



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO-UFPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-CCB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE MESTRADO E DOUTORADO EM
BIOQUÍMICA E FISIOLÓGIA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA PROTEASE DIGESTIVA
ALCALINA (TRIPSINA) DO PEIXE AMAZÔNICO PIRARUCU (*Arapaima
gigas*)**

AUGUSTO CÉZAR VASCONCELOS DE FREITAS JÚNIOR

RECIFE
2010

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA PROTEASE DIGESTIVA
ALCALINA (TRIPSINA) DO PEIXE AMAZÔNICO PIRARUCU (*Arapaima
gigas*)**

AUGUSTO CÉZAR VASCONCELOS DE FREITAS JÚNIOR

Orientador: Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra.
Depto. de Bioquímica, UFPE.

Co-orientadora: Dra. Patrícia Fernandes de Castro.
Embrapa Meio-Norte, Parnaíba-PI.

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Jr.
Depto. de Bioquímica, UFPE.

RECIFE
2010

Freitas Júnior, Augusto César Vasconcelos de
Purificação e caracterização de uma protease digestiva alcalina
(tripsina) do peixe amazônico Pirarucu (*Arapaima gigas*)/ Augusto Cezar
Vasconcelos de Freitas Júnior. – Recife: O Autor, 2010.

71 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Ranilson de Sousa Bezerra

Co-Orientadores: Patrícia Fernandes de Castro

Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Bioquímica e
Fisiologia, 2011.

Inclui bibliografia e anexos

1. Proteases 2. *Arapaima gigas* 3. Tripsina I. Título.

572.76

CDD (22.ed.)

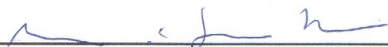
UFPE/CCB-2011-153

Augusto César Vasconcelos de Freitas Júnior

**“Purificação e caracterização de uma protease digestiva alcalina
(tripsina) do peixe amazônico pirarucu (*Arapaima gigas*)”**

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

Aprovado por:



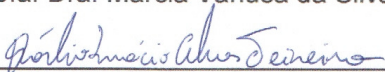
Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra
Presidente



Profa. Dra. Maria Teresa dos Santos Correia



Profa. Dra. Márcia Vanusa da Silva



Prof. Dr. Dárlcio Inácio Alves Teixeira

Data: 22 / 02 / 2010

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 PEIXES	1
1.1.2 Pirarucu (<i>Arapaima gigas</i>)	2
1.2 ENZIMAS	7
1.3 PROTEASES DIGESTIVAS DE PEIXES	10
1.4 TRIPSINA	14
1.5 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE TRIPSINAS	16
2. OBJETIVOS	19
3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO	20
ARTIGO	30
ANEXO	62

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por tudo que me tem proporcionado e por sempre me dar saúde e força para continuar em busca de meus objetivos. Que com isso eu obtenha possibilidade maior de auxiliar o próximo. Agradeço também por colocar sempre pessoas importantes no meu caminho, as quais sempre somam algo de bom em minha existência.

Aos meus pais, que sempre me forneceram o apoio que necessitava, especialmente a minha mãe que trabalhou sem descanso para nos proporcionar uma boa vida com saúde e educação, pelo seu amor e devoção proporcionando a base de que precisamos para avançar em nossa jornada, nos colocando em sua vida sempre acima de tudo.

À minha irmã, por me auxiliar em qualquer situação e pelo carinho dedicado a mim em nosso convívio, e aos meus familiares que me incentivam e contribuem para meu crescimento “humano” e profissional.

Ao meu amor, Helane Maria Silva da Costa, pelo companheirismo e dedicação em todos os momentos sendo meu pilar de sustentação nessa longa jornada.

A minha “filhota” adotiva Sarabi, pelos momentos de diversão e carinho.

Aos amigos da graduação, mestrado, doutorado, e da vida, Fernando Vaz, Romero Marcos, Ricardo Souza.

Aos amigos, “irmãos” de infância, Tiago Varela, Denis Menezes, Daniel Menezes, Giovane Ulisses, Paulo Casado, Diogo Moraes, que me acompanham nessa jornada, pela ajuda incondicional em todos os momentos em que precisei e pelos momentos de alegria compartilhados, e ainda por compartilhar em nossas vidas.

Aos amigos do Laboratório de Enzimologia (LABENZ) - Talita Espósito, Dárlcio Teixeira, Fábio Marcel, Thiago Cahú, Caio Assis, Renata França, Werlayne Mendes, Ian Porto, Marina Marcuschi, Ricardo Abadie, Diego Buarque, Juliana Santos, Robson Coelho, Karollina Lopes, Janilson Felix, Juliette Xavier, Douglas Holanda, Vagne Oliveira, Carolina Costa, Mirella Assunção, Gustavo Rêgo, Fernanda Prado, Charles, Anderson Henriques, Daniele Matias, Kelma Souza, Suzan Diniz

Agradeço em especial a minha grande amiga professora Dra. Karina Ribeiro pelo companheirismo e por ter me dado estímulo no momento em que eu mais precisei, sendo a primeira pessoa a reconhecer meu esforço.

Agradeço ao grande amigo Robson Liberal (*in memoriun*), por sempre acreditar em meu trabalho e competência e por ter me dado a oportunidade de seguir esse caminho.

À Banca Examinadora pela atenção e colaboração, em especial, à Prof^{ra}. Dr^a. Maria Teresa dos Santos Correia pelo auxílio prestado ao longo do mestrado.

Ao professor Dr. Ranilson de Souza Bezerra, meu orientador, a quem respeito muito, por sempre escutar minhas idéias e considerações e direcionar-me no caminho correto e por sempre nos tratar como amigos, demonstrando que realmente fazemos parte de uma família.

Ao professor Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior, pela sua simplicidade e alegria e por sempre auxiliar a todos que o procuram com paciência e dedicação.

Aos técnicos do departamento de bioquímica, Albérico Espírito Santo e Sr. João Virgínio, e aos secretários Miron Oliveira e Neide Fernandes pela grande amizade, apoio, carinho e respeito que sempre demonstraram para comigo.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Exemplar de pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> (SCHINZ, 1822)	3
Figura 2: Catálise enzimática	8
Figura 3: Ação das endopeptidases e exopeptidases sobre a estrutura da proteína	12
Figura 4: Estrutura terciária da tripsina	15
Figura 5: Centro ativo de uma serinoprotease	15
Figura 6: Sítio de hidrólise da tripsina	16
Figura 7: Técnicas cromatográficas	17

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Sistemática Filogenética do pirarucu, <i>Arapaima gigas</i> .	3
Tabela 2: Classificação das enzimas segundo a IUBMB.	9
Tabela 3: Aplicação de proteases na indústria alimentícia.	14

RESUMO

A protease alcalina extraída do ceco pilórico do pirarucu (*Arapaima gigas*) foi purificada em quatro etapas: tratamento térmico, precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de gel-filtração em coluna Sephadex[®] G-75 e cromatografia de afinidade em coluna benzamidina-agarose. Após as etapas de purificação aplicou-se uma amostra da proteína obtida em gel de eletroforese e verificou-se a presença de única banda que apresentou peso molecular aproximado de 28,0 kDa. Desta forma, após purificação, avaliaram-se as propriedades físico-químicas e cinéticas da enzima e o efeito de íons metálicos e de inibidores de proteases na atividade proteolítica da mesma, utilizando-se benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) como substrato. O pH e a temperatura ótima de reação encontrada foram 9,0 e 65°C, respectivamente. A enzima mostrou-se estável, após 30 min de incubação, em ampla faixa de pH alcalino (pH 6,0 a 11,5). Após 30 minutos de incubação a 60°C, foi detectada uma perda de 10% da atividade trípica. Os valores encontrados para os parâmetros cinéticos (K_m , K_{cat} e K_{cat}/K_m) foram: $0,47 \pm 0,042$ mM, $1,33 \text{ s}^{-1}$ and $2,82 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$, respectivamente, usando BAPNA como substrato. A atividade trípica mostrou-se sensível a alguns íons metálicos. A atividade trípica foi inibida, em ordem crescente, pelos íons: $\text{Mn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Li}^+ > \text{Cd}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Hg}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Al}^{3+} > \text{Pb}^{2+}$. Por outro lado, os íons K^+ , Mg^{2+} e Ba^{2+} não promoveram nenhum efeito na atividade da protease. A enzima foi fortemente inibida por inibidores de tripsina. Os ensaios com substrato específico e inibidores de tripsina forneceram evidências de que esta enzima é provavelmente uma tripsina-símile e suas características sugerem um forte potencial para ser utilizada em processos e produtos industriais.

Palavras-chaves: *Arapaima gigas*; enzimas digestivas; proteases; purificação de tripsina; resíduo de processamento de pescado; tripsina termoestável.

ABSTRACT

A fish alkaline protease enzyme extracted from pyloric caeca of pirarucu (*Arapaima gigas*) was purified by a four-step procedure: heat treatment, ammonium sulfate precipitation, Sephadex[®] G-75 filtration and benzamidine-agarose affinity chromatography. The effect of various metal ions and protease inhibitors on the activity of the digestive enzyme was determined. Its physical-chemical and kinetics properties were also determined. A single band (28.0 kDa) was observed for the sample in a sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE, 12.5%). The optimum pH and temperature was 9.0 and 65°C, respectively. The enzyme was stable after incubation for 30 min in a large pH range (6.0-11.5). At 60°C the purified protease lost 10% of its initial activity after 30 min of incubation. This activity was lost when increased the NaCl concentration (0-30%). The kinetic parameters such as: K_m , K_{cat} and K_{cat}/K_m were 0.47 ± 0.042 mM, 1.33 s^{-1} and $2.82 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$, respectively using benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) as substrate. This protease activity demonstrated to be sensitive to some metal ions. Its activity was inhibited by the ions increasing order: $\text{Mn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Li}^{+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Hg}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Al}^{3+} > \text{Pb}^{2+}$. On the other hand, the ions K^{+} , Mg^{2+} and Ba^{2+} did not promote any effect on the protease activity. The enzyme was highly inhibited by TLCK, Benzamidine and PMSF. Specific substrate and inhibitors for trypsin provided additional evidences that this enzyme is most likely a trypsin-like enzyme and their feature suggests a potential for industrial application.

Key words: *Arapaima gigas*; Air-breathing fish; Fish processing waste; Digestive enzymes; Proteases; Trypsin purification.

1. INTRODUÇÃO

1.1 PEIXES

Existe uma grande diversidade de espécies aquáticas nas zonas tropicais. Os peixes são animais ectodérmicos e possuem diversas adaptações morfológicas e fisiológicas como se pode observar nos hábitos alimentares e características do trato digestório (SOUZA et al., 2007). De uma forma geral, a compreensão da anatomia do sistema digestório dos organismos aquáticos facilita o entendimento de sua fisiologia digestiva.

Os órgãos digestórios dos peixes apresentam grande variação no tamanho sendo classificados como pequenos e simples e como complexos como nos ruminantes. Tal classificação reflete a variação das fontes de nutriente utilizadas por essas espécies no seu habitat natural. O que por sua vez promove a classificação dos peixes de acordo com seu hábito alimentar em quatro categorias principais: detritívoros, herbívoros, onívoros e carnívoros.

Esses animais não possuem glândulas salivares e muitos não apresentam um pâncreas distinto, possuindo apenas células pancreáticas difusas em torno do intestino e/ou no fígado (PEISONG et al., 2004). Os órgãos digestórios dos peixes incluem o esôfago posterior, o estômago (nas espécies gástricas) ou bulbo intestinal (nas agástricas), o intestino superior e inferior e os cecos pilóricos. Como órgãos de suporte encontram-se o pâncreas, a vesícula biliar e o fígado.

O estômago tem a função de iniciar a transformação do alimento, liberando nutrientes solúveis. Nos peixes o estômago se divide em quatro camadas de tecido distintas: a mucosa, a submucosa, a muscular e a serosa (RUST, 2002). O intestino é um órgão relativamente simples, apresentando duas partes: uma porção anterior superior,

denominada intestino ascendente ou delgado, e uma porção posterior inferior, conhecida por intestino descendente ou grosso. É neste órgão onde ocorre a maior parte da absorção dos nutrientes, íons e água oriundos da dieta. Os cecos pilóricos são circundados por tecido pancreático e são responsáveis pela produção de enzimas digestivas como proteases alcalinas, amilases e lipases e pela secreção de hormônios como a insulina, glucagon (RUST, 2002).

A digestão é uma ação coordenada de atividades físicas, químicas e enzimáticas que tem início tão logo o alimento entra na boca, e termina com a excreção das fezes. Incluídos nos processos físicos estão a apreensão, a trituração e mistura; o ácido clorídrico produzido pelo estômago é um processo químico que auxilia a hidrólise e quebra de compostos; os processos enzimáticos são mais específicos e envolvem um grande número de enzimas digestivas (RUST, 2002).

Considerando a história evolutiva dos peixes e seus nichos ecológicos variados a diversidade intestinal desses animais parece exceder a de outros vertebrados (KROGDAHL et al., 2005).

1.1.2 pirarucu (*Arapaima gigas*)

O pirarucu (*Arapaima gigas*) é um peixe exclusivo da Bacia Amazônica e característico das águas calmas de suas várzeas. Representante da família Arapaimatidae, está inserido na ordem dos Osteoglossiformes (FERRARIS JR., 2003) (Tabela1). Suas características filogenéticas, esqueleto e morfologia externa, diferem daquelas de todas as outras espécies de peixes, inclusive seu parente africano mais próximo, a espécie *Heterotis niloticus*. Foram incluídas ambas as espécies no passado dentro da família Osteoglossidae, mas atualmente considera-se que eles representam uma família distinta a Arapaimatidae.

Tabela 1. Sistemática Filogenética do pirarucu, *Arapaima gigas*.

Reino	Animalia
Filo	Chordata
Classe	Osteichthyes
Ordem	Osteoglossiformes
Subordem	Osteoglossoidei
Família	Arapaimatidae
Subfamília	Heterotidinae
Gênero	<i>Arapaima</i>
Espécie	<i>Arapaima gigas</i>

Esta espécie apresenta características biológicas e ecológicas distintas pois são animais de grande porte, seus espécimes podem atingir até três metros de comprimento e chegam a pesar 250 quilos. A palavra pirarucu é de origem tupi, constituída pela associação de *pira*, que significa peixe e *urucu*, significando vermelho, cor característica da semente do urucum, *Bixa orellana*. Este nome é atribuído devido à intensa coloração, dominante na orla posterior das escamas (Figura 1) em determinadas regiões do corpo. A intensidade da coloração que apresenta tais escamas, assim como o número, varia de acordo com o sexo e o período de reprodução (VENTURIERI e BERNARDINO, 1999).



Figura 1: Exemplar de pirarucu, *Arapaima gigas* (SCHINZ, 1822).

Fonte: <http://www.brasilsabor.com.br/img/artigos/gd/1188653017.jpg>

O pirarucu tem corpo subcilíndrico e alargado que se afina em forma progressiva a partir da origem dorsal, cabeça pequena com espaço interorbital plano e com numerosas placas ósseas. A boca superior é grande e oblíqua, com prognatismo da mandíbula inferior e o maxilar alcança na vertical o limite anterior da pupila. O pré-maxilar apresenta 20 pequenos dentes córneo, o maxilar 32 e a mandíbula de 35-36 dentes, essas estruturas também são observadas em menor tamanho na língua. O corpo do pirarucu é revestido com grandes e espessas escamas ciclóides, estriadas e granuladas (ROMERO, 1960).

A nadadeira dorsal tem origem no terço posterior do corpo e seus últimos raios mais longos passam da origem da cauda. A nadadeira anal inicia-se próximo as duas fileiras de escamas atrás da dorsal. A nadadeira caudal é arredondada. As nadadeiras ventrais e abdominais são bem posteriores. A cor do peixe é castanho-claro a partir do oitavo mês de idade (FONTENELE, 1952; BARD e IMBIRIBA, 1986; IMBIRIBA, 2001; VENTURIERI e BERNARDINO, 1999).

Além da língua óssea, a espécie apresenta duas placas ósseas laterais e uma platina na boca, que funcionam como verdadeiros dentes, os quais retêm a presa, matando-a antes da deglutição. O sistema digestório é curto, uma característica de peixes com hábito alimentar carnívoro. Possuem dois aparelhos respiratórios, as brânquias, utilizadas para a respiração aquática e a bexiga natatória modificada, (fisóstomo) que se comunica com o sistema digestório, funcionando como um pseudo-pulmão (CASTELLO, 2004). Desta forma, o pirarucu vem à superfície em intervalos de tempo regulares para tomar golfadas de ar que é direcionado para o interior da bexiga natatória. Neste processo respiratório a difusão do oxigênio para o sangue ocorre através da extensa rede de capilares sangüíneos presente na bexiga natatória (ONO et al, 2008). Brauner e Val (1996) sugerem que o pirarucu apresenta respiração aérea obrigatória e

que 78% do oxigênio consumido provém do ar, enquanto 63 a 85% do gás carbônico é excretado diretamente na água através das brânquias.

Quanto a reprodução esses animais apresentam comportamento único. Nos períodos de seca os peixes formam casais, procuram ambientes calmos e preparam seus ninhos, reproduzindo durante a enchente. Nesta espécie os machos protegem a prole por cerca de seis meses. Os filhotes apresentam hábito gregário, e durante as primeiras semanas de vida, nadam sempre em tomo da cabeça do pai, que os mantém próximos à superfície, facilitando-lhes o exercício da respiração aérea. Apesar de ser uma espécie resistente, essas características ecológicas e biológicas tornam o pirarucu bastante vulnerável à ação dos pescadores. Os cuidados com os ninhos, após as desovas expõem os reprodutores à fácil captura com malhadeiras ou à fiska com haste e arpão. Durante o longo período de cuidados parentais, a necessidade fisiológica de emergir para captar ar ocorre em intervalos menores, ocasião em que os peixes são arpoados. O abate dos machos, após as desovas, expõe os filhotes à predação por peixes carnívoros, especialmente as piranhas. Outro fator que prejudica o desenvolvimento da prole é a longa fase de imaturidade sexual (3-5 anos) que propicia a captura de espécies juvenis que nessa fase apresentam peso variando entre 30 e 40 quilos (Ono et al, 2008).

Segundo Lüling (1964), o *Arapaima gigas* distribui-se no Amazonas desde o Orinoco – Guiana até Ucayali – Peru, no entanto na área da Guiana e Guiana Francesa. Bard e Imbiriba (1986) dizem não haver registros na bacia do Orinoco, sendo encontrado apenas na parte inferior do rio Amazonas e afluentes, também nas vastas áreas de várzea e igapós ligadas a eles. Ainda assim, são pouco conhecidos os limites de ocorrência desta espécie nos cursos superiores do rio Amazonas e de seus afluentes.

Dentre os países onde é encontrado o *Arapaima gigas*, destacam-se: Brasil, Colômbia, Guiana, Peru, sendo questionável no Equador, onde ocorre como espécie

nativa. Sua distribuição é referenciada para a América do Sul, principalmente, na Bacia Amazônica e rios da Guiana.

O habitat desta espécie são águas pretas e tranquilas da Amazônia, não sendo encontrado, portanto, nas zonas de forte correnteza e nas águas ricas em sedimentos. O pirarucu torna-se com este comportamento, uma exceção entre as espécies que habitam as águas pretas do continente, já que estas, em geral, não acusam a presença de peixes de grande porte e com valor similar ao pirarucu. Vivem, portanto, em águas com pouca correnteza, ligeiramente alcalinas (pH entre 7,5 – 7,8) e com temperaturas que oscilam entre 26° e 31° C, que algumas vezes podem chegar a 37°C nas superfícies dos lagos (BARD e IMBIRIBA, 1986).

Segundo Bard e Imbira (1986) *A. gigas* pode ser cultivado em sistema intensivo, em viveiros de diferentes tamanhos, com uma produtividade de 1,7 a 11 toneladas/hectare x ano, e acreditam que a espécie pode ser criada em sistema extensivo, tendo como alimento peixes forrageiros (piaba, matupiri, tamuatá, etc.), que se reproduzem naturalmente em cativeiro.

Além de ser o maior peixe da Amazônia, o pirarucu é considerado uma espécie de alto interesse comercial e um dos peixes mais valorizados no mercado. Entretanto, uma diminuição exacerbada nos estoques naturais, fez com que o governo através do IBAMA passasse a controlar e regulamentar a sua pesca devido ao risco de extinção da espécie. De acordo com dados do IBAMA (2008), no ano de 2006 foram capturados 1.237 t de pirarucu. O risco de extinção aliado às características zootécnicas peculiares, como a excelente qualidade da carne desprovida de espinhos, o que gera grande aceitação no mercado consumidor, rusticidade para o manejo (CAVERO et al., 2003), respiração aérea e elevada taxa de crescimento, que pode alcançar de 7-10 Kg no primeiro ano de criação (IMBIRIBA, 2001; PEREIRA-FILHO et al., 2003), fez desta

espécie uma das mais promissoras para o desenvolvimento da criação de peixes carnívoros em regime intensivo na Região Amazônica.

1.2 ENZIMAS

As enzimas são proteínas, com exceção das ribozimas que são RNAs com atividade catalítica, que, atuando como catalisadores nas reações bioquímicas diminuem a energia de ativação necessária para que ocorra a reação química. Por serem catalisadores eficientes, são aproveitadas para aplicações industriais, como na indústria farmacêutica ou na alimentar. As enzimas não reagem quimicamente com as substâncias sobre as quais atuam, nem alteram o equilíbrio das reações. Estruturalmente, as enzimas possuem todas as características das proteínas, tendo regiões da sua estrutura responsáveis pela catálise. A eficiência das enzimas em catalisar reações é tal que a velocidade de uma reação pode ser aumentada em até 10^{20} vezes (CAMPBELL e FARRELL, 2007).

De uma maneira geral, uma enzima liga-se ao seu substrato formando um complexo Enzima-Substrato (ES) de caráter transitório (Fig. 2). Essa ligação ocorre em uma região específica da enzima denominada sítio ou centro ativo, localizada em uma fenda ou bolsão tridimensional formado por grupamentos que vêm de diferentes partes da sequência linear de aminoácidos da enzima. Podem existir também outras regiões da cadeia polipeptídica que são sensíveis à presença de determinadas espécies químicas, modulando a atividade da enzima. Tais regiões são denominadas centros alostéricos e essa modulação de alosteria (BERG et al., 2004).

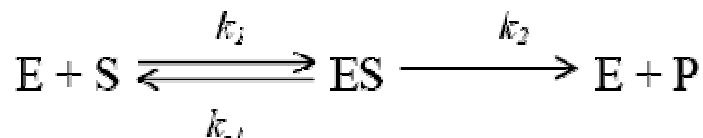


Figura 2. Reação de catálise enzimática. Enzima (E), Substrato (S), Produto (P), constante de velocidade (*k*).

A manutenção da estrutura de uma enzima é de extrema importância para a sua atividade e pode sofrer modificações e até mesmo ser perdida caso a enzima se depare com um meio em que fatores como o pH ou a temperatura não favoreçam a estabilidade estrutural de sua cadeia polipeptídica. Algumas enzimas necessitam também da presença de outras estruturas, genericamente denominadas cofatores, para efetuar a catálise. A natureza química dos cofatores é muito diversa, estes podem ser íons metálicos, como o Mg^{2+} , o Zn^{+} ou o Fe^{2+} , moléculas orgânicas, como o piridoxal fosfato ou a coenzima A. Outros grupos como moléculas orgânicas contendo metais, como o grupo hemi (uma porfirina contendo ferro) ou a vitamina B_{12} (5'-desoxiadenosilcobalamina) também podem ser classificados como um cofator (NELSON e COX, 2005).

Além das modificações estruturais, as enzimas podem ainda ter sua atividade alterada pela presença de inibidores. Existem diversos tipos e mecanismos de inibição. Entretanto os livros didáticos priorizam alguns, que apresentados de uma forma resumida, demonstram com clareza o efeito de inibidores. A inibição enzimática pode ser reversível ou irreversível, quando o inibidor se liga ao sítio ativo da enzima causando desastrosas alterações estruturais. Quanto à inibição reversível podemos classificá-la em competitiva e não competitiva. Na primeira, o inibidor apresenta semelhança estrutural com o substrato e se liga ao sítio ativo do mesmo, formando o complexo enzima-inibidor e impedindo que a enzima se ligue ao substrato. Entretanto,

diferentemente do inibidor irreversível, não há alteração na estrutura desta enzima. Quanto ao inibidor não competitivo, este se liga a outra região da enzima provocando uma alteração em sua estrutura principalmente em torno do sítio ativo, impedindo a reação de catálise mesmo quando o substrato está ligado a ela (VOET et al., 2006).

A atividade catalítica de uma enzima se constitui em um meio sensível e específico para sua mensuração. Assim, para se medir a quantidade de uma enzima em uma amostra, mede-se a velocidade de reação catalisada pela enzima. Os resultados são geralmente expressos em unidades enzimáticas e as quantidades relativas de enzima em diferentes amostras podem ser então comparadas. Uma unidade de enzima pode ser definida como a quantidade de substrato que reage ou do produto formado por tempo de reação (MURRAY et al., 2002). As enzimas são divididas em seis grupos pela NC-IUBMB de acordo com a reação específica que catalisa (Tabela 2) (NELSON e COX, 2005).

Tabela 2: Classificação das enzimas segundo a IUBMB.

CLASSE	REAÇÕES QUE CATALISAM
1. Oxidorredutases	Reações de oxidação-redução
2. Transferases	Reações de grupos contendo C, N ou P-
3. Hidrolases	Clivagem das reações adicionando água
4. Liases	Clivagem de C-C, C-S e certas ligações de C-N
5. Isomerases	Racemização de isômeros ópticos ou geométricos
6. Ligases	Formação de pontes entre C e O, S, N acoplados a hidrólise de fosfatos de alta energia.

C, carbono; N, nitrogênio; P, íon fosfato; S, enxofre; O, oxigênio. Fonte: NELSON e COX, 2005.

Dentro do grupo das hidrolases (3), encontram-se as proteases, que são as enzimas responsáveis pela hidrólise de ligações peptídicas (NC-IUBMB, 2009). As proteases são essenciais para a sobrevivência dos seres vivos, atuando na ativação de zimogênios, digestão de proteínas provenientes da dieta e do próprio organismo, coagulação

sanguínea etc. (RAO *et al*, 1998). As proteases são subdivididas em dois grandes grupos, as exoproteases que clivam ligações peptídicas próximas às extremidades amino e carboxiterminais do substrato e as endoproteases que clivam as ligações peptídicas internas das cadeias polipeptídicas do substrato.

1.3 PROTEASES DIGESTIVAS DE PEIXES

O aumento na demanda por produtos pesqueiros para consumo humano tem resultado em um constante crescimento da produção aquícola mundial, que no período entre 1997 a 2006 teve um aumento de aproximadamente 21,6%. Só em 2006, foram produzidas cerca de 159 milhões de toneladas de pescado, das quais 93 milhões foram oriundas da pesca e 66 milhões, da aquicultura (FAO, 2008). Com o aumento da produção pesqueira e, conseqüentemente, do volume de pescado processado mundialmente, grande quantidade de resíduos e de subprodutos tem sido gerada. Tal fato representa um grande desafio para empresários e comunidade científica interessados em buscar estratégias para que a produção de organismos aquáticos, seja oriunda do extrativismo, seja da aquicultura, torne-se uma atividade sustentável.

Segundo Arruda (2004), cerca de 50% do pescado mundial produzido em 2000 transformou-se em resíduo. Supondo que esse percentual tenha-se mantido ao longo dos anos, as 159 milhões de toneladas de pescado produzidas em 2006 geraram milhões de toneladas de subprodutos, constituindo-se em uma fonte significativa de desperdício de recursos e de contaminação ambiental. Assim, preocupados com problemas ambientais, pesquisadores em todo o mundo, vem desenvolvendo diversos esforços para obtenção de métodos que possibilitem a transformação desses resíduos em produtos passíveis de utilização tanto na nutrição humana quanto na animal (Martone *et al.*, 2005).

Stom e Eggum (1981) relataram que os órgãos internos e as cabeças de peixe podem ser convertidos em farinha de peixe e ser utilizada em ração animal. Esses resíduos podem também ser utilizados para os hidrolisados de proteínas de peixe (HPP) (BENJAKUL e MORRISSEY, 1997). Os hidrolisados têm uma ampla gama de potenciais aplicações, por exemplo, como ingredientes na alimentação animal (FAID et al., 1997) ou alimentos (FROKJAER, 1994), como peptona para meios de cultura microbiano (VECHT-LIFSHITZ et al., 1990), ou como fertilizante (KURBANOGLU e ALGUR, 2002).

Entre os subprodutos, as vísceras são reconhecidas como uma potencial e importante fonte de enzimas digestivas, principalmente proteases, com alta atividade e que atuam em uma ampla faixa de pH e condições de temperatura (CANCRE et al., 1999; GILDBERG, 1992; SHAHIDI JANAK e KAMIL, 2001). A recuperação de proteases de subprodutos da pesca é de grande importância uma vez que proteases de baixo custo poderiam promover novas aplicações dessas enzimas na indústria (KLOMKLAO et al., 2004), além de reduzir o descarte desses subprodutos minimizando assim o ônus ambiental.

Proteases constituem o grupo mais importante de enzimas industriais utilizadas no mundo, representando cerca de 50% do mercado industrial total de enzimas (RAO et al., 1998). Elas possuem diversas aplicações em uma ampla variedade de indústrias, como detergentes, alimentos, agroquímicos e farmacêutica (GUPTA et al., 2002; ZUKOWSKI, 1992). Essas proteases industriais são obtidas principalmente de origem animal, vegetal e fontes microbianas.

Proteinases digestivas de organismos aquáticos podem ser classificadas pelos mesmos critérios utilizados para proteases de outros animais, plantas ou microorganismos, com base na sua similaridade com outras proteases já bastante

caracterizadas como tripsina-símile, quimiotripsina-símile, quimosina-símile ou catepsina-símile. Elas podem ser classificadas em função da sua sensibilidade ao pH, como proteases ácidas, neutras e alcalinas. Elas também são classificadas por nomes comuns e nomes comerciais, especificidade preferencial e resposta a inibidores (KLOMKLAU, 2008). No sistema de nomenclatura de enzimas (EC), todas as proteases (peptídeo hidrolases) pertencem à subclasse 3.4, que é dividido em 3.4.11-19, para exopeptidases e 3.4.21-24 para endopeptidases (NISSEN, 1993). As endopeptidases clivam a cadeia polipeptídica nas ligações peptídicas no interior da cadeia, enquanto as exopeptidases clivam ligações peptídicas localizadas a partir das extremidades N-terminal (aminopeptidases) e C-terminal (carboxipeptidases) (Fig. 3) (KLOMKLAU, 2008).

Com base na natureza do sítio catalítico, proteases digestivas de organismos aquáticos são classificadas em quatro categorias como ácidas ou aspartato proteases, serinoproteases, tiolproteases ou cisteínoproteases, ou metaloproteases (SIMPSON, 2000). As enzimas nas diferentes classes são diferenciadas por vários critérios, tais como a natureza do grupos em seus sítios catalíticos, sua especificidade ao substrato, a sua resposta aos inibidores ou por sua atividade / estabilidade em ácido ou condições alcalinas (NISSEN, 1993)

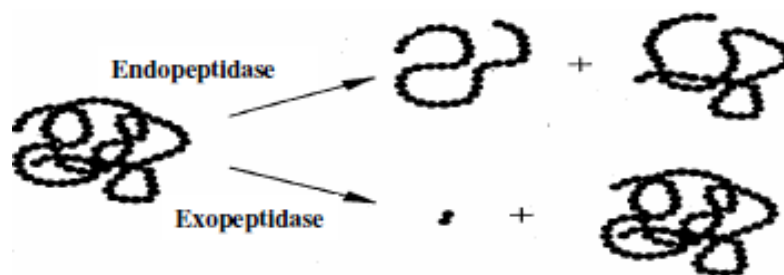


Figura 3. Ação das endopeptidases e exopeptidases sobre a estrutura da proteína.

Proteases digestivas foram estudadas em várias espécies de peixes (DE VECCHI E COPPES, 1996). As proteases encontradas nos órgãos digestivos de peixes incluem a pepsina, gastricsina, tripsina, quimotripsina, collagenase, elastase, carboxipeptidase e carboxilesterase (HAARD, 1994; SIMPSON, 2000). Pepsina e tripsina são os dois principais grupos de proteases encontradas em vísceras de peixes. Pepsina está localizada no estômago dos peixes (GILDBERG et al. 1990), enquanto a tripsina encontra-se concentrada no cecos pilóricos e no intestino (KISHIMURA et al., 2006b). A distribuição das proteases varia, dependendo da espécie e da morfologia do trato digestório. Para o peixe disco (*Symphysodon aequifasciata*), a atividade proteolítica no intestino foi maior do que no estômago (CHONG et al., 2002). Torrissen (1984) observou que a atividade proteolítica do intestino da truta arco-íris (*Salmo gairdneri*) foi maior do que a do Salmão do Atlântico (*Salmo salar*). O cecos pilóricos do Salmão Rei (*Oncorhynchus tshawytscha*) apresentou maior atividade proteolítica que o da truta arco-íris (DIMES et al., 1994). Este fato é reflexo da grande diversidade existente de espécies de peixe, as quais muitas vezes apresentam hábitos alimentares e dietas distintas.

Proteases digestivas de peixes podem ser ferramentas muito úteis na indústria de alimentos devido à propriedades importantes como, a estabilidade térmica e a alta atividade em baixa temperatura de processamento. Atualmente, há uma crescente demanda por proteases digestivas de peixes no processamento de alimentos (BOUGATEF et al., 2007). A indústria de alimentos usa proteases como adjuvantes para muitos produtos, incluindo produtos de padaria, cerveja, vinho, cereais, leite, produtos de peixe, leguminosas e na produção de hidrolisados proteicos e aromatizantes (Tabela 3).

Tabela 3. Aplicação de proteases na indústria alimentícia (HAARD, 1992).

Produto	Aplicação
Pães e Bolos	Aumentar a velocidade de secagem de proteínas; melhorar o manuseio do produto; diminuir o tempo de mistura da massa; melhorar a textura e volume do pão.
Ovo e produtos a base de ovo	Melhora a qualidade de produtos secos.
Carne	Tenderização; recuperação de proteína dos ossos; hidrólise de proteínas do sangue.
Peixe	Hidrolisados de proteínas de peixe; redução da viscosidade no processamento de produtos; remoção de pele; processamento de caviar.
Soja	Tofu; molho de soja; hidrolisado protéico de soja; remoção do sabor ruim do leite de soja.
Laticínios	Fabricação de queijo qualho; pudins; acelerar o envelhecimento de queijos.
Bebidas	Auxiliar na Fermentação e filtração; Promove clarificação a frio; diminui a formação de espuma; promove a fermentação malolática.
Chocolate	Facilitar a fermentação para a produção do chocolate.

1.4 TRIPSINA

Uma variedade de enzimas proteolíticas digestivas tem sido isoladas de órgãos de peixes. As enzimas proteolíticas mais importantes são a protease aspártica pepsina e as serinoproteases tripsina, quimotripsina e elastase. Proteases digestivas ácidas do estômago dos peixes possuem atividade elevada em meio onde o pH encontra-se entre 2,0 e 4,0, enquanto proteases digestivas alcalinas, como tripsina, são mais ativos em pH entre 8,0 e 10,0 (KLOMKLAO, 2008).

Recentemente, o uso de proteases alcalinas digestivas de organismos aquáticos, principalmente tripsina, aumentou notavelmente, dado que muitas são estáveis e ativas em condições adversas, tais como temperaturas de 50 a 60 °C, pH elevado e na presença de agentes surfactantes ou oxidantes (KLOMKLAO et al., 2005).

A tripsina (Fig. 4) é uma enzima chave na digestão protéica que apresenta atividade de endopeptidase, responsável também pela ativação do tripsinogênio e de

outros zimogênios, como por exemplo, o quimotripsinogênio (WHITAKER, 1994; KLOMKLAO et al., 2007). Estão presentes em peixes como isoenzimas, apresentando essencialmente a mesma especificidade (CASTILLO-YANEZ et al., 2005). Ela é um membro da família das serinoproteases, as quais são caracterizadas por um mecanismo catalítico comum, envolvendo a presença de uma tríade catalítica composta de resíduos específicos: serina, histidina e ácido aspártico (Fig. 5) (KLEIN et al., 1996).

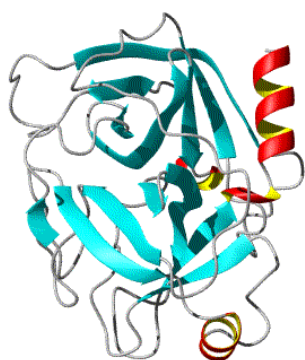


Figura 4. Estrutura terciária da tripsina.
Fonte: www.icp.csic.es/biocatalisis

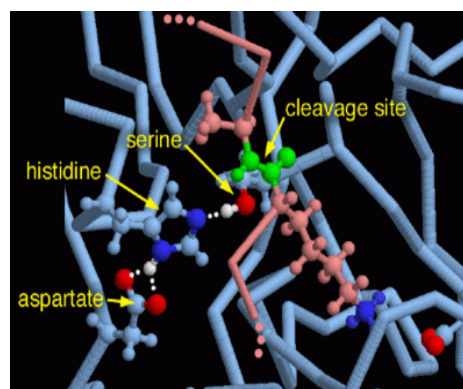


Figura 5. Centro ativo de uma serinoprotease
Fonte: www.proteopedia.org

A tripsina cliva ligações peptídicas no lado carboxila de resíduos de aminoácidos carregados positivamente como lisina e arginina (Fig. 6) (KOMKLAO et al., 2006). Ela apresenta maiores níveis de atividade nos valores de pH entre 8,0 e 11,0 e em temperaturas de 35°- 45°C, inibição ou instabilidade em pH abaixo de 5,0 e acima de 11,0 e inibição por diisopropil-fluorfosfato (DFP), fluoreto fenil-metil-sulfonil (PMSF), inibidor de tripsina de soja (SBTI) e aprotinina. A tripsina hidrolisa substratos sintéticos como: N- α -benzoil-L-arginina-p-nitoanilida (BAPNA) e tosil-arginina-metil-éster (TAME) (WHITAKER, 1994; SIMPSON, 2000). Vale também destacar sua ampla aplicabilidade industrial (KLEIN et al., 1996).

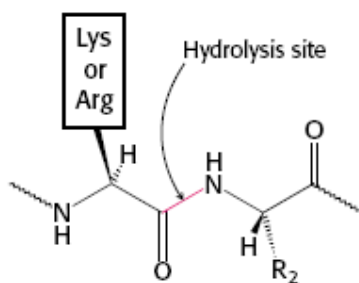


Figura 6. Sítio de hidrólise da tripsina.
Fonte: BERG et al., 2004.

A Tripsina é uma enzima muito importante na indústria alimentícia e pode ser empregada em processos citados anteriormente, como na maturação e aromatização do queijo, produção de hidrolisado protéico (preparações contendo alta qualidade de aminoácidos e peptídeos), produção de molho de soja, amaciamento da carne e produção de aromatizantes. Estas proteínas também são utilizadas para recuperar a proteína a partir de carcaças de peixes que de outra forma iriam para o lixo após a filetagem (HAARD, 1992; MACKIE, 1982). Tais fatos têm feito destas enzimas as mais estudadas em organismos aquáticos.

1.5 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE TRIPSINAS

Com o objetivo de purificar tripsinas, se utilizam técnicas comuns a processos de isolamento de proteínas, onde a primeira etapa é o preparo de extratos em solução salina ou tampão, seguido de fracionamento salino com sulfato de amônio e diálise das preparações protéicas obtidas. O tratamento com o sal, salting-out, é capaz de precipitar proteínas por retirar a camada de solvatação que as tornam solúveis, este método é eficiente uma vez que separa moléculas de acordo com sua solubilidade (VOET et al., 2006; BRACHT e ISHII-IWAMOTO, 2002). Tripsinas de peixes tropicais têm sido

parcialmente purificadas através deste procedimento (BEZERRA et al., 2001, 2005; BOUGATEF et al., 2007; SOUZA et al., 2007).

Técnicas cromatográficas convencionais (Fig. 7) como, cromatografia de troca iônica (SIRINGAN et al., 2007) e de gel filtração (BEZERRA et al., 2001, 2005; BOUGATEF et al., 2007; SOUZA et al., 2007) que separam as tripsinas de acordo com a carga líquida da molécula ou por sua massa molecular, respectivamente, podem ser utilizadas. Além destas, a cromatografia de afinidade desenvolvida por Cuatrecasas et al. (1968) isola as tripsinas de acordo com a especificidade de interação via sítio ativo. Nesta técnica, as proteínas ligam-se ao suporte inerte para uma posterior dessorção, seja por competição bioespecífica pelo sítio protéico com o inibidor, seja por alteração do pH e/ou da força iônica (CASTILLO-YANEZ et al., 2005; KURTOVIC et al., 2006).

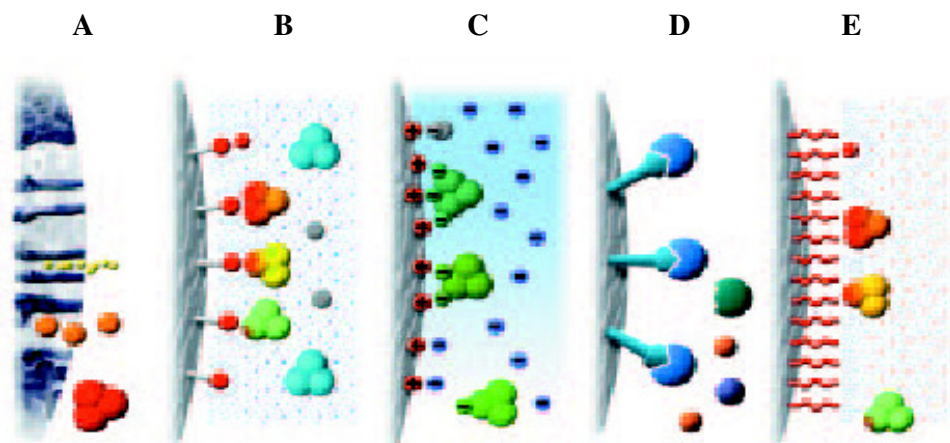


Figura 7. Técnicas cromatográficas. (A) Gel Filtração; (B) Interação Hidrofóbica; (C) Troca Iônica; (D) Afinidade; (E) Fase Reversa. Fonte: Amersham Bioscience Handbook. Gel Filtration. Principles and Methods.

As tripsinas podem ser caracterizadas por eletroforese; um método comumente utilizado para a determinação da pureza e da massa molecular de subunidades protéicas faz uso do detergente sulfato sódico de dodecila (SDS). Depois de realizada a eletroforese as proteínas são visualizadas pela adição de um corante, o azul de

Coomassie (LAEMMLI, 1970). Eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas sob condições não desnaturantes é uma poderosa técnica de análise de pureza de estruturas moleculares nativas (NEMOTO e SATO, 1998), baseando-se em suas cargas resultantes totais positivas ou negativas (conteúdos relativos ácidos e básicos, respectivamente).

Tripsinas têm sido extraídas, purificadas e caracterizadas a partir de vísceras de peixes, incluindo: *Mallotus villosus* (HJELMELAND e RAA, 1982), *Gadus ogac* (SIMPSON e HAARD, 1984), *Colossoma macropomum* (BEZERRA et al., 2001), *Engraulis japonica* (KISHIMURA et al., 2005), *Sardinops sagax caerulea* (CASTILLO-YANEZ et al., 2005), *Oreochromis niloticus* (BEZERRA et al., 2005), *Sardinops melanostictus* e *Pleurogrammus azonus* (KISHIMURA et al., 2006a), *Stolephorus spp.* (SIRINGAN et al., 2007), *Sebastes schlegelii* e *Alcichthys alcicornis* (KISHIMURA et al., 2007), *Sardina pilchardus* (BOUGATEF et al., 2007), *Katsuwonus pelamis* (KLOMKLAO et al., 2007) e *Pseudupeneus maculatus* (SOUZA et al., 2007).

Estas enzimas demonstraram características importantes como termoestabilidade, alta atividade em pH alcalino e são sensíveis a metais pesados, propriedades importantes que contribuem para sua purificação através do uso de tratamento térmico como etapas de purificação (BEZERRA et al., 2001, 2005; BOUGATEF et al., 2007; SOUZA et al., 2007).

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Extrair, purificar e caracterizar uma protease digestiva alcalina (tripsina s m le) presente no ceco pilórico do pirarucu (*Arapaima gigas*).

Objetivos Específicos

- ✓ Purificar a protease alcalina através de metodologia previamente descrita por BEZERRA et al., 2001 e através de cromatografia de afinidade;
- ✓ Caracterizar os parâmetros físico-químicos e cinéticos da enzima purificada do ceco pilórico de *A. gigas*;
- ✓ Determinar o peso molecular aparente da proteína purificada através de SDS-PAGE;
- ✓ Avaliar a sensibilidade da atividade da enzima purificada a íons metálicos, inibidores específicos e inespecíficos.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARRUDA, L. F. Aproveitamento do resíduo do beneficiamento da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) para obtenção de silagem e óleo como subprodutos. **Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**. Piracicaba, Universidade de São Paulo. 2004.

ASGEIRSSON, B.; FOX, J. W.; BJARNASON, J.B. Purification and characterization of trypsin from the poikilotherm *Gadus morhua*. **European Journal of Biochemistry**, v. 180, p. 85–94, 1989.

BARD, J.; IMBIRIBA, E. P. A Piscicultura do pirarucu, *Arapaima gigas*. **EMBRAPA-Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Úmido**, Belém , v. 52, 17p, 1986.

BENJAKUL, S.; MORRISSEY, M.T. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 3423-3430. 1997.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica. 5ª Ed.**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1059p., 2004.

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 proteinase 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 Food Biochemistry**, v. 25(3), p. 199-210, 2001.

BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E. L. **Métodos de Laboratório em Bioquímica**. Barueri: Manole, p. 77-192, 2002.

BOUGATEF, A.; SOUISSI, N.; FAKHFAKH, N.; ELLOUZ-TRIKI, Y.; NASRI, M. Purification and characterization of trypsin from the viscera of sardine (*Sardina pilchardus*). **Food Chemistry**, v. 102, p. 343–350, 2007.

CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. **Bioquímica: vol. 1**, bioquímica básica. Sao Paulo: Thomson Learning, 263p., 2007.

CANCRE, I.; RAVALLEC, R.; VAN WORMHOUDT, A. V.; STENBERG, E.; GILDBERG, A.; LE GAL, Y. Secretagogues and growth factors in fish and crustacean protein hydrolysates. **Marine Biotechnology**, v. 1, p. 489–494, 1999.

CASTELLO, L. A method to count pirarucu: fishers, assessment and management. **North American Journal of Fisheries Management**, v. 24, p. 379-389, 2004.

CASTILLO-YANEZ, F. J.; PACHECO-AGUILAR, R.; GARCACARRENO, F. L.; TORO, M. A. N. Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine *Sardinops sagax caerulea*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 140(B), p. 91–98, 2005.

CAVERO, B.A.S.; PEREIRA-FILHO, M.; ROUBACH, R.; ITUASSÚ, D.R.; GANDRA, A.L. Efeito da densidade de estocagem na homogeneidade do crescimento de juvenis de pirarucu em ambiente confinado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38: p. 103-107, 2003.

CHAVÉZ, J. D. A. Plano de Manejo de Paiche em las Cochas de Punga. **Programa Integral de Desarrollo y Conservación**, Ed.Ceta. Iquitos, Peru. 2002.

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 aequifasciata*). **Aquaculture**. V. 203, p. 321-333, 2002.

CUATRECASAS, P.; WILCHEK, M.; ANFINSEN, C. B. Selective enzyme purification by affinity chromatography. **Proceedings National Academy of Science**, v. 70, p. 636-643, 1968.

DE VECCHI, S.; COPPES, Z. Marine fish digestive proteases – relevance to food industry and the south-west Atlantic region – a review. **Journal of Food Biochemistry**, v. 20, p. 193–214, 1996.

DIMES, L. E.; GARCIA-CARRENO, F. L.; HAARD, N. F. Estimation of protein digestibility: III. Studies on the digestive enzymes from the pyloric ceca of rainbow trout and salmon. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 109(A), p. 349-360, 1994.

FAID, M.; ZOUITEN, A.; ELMARRAKCHI, A.; ACHKARI-BEGDOURI, A. Biotransformation of fish waste into stable feed ingredient. **Food Chemistry**, v. 60, p. 13-18, 1997.

FERRARIS, JR. Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America. **Porto Alegre: EDIPUCRS**, Brasil, p. 31, 2003.

FONTENELE, O. Hábitos de desova do pirarucu "*Arapaima gigas*" (Cuvier), e evolução de sua larva (Actinopterygii, Osteoglossidae). **Boletim Técnico DNOCS**, v. 153, p.1–18, 1952.

FROKJAER, S. Use of hydrolysates for protein supplementation. **Food Technology**, v. 48(4), p. 86-88, 1994.

IMBIRIBA, E. P. Potencial da criação de pirarucu, *Arapaima gigas*, em cativeiro. **Acta Amazonica**, v. 31: p. 299-316, 2001.

GILDBERG, A. Recovery of proteinase and protein hydrolysate from fish viscera. **Bioresource Technology**, v. 39, p. 271–276, 1992.

GILDBERG, A.; OLSEN, R.L.; BJANNASSON, J.B. Catalytic properties and chemical composition of pepsin from Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 69(B), p. 323-330, 1990.

GODINHO, H.P; SANTOS, J.E; FORMAGIO, P.S; GUIMARÃES-CRUZ, R.J. Gonadal morphology and reproductive traits of the Amazonian fish *Arapaima gigas* (Schinz, 1822). **Acta Zoológica**, v. 86, p. 289-294, 2005.

GUIZANI, N.; ROLLE, R. S.; MARSHALL, M. R.; WEI, C. I. Isolation, purification and characterisation of a trypsin from the pyloric caeca of mullet (*Mugil cephalus*). **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 98(B), p. 517–521, 1991.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 13–32, 2002.

HAARD, N. F. Protein hydrolysis in seafoods. **Seafood chemistry. Processing Technology and Quality**, Chapman & Hall, New York, p. 10-33. 1994.

HAARD, N. F. A review of proteolytic enzymes from marine organisms and their application in the food industry. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 1, p. 17–35, 1992.

HJELMELAND, K.; RAA, J. Characteristics of two trypsin type isozymes isolated from the Arctic fish capelin (*Mallotus villosus*). **Comparative Biochemistry and Physiology** v. 71(B), p. 557–562, 1982.

IBAMA (2008). Estatística da pesca 2006 Brasil. Grandes regiões e unidades da federação. Brasília.

IMBIRIBA, E. P.; LOURENÇO JUNIOR, J. B.; DUTRA, S. Rendimento de carne de pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier). **EMBRAPA-CPATU. Boletim de pesquisa**, Belém, n.150. 21p. 1994.

JAVEED, A.; MAHENDRAKAR, N.S. Autolysis and rancidity development in tropical freshwater fish viscera during fermentation. **Bioresource Technology**, v. 58, p. 247-251, 1996.

KISHIMURA, H.; TOKUDA, Y.; YABE, M.; KLOMKLAO, S.; BENJAKUL, S.; ANDO, S. Trypsins from the pyloric ceca of jacobever (*Sebastes schlegelii*) and elkhorn sculpin (*Alcichthys alcicornis*): Isolation and characterization. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1490-1495, 2007.

KISHIMURA, H.; HAYASHI, K.; MIYASHITA, Y.; NONAMI, Y. Characteristics of trypsin from the viscera of true sardine (*Sardinops melanostictus*) and the pyloric ceca of arabesque greenling (*Pleuroprammus azonus*). **Food Chemistry**, v. 97, p. 65–70, 2006a.

KISHIMURA, H.; TOKUDA, Y.; KLOMKLAO, S.; BENJAKUL, S.; ANDO, S. Enzymatic characteristics of trypsin from pyloric ceca of spotted mackerel (*Scomber Australasicus*). **Journal of Food Biochemistry**, v. 30, p. 466-477, 2006b.

KISHIMURA, H.; HAYASHI, K.; MIYASHITA, Y.; NONAMI, Y. Characteristics of two trypsin isozymes from the viscera of Japanese anchovy (*Engraulis japonica*). **Journal of Food Biochemistry**, v. 29, p. 459–469, 2005.

KLEIN, B.; LE MOULLAC, G.; SELLOS, D.; VAN WORMHOUDT, A. Molecular cloning and sequencing of trypsin cDNAs from *Penaeus vanammei* (Crustacea,

Decapoda): Use in assessing gene expression during the moult cycle. **Journal Biochemistry Cell Biology**, v. 28, p. 551-563, 1996.

KLOMKLAO, S. Digestive proteinases from marine organisms and their applications. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 30(1), p. 37-46, 2008.

KLOMKLAO, S.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; KISHIMURA, H.; SIMPSON, B. K. Purification and characterization of trypsins from the spleen of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). **Food Chemistry**, v. 100, p. 1580-1589, 2007.

KLOMKLAO, S.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; KISHIMURA, H.; SIMPSON, B. K.; SAEKI, H. Trypsins from yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) spleen: Purification and characterization. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 144 (B), p. 47–56, 2006.

KLOMKLAO, S., BENJAKUL, S., VISESSANGUAN, W., SIMPSON, B.K.AND KISHIMURA, H. Partitioning and recovery of proteinase from tuna spleen by aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3061-3067, 2005.

KLOMKLAO, S.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W. Comparative studies on proteolytic activity of spleen extracts from three tuna species commonly used in Thailand. **Journal of Food Biochemistry**. v. 28, p. 355-372, 2004.

KRISTJANSSON, M. M. Purification and characterization of trypsin from the pyloric caeca of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 39, p. 1738–1742, 1991.

KROGDAHL, A.; HEMRE, G.-I.; MOMMSEN, T.P. Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. **Aquaculture Nutrition**, v. 11, p. 103–122, 2005.

KURBANOGLU, E. B.; ALGUR, O. F. The influence of ram horn hydrolyzate on the crop yield of the mushroom *Agaricus bisporus*. **Scientia Horticulturae**, v. 94, p. 351-357, 2002.

KURTOVIC, I.; MARSHALL, S. N.; SIMPSON, B. K. Isolation and characterization of a trypsin fraction from the pyloric ceca of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 143(B), p. 432– 440, 2006.

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

LU B-J, ZHOU L-G, CAI Q-F. Purification and characterisation of trypsins from the pyloric caeca of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*). **Food Chemistry**, v. 110, p. 352–360, 2008.

LÜLING, K. H. Zur biologie und ökologie von *Arapaima gigas* (Pisces Osteoglossidae). Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere. n. 54, p. 436-530. 1964

LUNDBERG, J. G; CHERMOFF, B. A miocene fossil of the Amazonian fish *Arapaima* (Teleostei, Arapaimidae) from the Magdalena River Region of Colombia - Biogeography and evolutionary implications. **Biotropica**, v. 24, n.1. p. 2-14. 1992.

MACKIE, I. M. Fish protein hydrolysates. **Process Biochemistry**, v. 17, p. 26–31, 1982.

MARTINEZ, A.; OLSEN, R.L.; SERRA, J.L. Purification and characterization of two trypsin-like enzymes from the digestive tract of anchovy *Engraulis encrasicolus*. **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 91(B), p. 677–684, 1988.

MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. **Harper: Bioquímica. 9ª Ed.**, São Paulo: Editora Atheneu. 919p., 2002.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**, New York, W. H. Freeman and Company, 2005.

NEMOTO, T.; SATO, N. Analysis of subunit structures of proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 265, p. 190-192, 1998.

NISSEN, J. A. Proteases. **Enzymes in Food Processing**, Academic Press, Inc. New York, p. 159-203, 1993.

PEISONG, M.; YANSONG, L.; KONDA, P.R.; WOON, K.C.; LAM, T.J. Characterization of the seabass pancreatic α -amylase gene and promoter. **General and Comparative Endocrinology**, v.137, p. 78–88, 2004.

PEREIRA-FILHO, M.; CAVERO, B. A. S.; ROUBACH, R.; ITUASSÚ, D. R.; GANDRA, A. L.; CRESCÊNCIO, R. Cultivo do Pirarucu (*Arapaima gigas*) em viveiro escavado. **Acta Amazonica**, v. 33, p. 715-718, 2003.

RAO, M. B.; TANKSALA, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 597–635, 1998.

ROMERO, J.S. “El Paiche”. Aspectos de su historia natural ecología y aprovechamiento. Información Servicio Pesquerías y Caza, **Ministério da Agricultura**, Lima, Peru, 63p. 1960.

SAINZ, J. C.; GARCÍA-CARREÑO, F. L.; HERNÁNDEZ-CORTÉS, P. *Penaeus vannamei* isotrypsins: purification and characterization. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 138(B), p. 155-162, 2004.

SIMPSON, B. K. Digestive proteinases from marine animals. **Seafood Enzymes: Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality**. Marcel Dekker, New York, p. 531-540, 2000.

SIMPSON, B. K.; HAARD, N. F. Trypsin from Greenland cod (*Gadus ogac*), isolation and comparative properties. **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 79(B), p.613–622, 1984.

SIRINGAN, P.; RAKSAKULTHAI, N.; YONGSAWATDIGUL, J. Partial purification and characterization of trypsin-like proteinases in Indian anchovy (*Stolephorus* spp.). **Food Chemistry**, v.101, p. 82-89, 2007.

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

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

STOM, T.; EGGUM, B.O. Nutritional value viscera silage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 32, p. 115-120, 1981.

TORRISSEN, K. R. Characterization of proteases in the digestive tract of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in comparison with rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 77(B), p. 669-674, 1984.

VECHT-LIFSHITZ, S. E.; ALMAS, K. A.; ZOMER, E. Microbial growth on peptones from fish industrial wastes. **Letters in Applied Microbiology**, v. 10, p. 183-186, 1990.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica**. 3ª ed. Porto Alegre, Editora Artes Médicas, 2006.

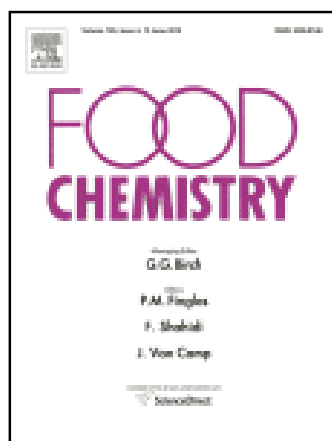
WHITAKER, J. R. **Principles of Enzymology for the Food Sciences**, 2nd ed. Marcel Dekker, New York, NY, p. 63–115, 1994.

YOSHINAKA, R.; SUZUKI, T.; SATO, M.; IKEDA, S. Purification and some properties of anionic trypsin from the catfish pancreas. **Bulletin of the Japanese Society of Fisheries Oceanography**. v. 49, p. 207–212, 1983.

ZUKOWSKI, M. M. Production of commercially valuable products. R. H. Doi e M. Mc. Gloughlin (Eds.), **Biology of bacilli: application to industry**. London: **Butterworth-Heinemann**, p. 311–337, 1992.

Artigo a ser submetido à revista Food Chemistry

ISSN: 0308-8146



1 Purification and characterization of a thermostable alkaline protease of the Amazon air-
2 breathing fish *Arapaima gigas* (Schinz, 1822)

3
4 Augusto C. V. Freitas Júnior¹; Helane M. S. Costa¹; Karina Ribeiro²; Maria C. R.
5 Soares³; Patrícia F. Castro⁴; Luiz B. Carvalho Jr.¹; Ranilson S. Bezerra^{1*}

6
7 ¹Laboratório de Enzimologia (LABENZ), Departamento de Bioquímica, and
8 Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de
9 Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brazil

10 ²Unidade Acadêmica Especializada em Ciências Agrárias, Universidade Federal do Rio
11 Grande do Norte, Av. Jundiaí, Km 3 S/N, Macaíba-RN, 59280-000, Brazil

12 ³Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Pesca e Aquicultura,
13 Dois Irmãos, 52171-900, Recife-PE, Brazil

14 ⁴Embrapa Meio-Norte, Caixa Postal 341, 64200-970, Parnaíba – PI, Brazil

15

16 Correspondence:

17 *Ranilson S. Bezerra.

18 Laboratório de Enzimologia – LABENZ, Departamento de Bioquímica, Universidade
19 Federal de Pernambuco. Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brazil,

20 Tel.: + 55-81-21268540, Fax: + 55-81-21268576

21 E-mail address: ransoube@uol.com.br

22

23

24

25

26 **Abstract**

27 Alkaline protease from pyloric caeca of pirarucu (*Arapaima gigas*) was purified. The
28 effect of metal ions and protease inhibitors on its activity and its physical-chemical and
29 kinetics properties were determined. A single band (28.0 kDa) was observed in a SDS-
30 PAGE. The optimum pH and temperature was 9.0 and 65°C, respectively. The enzyme
31 was stable after incubation for 30 min in a large pH range (6.0-11.5) and at temperature
32 of 60°C. The kinetic parameters such as: K_m , K_{cat} and K_{cat}/K_m were 0.47 ± 0.042 mM,
33 1.33 s^{-1} and $2.82 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$, respectively using BApNA as substrate. This protease
34 activity demonstrated to be very sensitive to some metal ions in the increasing order:
35 $\text{Fe}^{2+} > \text{Hg}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Al}^{3+} > \text{Pb}^{2+}$, and was highly inhibited by trypsin inhibitors. Specific
36 substrate and inhibitors for trypsin provided additional evidences that this enzyme is
37 most likely a trypsin-like enzyme and their feature suggests a potential for industrial
38 application.

39

40 **Key words:** *Arapaima gigas*; Air-breathing fish; Fish processing waste; Digestive
41 enzymes; Proteases; Trypsin purification.

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51 **Introduction**

52 Protease is a class of industrial enzymes widely consumed in the world,
53 accounting for about 60% of the world of enzymes (Gupta, Beg & Larenz, 2002; Rao,
54 Tanksale, Ghatge & Deshpande, 1998). This fact is due to the diversity of applications
55 that these proteins, mainly alkaline proteases, have in various industrial segments such
56 as: food, detergents, pharmaceuticals, textiles, among others (Espósito, Amaral,
57 Buarque, Oliveira, Carvalho Jr. & Bezerra, 2009; Klomklao, Benjakul, Visessanguan,
58 Simpson & Kishimura, 2005; Zukowski, 1992). Several studies report that fish viscera
59 can be used as an important source of digestive enzymes. These residues, which are
60 usually discarded, have a great potential for extraction of digestive enzymes. The use of
61 alkaline digestive proteases of aquatic organisms, especially trypsin, increased
62 markedly, as some are stable and active under harsh conditions such as temperatures
63 from 50 to 60°C, high pH and in the presence of surfactants or oxidizing agents
64 (Espósito, Amaral, Marcuschi, Carvalho Jr & Bezerra (*in press*); Klomklao et al. 2005).
65 Furthermore, the recovery of proteolytic enzymes from fish's viscera is an alternative to
66 minimize the economical and ecological onus caused by this processing waste (Shahidi
67 & Janaka Kamil, 2001; Bezerra et al. 2001, 2005; Klomklao et al. 2005; Bougatef,
68 Souissi, Fakhfakh, Ellouz-Triki, & Nasri, 2007; Souza, Amaral, Espírito Santo,
69 Carvalho Jr & Bezerra, 2007; Kishimura, Tokuda, Yabe, Klomklao, Benjakul & Ando,
70 2007).

71 Trypsin (EC 3.4.21.4) is one of the most studied fish digestive proteases. Studies
72 based on the use of commercial protease substrates and inhibitors have shown that fish
73 trypsins are present as isoenzymes along the digestive tract, and have essentially the
74 same specificity as the mammals (Castillo-Yáñez, Pacheco-Aguilar, Garcia-Carreño
75 & Toro, 2005). This enzyme belongs to the serinoproteases family, which are

76 characterized by a common catalytic mechanism involving the presence of a catalytic
77 triad composed by specific residues: serine, histidine and aspartic acid (Klomklao,
78 2008; Klein, Le Moullac, Sellos & van Wormhoudt, 1996). This protease cleaves the
79 peptide bonds on the carboxyl side from positively charged amino acids residues
80 (Klomklao, Benjakul, Visessanguan, Kishimura & Simpson, 2007a), being responsible
81 for many biological processes such as: protein digestion itself, zymogen activation and
82 mediation between the ingestion of food and assimilation of nutrients (Klomklao,
83 Benjakul, Visessanguan, Kishimura & Simpson, 2007b; Sainz, García-Carreño &
84 Hernández-Cortés, 2004).

85 This enzyme has been extracted, purified and characterized from the viscera of
86 important commercial fish, including: *Mallotus villosus* (Hjelmeland & Raa, 1982),
87 *Gadus ogac* (Simpson & Haard, 1984), *Colossoma macropomum* (Bezerra et al. 2001),
88 *Engraulis japonica* (Kishimura, Hayashi, Miyashita & Nonami, 2005), *Sardinops sagax*
89 *caerulea* (Castillo-Yáñez et al. 2005), *Oreochromis niloticus* (Bezerra et al. 2005),
90 *Sardinops melanostictus* and *Pleurogrammus azonus* (Kishimura, Tokuda, Klomklao,
91 Benjakul & Ando, 2006), *Stolephorus spp.* (Siringan, Raksakulthai & Yongsawatdigul,
92 2007), *Sebastes schlegelii* and *Alcichthys alcicornis* (Kishimura et al. 2007), *Sardina*
93 *pilchardus* (Bougatef et al. 2007), *Pseudupeneus maculatus* (Souza et al. 2007),
94 *Katsuwonus pelamis* (Klomklao, Kishimura, Nonami & Benjakul, 2009a) and *Lutjanus*
95 *vitta* (Khantaphant & Benjakul, 2010).

96 In fact, there is a great diversity of fish species, mainly in tropical areas, with
97 diet and various feeding habits, which reflects in enzymes with different features. The
98 pirarucu (*Arapaima gigas*) is the largest freshwater scale fish in the world, attaining
99 weight over 200 kg and up to three meters in length, being distributed predominantly in
100 the Amazon basin (Lüling, 1964; Saint-Paul, 1986; Nelson, 1994). This fish is

101 considered a species of high commercial interest and one of the most prized fish in the
102 Brazilian market. In Amazonia, *A. gigas* is marketed salted and dried as a substitute for
103 cod, being known as the Amazon cod. Its fishery is predominantly artisanal, performed
104 by fishing communities that lives in areas of occurrence of this species (IBAMA, 2008).
105 According to IBAMA (2008), in 2006, about 1,237 t of this fish was caught in Brazilian
106 waters. Although the culture of pirarucu is still in development, it has shown great
107 potential because of its peculiar characteristics, such as: excellent quality of meat
108 devoid of thorns, large consumer acceptance, rusticity, air-breathing capacity and high
109 rate of growth, which can range from 7-10 kg in the first year of establishment
110 (Imbiriba, 2001; Pereira-Filho, Cavero, Roubach, Ituassú, Gandra & Crescêncio, 2003;
111 Cavero, Pereira-Filho, Roubach, Ituassú & Gandra, 2003).

112 Since it is a large fish, its process generates a considerable amount of waste,
113 mainly viscera. With this in mind, the objective of this study was to establish a
114 purification protocol for a isoform of pirarucu alkaline protease, characterize it and
115 evaluate the viability of using the digestive tract (pyloric caeca) of this species as a
116 potencial source of trypsin.

117

118 Material and Methods

119

120 Materials

121 All reagents were of analytical grade and purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA),
122 Merck (Darmstadt, Germany) and Bio-Rad Laboratories (Ontario, Canada). The
123 Universidade Federal Rural de Pernambuco (Recife-PE, Brazil) kindly donated
124 cultivated juveniles specimens of *A. gigas* for this study.

125

126 Enzyme extraction

127 Three specimens (with a total length of 74.7 ± 5.3) were sacrificed in an ice bath
128 for biometric measurements and tissue removal, according to standard methodology of
129 Bezerra et al. (2001). The pyloric caeca was dissected, carefully cleaned with deionized
130 water, and kept at 4°C during transportation to the laboratory (~30 min). After this, the
131 tissue (12 g) were homogenized in 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 (200 mg of tissue/mL buffer)
132 by using a tissue homogenizer (4°C) (IKA RW 20D S32, China). The homogenate was
133 then centrifuged (Sorvall RC-6 Superspeed Centrifuge – North Carolina, USA) at
134 10,000g for 20 min at 4°C. The supernatant (crude extract) was stored at -25°C and
135 used for further purification steps.

136

137 Enzyme purification

138 The alkaline protease was purified with a four-step procedure: heat treatment,
139 ammonium sulfate precipitation, Sephadex® G-75 filtration and benzamidine-agarose
140 affinity chromatography. Crude extract (60 mL) was incubated at 45°C for 30 min and
141 centrifuged at 10,000g for 10 min at 4°C. The supernatant was collected and
142 fractionated in three fractions with ammonium sulfate (F1, 0-30%, F2, 30-100% of
143 saturation and SF, final supernatant) for 2h at 4°C. Afterwards, the precipitate
144 containing trypsin activity was collected by centrifugation and dialyzed against 0.1 M
145 Tris-HCl pH 8.0. A dialyzed sample (6mg of protein) was applied on a Sephadex® G75
146 column (1.2 x 42 cm), which was eluted with 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 at a flow rate of
147 $0.34 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Each fraction was tested for tryptic activity. The protein peaks with high
148 specific proteolytic activity were pooled and applied on a benzamidine-agarose column
149 (1mL of packed volume), which was eluted first with Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 containing

150 NaCl 1M. Then, was eluted with KCl-HCl 0.5M pH 2.0 and collected in the presence of
151 40 μ L of Tris-HCl buffer 1.5 M pH 9.0. Both benzamidine-agarose steps was carried in
152 the same flow rate (0.5 mL.min⁻¹). Each fraction was tested for tryptic activity. The
153 protein peak with higher specific proteolytic activity was pooled and after two dialysis
154 against 2 L 0.01 M of Tris-HCl buffer pH 8.0 it was stored at -25°C to be used in the
155 characterization experiments.

156

157 Specific activity

158 30 μ L of 8mM N- α -benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) prepared in
159 dimethylsulphoxide (DMSO) was incubated in microtiter wells with the enzyme (30
160 μ L) and 0.1M Tris-HCl pH 8.0 (140 μ L). The release of p-nitroaniline was followed by
161 an increase in absorbance at 405 nm in a microplate reader (BioRad Model X-MarkTM,
162 USA). Controls were performed without enzyme (Bezerra et al. 2005).

163

164 Protein determination

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

168

169 Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

170 SDS-PAGE was carried out according to Laemmli (1970) method, using a 4%
171 (w/v) stacking gel and a 12.5% (w/v) separating gel. Liofilized samples from the
172 affinity chromatography pool (50 μ g of protein) and a molecular mass standard were
173 mixed with a solution containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2.5% SDS, 10% glycerol,
174 5% b-mercaptoethanol and 0.002% bromophenol blue, heated at 100°C for 3 min and

175 applied in the electrophoresis gel. After running, the gel was stained for protein
176 overnight in a solution containing 0.25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue, 10% (v/v)
177 acetic acid and 25% methanol. The background of the gel was destained by washing in a
178 solution containing 10% (v/v) acetic acid and 25% methanol (v/v). The molecular
179 weight of the protein bands were estimated using the 198-6.8 kDa molecular mass
180 protein standards (Bio-Rad laboratories).

181

182 Kinetic parameters

183 BApNA prepared in DMSO was used as substrate (final concentration from 0.3
184 mM to 3 mM). The assay was carried at pH 8.0 (0.1M Tris-HCl) in a 96-well microtiter
185 plate. The reaction (triplicates) was initiated by adding 30 μ L of purified enzyme
186 solution (45.8 μ g protein/mL) and the release of p-nitroaniline was followed at 405 nm
187 by using a microtiter plate reader. Blanks were similarly prepared without enzymes. The
188 reaction rates were fitted to Michaelis-Menten kinetics using Origin 6.0 Professional
189 (Bezerra et al. 2001).

190

191 Effect of protease inhibitors

192 Purified *A. gigas* enzyme (30 μ L) was incubated during 30 min with protease
193 inhibitors (30 μ L, 8mM): phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), a serine-protease
194 inhibitor; N-p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK), a trypsin-specific inhibitor;
195 Benzamidine, a trypsin inhibitor; N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK),
196 a chymotrypsin-specific inhibitor; Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), a chelating
197 compound; β -Mercaptoethanol, a reducing agent. After incubation 8mM BApNA was
198 added and the release of p-nitroaniline was followed by increasing absorbance at 405
199 nm. The enzyme and substrate blank were similarly assayed without enzyme and

200 substrate solution, respectively. The 100% values of activities were those established in
201 the absence of the inhibitors (Bezerra et al. 2001).

202

203 Physical-chemical properties

204 The influence of both temperature and pH on the trypsin activity of the *A. gigas*
205 purified protein was studied as follows: the purified enzyme was assayed
206 (quadruplicates), at temperatures ranging from 25°C to 80°C and pH values from 5.0 to
207 11.5, with various buffers (Phosphate-citrate buffer for pH 5.0 to 7.0, Tris-HCl buffer
208 for pH 7.5 to 9.0 and Glicine-NaOH buffer for pH 9.5 to 11.5), using 8mM BApNA
209 prepared in DMSO as substrate, as previously described. The thermal stability of the
210 enzyme was determined by assaying (quadruplicates) its activity (25°C) after pre-
211 incubation for 30 min at temperatures ranging from 25°C to 70°C (Souza et al., 2007).
212 The pH stability of the enzyme was determinate after pre-incubation for 30 min at
213 various buffers in the range of pH 6-11.5.

214 Effect of metal ions

215 Samples of the purified enzyme (30 µL) were added to a 96-well microtiter plate
216 with 2 mM solution (30 µL) of MnCl₂, MgCl₂, BaCl₂, LiCl, KCl, CuCl₂, CdCl₂, ZnCl₂,
217 CaCl₂, HgCl₂, AlCl₃, FeCl₂ and PbCl₂. Deionised water was used to prepare these
218 solutions. After 30 min of incubation, 0.1M Tris-HCl buffer (110 µL) pH 8.0 and 8 mM
219 BApNA (30 µL) were added. The p-nitroaniline produced was measured in a microplate
220 reader at 405 nm after 15 min of reaction (Bezerra et al. 2005).

221

222

223

224

225 Effect of NaCl

226 The effect of NaCl on the activity of alkaline protease was studied, using
227 BAPNA as a substrate, at pH 8.0 and 25°C by the addition at a final concentration of 0–
228 30% (w/v) NaCl to the reaction mixture according Komklao et al. (2009a) modified.

229

230 Statistical analysis

231 All values are presented as mean $\pm$ standard deviations. These data were
232 statistically analyzed by ANOVA, followed by a post-hoc (Tukey–Kramer) test, when
233 indicated. Differences were accepted as significant at the 95% confidence level ($p <$
234 0.05).

235

236 Results and Discussion

237 The purification of alkaline protease from pyloric caeca of pirarucu is
238 summarized in Table 1. A purification factor of 1.2-fold was obtained with the yield of
239 35.4, when ammonium sulfate at 30 to 100% saturation (F2) was used. A insignificant
240 activity was detected in F1 fraction (0 to 30% of saturation) and no activity was
241 observed in the final supernatant fraction (SF). Than fraction F2 was chosen to be
242 applied on a Sephadex[®] G75 column. After this step, it was observed an increase of 7.7-
243 fold in the specific activity, and it was obtained a yield of 33.2%. The chromatogram of
244 the protein elution and the tryptic activity profiles are shown in Fig. 1A. The higher
245 tryptic activity was found in the second protein peak. Therefore, this peak was pooled
246 and applied on a benzamidine-agarose affinity chromatography column. Only one peak
247 with trypsin activity was observed (Fig. 1B). An increase of 24.9-fold was seen in the
248 specific activity with a yield of 17.4%. It is known that one of the most important
249 limiting factor for the commercial use of fish processing waste as a source of proteases

is the protein purification strategies. In fact, these are generally of high cost and time consuming (Bezerra et al. 2001). However, the procedures as well as the raw material (fish viscera) used in the present study are of relatively low cost, being therefore easily adapted to industrial scale. Furthermore, the use of these proteases in some segments of industry such as food and detergent require a lower degree of purity which makes the process more economically viable. Espósito et al. (*in press*) using ammonium sulphate precipitation processes followed by ethanolic precipitation in brute extract of intestine from *Cyprinus carpio* reported a large potential of one fraction as coadjuvant detergent.

The purified extract showed only one band on the SDS-PAGE with a molecular mass of approximately 28.0 kDa as seen in Fig. 2. According to the literature, fish trypsins have molecular weights between 23 and 28 kDa, which is confirmed for other fish species, such as: *Coryphaenoides pectoralis* (24 kDa) (Klomklao, Kishimura & Benjakul, 2009b), *Katsuwonus pelamis* (24 kDa) (Klomklao et al. 2009a), *Sardina pilchardus* (25 kDa) (Bougatef et al. 2007), *Pomatomus saltatrix* (29 kDa) (Klomklao, Benjakul, Visessanguan, Kishimura & Simpson, 2007b), *Pseudupeneus maculatus* (24.5 kDa) (Souza et al. 2007), *Oreochromis niloticus* (23.5 kDa) (Bezerra et al. 2005).

The kinetic parameters such as the affinity constant (K_m), the catalytic constant (k_{cat}) and catalytic efficiencies (K_{cat}/K_m) of purified enzyme were determined using N- α -benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) as shown in Table 2. The K_m is used to assess the affinity of the enzyme to the substrate, while K_{cat} indicates the number of enzymatic reactions catalyzed per second. The K_{cat}/K_m indicates the efficiency of enzyme to catalyze the transformation of substrate into product (Fersht, 1977). The results showed that alkaline protease from *A. gigas* have a similar affinity for BAPNA, when compared with other fish and mammals trypsin, except for spotted goatfish (*Pseudupeneus maculatus*) (Souza et al. 2007) and Monterey sardine (*Sardinops sagax*

275 *caerulea*) (Castillo-Yáñez et al. 2005). The purified enzyme also has a catalysis rate
276 (k_{cat} - enzymatic reactions catalyzed per second) close to the results found for the trypsin
277 from other animals, except for brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*) (Khantaphant &
278 Benjakul, 2010). Moreover, the efficiency of *A. gigas* protease to catalyze the
279 transformation of substrate into product (k_{cat}/K_m) varied to a different extent, in
280 comparison to the results found for trypsins from other animals (Table 2)

281 To obtain more evidences that the purified protein probably is a trypsin-like
282 enzyme, assays were carried out with specific and nonspecific inhibitors, where the
283 effect of other chemicals was also evaluated as shown in Table 3. The classical trypsin
284 inhibitors (TLCK and benzamidine) completely inhibited the proteolytic activity, wich
285 was also inhibited (85%) by PMSF (a serinoprotease inhibitor). The reducing agent β -
286 mercaptoethanol has caused 38% inhibition on the enzyme activity. The use of EDTA
287 and TPCK, a chelating agent and specific chymotrypsin inhibitor, respectively, had not
288 shown any significant effect on the enzyme activity. The results obtained with inhibitors
289 TLCK, benzamidine and PMSF, make some evidence that the enzyme is a trypsin-like.
290 The results obtained with EDTA gives evidence that the enzyme does not require any
291 ion for an efficient catalysts. The β -mercaptoethanol exerts its effect by breaking
292 disulfide bonds, affecting mainly extracellular proteins such as digestive proteases that
293 are often rich in this type of bonds which improves its thermal stability. However,
294 Bougatef et al. (2007) reported that trypsin of *Sardina pilchardus* was not inhibited by
295 β -mercaptoethanol. Other purified fish trypsins were inhibited by classic specific trypsin
296 inhibitor TLCK and the serinoproteases inhibitor PMSF: *Oreochromis niloticus*
297 (Bezerra et al. 2005), *Pomatomus saltatrix* (Klomklao et al. 2007b), *Oncorhynchus*
298 *masou* (Kanno et al. 2009), *Coryphaenoides pectoralis* (Klomklau et al. 2009b), *Seriola*
299 *quinqueradiata* and *Physiculus japonicus* (Kishimura, Tokuda, Klomklao, Benjakul &

300 Ando, 2006b) and *Macruronus novaezelandiae* (Shi, Marshall & Simpson. 2007). The
301 results suggest that the purified alkaline protease is probably a trypsin-like enzyme.

302 The effect of pH on pirarucu trypsin activity was evaluated and is shown in
303 Figure 3A and 3B. The enzyme showed maximum activity at pH 9.0, although more
304 than 80% of its maximum activity was observed in the range of pH 8.0 to 10.0. The loss
305 of enzyme activity at pH below and above the optimum pH, is probably due to protein
306 conformational changes caused by repulsion of charges (Klomklao et al. 2009b). The
307 purified protease was stable in a large range of pH from 6 to 11.5 (Figure 3B). This
308 indicates that the conformational change caused by the charges repulsion in this pH
309 range is reversible. In general, trypsins of aquatic organisms are active and stable in a
310 pH range from 7.5 to 10.0, being capable to hydrolyse various substrates (De Vecchi &
311 Coppes, 1996). According to Espósito et al. (2009), this feature of fish proteases suggest
312 the possibility of its use as an additive in detergents. Similar results were found for
313 optimum pH and stability of trypsins from other fish, such as: *Coryphaenoides*
314 *pectoralis* (pH 8.5 and pH 6-11.0, respectively) (Klomklao et al. 2009b), *Theragra*
315 *chalcogramma* (pH 8.0 and pH 6-11, respectively) (Kishimura et al. 2008), *Sardina*
316 *pilchardus* (pH 8.0 and pH 6-9.0, respectively) (Bougatef et al. 2007), *Sebastes*
317 *schlegelii* (pH 8.0 and pH 5-11, respectively) (Kishimura et al. 2007), *Pseudupeneus*
318 *maculatus* (pH 9.0) (Souza et al. 2007), *Sardinops sagax caerulea* (pH 8.0 and pH 7.0-
319 8.0, respectively) (Castillo-Yáñez et al. 2005), *Oreochromis niloticus* (pH 8.0) (Bezerra
320 et al. 2005) and *Colossoma macropomum* (pH 9.5) (Bezerra et al. 2001).

321 The effect of temperature on purified alkaline protease activity was evaluated
322 and is shown in Figure 3C and 3D. The purified enzyme showed maximum activity at
323 temperature of 65°C and was stable in the temperature range from 25°C to 55°C for 30
324 minutes, losing only about 10% of its activity at 60°C. According to Klomklao et al.

(2005) most of the alkaline proteases from aquatic organisms are stable and active in adverse conditions, i.e. temperatures of 50°C to 60°C. This and other features make them interesting for several industrial segments like detergent or food industries. Similar results of optimum temperature and thermostability were found for trypsins from other tropical fish, such as: *Sardina pilchardus* (60°C) (Bougatef, 2007), *Colossoma macropomum* (60°C and 55°C, respectively) (Bezerra et al. 2001), *Oreochromis niloticus* (50°C and 50°C, respectively) (Bezerra et al. 2005) and *Pseudupeneus maculatus* (55°C and 45°C, respectively) (Souza et al. 2007). Klomklao et al. (2009b) found an optimal temperature and thermostability of 45°C and 40°C, respectively for the trypsin of *Coryphaenoides pectoralis*. These results showed that even some species that live in cold waters (4°C) have digestive proteases that present high activity at elevated temperatures. It is not known why the digestive enzymes of fish and other aquatic organisms present high activity at temperatures well above the physiological temperature. Probably, the answer to this question is in the adaptations of their ancestors to climate change through evolution.

Some enzymes require additional chemical component (cofactor) such as inorganic ions for its full activity. On the other hand, due to their bio-accumulative and non-biodegradable properties, some metals constitute one of the main groups of aquatic pollutants (Ramesh, 2006). The effect of metallic ions (1 mM) on the activity of enzyme was evaluated and is presented in Table 3. The ions K^+ , Mg^{2+} and Ba^{2+} have not promoted any significant effect on enzyme activity. On the other hand, it showed to be sensitive to the following ions in increasing order: $Mn^{2+} < Ca^{2+} < Li^+ < Cd^{2+} < Cu^{2+} < Fe^{2+} < Hg^{2+} < Zn^{2+} < Al^{3+} < Pb^{2+}$ (3%, 4%, 7%, 40%, 50%, 69%, 80%, 81%, 91% and 100%, respectively). It is known that sub-lethal concentrations of heavy metals can disturb the digestive enzymatic activity of the exposed species (De Coen, Vangheluwe

350 & Janssen, 1998). The ion Ca^{2+} has been reported in the literature as a trypsin activator
 351 for several organisms, especially mammals. However, pirarucu alkaline protease was
 352 slightly inhibited in the presence of low concentrations of this ion (1mM). Results in the
 353 literature have shown that Ca^{2+} do not appear to be essential for the activity of alkaline
 354 proteases from fish. The same is observed to some aquatic organisms (Saborowski,
 355 Sahling, Navarette del Toro, Walter & García-Carreño, 2004; Souza et al., 2007;
 356 Bezerra et al., 2005; Kishimura & Hayashi, 2002). However, other works report that the
 357 Ca^{2+} promoted a stabilizing effect on fish trypsins (Klomklao et al. 2009a; Kishimura,
 358 Klomklao, Benjakul & Chun, 2008; Klomklao et al. 2007b). Kishimura and Hayashi
 359 (2002) reported that the binding of Ca^{2+} to a specific site found in mammalian trypsins
 360 promotes greater stabilization of the protein and increases its resistance to thermal
 361 denaturation and autolysis. The increase of Ca^{2+} concentration not promotes different
 362 effect on the activity of purified protease from *A. gigas* (Figure 3F). Previous studies
 363 have shown that trypsins-like of other tropical fishes also presents sensitivity to metallic
 364 ions (Bezerra et al., 2001, 2005; Bougatef et al., 2007, Souza et al., 2007), especially
 365 Cd^{2+} , Al^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} and Hg^{2+} (1 mM). Bougatef et al. (2007) using the ions
 366 Cu^{2+} , Zn^{2+} and Mn^{2+} at a concentration of 2 mM, observed 37.8%, 48.9% and 68.3% of
 367 inhibition on the trypsin from *Sardina pilchardus*, in the presence of these ions,
 368 respectively. Souza et al. (2007) found different results for sensitivity of trypsin of the
 369 spotted goatfish (*Pseudupeneus maculatus*) to ions Cd^{2+} , Al^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} (1 mM)
 370 (respectively, 53.15%, 97.49%, 74.4% and 69.2% of inhibition). Bezerra et al. (2005)
 371 reported high inhibition of trypsin from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using the
 372 ions Cd^{2+} , Al^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} and Hg^{2+} (1mM) (43.2%, 39.9%, 38.4%, 37.1% and 73.35%
 373 of inhibition, respectively).. The different results found by various authors reflect the
 374 diversity of species, and their adaptations to the aquatic environment.

375 The effect of NaCl on the activity of purified protease was evaluated and is
376 shown in Figure 3E. The enzyme lost activity with increasing NaCl concentration,
377 showing 65%, 51% and 42% of residual activity at concentrations of 5%, 10% and 15%
378 NaCl (w/v), respectively. This fact can be explained due to the salting-out phenomenon,
379 which varies for each protein. The assessment of enzyme activity under non-physiologic
380 osmolarity is an important factor, because most industrial processes may occur in such
381 conditions. Klomklao et al. (2007b) found that the trypsin from the fish *Pomatomus*
382 *saltatrix* has lost activity with increasing NaCl concentration. However, it retained
383 about 60% of its activity in the presence of 30% NaCl. Klomklao et al. (2009a) also
384 observed the same effect in two trypsin isoforms from the fish *Katsuwonus pelamis*,
385 where trypsin A and B have retained about 40% and 50% of its activity in the presence
386 of 25% NaCl, respectively. According Komklao et al (2007b), the proteolytic activity in
387 high concentrations of salt, suggest than possible use in the fermentation process of fish
388 sauce.

389

390 **Conclusions**

391 An alkaline protease was purified from the pyloric caeca of *Arapaima gigas*. The
392 characterization with specific substrate and inhibitors generates evidence that this
393 protease is probably a trypsin-like enzyme. The enzyme showed interesting features
394 such as high activity and stability on alkaline pH and thermostability. These
395 characteristics have confirmed that fish viscera may, in industrial conditions, be used as
396 a source of alkaline proteases with potential for industrial applications. It was also
397 observed that this protease showed a moderate sensitivity to various metal ions.

398

399 **Acknowledgments**

400

401 The authors would like to thank Albérico Espírito Santo and João Virgínio for
402 their technical assistance. This study was supported by the Financiadora de Estudos e
403 Projetos (FINEP/RECARCINE), Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca –
404 (SEAP/PR), Empresa brasileira de pesquisa agropecuária (Embrapa), Conselho
405 Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq), Fundação de Apoio à
406 Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Petróleo do Brasil S/A
407 (PETROBRAS) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
408 (CAPES).

409

410 **References**

411 Alencar, R. B., Biondi, M. M., Paiva, P. M. G., Vieira, V. L. A., Carvalho Jr, L. B.,
412 Bezerra, R. S. 2003. Alkaline proteases from digestive tract of four tropical fishes.
413 *Brazilian Journal of Food Technology*, 6, 279-284.

414 Asgeirsson, B., Fox, J. W., Bjarnason, J. (1989). Purification and characterization of
415 trypsin from the poikilotherm *Gadus morhua*. *European Journal of Biochemistry*, 180,
416 85-94.

417 Barkia, A., Bougatef, A., Nasri, R., Fetoui, E., Balti, R., Nasri, M. (*in press*). Trypsin
418 from the viscera of Bogue (*Boops boops*): isolation and characterization. *Fish*
419 *Physiology and Biochemistry*, DOI 10.1007/s10695-009-9365-z.

420 Bezerra, R. S., Lins E. J. F., Alencar R. B., Paiva, P. M. G., Chaves, M. E. C., Coelho L.
421 C. B. B., Carvalho Jr L. B. (2005). Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia
422 (*Oreochromis niloticus*). *Process Biochemistry*, 40, 1829-1834.

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

427 Bougatef, A., Souissi, N., Fakhfakh, N., Ellouz-Triki, Y., Nasri, M. (2007). Purification
 428 and characterization of trypsin from the viscera of sardine (*Sardina pilchardus*). *Food*
 429 *Chemistry*, 102, 343–350.

430 Castillo-Yáñez, F. J., Pacheco-Aguilar, R., Garcia-Carreño, F. L., Toro, M. A. N.
 431 (2005). Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine
 432 *Sardinops sagax caerulea*. *Comparative Biochemistry and Physiology (part B)*, 140,
 433 91–98.

434 Cavero, B. A. S., Pereira-Filho, M., Roubach, R., Ituassú, D. R., Gandra, A. L. (2003).
 435 Efeito da densidade de estocagem na homogeneidade do crescimento de juvenis de
 436 pirarucu em ambiente confinado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38, 103-107.

437 De Coen, W. M., Vangheluwe, M. L., Janssen, C. R. (1998). The use of biomarkers in
 438 *Daphnia magna* toxicity testing— III. Rapid toxicity testing of pure chemicals and
 439 sediment pore waters using ingestion and digestive enzyme activity. *Chemosphere*. 37,
 440 2677-2694.

441 De Vecchi, S., Coppes, Z. (1996). Marine fish digestive proteases – relevance to food
 442 industry and the south-west Atlantic region – a review. *Journal of Food Biochemistry*,
 443 20, 193–214.

444 Espósito, T. S., Amaral, I. P. G., Marcuschi, M., Carvalho Jr, L. B., Bezerra, R. S. (*in*
 445 *press*). Surfactants- and oxidants-resistant alkaline proteases from common carp

446 (*Cyprinus carpio* L) processing waste. *Journal of Food Biochemistry*, DOI:
 447 10.1111/j.1745-4514.2009.00255.x.

448 Espósito, T. S., Amaral, I. P. G., Buarque, D. S., Oliveira, G. B., Carvalho Jr., L. B.,
 449 Bezerra, R. S. (2009). Fish processing waste as a source of alkaline proteases for
 450 laundry detergent. *Food Chemistry*, 112, 125–130.

451 Fersht, A. (1977). *Enzyme structure and mechanism*, pp. 98–118. New York: W.H.
 452 Freeman and Company.

453 Gupta, R., Beg, Q. K., Larenz, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular
 454 approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59,
 455 15–32.

456 Hau, P. V., & Benjakul, S. (2006). Purification and characterization of trypsin from
 457 pyloric caeca of bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*). *Journal of Food*
 458 *Biochemistry*, 30, 478–495.

459 Hjelmeland, K., & Raa, J. (1982). Characteristics of two trypsin type isozymes isolated
 460 from the Arctic fish capelin (*Mallotus villosus*). *Comparative Biochemistry and*
 461 *Physiology (part B)*, 71, 557–562.

462 IBAMA (2008). Estatística da pesca 2006 Brasil. Grandes regiões e unidades da
 463 federação. Brasília.

464 Imbiriba, E. P. (2001). Potencial da criação de pirarucu, *Arapaima gigas*, em cativeiro.
 465 *Acta Amazonica*, 31, 299–316.

466 Kanno, G., Yamaguchi, T., Kishimura, H., Yamaha, E., Saeki, H. (*in press*).
 467 Purification and characteristics of trypsin from masu salmon (*Oncorhynchus masou*)

468 cultured in fresh-water. *Fish Physiology and Biochemistry*, DOI 10.1007/s10695-009-
 469 9336-4.

470 Khantaphant, S., & Benjakul, S. (2010). Purification and characterization of trypsin
 471 from the pyloric caeca of brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *Food Chemistry*,
 472 120, 658–664.

473 Kishimura, H., Klomklao, S., Benjakul, S., Chun, B. (2008). Characteristics of trypsin
 474 from the pyloric ceca of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*). *Food Chemistry*,
 475 106, 194-199.

476 Kishimura, H., Tokuda, Y., Yabe, M., Klomklao, S., Benjakul, S., Ando, S. (2007).
 477 Trypsins from the pyloric ceca of jacobever (*Sebastes schlegelii*) and elkhorn sculpin
 478 (*Alcichthys alcicornis*): Isolation and characterization. *Food Chemistry*, 100, 1490-
 479 1495.

480 Kishimura, H., Hayashi, K., Miyashita, Y., Nonami, Y. (2006a). Characteristics of
 481 trypsins from the viscera of true sardine (*Sardinops melanostictus*) and the pyloric ceca
 482 of arabesque greenling (*Pleuroprammus azonus*). *Food Chemistry*, 97, 65–70.

483 Kishimura, H., Tokuda, Y., Klomklao, S., Benjakul, S., Ando, S. (2006b). Comparative
 484 study of enzymatic characteristics of trypsins from the pyloric ceca of yellow tail
 485 (*Seriola quinqueradiata*) and brown hakeling (*Physiculus japonicus*). *Journal of Food*
 486 *Biochemistry*, 30, 521-534.

487 Kishimura, H., Hayashi, K., Miyashita, Y., Nonami, Y. (2005). Characteristics of two
 488 trypsin isozymes from the viscera of Japanese anchovy (*Engraulis japonica*). *Journal of*
 489 *Food Biochemistry*, 29, 459–469.

490 Kishimura, H., & Hayashi, K. (2002). Isolation and characteristics of trypsin from
 491 pyloric ceca of the starfish *Asterina pectinifera*. *Comparative Biochemistry and*
 492 *Physiology (part B)*, 132, 485–490.

493 Klein, B., Le Moullac, G., sellos, D., van Wormhoudt, A. (1996). Molecular cloning
 494 and sequencing of trypsin cDNAs from *Penaeus vanammei* (Crustacea, Decapoda): Use
 495 in assessing gene expression during the moult cycle. *Journal Biochemistry Cell Biology*,
 496 28, 551-563.

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

500 Klomklao, S., Kishimura, H., Benjakul, S. (2009b). Trypsin from the Pyloric Ceca of
 501 Pectoral Rattail (*Coryphaenoides pectoralis*): Purification and Characterization. *Journal*
 502 *of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 7097-7103.

503 Klomklao, S. (2008). Digestive proteinases from marine organisms and their
 504 applications. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 30(1), 37-46.

505 Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H., Simpson, B. K. (2007a).
 506 Purification and characterization of trypsins from the spleen of skipjack tuna
 507 (*Katsuwonus pelamis*). *Food Chemistry*, 100, 1580-1589.

508 Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H., Simpson, B. K. (2007b).
 509 Trypsin from the pyloric caeca of bluefish (*Pomatomus saltatrix*). *Comparative*
 510 *Biochemistry and Physiology (part B)*, 148, 382-289.

511 Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Simpson, B. K. and Kishimura, H.
 512 (2005). Partitioning and recovery of proteinase from tuna spleen by aqueous two-phase
 513 systems. *Process Biochemistry*, 40, 3061-3067.

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

516 Lüling, K. H. (1964). Zur biologie und ökologie von *Arapaima gigas* (Pisces
 517 Osteoglossidae). *Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere*, 54, 436-530.

518 Nelson, J. S. (1994). *Fishes of the World*. 3rd. edition, 624p, New York: Wiley and
 519 Sons, Inc.

520 Outzen H., Berglund, G. I., Smalås, A. O., Willassen, N. P. (1996). Temperature and pH
 521 sensitivity of trypsins from atlantic salmon (*Salmo salar*) in comparison with bovine
 522 and porcine trypsin. *Comparative Biochemistry and Physiology (part B)*, 115(1), 33-45.

523 Pereira-Filho, M., Cavero, B. A. S., Roubach, R., Ituassú, D. R., Gandra, A. L.,
 524 Crescêncio, R. (2003). Cultivo do Pirarucu (*Arapaima gigas*) em viveiro escavado. *Acta*
 525 *Amazonica*, 33, 715-718.

526 Ramesh, M. (2006). Studies on the impact of heavy metal cadmium on certain enzymes
 527 in a freshwater teleost fish, *Cyprinus carpio*. In *43rd Congress of the European Society*
 528 *of Toxicology and 6th Congress of Toxicology in Developing Countries. Toxicology*
 529 *Letters*. 164 (S), 157.

530 Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., Deshpande, V. V. (1998). Molecular and
 531 biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology*
 532 *Reviews*, 62, 597–635.

533 Saborowski, R., Sahling, G., Navarette del Toro, M. A., Walter, I. & García-Carreño, F.
534 L. (2004). Stability and effects of organic solvents on endopeptidases from the gastric
535 fluid of the marine crab *Cancer pagurus*. *Journal of Molecular Catalysis (part B)*, 30,
536 109-118.

537 Saint-Paul, U. (1986). Potential for aquaculture of South American freshwater fishes: a
538 review. *Aquaculture*, 54(3), 205-240.

539 Sainz, J. C., García-Carreño, F. L., Hernández-Cortés, P. (2004). *Penaeus vannamei*
540 isotrypsins: purification and characterization. *Comparative Biochemistry and*
541 *Physiology*, 138(B), 155-162.

542 Shahidi, F., & Janak Kamil, Y. V. A. (2001). Enzymes from fish and aquatic
543 invertebrates and their application in the food industry. *Trends in Food Science and*
544 *Technology*, 12, 435–464.

545 Shi, C., Marshall, S. N., Simpson, B. K. (2007). Purification and characterization of
546 trypsin from the pyloric caeca of the New Zealand hoki fish (*Macruronus*
547 *Novaezealandiae*), *Journal of Food Biochemistry*, 31, 772–796.

548 Simpson, B. K., & Haard, N. F. (1984). Trypsin from Greenland cod (*Gadus ogac*),
549 isolation and comparative properties. *Comparative Biochemistry Physiology*, 79(B),
550 613–622.

551 Siringan, P., Raksakulthai, N., Yongsawatdigul, J. (2007). Partial purification and
552 characterization of trypsin-like proteinases in Indian anchovy (*Stolephorus* spp.). *Food*
553 *Chemistry*, 101, 82-89.

- 554 Souza, A. A. G., Amaral, I. P. G., Espírito Santo, A. R., Carvalho Jr, L. B., Bezerra, R.
555 S. (2007). Trypsin-like enzyme from intestine and pyloric caeca of spotted goatfish
556 (*Pseudupeneus maculatus*). *Food Chemistry*, 100, 1429–1434.
- 557 Warburg, O., Christian, W. (1941). Isolierung und Kristallisation des Garunges
558 Ferments enolasc. *Biochemioche Zeitschrift*, 3190, 384-421.
- 559 Zukowski, M. M. (1992). Production of commercially valuable products. in: *Biology of*
560 *bacilli: application to industry*. Doi, R. H., McGloughlin M., (Eds.), pp. 311–337,
561 London: Butterworth-Heinemann.

562 Table 1. A summary of the purification of alkaline digestive protease from *A. gigas*

Purification steps	Total protein amount (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification (folds)
Crude extract	478,8	179,1	0,37	100,0	1,0
Heath crude extract	475,5	182,3	0,38	101,8	1,0
Ammonium Sulphate (30-100%)	145,5	63,5	0,44	35,4	1,2
Size exclusion chromatography	34,6	59,4	2,87	33,2	7,7
Affinity chromatography	3,5	31,3	9,33	17,4	24,9

563 pyloric caeca.

564

565 Exception of the heated crude extract (45°C for 30 min), all steps were performed at 4°C. The size
 566 exclusion and affinity chromatographies were performed on Sephadex® G75 and benzamidine-agarose
 567 columns, respectively.

568

569

570

571

572

573

574

575

576

577

578

579

580

Table 2. Kinetic parameters of alkaline digestive protease from *A. gigas* and other trypsins of fishes and mammals.

Species	K_m (mM)	K_{cat} (s ⁻¹)	K_{cat}/K_m (s ⁻¹ · mM ⁻¹)	References
pirarucu (<i>Arapaima gigas</i>)	0.47	1.37	2.83	Present work
Bovine	0.65	2.00	3.10	Asgeirsson et al. (1989)
Suine	0.82	1.55	1.89	Outzen et al. (1996)
Monterey sardine (<i>Sardinops sagax caerulea</i>)	0.051	2.12	41.0	Castillo-Yáñez et al. (2005)
bigeye snapper (<i>Priacanthus macracanthus</i>)	0.31	1.06	3.4	Hau and Benjakul (2006)
brownstripe red snapper (<i>Lutjanus vitta</i>)	0.50	4.71	9.27	Khantaphant and Benjakul, (2010)
spotted goatfish (<i>Pseudupeneus maculatus</i>)	1.82	nd*	nd*	Souza et al. (2007)
Nile tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	0.76	nd*	nd*	Bezerra et al. (2005)

*nd – not determinated.

Table 3. Effects of ions and inhibitors on the activity of alkaline digestive protease from pirarucu pyloric caeca.

Ions and inhibitors	Activity (U/mg)	Inhibition (%)
Control*	9.33 ± 0.07	0
Metal ions [1 mM]		
K ²⁺	9.33 ± 0.20	0
Mg ²⁺	9.29 ± 0.12	0
Ba ²⁺	9.34 ± 0.14	0
Mn ²⁺	9.02 ± 0.16	3
Ca ²⁺	8.92 ± 0.13	4
Li ²⁺	8.65 ± 0.18	7
Cd ²⁺	5.58	40
Cu ²⁺	4.65 ± 0.02	50
Fe ²⁺	2.88	69
Hg ²⁺	1.86 ± 0.26	80
Zn ²⁺	1.77 ± 0.02	81
Al ³⁺	0.84 ± 0.2	91
Pb ²⁺	0.00	100
Inhibitor [8 mM]		
Control*	9.33 ± 0.06	0
TPCK	9.32 ± 0.08	0
TLCK	0.0	100
Benzamidine	0.19 ± 0.07	98
PMSF	1.4	85
β-mercaptoethanol	5.72 ± 0.13	38
EDTA	9.34 ± 0.05	0

*Activity without presence of ions or inhibitors. The initial concentration used for the assay with inhibitors was 8 mM. The final concentration used for the assay with ions was 1 mM. phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), N-p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK), N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK), Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)

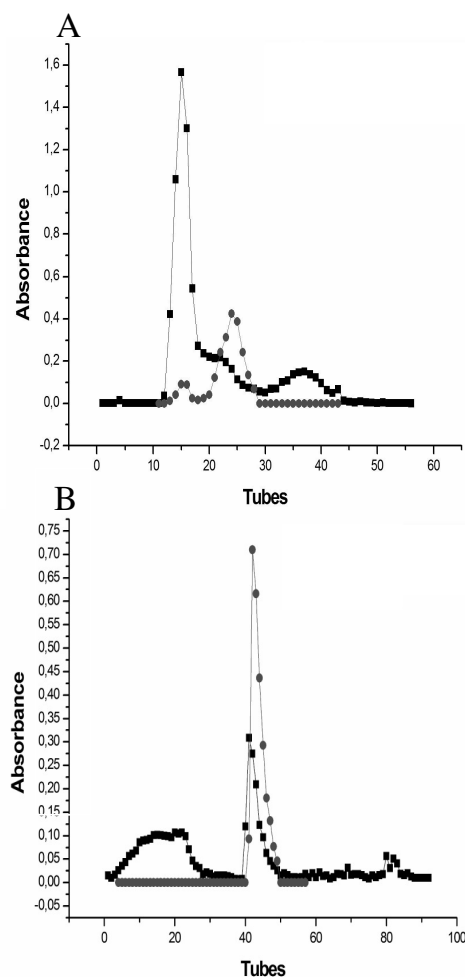


Figure 1. (■) $\lambda = 280$ nm. (●) $\lambda = 405$ nm (activity using BApNA). (A) Chromatogram of Sephadex® G75 column with fractions activity. A dialyzed sample F2 (6mg of protein) was applied on column (1.2 x 42 cm), which was eluted with 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 at a flow rate of 0.34 mL.min⁻¹. Each fraction was tested for tryptic activity. (B) Chromatogram of benzamidine-agarose column with fractions activity. The protein peaks with high specific proteolytic activity obtained at Sephadex® G75 column were pooled and applied on benzamidine-agarose column (1mL of packed volume and flow rate 0.5 mL.min⁻¹), which was eluted first with Tris-HCl 0.1 M pH 8.0. Then, was eluted with KCl-HCl 0.5M pH 2.0 and collected in the presence of 40 μ L of Tris-HCl buffer 1.5 M pH 9.0. Each fraction was tested for tryptic activity using BApNA as substrate.

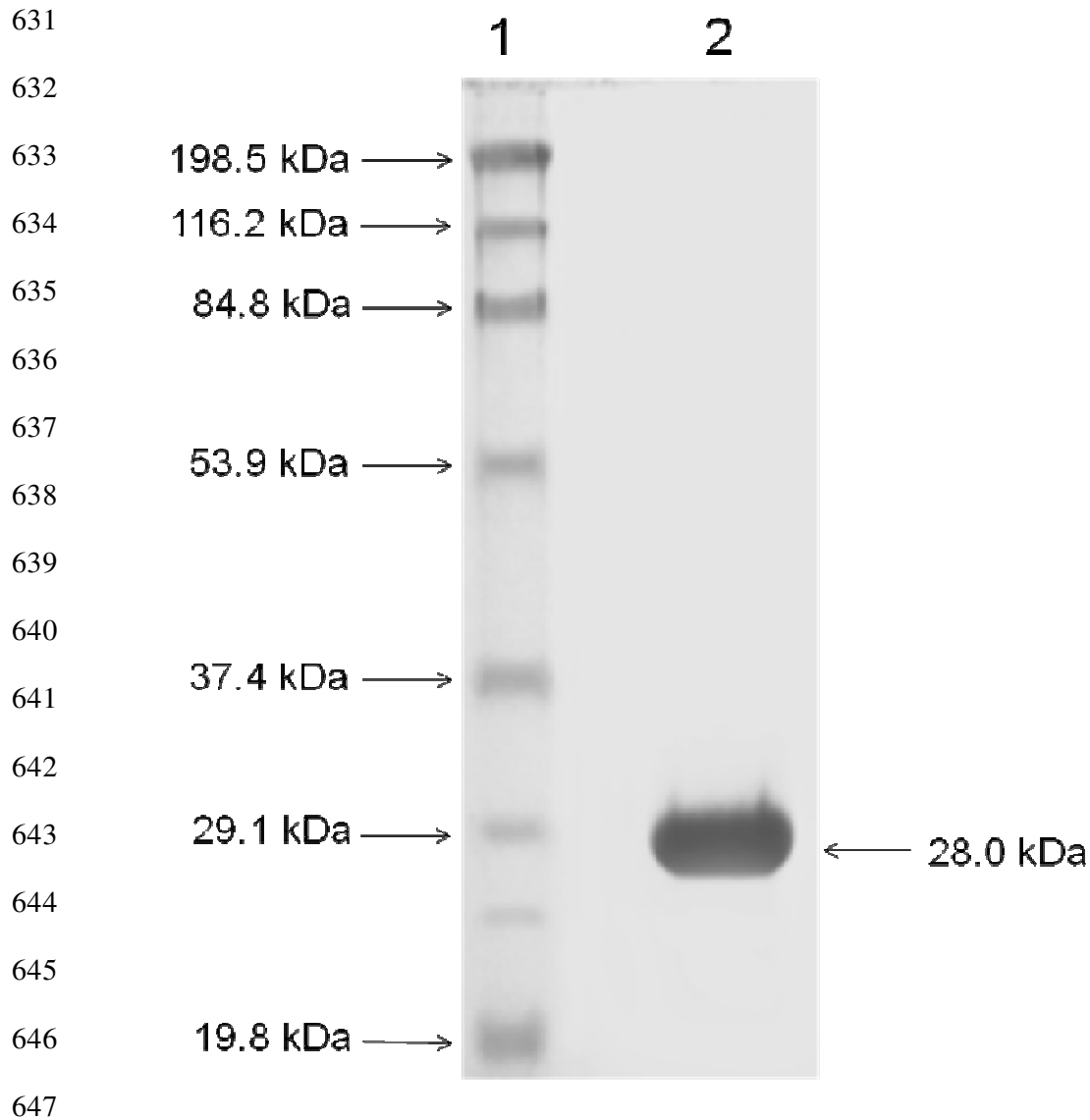


Figure 2. SDS-PAGE electrophoresis 12.5%. Lane 1 – MM standard (Myosin > β -galactosidase > Bovine serum albumine > Ovalbumin > Carbonic anhydrase > Soybean trypsin inhibitor > Lysozyme). Lane 2 – Sample (50 μ g of protein) of activity pool from affinity chromatography. After running, the gel was stained for protein overnight in a solution containing 0.25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue, 10% (v/v) acetic acid and 25% methanol. The background of the gel was destained by washing in a solution containing 10% (v/v) acetic acid and 25% methanol (v/v).

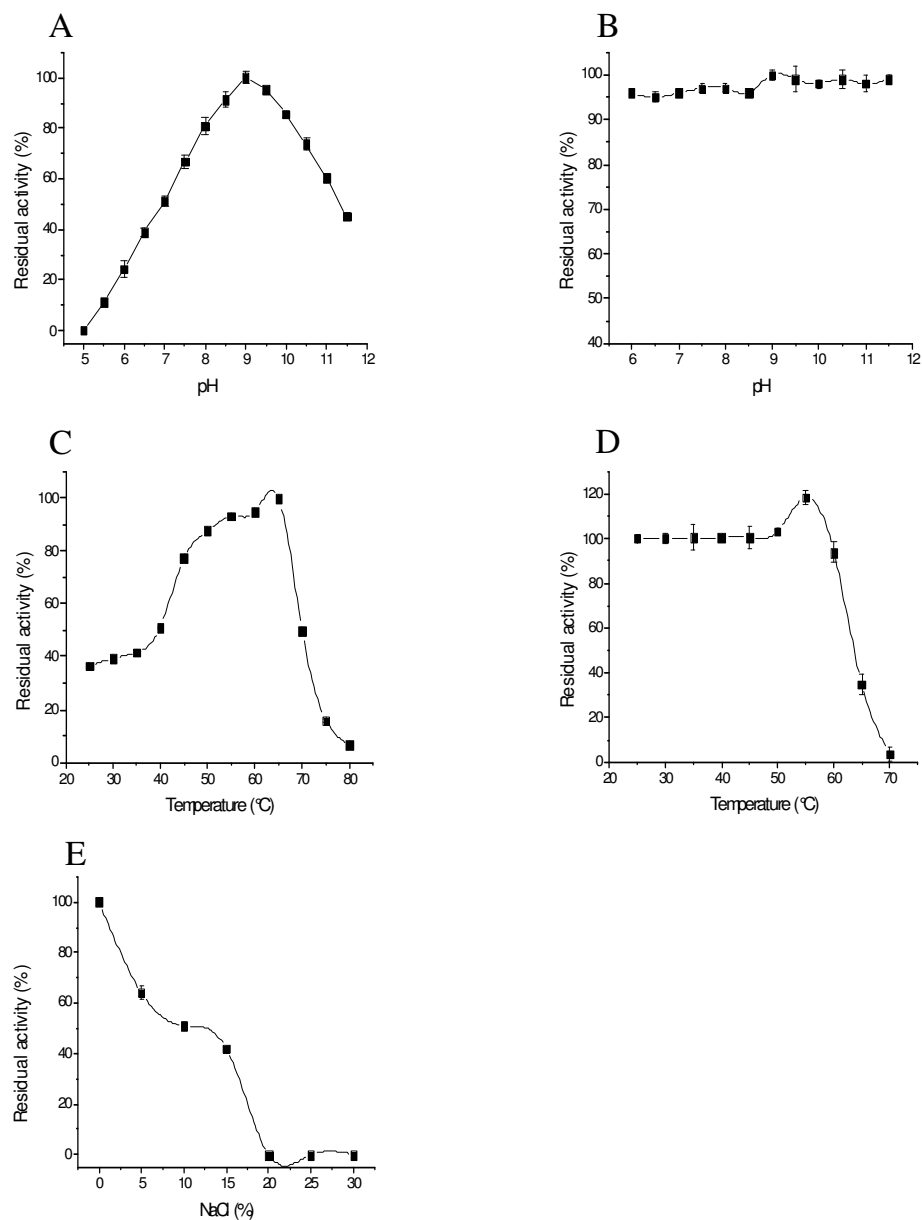


Figure 3. Effect of pH, temperature, NaCl and Ca^{2+} on the alkaline digestive protease from *A. gigas*. (A) pH optimum for activity of enzyme, utilizing various buffers in the pH range 5.0-11.5. (B) pH stability of enzyme, after incubation of 30 min in the pH range 6.0-11.5, using the pH 9.0 as a maximum activity. Effect of temperature on the enzyme from *A. gigas*, utilizing a temperature range of 25 to 80°C. (C) Optimum temperature for activity of enzyme. (D) Thermal stability of enzyme, after 30 min of incubation in the temperature range 25-70°C. (E) Effect of addition of NaCl (0-30%;

681 w/v), in reaction mixture, on the activity of enzyme. All assays were carried using
682 BApNA as substrate.

ANEXO

Guide for Authors

Submission of Papers

All manuscripts for Food Chemistry should be submitted online via EES – Elsevier Editorial System - <http://ees.elsevier.com/foodchem> . **This is the preferred method of submission, and facilitates processing of your manuscript.** Only in exceptional cases where the authors have no electronic facilities whatsoever, the author should submit one original copy of the manuscript, plus two photocopies and a copy on disk, to the

Managing Editor:

Professor Gordon Birch

School of Food Biosciences

University of Reading

Whiteknights, PO Box 226

Reading RG6 6AP, UK

Authors are required to submit, with their manuscripts, the names and full contact details (including e-mail address) of 3 potential referees (who should not come from the same institute).

It is the author's responsibility to ensure that papers are written in clear and comprehensible English. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission. English language help service: Upon request, Elsevier will direct authors to an agent who can check and improve the English of their paper (before submission).

Please contact authorsupport@elsevier.com for further information.

Submission of a paper implies that it has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the Publisher.

Review Policy

A peer review system involving two or three reviewers is used to ensure high quality of manuscripts accepted for publication. The Managing Editor and Editors have the right to decline formal review of a manuscript when it is deemed that the manuscript is 1) on a topic outside the scope of the Journal; 2) lacking technical merit; 3) focused on foods or processes that are of narrow regional scope and significance; 4) fragmentary and providing marginally incremental results; or 5) is poorly written.

Types of Contributions

Original research papers; review articles; rapid communications; short communications; viewpoints; letters to the Editor; book reviews.

1. *Research papers* - original full-length research papers which have not been published previously, except in a preliminary form, and should not exceed 7,500 words (including allowance for no more than 6 tables and illustrations).

2. *Review articles* - will be accepted in areas of topical interest, will normally focus on literature published over the previous five years, and should not exceed 10,000 words (including allowance for no more than 6 tables and illustrations).

3. *Rapid communications* - an original research paper reporting a major scientific result or finding with significant implications for the research community, designated by the Editor.

4. *Short communications* - Short communications of up to 3000 words, describing work that may be of a preliminary nature but which merits immediate publication.

5. *Viewpoints* - Authors may submit viewpoints of about 1200 words on any subject covered by the Aims and Scope.

6. *Letters to the Editor* - Letters are published from time to time on matters of topical interest.

7. *Book reviews*

Manuscript Preparation

General: Manuscripts must be typewritten, double-spaced with wide margins on one side of white paper. Each page must be numbered, and lines must be consecutively numbered from the start to the end of the manuscript. Good quality printouts with a font size of 12 or 10 pt are required. The corresponding author should be identified (include a Fax number and E-mail address). Full postal addresses must be given for all coauthors.

Authors should consult a recent issue of the journal for style if possible. An electronic copy of the paper should accompany the final version. The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity. Authors should retain a copy of their manuscript since we cannot accept responsibility for damage or loss of papers.

Original manuscripts are discarded one month after publication unless the Publisher is asked to return original material after use.

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

Text: Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text, Acknowledgements, Appendix, References, Vitae, Figure Captions and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text. The

corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers. The title of the paper should unambiguously reflect its contents. Where the title exceeds 70 characters a suggestion for an abbreviated running title should be given.

Units: The SI system should be used for all scientific and laboratory data; if, in certain instances, it is necessary to quote other units, these should be added in parentheses.

Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' (10⁹ in America, 10¹² in Europe) is ambiguous and should not be used.

Symbols: Abbreviations for units should follow the suggestions of the British Standards publication BS 1991. The full stop should not be included in abbreviations, e.g. m (not m.), ppm (not p.p.m.), % and '/' should be used in preference to 'per cent' and 'per'.

Where abbreviations are likely to cause ambiguity or may not be readily understood by an international readership, units should be put in full.

Current recognised (IUPAC) chemical nomenclature should be used, although commonly accepted trivial names may be used where there is no risk of ambiguity.

The use of proprietary names should be avoided. Papers essentially of an advertising nature will not be accepted.

References: All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. In the text refer to the author's name (without initials) and year of publication (e.g. "Steventon, Donald and Gladden (1994) studied the effects..." or "...similar to values reported by others (Anderson, Douglas, Morrison & Weiping, 1990)..."). For 2-6 authors all authors are to be listed at first citation. At subsequent citations use first author et al.. When there are more than 6 authors, first author et al. should be used throughout the text. The list of references should be arranged

alphabetically by authors' names and should be as full as possible, listing all authors, the full title of articles and journals, publisher and year. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.

References should be given in the following form:

Ahmed, I. A., & Robinson, R. K. (1999). The ability of date extracts to support the production of aflatoxins. *Food Chemistry*, 66(3), 307-312.

Marasas, W. F. O. (1996). Fumonisin: History, worldwide occurrence and impact. In L. S. Jackson, J. W. DeVries, & L. B. Bullerman, *Fumonisin in food, advances in experimental medicine and biology*, vol. 392 (pp. 1-18). New York: Plenum Press.

Massart, D. L., & Kauffmann, L. (1983). *Interpretation of analytical data by use of cluster analysis*. New York: Wiley.

Noel, S., & Collin, S. (1995). Trans-2-nonenal degradation products during mashing. In *Proceedings of the 25th European brewery convention congress* (pp. 483-490). Oxford: IRL Press.

Citing and listing of web references. As a minimum, the full URL should be given. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The

assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly "Articles in Press" because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*:

doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

Illustrations

Photographs, charts and diagrams are all to be referred to as "Figure(s)" and should be numbered consecutively in the order to which they are referred. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. All illustrations should be clearly marked with the figure number and the author's name. All figures are to have a caption. Captions should be supplied on a separate sheet. Tables should be numbered consecutively and given a suitable caption and each table typed on a separate sheet. Footnotes to tables should be typed below the table and should be referred to by superscript lowercase letters. No vertical rules should be used. Tables should not duplicate results presented elsewhere in the manuscript (e.g. in graphs).

If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please note: Because of technical complications which can arise by converting

colour figures to 'grey scale' (for the printed version should you not opt for colour in print) please submit in addition usable black and white prints corresponding to all the colour illustrations. As only one figure caption may be used for both colour and black and white versions of figures, please ensure that the figure captions are meaningful for both versions, if applicable.

Preparation of electronic illustrations

Submitting your artwork in an electronic format helps us to produce your work to the best possible standards, ensuring accuracy, clarity and a high level of detail.

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Helvetica, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide all illustrations as separate files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions> . **You are urged to visit this site.**

Preparation of Supplementary Data

Elsevier now accepts electronic supplementary material (e-components) to support and

enhance your scientific research. Supplementary files offer the Author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the final version of the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Proofs

When your manuscript is received at the Publisher it is considered to be in its final form. Proofs are not to be regarded as 'drafts'. One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author, to be checked for typesetting/editing. No changes in, or additions to, the accepted (and subsequently edited) manuscript will be allowed at this stage. Proofreading is solely your responsibility. A form with queries from the copy editor may accompany your proofs. Please answer all queries and make any corrections or additions required. The Publisher reserves the right to proceed with publication if corrections are not communicated. Return corrections within two working days of receipt of the proofs. Should there be no corrections, please confirm this.

Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. In order to do this we need your help. When you receive the (PDF) proof of your article for correction, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections will not be possible, so please ensure your first sending is complete. Note that this does not

mean you have any less time to make your corrections, just that only one set of corrections will be accepted. Proofs are to be returned to the Log-in Department, Elsevier Ltd, Bampfylde Street, Exeter, EX1 2AH, UK, fax +44 (0)1392 425370.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Copies of the issue can be ordered at a specially reduced rate using the order form sent to the corresponding author after the manuscript has been accepted.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to transfer copyright (for more information on copyright see <http://authors.elsevier.com>). This transfer will ensure the widest possible dissemination of information. A letter will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript. A form facilitating transfer of copyright will be provided. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: contact Elsevier Ltd., Global Rights Department, The Boulevard, Langford Lane, Oxford, OX5 1GB, UK; phone: (+44) 1865 843830, fax: (+44) 1865 853333, e-mail: permissions@elsevier.com

Author Enquiries

Authors can keep a track on the progress of their accepted article, by visiting <http://www.elsevier.com/trackarticle>. Other questions or queries will also be dealt with via the website <http://authors.elsevier.com>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided when an article

is accepted for publication. Do not contact the editors - they do not have access to this information.

***Food Chemistry* carries no page charges**