

APROVEITAMENTO DOS SUBPRODUTOS DE CAVALA (*Scomberomorus cavala*) PARA OBTENÇÃO DE PROTEASES DIGESTIVAS: TEMPERATURA ÓTIMA E TERMOESTABILIDADE.

Luiz Henrique Svintiska Lino¹, Nathalia Albuquerque Roberto¹, Ranilson de Souza Bezerra², Vagne de Melo Oliveira^{3*}, Ana Lúcia Figueiredo Porto⁴

1.Laboratório de Enzimologia, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901.

2.Professor Associado do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife – PE, CEP: 50670-901.

3.Doutorando em Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife – PE, CEP: 50670-901. *E-mail:vagne_melo@hotmail.com

4.Professora Associada do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

RESUMO

Este trabalho objetivou extrair e caracterizar parcialmente duas proteases digestivas da cavala (*Scomberomorus cavala*), quanto a sua temperatura ótima e sua termoestabilidade. Para tanto, foram utilizados 500g de vísceras intestinais de *S. cavala* obtidas através de colônia de pescadores em Ponta Verde, Maceió-AL, Brasil. A etapa de extração enzimática foi realizada através do processo de maceração e homogeneização. O efeito da temperatura e a termoestabilidade sobre a atividade enzimática da tripsina e da quimotripsina foi avaliada a temperaturas que variaram entre 25 e 80°C. a temperatura ótima foi de 35°C e 40°C, mantendo-se estável entre 25-50°C e 25°-45°C, respectivamente, para tripsina e quimotripsina. As enzimas testadas apresentaram temperatura ótima e estabilidade térmica dentro do mencionado na literatura para as enzimas de espécies de peixes Neotropicais.

Palavras-chave: biomoléculas, processamento, proteases, resíduos.

UTILIZATION OF BY-PRODUCTS OF MACKEREL (*Scomberomorus mackerel*) TO OBTAIN PROTEASES DIGESTIVE: OPTIMAL TEMPERATURE AND THERMOSTABILITY.

ABSTRACT

This study aimed to extract and partially characterize two digestive proteases mackerel (*Scomberomorus mackerel*), as its optimum temperature and its thermal stability. Thus, we used 500g of mackerel viscera intestines of *S.* obtained through fishing colony in Ponta Verde, Maceió-AL, Brazil. Step Enzyme extraction was performed by maceration and homogenization process. The temperature effect on the thermostability and enzymatic activity of trypsin and chymotrypsin was measured at temperatures ranging between 25 and 80°C. The optimum temperature was 35°C and 40°C while being stable 25-50°C and 25°C-45°C, respectively, for trypsin and chymotrypsin. The enzymes tested showed optimum temperature and thermal stability mentioned in the literature for enzyme Neotropical fish species.

Keywords: biomolecules, processing, protease, residues.

INTRODUÇÃO

Proteases são um grupo de enzimas capazes de clivar ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas, catalisando a hidrólise total das proteínas, comum em processos de ativação ou inativação de enzimas, envolvido principalmente na digestão.

São classificadas segundo o valor do pH no qual apresentam atividade máxima, diferenciando-se dessa forma em: proteases ácidas, neutras ou alcalinas. Elas são enzimas que desempenham um papel essencial no crescimento e sobrevivência de todos os organismos vivos. Para os animais marinhos, proteases são produzidas predominantemente pelas glândulas digestivas dentre elas, pepsina, gastricsina, tripsina, quimotripsina, colagenase, elastase, carboxipeptidase e esterase carboxila. As proteases são divididas em dois grupos principais, dependendo do seu local de ação: endopeptidases e exopeptidases (1).

A tripsina (EC 3.4.21.4) é uma das mais importantes enzimas de peixes e invertebrados aquáticos (2-3), sendo responsável pela hidrólise de proteínas da dieta (3-4). É uma serinoprotease que hidrolisa ligações peptídicas constituídas por resíduos de lisina e arginina (1, 3, 5). Os zimogênios secretados pelo pâncreas são ativados por clivagem proteolítica (6) no intestino pela enteroquinase, convertendo o zimogênio pancreático tripsinogênico em tripsina (3,7,8) pela remoção de um hexapeptídeo na porção N-terminal. A tripsina, subsequentemente, converte outras moléculas de tripsinogênio em tripsina. De tal modo, a enteroquinase desencadeia uma cascata de atividade proteolítica, pois a tripsina é o ativador comum de todos os zimogênios pancreáticos, como por exemplo o quimotripsinogênio (1,3,7,8,9).

A quimotripsina (EC 3.4.21.1) é uma endopeptidase membro da família de serinoproteases, armazenada no pâncreas de vertebrados e invertebrados na forma de um precursor, o quimotripsinogênio, ativada através de um efeito cascata a partir da ativação da tripsina no duodeno (3). Ao sofrer clivagem com a tripsina, é clivada em duas partes, que ainda ficam unidas por uma ponte dissulfeto (S-S). Quando o quimotripsinogênio clivado perde dois peptídeos pequenos, numa etapa chamada de trans-proteólise, obtém-se a quimotripsina. É uma enzima específica para a hidrólise de ligações peptídicas em que grupos carboxila são fornecidos por um dos três aminoácidos aromáticos, ou seja, fenilalanina, tirosina e triptofano. A enzima tem três estruturas diferentes (isoformas), variando ligeiramente na solubilidade, mobilidade eletroforética, ponto isoelétrico e especificidade de clivagem (5,10,11,12,13). Este trabalho objetivou extrair e caracterizar parcialmente duas proteases digestivas da cavala (*Scomberomorus cavala*), quanto a sua temperatura ótima e sua termoestabilidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Modelo biológico

Para este ensaio, foram utilizadas vísceras digestivas do peixe marinho *Scomberomorus cavala* (Cavala) (Figura 1), oriundas do litoral alagoano, através de colônia comunitária de pescadores situada na Ponta Verde, Maceió, Alagoas, Brasil. Após a evisceração realizada pelos pescadores, 100 g de vísceras intestinais foram imediatamente congeladas e conduzidas ao Laboratório de Enzimologia, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CCB/UFPE), onde foram armazenadas no -80C para processamentos a posteriori.



Figura 1: *Scomberomorus cavala*. Fonte: basefish.

Etapa de extração

Para a extração das duas proteases digestivas (tripsina e quimotripsina), as vísceras intestinais foram maceradas e homogeneizadas (18 rpm durante 5 minutos, com intervalos de 30 segundos) em tampão Tris-HCl 0,05M pH 7,4 com 0,9% de NaCl (p/v), obtendo-se o extrato bruto enzimático (E.B.E.), utilizado nas análises (BEZERRA *et al.*, 2005).

Etapa de atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada utilizando-se 170 μ L de tampão Tris-HCl 0,05M pH 7,4, 30 μ L de extrato enzimático (E.B.) e 30 μ L de substrato específico, BApNA (N- α -benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida) e Suc-Phe-p-Nan para tripsina e quimotripsina, respectivamente. Após o período de incubação de 15 min., as amostras foram lidas no leitor de microplaca com comprimento de onda de 405 nm de absorbância. Todas as análises foram realizadas em triplicatas (14).

Etapa de temperatura ótima e termoestabilidade

O efeito da temperatura e a termoestabilidade sobre a atividade enzimática da tripsina e da quimotripsina foi avaliada a temperaturas que variaram entre 25 e 80°C. Para a temperatura ótima, o ensaio foi realizado por incubação das amostras com o substrato, BApNA para tripsina e Suc-Phe-p-Nan para quimotripsina, em um banho-maria. No teste da estabilidade térmica, a enzima foi incubada em banho-maria durante 30 min. e a atividade remanescente foi então mensurada a 25°C, usando o método previamente descrito (15).

Análise estatística

Os valores médios para os diferentes tratamentos foram comparados utilizando análise de variância com um fator (One-way ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 95% ($p < 0,05$), usando o software de modelagem MicroCal Origin Versão 8.0 (Microcal, Northampton, MA, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A temperatura ótima das enzimas testadas foram de 35°C e 40°C, respectivamente, para tripsina e quimotripsina, como ilustrado nas figuras 1A e 1B. As enzimas mantiveram-se estáveis de 25-50°C para tripsina e de 25-45°C para quimotripsina, como visualizado nas figuras 2A e 2B, respectivamente.

A temperatura ótima das enzimas testadas variaram de acordo com dados encontrados na literatura. Tripsinas com temperatura ótima de 60°C foi encontrado para as espécies de peixes *Oncorhynchus tshawytscha* (16), *Lutjanus vitta* (17), *Salaria basilisca* (18). A perda de atividade foi presumivelmente causada por tratamento térmico. A temperatura tem um efeito significativo sobre a atividade da quimotripsina de espécies de peixes (13). Neste trabalho foi observado diminuição brusca de atividade a partir de 40°C, cessando em absoluto aos 60°C.

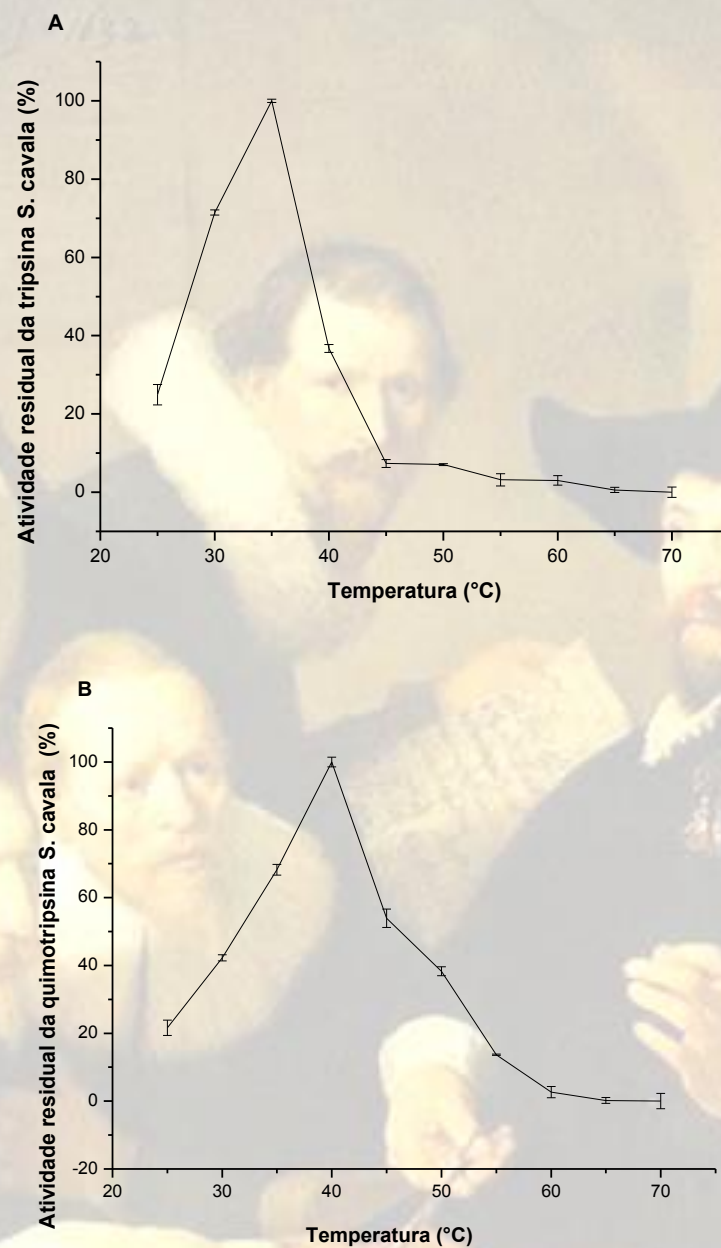


Figura 1. Atividade residual da tripsina (1A) e da quimotripsina (1B) de *Scomberomorus cavala*.

A temperatura tem um efeito significativo sobre a atividade e estabilidade da tripsina (2), enquanto que alguns autores já relataram quimotripsinas de peixes marinhos ambientados a regiões frias apresentam maior atividade catalítica que enzimas em mamíferos, por exemplo (13).

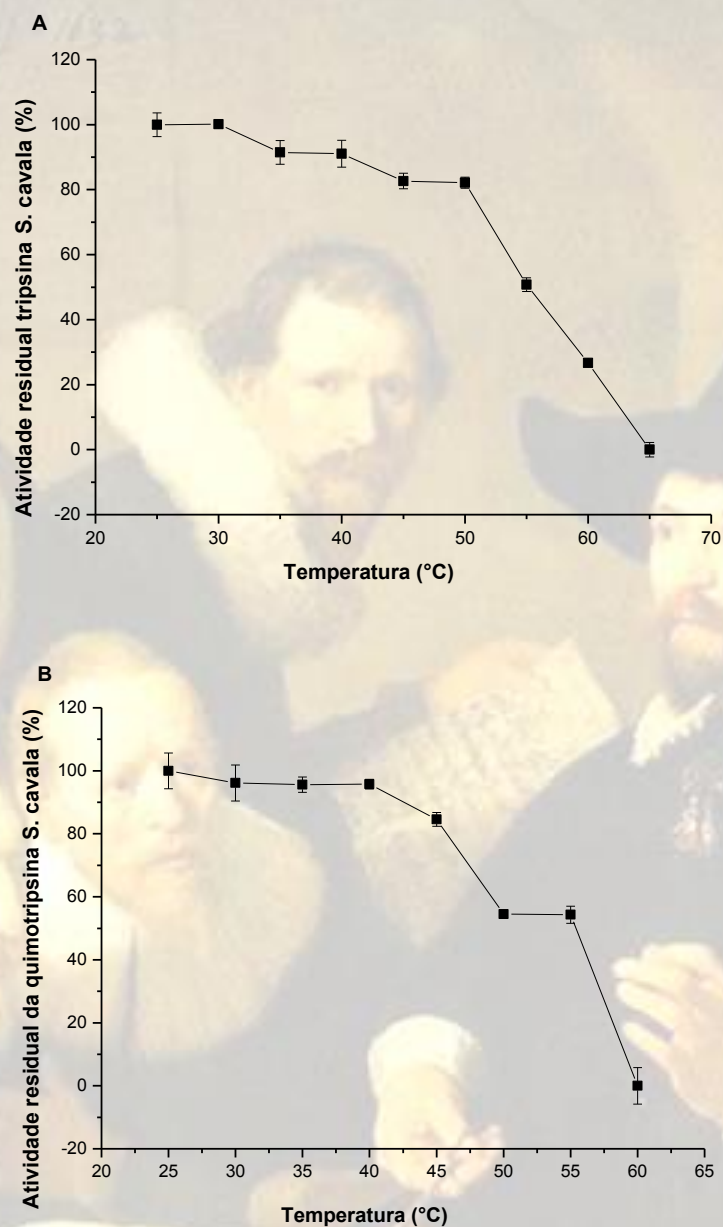


Figura 2. Termoestabilidade da tripsina (2A) e da quimotripsina (2B) de *Scomberomorus cavala*.

CONCLUSÕES

As enzimas testadas apresentaram temperatura ótima e estabilidade térmica dentro do mencionado na literatura para as enzimas de espécies de peixes Neotropicais, tornando-se fonte alternativa de obtenção destas biomoléculas bioativas com propriedades físico-químicas de amplo interesse industrial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Klomklao S. Digestive proteinases from marine organisms and their applications. Songklanakarin J. Sci. Technol. 2008; 30:37–48.
2. Bougatef A. Trypsins from fish processing waste: characteristics and biotechnological applications comprehensive review. J. Cleaner Prod. 2013; 57:257–265.
3. Oliveira VM, Assis CRD, Bezerra RS. Fish digestive hydrolase: biochemical, physiological and biotechnological aspects. REB, Ver. Eletrôn. Biol. 2014; 7:330–341.
4. Barkia A, Bougatef A, Nasri R, Fetoui E, Balti R, Nasri M. Trypsin from the viscera of Bogue (*Boops boops*): isolation and characterization. Fish Physiol Biochem. 2009; 36:893–902.
5. Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998;62: 597–635.
6. Koolman J, Rohem KH. Bioquímica: texto e atlas. 3ed. Porto Alegre. 478 p; 2005.
7. Kolkovski S. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles-implications and applications to formulated diets. Aquaculture, 2001; 200:181–201.
8. Kano G, Yamaguchi T, Kishimura H, Yamaha, E, Saeki H. Purification and characteristics of trypsin from masu salmon (*Oncorhynchus masou*) cultured in fresh-water. Fish Phys Biochem. 2009; 36:367–645.
9. Rotta MA. Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo de teleósteos relacionados à piscicultura. Corumbá, Embrapa pantanal, 48p., 2003.
10. Applebaum SL, Holt GJ. The digestive protease, chymotrypsin, as an indicator of nutritional condition in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). Marine Biol. 2003; 142:1159–1167.
11. Kuz'mina VV, Golovanova IL. Contribution of prey proteinases and carbohydrases in fish digestion. Aquaculture, 2004; 234:347–360.
12. Yang F, Su WJ, Lu BJ, Wu T, Sun LC, Hara K, Cao M. Purification and characterization of chymotrypsins from the hepatopancreas of crucian carp (*Carassius auratus*). Food Chem. 2009; 116:860–866.
13. Zhou L, Budge SM, Ghaly AE, Brooks MS, Dave D. Extraction, Purification and characterization of fish chymotrypsin: A Review. American J. Biochem. Biotech. 2011; 7:104–123.
14. Bezerra RS, Lins EJJ, Alencar RB, Paiva PMG, Chaves MEC, Coelho LCBB, Carvalho JR L. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Process Biochem. 2005; 40:1829–1834.
15. Silva JF, Esposito ST, Marcuschi M, Ribeiro K, Cavalli RO, Oliveira V, Bezerra, RS. Purification and partial characterisation of a trypsin from the processing waste of the silver mojarra (*Diapterus rhombeus*). Food Chem. 2011; 129:777–782.
16. Kurtovic I, Marshall SN, Simpson B.K. Isolation and characterization of a trypsin fraction from the pyloric caeca of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Comp. Biochem. Physiol. B 2006; 143:432–440.
17. Khantaphant S, Benjakul S. Purification and characterization of trypsin from the pyloric caeca of brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). Food Chem. 2010; 120: 658–664.
18. Ktari N, Ben Khaled H, Nasri R, Jellouli K, Ghorbel S, Nasri M. Trypsin from zebra blenny (*Salaria basilisca*) viscera: purification, characterisation and potential application as a detergent additive. Food Chem. 2012; 130:467–474.