

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



ANA ACACIA GOMES DE SOUZA

**Orientador: Dr. LUIZ BEZERRA DE CARVALHO JÚNIOR.
Co-orientador: Dr. RANILSON DE SOUZA BEZERRA.**

Recife, 2004.

ANA ACACIA GOMES DE SOUZA

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASES
DO SARAMUNETE, *Pseudupeneus maculatus*,
(TELEOSTEI - MULLIDAE), BLOCH, 1793.

Dissertação apresentada ao
curso de Mestrado em
Bioquímica, como requisito à
obtenção do título de Mestre em
Bioquímica pela Universidade
Federal de Pernambuco.

Recife, 26 de fevereiro 2004.

Souza, Ana Acacia Gomes de
Purificação e caracterização de proteases do
Saramunete, *Pseudupeneus maculatus*, (Teleostei –
Mullidae), Bloch, 1793 / Ana Acácia Gomes de
Souza . – Recife : O Autor, 2004.
x, 11 folhas : il., fig., graf., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCB. Mestrado em Bioquímica, 2004.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Bioquímica – Enzima – Propriedade. 2.
Pseudupeneus maculatus – Saramunete – Protease -
Tripsina. 3. Saramunete - Peixe tropical. Título.

577.151.6
572.76

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

UFPE
BC2006-0

Ata da defesa de dissertação da Mestranda **Ana Acácia Gomes de Souza**, realizada em 26 de fevereiro de 2004, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Às 09:05 minutos do dia 26 de fevereiro de 2004, foi realizada, no Auditório Prof. Marcionilo Barros Lins, a defesa de dissertação de **Ana Acácia Gomes de Souza**, aluna do Curso de Mestrado em Bioquímica. Iniciando, o Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, Orientador da aluna, fez a apresentação da mestranda, de seu Co-orientador, o Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra, e da Banca Examinadora composta pelos professores doutores: Luiz Bezerra de Carvalho, na qualidade de Presidente, Patrícia Maria Guedes Paiva, ambos do Depto. de Bioquímica, Ana Lúcia Figueiredo Porto, e Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão, ambos do Depto. de Morfologia e Fisiologia Animal/UFRPE. Após as apresentações, o Sr. Presidente convidou a aluna para a apresentação de sua dissertação intitulada: "**Purificação e Caracterização das Proteases Saramunete (*P. maculatus*)**", e informou, que de acordo com o Regimento Interno do Curso, o candidato dispõe de até 50 (cinquenta) minutos para apresentação do trabalho e o tempo de arguição para cada examinador, juntamente com o tempo gasto pelo aluno para responder às perguntas será de 30 (trinta) minutos. A aluna procedeu a explanação e comentários acerca do tema em 20 (vinte) minutos. Após a apresentação, o Sr. Presidente convidou os membros da Banca Examinadora para ocupar seus lugares, passando a palavra para a Profa. Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão, em seguida para a Profa. Ana Lúcia Figueiredo Porto, e finalmente para a Profa. Patrícia Maria Guedes Paiva. Concluídas suas arguições, agradeceram e cumprimentaram a mestranda e seus orientadores. A sessão foi suspensa para o julgamento pela Banca Examinadora, que se reuniu na Secretaria do Curso, na presença da Coordenadora. Após alguns comentários, a Banca decidiu, por unanimidade, conceder a menção "**Aprovada**". Nada mais havendo a tratar, lavrei a presente ata que vai assinada por mim, Secretário, e demais membros presentes. Recife, 26 de fevereiro de 2004.

por *M. Lins*
Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão
Ana Lúcia Figueiredo Porto
Patrícia Maria Guedes Paiva
Vera Lúcia M. Lins

Jose Milton de Oliveira
Secretário do Curso do
Mestrado em Bioquímica / CCB / UFPE

*Aos meus pais, por todo
esforço realizado para que este
dia se tornasse uma realidade
na minha vida e ao meu noivo
Alexandre por estar sempre
presente mesmo quando eu
estava ausente.*

AGRADECIMENTOS

Ao senhor Deus que esteve presente em todos os momentos de angústias na minha vida e cuidadosamente me carregou nos braços.

A minha família que me apoiou quando decidi deixar de trabalhar para me dedicar aos estudos.

Ao Professor Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, por ser essa excelência de simplicidade, pela valiosa orientação e confiança que se traduziu como estímulo ao meu desempenho acadêmico.

Ao Professor Ranilson de Souza Bezerra pela presente orientação e por sua generosa confiança me mostrando sempre que sou capaz. Você realmente é uma pessoa fantástica.

A Professora Patrícia Maria de Paiva Guedes por ter se tornado minha “terceira orientadora” de tanto que se fez presente durante o mestrado e por todas as palavras de incentivo e carinho.

A Coordenadora do Curso de Mestrado em Bioquímica, Prof^a Vera Lúcia Menezes pelo apoio e confiança.

Ao Professor José Luiz de Lima Filho Diretor do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-LIKA, pelo incentivo à pesquisa permitindo a realização parcial dos meus experimentos.

As Prof^{as} Maria da Paz Carvalho da Silva e Maria Zilda Figueiredo pelo incentivo, carinho e amizade.

Ao meu amigo e técnico do Laboratório de Enzimologia, Albérico Real do Espírito Santo Filho por “tuuuuuudo” que fez por mim e por toda ajuda na parte experimental do meu trabalho e porque não “espiritual”, suas palavras de

[illegible]

Ao aluno de IC Ian Porto por nunca deixar de me atender quando preciso e por ser essa pessoa fantasticamente superdotada, você é maravilhoso.

Aos meus amigos do Mestrado Regininha, Alexandre Libânio, Nerivan, Michele, Neila, Ana Catarina, Joãozinho, Rosângela e Lília por toda cumplicidade que adquirimos durante o curso e por termos sobrevivido aos bons e maus momentos juntos.

Ao Técnico João do Laboratório de Produtos Naturais por sua incansável
presteza, carinho e solidariedade.

Ao meu amigo Miron (valeu cara você é 10) secretário do Mestrado, por todos os galhos (árvores) quebrados e sua paciência.

Aos meus companheiros do laboratório de Enzimologia Carol, Jaqueline, Diego, Marina, Michele, Flávio e Eduardo pelo carinho e amizade.

Ao Mestrado em Bioquímica da UFPE pela oportunidade e apoio
prestado.

A EMPAF Empresa Frigorífica de Armazenagem (NETUNO) por ter colaborado com este trabalho cedendo os exemplares de saramunete.

Ao meu amor Alexandre por todas as noites em claro me ajudando e por todas as lágrimas que enxugou quando eu me sentia incapaz. Obrigada Deus por esse presente tão valioso que me deste.

Aos meus amigos por sempre acreditarem que sou capaz.

LISTA DE TABELAS

	Página
Table 1 – Purification of trypsin-like enzyme from spotted goatfish intestine and pyloric caeca.	14

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Chromatogram of the Sephadex G-75 filtration of dialyzed ammonium sulfate precipitate obtained from the spotted goatfish intestine (A) and pyloric caeca (B).	15
Figura 2 – SDS-PAGE and zymogram of spotted goatfish intestine and pyloric caeca alkaline proteases.	15
Figura 3 – Temperature effect on the trypsin-like enzyme of spotted goat fish pyloric caeca [●] and intestine [○].	15
Figura 4 – pH effect on the trypsin-like enzyme of spotted goat fish pyloric caeca [●] and intestine [○].	16
Figura 5 – Thermal stability of the trypsin-like enzyme of spotted goat fish pyloric caeca [●] and intestine [○].	16
Figura 6 – Ions effect on the trypsin-like enzyme of spotted goat fish pyloric caeca [■] and intestine [□].	16

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Aspectos sócio-econômicos da pesca.	1
1.2. <i>Pseudupeneus maculatus</i> Bloch, 1793.	3
1.3. Proteases.	4
1.4. Aplicação das proteases.	6
2. OBJETIVOS	7
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	8
4. ARTIGO	11

RESUMO

Uma enzima do tipo tripsina foi parcialmente purificada do intestino e cecos pilóricos do saramunete (*Pseudupeneus maculatus*). Para isto foi utilizado um método simples de quatro etapas (tratamento térmico, precipitação por sulfato de amônio, diálise e cromatografia em gel de filtração Sephadex G-75). As enzimas do intestino e cecos pilóricos tiveram os coeficientes de purificação de 96 vezes e 57.7 vezes purificadas, respectivamente, de acordo com esses procedimentos, e os rendimentos foram de 68.1% e 26.1%, respectivamente. As proteínas coletadas da cromatografia em gel de filtração Sephadex G-75 apresentaram uma única banda em SDS-PAGE, com um peso molecular de 24.5 kDa e foram hábeis para hidrolisar caseína. Ambas as enzimas apresentaram um pH ótimo idêntico de 9.0 e temperatura ótima de 55°C. Perderam metade de sua atividade quando incubadas nesta temperatura por 30 min. O K_m para as enzimas do intestino e dos cecos pilóricos foram 3.23 ± 0.04 mM ($n = 7$) e 1.86 ± 0.26 mM ($n = 8$), respectivamente. Esta diferença estatisticamente significativa no K_m foi a única discrepância entre as enzimas em estudo. Finalmente, essas atividades enzimáticas foram inibidas pelos seguintes íons em ordem decrescente: $Al^{3+} > Zn^{2+} > Hg^{2+} = Cu^{2+} > Cd^{2+}$. Os efeitos do Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} , K^{+1} , Li^{+1} e Co^{2+} foram estatisticamente significantes entre as enzimas do intestino e cecos pilóricos.

Palavras chaves: Enzima, *Pseudupeneus maculatus*, protease, saramunete, peixe tropical, tripsina.

ABSTRACT

Trypsin-like enzyme was partially purified from the intestine and pyloric caeca of spotted goatfish (*Pseudupeneus maculatus*) by a simple four steps procedure (heat treatment, ammonium sulfate precipitation, Ammonium sulfate dialysis and Sephadex G-75 filtration). The enzymes from the intestine and pyloric caeca were 96-fold and 57.7-fold purified, respectively, according to this procedure, and yields of 68.1% and 26.1% were achieved, respectively. The proteins collected from the Sephadex G-75 filtration showed one single band in SDS-PAGE, molecular weight of 24.5 kDa and were able to hydrolyze casein. Both enzymes presented identical optima pH (9.0) and temperature (55°C). They lost half of this activity when incubated at this temperature for 30 min. K_m for the trypsin-like enzyme from the intestine and pyloric caeca were 3.23 ± 0.04 mM (n =7) and 1.86 ± 0.26 mM (n = 8), respectively. This statistically difference in K_m was the unique discrepancy between these enzymes. Finally, their activities were inhibited by the following ions in decreasing order: $Al^{3+} > Zn^{2+} > Hg^{2+} = Cu^{2+} > Cd^{2+}$. The effects of Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} , K^{+1} , Li^{+1} and Co^{2+} were statistically significant.

Key words: Enzyme, *Pseudupeneus maculatus*, protease, Spotted Goatfish, tropical fish, trypsin.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos sócio-econômicos da pesca.

A produção mundial de pescado, sumarisa 101,3 milhões de toneladas/ano, provenientes tanto de produções extrativas marinhas quanto de água doce, dentre as quais, 84,3 milhões de toneladas oriundas da pesca marítima, sendo cerca de 70% constituída de teleósteos pelágicos e 8% de espécies demersais (FAO, 1997).

O setor pesqueiro nacional é responsável por uma produção estimada em 465,7 mil toneladas/ano, proveniente tanto da pesca artesanal como industrial, onde em termos de valor produzido, a participação do setor artesanal certamente supera a do industrial em função do mesmo incidir predominantemente sobre espécies mais nobres. Da produção nacional de pescado, cerca de 75% é proveniente da pesca marítima, na qual o Brasil ocupa a 25ª posição entre os países produtores, participando com menos de 1% da produção mundial de pescado (HAZIN, et al. 1997).

Na região Nordeste, cuja linha costeira cobre o equivalente a 40,7% do litoral brasileiro, a produção de pescado estuarino/marinho situa-se em torno de 70 mil toneladas/ano, com uma certa estabilização no tocante à pesca artesanal ao redor de 50 mil toneladas/ano, com tendências decrescentes no tocante a pesca industrial e ao conjunto das pescas. Esta região apresenta contrastes marcantes na atividade pesqueira, com características que variam desde o mais rudimentar até a atividade industrial (HAZIN, et al. 1997).

O estado de Pernambuco possui um litoral de 187Km de extensão (representando cerca de 2,5% do litoral brasileiro), que estende-se desde o município de Goiana, ao norte, até o município de São José da Coroa Grande, ao sul, onde estão localizados 14 municípios costeiros totalizando cerca de 33 comunidades envolvidas diretamente com a atividade pesqueira (ESTATPESCA, 1999).

A atividade pesqueira em Pernambuco é realizada principalmente por embarcações que medem de 8 à 12m de comprimento e com menos de 20 TBA (tonelagem bruta de arqueação), o que as caracteriza como embarcações de pequeno porte, possuindo em sua maioria casco de madeira e realizando viagens que não ultrapassam 15 dias (ESTATPESCA, 2000).

Os desembarques são dispersos ao longo do litoral. Trata-se de uma atividade produtiva fixadora, responsável pela geração de emprego e renda de mais de 60 mil famílias no estado. Observa-se uma grande diversidade de pescados, destacando-se, entre outros, saramunete, cioba, serra, cavala, agulha, lagosta, camarão, caranguejo, sururu, mariscos e polvo. (ESTATPESCA, 2000). Isto torna a pesca, dentro do Estado de Pernambuco, uma atividade de grande importância tanto econômica quanto social, pois além de aumentar o número de empregos de forma direta e indireta também aumenta a oferta de proteína de origem animal para as populações de baixa renda.

A partir de 1996, o PRORENDA RURAL – PE encetou em Pontas de Pedra, Goiana – PE com a Colônia de Pescadores Z-3 a implementação de uma unidade de beneficiamento e comercialização de pescado. Tal empreendimento objetivou apoiar a agregação de valor ao pescado, a partir do aumento da qualidade e da diversificação dos produtos pesqueiros. Este entreposto propiciou o melhor aproveitamento do pescado. Sem a unidade 70% dos pescados eram desperdiçados, pois os peixes de segunda e terceira, que só adquirem valor comercial quando beneficiados, deixavam de ser utilizados.

Uma recente avaliação mundial das capturas incidentais (fauna acompanhante) e dos descartes da pesca apontou que um volume da ordem de 17,9 a 39,5 milhões de toneladas de pescado de baixo valor comercial, juntamente com elevada proporção de juvenis de espécies de valor comercial, é descartada anualmente pelas embarcações. O efeito combinado desta prática é ameaça à manutenção da biodiversidade e a sustentabilidade, a longo prazo, dos recursos pesqueiros. Não obstante, aumentos da produção poderiam advir da expansão da captura de recursos não tradicionais, cujos potenciais ainda não são conhecidos (MMA, 1997).

Segundo dados do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, espécies de peixes de recifes de coral estão entre as categorias de pescados de maior valor no mercado, contribuindo com 28,25% da captura anual e com quase 50% da captura de peixes ósseos (ESTATPESCA, 1996). Uma dessas espécies cuja atividade pesqueira vem sendo intensificada, principalmente no Estado de Pernambuco, é o saramunete, *Pseudupeneus maculatus*.

Desde 1994 a participação do saramunete nas capturas vem aumentando, saindo de um patamar de aproximadamente 193 toneladas em 1993, chegando a atingir cerca de 626 toneladas em 2000 (ESTATPESCA, 2000). Apesar de ocorrer em todos os estados da região Nordeste, sua pesca, para fins comerciais, está praticamente restrita a Pernambuco.

A razão para o crescimento econômico da pesca desta espécie foi que a partir de 1998 a demanda internacional aumentou o interesse nesta espécie, que tem sido exportada para países como Estados Unidos e França. No ano de 2000, esta espécie representou o segundo item pesqueiro mais exportado em Pernambuco, representando cerca de 12% das exportações de pescado no Estado, ficando atrás apenas do camarão marinho que responde por cerca de 58% das exportações (ESTATPESCA, 2000). Se levarmos em consideração que a maioria do camarão exportado é proveniente de cultivo, teremos então o saramunete como o principal item pesqueiro exportado que é proveniente da atividade pesqueira no estado de Pernambuco.

1.2. *Pseudupeneus maculatus* Bloch, 1793.

O *P. maculatus* pertence a uma família numericamente pequena, apresentando 6 gêneros: *Mulloidichthys* ou *Muloides*, *Mullus*, *Parupeneus*, *Pseudupeneus*, *Upeneichthys* e *Upeneus*, com aproximadamente 55 espécies (NELSON, 1994).

O saramunete apresenta coloração variada, de acordo com seu hábito, quando ativos, investigando o substrato, apresentam três manchas retangulares escuras grandes ao longo da linha lateral com o colorido geral acinzentado claro e, quando em repouso, sua coloração apresenta-se avermelhada com manchas amareladas nas margens das escamas e linhas diagonais azuladas na cabeça. Há variação do colorido, pois a espécie é capaz de mudar rapidamente de cor, disfarçando-a com ambiente e, tal variação de cores talvez represente um comportamento social (HUMANN, 1994).

É uma espécie de hábito demersal, mas suas larvas são pelágicas, isto faz com que esta espécie apresente uma distribuição batimétrica diferenciada com relação a juvenis e adultos ficando os indivíduos jovens nas áreas de menores profundidades, e os indivíduos mais velhos costumam distribuir-se em áreas onde a profundidade é maior.

Habita águas rasas com profundidades inferiores a 90m, em áreas com fundos rochosos e coralinos, em bolsões de areia e cascalho ou bancos de algas próximos, da costa a ilhas oceânicas e apresenta ampla distribuição geográfica, estendendo-se do Atlântico Ocidental, Bermudas, Nova Jersey, Estados Unidos, Golfo do México, Bahamas, Barbados, Porto Rico, Cuba, Jamaica e Brasil ao Oceano Pacífico e Índico (CERVIGON, 1993).

Geralmente encontram-se solitários ou agrupados em pequenas associações de 4 a 6 indivíduos, nadando próximo ao substrato e investigando-o a procura de alimento. Usualmente são vistos em associações alimentares, geralmente relacionadas à localização e captura de alimento (ARONSON & SANDERSON, 1987; DUBIN, 1982). Esta espécie costuma alimentar-se de diversos organismos que compõem o zoobentos marinho, principalmente invertebrados (CERVIGON, 1993).

É uma espécie de crescimento lento e elevada longevidade (6 anos). Existem evidências de que esta espécie só atinge a maturidade quando está com 21cm aproximadamente, o que corresponde à idade de 3,5 anos, demonstrando uma maturidade um tanto quanto tardia para uma espécie que vive em média cinco anos.

1.3. Proteases.

As enzimas proteolíticas atuam como catalisadores biológicos de alta especificidade, desempenhando um papel fundamental na manutenção da vida. Por exemplo, elas são responsáveis pelo processamento de nutrientes de natureza macromolecular que têm monômeros importantes à economia do animal. Esse é o caso das enzimas proteolíticas, secretadas no lume do trato digestório dos animais, que degradam as proteínas da dieta, de sorte que os aminoácidos e peptídeos possam ser melhor aproveitados por estes (Bezerra *et al.* 2001).

Atualmente, as proteases são classificadas baseadas em dois critérios: 1) o tipo de reação catalisada; e 2) a natureza química do sítio catalítico. Dependendo do local de ação na cadeia polipeptídica as proteases podem ser divididas em dois grandes grupos: exopeptidases e endopeptidases. As exopeptidases atuam próximo às extremidades das cadeias polipeptídicas. Enquanto as endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas

das cadeias polipeptídicas. Quanto ao sítio catalítico, as exoproteases podem ser classificadas em amino ou carboxipeptidases em função do seu sítio de ação na extremidade N– ou C–terminal, respectivamente; as carboxipeptidases podem ser subdivididas em serino, metalo e cisteínocarboxipeptidases, enquanto as aminopeptidases, em função do número de resíduos de aminoácidos removidos são subdivididas em aminopeptidases (um resíduo), aminodipeptidases (dois resíduos) ou aminotripeptidases (três resíduos). As endoproteases podem ser classificadas em serinoendopeptidases, cisteínoendopeptidases, aspárticoendopeptidases, metaloendopeptidases e endopeptidases com mecanismo de catálise desconhecido (BARRET, 1994).

As enzimas também são classificadas segundo o valor de pH onde a atividade é máxima; assim existem proteases ácidas, neutras e alcalinas em função do seu pH ótimo (RAO, et al. 1999).

A caracterização parcial de vários tipos de proteases presentes no trato digestivo de diferentes espécies de peixes é baseada em estudos bioquímicos e observações eletroforéticas (CHONG, et al. 2002). A tripsina e quimiotripsina de vísceras de anchova (*Engraulis japonica*) foram caracterizadas como serino-proteases, comparável às enzimas tipo tripsina e quimiotripsina de intestinos de outros peixes (HEU, et al. 1995). Proteases ácidas de estômago de diferentes espécies de peixes mostraram-se ser do tipo pepsina de mamíferos (DÍAZ-LOPES, et al. 1998).

Estudos recentes sobre o efeito do pH, temperatura ótima, inibidores e substratos sobre a atividade proteolítica de extratos de peixes obtidos a partir de estômago, fígado, cecos pilóricos e intestino de tambaqui (*Colossoma macropomum*) mostraram que o pH e a temperatura ótima das proteases ácidas e alcalinas foram de 1.8 e 35°C e 7.0-9.0 e 65°C, respectivamente (BEZERRA, et al. 2000). Foi ainda purificada uma tripsina termoestável, a qual permaneceu inalterada após a incubação a 55°C por 30min, tornando-a atrativa para aplicações industriais (BEZERRA, et al. 2001).

Uma pepsina de salmão foi a primeira protease de peixe a ser cristalizada (NORRIS & ELAM, 1940). Na Noruega, GILDBERG (2001), reportou um processo de produção de proteases em alta escala, o qual produz expressivas quantidades de pepsina e tripsina a partir de vísceras de peixes.

1.4. Aplicação das proteases

Uma tendência recente no mundo moderno é o desenvolvimento de tecnologias com menor impacto ambiental, onde as proteases têm extensas aplicações no tratamento em processos de biorremediação. As proteases utilizadas em indústrias de alimentos e detergentes são preparadas em grande quantidade e usadas como preparações cruas, enquanto que aquelas utilizadas em medicina são produzidas em pequena quantidade, mas requerem purificação extensiva antes de serem aplicadas (RAO, et al. 1998).

Na indústria alimentícia, as proteases são usadas nos processos de fermentação, produção de gelatinas, leite de soja, vinhos, chocolates, carnes, pescados, legumes, hidrolisados protéicos e molhos (HAARD, et al. 1992; MOREIRA, et al. 2002). Clarificação de sucos, devido à hidrólise das proteínas solúveis neles contidos em altas concentrações (DAWES, et al. 1994); fabricação de pães produzindo uma massa mais macia; produção de queijo melhorando a maturação e o desenvolvimento da textura e do sabor; e indústria de carne melhorando a tenderização (DONAGHY & MACKAY, 1993).

Também são amplamente empregadas na formulação de detergentes, produções de papel (STEELE & STOWERS, 1991; DONAGHY & MACKAY, 1993), indústria de couro (GEORGE, et al. 1995), produção de cerveja (DONAGHY & MACKAY, 1993), recuperação de prata dos filmes de raios-X (KUMAR & TAKAGI, 1999) e na indústria farmacêutica (RAO, et al. 1998).

2. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral:

- Purificar e caracterizar proteases do trato digestório do saramunete *Pseudupeneus maculatus*.

3.2. Objetivos específicos:

- Promover a purificação de proteases alcalinas extraídas do trato digestório do saramunete.
- Caracterizar parcialmente as proteases purificadas.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARONSON, R. B. & SANDERSON, S. L. 1987. Benefits of heterospecific foraging by the Caribbean wrasse, *Halichoeres garnoti* (Pisces: Labridae). **Environmental Biology of Fishes**, V. 18, N. 4, p. 303-306.
- BARRET, A. J. 1994. Classification of peptidases. **Methods in enzymology**. New York, academic press, v. 244, p. 1-59.
- BEZERRA, R. S., SILVA, J. F., LINO, M. A. S., VIEIRA, V. L. A. & CARVALHO JR. L. B. 2000. Characterization of stomach and pyloric caeca proteinases of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Journal of Food Biochemistry**, v. 24, n. 3, p. 189-199.
- BEZERRA, R. S., VIEIRA, V. L. A. & CARVALHO JR, L. B. 2001. Proteases no trato digestivo de peixes. Tripsina do tambaqui (*Colossoma macropomum*), modelo alternativo para o aproveitamento de sub-produtos na indústria pesqueira. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 22, p. 46-49.
- CERVIGÓN, F. 1993. **Los peces marinos de Venezuela**. 2. ed. Caracas: Fundación Científica de los Roques, 427p.
- CHONG, A. S. C., HASHIM, R., CHONG-YANG, L. & ALI, A. B. 2002. Partial characterization e activities of protease from the digestive tract of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*). **Aquaculture**, v. 203, p. 321-333.
- DAWES, H., STRUEBI, P. & KEENE, J. 1994. Kiwifruit juice clarification using a fungal proteolytic enzyme. **Journal of Food Biochemistry**, v. 59, n. 4, p. 858-861.
- DÍAZ-LÓPES, M., MOYANO-LÓPEZ, F. J., ALARCÓN-LÓPEZ, F. J., GÁRCIA-CARREÑO, F. L. & NAVARRETE DEL TORO, M. A. 1998. Characterization of fish acid proteases by substrate-gel eletrophoresis. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part B, v. 121, p. 369-377.

- DONAGHY, J. A. & MACKAY, A. M. 1993. Production and properties of an alkaline proteases by *Auresbasidium pullulans*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 74, p. 662- 666.
- DUBIN, R. E. 1982. Behavioral interactions between caribbean reef fish and eels (Muraenidae and Ophichthidae). **Copeia**, n. 1, p. 229-232.
- ESTATPESCA, 1996. **Boletim estatístico da pesca marítima e estuarina do Estado de Pernambuco**. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA, Centro de Pesquisa e Extensão Pesqueira do Nordeste – CEPENE; Tamandaré, Agosto de 1997.
- ESTATPESCA, 1999. **Boletim estatístico da pesca marítima e estuarina do Estado de Pernambuco**. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA, Centro de Pesquisa e Extensão Pesqueira do Nordeste – CEPENE; Tamandaré, Agosto de 2000.
- ESTATPESCA, 2000. **Boletim estatístico da pesca marítima e estuarina do Estado de Pernambuco**. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA, Centro de Pesquisa e Extensão Pesqueira do Nordeste – CEPENE; Tamandaré, Agosto de 2001.
- FAO, 1997. **Marine Resources Service, Fishes resources Division**: review of the state of world fishery resources: Marine Fisheries. Rome: FAO, 173 p. FAO Circular. N. 920.
- GILDBERG, A. 2001. Utilisation of male Artic capelin and Atlantic cod intestines for fish sauce production – evaluation of fermentation conditions. **Bioresource Technology**, 76:119-123.
- HAARD, N. F. 1992. A review of proteolytic enzymes from marine organisms and their application in the food industry. **Journal Aq. Food. Product Tech.** 1(1): 17-35.

- HAZIN, F. H. V., MATTOS, S. M. G., PEDROSA, B. M. J., LINS OLIVEIRA, J. E. & VASCONCELOS, J. A. 1997. **Diagnósticos da pesca artesanal marítima do Estado do Rio Grande do Norte**. Natal: FUNPEC, 78p.
- HUMANN, P. 1994. **Reef Fish Identification – Florida, Caribbean, Bahamas**. 2 ed. New World Publications, Inc. 396 p.
- KUMAR, C. G. & TAKAGI, H. 1999. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*, v.17, n.17, p 561-594.
- MMA, 1997. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. **Diretrizes Ambientais para o Setor Pesqueiro: diagnóstico e diretrizes para a pesca marítima**. Brasília: MMA, 124p.
- MOREIRA, K. A., ALBUQUERQUE, B. F., TEIXEIRA, M. F. S., PORTO, A. L. F. & LIMA FILHO, J. L. 2002. Application of proteases from *Nocardiopsis sp.* As a laundry detergent additive. **World Journal of Microbiology e Biotechnology**, v. 18, p. 307-312.
- NELSON, J. S. 1994. **Fishes of the world**. 3 ed. John Wiley & Sons, Inc., 600p.
- NORRIS, E. R. & ELAM, D. W. 1940. Preparation and properties of crystalline salmon pepsin. **Journal of Biological Chemistry**. 134: 443-454.
- 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**, v. 62, n. 3, p. 597-635.
- RAO, M. B. & DESHPANDE, V. V. 1999. Proteases and their applications in biotechnology. In and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular International**, v. 32, p. 413-419.
- STEELE, D. B. & STOWERS, M. K. 1991. Techniques for selection of industrially important microorganisms. **Annual Review of Microbiology**, v. 45, p. 89- 106.

**Artigo IN PRESS no periódico:
"FOOD CHEMISTRY"**

**TRYPSIN-LIKE ENZYME FROM INTESTINE AND
PYLORIC CAECA OF SPOTTED GOATFISH
(*Pseudupeneus maculatus*)**

Ana A. G. Souza; Ian P. G. Amaral, Albérico R. Espírito Santo,

Luiz B. Carvalho Jr. & Ranilson S. Bezerra.



Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Food Chemistry xxx (2006) xxx–xxx

Food
Chemistry

www.elsevier.com/locate/foodchem

Trypsin-like enzyme from intestine and pyloric caeca of spotted goatfish (*Pseudupeneus maculatus*)

Ana A.G. Souza^a, Ian P.G. Amaral^{a,b}, Albérico R. Espírito Santo^a,
Luiz B. Carvalho Jr.^{a,b}, Ranilson S. Bezerra^{a,b,*}

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

^b Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Brazil

Received 28 October 2005; accepted 1 December 2005

Abstract

Trypsin-like enzyme was partially purified from the intestine and pyloric caeca of spotted goatfish (*Pseudupeneus maculatus*) by a simple three steps procedure: heat treatment, ammonium sulphate precipitation and Sephadex G-75 filtration. The enzymes from the intestine and pyloric caeca were 96- and 57.7-fold purified with yield values of 68.1% and 26.1%, respectively. The pyloric caeca enzyme collected from the Sephadex G-75 filtration showed a single band in SDS-PAGE (24.5 kDa). Both enzymes presented identical optima pH (9.0) and temperature (55 °C). After incubation at 45 °C for 30 min, enzymes obtained from intestine remained fully activity while a loss of activity (10%) of enzyme extracted from pyloric caeca was registered. Michaelis constant was not significantly different for trypsin-like enzyme from pyloric caeca (1.82 ± 0.19 mM) and that from the intestine (1.94 ± 0.45 mM) acting on benzoyl-DL-arginine-*p*-nitro-anilide (BAPNA). Finally, their activities were inhibited by the following ions in decreasing order: $\text{Al}^{3+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Hg}^{2+} = \text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+}$. The effects of Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} , K^{1+} , Li^{1+} and Co^{2+} showed to be less intensive. The similarities between them provide basis for the proposition of obtaining an attractive protease preparation from the tons of intestine and pyloric caeca, that are usually discarded, from this fish which is an important species exported by North-eastern Brazilian fishery industry.

© 2006 Published by Elsevier Ltd.

Keywords: Enzyme; Protease; Trypsin; Tropical fish; Spotted goatfish; *Pseudupeneus maculatus*

1. Introduction

There is a large diversity of aquatic species in the tropical zones. Fishes are ectothermic animals, and have many morphological and physiological adaptations, presenting different food habits and characteristics of the digestive tracts. It is reflected in the digestive enzyme activities and their properties (Alencar et al., 2003; Bezerra et al., 2001, 2005; Bezerra, Santos, Lino, Vieira, & Carvalho, 2000; Cohen, Gertler, & Birk, 1981; El-Shemy & Levin, 1997; Guizani, Rolle, Marshall, & Wei, 1991).

Spotted goatfish is a marine fish living in the coastal waters. It presents a typical carnivore digestive tract composed of stomach followed by pyloric caeca, which in turns precedes a very short intestine (from 0.8- to 1.0-fold standard length). This developed pyloric caeca is probably responsible for a higher amount of alkaline proteases encountered in this aquatic animal (Alencar et al., 2003).

Proteases represent an important class of industrial enzymes, accounting for about 50% of the total sale of enzymes in the world. There are many studies on new sources of proteolytic enzymes, and proteases from fish have been frequently brought to focus. These proteins are present in fish viscera, an important foodstuff industry processing waste, usually discarded, that could be employed as an alternative source of bioactive molecules for biotechnological applications (De Vecchi & Coppes, 1996; Haard, 1992).

* Corresponding author. Tel.: +55 81 212 685 40/47; fax: +55 81 212 684 85/685 76.

E-mail addresses: ransoube@lika.ufpe.br, ransoube@uol.com.br (R.S. Bezerra).

The occurrence of digestive alkaline proteases in intestine and pyloric caeca of spotted goatfish (*Pseudupeneus maculatus*) has been recently reported (Alencar et al., 2003). Evidences supported by specific substrate and inhibitors indicate that a trypsin-like enzyme is present in the pyloric caeca of this animal. On the other hand large amounts of viscera are produced by processing of this fish, which are actually discarded. In Northeast Brazil, amounts of about 1400 tons of spotted goatfish have been caught in 2004 yielding as waste an amount of about 140 tons of viscera per year. It is the second most important exported item in the Pernambuco state fishery industry, Northeast Brazil. Therefore, these wastes could represent an alternative source of biomolecules, such as proteases.

This enzyme occupies a key role in foodstuff industry. It can be employed in cheese ripening and flavouring, protein hydrolysate production (high quality aminoacids and peptides containing preparations), soya sauce production, meat flavouring and tenderising. These proteins are also used to recover protein from fish carcasses that would otherwise go to waste after filleting (Haard, 1992; Mackie, 1982).

The recovery of proteolytic enzymes from fish's viscera is an alternative to minimize the economical and ecological onus of this processing waste. However, the high cost of purification could be a limiting problem to propose fish's proteases as far their commercial application is concerned.

A simple and low cost method to purify fish thermostable alkaline proteolytic enzymes has been developed in our laboratory based on heat treatment, ammonium sulphate precipitation and Sephadex G-75 filtration (Bezerra et al., 2001, 2005). Trypsins from tambaqui (*Colossoma macropomum*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) have been successfully purified following this protocol. Here, this procedure was again used to purify trypsin-like enzyme from spotted goatfish intestine and pyloric caeca. Moreover, in this paper, some physico-chemical and kinetics properties of these partially purified preparations were investigated as well as the effect of metal ions on their activities.

2. Materials and methods

2.1. Material

Empresa de Armazenagem Frigorífica Ltda (EMPAF) kindly donated the specimens of spotted goatfish. Azocasein and benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA) were acquired from Sigma Chemical Com. and all others reagents used were of analytical grade.

2.2. Enzyme extraction

Fish intestine and pyloric caeca were dissected, cautiously cleaned with deionised water. Then the extracted tissues were homogenized in 0.9% (w/v) NaCl (40 mg of tissue/mL) by using a tissue homogeniser. Then the homogenate was centrifuged at 7000g for 10 min at 4 °C. The supernatant (crude extract) was used for further purification steps.

2.3. Enzyme purification

The trypsin-like enzyme was purified from the intestine and pyloric caeca by three steps procedure (Bezerra et al., 2001). Crude extract (50 ml) was incubated at 45 °C for 30 min and centrifuged at 10,000g for 10 min at 4 °C. The supernatant was then collected and fractionated with ammonium sulphate during 1 h at 4 °C to obtain the fractions of saturation from 0% to 40% and from 40% to 80%. The 40–80% fraction precipitate was dissolved in 50 ml of 0.2 M Tris–HCl, pH 7.2, and dialysed against this buffer for 24 h at 4 °C. Afterwards the dialysed enzyme was applied (10 ml) on a Sephadex G-75 column (1.2 × 42 cm) which was eluted with 0.9% (w/v) NaCl at a flow rate of 20 ml/h. The second peak was pooled and used throughout the enzyme characterisation.

2.4. Enzyme assays

Proteolytic activity (Alencar et al., 2003): in a micro centrifuge tube (quadruplicates) 1% (w/v) azocasein (100 µl), prepared in 0.2 M Tris–HCl, pH 7.2, was incubated with the crude extract (60 µl) for 60 min at 25 °C. Then, 480 µl of 10% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) were added to stop the reaction. After 15 min, centrifugation was carried out for 5 min at 8000g. The supernatant (320 µl) was added to 1 M NaOH (560 µl) and the absorbance of this mixture was measured at 440 nm (Varian/UV–Vis 634-S) against a blank similarly prepared except that 0.15 M NaCl replaced the crude extract sample. Previous experiment showed that for the first 60 min the reaction carried out under the conditions described above follows first order kinetics. One unit (U) of enzymatic activity was defined as the amount of enzyme capable to produce a 0.001 change in absorbance per minute.

Trypsin activity (Alencar et al., 2003): 30 µl of 4 mM BAPNA, prepared in dimethylsulphoxide (DMSO), was incubated in the well microtiter plate with the enzyme (30 µl) and 0.2 M Tris–HCl buffer (140 µl) pH 8.0. The release of *p*-nitroaniline was followed by the increase in absorbance at 405 nm in a microtiter plate reader (Bio-Rad 550). Controls were performed without enzyme and substrate solution.

2.5. Measurement of protein

The protein content was estimated by measuring sample absorbance at 280 and 260 nm and using the following equation: [protein] mg/mL = $A_{280\text{ nm}} \times 1.5 - A_{260\text{ nm}} \times 0.75$ (Warburg & Christian, 1941).

2.6. Electrophoresis SDS–PAGE and zymogram

Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) was carried out according to the method of Laemmli (1970), using a 4% (w/v) stacking gel and a 12.5% (w/v) separating gel. The gels were stained for protein overnight in 0.01% (w/

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

v) Coomassie Brilliant Blue R250. The background of the gel was destained in 10% (v/v) acetic acid. The molecular weight of the spotted goatfish trypsin-like enzyme was estimated using the protein standards (Sigma) bovine albumin (66 kDa), ovalbumin (46 kDa), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (36.0 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), trypsinogen (24.0 kDa) and α -lactalbumin (14.2 kDa). The proteolytic activity of the bands (zymogram) was demonstrated according to García-Carreño, Dimes, and Haard (1993). Briefly, the enzymes preparations were submitted to electrophoresis as above except that neither reducing agents nor pre-boiling treatment were used before loading them onto the gels. After the SDS–PAGE, the gels were immersed in 2.5% (100 ml) Triton X-100 in 100 mM Tris–HCl, pH 8.0, for 30 min at 4 °C under mild mixing to remove the SDS. The Triton X-100 was removed by washing the gels three times with 100 ml of 100 mM Tris–HCl buffer, pH 8.0. Then, the SDS and Triton X-100 free gels were incubated with 50 ml of 3% (w/v) casein in 50 mM Tris–HCl buffer, pH 8.0, for 30 min at 4 °C. Afterwards, the temperature was raised to 25 °C and kept for 90 min to allow the digestion of the casein by the active fractions. Finally, the gels were stained with 0.01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 as above described.

2.7. Physico-chemical properties

The influences of temperature and pH on the trypsin activity of the enzyme preparations were studied as follows: the purified extract was assayed (quadruplicates) as described above at temperatures ranging from 25 to 65 °C and pH values from 6.0 to 10.5 (Tris–HCl buffer).

The thermal stability of the enzymes was determined by assaying (quadruplicates) its activity (25 °C) after pre-incubation for 30 min at temperatures ranging from 30 to 60 °C followed by 25 °C equilibrium.

2.8. Effect of metal ions

Samples of the purified enzymes (30 μ l) were added in a 96-well microtiter plate with 3 mM solution (70 μ l) of AlCl_3 , BaCl_2 , CaCl_2 , CdSO_4 , CoCl_2 , CuSO_4 , HgCl_2 , KCl ,

LiCl , MgCl_2 , MnCl_2 , and ZnSO_4 . After 30 min of incubation, Tris–HCl buffer (70 μ l), pH 8.0, and 4 mM BAPNA (30 μ l) were added. The *p*-nitroaniline produced was measured in a microplate reader at 405 nm after 30 min of reaction.

2.9. Kinetic parameters

BAPNA prepared in DMSO was used as substrate (final concentration from 0.1 to 1 mM), in a total volume of 170 μ l, at pH 8 (0.2 M Tris–HCl) in a 96-well microtiter plate. The reaction (quadruplicates) was started by addition of 30 μ l of purified enzyme solution (420 μ g protein/mL) and *p*-nitroaniline release followed at 405 nm by using a microtiter plate reader (Bio-Rad 550). The blanks were similarly prepared without enzyme. The reaction rates were fitted to a Michaelis–Menten kinetics using Enzfitter Software Version 1.05 (Elsevier-Biosoft).

3. Results and discussion

Table 1 summarizes the three-step procedure used to purify the alkaline proteases from the spotted goatfish viscera. The enzymatic preparations from the intestine and pyloric caeca were 96-fold and 57.7-fold purified, respectively, and yields of 68.1% and 26.1% were achieved, respectively.

The results from the Sephadex G-75 filtration for both enzymes are shown in Fig. 1. The enzymatic activity was coincident with the second protein peak for the intestine dialysed ammonium sulphate precipitate, whereas two peaks with activities were found for the pyloric caeca. In this work, the second peak (higher specific enzymatic activity) was selected for the characterisation of the enzyme from the pyloric caeca. Similar chromatogram profiles were obtained for tambaqui and Nile tilapia, representing a reproducible protocol for purification of tropical fish trypsin (Bezerra et al., 2001, 2005). Although the heat treatment does not enhance the purification performance its inclusion has been shown to improve the ammonium sulphate precipitation. Probably, the protein hydrolysis catalysed by the fish thermostable proteases for 30 min at 40 °C

Table 1
Purification of trypsin-like enzyme from spotted goatfish intestine and pyloric caeca

Organ and step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
<i>Intestine</i>					
Crude extract	203.0	184.9	0.911	100.0	1
Heat treatment	148.3	174.1	1.174	94.1	1.3
Ammonium sulphate precipitation	5.7	79.2	13.895	42.8	15.3
Sephadex G-75 filtration	1.44	126.0	87.500	68.1	96.0
<i>Pyloric caeca</i>					
Crude extract	331.2	432.7	1.307	100.0	1
Heat treatment	271.8	399.0	1.468	92.2	1.1
Ammonium sulphate precipitation	13.3	134.3	10.098	31.0	7.7
Sephadex G-75 filtration	1.5	113.1	75.400	26.1	57.7

Proteins and enzymatic activities were established, respectively, according to Warburg and Christian (1941) and Alencar et al. (2003) using azocasein as substrate.

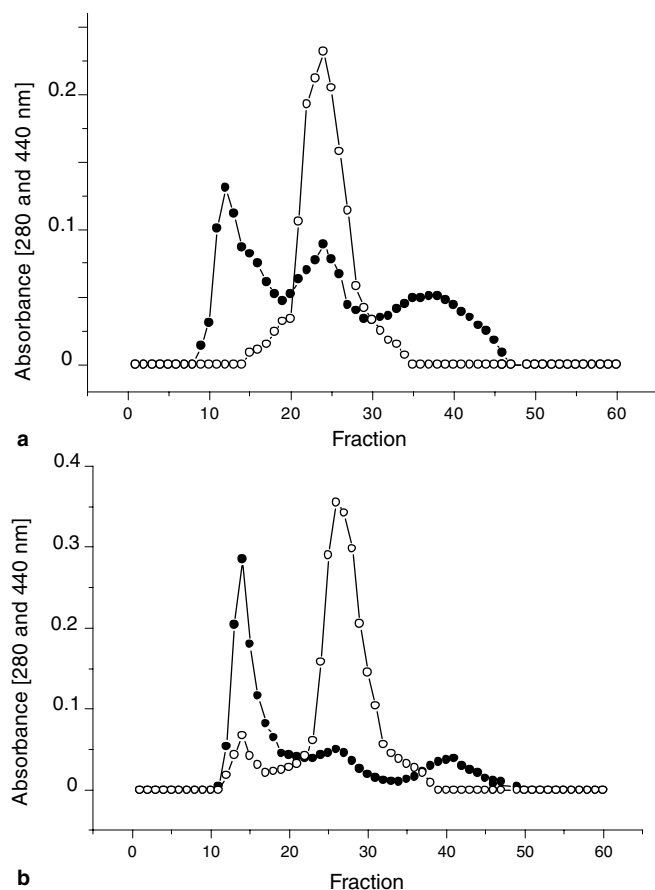


Fig. 1. Chromatogram of the sephadex G-75 filtration of dialysed ammonium sulphate precipitate obtained from the spotted goatfish intestine (a) and pyloric caeca (b). The protein eluted was monitored at 280 nm (●) and the azocasein hydrolysis catalysed by each fraction was followed at 440 nm (○).

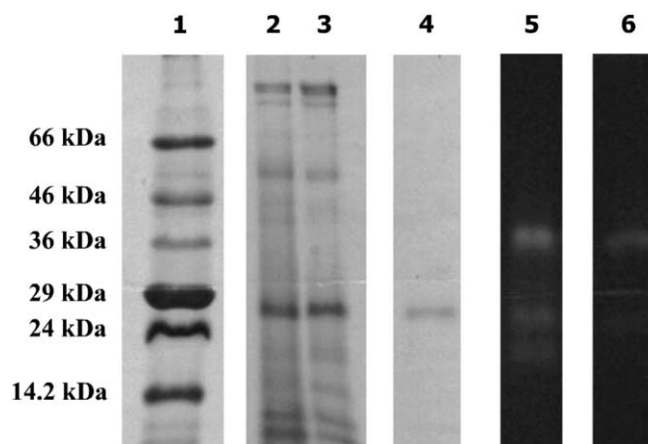


Fig. 2. SDS-PAGE and zymogram of spotted goatfish intestine and pyloric caeca alkaline proteases. Pattern of stained bands produced by standard proteins (lane 1), intestine crude extract (lane 2), pyloric caeca crude extract (lane 3) and pyloric caeca fraction collected by Sephadex G-75 filtration (lane 4) during SDS-PAGE and zymogram specific to proteases from intestine (lane 5) and pyloric caeca (lane 6). Protein standards (Sigma) were bovine albumin (66 kDa), ovalbumin (46 kDa), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (36.0 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), trypsinogen (24.0 kDa) and α -lactalbumin (14.2 kDa).

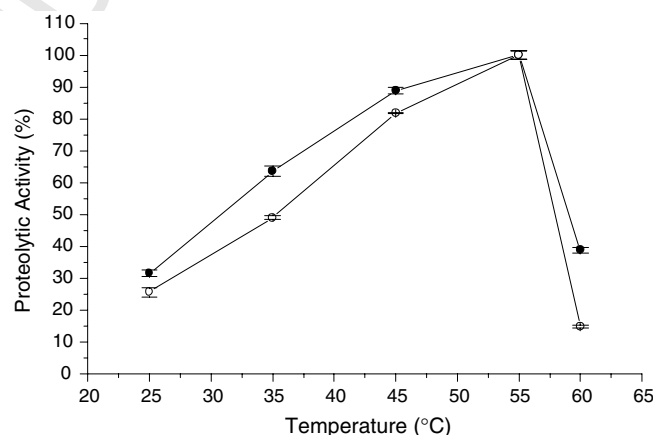


Fig. 3. Temperature effect on the trypsin-like enzyme of spotted goat fish pyloric caeca (●) and intestine (○). The activities were assayed (quadruplicates) by incubating the enzyme (60 μ l) with 1% azocasein prepared in 0.2 M Tris-HCl buffer pH 8.0 (100 μ l) at indicated temperatures and the absorbance of this mixture was measured at 440 nm. The highest activity for the pyloric caeca enzyme was considered 100%.

produces soluble smaller peptides that are not precipitated under 0–40% and 40–80% ammonium sulphate. This is a simple and low cost method when compared with other protocols that includes several chromatographic steps using expensive stationary phases.

The second protein peak collected from the pyloric caeca by Sephadex G-75 filtration showed a single band in SDS-PAGE (Fig. 2, lane 4). This fraction was also able to hydrolyse casein (Fig. 2, lane 6). The molecular weight of this band was estimated to be 24.5 kDa. This value is similar to that reported for trypsin-like enzyme from intestine of Nile tilapia (Bezerra et al., 2001). This apparent molecular weight is inside the fish trypsin range from 22.5 to 31.4 kDa (Kolodziejaska & Sikorski, 1996). The second protein peak collected from the intestine by Sephadex G-75 also presented a single band (not shown) and was capable to hydrolyse casein (Fig. 2, lane 5).

The optimum temperature and pH for both enzymes were 52 °C and 9.0, respectively (Figs. 3 and 4). Furthermore, the intestine and pyloric caeca enzymes showed similar thermal stability, namely, the activity was almost unaltered after incubated at 45 °C for 30 min (Fig. 5). Similar values have been reported for tropical fishes, for

example: hybrid tilapia *T. mossambicalaurea* (El-Shemy & Levin, 1997); mullet *Mugil cephalus* (Guizani et al., 1991); tambaqui *C. macropomum* (Bezerra et al., 2001). This pH value is common to fish trypsin, whereas the optimum temperature and thermal stability are slightly higher than those usually reported for trypsin from other fishes (De Vecchi & Coppes, 1996).

The Michaelis-Menten constant for the trypsin-like enzyme from the intestine and pyloric caeca were 1.94 ± 0.45 and 1.82 ± 0.19 mM, respectively. This difference of K_m was not statistically significant. These values are higher than those reported for other tropical fishes: common carp, *Cyprinus carpio* – 0.039 mM (Cohen et al.,

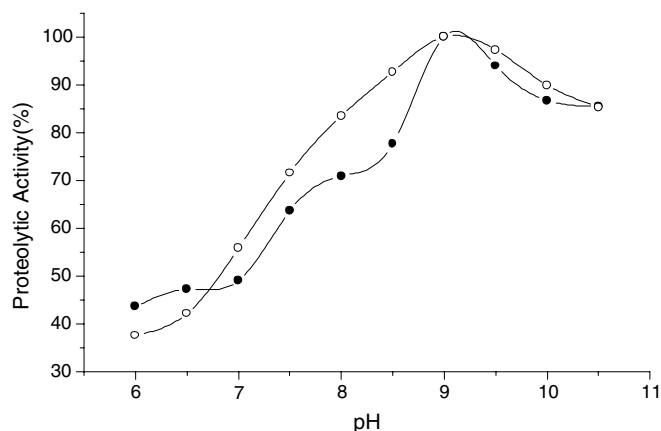


Fig. 4. pH effect on the trypsin-like enzyme of spotted goat fish pyloric caeca (●) and intestine (○). The activities were assayed (quadruplicates) by incubating the enzyme (60 μ l) with 1% azocasein (100 μ l) prepared in 0.2 M Tris–HCl buffer at indicated pH and the absorbance of this mixture was measured at 440 nm. The highest activity for the pyloric caeca enzyme was considered 100%.

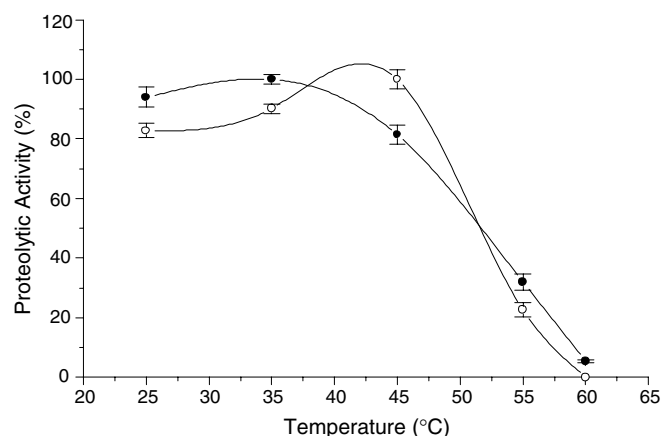


Fig. 5. Thermal stability of the trypsin-like enzyme of spotted goat fish pyloric caeca (●) and intestine (○). Aliquots of the enzyme were incubated at indicated temperatures for 30 min. After 25 °C equilibration the activities were assayed (quadruplicates) by incubating the enzyme (60 μ l) with 1% azocasein prepared in 0.2 M Tris–HCl buffer pH 8.0 (100 μ l) at 25 °C and the absorbance of this mixture was measured at 440 nm. The highest activity for the pyloric caeca enzyme was considered 100%.

Table 2

Ions effect on the trypsin-like enzyme of spotted goatfish pyloric caeca and intestine

Ion (1 mM)	Intestine	Pyloric caeca
	Residual activity $\pm$ SD (%)	Residual activity $\pm$ SD (%)
Al ³⁺	10.18 $\pm$ 3.54 ^a	2.51 $\pm$ 1.29
Zn ²⁺	19.26 $\pm$ 3.23 ^a	25.06 $\pm$ 1.04
Hg ²⁺	29.51 $\pm$ 4.00	29.12 $\pm$ 1.68
Cu ²⁺	42.47 $\pm$ 2.57 ^a	30.80 $\pm$ 0.97
Cd ²⁺	49.43 $\pm$ 4.57 ^a	46.85 $\pm$ 1.93
Co ²⁺	63.73 $\pm$ 3.93 ^a	86.80 $\pm$ 1.94
Ba ²⁺	69.12 $\pm$ 3.25 ^a	91.51 $\pm$ 5.10
Mn ²⁺	72.82 $\pm$ 3.93 ^a	82.42 $\pm$ 1.94
K ⁺	78.81 $\pm$ 2.45 ^a	91.64 $\pm$ 2.45
Ca ⁺	74.95 $\pm$ 3.10 ^a	93.44 $\pm$ 0.84
Li ⁺	74.62 $\pm$ 4.39 ^a	95.57 $\pm$ 2.58
Mg ²⁺	89.70 $\pm$ 2.91	86.29 $\pm$ 1.80

Samples (quadruplicates) of the purified enzyme (30 μ l) were added to the metal ions 3 mM solutions (70 μ l). After 30 min of incubation, 0.2 M Tris–HCl pH 8.0 buffer (70 μ l) and 4 mM BAPNA (30 μ l) were added. The *p*-nitroaniline produced was spectrophotometrically measured at 405 nm after 30 min of reaction.

^a Statistically different from pyloric caeca residual activity.

severe than those registered for the Nile tilapia enzyme (respectively, 39.9%, 38.4% and 73.4%). The influence of heavy metals or other inhibitory compounds on trypsin activity has been employed as a means to detect xenobiotics in a solution containing commercially available trypsin (Šafařík et al., 2002). The inhibition displayed by tested ions may well render the purified enzyme to be used in those methods of detection.

The inhibition effects by Ca²⁺, Co²⁺, Li⁺, K⁺, Mn²⁺, Mg²⁺ and Ba²⁺ on the spotted goatfish enzymes were less intensive than those displayed by the ions above mentioned. Furthermore, the effects of Co²⁺, Ba²⁺, Mn²⁺, K⁺ and Li⁺ on the pyloric caeca enzyme were lower than those observed for the intestine enzyme. On the contrary, the effects of Al³⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, and Cd²⁺ were higher on the pyloric caeca enzyme than on the intestine trypsin. There were no statistically significant differences ($p > 0.05$) between the effects of Hg²⁺, and Mg²⁺ on both enzymes (Table 2). These discrepant ion effects on the enzymes probably reflect structural differences between them despite they share some properties (K_m , optimal pH and temperatures).

Although it is known that calcium is required for trypsin activity, especially in mammals, the same was not observed for this tropical fish trypsin. Similar results regarding calcium effect on alkaline proteases from aquatic animals have been reported by other research communications (Bezerra et al., 2005; Kishimura & Hayashi, 2002; Saborowski, Sahling, Toro, Walter, & García-carreño, 2004).

All this information emerged in this contribution indicate that these trypsin-like enzymes present in the spotted goatfish intestine and pyloric caeca have very similar characteristics. Therefore, these viscera can be homogenised together and the purification according to the present

1981); Mullet, *Mugil cephalus* – 0.490 mM (Guizani et al., 1991) and Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* – 0.755 mM (Bezerra et al., 2005).

The effects of the ions on the trypsin-like enzyme from both intestine and pyloric caeca tissues are shown in Table 2. As described for other tropical fish proteases, these enzymes demonstrated to be sensitive to ions (Cohen et al., 1981), particularly, Al³⁺, Zn²⁺, Hg²⁺, Cu²⁺ and Cd²⁺. These ions also inhibited the trypsin-like enzyme obtained from Nile tilapia intestines (Bezerra et al., 2005). However, the effects of Al³⁺, Zn²⁺, Hg²⁺ on the spotted goatfish enzyme from the pyloric caeca (respectively, 2.51%, 25.06% and 29.12%) and intestine (respectively, 10.18%, 19.26% and 29.51%) showed to be more

protocol would yield a preparation presenting similar properties.

The trypsin-like from spotted goatfish have shown properties alike other trypsin from tropical fishes (tambaqui and tilapia) and commercial trypsin. These features can add aggregated value to the fishery industry waste that is presently discarded in the environment without treatment. Also, it could be used in the foodstuff industry applications, such as: protein hydrolysates and fish sauce production; and shrimp waste recovery (Gildberg, 2001; Gildberg & Stenberg, 2001; Haard, 1992; Mackie, 1982).

Acknowledgements

This work was financially supported by SEAP, CNPq, FINEP, UFPE/FACEPE, and Japan International Cooperation Agency (JICA).

References

- Alencar, R. B., Biondi, M. M., Paiva, P. M. G., Vieira, V. L. A., Carvalho, L. B., Jr., & Bezerra, R. S. (2003). Alkaline proteases from digestive tract of four tropical fishes. *Brazilian Journal of Food Technology*, 6(2), 279–284.
- Bezerra, R. S., Lins, E. J. F., Alencar, R. B., Paiva, P. M. G., Chaves, M. E. C., Coelho, L. C. B. B., et al. (2005). Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Process Biochemistry*, 40(5), 1829–1834.
- Bezerra, R. S., Santos, J. F., Lino, M. A. S., Vieira, V. L. A., & Carvalho, L. B. Jr., (2000). Characterization of stomach and pyloric caeca proteinases of tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Journal of Food Biochemistry*, 24(3), 189–199.
- Bezerra, R. S., Santos, J. F., Paiva, P. M. G., Correia, M. T. S., Coelho, L. C. B. B., Vieira, V. L. A., et al. (2001). Partial purification and characterization of a thermostable trypsin from pyloric caeca of tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Journal of Food Biochemistry*, 25(3), 199–210.
- 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 Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 69(3), 647–653.

- De Vecchi, S., & Coppes, Z. (1996). De Marine fish digestive proteases – relevance to food industry and the south-west Atlantic region – a review. *Journal of Food Biochemistry*, 20(3), 193–214.
- 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.
- García-Carreño, F. L., Dimes, L. E., & Haard, N. F. (1993). Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinases inhibitors. *Analytical Biochemistry*, 214(1), 65–69.
- Gildberg, A. (2001). Utilisation of male Arctic capelin and Atlantic cod intestines for fish sauce production – evaluation of fermentation conditions. *Bioresource Technology*, 76(2), 119–123.
- Gildberg, A., & Stenberg, E. (2001). A new process for advanced utilization of shrimp waste. *Process Biochemistry*, 36(8–9), 809–812.
- Guizani, N., Rolle, R. S., Marshall, M. R., & Wei, C. I. (1991). Isolation, purification and characterisation of a trypsin from the pyloric caeca of mullet (*Mugil cephalus*). *Comparative Biochemistry Physiology*, 98B(4), 517–521.
- Haard, N. F. (1992). A review of proteolytic enzymes from marine organisms and their application in the food industry. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 1(1), 17–35.
- Kishimura, H., & Hayashi, K. (2002). Isolation and characteristics of trypsin from pyloric caeca of the starfish *Asterina pectinifera*. *Comparative Biochemistry and Physiology B Biochemistry and Molecular Biology*, 132(2), 485–490.
- Kolodziejaska, I., & Sikorski, Z. E. (1996). The digestive proteases of marine fish and invertebrates. *Bulletin of Sea Fisheries Institute*, 137(1), 51–56.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Mackie, I. M. (1982). Fish protein hydrolysates. *Process Biochemistry*, 17(1), 26–31.
- Saborowski, R., Sahling, G., Toro, M. A., Walter, I., & García-carreño, F. L. (2004). Navarete del Stability and effects of organic solvents on endopeptidases from the gastric fluid of the marine crab *Cancer pagurus*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 30(3–4), 109–118.
- Šafařík, I., Ptáková, L., Koneracká, M., Šafaoiková, M., Timko, M., & Kopeanský, P. (2002). Determination of selected xenobiotics with ferrofluid-modified trypsin. *Biotechnology Letters*, 24(5), 355–358.
- Warburg, O., & Christian, W. (1941). Isolierung und Kristallisation des Garunges Ferments enolasc. *Biochemische Zeitschrift*, 310, 384–421.