyme was comprised of two main peaks – one with 23.9 kDa and the other with half this value, 11.9 kDa.	59
Figure 3. Effect of a pH range (6.0 to 12.0) on trypsin activity using universal buffer and z-FR-MCA as substrate.	60
Figure 4. Stability of tilapia trypsin on surfactants presence at 0,5 % of final concentration and the residual activity was measured after 30 min incubation using z-FR-MCA as substrate.	61
Figure 5. Trypsin thermal stability after 30 min incubation at a range of temperatures (20 °C to 65 °C) on the presence of 5 mM CaCl ₂ and 5 mM EDTA and the residual activity was measured using BAPNA as substrate.	62
Figure 6. Activation of trypsin activity by calcium ion incubation using z-FR-MCA and BAPNA as substrate.	63
Figure 7. Effect of PEG at different molecular weights (600 to 12,000 g/mol) on trypsin activity for 15 min of incubation and relative activity measured using z-FR-MCA as substrate.	64

Lista de tabelas

Revisão bibliográfica

		Página
Tabela 1.	Aplicações industriais de proteases de animais, plantas e microrganismos (WISEMAN, 1991).	23
Tabela 2.	Clãs e famílias das serino proteases (PAGE; DI CERA, 2007).	24
Tabela 3.	Exemplos de estudos clínicos do uso terapêutico da tripsina em humanos e animais (GUDMUNDSDÓTTIR; PÁLSDOTTIR, 2005).	27

Artigo científico

		Página
Table 1	Purification summary of the trypsin-like from tilapia.	65
Table 2	Kinetics parameters of tilapia trypsin with and without 15 mM calcium ion for the hydrolysis of z-FR-MCA.	66
Table 3	Kinetic parameters from the hydrolysis of two series of synthetic fluorogenic peptide substrates by trypsin-like from tilapia – Abz-RXFK-EDDnp (X represents P ₁ ') and Abz-XRFX-EDDnp (X represents P ₂).	67

Lista de abreviaturas e siglas

Abz	Orto-aminobenzoil
ANOVA	Análise de Variância
BapNa	N- α -Benzoil-L-Arginina <i>p</i> -Nitroanilida
BSA	Albumina do Soro Bovino
DMSO	Di-Metil-Sulfoxido
EC	Comitê Enzimático
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
GIFT	Tilápia cultivada geneticamente melhorada
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
MALDI	Dessorção/ionização a laser auxiliada por matriz
MPA	Ministério da Pesca e Aquicultura
OMS	Organização Mundial da Saúde
PEG	Poli(etil)enoglicol
PMSF	Fluoreto de Fenil-Metil-Sulfonil
PSTI	Inibidor Pancreático de Tripsina
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS - PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS
Ton	Tonelada
TLCK	Tosil - Lisina Clorometil Cetona
Tris-HCl	Hidrocloridrato de 2-Amino-2-(Hidroximetil)-1,3-Propanodiol
z-FR-MCA	Carbobenzoxi-Phe-Arg-7-amido-4-metilcoumarina

Lista de símbolos

Ala (A)	Alanina
Arg (R)	Arginina
Asn (N)	Asparagina
Asp (D)	Ácido aspártico
Cys (C)	Cisteína
Glu (E)	Glutamina
Gln (Q)	Ácido glutâmico
Gly (G)	Glicina
His (H)	Histidina
Ile (I)	Isoleucina
Leu (L)	Leucina
Lys (K)	Lisina
Met (M)	Metionina
Phe (F)	Fenilalanina
Pro (P)	Prolína
Ser (S)	Serina
Thr (T)	Treonina
Trp (W)	Triptofano
Tyr (Y)	Tirosina
Val (V)	Valina
Dnp	2,4-di-nitro-fenil
<i>k_{cat}</i>	Constante catalítica
<i>kDa</i>	Quilo Daltons
<i>K_m</i>	Constante de Michaelis e Menten
λ_{max}	Comprimento de onda com emissão máxima
M.M.	Massa molecular
<i>V_{max}</i>	Velocidade máxima

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1. Aquicultura.....	16
2.1.1. Resíduos da indústria pesqueira	18
2.2. Tilápia do Nilo	19
2.3. Proteases.....	21
2.3.1 Serino proteases.....	24
2.4. Tripsina	25
2.5. Técnicas de purificação e análise de proteínas.....	27
2.6. Estabilidade e eficácia de enzimas	30
3. OBJETIVOS	32
3.1. Geral.....	32
3.2. Específicos	32
4. CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
APÊNDICE A - ARTIGO CIENTÍFICO.....	39
5. ANEXOS.....	68
1 - Instruções de autores do periódico do trabalho.....	68

1. INTRODUÇÃO

Proteases são um grupo de enzimas responsáveis pela clivagem de proteínas através da hidrólise de ligações peptídicas (TURK, 2006). A clivagem específica destas enzimas permitiu que este grupo se destacasse em diferentes aplicações fisiológicas e comerciais, onde atualmente representam 60% de todas as enzimas comercializadas no mundo (GUPTA *et al.*, 2002). As proteases representam 2% do genoma humano e podem ser amplamente encontradas na natureza, estando presente em todos os organismos vivos e em vírus, o que favorece a obtenção destas macromoléculas (SANMAN; BOGYO, 2014).

As proteases podem ser extraídas e caracterizadas a partir de resíduos do processamento do pescado, que são geralmente descartados por não apresentarem valor comercial para a indústria. No entanto são uma importante fonte para obtenção de biomoléculas ativas, com características favoráveis a diferentes aplicações industriais. A reutilização destes resíduos favorece economicamente esta atividade, com aproveitamento total do pescado, além de reduzir o impacto ambiental causado pelo seu descarte indevido (BOUGATEF *et al.*, 2013).

Vísceras de peixes, subprodutos do resíduo do pescado, são ricas em enzimas digestivas, especialmente proteases alcalinas. Dentre estas, destaca-se a tripsina (EC 3.4.21.4), pertencente ao grupo das serino proteases. A tripsina presente nas vísceras de peixes tropicais tem sido estudada e apresenta grande estabilidade frente a diversas condições biológicas, como ampla faixa de pH e temperatura, presença de íons metálicos, agentes surfactantes, oxidantes e detergentes comerciais (BEZERRA *et al.*, 2001; ESPÓSITO *et al.*, 2009; MARCUSCHI *et al.*, 2010).

A tilápia do Nilo é um importante peixe para a aquicultura mundial, apresentando-se como a espécie mais cultivada no Brasil e a segunda mais cultivada no mundo (FAO, 2014). Isto pode ser explicado pela facilidade com que esta espécie pode ser cultivada, sendo capaz de suportar diferentes condições de cultivo e estresses, além de possuir uma carne com boa qualidade nutricional (EKASARI *et al.*, 2015; WAKEFIELD *et al.*, 2014).

A tripsina encontrada no intestino da tilápia do Nilo possui estabilidade a altas temperaturas e ampla faixa de pH (50 °C, pH de 7 a 10), além de alta eficiência catalítica (BEZERRA *et al.*, 2005). Adicionalmente, isoformas da tripsina deste peixe foram isoladas em apenas três etapas de purificação e mostraram-se termoestáveis e ativas na presença de tensoativos e detergentes comerciais (UNAJAK *et al.*, 2012).

No presente trabalho, uma tripsina-símile do intestino da tilápia do Nilo foi extraída e purificada, com posterior caracterização bioquímica e estrutural. Esta enzima foi submetida a ensaios de fluorescência, com substratos sintéticos, bem como à presença de inibidores específicos para protease, agentes surfactantes, íon cálcio, e a diferentes pHs e temperaturas. Os resultados obtidos corroboram com o estudo do potencial desta tripsina para aplicação em processos biotecnológicos e industriais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

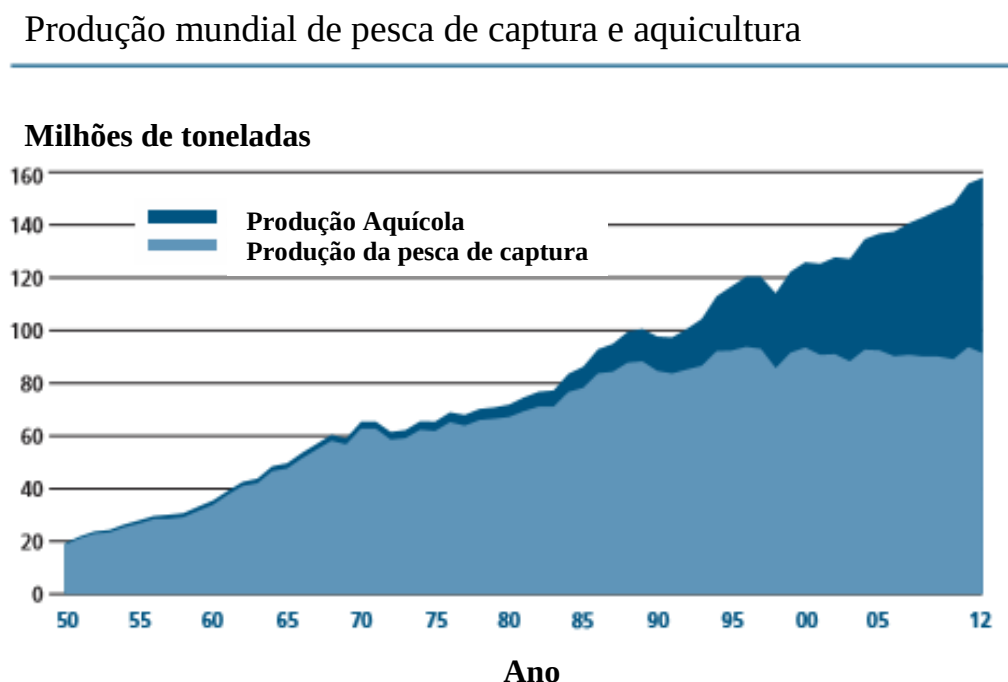
2.1. Aquicultura

A Aquicultura, cultivo de organismos cujo ciclo de vida em condições naturais se dá total ou parcialmente em meio aquático, é uma das mais antigas atividades exercidas pelo homem. Há milhares de anos essa técnica vem sendo explorada pelo ser humano, com registros de cultivos do peixe tilápia pelos egípcios há aproximadamente quatro mil anos. O cultivo de organismos pode ser feito em água doce (continental) ou água salgada (marinha), e pode ser dividido nas seguintes categorias, de acordo com a espécie a ser cultivada (MPA, 2014):

- Piscicultura (criação de peixes, em água doce e marinha);
- Malacocultura (produção de moluscos, como ostras, mexilhões, caramujos e vieiras). A criação de ostras é conhecida por ostreicultura e a criação de mexilhões, por mitilicultura;
- Carcinicultura (criação de camarão em viveiros);
- Algicultura (cultivo de macro ou microalgas);
- Ranicultura (criação de rãs);
- Criação de jacarés

Nas últimas cinco décadas, a taxa de crescimento da produção mundial de peixe como alimento superou o crescimento da população global, por constituir-se de fontes proteicas de alto valor biológico, com balanceamento de aminoácidos essenciais, sendo inclusive recomendado pela OMS (Organização Mundial da Saúde) o consumo de ao menos 12 kg de pescado habitante/ano ((FAO, 2014; LEDERER, 1991). Logo, essa crescente busca por produtos oriundos da indústria pesqueira, associada à deficiência da pesca extrativa em suprir toda essa demanda, permitiram que a aquicultura crescesse consideravelmente em todo o mundo (FAO, 2014) (Figura 1).

Figura 1. Crescimento da produção aquícola mundial nas últimas cinco décadas.

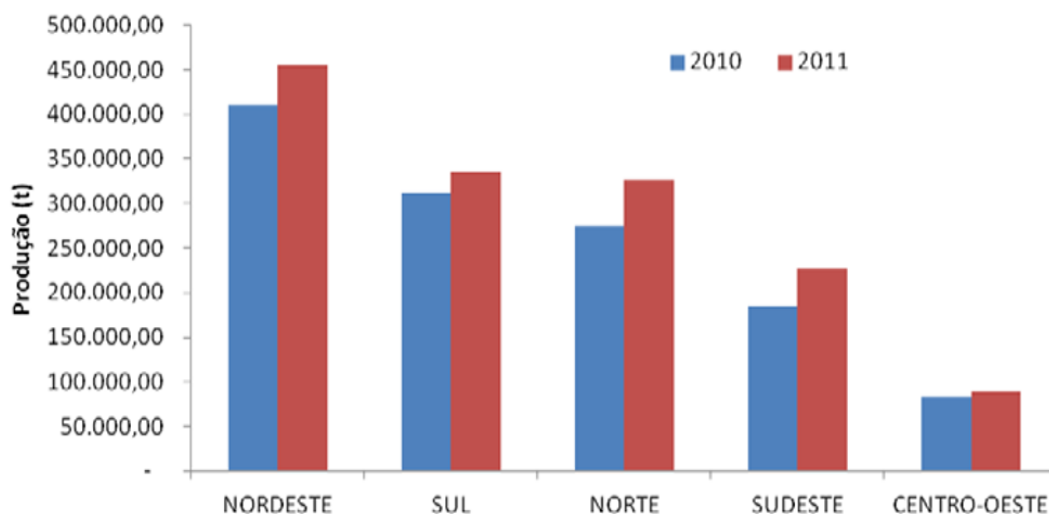


Fonte: FAO (2014).

A produção aquícola brasileira no ano de 2011 foi equivalente a 628.704,3 t, com acréscimo de 31,1 % da produção em relação ao ano de 2010. Com mais de 3,5 milhões de hectares de lâminas d'água e uma extensa área marinha para a produção em cativeiro, o Brasil apresenta grande potencial para expandir sua produção aquícola pelos próximos anos, podendo, segundo a FAO (2014), atingir 20 milhões de toneladas de pescado até 2030 (MPA, 2013).

A região Nordeste se destaca nesta atividade, representando 31,7% da produção de pescado nacional, com 454.216,9 t produzidas somente no ano de 2011 (Figura 2). As principais espécies cultivadas nesta região são a tilápia do Nilo e o camarão marinho (MPA, 2013). Esta atividade gera um PIB pesqueiro de aproximadamente R\$ 5 bilhões para o país, além de gerar emprego para profissionais de diversos setores (MPA, 2014).

Figura 2. Produção de pescado (t) nacional em 2010 e 2011 discriminada por região.



Fonte: MPA (2013).

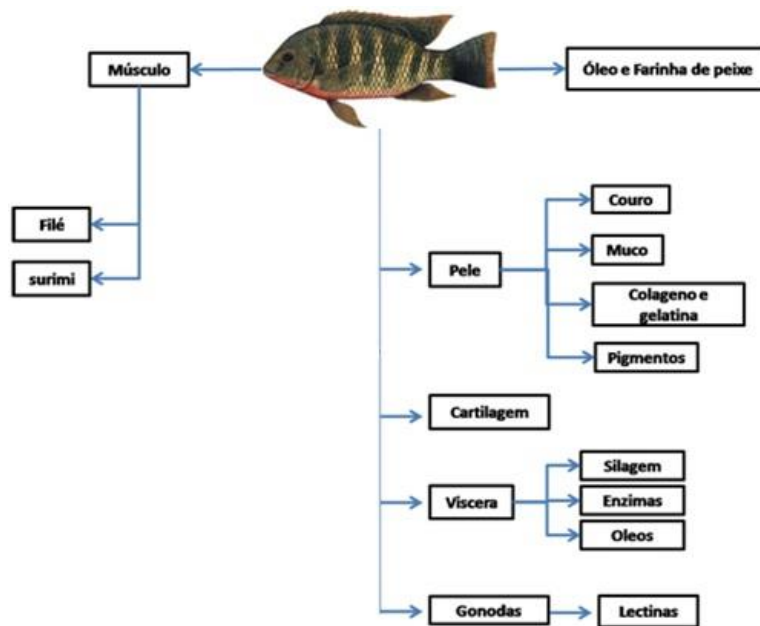
2.1.1. Resíduos da indústria pesqueira

É importante se destacar que o processamento em larga escala do pescado gera, além de lucros para as indústrias, uma grande quantidade de resíduos. Segundo Arruda (2004), cerca de 50 % do pescado produzido é descartado na forma de resíduo. Considerando-se que em 2012 foram produzidas 158 milhões de toneladas de pescado no mundo (FAO, 2014), quase 80 milhões de toneladas de resíduos sólidos podem ter sido geradas a partir deste montante. Por isso, o desenvolvimento de técnicas visando o aproveitamento destes descartes é de grande interesse econômico e ambiental (BLANCO *et al.*, 2007) (Figura 3).

No passado, subprodutos do pescado, como cabeça, víscera, pele, ossos e escamas, eram considerados de baixo valor ou um problema às indústrias pesqueiras para descartá-los. Há duas décadas tem havido um aumento da conscientização para com os aspectos econômicos, sociais e ambientais, otimizando o uso dos subprodutos do pescado. Uma grande variedade de metodologias para o aproveitamento desses resíduos tem sido desenvolvida, como a produção de rações para alimentação em aquicultura e criação de gado, fertilizantes, etc. (FAO, 2014). Ademais, importantes biomoléculas para a indústria farmacêutica e para aplicações biotecnológicas e biomédicas podem ser obtidas a partir dos insumos do pescado, como carotenóides (SANTOS, 2006), enzimas (peptidases, lipases e carboidrases) (SHAHIDI; JANAKKAMIL, 2001; KIM; MENDIS, 2006; BLANCO *et al.*, 2007;

BEZERRA *et al.*, 2005; ESPÓSITO, 2006; ASSIS *et al.*, 2007), quitina e quitosana (SHAHIDI; JANAKKAMIL, 2001; KIM; MENDIS, 2006), colágeno e gelatina (GONZÁLEZ *et al.*, 2007; KIM; MENDIS, 2006; LEE *et al.*, 2009; HWANG *et al.*, 2007).

Figura 3. Esquema dos principais produtos que podem ser obtidos do processamento do pescado.



Fonte: BLANCO *et al.*, 2007.

2.2. Tilápia do Nilo

Classificada taxonomicamente na classe Osteichthyes, superordem Teleostei, ordem Perciformes e família Cichlidae, a tilápia é o nome comum atribuído a três gêneros de peixes oriundos do continente Africano: *Oreochromis*, *Sarotherodon* e *Tilapia* (WATANABE *et al.*, 2002; RESENDE, 2010). No entanto, *Oreochromis niloticus* se destaca como a espécie mais cultivada, representando 80% de todas as tilápias produzidas no mundo (MASSAGO, 2007).

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) foi inicialmente introduzida no Brasil no ano de 1971, porém sem sucesso de adaptação. No entanto, no ano de 1995 uma linhagem

domesticada no Japão e na Tailândia foi importada ao Brasil, apresentando melhor desempenho (ZIMMERMANN *et al.*, 1999).

Atualmente, a tilápia do Nilo se apresenta como a espécie de água doce mais cultivada em todo o Brasil, onde 253.824,1 t foram produzidas no ano de 2011, e a segunda mais cultivada no mundo, com registro de cultivo em mais de 135 países em todos os continentes (MPA, 2013; FAO, 2014). Estes valores podem ser justificados pela grande capacidade de suportar diferentes condições de qualidade de água no cultivo, como pouco oxigênio dissolvido, águas salobras e salinas, alta concentração de amônia e altas condições de turbidez da água. Além disto, a tilápia é resistente a agentes patogênicos e apresenta altas taxas de reprodução e crescimento em cativeiro (WELKER, 2014).

Figura 4. Espécime de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) juvenil.



Fonte: Acervo pessoal. Fotografia de Raquel Pereira (2011).

Esta espécie é onívora, alimentando-se de algas, plantas aquáticas, pequenos invertebrados, além de uma variedade de alimentos de origem animal e também artificial (ração) (WATANABE *et al.*, 2002). Possui corpo curto e alto, cabeça e caudas pequenas, chega a pesar mais de 5 kg e prefere temperaturas em torno de 21 °C a 35 °C. Adicionalmente, a tilápia tornou-se tendência no mercado consumidor, por apresentar uma carne de sabor agradável, com baixo teor de gorduras e de calorias (RESENDE, 2010) (Figura 4).

Programas para melhoramento genético e de cultivo de tilápias têm sido desenvolvidos nas últimas décadas, com o objetivo de aprimorar a resistência das linhagens ao cultivo, aumentando a taxa de crescimento e tolerância a diferentes condições ambientes, favorecendo,

desta forma, o trabalho dos tilapicultores (WATANABE *et al.*, 2002; ZHAO *et al.*, 2015). A exemplo tem-se a Tilápia Cultivada Geneticamente Melhorada - GIFT (Genetically Improved Farmed Tilapia), principal linhagem da tilápia do Nilo desenvolvida e comercializada no Brasil. A GIFT foi produzida na Malásia a partir do cruzamento de 8 linhagens e trazida ao Brasil no ano de 2005 (MASSAGO, 2007) (Figura 5).

Figura 5. Cultivo de tilápias em tanques-rede



Fonte: Panorama da aquicultura, 2013.

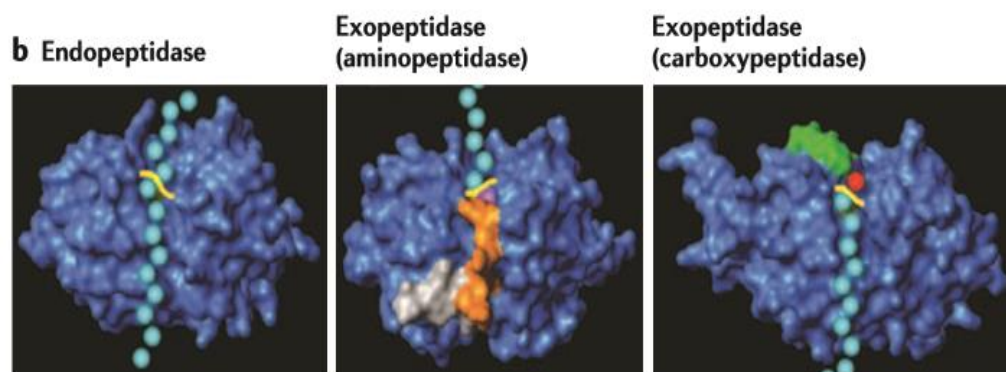
2.3. Proteases

Proteases, também denominadas peptidases, são enzimas proteolíticas responsáveis pela quebra de proteínas através da hidrólise de ligações peptídicas. Com a evolução dos organismos, as proteases tornaram-se capazes de suportar diversas condições biológicas (variação de pH, diferentes condições ambientais, variedade nutricional) utilizando-se variados mecanismos de clivagem para hidrólise de diferentes substratos (TURK, 2006). As proteases são divididas em nove famílias, de acordo com o MEROPS (banco de dados de enzimas proteolíticas, seus substratos e inibidores): aspártico, cisteína, glutâmico, metalo, asparaginina, mistos, serino, treonina e desconhecido (RAWLINGS *et al.*, 2014).

O sítio ativo das enzimas possui um arranjo de aminoácidos específico que definirá a sua interação com determinado substrato. A clivagem específica das proteases pode ocorrer

em diferentes pontos do substrato, o que as classifica em duas subclasses: Endopeptidases e Exopeptidases. As endopeptidases realizam a clivagem no meio da molécula, enquanto que as exopeptidases tem ação próxima ao final da cadeia polipeptídica, podendo ser ainda subdivididas quanto à localização da clivagem, onde próximos ao N-terminal são classificadas como aminopeptidases e próximos ao C-terminal como carboxipeptidases (TAVANO, 2013) (Figura 6).

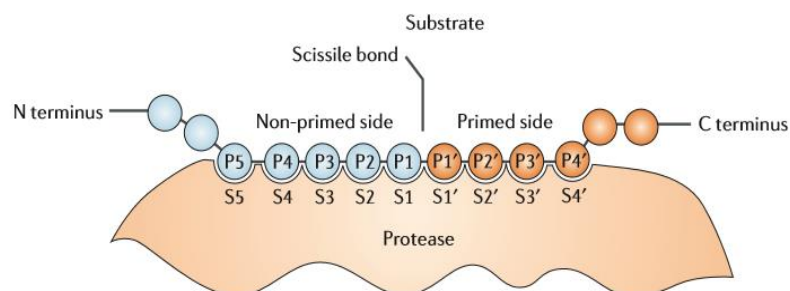
Figura 6. Clivagem do substrato pelas Endopeptidases e Exopeptidases indicando o ponto específico da hidrólise por cada subclasse.



Fonte: TURK (2006).

Schechter e Berger (1968) padronizaram a especificidade da ligação protease-substrato através de um modelo representado pela figura 7. Os resíduos de aminoácidos são numerados a partir do sítio catalítico em direção às extremidades (S1 a Sn – N-terminal e S1' a Sm' – C-terminal) e os resíduos de aminoácidos do substrato a partir do sítio de clivagem para as extremidades da cadeia (P1 a Pn – N-terminal e P1' a Pm' – C-terminal).

Figura 7. Representação esquemática do complexo enzima-substrato.



Fonte: TURK (2006).

A participação das proteases é importante e extremamente necessária para muitos processos biológicos, como proliferação e morte celular, replicação do DNA, remodelação do tecido, hemostasia, cicatrização e resposta imune. No entanto, por realizarem um processo irreversível, existe um mecanismo controlado pela célula, onde a maioria das proteases são transcritas de forma inativa (zimogênio), tornando-se ativa apenas quando necessário (TURK, 2006). A forma zimogênica da enzima apresenta um domínio onde um inibidor permanece ligado impedindo a atividade da protease. Algumas proteases não apresentam este domínio, estando, portanto ligadas a um cofator que regula a ativação da enzima. Além disto, mudanças de pH e altas temperaturas estão relacionadas com ativação da forma zimogênica de proteases (SANMAN; BOGYO, 2014).

As proteases são o grupo de enzimas com maior importância comercial, representando 60% do total de enzimas utilizadas comercialmente (GUPTA *et al.*, 2002). Possuem uma extensa possibilidade de aplicações em produtos e processos industriais incluindo detergentes, alimentos, produtos farmacêuticos, couro, lã e extração de prata para o preparo de filmes de raio-X. Além disto, são também utilizadas em análises de estudos de proteômica e desenvolvimento de hidrolisados proteicos, relacionados com o auxílio nutricional (ABIDI *et al.*, 2008). Estas proteínas tem ganhado cada vez mais importância mercadológica uma vez que realizam processos de catálise de forma rápida e mais sutil quando comparada a produtos químicos, sendo menos agressivas ao meio ambiente (Tabela 1).

Tabela 1. Aplicações industriais de proteases de animais plantas e microrganismos.

Fonte de obtenção	Enzima	Aplicação industrial
Animal	Tripsina, Quimotripsina, etc	Indústria farmacêutica, de couro, processamento de alimentos, especialmente hidrólise de proteínas e síntese de peptídeos.
Vegetal	Papaína, Ficina, Bromelaína	Produção de extratos de leveduras, cerveja resistente ao congelamento, panificação, fármacos, amaciamento de carne.
Microrganismos (<i>Aspergillus niger</i>)	Proteases ácidas e neutras	Queijo, carnes, pescado, cereais, bebidas.
Microrganismos (<i>Aspergillus oryzae</i>)		Hidrólise protéica, processamento de carne e pescado, indústria cervejeira e de panificação.
Microrganismos (<i>Aspergillus melleus</i> , <i>Endothia parasítica</i> , <i>Mucor miehei</i> e <i>Mucor pusillus</i>)	Proteases alcalinas	Manufatura de queijo (coagulação do leite).
Microrganismos (<i>Bacillus licheniformis</i> e <i>Bacillus subtilis</i>)		Fabricação de detergentes e indústria de couro, processamento de carnes, pescados e derivados lácteos.
Microrganismos (<i>Bacillus subtilis</i> e <i>Bacillus cereus</i>)	Protease neutra	Produção de bebidas e panificação.

Fonte: WISEMAN (1991).

2.3.1 Serino proteases

As serino proteases representam um importante grupo de proteases caracterizado pela presença de um resíduo de serina em seu sítio ativo, além dos resíduos de histidina e ácido aspártico, formando a tríade catalítica “Asp-His-Ser”. Estas enzimas representam aproximadamente um terço de todas as proteases, com mais de 18.000 representantes agrupados em 13 clãs e 40 famílias, de acordo com a nomenclatura MEROPS (DI CERA, 2009; HEDSTROM *et al.*, 2002) (Tabela 2).

Tabela 2. Clãs e famílias das serino proteases.

Clan	Families	Representative member	Catalytic unit	Fold	PDB (#)
PA	12 ^a	Trypsin	His, Asp, Ser	Greek-key β barrels	1DPO (195)
SB	2	Subtilisin, sedolisin	Asp, His, Ser	3-layer sandwich	1SCN (221)
SC	6	Prolyl oligopeptidase	Ser, Asp, His	α/β hydrolase	1QFS (554)
SE	3	D-Ala, D-Ala carboxypeptidase	Ser, Lys	α -helical bundle	3PTE (62)
SF	2	LexA peptidase	Ser, Lys/His	All β	1JHH (119)
SH	1	Cytomegalovirus assemblin	His, Ser, His	α/β barrel	1LAY (132)
SJ	2	Lon peptidase	Ser, Lys	$\alpha + \beta$	1RR9 (679)
SK	3	Clp peptidase	Ser, His, Asp	$\alpha \beta$	1TYF (97)
SP	1	Nucleoporin	His, Ser	All β	1KO6 (-)
SQ	1	Aminopeptidase DmpA	Ser	4-layer sandwich	1B65 (250)
SR	1	Lactoferrin	Lys, Ser	3-layer sandwich	1LCT (259)
SS	1	L,D-carboxypeptidase	Ser, Glu, His	β sheet + β barrel	1ZRS (115)
S-	5	Rhomboid	His, Ser	α barrel	2IC8 (201)

Fonte: PAGE; DI CERA (2008).

O mecanismo de ação das serino proteases envolve o ataque nucleofílico da serina na porção carbonila da ligação peptídica do substrato, formando um intermediário acil-enzima (DI CERA, 2009). As serino proteases apresentam-se como endo ou exopeptidases, com maioria endopeptidase, e variam sua especificidade por substrato de acordo com sua função fisiológica (HEDSTROM *et al.*, 2002).

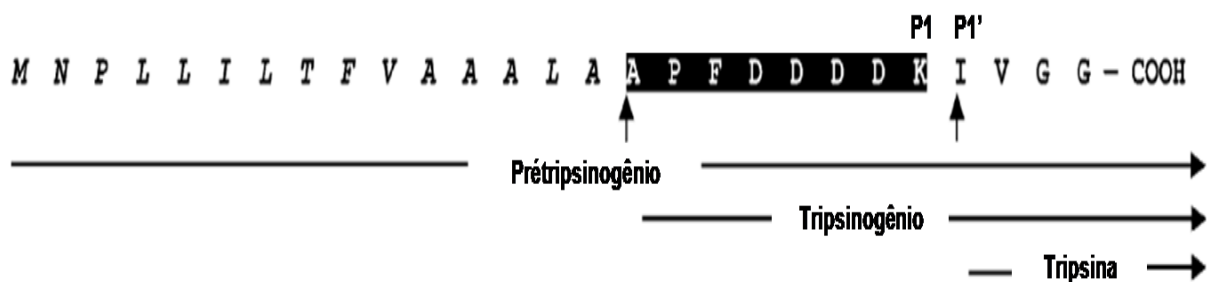
Essa classe de proteases está presente em todos os organismos dos reinos de vida celular, incluindo os vírus, com distinções em seu comportamento para cada espécie (PAGE; DI CERA, 2008). Muitos processos fisiológicos necessitam da participação das serino proteases, como digestão de alimentos, auxílio na coagulação do sangue e na penetração do espermatozoide no óvulo e regulação do desenvolvimento de organismos (NEITZEL *et al.*, 2010).

2.4. Tripsina

A tripsina (EC 3.4.21.4) é uma importante enzima proteolítica, pertencente à família S1 do clã PA das serino protease, responsável pela clivagem de ligações peptídicas na porção C-terminal dos resíduos de aminoácidos arginina e lisina. São endopeptidases com peso molecular geralmente entre 22 e 28 kDa, encontradas em organismos eucariotos, procariotos e vírus (BOUGATEF *et al.*, 2013, POLGÁR, 2005).

A tripsina é uma das proteases digestivas mais importantes para a maioria dos vertebrados, sendo sintetizada no pâncreas na forma de um precursor inativo, o pré-tripsinogênio, e então armazenada em grânulos de zimogênio, juntamente com o inibidor pancreático de tripsinas, o PSTI (Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor), que impede a sua ativação dentro do pâncreas. Ainda ligado ao retículo endoplasmático rugoso, o seu peptídeo sinal é retirado tornando-se o tripsinogênio que então é secretado no duodeno, onde será ativado pela enteropeptidase (enzima proteolítica secretada pelas células intestinais) ou por autocatálise (Figura 8). A ativação é feita pela liberação do propeptídeo pela hidrólise de Lys15-Ile16, resultando na β -tripsina de cadeia única (VANDERMARLIERE *et al.*, 2013; HIROTA *et al.*, 2006; VARALLYAY *et al.*, 1998).

Figura 8. 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.



Fonte: CHEN *et al.*, (2003).

Os primeiros resíduos de aminoácidos da tripsina, após a clivagem do tripsinogênio, são bastante conservados. A isoleucina (I) aparece como aminoácido N-terminal, sendo usualmente seguida pela sequência: VGG (Valina-Glicina-Glicina). A importância da

liberação da isoleucina N-terminal para a conferência de atividade à tripsina se deve a uma ponte salina que este aminoácido forma com o Asp 194, promovendo um rearranjo estrutural e levando à formação do sítio ativo (HEDSTROM *et al.*, 2002). Experimentos com tripsinas que tiveram a isoleucina N-terminal modificada ou substituída por outros grupamentos químicos indicaram que estas enzimas modificadas sofreram uma redução significativa em suas atividades (HEDSTROM *et al.*, 2002). Desta forma, pode-se inferir que a tripsina não é ativa enquanto tripsinogênio por não apresentar a isoleucina N-terminal livre.

Em condições normais, a ativação da tripsina é altamente controlada, no entanto, quando a ativação do tripsinogênio é muito alta ou a capacidade do PSTI se ligar à tripsina é muito baixa, então a enzima torna-se ativa ainda no pâncreas, resultando na autodigestão deste órgão, o que caracteriza a doença conhecida por pancreatite (HIROTA *et al.*, 2006). Esta doença também pode ser ocasionada quando o loop de autólise, responsável por desencadear a autólise da tripsina, sofre mutação nos aminoácidos Arg117 e Lys 145, e por consequência o organismo sofrerá de pancreatite hereditária, caso verificado para mamíferos (VÁRALLYAY *et al.*, 1998; WHITCOMB *et al.*, 1996).

A principal função da tripsina é a clivagem de proteínas, ingeridas durante a alimentação, em peptídeos, que serão fragmentados por exopeptidases transformando-se em fragmentos ainda menores que podem então ser absorvidos pelo intestino, permitindo a ingestão de aminoácidos essenciais não sintetizados pelo organismo. Além disto, a tripsina também participa da ativação do receptor da insulina, pela clivagem de seu domínio extracelular e participa da clivagem e ativação de proteases acopladas à proteína G (PARs), que contribuem para a defesa do organismo com respostas inflamatórias (VANDERMARLIERE *et al.*, 2013).

A tripsina foi descoberta em 1876 por Keuhne que estudava a digestão de proteínas no fluído pancreático bovino. Posteriormente, ele percebeu que esta se encontrava inicialmente inativa, tornando-se ativa após alguns instantes. Esta observação foi importante para a fundamentação do conceito de zimogênio. Aproximadamente um século após esta descoberta (em 1964), a tripsina tornou-se uma das primeiras proteínas a ter sua sequência de aminoácidos determinada (VANDERMARLIERE *et al.*, 2013).

Embora a tripsina apresente um único mecanismo de ação, ela pode variar seu comportamento, frente a condições biológicas, para cada organismo. Um exemplo disto é a maior susceptibilidade de tripsina de suínos à desnaturação em pH mais baixo e altas temperaturas comparativamente à tripsina de ovinos (TAVANO, 2013). Tripsinas de peixes são ainda mais resistentes a desnaturação por aquecimento (especialmente peixes de ambientes tropicais), mudanças de pH e a autólise que seus homólogos mamíferos. Portanto,

tripsinas de peixes de ambientes tropicais e temperados têm sido cada vez mais estudadas nas últimas décadas, mostrando-se como uma fonte alternativa para obtenção desta importante enzima (BOUGATEF *et al.*, 2013).

Devido a sua clivagem altamente específica e estabilidade em diferentes condições biológicas, a tripsina é uma das proteases mais utilizadas comercialmente. Tripsinas são utilizadas como aditivos de detergentes, auxiliando na remoção de manchas de origem proteica, na hidrólise do leite de vaca para amamentação de recém-nascidos alérgicos à beta-lactoglobulina presente no leite bovino, clivagem de proteínas em muitos peptídeos para análises de proteômica utilizando espectrometria de massa, entre outras aplicações associadas à biotecnologia, medicina e outros setores industriais (VANDERMARLIERE *et al.*, 2013; BOUGATEF *et al.*, 2013) (Tabela 3).

Tabela 3. Exemplos de estudos clínicos do uso terapêutico da tripsina em humanos e animais.

<i>Clinical indication</i>	<i>Application</i>	<i>Clinical studies</i>
Inflammation	Systemic	Humphries, 1971; Martin et al., 1955
Wound healing	Topical	Rodeheaver et al, 1974; Lecht and Stephenson, 1968
Burn	Topical/systemic	Stucke, 1949; RaviKumar et al., 2001
Postoperative complications	Systemic/topical	Krause, 1961
Arthritis	Systemic	Mazourov et al., 1997; Rovenska et al., 1999 ^b
Repair between cartilage and bone	Implant pretreated with trypsin	Chen et al., 2000 ^b

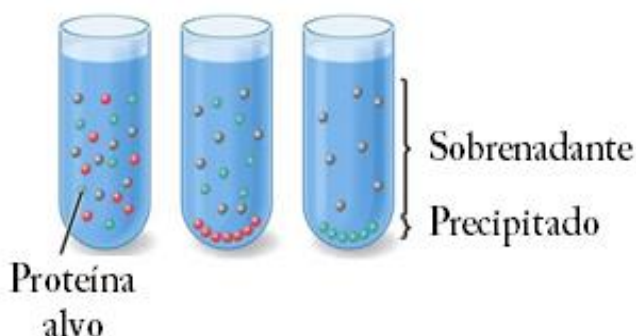
Fonte: GUDMUNDSDÓTTIR; PÁLSDOTTIR (2005).

2.5. Técnicas de purificação e análise de proteínas

Para a determinação das propriedades e atividade de uma proteína é necessário que a esta esteja pura ou parcialmente purificada. Alguns métodos foram desenvolvidos para a separação de proteínas, com algumas modificações a depender da proteína analisada. A primeira etapa de qualquer purificação proteica é a extração de proteínas a partir da célula ou tecido em que elas podem ser encontradas. A partir de processos mecânicos, como homogeneização em soluções tamponantes, as proteínas podem ser liberadas em uma solução chamada de extrato bruto, com posterior centrifugação para remoção de fragmentos celulares (NELSON; COX, 2014).

Uma etapa seguinte para purificação de proteínas consiste da separação destas de outras substâncias indesejadas através de técnicas de fracionamento. O fracionamento de proteínas utilizando sais, como o sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) é uma das técnicas mais utilizadas para purificação proteica. Esta metodologia está fundamentada na adição de certos sais na quantidade ideal para a precipitação da proteína, uma vez que há uma competição entre estas e íons de sal por moléculas de solvatação, até o momento em que a proteína se torna insolúvel e precipita, resultado de um fenômeno conhecido por *salting out* (Figura 9). Diferentes proteínas podem ser separadas a partir desta técnica, devido às solubilidades distintas que estas apresentam, podendo então ser separadas em diferentes frações de sal. O fracionamento também pode ser realizado levando-se em consideração diferenças na solubilidade proteica em função do pH, temperatura, concentração de solventes orgânicos (NELSON; COX, 2014; VOET; VOET, 2013).

Figura 9. Precipitação de proteínas a partir da adição crescente de sal (*salting out*).



Fonte: VOET; VOET (2008).

A fase que geralmente acompanha o fracionamento proteico é a cromatográfica. A cromatografia é uma importante técnica, muito eficaz para a purificação de proteínas, que consiste na passagem de uma mistura de substâncias dissolvidas em um fluído líquido ou gasoso (fase móvel) por uma matriz sólida porosa, ou líquida em alguns casos (fase estacionária) e que deve ser escolhida de acordo com a proteína analisada. As proteínas podem ser separadas pelo tamanho da molécula (cromatografia de exclusão por tamanho ou cromatografia de filtração em gel), por carga (cromatografia de troca iônica) ou por afinidade de ligação e outras propriedades (ALBERTS, 2002). A cromatografia pode ser aperfeiçoada

utilizando-se um método cromatográfico mais eficiente, o HPLC (High Performance Liquid Cromatography) ou Cromatografia líquida de alto desempenho. Esta técnica faz uso de bombas de alta pressão para acelerar a passagem das proteínas pela coluna, reduzindo o tempo do fluxo da amostra e diminuindo a dispersão por difusão de bandas proteicas, melhorando a resolução destas (NELSON; COX, 2014).

A purificação deve ser acompanhada pela mensuração da quantidade total de proteínas e atividade biológica resultante de cada etapa. A redução da quantidade total de proteínas é uma característica observada em purificações, uma vez que o objetivo é reduzir o maior número possível de proteínas indesejadas. Por consequência, a atividade específica, número de unidades de enzimas por miligrama de proteína total, tende a aumentar do extrato bruto à proteína pura, caracterizando uma purificação bem sucedida. A confirmação da pureza da amostra é realizada através de diferentes técnicas, sendo a eletroforese uma das mais empregadas (NELSON; COX, 2014).

A eletroforese, migração de íons em um campo elétrico, é um método analítico que permite aos pesquisadores estimar a quantidade de proteínas presentes na amostra analisada, bem como o grau de pureza, o ponto isoelétrico e massa molecular da proteína. Existem diferentes metodologias eletroforéticas (VOET; VOET, 2013):

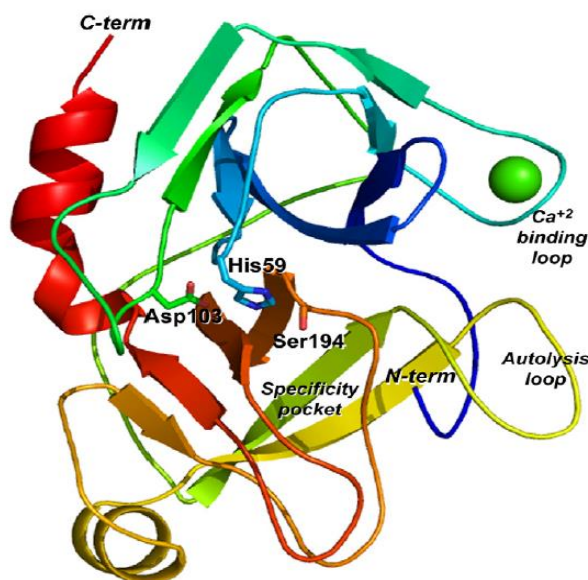
- Eletroforese em papel
- Eletroforese em gel (SDS-PAGE)
- Focagem isoelétrica
- Eletroforese bidimensional
- Eletroforese capilar

O gel de poliacrilamida SDS-PAGE é o método eletroforético mais empregado. A presença do detergente SDS (dodecil sulfato de sódio) é responsável pela desnaturação da proteína, transformando sua estrutura de globular para linear, além de conferir-lhe uma carga negativa. Quando se aplica uma corrente elétrica no gel, a proteína irá migrar para o polo positivo através da malha de poliacrilamida, com velocidade de migração dirigida pelo peso molecular da proteína. O gel é posteriormente corado com o corante azul de Comassie e em seguida descorado com ácido acético e álcool etílico para visualização das bandas proteicas presentes (ALBERTS, 2002).

2.6. Estabilidade e eficácia de enzimas

Algumas enzimas necessitam da presença de íon metálicos ou outros compostos químicos para tornarem-se ativas ou melhorarem sua eficiência catalítica (SILVA *et al.*, 2011). Em tripsinas, o íon cálcio apresenta uma relação ainda mais efetora, apresentando efeito ativador e estabilizador para esta enzima, especialmente em mamíferos. Esta característica está associada aos sítios de ligação ao cálcio presente em tripsinogênio e tripsina, que quando ocupados por este íon sofrem mudança estrutural, tornando-se mais compacta e por isso mais estável frente ao aquecimento e à autólise (KISHIMURA *et al.*, 2006) (Figura 10). Tripsinas de peixes comportam-se de maneira diferente quando incubadas ao íon cálcio. Em alguns espécies o Ca^{2+} auxilia na estabilidade térmica da tripsina (*Coryphaenoides pectoralis*) ou não apresentam efeito significativo (*Mustelus mustelus*), sugerindo que existam diferenças estruturais entre as tripsinas destes diferentes organismos (KLOMKLAO *et al.*, 2009; BOUGATEF *et al.*, 2010; 2013).

Figura 10. Representação do modelo teórico da tripsina de sardinha (*Sardinops sagax caerulea*) Try I, com características estruturais indicadas.



Fonte: ARVIZU-FLORES *et al.* (2012).

O polietilenoglicol (PEG) é um poliéter linear ou ramificado com grupos hidroxila terminais e apresenta diferentes pesos moleculares (até dezenas de milhares) (LANGE *et al.*, 2009). Este composto tem sido bastante utilizado na indústria farmacêutica, desde 1970, devido a sua alta solubilidade e baixa toxicidade, além de melhorar as propriedades

terapêuticas de enzimas, aumentando sua estabilidade e tempo de meia-vida (SOARES *et al.*, 2002). A estrutura do PEG é altamente flexível e pode ligar de 2 a 3 moléculas de água por unidade de óxido de etileno (LANGEL *et al.*, 2009).

A estabilidade de proteínas na presença do PEG pode ser justificada pela modificação desta macromolécula pela exclusão estérica de polímeros vizinhos da proteína, promovendo uma hidratação preferencial. Proteínas em estado mais solúvel apresentam maior estabilidade e, portanto, sua atividade biológica é mais bem preservada. Desta forma, o PEG pode contribuir com um aumento significativo da estabilidade de proteínas em condições operacionais e de estocagem, favorecendo o uso destas em diferentes processos biotecnológicos e industriais (NOVAES *et al.*, 2014).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Extrair, purificar e caracterizar bioquimicamente uma tripsina do intestino do peixe tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

3.2. Específicos

- Purificar uma tripsina-simile do intestino da tilápia do Nilo;
- Caracterizar a enzima quanto ao efeito de pH, inibidores, surfactantes e polietilenoglicol (PEG) em sua atividade;
- Avaliar o efeito do íon cálcio sobre a termoestabilidade e atividade da tripsina;
- Identificar a especificidade de hidrólise da enzima purificada frente a substratos fluorogênicos sintéticos.

4. CONCLUSÃO

Uma tripsina-símile, com peso molecular de 23,9 kDa, foi extraída do intestino da tilápia do Nilo e purificada em apenas 4 etapas de purificação. Esta enzima mostrou-se ativa e estável a ampla faixa de pH (7,0 a 12,0) e ao aquecimento, mantendo 50 % de atividade residual a 60 °C na presença do íon cálcio. A tripsina-símile da tilápia do Nilo manteve-se na presença de agentes surfactantes, incluindo o SDS, apresentando aproximadamente 50 % de atividade residual na presença deste surfactante.

A tripsina-símile apresentou aumento em sua atividade pela presença do Ca^{2+} em diferentes concentrações e do polietilenoglicol (PEG) de diferentes pesos moleculares. Esta enzima apresentou características favoráveis a aplicações na área biotecnológica, farmacêutica, bem como em indústrias de detergente e alimentícia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIDI, F., LIMAM, F. and NEJIB, M. M. Production of alkaline proteases by *Botrytis cinerea* using economic raw materials: assay as biode detergent. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 11, p. 1202-1208, 2008.

ALBERTS, Bruce; JOHNSON, Alexander; LEWIS, Julian; RAFF, Martin; ROBERTS; Keith; WALTER, Peter, Molecular biology of the cell, 4ª edição Garland Science, New York 2002

ARRUDA, L. F. Aproveitamento do resíduo do beneficiamento da tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) para obtenção de silagem e óleo como subprodutos. Piracicaba, 2004. 78p. 2004. **Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado)-Escola Superior de Agricultura" Luiz de Queiroz"**, Universidade de São Paulo.

ARVIZU-FLORES, A. A. et al. Thermodynamic activation and structural analysis of trypsin I from Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*). **Food Chemistry**, v. 133, n. 3, p. 898-904, 2012.

ASSIS, C. R. D. et al. Effect of dichlorvos on the acetylcholinesterase from tambaqui (*Colossoma macropomum*) brain. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.26, p.1451-1453, 2007.

BEZERRA, R. S. et al. Partial purification and characterization of a thermostable trypsin from pyloric caeca of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Journal of Food Biochemistry**. 199-210 p, 2001.

BEZERRA, R. S. et al. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, 1829-1834 p, 2005.

BLANCO, M. et al. Towards sustainable and efficient use of fishery resources: present and future trends. **Trends in Food Science & Technology** v. 18, n. 1, 29-36 p, 2007.

BOUGATEF, A. et al. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. **Food chemistry**, v. 118, n. 3, p. 559-565, 2010.

BOUGATEF, A. Trypsins from fish processing waste: characteristics and biotechnological applications e comprehensive review. **Journal of Cleaner Production**. 1-9 p, 2013.

CHEN, J. et al. Evolution of trypsinogen activation peptides. **Molecular biology and evolution**, v. 20, n. 11, 1767-1777 p, 2003.

DI CERA, E. Serine proteases. **IUBMB life**, v. 61, n. 5, p. 510-515, 2009.

EKASARI, J. et al. Biofloc-based reproductive performance of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* L. broodstock. **Aquaculture Research**, v. 46, n. 2, p. 509-512, 2015.

ESPÓSITO, T. S. Aplicação de proteases alcalinas das vísceras do tambaqui (*Colossoma macropomun*) e da carpa (*Cyprinus carpio*) como aditivo de detergentes em pó. **Dissertação (Mestrado em Aqüicultura e Recursos Pesqueiros)**, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2006.

ESPÓSITO, T. S. et al. Fish processing waste as a source of alkaline peptidases for laundry detergent. **Food Chemistry**. 125–130 p, 2009.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FishStat Plus**: Universal software for fishery statistical time series. Disponível on-line: <http://www.fao.org>.2014

GONZÁLEZ, Y. et al. Purification and partial characterization of human neutrophil elastase inhibitors from the marine snail *Cenchritis muricatus* (Mollusca). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, n. 4, 506-513 p, 2007.

GUÐMUNDSDÓTTIR, A.; PÁLSDÓTTIR, H. M. Atlantic cod trypsins: from basic research to practical applications. **Marine Biotechnology**, v. 7, n. 2, 77-88 p, 2005.

HEDSTROM, L et al. Serine protease mechanism and specificity. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 12, 4501-4524 p, 2002.

HIROTA, M., OHMURAYA, M.; BABA, H. The role of trypsin, trypsin inhibitor, and trypsin receptor in the onset and aggravation of pancreatitis. **Journal of gastroenterology**, v. 41, n. 9, p. 832-836, 2006.

HWANG, J., MIZUTA, S., YOKOYAMA, Y., YOSHINAKA, R. Purification and characterization of molecular species of collagen in the skin of skate (*Raja Kenojei*). **Food Chemistry**, v.100, p.921- 925, 2007.

KIM, S., MENDIS, E. Bioactive compounds from marine processing byproducts—a review. **Food Research International**, v. 39, n. 4, p. 383-393, 2006.

KISHIMURA, H. et al. Characteristics of trypsins from the viscera of true sardine (*Sardinops melanostictus*) and the pyloric ceca of arabesque greenling (*Pleuroprammus azonus*). **Food Chemistry**, v. 97, n. 1, p. 65-70, 2006.

KLOMKLAO, S.; KISHIMURA, H.; BENJAKUL, S. Trypsin from the pyloric ceca of pectoral rattail (*Coryphaenoides pectoralis*): Purification and characterization. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 15, 7097-7103 p, 2009.

LANGEL, U. et al. Introduction to peptides and proteins. **CRC Press**, 2009.

LASSOUED, I. et al. Digestive alkaline proteases from thornback ray (*Raja clavata*): Characteristics and applications. **International journal of biological macromolecules**, v. 80, p. 668-675, 2015.

LEE, J. K. et al. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from the rotifer, *Brachionus rotundiformis*. **Bioresource technology**, v. 100, n. 21, 5255-5259 p, 2009.

NELSON, D. L., COX, M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6ª Ed. Artmed, Porto Alegre, 2014.

LEDERER, J. Enciclopédia moderna de higiene alimentar. **São Paul: Manole**, v. 2, 1991.

MARCUSCHI, M. et al. Purification, characterization and substrate specificity of a trypsin from the Amazonian fish tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Biochemical and biophysical research communications**, v. 396, n. 3, 667-673 p, 2010.

MASSAGO, H. Desempenho de alevinos de quatro linhagens da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e análise da variabilidade genética pelos marcadores RAPD. 51 f. **Dissertação (Mestrado em Zootecnia)**. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, 2007.

MPA. Boletim Estatístico da pesca e Aquicultura: Brasil 2010. **Ministério da Pesca e Aquicultura**. 128p, 2013

MPA. **Ministério da Pesca e Aquicultura**. [2014]. Disponível em <http://www.mpa.gov.br/aquicultura>. Acesso em: 14 de dezembro de 2015.

NEITZEL, J. J. Enzyme Catalysis: The Serine Proteases. **Nature Education**. [2010]. Disponível em <http://www.nature.com/scitable/topicpage/enzyme-catalysis-the-serine-proteases-14398894>. Acesso em: 20 de dezembro de 2015.

NOVAES, L. C. L. et al. The influence of pH, polyethylene glycol and polyacrylic acid on the stability of stem bromelain. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 2, p. 371-380, 2014.

PAGE, M. J.; DI CERA, E. Serine peptidases: classification, structure and function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 7-8, p. 1220-1236, 2008.

POLGAR, L. The catalytic triad of serine peptidases. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 62, n. 19-20, 2161-2172 p, 2005.

RAWLINGS, N. D. et al. *MEROPS*: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Res.** 42, D503-D509, 2014

RESENDE, A. L. S. S. Viabilidade Técnica, Qualidade Nutricional e Sensorial de Produtos à Base de Carne de Tilápia (*Oreochromis niloticus*). 112 f. **Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)**. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

SANMAN, L. E.; BOGYO, M. Activity-based profiling of proteases. **Annual review of biochemistry**, v. 83, p. 249-273, 2014.

SANTOS, G. M., FERREIRA, E. J. G., ZUANON, A. S. J. Peixes comerciais de Manaus. **Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis**, 144 p, 2006.

SCHECHTER, I., BERGER, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 27, n. 2, p. 157-162, 1967.

SHAHIDI, F.; JANAKKAMIL, Y. V. A. Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 12, n. 12. 435-464 p, 2001.

SILVA, J. F. et al. Purification and partial characterisation of a trypsin from the processing waste of the silver mojarra (*Diapterus rhombeus*). **Food chemistry**, v. 129, n. 3, p. 777-782, 2011.

SOARES, A. L. et al. Effects of polyethylene glycol attachment on physicochemical and biological stability of *E. coli*-asparaginase. **International journal of pharmaceutics**, v. 237, n. 1, p. 163-170, 2002.

TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: an important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 1-11, 2013.

TURK, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. **Nature reviews Drug discovery**, v. 5, n. 9, p. 785-799, 2006.

UNAJAK, S. et al. Characterisation of thermostable trypsin and determination of trypsin isozymes from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). **Food chemistry**, v. 134, n. 3, p. 1533-1541, 2012.

VANDERMARLIERE, E., MUELLER, M., MARTENS, L. Getting intimate with trypsin, the leading protease in proteomics. **Mass spectrometry reviews**, v. 32, n. 6, p. 453-465, 2013.

VÁRALLYAY, E. et al. Two mutations in rat trypsin confer resistance against autolysis. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 243, n. 1, 56-60 p, 1998.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. Fundamentals of Biochemistry. Life at the molecular level. **Wiley**. 2008.

VOET, D.; VOET, J. G. Bioquímica. **Artmed Editora**, 2013.

ZHAO, Y. et al. An optimized group mating design and determination of the admixture rate in Nile tilapia families. **Aquaculture Reports**, v. 3, p. 45-50, 2016.

ZIMMERMANN, S. Incubação artificial: técnica permite a produção de tilápias do Nilo geneticamente superiores. **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 54, p. 15-21, 1999.

WATANABE, W. O. et al. Tilapia Production systems in the Americas: technological advances, trends, and challenges. **Reviews in Fisheries Science**, v. 10, n. 3-4, p. 465-498, 2002.

WELKER, T. L. In: Tilapia. Biology. Management Practices and Human Consumptions. Chapter one, Editor Renae Wakefield. **Nova Science Publishe**, 2-54p, 2014.

WISEMAN, A. Manual de Biotecnología de las Enzimas. **Zaragoza: Acribia**, 44 p. 1991.

WHITCOMB, D.C. et al. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. **Nature Genetics**, V. 14, 141-145p, 1996.

APÊNDICE A - ARTIGO CIENTÍFICO
Biochemical characterization and substrate specificity of a trypsin-simile from Nile
tilapia (*Oreochromis niloticus*)

To be submitted to Biotechnology and Bioengineering

(ISSN: 1097-0290)

Fator de Impacto: 4.164

Qualis CAPES em Ciências Biológicas I: A2

Author Guidelines Disponível em:

[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1097-0290/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1097-0290/homepage/ForAuthors.html)

Lidiane Cristina Pinho Nascimento^a, Marina Marcuschi^a, Marcelo Yudi Icimoto^b, Fellipe Bronze dos Santos^b, Vitor Oliveira^b, Ranilson de Souza Bezerra^{a1}

^a Laboratório de Enzimologia (LABENZ), Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, 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

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is a worldwide prominent inland aquaculture fish. Its viscera are by-product of the fisheries industry and have important digestive proteases, like trypsin. In this study, a trypsin-like with 23.9 kDa was extracted from tilapia's intestine and purified through a four-step purification process: heating at 45 °C, ammonium sulphate fractionation, size exclusion and affinity chromatography. The biochemical features of this protein were investigated using fluorescence z-FR-MCA and BAPNA as substrates. The trypsin was strongly inhibited by TLCK and PMSF, kept its activity in a pH range of 7.0 to 12.0 and maintained 70 % of its activity in the presence of surfactants agents, like Tween 20, Triton x-100 and Triton x-450. Moreover, trypsin-like on calcium ion presence was more thermal stable when compared with the EDTA control, tolerating temperatures until 60 °C. Calcium ion presence was also responsible for activation on trypsin activity. In addition, trypsin activity was improved by polyethylene glycol (PEG) presence on different molecular weights. The enzyme showed efficiency for hydrolyzing substrates presenting asparagine (N) and threonine (T) residues at P₁' position and isoleucine (I), leucine (L) and aspartic acid (D) at P₂ position. Trypsin-like from tilapia tolerates harsh and different biological conditions showing a potential for medical, proteomics, food, and detergent applications.

Keywords: Protease, catalytic efficiency, stability, tropical fish.

1. Introduction

The use of enzymes on industrial processes became an important way of developing environmental friendly technologies to obtain products with less harmful chemical reagents, reducing the pollution. Moreover, enzymatic processes are very specific and faster as mild temperatures than conventional chemical processes (Lassoued et al., 2015; Bougatef et al., 2013).

The most important group of industrial enzymes is the proteases, which represent 60 % of all global enzyme sales (Gupta et al., 2002). For having a broad commercial and industrial use, an optimization of its obtaining is very important. Fish processing waste is a potential source for the recovery of proteolytic enzymes, since they used to be discarded in large amount by fishery industry for not presenting commercial value (Bezerra et al., 2005).

Nile tilapia is one of the most important fish for inland aquaculture, with global production reaching near 4 million tons in 2011 (FAO, 2014). Considering that a large proportion of this fish is sold in filleted form, which presents a yield of 30 % to 37 %, a great amount of residue is produced. Previous works have demonstrated that important digestive proteases could be extracted from Nile tilapia viscera (by-products of its processing) with high potential for industrial application (Lee-Shing and Shu-Fen, 1988).

Among those digestive proteases, a trypsin-like was extracted from Nile tilapia intestine, showing a high heat stability, wide pH range, and also remaining activity in the presence of surfactants and detergents (Unajak et al., 2012; Bezerra et al., 2005). Trypsin from fish has been thoroughly studied as to pH and temperature effects, but little information is available regarding their substrate specificity. In order to enrich the knowledge on these unique enzymes, the present study aimed to purify a trypsin-like from Nile tilapia intestine and evaluate it physical-chemically using fluorogenic substrates.

2. Materials and Methods

2.1. Enzyme extraction

Viscera from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) were kindly provided by Noronha Pescados LTDA industry. The tissues were homogenized in 100 mM Tris-HCl pH 8.0 at 4 °C, 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 xg 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 following four-step procedure described by Marcuschi (2010) with slight modification. The crude extract was first incubated for 30 min at 45 °C (heat treatment) and centrifuged at 10,000 xg for 15 min at 4 °C. The supernatant was collected and fractionated with ammonium sulphate for 2 h at 4 °C for the final salt saturation of 0 to 30% and 30 to 60%. After each fractionation, the extract was centrifuged at 10,000 xg for 15 min at 4 °C. The pellets were collected, suspended with 4 mL of 100 mM Tris-HCl pH 8.0 and dialyzed against this same buffer for 24 h at 4 °C. After dialysis, the sample was placed on an affinity column (2 cm³ with 1 mL of benzamidine-agarose, Sigma®) at a flow rate of 0.5 mL/min of binding buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0). When all non-ligand molecules were washed out, 500 mM KCl-HCl pH 2.0 buffer was used to elute the sample. For each 1 mL fraction collected, 30 µL of 1.5 M Tris-HCl pH 8.0 buffer was added to neutralize the sample pH. These fractions were pooled and lyophilized. Afterwards the sample was resuspended with 1.5 mL of 100 mM Tris-HCl pH 8.0 and then applied on a gel filtration column (24 mL

bed volume Superdex G-75 10/300 GL - GE Healthcare Life Science). The sample elution was made by 100 mM Tris-HCl pH 8.0 with a flow rate of 0.5 mL/min. The fractions were pooled and dialyzed against 10 mM Tris-HCl pH 8.0, lyophilized and resuspended on 100 mM Tris-HCl pH 8.0 for further assays.

2.3. Trypsin activity and protein determination

2.3.1. Specific trypsin activity with chromogenic substrate

Tryptic activity was assayed following procedure described by Bezerra et al., 2001, 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-MarkTM, Brazil). One unit (U) of enzyme activity was defined as the amount of enzyme capable of hydrolyzing one μ mol of BAPNA per min under the established conditions, using the molar extinction coefficient of 9,100 mM⁻¹ cm⁻¹. Controls were performed without enzyme.

2.3.2. Specific trypsin activity with fluorogenic substrate

Tryptic activity was also assayed using the fluorogenic substrate carbobenzoxy-Phe-Arg-7-amido-4-methylcoumarin (z-FR-MCA) prepared in DMSO, following procedure described by Marcuschi et al., 2010. The reaction mixture used to assay the effect of pH was composed of 40 μ M z-FR-MCA, 100 mM Tris-HCl pH 8.0 and sample (0.084 mg/mL). The

mixture was kept under agitation in a Hitachi F-7000 (Tokyo, Japan) fluorimeter for 300 seconds and the release of free MCA (fluorophore) was continuously measured at λ_{EX} 380 nm and λ_{EM} 460 nm. 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.

2.3.3. Protein determination

The total protein content of the samples was estimated following the procedure described by Smith (1985), using the kit Pierce® BCA for protein analyses (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

2.3.4. SDS-PAGE and mass spectrometer

Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) was carried out according to the method 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).

2.4. Effect of synthetic inhibitors and surfactants

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),

100 μ M tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone and 1 mM phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF). The sample was incubated for 15 minutes, the remaining activity was measured and percent inhibition was then calculated. The effect of anionic (SDS) and non-ionic (Saponin, Tween 20, Triton x-100, Triton x-450) surfactants at 0.5% at final concentration was also checked. The enzyme was incubated for 30 minutes with those surfactants and an aliquot of this incubated sample was withdrawn (2 μ L) to the measurement of residual activity using z-FR-MCA as the substrate.

2.5. Effect of pH and temperature

The effect of pH on the purified enzyme was evaluated with z-FR-MCA (apparent second-order rate constant) at 25 °C in a range of 6 to 12 using a universal buffer made with a mixture of 25 mM MES buffer, 25 mM acetic acid, 25 mM glycine and 75 mM Tris. The effect of temperature was evaluated in a range of 20 °C to 65 °C, using 100 mM Tris-HCl pH 8.0 as the buffer and BAPNA as substrate. The presence of 5 mM calcium ion (final concentration) was tested to investigate its effect on trypsin thermal stability during 30 min of incubation on each temperature, using 5 mM EDTA as the control.

2.6. Effect of calcium and polyethylene glycol (PEG)

The effect of calcium ion on trypsin activity was tested using the salt calcium chloride (CaCl_2) at different range concentration (0.5, 2, 4, 5, 7, 12 and 15 mM - final concentration) using z-FR-MCA and BAPNA as substrates. Polyethylene glycol effect was also tested on tryptic activity, using PEG at different molecular weights: 600, 1500, 4000, 6000, 8000 and

12000 g/mol and z-FR-MCA as the substrate. The trypsin was incubated with each reagent during 15 minutes and an aliquot of the incubated sample was withdrawn to the measurement of residual activity.

2.7. 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-XRFX(Dnp)-OH and Abz-RXFX(Dnp)-OH, in which X denotes the position of the altered amino acid. The assay mixture was comprised of the sample (3.57 μ M), 100 mM Tris-HCl pH 8.0 (1 mL) and substrate in an increasing concentration. The activity for each substrate concentration was assayed for 100 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.

2.8. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraFit 5 Data Analysis Software, from Erithacus Software Ltd.

3. Results and Discussion

3.1. Enzyme purification

In this study, trypsin was purified from the intestine of Nile tilapia by four-step procedures: heat treatment, ammonium sulphate precipitation, affinity, and size exclusion chromatography. Affinity chromatography ($113.29 \text{ U mL}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) showed an increase in the specific activity compared with the crude enzyme ($33.32 \text{ U mL}^{-1} \text{ mg}^{-1}$), using BAPNA as substrate, and resulted in a purification factor of 3.4-fold and a yield of 28.4%. Size exclusion chromatography enhanced the purity of the enzyme with 5.7-fold and the specific activity ($190.93 \text{ U mL}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) (Table 1). The purity was evaluated by SDS-PAGE which showed a strong band from the purified enzyme and a faint band, which may indicate a contamination by another protein or it may be the product of autolysis (Figure 1). The MALDI-TOF spectrum presented a sharp peak at 23.9 kDa and a minor peak with half of this value (11.9 kDa) (Figure 2). Similar results were reported for other fish trypsin, as Pacific cod and saffron cod (24 kDa) (Fuchise et al., 2009), tambaqui (23.9 kDa) (Marcuschi et al., 2010); true sardine (24 kDa) (Kishimura et al., 2006); Monterey sardine (25 kDa) (Castillo-Yanez et al., 2005); spotted goatfish (24.5 kDa) (Souza et al., 2005); silver mojarra (26.5 kDa) (Silva et al., 2011); bogue (23 kDa) (Barkia et al., 2010); pirarucu (28 kDa) (Freitas-Junior et al., 2012); golden gray mullet (23 kDa) (Bkhairia et al., 2015).

3.2. Enzyme characterization

In order to investigate the nature of the purified enzyme, the effect of different protease inhibitors were tested (data not shown). Trypsin-like was strongly inhibited by the presence of serine proteases inhibitors like TLCK and PMSF (1.1 % and 11. The first is an irreversible inhibitor of serine proteases, more specifically of trypsin-like. They act on His-46 residue located in the active site of the enzyme and therefore the trypsin was inactivated. A similar result is observed for PMSF on trypsin activity, since it is a strong serine protease that reacts with serine residues. Other fish trypsins were inactivated by these serine proteases

inhibitors, showing a potential reduction on their activity. PMSF inhibited the activity of purified fish trypsin in a range from 2 to 20 %, whereas TLCK range was from 5 to 12 % (Bougatef et al., 2010; Jellouli et al., 2009; Bezerra et al., 2000). These results confirmed that the purified enzyme was a serine proteinase, most likely trypsin.

Trypsin is an alkaline protease that acts better next to the neutral pH, similar to the pH of the intestine lumen where the trypsin practices its function. Tilapia's trypsin showed a good activity over a wide alkaline pH range (7.0 to 12.0), maintaining circa 80 % of relative activity at pH 12.0 (Figure 3). This feature is observed in other fish trypsin (Kishimura et al., 2006, 2007, 2008; Klomklao et al., 2006, 2007; Lu et al., 2008; Castillo-Yanez et al., 2005; Kristjansson, 1991). This suggests that the trypsin-like purified has potential for high alkaline conditions required on some industrial applications, like laundry detergent.

Another considerable parameter for the use of enzymes in detergents is their compatibility with detergent components such as surfactant agents. Tilapia's trypsin-like was assayed in the presence of anionic (SDS) and non-ionic (Saponin, Tween 20, Triton X-100 and Triton X-450) surfactants at 0.5 % of initial concentration. The surfactants did not completely denature the trypsin. However the SDS was responsible for a significant loss of the enzymatic activity (Figure 4). This behavior for SDS incubation is justified once the hydrophobic group of this surfactant interacts with the trypsin hydrophobic backbone, resulting in a partial unfolding of this enzyme (Gosh, 2008). Somehow, trypsin-like from Nile tilapia showed more stability on SDS presence than other fish trypsin, maintaining 45.9% of residual activity whereas tambaqui (Esposito et al., 2009), Indian anchovy (Siringan; Raksakulthai and Yongsawatdigul, 2007) and Grey triggerfish (Jellouli et al., 2009) trypsin residual activity were 15%, 0.7% and 23.8%, respectively.

For most trypsins, the calcium ion is an important ligand that acts accelerating the transformation of trypsinogen into trypsin and also stabilizes the enzyme against auto

digestion at high temperatures (Mc Donald and Kunits, 1941; Sipos and Merkel, 1970). An effective thermal stability by calcium ion is commonly observed for mammalian trypsin (Lacerda et al., 2014). In the presence of Ca^{+2} , some fish trypsin are indifferent or slightly inhibited (Jellouli et al., 2009, Bezerra et al., 2005; Freitas-Junior et al., 2012) or also could become more thermal stable, like mammalian trypsins (Fuchise et al., 2009; Kishimura et al., 2008). In this context, the effect of calcium ion was tested on the activity and thermal stability of trypsin-like from Nile tilapia.

Thermal stability was carried out in the presence of 5 mM calcium ion and 5 mM EDTA (ion chelating) at final concentration in a wide range of temperatures (20 to 65 °C), using BAPNA as substrate (Figure 5). The stability to high temperatures on calcium ion presence was slightly higher when compared with the EDTA control. This behavior is explained by the fact that trypsinogen and trypsin commonly have two calcium-binding sites, but the second one is found only in zymogene form. When the primary calcium-binding site is occupied by the ion, a conformational change occurs, promoting stabilization against thermal denaturation or autolysis by making trypsin structure more compact (Fuchise et al., 2009). Tilapia's trypsin tolerated the heating, retaining until 50 % of its residual activity at 60 °C. Kishimura et al. (2008) reported the relationship between habitat temperature of fish and their trypsin thermal stability. The study indicated strong positive correlation, showing a higher potential for tropical fish trypsin to deal with high temperatures and less capability to cold and temperate fish trypsin.

The effect of calcium ion on trypsin activity was evaluated by incubation of calcium chloride at different concentrations and demonstrated an increase on its activity when compared with the control, using z-FR-MCA and BAPNA as substrates (Figure 6). With z-FR-MCA the residual activity was increased in almost 150 % at 15 mM calcium ion presence, compared to the 100% control with 0.5 mM calcium ion. When BAPNA was used as

substrate for the same assay the result exhibited a difference on trypsin activity that showed less activation by calcium presence. Nevertheless, 7 mM, 12 mM and 15 mM of calcium ion displayed an increase on trypsin activity (122.32 %, 110.9 % and 116.39 % of residual activity, respectively). Table 2 shows an enzyme kinetic where the hydrolysis of z-FR-MCA by tilapia's trypsin was assayed on the presence of calcium ion and on its absence. The results demonstrated that when the trypsin is incubated with 15 mM Ca^{2+} a decrease on K_m values occurred, which indicated more affinity for the fluorescent substrate. Moreover the catalytic efficiency was higher on calcium ion presence. A possible explanation for this result may be by the fact that calcium ion promotes a conformational change on trypsin structure probably modifying the substrate site, increasing enzyme-substrate affinity. Another possibility is that high concentrations of calcium result on a shifting of the existing equilibrium between the inactive toward the active form (Sipos and Merkel, 1970).

Polyethylene glycol (PEG) is a linear or branched polyether with terminal hydroxyl groups with different molecular weight (up to tens of thousands) (Langel et al., 2009). Since 1970, PEG has been used for many pharmaceutical approaches due its low toxicity and its ability to stabilize, activate proteins in biological processes and prolong the protein half-lives when administered intravenously into animals (Soares et al., 2002; Matsuyama et al., 1991). Different molecular weights of PEG (600, 1,500, 4,000, 6,000, 8,000 and 12,000 g/mol) were tested on trypsin-like activity. The enzyme was activated by PEG presence with all molecular weights, specially 8,000 g/mol which improves trypsin activity in 81% when compared to the control without PEG (figure 7). The association with trypsin and PEG is a method to improve the use of this enzyme on pharmaceutical and medicine processes, as repair between cartilage and bone (Chen et al., 2000), wound healing (Rodeheaver et al., 1974) and other therapeutics uses (Gudmundsdóttir and Pálsdóttir, 2005), prolonging its half-life and increasing its activity in these processes.

The use of Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) peptides is an important way to better understand the cleavage mechanism of proteases specificity. The hydrolysis of FRET generates fluorescence which permits the measurement of enzymatic activity (Carmona; Juliano and Juliano, 2006). Two different series of synthetic fluorogenic tetrapeptides (Abz-R↓XFK-Eddnp and Abz-XR↓FK-Eddnp) were tested to extend the knowledge of tilapia's trypsin cleavage specificity for positions P₁' and P₂. Kinetic parameters of trypsin hydrolysis of FRET were investigated, as Michaelis constant (K_m), catalytic constant (k_{cat}) and catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) and they are showed on table 3. Tilapia's trypsin exhibited greater efficiency by hydrolyzing substrates presenting Asparagine (N), Histidine (H) and Threonine (T) residues at P₁'. Low catalytic efficiency was observed for the amino acids residues of Tyrosine (Y), Leucine (L), Glutamine (Q), Serine (S) and Isoleucine (I) for the same position. At P₂ position tilapia's trypsin had higher affinity for Isoleucine (I), Leucine (L) and Aspartic Acid (D). Trypsin from the tropical fish tambaqui also showed a catalytic efficiency for hydrolyzing substrate with a leucine residue at P₂ position (Marcuschi et al., 2010).

4. Conclusion

The present work showed a purification and characterization of a trypsin-like from Nile tilapia intestine. The enzyme presents a molecular weight of 23.9 kDa and remained active during all the procedures. The trypsin-like was stable at high temperatures and in a wide pH range. Moreover the enzyme remained activity in the presence of different surfactants agents, including SDS. An interesting result for tilapia trypsin was the increase on its activity by calcium ion and polyethylene glycol (PEG) presence at different concentrations, which could enhance the potential for trypsin in different industrial and medicine processes. The

characterization showed that Nile tilapia viscera are important source of trypsin with high potential to use in biotechnology and for detergent and food industry.

Acknowledgements

This study was financially supported by the following Brazilian agencies: CAPES and CNPq.

5. References

- Barkia, Ahmed et al. Trypsin from the viscera of Bogue (*Boops boops*): isolation and characterisation. **Fish physiology and biochemistry**, v. 36, n. 4, p. 893-902, 2010.
- Bkhairia, I. et al. Biochemical and molecular characterisation of a new alkaline trypsin from *Liza aurata*: Structural features explaining thermal stability. **Food chemistry**, v. 196, p. 1346-1354, 2016.
- Bezerra, R. S. et. al. Characterization of stomach and pyloric caeca proteinases of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Journal of Food Biochemistry**. 189-199 p, 2000
- Bezerra, R. S. et al. Partial purification and characterization of a thermostable trypsin from pyloric caeca of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Journal of Food Biochemistry**. 199-210 p, 2001.
- Bezerra, R. S. et. al.. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, 1829-1834 p, 2005.
- Bougatef, A. et al. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. **Food chemistry**, v. 118, n. 3, p. 559-565, 2010.
- Bougatef, A. Trypsins from fish processing waste: characteristics and biotechnological applications e comprehensive review. **Journal of Cleaner Production**. 1-9 p, 2013.
- Carmona, A K. et al. A continuous fluorescence resonance energy transfer angiotensin I-converting enzyme assay. **Nature protocols**, v. 1, n. 4, p. 1971-1976, 2006.

Castillo-Yáñez, F. J. et al. Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 140, n. 1, p. 91-98, 2005.

Chen, J., Maniwa, S., Ochi, M. Influence of trypsin on the biological bonding of cartilaginous surface to bone in rabbits. **Archives of orthopedic and trauma surgery**, v. 120, n. 10, p. 587-591, 2000.

Espósito, T. S. et. al. Fish processing waste as a source of alkaline peptidases for laundry detergent. **Food Chemistry**. 125–130 p, 2009.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FishStat Plus**: Universal software for fishery statistical time series. Disponível on-line: <http://www.fao.org>.2014

Lee-Shing, F.; Shu-Fen, C. Effect of salinity on the activities of digestive proteases from the tilapia fish, *Oreochromis niloticus* in different culture environments. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 93, n. 2, p. 439-443, 1989.

Freitas-Júnior, A. C. V. et al. Giant Amazonian fish pirarucu (*Arapaima gigas*): its viscera as a source of thermostable trypsin. **Food chemistry**, v. 133, n. 4, p. 1596-1602, 2012.

Fuchise, T. et al. Purification and characteristics of trypsins from cold-zone fish, Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) and saffron cod (*Eleginus gracilis*). **Food Chemistry**, v. 116, n. 3, p. 611-616, 2009.

Ghosh, S. Interaction of trypsin with sodium dodecyl sulfate in aqueous medium: a conformational view. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 66, n. 2, 178-186 p, 2008.

Gudmundsdóttir, A.; Pálsdóttir, H. M. Atlantic cod trypsins: from basic research to practical applications. **Marine Biotechnology**, v. 7, n. 2, 77-88 p, 2005.

Gupta, R., Beg, Q., Lorenz, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 59, n. 1, p. 15-32, 2002.

Jellouli, K. et al. New alkaline trypsin from the intestine of grey triggerfish (*Balistes capriscus*) with high activity at low temperature: purification and characterisation. **Food Chemistry**, v. 116, n. 3, p. 644-650, 2009.

Kishimura, H. et al. Characteristics of trypsins from the viscera of true sardine (*Sardinops melanostictus*) and the pyloric ceca of arabesque greenling (*Pleuroprammus azonus*). **Food Chemistry**, v. 97, n. 1, p. 65-70, 2006.

Kishimura, H. et al. Trypsins from the pyloric ceca of jacobever (*Sebastes schlegelii*) and elkhorn sculpin (*Alcichthys alcicornis*): isolation and characterization. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1490-1495, 2007.

Kishimura, H. et al.. Characteristics of trypsin from the pyloric ceca of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*). **Food Chemistry**, v. 106, n. 1, 194-199 p, 2008.

Klomklao, S. et al. Trypsins from yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) spleen: purification and characterization. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 144, n. 1, p. 47-56, 2006.

Klomklao, S. et al. Purification and characterisation of trypsins from the spleen of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). **Food chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1580-1589, 2007.

Kristjansson, M. M. Purification and characterization of trypsin from the pyloric caeca of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 39, n. 10, p. 1738-1742, 1991.

Lacerda, C. D. et al. Gamma trypsin: Purification and physicochemical characterization of a novel bovine trypsin isoform. **International journal of biological macromolecules**, v. 70, p. 179-186, 2014.

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

Langel, U. et al. Introduction to peptides and proteins. **CRC Press**, 2009.

Lassoued, I. et al. Digestive alkaline proteases from thornback ray (*Raja clavata*): Characteristics and applications. **International journal of biological macromolecules**, v. 80, p. 668-675, 2015.

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

Lu, B. et al. Purification and characterisation of trypsins from the pyloric caeca of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*). **Food chemistry**, v. 110, n. 2, p. 352-360, 2008.

Marcuschi, M. et. al.. Purification, characterization and substrate specificity of a trypsin from the Amazonian fish tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Biochemical and biophysical research communications**, v. 396, n. 3, 667-673 p, 2010.

Matsuyama, H., T. R., and Ikezawa, H. Phospholipase D modified with a polyethylene glycol derivative. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 39, n. 3, p. 743-746, 1991.

McDonald, M. R.; Kunitz, M. The effect of calcium and other ions on the autocatalytic formation of trypsin from trypsinogen. **The Journal of general physiology**, v. 25, n. 1, p. 53-73, 1941.

Rodeheaver, G. et al. Proteolytic enzymes as adjuncts to antibiotic prophylaxis of surgical wounds. **The American Journal of Surgery**, v. 127, n. 5, p. 564-572, 1974.

Silva, J. F. et al. Purification and partial characterisation of a trypsin from the processing waste of the silver mojarra (*Diapterus rhombeus*). **Food chemistry**, v. 129, n. 3, p. 777-782, 2011.

Sipos, T., Merkel, J. R. Effect of calcium ions on the activity, heat stability, and structure of trypsin. **Biochemistry**, v. 9, n. 14, p. 2766-2775, 1970.

Siringan, P.; Raksakulthai, N.; Yongsawatdigul, J. Partial purification and characterization of trypsin-like proteinases in Indian anchovy (*Stolephorus* spp.). **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 82-89, 2007.

Smith, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical biochemistry**, v. 150, n. 1, 76-85 p, 1985.

Soares, A. L. et al. Effects of polyethylene glycol attachment on physicochemical and biological stability of E. coli-asparaginase. **International journal of pharmaceutics**, v. 237, n. 1, p. 163-170, 2002.

Souza, A. A. G., et. al. Trypsin-like enzyme from intestine and pyloric caeca of spotted goatfish (*Pseudupeneus maculatus*). **Food Chemistry**, v. 100 1429–1434p, 2007

Unajak, S. et al. Characterisation of thermostable trypsin and determination of trypsin isozymes from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). **Food chemistry**, v. 134, n. 3, p. 1533-1541, 2012.

Figures

Figure 1. SDS-PAGE Electrophoresis of purified trypsin from tilapia; Lane 1 – Pattern of standard protein bands; Lane 2 – purified trypsin (final step – Size exclusion column).

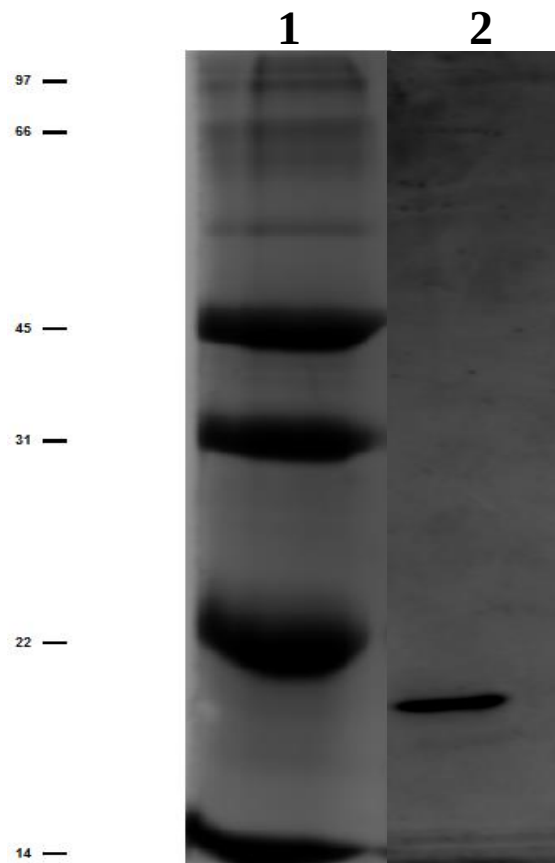


Figure 2. Mass spectrum (MALDI TOF) from the purified enzyme was comprised of two main peaks – one with 23.9 kDa and the other with half this value, 11.9 kDa.

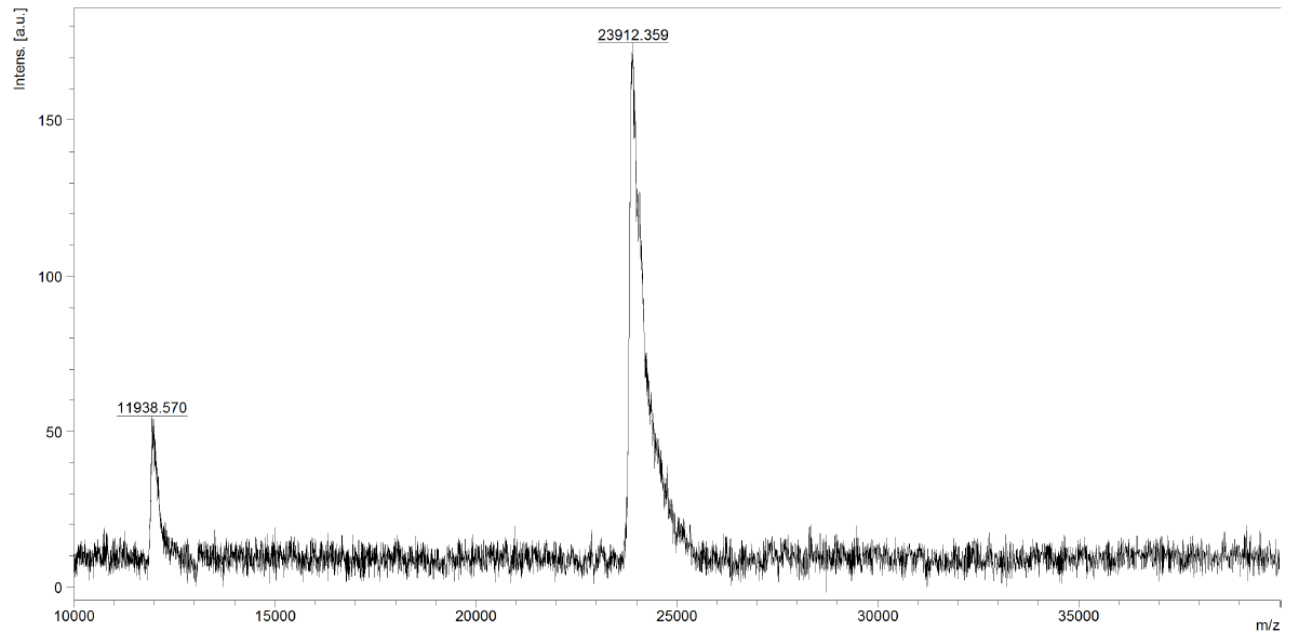


Figure 3. Effect of a pH (6.0 to 12.0) on trypsin activity. Assay was performed with universal buffer, made with Glicine, Tris, Acetic Acid and MES buffers, and z-FR-MCA as substrate.

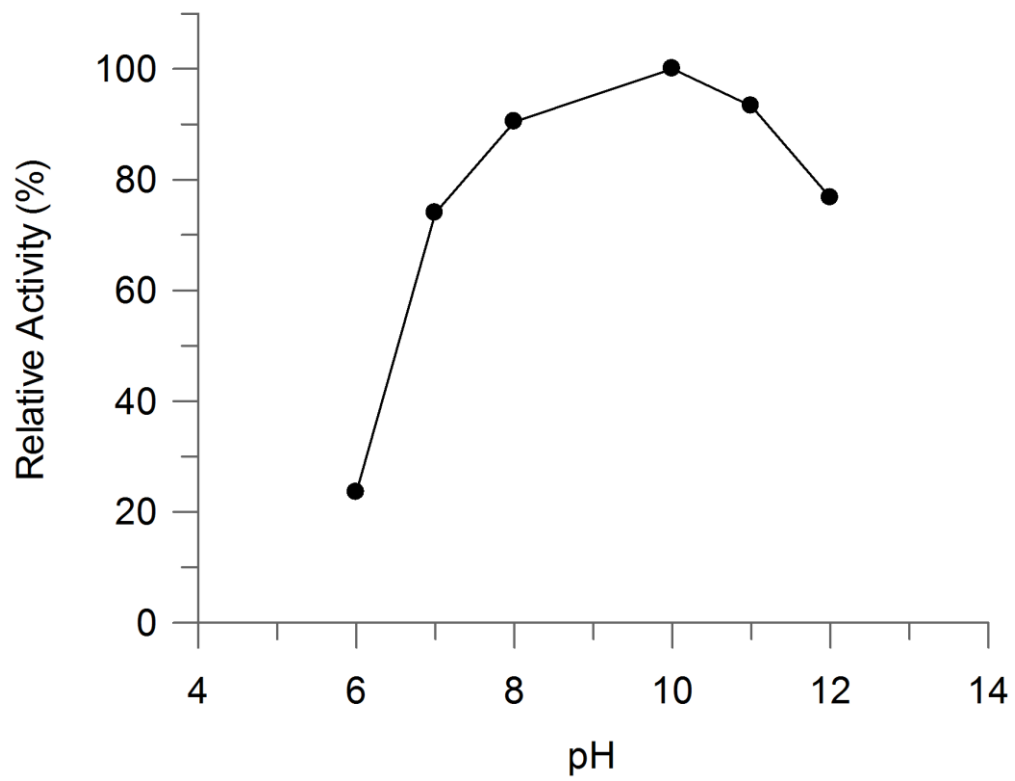


Figure 4. Residual activity of *Tilapia* trypsin, measured after 30 min incubation with surfactants at 0.5% final concentration, using z-FR-MCA as substrate.

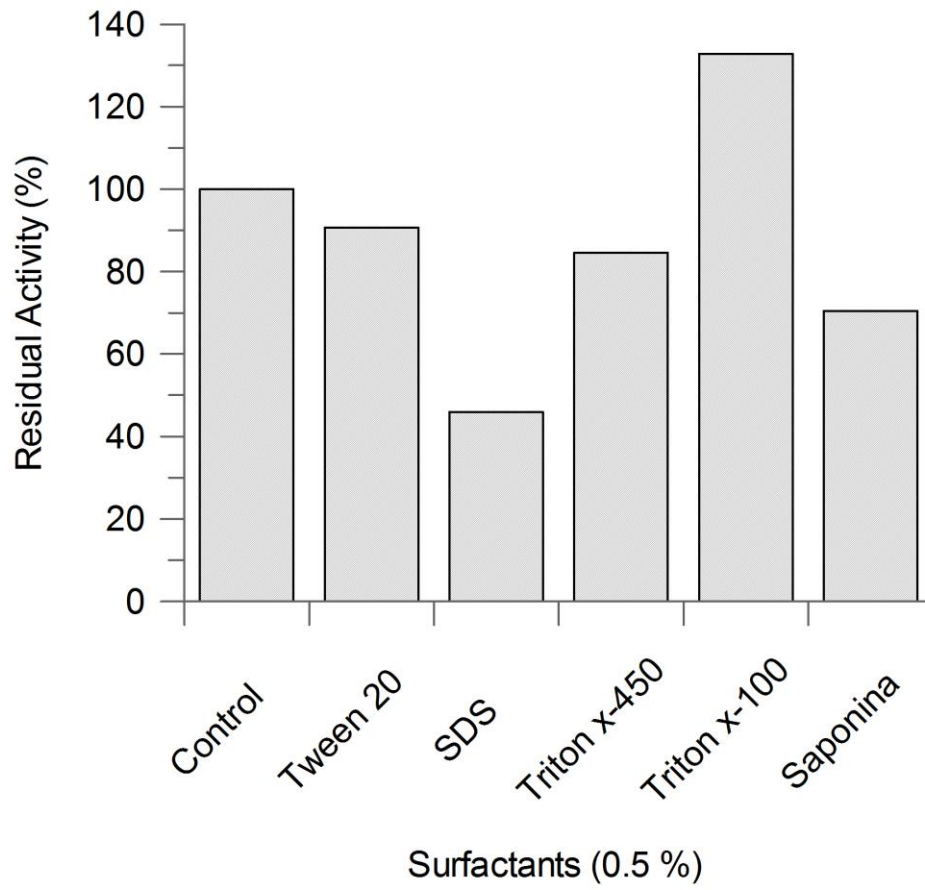


Figure 5. Trypsin thermal stability after 30 min incubation at a range of temperatures (20 °C to 65 °C) on the presence of 5 mM CaCl_2 and 5 mM EDTA and the residual activity was measured using BAPNA as substrate.

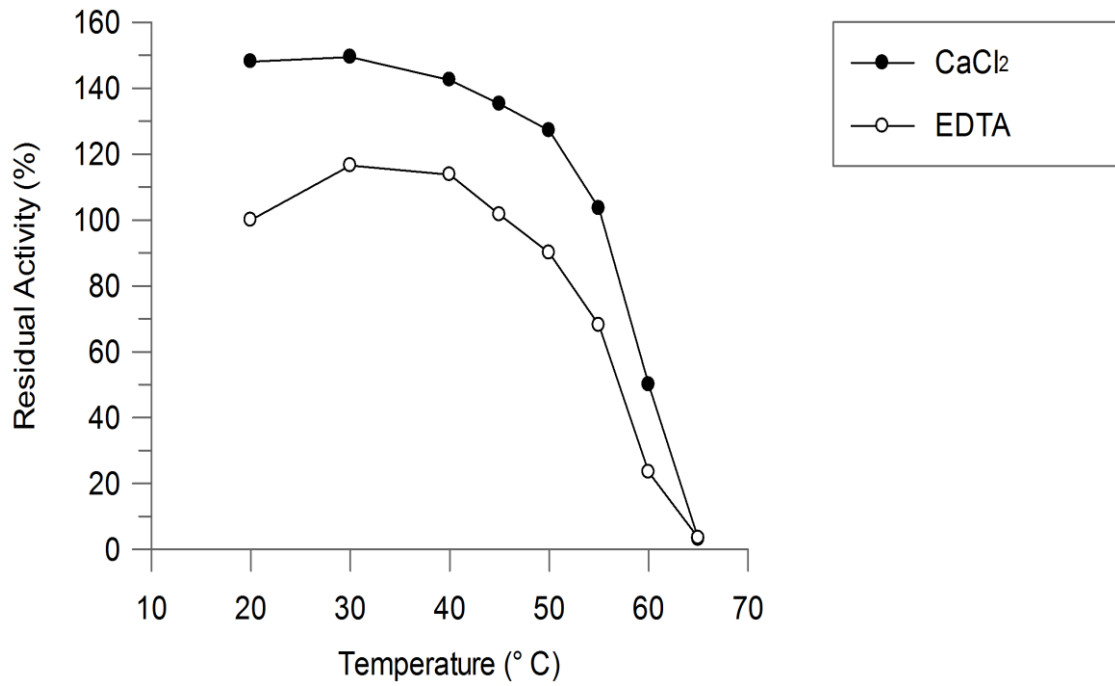


Figure 6. Activation of trypsin activity by calcium ion incubation using z-FR-MCA and BAPNA as substrate.

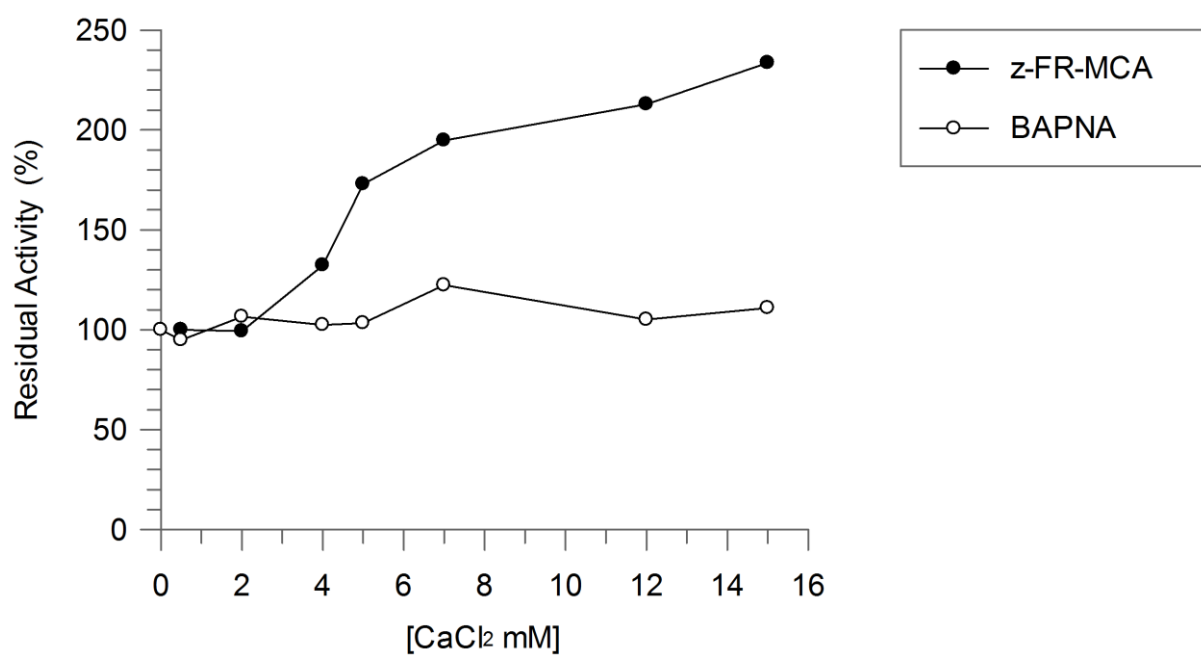
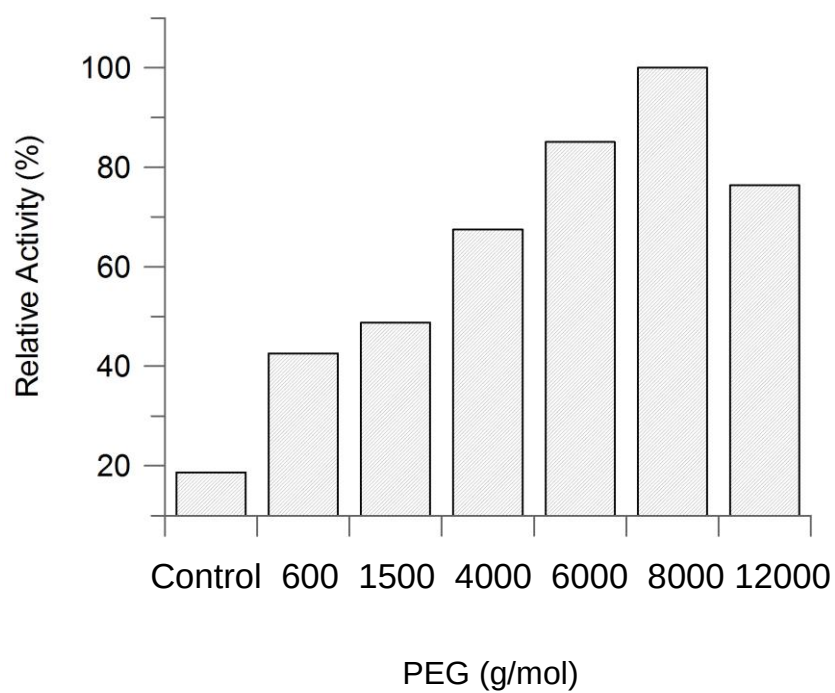


Figure 7. Effect of PEG at different molecular weights (600 to 12,000 g/mol) on trypsin activity for 15 min of incubation and relative activity measured using z-FR-MCA as substrate.



Tables

Table 1. Purification summary of the trypsin-like from tilapia.

Purification steps	Total protein (mg)	Total Enzyme activity (U mL ⁻¹)	Specific enzyme activity (U mL ⁻¹ mg ⁻¹)	Yield (%)	Purification
Crude extract	0.120	2506.87	33.32	100.0	1.0
Affinity Chromatography	0.157	712.97	113.29	28.4	3.4
Size exclusion Chromatography (Superdex G-75)	0.085	274.62	190.93	11.0	5.7

Table 2. Kinetics parameters of tilapia trypsin with and without 15 mM calcium ion for the hydrolysis of z-FR-MCA.

	K_m (μM)	k_{cat} (S^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{S}^{-1} \text{M}^{-1}$)
Trypsin	4.13	5.44	1.32
Trypsin with 15 mM CaCl_2	1.55	7.39	4.75

Table 3. Kinetic parameters from the hydrolysis of two series of synthetic fluorogenic peptide substrates by trypsin-like from tilapia – Abz-RXFK-EDDnp (X represents P₁') and Abz-XR₁FK-EDDnp (X represents P₂).

Abz-R ₁ FK-EDDnp				Abz-XR ₁ 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)
RYFK	0.85	20.82	0.04	DRFK	71.95	4.92	14.62
RHFK	0.29	0.22	1.29	HRFK	29.92	10.17	2.94
RLFK	0.57	1.23	0.46	LRFK	83.05	3.25	25.53
RNFK	0.81	0.24	3.32	VRFK	30.74	5.50	5.59
RTFK	0.46	0.19	2.40	IRFK	471.09	12.05	39.10
RQFK	1.66	7.99	0.21	SRFK	40.45	19.92	2.03
RSFK	0.81	4.95	0.16	TRFK	5.57	37.80	0.15
RIFK	0.49	1.77	0.28	WRFK	0.24	225.61	0.001

5. ANEXOS

1 - Instruções de autores do periódico do trabalho

Author Guidelines

NIH Public Access Mandate

For those interested in the Wiley-Blackwell policy on the NIH Public Access Mandate, [please visit our policy statement](#).

- [Permissions Request](#)

Visit the new [Author Services](#) today! Features include:

- **Free access to your article for 10 of your colleagues;** each author of a paper may nominate up to 10 colleagues. This feature is retrospective—even articles already published offer this feature for free colleague access.
- **Access in perpetuity** to your published article.
- **Production tracking** for your article and **easy communication with the Production Editor** via e-mail.
- **A list of your favorite journals** with quick links to the Editorial Board, Aims & Scope, Author Guidelines and if applicable the Online Submission website; journals in which you have tracked production of an article are automatically added to your Favorites.

Author Guidelines

Types of Manuscripts

Articles should not exceed 15 double-spaced pages of text (not including references) and should contain no more than 10 figures and/or tables.

Communications to the Editor should not exceed 8 double-spaced pages of text (not including references) and should contain no more than 20 references and 4 figures and/or tables.

Regarding serial or companion papers, which must be reviewed together, no more than two manuscripts may be submitted at the same time.

Reviews and **Mini-Reviews** should be concise and critical assessments of the recent literature on a fast-moving area of contemporary interest. Reviews should not exceed 22 double-spaced pages of text (not including references) and should contain no more than 15 figures and/or tables. Mini-Reviews should not exceed 8 double-spaced pages of text, and should not contain more than 20 references and 4 figures and/or tables. Authors must contact the Board of Review Editors at atbiotechbioeng@wiley.com on the suitability of a subject and the qualifications of the authors before submitting a Review or Mini-Review.

Exceptions to the lengths of the various types of manuscripts will be considered on an individual basis upon request by the authors. The authors must explain clearly, upon manuscript submission, the reasons for the longer manuscript.

Commentaries provide a forum for communication of opinion, insight, and interpretation on a recently published B&B paper and are submitted at the request of our editors.

Perspectives are submitted at the request of the Editor-in-Chief.

Manuscript Submission

The journal to which you are submitting your manuscript employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published works.

Biotechnology and Bioengineering is a member of, and subscribes to the principles of, the [Committee on Publication Ethics \(COPE\)](http://www.publicationethics.org) (www.publicationethics.org).

All manuscripts must be submitted online at mc.manuscriptcentral.com/bit. Specific requirements for manuscript submission are detailed at the ScholarOne Manuscripts website on the "Submit a Manuscript" page. The following items are also required as part of the manuscript submission process:

- A cover letter containing a brief statement regarding the important contributions of the submitted paper and the reason(s) it should be published in *Biotechnology and Bioengineering*
- The subject category best suited for the manuscript content
- The names, addresses, phone numbers and e-mail addresses of four or five potential independent reviewers
- Image and text for graphical Table of Contents

The suggested reviewers should not be affiliated with the institution of the authors. Please note that the list of reviewers should **not** include the Editor-in-Chief or any of the Associate Editors of *Biotechnology and Bioengineering*. The authors may request that certain reviewers be excluded from reviewing their paper if they feel that these reviewers may be unfavorably biased.

Biotechnology and Bioengineering is initiating publication of a graphical Table of Contents. Please supply an image and text for this purpose that adheres to the following guidelines:

Image: Colorful, mostly square images are optimal. Please make sure images are of high enough quality for online publication.

Text: Descriptive text (2-3 sentences; 80 word maximum) which should capture the most compelling aspects of the work, aimed at a broad readership.

Conflict of Interest Disclosure: *Biotechnology and Bioengineering* requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise, that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or indirectly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include but are not limited to patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication in this journal.

If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission. It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and to collectively list in the cover letter to the Editor-in-Chief, in the manuscript (in the Acknowledgments section), and in the online submission system ALL pertinent commercial and other relationships.

Questions regarding manuscript submission should be directed to the Editorial Office at biotechbioeng@wiley.com or (201) 748-6232.

Manuscript Preparation

Prepare your text in Word, Post Script or Rich Text Format, using American spelling and grammar. We also accept manuscripts created with LaTeX.

Do not embed figures or tables in the document. The text and references should be double-spaced with one inch margins. Use Times New Roman size 12 font or equivalent.

All manuscripts should have a separate title page with the title of the paper, the names and affiliations of all authors, the name, address, phone number and e-mail address (and FAX number if available) of the corresponding author, and a short running title of no more than 45 characters.

Articles should contain an Abstract, Introduction, Materials and Methods (including Computational Methods), Modeling or Theoretical Aspects (optional), Results, Discussion (can be combined with Results), Conclusions (optional), Acknowledgments (optional), Nomenclature (optional), and References.

Communications to the Editor should not be divided into sections except for Materials and Methods (including Computational Methods). A short Abstract (preferably less than 200 words), a brief introduction (not divided into its own section), Acknowledgments (optional), and References should be included. Communications to the Editor are subjected to the same review process as Articles, and they should not constitute preliminary investigations.

Reviews and **Mini-Reviews** should contain an Abstract, a brief Introduction, appropriate subsections for various topics, Acknowledgments, and References.

All types of manuscripts begin with a title page consisting of the title of the manuscript, author affiliation, and the corresponding author information. Page 2 of the manuscript should consist of an Abstract followed by Keywords (3–6 key words or phrases). The body of the manuscript should begin on page 3. For all types of manuscripts, the list of References should be followed by the Tables, the List of Figures with their legends (separate from the images), and finally the numbered copies of the Figures. Acknowledgments of personal or financial assistance should be made in a separate paragraph following the Discussion or Conclusions sections.

Supplementary Online Material: Authors are invited to submit supplementary material for their articles. Supplementary material may include (but is not limited to) video clips, analytical and spectral characterization data, crystallographic information files, large sections of tabular data, derivations, program code, or graphical files that are not suitable for print media. Supplementary material for published articles will be made available via a link in the online version of the article.

The title should be specific, informative and as short as possible. For Articles, the main text of the paper should be reasonably divided into subsections as necessary by inserting appropriate headings. Please refer to any issue of *B&B* for examples. Do not use footnotes in the text. The Erratum section allows authors to correct inadvertent (e.g. typographical) errors in published papers. Changes or additions to the manuscript and its data are not permitted. Errata should be submitted directly to the publisher.

References

The list of References should include all relevant and necessary published work, and all listed references must be cited in the text. The reference list should be arranged in alphabetical order by first author. Do not use numbers. In the text, references should be cited by the author's surname with year of publication in parentheses. For more than two authors, e.g., Briggs, Porter, and King (1993), the reference citation in the text would be Briggs et al. (1993). If there is more than one citation in the same place, put the different citations in parentheses, in alphabetical order, and separated by a semicolon, e.g., (Adam, 1995; Dorow and O'Neal, 1974). Journal titles should be abbreviated according to the *Chemical Abstracts Service Source Index*.

The listed references should include only published journal papers, books, book chapters, and Ph.D. theses and dissertations. Manuscripts in preparation or submitted, abstracts, meeting presentations, editorials, patents, M.S. theses, letters to the editor, published science briefings, and in general all other published material that has not been edited or refereed should not be listed in the References. Such material can be mentioned parenthetically in the text. If an "in press" publication is included in the list of References, a copy must be submitted with the manuscript as Supplementary Material so that this reference can become available to the reviewers. For reference citations, follow the styles of the examples below:

Journal article

King VM, Armstrong DM, Apps R, Trott JR. 1998. Numerical aspects of pontine, lateral reticular, and inferior olivary projections to two paravermal cortical zones of the cat cerebellum. *J Comp Neurol* 390:537-551.

Book

Voet D, Voet JG. 1990. *Biochemistry*. New York: John Wiley & Sons. 1223 p.

Book chapter

Gilmor ML, Rouse ST, Heilman CJ, Nash NR, Levey AI. 1998. Receptor fusion proteins and analysis. In: Ariano MA, editor. *Receptor localization*. New York: Wiley-Liss. p 75-90.

Tables

Tables should be numbered with capital Roman numerals in the order they appear in the text. All table columns should have an explanatory heading. Duplication of information contained in tables and figures should be avoided as much as possible. Long tables containing a large amount of information can be avoided by showing only typical or the most important results.

Prepare your tables in Word, Post Script or Rich Text Format. Do not embed tables in the text portion of the manuscript.

Figures and Illustrations

Number figures sequentially using Arabic numbers. All figures must be accompanied by a figure legend. The list of figure legends should follow the Tables section.

To ensure the highest print quality, your figures must be submitted in .TIF format according to the following minimum resolutions:

- 300 dpi (dots per inch) for black and white line art (simple bar graphs, charts, etc.)
- 300 dpi for halftones (black and white photographs)
- 300 dpi for combination halftones (photographs that also contain line art such as labeling or thin lines)

Vector-based figures (e.g. figures created in Adobe Illustrator) should be submitted in .EPS format. Color figures must be submitted in a CMYK colorspace. Do not submit color figures as RGB.

For best reproduction, bright, clear colors should be used. Dark colors against a dark background do not reproduce well; please place your color images against a white background wherever possible. Please contact the production editor (bitprod@wiley.com) for further information.

Symbols and Nomenclature

The nomenclature sponsored by the International Union of Pure and Applied Chemistry is requested for chemical compounds. All necessary quantities should be defined with units compatible with the SI system. If many symbols are used in the text and in equations it is advisable to assemble the definitions and units of all symbols in a Nomenclature section just before the list of References. Symbols should be assembled alphabetically.

Copyright/Licensing

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement:

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen:

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and

visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

Editorial Policy

All authors take public responsibility for the accuracy, reproducibility and veracity of the content of their submitted work.

Manuscript submission implies all authors meet the criteria described below and that no authors meeting the criteria have been omitted. Authorship is defined by the journal as making a substantial contribution to the manuscript with respect to:

- Substantive intellectual contributions in conception, design or implementation of the work
- Interpretation and analysis of information or data
- Manuscript preparation including writing, critical revision and/or ultimate approval of the drafted manuscript for submission

Manuscripts submitted to *B&B* must represent original research or original review on subjects within the scope of the journal as outlined in the Aims and Scope section (which appears under the Overview link above). All authors must agree to its submission to *B&B* and to the implications of this submission as described below. All authors are responsible for the complete contents of their manuscript. By its submission to *B&B*, all the authors guarantee that the manuscript, in its present or a substantially similar form, has not been published or is not being considered for publication elsewhere. Publication in any reasonably retrievable source constitutes prior publication. Meeting abstracts do not constitute prior publication.

The number of authors on a single manuscript should not exceed 12. Manuscripts that contain more than 12 authors will be returned to the authors without review. Other contributors who do not meet the requirements of authorship may be listed in the Acknowledgments.

It is the authors' responsibility to obtain permissions for reproduction of figures, tables, or text from published work. The publisher of a journal or book is the copyright owner from whom the written permission must be obtained. Permission from authors is also encouraged as a professional courtesy.

Although *Biotechnology and Bioengineering* encourages international submissions, we require that authors employ American spelling and grammar. Authors who are not fluent in English are strongly encouraged to seek outside assistance with manuscript preparation. Manuscripts can be rejected or returned to the authors solely on the basis of substandard English.

Revised manuscripts must be returned within 6 weeks upon receiving notification with the reviews by an editor. Otherwise, they will be considered withdrawn and treated as new manuscripts upon resubmission.

Proofs will be sent to the corresponding author who must be identified on the title page. *Page charges* will not be made.

Reprints may be ordered at <https://caesar.sheridan.com/reprints/redir.php?pub=10089&acro=BIT>. All *color figures* will be reproduced in full color in the online edition of the journal at no cost to authors. Authors are requested to pay the cost of reproducing color figures in print; the fee is \$500 per color page. Authors are encouraged to submit color illustrations that convey or clarify essential scientific information.

Cover Illustrations: Authors may submit color figures for use as cover illustrations. These illustrations may be related to, but not necessarily included in, their manuscript. Alternatively, authors may submit figures which portray the fields of biotechnology and bioengineering at the molecular, cellular, bench-top, or production level as possible cover illustrations in keeping with the general themes of the journal. Authors should submit a brief description of their illustration if it is not included in their manuscript.

Submission of Protein Structures: Authors are expected to deposit the coordinates for new protein structures in the Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>) and include the assigned identification codes in the manuscript.

Submission of Sequence Data: The Editors encourage the use of widely accessible genetics databases as repositories for newly determined nucleotide and/or amino acid sequence data. Authors should always include the appropriate database (e.g. GenBank) accession number(s) in the Materials and Methods section of the manuscript.

Deposition of Cultures: Authors are encouraged to deposit important strains in publicly accessible culture collections and include the collection and strains designations in the text of the manuscript.