



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE PROTEASES DE
INTESTINO DE TILÁPIA DO NILO COMO ADITIVO PARA A
INDÚSTRIA DE DETERGENTES**

CHIRLEANNY MACIEL MENDES

Orientadora: Profa. Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha

Co-orientadores: Profa. Dra. Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão

Prof. Dr. Luis Bezerra Carvalho Júnior

Recife, 2007

CHIRLEANNY MACIEL MENDES

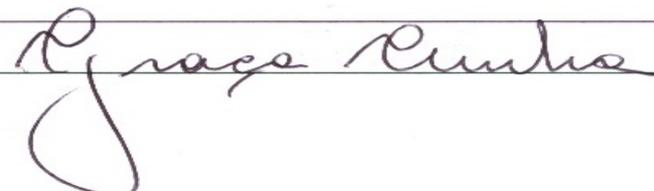
**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE PROTEASES DE
INTESTINO DE TILÁPIA DO NILO COMO ADITIVO PARA A
INDÚSTRIA DE DETERGENTES**

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

Aprovado por:



Doreza Coqueiro



Graça Cunha

Data: ____/____/____

Mendes, Chirleanny Maciel
Avaliação da estabilidade de proteases de intestino de Tilápia do Nilo
como aditivo para a indústria de detergentes/ Chirleanny Maciel Mendes.
– Recife: O Autor, 2007

35 folhas: il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Departamento de Bioquímica, 2009.

Inclui bibliografia

1. Proteases-enzimas. 2. Tilápia do Nilo. 3. Aditivo de detergentes. I Título.

577.15
572.7

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
CCB – 2009- 52

Índice Analítico

Mensagem.....	iv
Dedicatória.....	v
Agradecimentos.....	vi
Lista de figuras.....	viii
Lista de tabelas.....	ix
Resumo.....	x
Abstract.....	xi
1. Introdução e Justificativa.....	12
2. Revisão de Literatura.....	14
2.1 Proteases.....	14
2.2 Proteases Digestivas de Peixes.....	16
2.3 Tilápia do Nilo.....	18
2.4 Detergentes.....	20
2.5 Planejamento Estatístico.....	24
3. Objetivos.....	26
3.1 Objetivo Geral.....	26
3.2 Objetivos Específicos.....	26
4. Artigo submetido para publicação no periódico Chemical Papers.....	27
5. Conclusões.....	28
6. Referências Bibliográficas.....	29

Sei de muito pouco. Mas tenho a meu favor tudo que não sei.

Clarisse Lispector

À minha mãe, Edilene, e aos meus irmãos, Claylton e Claylson.
Mais uma vez!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por plantar o sonho do mestrado em meu coração e permitir-me vivê-lo. Pelo amor e misericórdia.

A minha mãe, Edilene, e meus irmãos, Claylton e Claylson, pelo amor incondicional, incentivo em todas as horas e confiança.

A minha orientadora, Prof. Dr^a. Maria das Graças Carneiro da Cunha, pela confiança, acolhimento e respeito, fundamentais à realização deste trabalho.

A Prof. Dr^a. Ana Maria dos Anjos Carneiro-Leão pela co-orientação e incentivo.

Ao Prof. Dr. Luis Bezerra Carvalho Junior pela co-orientação e respeito.

A Prof. Dr^a. Ana Lúcia Figueiredo Porto pelas sugestões sempre pertinentes e respeito a mim direcionados.

Ao Prof. Dr. Ranilson Bezerra pelas dicas e disponibilização das instalações do LABENZ.

A Profa. Dra. Patrícia Paiva pela gentil doação do inibidor de tripsina de *Cratylia mollis*-ITCm.

A todos os professores do Programa pela contribuição para a formação de mestres comprometidos com a ética na docência e na pesquisa.

Ao Prof. Dr. Athiê Guerra, diretor da Estação de Aqüicultura Continental Prof. Jokei-Koike (UFRPE) pela doação das tilápias e a João do Carmo pela boa vontade em ajudar na obtenção e coleta dos peixes.

A Givanildo, Ian e Talita pela valiosa, fundamental e bem-humorada ajuda no início e decorrer dos experimentos.

A Tatiana Porto pela disponibilidade na elaboração e avaliação da parte estatística deste trabalho.

As amigas do mestrado: Érika, Jayra, Renata, Alessandra, Flavinha, Daniele, Paula, e ao amigo Igor por tantos momentos de trabalho e laser compartilhados ao longo de dois anos.

A todos os colegas do Setor de Bioquímica (LIKA), especialmente a Ricardo Souza e Marília Aguiar, por estarem sempre prontos a ajudar, pela confiança e amizade.

À amiga Cristiane Moutinho pela amizade, apoio/torcida e bronca nos momentos necessários.

À amiga Kely pelo carinho de sempre.

Aos amigos Cosme, Sabrina, Renata, Ana Linda, Cris, Ricardo Magalhães, Allyson, Joilson, Zaqueu, Marcelo e Adecarlos pelos momentos de descontração.

Aos colegas do LIKA: Camila, Germana, Tatianny, Edgar, Maria Daniele, Roberto e Daniele Viana por toda a boa vontade e pelos momentos engraçados.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica: Neide, Miron, Djalma, Albérico, Sr. João, Dona Helena e Sr. Ademar pela prestatividade e carinho.

Aos funcionários do LIKA: Felipe, Izabel, Rafael, Verinha, Cleide, Paulo, Dona Celeste, Moisés e Sr. Otaviano, pelo suporte e carinho.

Ao Diretor do LIKA/UFPE, Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho e à Coordenadora Administrativa do LIKA, Prof^a Dr^a. Elizabeth Chaves, pelo acesso às instalações do Setor de Bioquímica, onde o experimento foi desenvolvido.

A CAPES, pelo apoio financeiro durante todo o trabalho.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 - Cascata de ativação de enzimas digestivas do intestino.....	16
FIGURA 02 - Vista lateral de Tilápia do Nilo linhagem Chitralada.....	19

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Utilização de proteases nos setores industriais.....	15
Tabela 02 - Peixes utilizados para extração e/ou purificação de tripsinas e quimiotripsinas a partir de cecos pilóricos e intestinos.....	17
Tabela 03 - Principais componentes utilizados em formulações detergentes simples.....	21
Tabela 04 - Enzimas utilizadas como aditivos na indústria de detergentes.....	22

RESUMO

As proteases constituem o grupo mais importante dentre as enzimas industriais, principalmente na indústria de detergentes. Uma fonte alternativa e potencial dessas enzimas são as vísceras de peixes, que constituem subprodutos da aquicultura. O presente trabalho objetivou a avaliação da estabilidade das proteases de intestino de tilápia do Nilo, a segunda espécie de peixe exótico mais importante na aquicultura brasileira, e a sua aplicação experimental como aditivo de detergentes através de planejamento estatístico fatorial 2^4 . As proteases do Extrato Enzimático (E.E) foram parcialmente purificadas por tratamento térmico, apresentando um fator de purificação de 3,69 e rendimento de 103.41%. Estas enzimas mostraram atividade máxima e foram estáveis em pH 7,2-11 (120 min), temperatura ótima de 55 °C e estabilidade a 35 e 45°C. Em presença de Saponin (1 % p/v) a atividade proteolítica foi estimulada aproximadamente 15%, enquanto que em Tween 20 e colato de sódio (1 % p/v) as proteases foram estáveis. O surfactante SDS (1 % p/v) inativou-as após 30 min. Em soluções de peróxido de hidrogênio a 5 % e 10 % (v/v) cerca de 65 % de atividade proteolítica foi mantida após 30 min de incubação. As proteases digestivas foram fortemente ativadas pelos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} e a hidrólise dos substratos protéicos obedeceu a seguinte seqüência: caseína > azocaseína > hemoglobina > ovoalbumina > BSA. O modelo estatístico sugeriu que todos os fatores escolhidos (concentração do EE; concentração de detergente; tipo de detergente comercial; tempo de incubação) tiveram um impacto significativo sobre a resposta atividade enzimática. A melhor condição para a utilização das proteases de tilápia do Nilo como aditivos de detergentes foi com extrato contendo 0,299 mg/mL de proteínas, solução do detergente comercial Astrus[®] (3,0 mg/mL), por 30 min.

PALVRAS-CHAVE: Proteases, tilápia do Nilo, aditivo de detergentes, planejamento estatístico

ABSTRACT

The proteases are the most important group of industrial enzymes mainly in the detergent industry. An alternative and potential source of these enzymes is fish viscera, by-products from aquaculture. The present work aimed at the evaluation of stability of proteases from Nile tilapia intestine, the second exotic fish specie most important in Brazilian aquaculture, and its experimental application as detergent additive through a factorial 2^4 statistical planning. The proteases of the Enzymatic Extract (EE) were easily partially, presenting 3.69 fold-purified and 103.41% of yield. These enzymes showed maximum activity and stability at pH 7.2-11.0, temperature optimum of 55°C and stability at 35°C and 45°C (120min). The 1%(v/v) saponin surfactant stimulated their activities about 15% after 120min, while in 1% (v/v) Tween 20 and 1% (w/v) sodium choleate they were stable. The 1%(v/v) SDS surfactant inactivate them after 30min. In 5 and 10%(v/v) hydrogen peroxide solution about 65% of proteolytic activity was kept after 30 min. Intestine proteases were slightly activated by Ca^{2+} and Mg^{2+} and the hydrolysis of proteic substrates obeyed the following sequence: casein > azocasein > hemoglobin > ovoalbumin > BSA. The statistic model suggested that all the factors chosen (EE concentration; detergent concentration; commercial detergent; incubation time) had a significant impact on enzymatic activity. The optimum conditions for Nile tilapia protease can be used as detergent additive were extract with 0.229mg.mL^{-1} of protein, Astrus[®] detergent solution (3.0mg.mL^{-1}), for 30min.

KEYWORDS: Proteases, Nile tilapia, laundry detergent additive, statistic planning

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As enzimas são biocatalizadores de alta especificidade e estão envolvidas em todos os processos bioquímicos que ocorrem nos organismos vivos, tais como nas alterações estruturais de biomoléculas, na expressão gênica e no processamento de nutrientes de natureza macromolecular. Neste último processo, estão particularmente envolvidas as proteases digestivas, enzimas degradativas que hidrolisam as proteínas, permitindo o melhor aproveitamento dos aminoácidos e peptídeos provenientes da dieta, para aquisição de energia pelas células animais (Nelson & Cox, 2002).

Além da importância nos sistemas vivos e dinâmicos, as proteases constituem o grupo mais importante entre as enzimas industriais, sendo responsáveis por cerca de 60% do total das enzimas comercializadas em todo mundo (Sana et al., 2006) para utilização nos setores alimentícios (El-Beltagy et al., 2004), farmacêuticos (Tunga, 2003), de detergentes (Moreira et al., 2002), de curtumes (George, 1995), e de recuperação da prata dos filmes de raios X (Manachini & Fortina, 1998). No entanto, cerca de 30% do total das vendas mundiais de enzimas são direcionadas às indústrias de detergentes, que adquirem proteases alcalinas para serem incorporadas como aditivos (Maurer, 2004; Sana et al., 2006).

Formulações de detergentes contendo proteases passaram a ser preferencialmente utilizadas nas últimas duas décadas e atualmente são líderes na maior parte do mundo. No mercado brasileiro, cerca de 80% dos detergentes apresentam pelo menos uma enzima na sua formulação (www.novozymes.com, 2007). As proteases utilizadas como aditivos atuam sobre manchas específicas ao degradarem os resíduos orgânicos de origem protéica, permitindo assim a substituição ou a redução da utilização de produtos cáusticos, ácidos e solventes tóxicos, que agridem o meio ambiente e promovem o desgaste dos tecidos e de equipamentos (Mitidieri et al., 2002).

Embora as proteases possam ser obtidas de qualquer ser vivo, as mais utilizadas como aditivos de detergentes são obtidas das bactérias do gênero *Bacillus* (Vasconcelos et al., 2006), dado que as suas características satisfazem as necessidades desta indústria a despeito de seu processo de extração implicar custos elevados (Awnar & Sallemuddin, 1998; Moreira et al., 2002). Deste modo, no ambiente altamente competitivo do mercado de detergentes para lavanderia, os fabricantes são constantemente pressionados para a busca de proteases viáveis, não só sob o aspecto

industrial, mas também financeiro, para a sua aplicação como aditivos a fim de satisfazerem, cada vez mais, os consumidores e se consolidarem industrialmente (Saisubramanian et al., 2006; Mitidieri et al., 2002). Neste contexto, destacam-se as vísceras de peixes como fonte alternativa e potencial de enzimas proteolíticas (Bezerra et al., 2005).

Recentemente, proteases parcialmente purificadas de intestino de tambaqui (*Colossoma macropomum*) apresentaram excelentes resultados quanto à proposta de sua utilização como aditivos de detergentes (Espósito, 2006). De igual modo, outro peixe que apresenta enzimas viáveis para as formulações de detergentes é a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), a segunda espécie de peixe exótico mais importante na aquicultura brasileira (Amaral et al., 2006). No processamento desta espécie, os intestinos constituem subprodutos cujo destino corresponde a um problema financeiro e ambiental, já que mais de 12 toneladas deste material foram descartadas somente no ano de 2003 (IBAMA, 2003).

Justifica-se, assim, o presente trabalho devido à relevância das proteases no contexto biotecnológico, aliado à grande quantidade de subprodutos (intestinos) provenientes do beneficiamento da tilápia do Nilo, no sentido de promover a utilização das proteases digestivas como aditivo para a remoção de manchas, tornando-as industrialmente atrativas e conseqüentemente representando uma perspectiva de aproveitamento para estes resíduos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Proteases

Enzimas proteolíticas, proteases, proteinases ou peptidases são sinônimos utilizados para as enzimas que catalisam as reações de hidrólise em ligações peptídicas de substratos protéicos (Nelson & Cox, 2002). As proteases executam uma grande variedade de funções nos organismos vivos, compreendendo a ativação e a participação de cascatas biológicas, como na digestão, homeostasia e inflamação em diversos sistemas, sendo imprescindíveis para o perfeito funcionamento celular (Gavrilescu & Chisti, 2005).

Dependendo do local de ação no substrato, as proteases podem ser subdivididas em dois grandes grupos: exopeptidases e endopeptidases. As exopeptidases atuam próximo das extremidades das cadeias polipeptídicas, podendo ser classificadas como amino ou carboxipeptidases, em função do seu sítio de ação na extremidade amino ou carboxi-terminal, respectivamente. As carboxipeptidases podem ser subdivididas em serino, metalo e cisteíno-carboxipeptidases. As aminopeptidases, em função do número de resíduos de aminoácidos removidos, são classificadas em aminopeptidases (um resíduo), aminodipeptidases (dois resíduos) e aminotripeptidases (três resíduos). Já as endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas das cadeias polipeptídicas e são subdivididas em 4 grupos: serino-proteases, aspartato-proteases, cisteíno-proteases e metalo-proteases (Rao et al., 1998).

Sob o aspecto biotecnológico, as proteases compreendem as enzimas de maior relevância industrial (Gavrilescu & Chisti, 2005), representando cerca de 60% do total de enzimas vendidas mundialmente (Sana et al., 2006).

O sucesso da utilização das proteases nos processos industriais deve-se ao fato de oferecerem numerosas vantagens em relação aos catalisadores químicos, além de exibirem elevada atividade catalítica, possuírem vários substratos específicos, serem produzidas em grandes quantidades e serem economicamente viáveis (Mitidierrei et al., 2006). Deste modo, as proteases têm sido utilizadas nos mais diversos setores industriais, embora entre todas as aplicações as dos setores alimentares e de detergentes sejam as mais relatadas na literatura (Tabela 01).

Tabela 01- Utilização de proteases nos setores industriais

Setor Industrial	Aplicação	Referência
Alimentício	Amaciamento, clarificação, atenuação de sabor, etc	Sana et al. (2006); Rao et al. (1998)
Detergentes	Aditivos clareadores	Vasconcelos et al. (2006); Amaral et al. (2006); Mittidieri et al. (2002)
Farmacêutico	Moléculas bioativas	Sana et al. (2006); Rao et al. (1998)
Curtumes	Degradação de queratina	George et al. (1995)
Filmes de raios X	Recuperação de Prata	Kumar & Takagi (1999)
Produção de papel	Clareamento	Steele & Stowers (1991)

As proteases industriais podem ser extraídas e/ou obtidas de várias fontes biológicas como bactérias, fungos, animais e vegetais, sendo que 40% da produção mundial destas enzimas é obtida de microrganismos (Sana et al., 2006). A desvantagem da utilização destas proteases está relacionada com o alto custo da sua produção, uma vez que todos os parâmetros do crescimento microbiológico para produção enzimática devem ser considerados, desde o monitoramento até a otimização (Awnar & Sallemuddin, 1998).

O aumento na demanda de proteases com propriedades específicas para os diversos setores industriais tem estimulado os biotecnologistas a explorar novas fontes destas enzimas (Mei & Jiang, 2005). É neste contexto que as proteases de origem animal, como os peixes, surgem como uma alternativa a ser considerada.

2.2 Proteases Digestivas de Peixes

As proteases obtidas de peixes têm sido estudadas desde 1940, embora ainda exista pouca informação a respeito de proteases de peixes tropicais, dulcícolas e as suas aplicações biotecnológicas (Bezerra et al., 2005).

A produção e excreção das proteases digestivas destes peixes ocorrem de forma similar ao processo observado em mamíferos. O estômago secreta HCl e contém pepsina, uma protease produzida no epitélio sob a forma de pepsinogênio. Este zimógeno é ativado por autocatálise, liberando cerca de 40 a 50 resíduos de aminoácidos da sua região N-terminal (Kolodziejska & Sikorski, 1996). As proteases digestivas do pâncreas são produzidas sob a forma de zimogênios, como o tripsinogênio e são ativadas no lúmen do intestino pela ação da enteroquinase (enteropeptidase), uma protease intestino anterior, que hidrolisa uma ligação peptídica específica no tripsinogênio, transformando-o em tripsina ativa. A partir de então, as moléculas de enteroquinase juntamente com as de tripsina (recém ativadas) promovem um efeito em cascata (Figura 01), responsável pela ativação de novos tripsinogênios e outros zimogênios como o quimiotripsinogênio, procarboxipeptidase, proelastase e profosfolipase (Brody, 1994). Na maioria dos peixes, contudo, o tecido pancreático encontra-se difuso entre outros órgãos como os cecos pilóricos e intestinos (Glass et al., 1989).

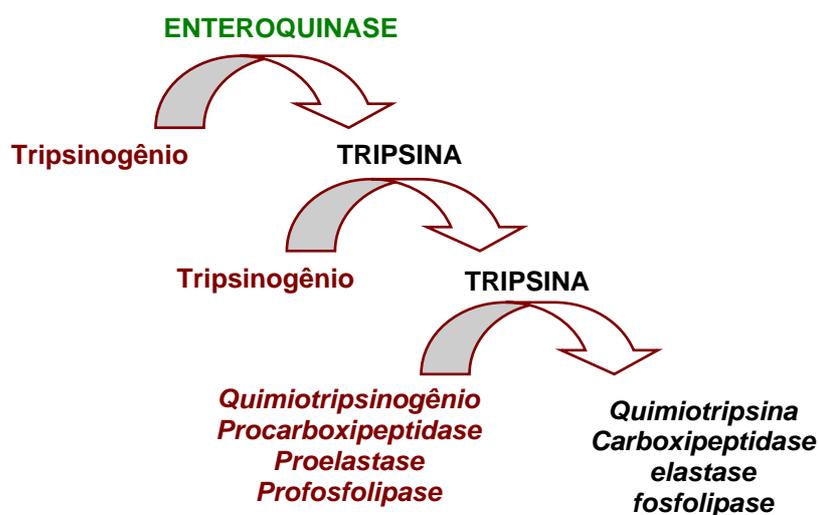


Figura 01 - Cascata de ativação de enzimas digestivas do intestino (Brody, 1994).

Nos últimos anos, tripsinas e quimiotripsinas de peixes têm sido purificadas a partir de intestinos e cecos pilóricos de vários peixes, conforme descrito na Tabela 02.

Tabela 02 – Peixes utilizados para extração e/ou purificação de tripsinas e quimiotripsinas a partir de cecos pilóricos e intestinos

Peixe	Espécie	Referência
Saramunete	<i>Pseudopenaeus maculatus</i>	Souza et al. (2007)
Jacopever”	<i>Sevastes schlegelii</i>	Kishimura et al. (2006)
“Elkhorn sculpin”	<i>Alcichthys alcicornis</i>	Kishimura et al. (2006)
Tilápia do Nilo	<i>Oreochromis niloticus</i>	Bezerra et. al (2005)
Tambaqui	<i>Colossoma macropomum</i>	Bezerra et al. (2001)
<i>Discus fish</i>	<i>Symphysodon aequifasciata</i>	Chong et al. (2002)
Tilápia híbrida	<i>Tilapia nilotica/aurea</i>	El-Shemy & Levin (1997)
<i>Mullet</i>	<i>Mugil cephalus</i>	Guizani et at. (1991)
<i>Atlantic halibut</i>	<i>Hippoglossus hippoglossus</i> L	Glass et al. (1989)
<i>Turboti</i>	<i>Scophthalmus maximus</i> L	Glass et al. (1989)
<i>Dove sole</i>	<i>Solea solea</i> L	Glass et al. (1989)
Carpa	<i>Ciprinus carpio</i>	Cohen et al. (1981)

Alguns aspectos de proteases digestivas obtidas da tilápia do Nilo (*O. niloticus*) já foram discutidos na literatura tais como: purificação e caracterização de uma protease alcalina de intestino (Bezerra et al., 2005) e de uma protease do tipo pepsina de estômago (Yamada & Takano, 1993); efeito da salinidade (Fang & Chiou, 1989); distribuição de enzimas ao longo do tubo digestivo e intestino (Tengjaroenkul et al., 2000), purificação por cromatografia de afinidade usando um inibidor de tripsina imobilizado em partículas paramagnéticas (Rocha, 2002) e imobilização de tripsina em dacron ferromagnético (Amaral et al., 2006).

As proteases digestivas representam uma importante classe de enzimas para aplicações industriais (Bezerra et al., 2005). Estas biomoléculas estão presentes em vísceras (intestinos) de peixes, os quais constituem subprodutos que são simplesmente descartados pelas empresas de aquicultura, gerando ônus financeiro e ecológico. No âmbito biotecnológico, o melhor aproveitamento destes subprodutos está relacionado com uma nova e abundante fonte em potencial de moléculas bioativas, a exemplo das

enzimas proteolíticas (Espóstio, 2006). Estas podem ser purificadas para utilização nos setores farmacêuticos e alimentares ou serem utilizadas em extratos brutos na indústria de detergentes, a qual não requer a enzima totalmente purificada para ser utilizada como aditivo (Gavrilescu & Christi, 2005; Maurer, 2004).

2.3 Tilápia do Nilo

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a segunda espécie de peixe exótico mais importante para a aquicultura brasileira (IBAMA, 2000), sendo a sua produção somente superada pelas das carpas (Kubitza & Kubitza, 2000).

Tilápia é a denominação comum de uma grande gama de espécies de peixes ciclídeos, que se distribuíram originalmente desde o centro-sul da África até o norte da Síria (Popma & Phelps, 1998). Apesar de existirem aproximadamente 70 espécies taxonomicamente classificadas como tilápias e, dentre estas, cerca de 22 serem cultivadas, apenas quatro conquistaram destaque na aquicultura mundial: a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), a tilápia mossâmbica (*O. massambicos*), tilápia azul ou áurea (*O. aureus*) e a tilápia de Zanzibar (*O. urolepsis hornorum*) (Kubitza & Kubitza 2000; El- Sayed, 1999).

A distribuição mundial de tilápias começou com a criação de peixes para a subsistência em países em desenvolvimento (Lovshin & Cyrino, 1998). No Brasil, as primeiras tilápias foram introduzidas nos anos 50 para o povoamento das represas da hidroelétrica *Light*, empresa de abastecimento hídrico do Estado de São Paulo. As tilápias introduzidas eram das espécies *O. massambicos*, *Tilápia rendalli* e *T. zilli*, porém não apresentaram um alto potencial para a aquicultura, por serem de pequeno porte e causarem superpopulação nas represas e lagoas (Borghertti & Ostrensky, 1998). Somente em 1971, a tilápia do Nilo apresentou alto potencial para a aquicultura em vários sistemas de criação e foi introduzida no nordeste brasileiro a partir da Costa do Marfim (Boscolo et al., 2001).

Segundo Kubitza & Kubitza (2000), tilápia do Nilo linhagem Chitralada (Figura 02) foi introduzida no Brasil 25 anos mais tarde, em 1996, a partir de alevinos doados pelo Asian Institute of Technology (AIT). Os termos tilápia do Nilo linhagem Chitralada, tilápia Chitralada, tilápia thai-Chitralada e tilápia tailandesa são sinônimos

para essa linhagem da espécie *O. niloticus* desenvolvida no Japão na década de 40 e melhorada na Tailândia, no Palácio Real de Chitralada em Bangkok, no final dos anos 60 (Ferraz et al., 2003).



Figura 02 - Vista lateral de tilápia do Nilo linhagem Chitralada (reproduzido do www.aquabel.com.br/tilápia, 2007)

A linhagem Chitralada foi desenvolvida porque praticamente não existiam populações puras de *O. niloticus*, uma vez que os governos da África haviam realizado introduções errôneas e massivas de *O. aureus*, *O. hornorum*, *O. mossambicus*, *Tilapia zilli* e *Tilapia rendalli* em culturas aquíferas, as quais acasalaram naturalmente com as tilápias nilóticas, e praticamente acabaram com a pureza desta espécie (Pullin & Capili, 1998). O sucesso da linhagem Chitralada para produção em larga escala tem sido confirmado pela sua viabilidade econômica relativa ao ganho de peso, à conversão alimentar, à sobrevivência na fase inicial e ao seu comprimento ser superior ao da tilápia do Nilo pura, tanto nas fases iniciais como nas de crescimento (Boscolo et al., 2001).

A tilápia do Nilo é predominantemente herbívora e capaz de produzir proteínas de alta qualidade para o consumo humano, uma vez que a sua conversão alimentar é beneficiada pela atividade das suas proteases digestivas (Xue-yan et al., 2005). A sua alimentação e os seus mecanismos digestivos já foram bem descritos na literatura (Little & Edwards, 2004; Tengjaroenkul et al., 2000; Fang & Chiou, 1989; Bowen, 1976; Fish, 1951).

2.4 Detergentes

As moléculas de gordura que mancham as roupas prendem-se firmemente ao tecido na forma de pequenas gotículas que não se misturam com a água, impedindo que as roupas sejam limpas através de simples imersão em solução aquosa (Saisubramanian et al., 2006). Quando um detergente é colocado no sistema de lavagem, as suas moléculas hidrofóbicas e hidrófilas posicionam-se entre a gordura e a água, impedindo que a gotícula gordurosa se prenda ao tecido e deste modo, possa ser retirada pelas micelas (Gavrilescu & Christi, 2005).

Os detergentes comerciais simples podem conter até 17 componentes (www.poupaclie.com.br/materiais, 2007), cada qual com uma função específica sobre a limpeza de roupas (Tabela 03). Porém, os detergentes modernos apresentam um espectro de ação e de utilização bastante amplo, havendo, conseqüentemente, necessidade de especialização das formulações (Mittidieri et al., 2002). Por este motivo, a indústria de detergentes tem emergido como a maior compradora de várias enzimas hidrolíticas alcalinas em todo o mundo, com a finalidade de aplicá-las como aditivos (Gavrilescu & Christ, 2005).

De um modo geral, estas enzimas são utilizadas tanto em formulações de detergentes para limpezas específicas (remoção de manchas em lentes de contato e próteses dentárias) assim como em detergentes para uso doméstico (Rao et al., 1988). A principal vantagem da formulação de detergentes que contenha enzimas é a substituição ou redução de produtos cáusticos, ácidos e solventes tóxicos, que agredem o meio ambiente e que provocam o desgaste de materiais e de instrumentos (Vasconcelos et al., 2006).

Tabela 03- Principais componentes utilizados em formulações de detergentes simples

Componente	Descrição/função
Alquilbenzeno sulfonato	Agente sintético produzido com parafina retirada do petróleo. Agente tensoativo que ao reduzir a incompatibilidade da água com a gordura, facilita a retirada da sujeira das roupas.
Sabão	Agente tensoativo à base de óleo vegetal, presente em menor proporção para evitar a produção excessiva de espuma e impedir o retorno da sujeira ao tecido.
Perborato	Agente de branqueamento, responsável pela descoloração dos tecidos.
Tripolifosfato	Fosfatos que neutralizam o calcário presente na água mantêm o meio alcalino e impedem que a sujeira volte a fixar-se nos tecidos, facilitando a ação dos tensoativos. Ainda apresentam um efeito anticorrosivo e de estabilização dos agentes branqueadores.
Branqueador óptico	Molécula fosforescente que se deposita sobre o tecido, emitindo luz azul quando exposta à radiação ultravioleta. Com isto, causa a impressão do algodão ser mais branco e reduz o efeito de encardimento causado pela sujeira, quando ela se fixa em outros pontos do tecido, durante a lavagem.
Perfume	Disfarça o mau cheiro dos demais componentes do produto.

(www.poupaclie.com.br/materiais, 2007)

O uso de enzimas como aditivo de detergentes surge do fato de que estas biomoléculas removem manchas específicas em roupas (Tabela 04). Dentre todas as enzimas, no entanto, as proteases são as enzimas mais utilizadas como aditivos uma vez que a maioria das manchas típicas de roupas contêm resíduos protéicos (Moreira et al., 2002). A utilização de celulasas, contudo, não está diretamente relacionada à remoção de manchas, mas sim à sua capacidade de hidrolisar fibras de celulose dos tecidos, podendo, deste modo, serem aplicadas em formulações amaciantes de roupas (Rao et al., 1998).

Tabela 04 - Enzimas utilizadas como aditivos na indústria de detergentes (modificado de Awnar & Salleemuddin, 1998)

Enzima	Resíduo removido	Exemplos de Manchas
Proteases	Hidrolisam manchas contendo resíduos protéicos	Ovo, suor, molhos de tomate
Amilases	Hidrolisam manchas contendo resíduos de amido e outros carboidratos	Chocolate, sorvetes
Lípases	Hidrolisam manchas contendo resíduos lipídicos	Óleos, gorduras, maionese
Celulases	Hidrolisam celulose presente nas fibras do tecido	(São utilizadas em formulações amaciantes)

A utilização de proteases como aditivo tem crescido substancialmente devido ao fato de serem biodegradáveis, haver um aumento na razão entre o desempenho do detergente e o custo do processo quando estas biomoléculas são usadas nas formulações de detergentes (Saisubramanian et al., 2006).

A primeira preparação de detergentes contendo proteases data de 1913 e consistia em carbonato de sódio e extrato de pâncreas (Rao et al., 1998). Somente a partir da década de 60, proteases extraídas de microrganismos começaram a ser utilizadas (Maurer et al., 2004). Atualmente, a maioria das enzimas proteolíticas usadas como aditivos de detergentes são serino-proteases produzidas por bactérias, embora as metodologias aplicadas para sua obtenção impliquem em um alto custo (Maurer, 2004). Paralelamente, a utilização de fungos não apresenta este problema, mas a necessidade de ajustar o meio de fermentação e de crescimento para a produção das proteases ainda é uma desvantagem da utilização desta fonte biológica (Gavrilescu & Christi, 2005).

As propriedades envolvidas na escolha de uma protease para a sua utilização como aditivo de detergente incluem: (1) atividade em pH alcalino e a elevadas temperaturas (Maurer et al., 2004), (2) estabilidade em presença de agentes surfactantes e oxidantes (Gupta et al., 1999), (3) eficiência na remoção de manchas em baixas concentrações em relação à concentração da solução de detergentes (Vasconcelos et al., 2006), (4) especificidade a vários de substratos (Banerjee et al., 1999), e (5) que

promovam o aumento do potencial de limpeza de um detergente em 30 a 40% (Moreira et al., 2002).

Considerando que as suas características suprem as exigências das indústrias de detergentes, as proteases mais utilizadas como aditivos são subtilisinas obtidas de bactérias do gênero *Bacillus*. Estima-se que, em 2003, a União Européia produziu e utilizou cerca de 900 toneladas destas enzimas (Maurer, 2004).

Subtilisinas são proteases definidas como serino-proteases cuja seqüência de aminoácidos e estrutura tridimensional podem ser facilmente diferenciadas de outras serino-proteases como quimiotripsina, carboxipeptidases e peptidases de *Escherichia coli*. O sítio ativo das subtilisinas consiste em ácido aspártico, histidina e serina, e a sua massa molecular varia entre 18 e 90 KDa, embora todas subtilisinas usadas na formulação de detergentes tenham massa molecular aproximada de 27 KDa (Wolff & Wents, 1996). Outras importantes proteases utilizadas comercialmente com a mesma finalidade são: “Subtilisins Carlsberg”, “Subtilisins BPN”, “Alcalase”, “Esperase” e “Savinase T” (Maurer, 2004). Nos últimos 30 anos, os estudos acerca de proteases industriais cresceram consideravelmente, embora ainda não haja sucessores para as proteases alcalinas versáteis e universalmente aplicadas como aditivos de detergentes como as subtilisinas (Vasconcelos et al., 2006), mesmo considerando o custo elevado de sua obtenção. Alternativamente, proteases alcalinas de intestino de tambaqui (*Colossoma macropomum*) apresentaram características favoráveis à sua utilização como aditivos de detergentes comerciais, especialmente por serem estáveis na presença de agentes oxidantes e surfactantes (Espósito, 2006).

A pesquisa de novas fontes de enzimas com as características requeridas para serem utilizadas com tal finalidade, tem-se tornado crucial para a sustentabilidade e desenvolvimento das indústrias de detergentes. Neste contexto, as proteases digestivas de peixes representam uma nova perspectiva de enzimas a serem utilizadas, considerando-se suas propriedades enzimáticas e a possibilidade de sua obtenção a baixo custo.

2.5 Planejamento Estatístico

A atividade estatística mais importante relacionada ao um determinado experimento não é análise dos dados mas sim o planejamento dos experimentos através dos quais esses dados devem ser obtidos. Quando esta etapa não é feita da forma apropriada, o resultado é uma quantidade enorme de dados (números) que dificulta a construção de conclusões a cerca do que foi testado (Barros Neto et al., 2002).

Alguns modelos de planejamentos estatísticos são propostos com a finalidade de se aperfeiçoar o processo experimental em função do objetivo do estudo. *Planejamentos fatoriais fracionários*, por exemplo, são indicados quando se conhece pouco sobre as variáveis relevantes a um determinado processo. Assim, este modelo permite realizar uma triagem e descartar as variáveis não-significativas, ocasionando redução de custo e de tempo destinado ao experimento. Após a seleção das variáveis importantes, pode-se avaliar quantitativamente a influência de cada variável sobre a resposta de interesse, bem como suas interações. Para obter-se este perfil, os *planejamentos fatoriais completos* são indicados. Neste caso, a primeira etapa indicada é a determinação das variáveis e as respostas de interesse para o sistema que se deseja avaliar.

Para executar um planejamento fatorial completo, é necessário especificar os níveis em que cada variável será estudada, ou seja, os valores das variáveis (ou as versões, nos casos qualitativos) que serão empregados nos experimentos. Esta é uma etapa fundamental uma vez que um planejamento fatorial requer a execução de experimentos para todas as possíveis combinações dos níveis escolhidos para as variáveis testadas. Costuma-se identificar os níveis das variáveis em superior e inferior com os sinais (+) e (-), respectivamente.

A obtenção da estimativa do erro experimental associado à determinação de uma resposta individual também é imprescindível a este modelo de planejamento, pois a extensão desse erro implica na avaliação da existência ou não de variáveis estatisticamente significativas sobre a resposta analisada no experimento. Porém, para evitar a ocorrência de distorção estatística nos resultados, ou seja, para impedir que erros atípicos sejam obrigatoriamente associados a determinadas combinações de níveis, os ensaios devem ser realizados em ordem totalmente aleatória. No caso de planejamentos fatoriais com muitas variáveis, podem-se escolher ensaios que correspondam aproximadamente a toda faixa experimental estudada para se fazer as repetições necessárias ao cálculo do erro experimental.

A análise das respostas obtidas após a realização de ensaios seguindo o planejamento estatístico fatorial completo permite conhecer quais variáveis são importantes ao estudo em questão e como elas podem interagir e influenciar a resposta avaliada no experimento. Por ocasião da existência de interação entre variáveis, a análise isolada de uma variável torna-se errônea. Assim, os efeitos das variáveis devem ser feitos interpretados conjuntamente para que a interação entre eles fique claramente evidenciada. Atualmente já existem programas computacionais especializados para construção de cálculos e gráficos a partir das respostas de um planejamento estatístico.

A utilização desses métodos estatísticos foi recentemente utilizada para extração líquido-líquido de proteases em sistema de duas fases aquosas (PEG/Citrato) (Porto et al., 2006), assim como para avaliação da eficiência de uma lipase produzida por *Aspergillus niger* como aditivo de detergentes (Saisubramanian et al., 2006).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar a estabilidade das proteases de intestino de tilápia do Nilo como aditivo de detergentes e testar sua utilização experimental através de planejamento estatístico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Obter Extrato Enzimático (EE), parcialmente purificado, de proteases de intestino de tilápia do Nilo;
- Caracterizar as proteases do EE quanto ao pH e temperatura ótimos, a sua estabilidade em presença de agentes surfactantes, agentes oxidantes e de íons metálicos;
- Verificar a presença de enzimas do tipo tripsina e quimiotripsina no EE através de ensaios de inibição;
- Determinar a melhor condição experimental para utilização das proteases do EE como aditivo de detergentes com auxílio de planejamento estatístico.

**4. ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO CHEMICAL
PAPERS**

Aquaculture by-product: a source of proteolytic enzymes for detergent additive

Chirleanny M. Mendes ^a, Marília A. Brito ^b, Tatiana S. Porto ^{b,c}, Ana L. F. Porto ^{b,c},
Ranilson S. Bezerra ^{a,b}, Luiz B. Carvalho Jr. ^{a,b}, Ana M. A. Carneiro-Leão ^c, Maria G.
Carneiro-da-Cunha ^{a,b*}

^aDepartamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Campus Universitário, s/n, Cidade Universitária – CEP: 50.670-420 – Recife- PE- Brazil.

^bLaboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Campus Universitário, s/n, Cidade Universitária - CEP: 50670-901- Recife - PE – Brasil.

^cDepartamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n. Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife - PE – Brazil.

* Corresponding author. Fax: +55-81-2126.8576; Tel.: +55-81-2126.8540

E-mail address: mgcc@ufpe.br (Maria das Graças Carneiro-da-Cunha, Ph.D.)

Received [Dates will be filled in by the Editorial office]

Intestine proteases of the Nile tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) were partially purified by heat treatment (yield of 103.41%; purification factor of 3.49) and presented the maximum activity and stability within an alkaline pH range of 7.2 - 11.0. The optimum temperature and stability, over a period of 120 min, were found to be at 55 °C

and at 35 - 45 °C, respectively. The proteases' activity was increased about 15 % by 1 % (v/v) saponin surfactant, inactivated by 1 % (w/v) SDS after 120 min, and remained stable for 30 min with 5 % and 10 % (v/v) hydrogen peroxide. The proteases were slightly activated by Ca^{2+} , Mg^{2+} and K^{+} ions and the substrate most effectively hydrolysed was casein (40 U/mg). A 2^4 full factorial design used to evaluate the influence of independent variables showed that the enzymatic extract, detergent concentration and the incubation time, all had a significant influence on enzymatic activity. The best condition to be used as detergent additive was found with 0.229 mg/mL of protein, 3.0 mg/mL of detergent for 30 min in the presence of Astrus[®] detergent.

Keywords: Protease, Nile tilapia, Laundry detergent, Surfactant, Oxidizing agents

Introduction

Proteases account for nearly 60 % of the total world-wide enzymes sales and, from an industrial point of view, represent one of the most important classes of enzymes (Joo & Chang, 2006). The utilization of these bio molecules has been described for animal feed processes, silk degumming, peptide synthesis (Joo & Chang, 2006), leather processing (George et al., 1995), food processing (Rao et al., 1998) and decomposition of gelatin on X-ray films (Kumar & Takagi, 1999). Among these applications, alkaline proteases are particularly suitable for the detergent industry because of their stability at high pH and temperature, and activity in the presence of different oxidizing agents and surfactants (Sana et al., 2006).

Their presence in formulations increases cleaning performance (Vasconcelos et al., 2006). The use of enzyme-based detergent is preferred over the synthetic catalysts

due to their better cleaning properties, lowering of washing temperatures (Saisubramanian et al., 2006) and decreases the pollution load (Moreira et al., 2002).

The majority of detergent proteases are subtilisins, serine-proteases produced by several *Bacillus* strains (Maurer, 2004). However, the increasing demand for proteases and low costs of production (Joo & Chang, 2006) has led to explore new and cheaper sources of alkaline proteases (Sana et al., 2006).

One of the main digestive proteinases detected in the pyloric caeca and intestine of fish is the trypsin (EC 3.4.21.4), a member of a large family of serine proteinases which specifically hydrolyse proteins and peptides at the carboxyl group of arginine and lysine residues and plays a critical role in protein digestion (Kishimura et al., 2007). Because of their potential industrial use, trypsins and trypsin-like serine proteinases have been isolated from different species of fish including mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) (Lu et al., 2008), walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) (Kishimura et al., 2008), spotted goatfish (*Pseudopenus maculates*) (Souza et al., 2007), jacobever (*Sebastes schlegelli*) and elkrorn sculpin (*Alcichthys alcicornis*) (Kishimura et al., 2007), tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Bezerra et al., 2001) and carp (*Ciprinus carpio*) (Cohen et al., 1981).

Recently, intestine of common carp (*Ciprinus carpio*) was proposed as a source of alkaline proteases (Espósito et al., 2009b) and the compatibility of proteases from tambaqui (*Colossoma macropomum*) viscera with commercial laundry detergents was also studied (Espósito et al., (2009a). Nile tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) is one of the most important species for Brazilian aquaculture with an annual production of about 71,000 tons (IBAMA, 2008). Discarded in large amounts, the viscera of this fish could also provide another source of alkaline proteases for detergent additive.

With the proper statistical design, the significant effects can be identified from a minimum number of experiments (Cavalcanti et al., 2006). Moreover statistical design was described as a satisfactory tool to evaluate the efficiency of a lipase from *Aspergillus niger* as detergent additive (Sana et al., 2006) and is a very widely used tool for process optimization and control (Cavalcanti et al., 2006). In this work are described the characteristics and stability of digestive proteases from the Nile tilapia fish and evaluated, with a statistical approach, their suitability for use as a detergent additive.

Experimental

Material

Oreochromis niloticus specimens were obtained from the Estação de Aquicultura Continental Professor Jokei Koike at the Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, Brazil. All reagents were of an analytical grade purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) and Merck (Darmstadt, Germany). The commercial laundry detergents Ala[®] (Gessy Lever Ltd.), Bem-te-vi[®] and Astrus[®] (both from Asa Ltd.) were obtained from local domestic sources.

Preparation of enzymatic extract (EE)

The fishes were transported alive to the laboratory. Intestines were collected (immediately dissected after being killed in an ice bath) and homogenised in 150 mM NaCl (40 mg/mL) and centrifuged (10,000 x g, 10 °C, 10 min). The supernatant obtained was submitted to heat treatment (45 °C, 30 min) and centrifuged (10,000 x g, 4 °C, 10 min) according to Bezerra et al. (2001). The final supernatant was termed Enzymatic Extract (EE).

Enzymatic activity and protein determination

Proteolytic activity was determined using 1 % (w/v) azocasein as substrate in 0.2 M Tris-HCl buffer, at pH 8.2 and 25 °C according to Leighton et al. (1973). One unit of enzymatic activity (U) was defined as the amount of enzyme that produces an increase in optical density of 1.0 at 440 nm after 1 h and expressed as U/mL. The protein concentration was spectrophotometrically determined according to Bradford (1976), with bovine serum albumin as standard. The specific activity was calculated as the ratio between the enzymatic activity (U/mL) and the total protein concentration in the sample (mg/mL) and expressed as U/mg.

Effect of pH and temperature on activity and stability of enzyme

The proteolytic activity was determined at different values of pH (5.8 – 11.0) using different types of buffer system according to their pKa value and at several temperatures (25-75 °C). The EE was incubated with 1 % (w/v) azocasein for 1 h and proteolytic activity was determined as described above. The effect of pH and temperature on the stability of the enzyme was studied by incubating the EE for 30, 75 and 120 min with each buffer and at each temperature and then the enzymatic activity was measured.

Effect of oxidizing agents and surfactants

The stability of proteases in the presence of oxidizing agents and ionic (saponin and sodium choleate) and anionic (tween 20, tween 80 and SDS) surfactants was analyzed by incubating the samples of EE (1:1 v/v) with hydrogen peroxide at concentrations of 5 %, 10 % and 15 % (v/v) and with 1 % (w/v) saponin, sodium choleate, SDS, 1 % (v/v) tween 20 and tween 80, respectively, at 45 °C for 120 min.

Aliquots were collected at 30, 75 and 120 min for determination of proteolytic activity as previously described and compared with the enzymatic activity without any oxidizing agent or surfactants (100 % of activity).

Effect of metallic ions

The assays were performed using several sources of metallic ions (1 mM): $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, MgCl_2 , KCl . The enzymatic activity was determined in 0.2 M Tris-HCl buffer, at pH 8.2 and 25 °C. The value of enzymatic activity without metallic ions was taken as 100 %.

Specificity of enzyme on various protein substrates

The assays were performed according to Pokorny et al. (1979) modified, using the following protein substrates: haemoglobin, casein, ovalbumin and bovine serum albumin prepared in 0.2M Tris-HCl buffer, pH 8.2. To 1.0 mL of 1 % bovine serum albumin or 1 % (w/v) haemoglobin was added 0.5 mL of EE, incubated at 37 °C for 10 min. Using 1 % (w/v) casein or ovalbumin, 5.0 mL of each substrate and 0.5 mL of EE were incubated at 40 °C for 10 min. The different reactions were terminated with addition of 2.0 mL 10 % of trichloroacetic acid (TCA) and then centrifuged at 5,000 x g for 5 min. One unit of enzymatic activity (U) was defined as the amount of enzyme that produced an increase in optical density of 0.1 at 280 nm after 1 h and expressed as U/mL. The specific activity was calculated as the ratio between the enzymatic activity (U/mL) and the total protein in the sample (mg/mL) and expressed as U/mg.

Experimental design and statistical analysis

The influence of independent variables namely enzymatic extract, detergent concentration, commercial detergent type and incubation time, on the enzymatic activity was evaluated. The results were obtained from a 2⁴ full factorial design (Table 1). The central point was run in quadruplicate to allow the estimation of pure experimental error (Barros et al., 2002).

Table 1 – Values of independent variables used in 2⁴ full factorial design.

Variables	Level		
	Lower (-1)	Central (0)	Higher (+1)
1. Extract concentration (mg/mL)	0.095	0.144	0.299
2. Detergent concentration (mg/mL)	3.0	7.0	11.0
3. Commercial detergent	Ala [®]	Bem-te-vi [®]	Astrus [®]
4. Incubation time (min)	30	75	120

In this evaluation, the commercial laundry detergents Ala[®] (Gessy Lever Ltd.), Bem-te-vi[®] and Astrus[®] (both from Asa Ltd.) were used without enzyme addition. The EE was randomly incubated in each detergent solution (prepared in distilled water) at 45°C. At established time intervals 150 µl samples were collected for determination of proteolytic activity at 25°C (Leighton et al., 1973). The statistical analysis was carried out by variance analysis (ANOVA) with $p \leq 0.05$. All statistical and graphical analyses were carried out with the Statistica 6.1 program (StatSoft, Inc. 2002).

Results and discussion

Enzymatic extract (EE)

High levels of protease activity (103.41 %) and purification factor (3.49) were achieved after heat treatment. The activity (11.52 U/mL) shown by EE proteases is similar to those described for intestine proteases from Spotted Goatfish (*P. maculatus*) and Crevalle Jack (*Caranx hippos*) (Alencar et al., 2003).

Effect of pH and temperature on activity and stability enzyme

The EE proteases presented the maximum activity within an alkaline pH range of 7.2-11.0 (Figure 1A) and were stable within this pH range (Figure 1B) over a period of 120 min.

Similar results have also been described for proteases from the intestine and pyloric caeca of crevalle jack (*C. hippos*), spotted goatfish (*P. maculatus*), parrotfish (*Sparisoma* sp.), traíra (*Hoplias malabaricus*) (Alencar et al., 2003), hybrid tilapia (*Tilapia nilotica/aurea*) (El-Shemy & Levin, 1997) and mullet (*Mugil cephalus*) (Guizani et al., 1991) although, alkaline proteases from tambaqui (*C. macropomum*) intestine were reported to be stable at higher pH range (10.0-12.5) (Espósito et al., 2009a).

The optimum proteolytic activity of EE proteases was observed at 55 °C (Figure 1C), while the maximum thermal stability, over a period of 120 min, was found between 35 °C and 45 °C (Figure 1D). Digestive proteases from tropical fishes often have high optimum temperatures (Bezerra et al., 2001; Castillo-Yáñez et al., 2005; Souza et al., 2007) and similar thermal stability profiles (Alencar et al., 2003; El-Shemy & Levin, 1997; Kishimura et al., 2008). This could be a result of the adaption of these fishes to tropical conditions since fish species adapted to cold water have higher enzymatic

activity at low temperature and relatively lower thermal stability (Kishimura et al., 2008).

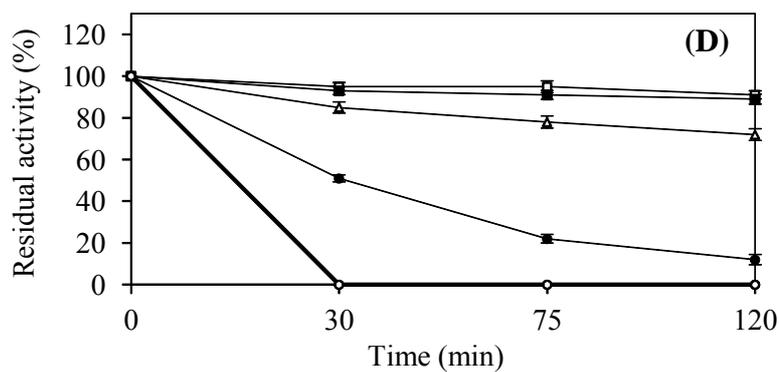
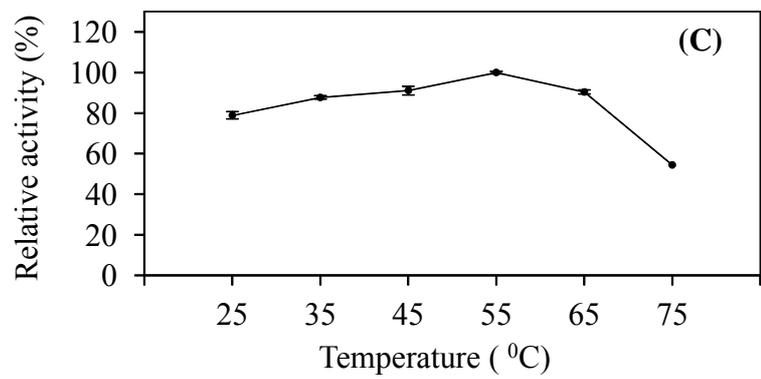
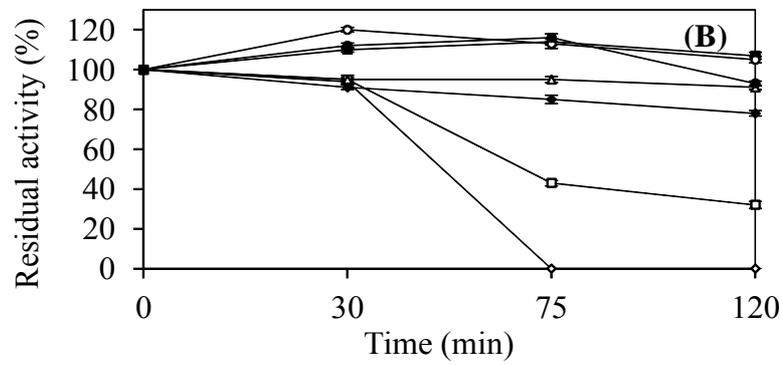
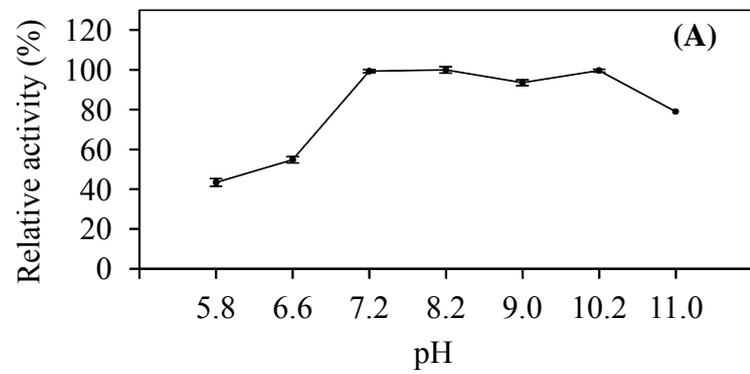


Figure 1 – Effect of pH and temperature on proteolytic activity of proteases from Nile tilapia intestine. (A) pH effect on activity and (B) pH effect on stability. Proteolytic activity was assayed using 1% (w/v) azocasein at 25 °C for 1 h. The different buffer solutions used were (0.2 M): Sodium phosphate pH 5.8 (◇) and 6.6 (□); Tris-HCl pH 7.2 (■), pH 8.2 (Δ) and pH 9.0 (○); Glycin-NaOH pH 10.2 (●) and 11.0 (◆). (C) Temperature effect and (D) thermal stability. Proteolytic activity was evaluated at 25 °C (□), 35 °C (■), 45 °C (Δ), 55 °C (●), 65 °C and 75 °C (○) for 1 h using 1% (w/v) azocasein at pH 8.2. Each data point is an average of three experiments and the error bars show the standard deviation.

Effect of surfactants and oxidizing agents

The stability of EE proteases, over a period of 120 min, is illustrated in the Figure 2A. In the presence of tween 20 and sodium choleate the EE proteases retained about 70 % of its activity and were stimulated by about 15 % by saponin. The surfactant SDS was the only agent we found that was capable of inactivating them.

The stability of intestine proteases from tambaqui (*C. macropomum*) have also been assayed in the presence of these compounds but over a period of 60 min and presented the similar results, including the strong effect of SDS in protease denaturation (Espósito et al., 2009a), and proteases from *Cyprinus carpio*, over the same period of 60 min, were also stimulated by tween 20 and 80 (Espósito et al., 2009b). The analysis of the proteases' compatibility with these components is important because blended surfactants and oxidizing agents comprise 34 % of the total detergent formulation weight (Vasconcelos et al., 2006).

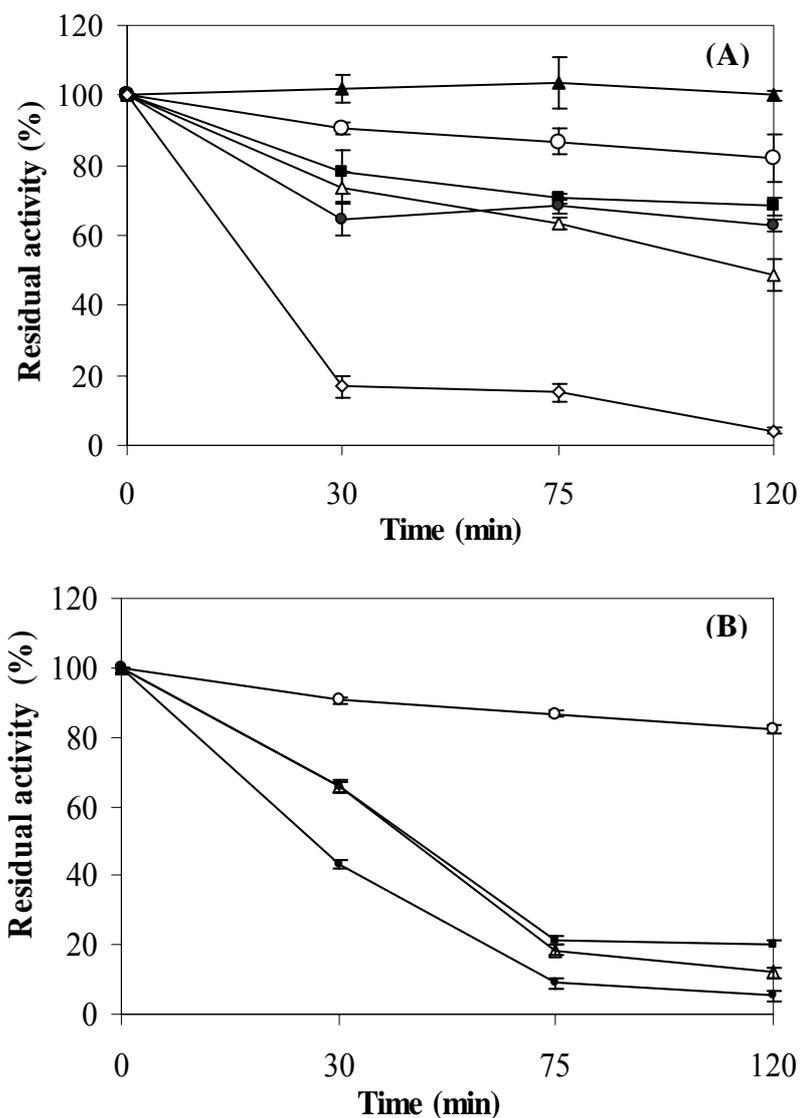


Figure 2 – (A) Effect of surfactants on proteolytic activity of proteases from Nile tilapia intestine. The EE was incubated with Saponin (▲), Tween 20 (■), Tween 80 (△), Sodium Choleate (●) and SDS (◇) surfactant (1.1 v/v or w/v) at 45^o C for 120 min. (B) Inhibition curve of proteases from Nile tilapia intestine by hydrogen peroxide. The EE was incubated with 5 % H₂O₂ (■), 10 % (△) and 15% (●) (1:1 v/v) at 45° C for 120 min. The proteolytic activity was determined using 1% (w/v) azocasein at pH 8.2 at 25°C and compared with control enzymatic sample-EE (○). Each data point is an average of three experiments and the error bars show the standard deviation.

The effects of oxidizing agents are illustrated in Figure 2B. About 65 % of the initial enzymatic activity was retained after 30 min of incubation in the presence of 5 and 10 % (v/v) hydrogen peroxide, and with the concentration of 15 % there was retention of 43 % of the initial activity. After 75 min of incubation the proteases lost on average 83 % of activity in all concentrations tested in this work.

Under the same conditions, intestinal proteases from tambaqui (*C. macropomum*) were more stable and retained about 50 % of activity after 75 min (Espósito et al., 2009a). The oxidation-stability in most of the commercial proteases, such as Durazym, Maxapem and Purafect has been introduced through site-directed mutagenesis (Outtrup et al., 1995) and protein engineering techniques (Wolff & Wentes, 1996), or has been achieved by techniques of enzymes immobilization (Vasconcelos et al., 2006).

Effect of metal ions and substrate specificity

The EE proteases' activity was slightly activated by Ca^{2+} (110.09 % \pm 0.45), Mg^{2+} (112.11 % \pm 0.15) and K^{+} (104.75 % \pm 0.22) ions. Similar results involving the effect of calcium on fish trypsin have been identified in common carp (Cao et al., 2000), tuna (Klomklao et al., 2004), true sardine and arabesque greenling (Kishimura et al., 2006). In the presence of Mg^{2+} ions, two trypsins from mandarin fish were also activated (Lu et al., 2008), while trypsin-like proteases from spotted goatfish were slightly suppressed by Mg^{2+} , Ca^{2+} and K^{+} (Souza et al., 2007).

The ability to hydrolyse different protein substrates is one of the criteria used to assess the potential effectiveness of a protease as a laundry detergent additive (Moreira et al., 2002). The substrate most hydrolysed by EE proteases was casein (40 U/mg), followed by azocasein (38.52 U/mg), haemoglobin (32 U/mg), ovalbumin (22 U/mg) and BSA (14 U/mg). Other proteases used as detergent additives have similar hydrolysis

profiles (Moreira et al., 2002). The broader specificity of the proteases from EE would make them useful for detergent formulations against a wide variety of stains, such as blood and egg.

Statistical design for application of protease as detergent additive

Table 2 shows the results of the assays and the Figure 3A the significance level of each tested variable and their interactions in decreasing order of magnitude. Extract concentration (1) was the most significant positive effect. The negative effect of detergent concentration (2) was the next most significant variable, followed by the negative effect of incubation time (4). This means that the low detergent concentration (3.0 mg/mL) and incubation time (30 min) favoured the protease activity. The positive effect of commercial detergent (3) means that the higher tested level (Table 1) of this variable (Astrus[®] detergent) was favourable on the same response.

The interaction (1 by 2, figure 3A) between extract concentration (1) and detergent concentration (2) showed a negative effect, which favours the response when the first increase and the second decrease (figure 3B).

Table 2 – Selected conditions and results of 2⁴ full factorial design for evaluation of EE proteases as a detergent additive.

Run	Extract concentration (mg/mL)	Detergent concentration (mg/mL)	Commercial detergent	Incubation time (min)	Enzymatic activity (U)
1	0.095	3.0	Ala [®]	30	1.96
2	0.299	3.0	Ala [®]	30	6.26
3	0.095	11.0	Ala [®]	30	0.33
4	0.299	11.0	Ala [®]	30	1.83
5	0.095	3.0	Astrus [®]	30	2.63
6	0.299	3.0	Astrus [®]	30	7.91
7	0.095	11.0	Astrus [®]	30	1.13
8	0.299	11.0	Astrus [®]	30	3.44
9	0.095	3.0	Ala [®]	120	1.77
10	0.299	3.0	Ala [®]	120	4.49
11	0.095	11.0	Ala [®]	120	0.00
12	0.299	11.0	Ala [®]	120	1.55
13	0.095	3.0	Astrus [®]	120	2.17
14	0.299	3.0	Astrus [®]	120	4.88
15	0.095	11.0	Astrus [®]	120	0.00
16	0.299	11.0	Astrus [®]	120	2.31
17 (C)	0.144	7.0	Bem-te-vi [®]	75	0.76
18 (C)	0.144	7.0	Bem-te-vi [®]	75	0.67
19 (C)	0.144	7.0	Bem-te-vi [®]	75	0.64
20 (C)	0.144	7.0	Bem-te-vi [®]	75	0.58

The positive interaction (2 by 4, figure 3A) between detergent concentration (2) and incubation time (4) indicates that a decrease in both variables enhances the protease activity. On the other hand, the increase of extract concentration (1) and the Astrus[®] detergent (Table 1, higher level) show a positive effect on protease activity.

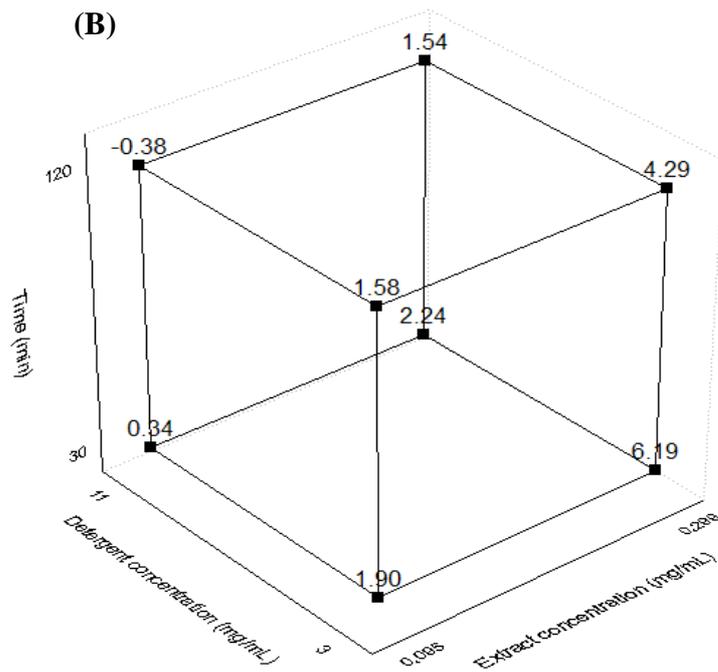
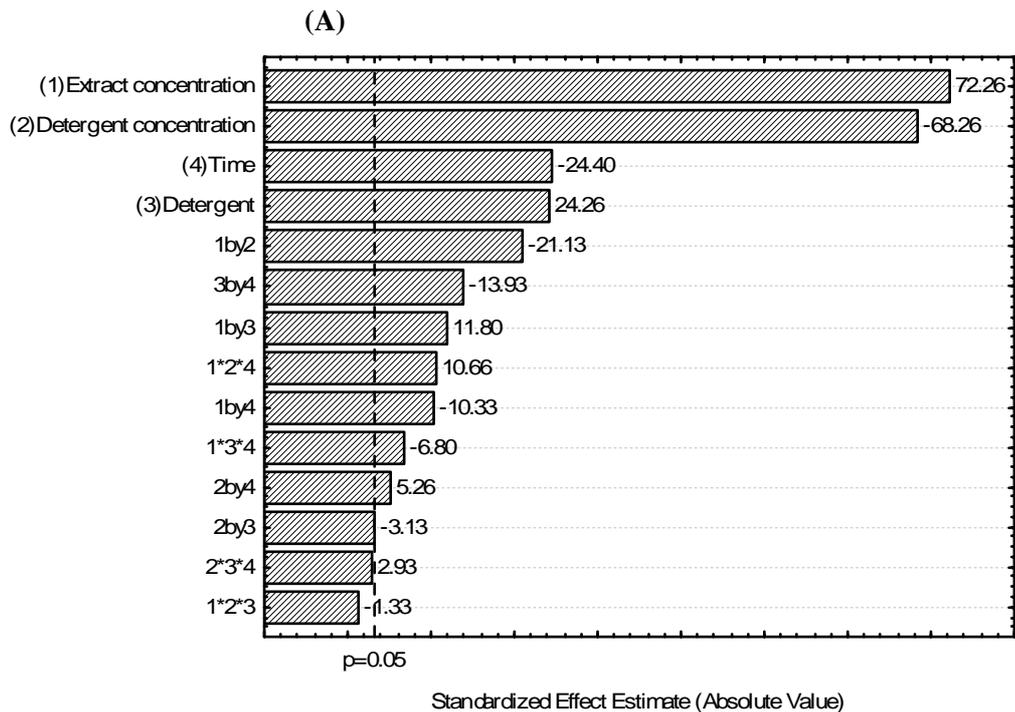


Figure 3 – (A) Pareto bar chart for the effects of variables extract concentration (1), detergent concentration (2), detergent (3) and incubation time (4) on activity of EE proteases. The extension of bars across the vertical dotted line ($p = 0.05$) represent the dimensions of significance. Pure error = 0.005625. (B) Cubic graphic representation of the relations among extract concentration, detergent concentration and incubation time on activity of EE proteases.

Due to the larger effect of extract concentration and the detergent concentration on EE protease activity, the interaction between them and incubation time is also illustrated in Figure 3B.

The best results (6.26 and 7.91 U, runs 2 and 6, respectively, Table 2) were obtained when the experimental system was composed of 0.229 mg/mL of protein and 3.0 mg/mL of detergent concentration with the incubation period of 30 min especially in Astrus[®] detergent.

Conclusions

The experimental design proved to be suitable for this study. EE proteases were found to be alkaline, with a high optimum temperature, thermo-stable and detergent-compatible additive. The best condition to be used as detergent additive was found with 0.229 mg/mL of protein, 3.0 mg/mL of detergent for 30 min in the presence of Astrus[®] detergent. Nile tilapia viscera could therefore provide another and abundant source of alkaline proteases for industry and other biotechnological application, giving an appropriate use for this fish residue.

Acknowledgements. The authors are grateful to Estação de Aqüicultura Continental Prof. Jokei Koike/UFRPE. This work was financially supported by CAPES.

References

- Alencar R. B., Biondi M. M. & Paiva P. M. G. (2003) Alkaline proteases from the digestive tract of four tropical fishes. *Brazilian Journal of Food Technology*, 6:279-284.
- Barros Neto B., Scarmini I. C. & Bruns R. E. (2002) Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas: Editora da Universidade de Campinas – UNICAMP, pp.401.
- Bezerra R. S., Santos J. F., Paiva P. M. G., Correia M. T. S., Coelho L. C. B. B. & Vieira V. L. A. (2001) Partial purification and characterization of a thermostable trypsin from pyloric caeca of tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Journal of Food Biochemistry*, 25:199-210. DOI 10.1111/j.1745-4514.2001.tb00734.x.
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254. DOI 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Cao M. J., Osatomi K., Suzuki M., Hara K., Tachibana K. & Ishihara T. (2000) Purification and characterization of two anionic trypsins from the hepatopancreas of carp. *Fisheries Science*, 66:1172–1179. DOI 10.1046/j.1444-2906.2000.00185.x.
- Castillo-Yáñez F. J. & Pacheco-Aguilar R., García-Carreño, F. L., Navarrete-Del Toro M. A. (2005) Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*). *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 140:91-98. DOI 10.1016/j.cbpc.2004.09.031.

- Cavalcanti M. T. H., Porto T. S., Neto B. B., Lima-Filho J. L., Porto A. L. F., Pessoa Jr. A. (2006) Aqueous two-phase systems extraction of α -toxin from *Clostridium perfringens* type A. *Journal of Chromatography B*, 833:135-140. DOI 10.1016/j.jchromb.2006.01.023.
- Cohen T., Gertler A. & Birk Y. (1981) Pancreatic proteolytic enzymes from carp *Cyprinus carpio*-II. Kinetic properties and inhibition studies of trypsin, chymotrypsin and elastase. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 69: 647-653. DOI 10.1016/0305-0491(81)90365-5.
- El-Shemy M. G. & Levin R. E. (1997) Characterization of affinity-purified trypsin from hybrid tilapia (*Tilapia nilotica/aurea*). *Journal of Food Biochemistry*, 21:163-175. DOI 10.1111/J.1745-4514.1997.TB00221.x.
- Espósito T. S., Amaral I. P. G., Buarque D. S., Oliveira G. B., Carvalho-Jr L. B. & Bezerra R. S. (2009a) Fish processing waste as a source of alkaline proteases for laundry detergent. *Food Chemistry*, 112:125-130. DOI 10.1016/j.foodchem.2008.05.049.
- Espósito T.S., Amaral I. P. G., Marcuschi M., Carvalho-Jr L. B., & Bezerra R. S. (2009b) Surfactants- and oxidants-resistant alkaline proteases from common carp (*cyprinus carpio* L.) processing waste. *Journal of Food Biochemistry*, 33(5). *In press*.
- George S., Raju V., Krishnan M. R. V., Subramanian T. V., & Jayaraman K. (1995) Production of Protease by *Bacillus amyloliquefaciens* in Solid-State Fermentation and its Applications in the Unhairing of Hides and Skins. *Process Biochemistry*, 30:457-462. DOI 10.1016/0032-9592(94)00034-F.
- Guizani N., Rolle R. S., Marshall M. R., & Wei C. L. (1991) Isolation, purification and characterization of a trypsin from the pyloric ceca of mullet (*Mugil cephalus*).

Comparative Biochemistry and Physiology B, 98:517-521. DOI 10.1016/0305-0491(91)9046-A.

IBAMA (2008). Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Estatística da pesca 2006 Brasil: Grandes Regiões e Unidades da Federação. Brasília. pp 174.

Joo H. S., & Chang C. S. (2006) Production of an oxidant and SDS-stable alkaline protease from an alkaphilic *Bacillus clausii* I-52 by submerged fermentation: Feasibility as a laundry detergent additive. *Enzyme Microbial Technology*, 38:176-183. DOI 10.1016/j.enzmictec.2005.05.008.

Kishimura H., Hayashi K., Miyashita Y., & Noami Y. (2006) Characteristics of trypsins from the viscera of true sardine (*Sardinops melanostictus*) and the pyloric ceca of arabesque greenling (*Pleuroprammus azonus*). *Food Chemistry*, 97:65–70. DOI 10.1016/j.foodchem.2005.03.008.

Kishimura H., Tokuda Y., Yabe M., Klomklao S., Benjakul S., & Ando S. (2007) Trypsins from the pyloric ceca of jacobever (*Sebastes schlegelli*) and elkhorn sculpin (*Alcichthys alcicornis*): Isolation and characterization. *Food Chemistry*, 100:1490-1495. DOI 10.1016/j.foodchem.2005.11.040.

Kishimura H., Klomklao S., Benjakul S., & Chun B. S. (2008) Characteristics of trypsin from the pyloric ceca of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*). *Food Chemistry*, 106:194–199. DOI 10.1016/j.foodchem.2007.05.056.

Klomklao S., Benjakul S., & Visessanguan W. (2004) Comparative studies on proteolytic activity of splenic extract from three tuna species commonly used in Thailand. *Journal of Food Biochemistry*, 28:355–372. DOI: 10.1111/j.1745-4514.2004.05203.x.

- Kumar C. G. & Takagi H. (1999) Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*, 17:561-594. DOI 10.1016/S0734-9750(99)00027-0.
- Leighton T. J., Doi R. H., Warren R. A. J., & Kelln R. A. (1973) The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal Molecular Biology*, 76:103-122. DOI 10.1016/0022-2836(73)90083-1.
- Lu B. J., Zhou L. G., Cai Q. F., Hara K., Maeda A., Su W. J. & Cao M. J. (2008) Purification and characterisation of trypsins from the pyloric caeca of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*). *Food Chemistry*, 110:352-360. DOI 10.1016/j.foodchem.2008.02.010.
- Maurer K. H. (2004) Detergent proteases. *Current Opinion in Biotechnology*, 15:330-334. DOI 10.1016/j.copbio.2004.06.005.
- Moreira K. A., Albuquerque B. F., Teixeira M. F. S., Porto A. L. F. & Lima Filho J. L. (2002) Application of protease from *Nocardioopsis* sp. as a laundry detergent additive. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 18:307-312. DOI 10.1023/A:1015221327263.
- Outtrup H., Dambumann C., Christiansen M., Aaslyng D. A. (1995) Patent. US 5.4665.94.
- Pokorny M., Vitale L. J., Turk V., Renko M., Zuvanic J. (1979) *Streptomyces rirnosus* extracellular proteases. *European Journal of Applied Microbiology*, 8: 81-90. DOI 10.1007/BF00510269.
- Rao M. B., Tanksale A. M., Ghatge M.S. & Deshpande V. V. (1998) Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62:597-635.

- Saisubramanian N., Edwinoliver N. G., Nandakumar N., Kamini N. R. & Puvanakrishnan R. (2006) Efficacy of lipase from *Aspergillus niger* as an additive in detergent formulations: a statistical approach. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 33:669-676. DOI 10.1007/s10295-006-0100-9.
- Sana B., Ghosh D., Saha M. & Mukherjee J. (2006) Purification and characterization of a salt, solvent, detergent and bleach tolerant protease from a new gamma-Proteobacterium isolated from the marine environment of the *Sundarbans*. *Process Biochemistry*, 41:208-215. DOI 10.1016/j.procbio.2005.09.010.
- Souza A. A. G., Amaral I. P. G., Santo A. R. E., Carvalho Jr L. B. & Bezerra R. S. (2007) Trypsin-like enzyme from intestine and piloric ceaca of spotted goatfish (*Pseudupeneus maculatus*). *Food Chemistry*, 100:1429-1434. DOI 10.1016/j.foodchem.2005.12.016.
- Vasconcelos A., Silva C. J. S. M., Schroeder M., Guebitz G. M. & Cavaco-Paulo A. (2006) Detergent formulations for wool domestic washings contained immobilized enzymes. *Biotechnology Letters*, 28:725-731. DOI 10.1007/s10529-006-9050-6.
- Wolff A. M. & Wentes S. W. C. (1996) Laundry performance of *subtilisins* proteinases. In: Batt R, Betzel C. *Subtilisin enzymes: practical protein Engineering*: Netherlands; Kluwer Acad. Pub, pp 113-120.

5. CONCLUSÕES

- Proteases de intestino de Tilápia do Nilo foram parcialmente purificadas através de tratamento térmico, apresentando fator de purificação de 3,49 e rendimento em atividade de 103,41%;
- As proteases parcialmente purificadas são alcalinas e estáveis na faixa de pH 7,2-11.
- Possuem elevada temperatura ótima e estabilidade térmica a 35°C e 45°C por 120min;
- São ativadas em solução de Saponin 1% (p/v), íons Ca^{2+} e Mg^{2+} e inibidas em presença de SDS 1% (v/v);
- São estáveis em presença de peróxido de hidrogênio 5 e 10% (v/v) por 30 minutos;
- O planejamento estatístico utilizado pôde ser considerado satisfatório para a análise da melhor condição experimental de utilização das proteases de tilápia do Nilo como aditivos de detergentes;
- De acordo como o modelo estatístico, todas as variáveis testadas apresentaram impacto significativo sobre a atividade enzimática das proteases.
- A melhor condição para utilização das proteases como aditivos de detergentes é obtida com extrato enzimático ($0,229 \text{ mg.mL}^{-1}$ de proteína) e solução do detergente Astrus® (3.0 mg.mL^{-1}), por 30 min.
- Intestinos de tilápia do Nilo representam uma fonte alternativa de proteases com importância biotecnológica.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, R. B.; BIONDI, M. M.; PAIVA, P. M. G. Alkaline proteases from the digestive tract of for tropical fishes. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n. 2, p. 279-284. 2003.

AMARAL.I. P.G.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G; CARVALHO JR., L.B; BEZERRA, R.S. Fish trypsin immobilized on ferromagnetic dacron. **Process Biochemistry**, 41, p. 1213-1216. 2006.

ANWAR A. & SALLEMUDDIN, M. Alkaline proteases: a review. **Bioresouce Technology**, v. 64, p. 175-183. 1998.

BANERJEE, U. C.; SANI, R. K.; AZMI, W.; SONI, R. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. **Process Biochemistry**,v. 35,p. 213-219. 1999.

BARRET, A. J. Classification of peptidases. **Methods in Enzymology**, 1994. 244:1-59.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. C.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Editora da Universidade de Campinas - UNICAMP, Campinas, SP, 2ª ed., 401p. 2002.

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

BEZERRA, R.S.; SANTOS, J. F.; PAIVA, P. M.G.;CORREIA, M. T.S.; COELHO, L.C.B.B; VIEIRA, V.L.A;CARVALHO-JR, L.B. Partial purification and characterization of a thermostable trypsin from pyloric caeca of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Journal of Food Biochemistry**, v. 25, p. 199-210. 2001

BORGHETTI, J.R.; OSTRENSKY, A. Estratégias e ações governamentais para incentivar o crescimento da atividade aquícola no Brasil. CONGRESSO SUL-AMERICANO DE AQUICULTURA, Recife, PE. **Anais**, p. 437-447. 1998.

BOSCOLO, W. R.; HAYASHI, C.; SOARES, C. M. Performance and carcass characteristics of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reversed males of Thai and common strains at the starting and growing phases. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n. 5, p. 391-1396. 2001.

BOWEN, S. H. (1976) Mechanism for digestion of dentrital bacteria by Cichlid fish *Sarotherodon mossambicus* (PETERS). **Nature**.260:137-138.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis). **Estatística da Pesca 2000 Brasil: Grandes regiões e Unidades da Federação**, Brasília, 2000.

BRODY, T. Nutritional Biochemistry. 1994. **Academic Press**, printed in the USA, 657p.

COHEN, T.; GERTLER, A.; BIRK, Y. Pancreatic proteolytic enzymes from carp *Cyprinus carpio*- II. Kinetic properties and inhibition studies of trypsin, chymotrypsin and elastase. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 69 B, p. 647-653. 1981.

CHONG, A. S. C.; HASHIM, R.; CHOW-YANG, L.; ALI, A.B. Partial characterization and activities of proteases from the digestive tract of discus fish (*Symphysodon aequifasiata*). **Aquaculture**, v. 203, p. 321-333. 2002.

EL-SAYED, A.F.M. Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis* spp. **Aquaculture**, v. 179, p.149-168.1999.

EL-SHEMY, M. G. & LEVIN, R. G. Characterization of affinity purified trypsin from hybrid tilapia (*T. nilotica/aurea*). **Journal of Food Biochemistry**, v. 21, p. 163-175. 1997.

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

FANG, L. S. & CHIOU, S.F. Effect of salinity on the activities of digestive proteases from the tilapia fish: *Oreochromis niloticus* in different culture environments. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 93(A), n. 2, p. 439-443. 1989.

FERRAZ, L. B.; CARMO, J. L.;CORREIA, E.S. Avaliação do crescimento de três linhagens de Tilápia (*Oreochromis spp.*) em viveiros. III JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO DA UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO. **Anais**. 2003.

FISH, G. R. Digestion in *Tilapia esculenta*. **Nature**.167: 900-901. 1951.

GAVRILESCU, M. & CHISTI, Y. Biothecnology- a sustainable alternative for chemical industry. **Biothecnology Advances**, v. 23, p. 471-499. 2005.

GEORGE, S. Production of protease by *Bacillus amyloliquefaciens* in solid-state fermentation and its applications in unhairing of hides and skins. **Process Biochemistry**, v. 305, p. 457-462. 1995.

GLASS, H. J. MacDONALD N. L. MORÁN R. M. &STARK J. R. Digestion of protein on different marine species. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 94(B), p. 607-611. 1989.

GODFREY, T.& WEST, S. **Industrial Enzimology**. 2nd. ed., p.3. New York: Macmillian Publishers Inc. 1996.

GUIZANI, N.;ROLLE, R.S.; MARSHALL, M. R.; WEI, C. Isolation, purification and characterization of trypsin from the pyloric ceco of mullet (*Mugil ceplalus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 98 (B), n. 4, p. 517-521. 1991.

GUPTA, R.; GUPTA, K.; SAXEMA, R.K. & KHAN, S. Stable alkaline protease for *Bacillus* sp. **Biotechnology Letters**, v. 21, p.135-138.1999.

KISHIMURA, H.; TOKUDA, Y.; YABE, M.; KLOMKLAO, S.; BENJAKUL, S. ANDO, S. Trypsins from the pyloric ceca of jacobever (*Sebastes schlegelli*) and elkhorn sculpin (*Alcichthys alcicornis*): Isolations and characterization. **Food Chemistry**. v.100, n.4, p.1490-1497. 2006.

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

KUBITZA, F.& KUBITZA, M. M. L. **Tilápia: qualidade da água, sistemas de cultivo, planejamento na produção, manejo nutricional e alimentar e salinidade**. Panorama da Aqüicultura. v.10, n.59. 2000.

KUMAR, C.G. & TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: from an industrial viewpoint. **Biotechnology Advances**, v.17, n. 17, p. 561-594. 1999.

LITTLE, D. C. & EDWARDS, P. Impact of nutrition ad season on pond culture performace of mono-ssex mixed-sex Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 232, p. 279-292. 2004.

LOVSHIN, L.L.& CYRINO, J.E.P. Status of commercial fresh water fish culture in Brazil. SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES. Piracicaba. **Anais**. p.1-20. 1998.

MANACHINI, P. L. & FORTINA, M. G. production in seawater of thermostable alkaline protease by a halotolerant strain of *Bacillus licheniformis*. **Biothecnology Letters**, v. 20, p. 565-568. 1998.

MAURER, Karl- Heinz. Detergent proteases. **Current Opinion in Biotechnology**, v.15, n.4, p. 330-334. 2004.

MEI, C. & JIANG, X. A novel surfactant- and oxidation-stable alkaline protease from *Vibrio metcshnikovii* DL 33-51. **Process Biochemistry**, v. 40, p.2167-2172. 2005.

MITIDIERI, S.; MARTINELLI, A. H. S.; CAMASSOLA, S., et al. Detergentes biológicos biodegradáveis: avaliação das formulações do mercado. **Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 26, p. 56-60, 2002.

MOREIRA, K. A; ALBUQUERQUE, B. F.; TEIXEIRA, M. F. S.; PORTO, A. L. F.; LIMA FILHO, J. L. Application of protease from *Nocardiosis* sp. as a laundry detergent additive. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.18, p. 307-312. 2002.

NELSON, D.; LEHNINGER, A. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3 ed. São Paulo: Savier, 2002. 975 p.

POPMA, T.J. & PHELPS, R.P. Status report to commercial tilápia producers on monose x fingerling productions techniques. In: Aquicultura Brasil'98. SIMBRAQ. Recife. **Anais**, p. 127-145. 1998.

PORTO, T. S.; PESSOA FILHO, P. A.; CAVALCANTI, M. T. H.; BARROS NETO, B.; LIMA FILHO, J. L.; CONVERTI, A.; PORTO, A. L. F.; PESSOA JUNIOR, A. Removal of proteases from *Clostridium perfringens* fermented broth by aqueous two-phase systems (PEG/citrate). *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. proof, p. proof, 2007. ; *Meio de divulgação*: Vários; ISSN/ISBN: 13675435. *submitted*.

PULLIN, R. S. V. & CAPILI, J. B. Genetic improvement of tilapias: problems and projects. THE SECOND INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA IN AQUACULTURE. ICLARM Conf. Proc. 15. Department of Fisheries, Bangkok, Thailand, and ICLARM, Manila, Philippines. 259-266. 1988.

RAO, M. B.;TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESPHANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 597- 635. 1998.

ROCHA, M.E.B. Imobilização do inibidor de tripsina de *Cratylia mollis* em partículas paramagnéticas visando a purificação de tripsina de tilápia. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2002.

SAISUBRAMANIAN, N.; EDWINOLIVER, N. G.; NANDAKUMAR, N; KAMINI, N. R; PUVANAKRISHNAN, R. P. Efficacy of lipase from *Aspergillus niger* as an additive in detergent formulations: a statistical approach. **Journal of Microbiology Biothecnology**. DOI 10.1007/S10295-006-0100-9.2006.

SANA, B; GHOSH, D.; SAHA, M.; MUKHERJEE, J. Purification and characterization of a salt, solvent, detergent and bleach tolerant protease from a new gamma-Proteobacterium isolated from the marine environment of the Sundarbans. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 208-215. 2006.

SOUZA, A. A. G.; AMARAL, I. P. G.; SANTO, A. R. E.; CARVALHO JR, L. B. & BEZERRA, R. S. Trypsin-like enzyme from intestine and piloric caeca of spotted goatfish (*Pseudupeneus maculatus*). **Food Chemistry**, v. 100, p.1429-1434. 2007.

STEELE, D. B. & STOWERS, M. K. Techniques for selection of industrially important microorganisms. **Annual Review of Microbiology**, v. 45, p. 89-106. 1991.

TENGJAROENKUL, B.; SMITH, B. J; CACECI, T. SMITH, S.A. Distribution of intestinal enzymes activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. **Aquaculture**, v. 182, p. 317-327. 2000.

TUNGA, R., SHRIVASTA B., BANERJEE, R. Purification and characterization of protease from solid state culture of *Aspergillus parasiticus*. **Process Biochemistry**, v.38, p.1553-1558. 2003.

VASCONCELOS, A.; SILVA, C. J. M.; SCHROEDER, M.; GUEBITZ, G. M.; PAULO, A. C. Detergent formulations for wool domestic washings contained immobilized enzymes. **Journal of Microbiology Biothecnology**. DOI 10.1007/S10529-006-9050-6.2006.

WOLFF, A. M. & WENTS, W. C. Laundry performace of *subtilisins* proteinases. In: *Subtilisn enzymes: practical protein Engineering*. Eds. Batt, R. and Betzel, C. Nethherlands: **Kluwer Academic Publishers**, p.113-120. 1996.

XUE-YAN, F.; CHANG-HU, X.; MAIO, B; ZHAO-JIE, L.; XIN, G.; YANG, W. Charaterization of proteases from the digestive tract of sea cucumber (*Stichopus japonicus*): high alkaline protease activity. **Aquaculture**, v. 246, p.321-329. 2005.

YAMADA, A. &TAKANO, K. Purification and propertidies of protease from tilapia stomch. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v. 59, p.1903-1990. 1993.

Disponível em www.aquabel.com.br/tilapia. Acesso dia: 11/02/2007

Disponível em www.novozymes. Acesso dia: 11/02/2007

Disponível em www.poupaclique.ig.com.br/materiais. Acesso dia: 11/02/2007