



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

**ALFA-AMILASES DO PEIXE AMAZÔNICO TAMBAQUI,
Colossoma macropomum, (CUVIER, 1818), E SUA
COMPATIBILIDADE COM DETERGENTES COMERCIAIS.**

AMÁLIA CRISTINE MEDEIROS FERREIRA

ORIENTADOR: RANILSON DE SOUZA BEZERRA
COORIENTADOR: LUIZ BEZERRA DE CARVALHO JÚNIOR

RECIFE 2014

AMÁLIA CRISTINE MEDEIROS FERREIRA

**ALFA-AMILASES DO PEIXE AMAZÔNICO TAMBAQUI,
Colossoma macropomum, (CUVIER, 1818), E SUA
COMPATIBILIDADE COM DETERGENTES COMERCIAIS.**

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

RECIFE, 2014

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Ferreira, Amália Cristine Medeiros

Alfa-amilases do peixe amazônico tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), e sua compatibilidade com detergentes comerciais / Amália Cristine Medeiros Ferreira. – Recife: O Autor, 2014.

68 f.: il.

Orientadores: Ranilson de Souza Bezerra, Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, 2014.

Inclui bibliografia e anexos

1. Enzimas – Aplicações industriais 2. Tambaqui (Peixe) I Bezerra, Ranilson de Souza (orient.) II. Carvalho Júnior, Luiz Bezerra de (coorient.) III. Título.

572.7

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-249

Amália Cristine Medeiros Ferreira

“ α -Amilase do peixe amazônico tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818),
e sua compatibilidade com detergentes comerciais”

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:

Dr. Ranilson de Souza Bezerra

Dra. Karina Ribeiro

Dr. Augusto César Vasconcelos Freitas Júnior

Dra. Renata Cristina Penha França

Data: 28/02/2014

A você, mãe, dedico não só essa, mas
todas as minhas vitórias.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que de uma forma muito especial, e às vezes até engraçada, aplaina os caminhos por onde ando.

Ao professor Ranilson pela oportunidade de viver um sonho que eu julgava tão distante.

À minha família, por todo incentivo, apoio e amor, em especial aos meus pais, Susi e Zildo, minha irmã Amanda, e nossos amados Soró e Teddy. Às minhas queridas primas e fãs Letícia, Laylla e Lílyan por fazerem minha vida mais feliz através da inocência da nossa amizade.

À minha vó Lia (*in memoriam*), fonte de inspiração que vive dentro de mim, exemplo de garra, que até os últimos momentos de sua vida dedicou-se incondicionalmente à nossa família.

A Diego agradeço imensamente por estar presente, de forma integral, ao longo desses dois anos de mestrado, suavizando a caminhada e, por muitas vezes, fazendo com que eu acreditasse mais em mim.

Aos meus amigos Alice, Betinho, Girllayne, Ítalla, Kaline, Laísa, Lívia, Nany e Nathalia, pelos quais tenho profunda admiração, respeito e amor. Agradeço principalmente pela posição de “família” que ocupam na minha vida, dividindo a casa, a comida, os medos e também as vitórias. À Chrisjacele Araújo por toda força e ajuda inestimável.

Aos professores e eternos mestres Cleideana Bezerra e João da Silva que me conduziram à tão almejada pós-graduação.

À família LABENZ, pelos momentos de ensinamento e descontração partilhados no dia-a-dia, em especial a Marina Marcuschi por toda paciência e orientação.

Agradeço aos amigos da turma de mestrado em Bioquímica e Fisiologia por contribuírem para meu crescimento acadêmico e pessoal, em especial a Thiago David e Cleopatra Silva, verdadeiros amigos conquistados em tão pouco tempo.

Ao departamento de bioquímica da UFPE pela acolhida tão rápida, em especial aos funcionários Djalma, Miron e Sr. João, e à professora Patrícia Paiva, sempre muito solícita.

Agradeço aos membros que compõe a banca avaliadora por disporem do seu tempo para me auxiliar na etapa final desse trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Muitíssimo obrigada!

*“Trago dentro do meu coração,
Como num cofre que se não pode fechar de cheio,
Todos os lugares onde estive,
Todos os portos a que cheguei,
Todas as paisagens que vi
através de janelas ou vigias,
Ou de tombadilhos, sonhando,
E tudo isso, que é tanto,
é pouco para o que eu quero”.*

Fernando Pessoa

RESUMO

A α -amilase é uma endocarboidrase que atua na hidrólise de ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$ presentes em polissacarídeos como o amido e glicogênio, gerando como produtos oligossacarídeos, dextrinas e maltose. Esta enzima corresponde à segunda classe de enzimas mais utilizadas na indústria, apresentando diversas aplicações biotecnológicas, principalmente nas indústrias alimentícia e de detergentes. A α -amilase é encontrada em diversos organismos, e pode ser obtida através de bactérias, fungos e tecidos animais e vegetais. Com o intuito de reduzir o impacto causado pelo avanço da indústria pesqueira, essas e outras classes de enzimas vêm sendo extraídas através do reaproveitamento dos resíduos pesqueiros. Neste trabalho, α -amilases foram obtidas através dos cecos pilóricos e intestinos do tambaqui, *Colossoma macropomum*, caracterizadas e avaliadas quanto ao seu uso como aditivo de limpeza em detergentes comerciais. Para isso, o extrato bruto obtido foi submetido a fracionamento salino utilizando sulfato de amônio, a fração 30-60% apresentou maior atividade, foi em seguida dialisada e aplicada a uma coluna de cromatografia p-aminobenzamidine-agarose (Sigma®). Após esse processo de purificação, foram realizados zimogramas e eletroforese SDS-PAGE, os resultados obtidos sugerem uma purificação parcial, e presença de isoformas. As α -amilases apresentaram atividade ótima no pH 7.0 e 8.5, respectivamente para AMY-1 (intestinos) e AMY-2 (cecos pilóricos). Foram termoestáveis durante 30 minutos a 40°C, e apresentando temperatura ótima de 40 e 45°C, respectivamente. As α -amilases foram fortemente inibidas pelos íons Hg^{+3} e Cu^{+2} . Quanto ao seu uso como aditivo de detergentes, as α -amilases extraídas do tambaqui, foram significativamente estáveis durante incubação de 60 minutos com agente oxidante (H_2O_2 15%), surfactantes coleato de sódio, tween 20, tween 80 e SDS, sendo também compatíveis e estáveis com todas as marcas de sabão utilizadas neste trabalho. Estes resultados sugerem que estas enzimas possuem potencial aplicação na indústria de detergentes, podendo ser utilizadas como aditivo de limpeza. Adicionalmente, pode-se concluir que o reaproveitamento dos resíduos do tambaqui corresponde a uma fonte inovadora de α -amilase com alta atividade e aplicabilidade industrial.

Palavras-chave: resíduo pesqueiro; tambaqui; α -amilase; detergentes comerciais.

ABSTRACT

The α -amylase is an endo-acting enzyme engaged in the hydrolysis of glycosidic α (1 $\rightarrow$ 4) present in polysaccharides such as starch and glycogen, yielding products such as oligosaccharides, dextrins and maltose. This enzyme corresponds to the second class of enzymes most commonly used in industry, having several biotechnological applications especially in the food and detergent industries. The α -amylase is found in various organisms and may be obtained from bacteria, fungi and animal and vegetal tissues. In order to reduce the impact caused by the advance of the fishing industry, these and other classes of enzymes have been extracted through the reuse of fish waste. In this paper, α -amylase were obtained from the pyloric caeca and intestines tambaqui (*Colossoma macropomum*) characterized and evaluated for its use as an additive in commercial cleaning detergents. For this, the crude extract was subjected to salt fractionation using ammonium sulfate, fraction 30-60% higher activity was then dialyzed and applied to a p-aminobenzamidine-agarose (Sigma®) column chromatography. After this purification process, zymograms and SDS-PAGE were performed, the results suggest a partial purification, and presence of isoforms. The α -amylase showed maximum activity at pH 7.0 and 8.5, respectively for AMY-1 (intestines) and AMY-2 (pyloric caeca). Was thermostable for 30 min at 40 ° C, and showing optimum temperature of 40 to 45 ° C, respectively. The α -amylase were strongly inhibited by ions Hg^{+3} and Cu^{+2} . As to its use as an additive for detergents, the α -amylases derived tambaqui were significantly stable during 60 min incubation with the oxidizing agent (H_2O_2 15%), sodium lauryl sulfates, Tween 20, Tween 80 and SDS, and also compatible and stable with all brands of soap used in this work. These results suggest that these enzymes have potential application in laundry detergents, which can be used as cleaning additive. Additionally, it can be concluded that the reuse of waste tambaqui corresponds to a novel source of α -amylase activity, and high industrial applicability.

Keywords: fisheries waste; tambaqui; α -amylase; commercial detergents.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Produção de pescado (t) da aquicultura continental entre 2009 e 2011.....	13
Figura 2 – Produção da aquicultura continental por região.....	14
Figura 3 – Produção da aquicultura continental por espécie.....	14
Figura 4 - Produtos que podem se obtidos através do processamento do pescado.....	16
Figura 5 – tambaqui, <i>Colossoma macropomum</i>	17
Figura 6 - Trato digestório do tambaqui.....	18
Figura 7 - Ligação de um substrato no sítio ativo de uma quimiotripsina. Alguns dos resíduos chave do sítio ativo aparecem como uma mancha vermelha na superfície da enzima.....	20
Figura 8 – Estrutura tridimensional da α -amilase.....	22
Figura 9 – Mecanismo de deslocamento duplo.....	25

SUMÁRIO

	Página
1. Introdução.....	10
2. Fundamentação Teórica.....	12
2.1 Aquicultura Brasileira.....	12
2.1.1 <i>Colossoma macropomum</i>	17
2.2 Enzimas.....	19
2.2.1 α -Amilases.....	21
2.3 Aplicações Biotecnológicas da α -Amilase.....	25
2.3.1 α -Amilase como Aditivo de Detergentes Comerciais.....	25
3. Referências Bibliográficas.....	28
4. Objetivos	
4.1 Geral.....	39
4.2 Específicos.....	39
5. Artigo.....	40
6. Conclusões.....	57
6. Anexos	58

1. INTRODUÇÃO

Há muito tempo o homem utiliza enzimas para catalisar uma série de reações, essas são as proteínas mais notáveis e especializadas que desempenham o papel de catalisadores nas diversas reações bioquímicas. Essas biomoléculas já eram utilizadas na indústria para acompanhar reações químicas fora da célula, muito antes de se entender sua natureza e função (LEADLAY, 1993). A tecnologia enzimática corresponde a um dos campos mais promissores dentro das novas técnicas para síntese de compostos de alto valor agregado, pois oferece menor impacto ambiental e também menor consumo energético, uma vez que as enzimas são biodegradáveis e sendo altamente específicas minimizam os efeitos indesejáveis. Entre as enzimas produzidas por técnicas biotecnológicas, aquelas com atividade amilolítica apresentam um papel importante em diversos setores industriais (MITIDIERI, 2002).

A α -amilase [EC 3.2.1.1] é uma endocarboidrase encontrada em vários organismos, como animais, vegetais, fungos e bactérias. Ela é responsável por hidrolisar ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$ presentes em macromoléculas de amido e glicogênio, gerando como produtos oligossacarídeos, α -dextrinas e maltose (VAN WORMHOUDT e FAVREL, 1988; ARAI, et al., 1991). Essas enzimas representam aproximadamente 25% do mercado enzimático mundial, sendo a mais importante forma de amilase industrial (GUPTA, 2003).

Dentre os vários setores onde esta enzima é utilizada, destacam-se a hidrólise do amido, produção de bioetanol, produção de açúcar e cerveja, indústrias têxtil e curtume, indústria alimentícia, e na formulação de detergentes como aditivo de limpeza (VAN DER MAAREL et al., 2002).

Cerca de 40% das enzimas industriais produzidas em todo o mundo são aplicadas no mercado de detergentes, este representa uma das aplicações industriais mais bem sucedidas no campo da biotecnologia moderna (IGARASHI et al., 2003). As α -amilases são a segunda classe de enzimas mais utilizadas na formulação de detergentes, estando presente na composição de 90% dos detergentes líquidos (MITIDIERI et al., 2006). Os detergentes enzimáticos são superiores aos detergentes comuns porque agem de forma específica, atuando na limpeza completa dos materiais e na remoção de detritos e sujeiras, especialmente sob matéria orgânica, tendo como consequência a diminuição de grande parte dos microrganismos presentes, além de dispensar o uso de produtos cáusticos na sua composição (BON, 2008).

As α -amilases aplicadas na indústria de detergentes, na sua maioria, são produzidas por micro-organismos, principalmente bactérias. No entanto, é importante investigar novas fontes dessas enzimas, com a finalidade de descobrir novas formas de amilases e também buscar redução nos custos de produção.

Os insumos do processamento do pescado representam uma importante fonte de biomoléculas com potencial aplicação industrial, além do mais, devido à expansão na produção e processamento do pescado, a aquicultura tem gerado uma grande quantidade de resíduos. Entre esses, as vísceras são reconhecidas como uma potencial e importante fonte de enzimas digestórias, principalmente proteases e amilases 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). No intuito de diminuir o ônus ambiental causado pela indústria pesqueira, esses resíduos podem ser utilizados como fonte de moléculas bioativas (SHAHIDI e JANAKKAMIL, 2001; ASPMO et al, 2005).

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é a principal espécie nativa cultivada no Brasil, sendo a segunda mais produzida em âmbito nacional (MPA, 2013). Pertencente à família Characidae, este peixe pode atingir até 108 cm e pesar até 30,0 kg. O tambaqui corresponde a uma importante fonte de proteína animal, havendo alta aceitação no mercado devido ao sabor e vida útil da sua carne (ALMEIDA et al., 2006). Estudos abordando as enzimas desse animal reportam o uso dessas biomoléculas em diversos setores. Proteases alcalinas extraídas das vísceras apresentaram características que apontam sua utilização na indústria de detergentes e alimentos; acetilcolinesterases extraídas do cérebro foram aplicadas como biomarcadores de pesticidas (BEZERRA et al., 2001; ASSIS et al., 2007; ESPÓSITO et al., 2009; MARCUSCHI et al., 2010). No entanto, não foram encontrados estudos visando a purificação e aplicação de α -amilases desse peixe na indústria.

Compatibilizar o desenvolvimento econômico com a proteção do meio ambiente, mediante o uso racional dos recursos naturais, é o objetivo central destas novas abordagens industriais, que com o auxílio da biotecnologia buscam a promoção de processos industriais mais eficazes e que minimizem o dano ambiental (BON, 2008).

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Aquicultura Brasileira

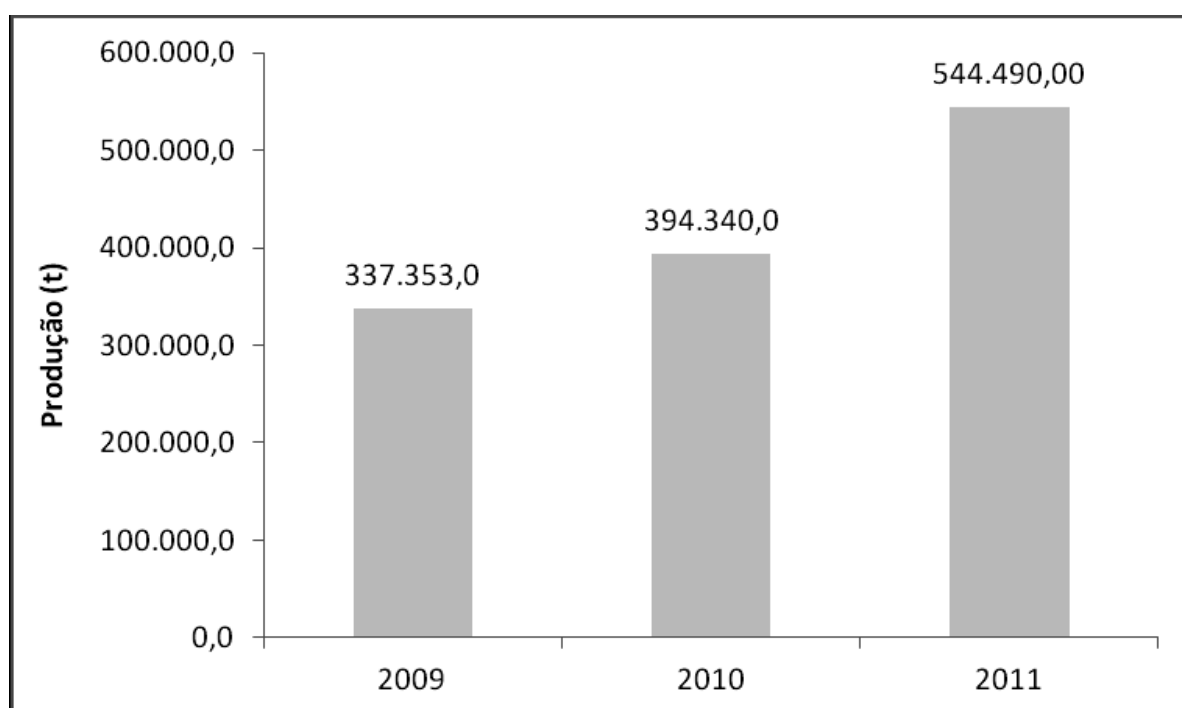
A aquicultura é o cultivo ou criação de organismos cujo ciclo de vida se desenvolve em condições naturais, total ou parcialmente em meio aquático (FAO, 2012). Essa atividade corresponde ao setor da agropecuária brasileira com maior expansão nos últimos anos (FIGUEIREDO *et al.*, 2008), tornando-se uma importante alternativa para a produção de pescado, tanto em área continental como marinha, e envolve a produção de peixes, crustáceos, moluscos, algas e anfíbios (IBAMA, 2008; SANTOS, 2009). Com o aumento da exploração indiscriminada dos estoques pesqueiros naturais, a aquicultura se tornou uma alternativa importante para regularizar a demanda por alimento, e com este desenvolvimento a atividade entrou em franca expansão (CAMARGO e POUEY, 2005).

O Brasil possui um enorme potencial para o desenvolvimento de atividades aquícolas, pois abrange 12% de toda a água doce do planeta, com 7.367 km costeiros, 5,5 milhões de hectares de água doce, 3,5 milhões de hectares de águas represadas em reservatórios de hidrelétricas. Apresenta clima preponderantemente tropical, é autossuficiente na produção de grãos, possui a maior bacia hidrográfica do mundo, a Bacia Amazônica, com 3.984,467 km² em território brasileiro, exibindo abundância de água doce em praticamente todas as regiões do país (OSTRENSKY *et al.*, 2008). Possui a maior fauna de peixes de água doce do mundo, correspondendo a 3.000 espécies conhecidas, um total três vezes maior que o encontrado em outros países (IBAMA, 2013). Por apresentar imenso complexo hidrográfico e clima favorável, o Brasil exibe inúmeras vantagens para o desenvolvimento de organismos aquícolas cultivados (FERREIRA, 2007). Entretanto, a implantação comercial da aquicultura no Brasil é relativamente recente. Apesar de ter sido iniciada em 1930, esta atividade só começou a se intensificar a partir de 1970 e, na década de 90 ela se tornou economicamente significativa dentro do cenário nacional, incluindo a piscicultura como uma atividade econômica na produção de alimentos (SEAP, 2003; FERREIRA, 2007).

De acordo com dados da FAO, a produção aquícola brasileira teve início em 1968, quando foram reportadas menos de 0,5 t. Desde então, a aquicultura nacional tem mostrado um crescimento gradual, atingindo em 2003 um pico de produção de 273.268 t. Após uma pequena queda nos anos de 2004 e 2005, a produção retomou o crescimento, registrando altos valores em 2008, 2009 e 2010, com 365.367 t, 415.649 t e 479.399 t, respectivamente. Em

2011, a produção nacional foi de 628.704,3 t, onde é possível observar o evidente o crescimento deste setor no país, com um incremento de 51,2% na produção durante o triênio 2009-2011. O crescimento desta modalidade pode ser atrelado ao desenvolvimento do setor, que por sua vez, se deu pela ampliação de políticas públicas que facilitaram o acesso aos programas governamentais existentes, tais como o Plano Mais Pesca e Aquicultura desenvolvido pelo MPA (MPA, 2010; 2013).

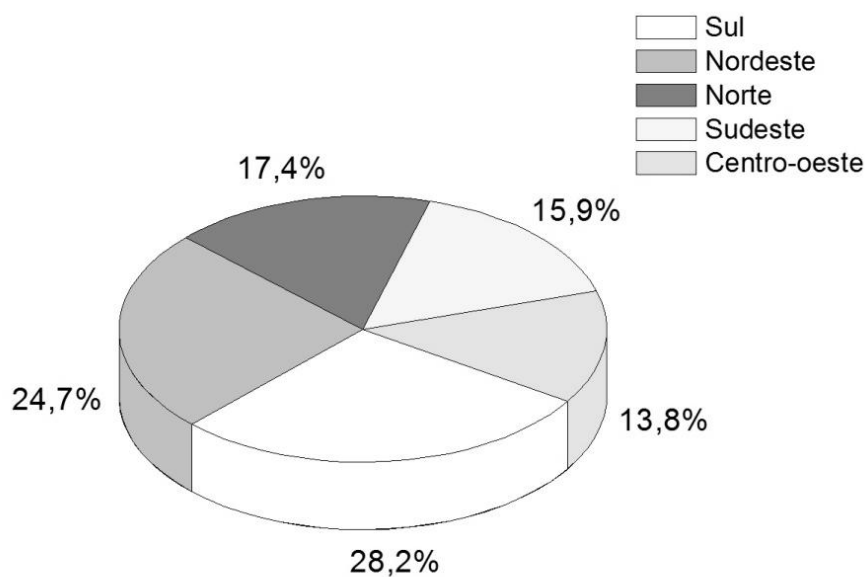
Figura 1- Produção de pescado (t) da aquicultura continental entre 2009 e 2011.



Fonte: MPA, 2013.

A maior parcela da produção aquícola é oriunda da aquicultura continental (figura 1), onde se destaca a piscicultura que em 2011 produziu o equivalente a 86,6% da produção nacional. Considerando os dados da aquicultura continental brasileira, a região Sul é a maior produtora de pescado, sendo responsável por 28,2% de toda a produção nacional, o que corresponde a 153.674,5t de pescado. Em seguida, temos a região Nordeste com 135.292,6 t, Norte com 94.578 t, Sudeste com 86.837 t e Centro-Oeste com produção de 75.107,9 t.

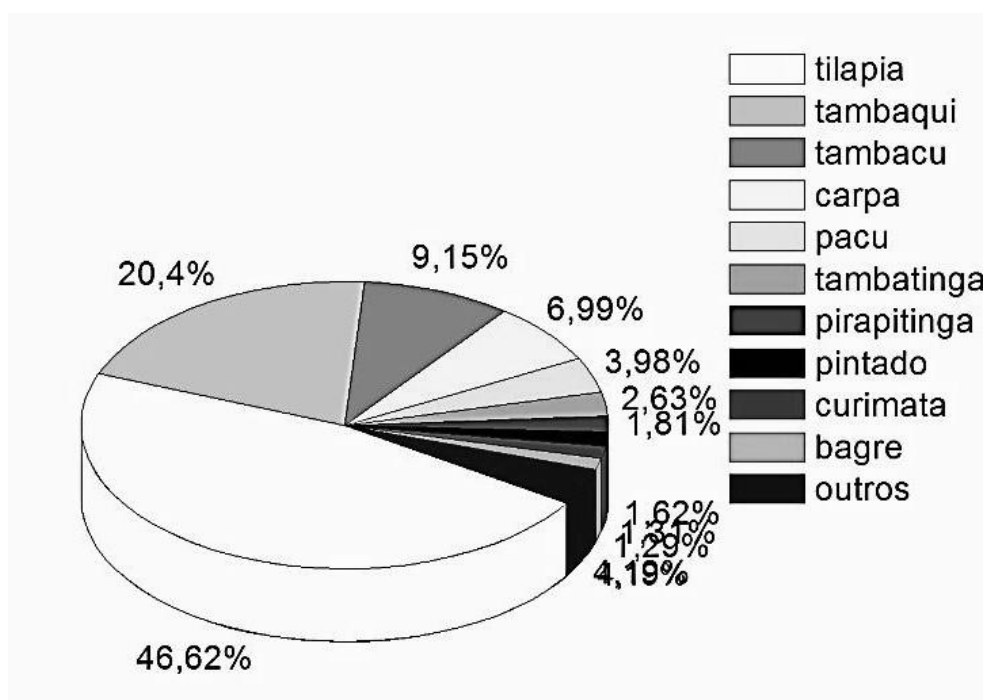
Figura 2- Produção da aquicultura continental por região.



Dados: MPA, 2013.

Entre as espécies de peixes mais cultivadas no país, destacam-se a tilápia (*Oreochromis niloticus*), o tambaqui (*Colossoma macropomum*) e o híbrido tambacu com produção em 2011 de 253.824,1 t, 111.084,1 t e 49.818 t, respectivamente (MPA, 2013).

Figura 3- Produção da aquicultura continental por espécie.

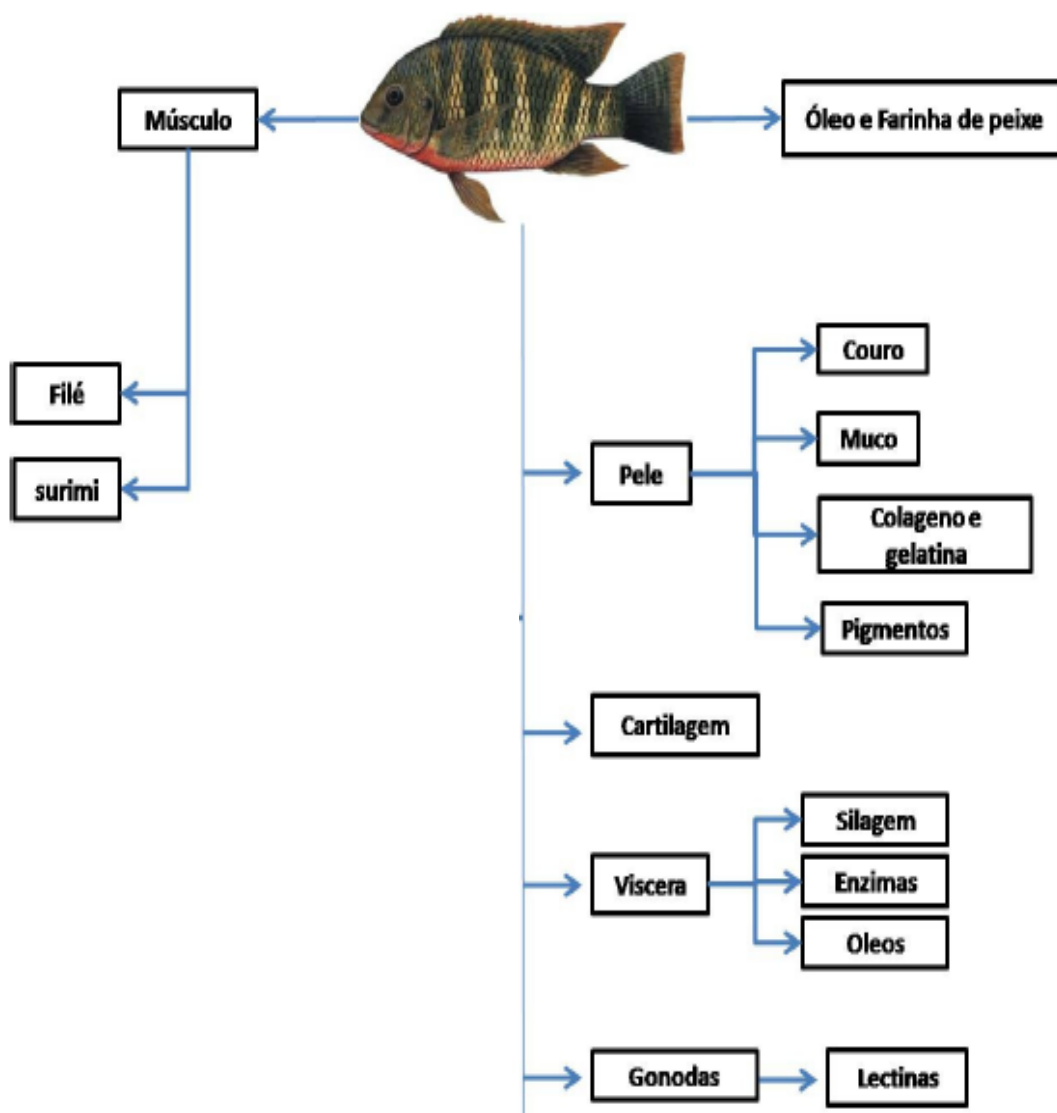


Dados: MPA, 2013.

Com o crescimento da aquicultura e, conseqüentemente, do volume de pescado processado mundialmente, a indústria pesqueira tem gerado grande quantidade de resíduo e subprodutos. Segundo Arruda (2004), cerca de 50% do pescado produzido é descartado na forma de resíduo. Considerando que em 2010 foram produzidas 154.000.000t de pescado no mundo (FAO, 2012), isso equivaleria a 77 milhões de toneladas de resíduos, uma significativa fonte de desperdício de recursos e de contaminação ambiental. Assim, preocupados com problemas ambientais, pesquisadores em todo o mundo vêm desenvolvendo diversos esforços para obtenção de métodos que possibilitem a transformação desses resíduos em produtos passíveis de utilização na indústria e na nutrição humana e animal (MARTONE *et al.*, 2005).

Os animais aquáticos representam uma importante fonte de biomoléculas, como carotenoides (SANTOS, 2006), quitina e quitosana (SHAHIDI e JANAKKAMIL, 2001; KIM e MENDIS, 2006), colágeno (HWANG *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2007; NALINANON *et al.*, 2007), gelatina (GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2007), peptídeos bioativos com atividade anti-hipertensiva, antitrombótica, imunomoduladora e antioxidante (KIM e MENDIS, 2006) e enzimas. Assis *et al.* (2007) extraíram acetilcolinesterase de cérebro de tambaqui e a aplicaram na detecção de inseticidas. Várias proteases foram extraídas e purificadas de diversas espécies de peixe mostrando características interessantes para diversas aplicações (BEZERRA *et al.*, 2001; ALENCAR *et al.*, 2003; BEZERRA *et al.*, 2005; KLOMKLAO *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2007; ESPÓSITO *et al.*, 2009-a, 2009-b), incluindo a degradação de tecidos, extração de pigmentos, coagulação de proteínas, manejo de resíduos, amaciamento de carnes, extração de óleo de peixe, produção de ômega-3, ação antioxidante e antibacteriana (SHAHIDI e KAMIL, 2001), formulação de detergentes (ESPÓSITO *et al.*, 2009), e produção de hidrolisado proteico (ASPMO *et al.*, 2005).

Figura 4- Produtos que podem se obtidos através do processamento do pescado.



Fonte: BLANCO *et al.*, 2007.

Entre os subprodutos, as vísceras são reconhecidas como uma potencial e importante fonte de enzimas digestivas, principalmente proteases e amilases com alta atividade e que atuam em uma ampla faixa de pH e condições de temperatura (GILDBERG, 1992; CANCRE *et al.*, 1999; SHAHIDI JANAK e KAMIL, 2001). A recuperação de enzimas a partir de subprodutos da pesca é de grande importância uma vez que enzimas digestivas de baixo custo poderiam promover novas aplicações industriais, além de evitar o descarte desses insumos no meio ambiente (KLOMKLAO *et al.*, 2008).

2.1.1 *Colossoma macropomum* (tambaqui)

O tambaqui, *Colossoma macropomum* (Curvier, 1818) (fig. 5), é um peixe de piracema nativo das bacias dos rios Solimões, Amazonas e Orinoco, amplamente distribuído na parte tropical da América do Sul e na Amazônia Central, e muito apreciado por seu sabor, sendo importante fonte de proteína animal. Atualmente, com o desenvolvimento das pisciculturas, o tambaqui é criado e difundido em diversas regiões do Brasil e do continente sul-americano (ARAÚJO-LIMA e GOULDING, 1997; BRASIL, 2010). Esta espécie nativa do Brasil é considerada como o segundo maior peixe de escamas de água doce da América do Sul, atrás apenas do pirarucu, *Arapaima gigas* (FISHBASE, 2013), e está classificada taxonomicamente da seguinte forma, segundo Nelson (1984):

REINO Animalia

SUB-FILO Vertebrata

SUPER-CLASSE Pisces ou Teleostomi

CLASSE Osteichthyes

SUB-CLASSE Actinopterygii

ORDEM Characiformes

FAMÍLIA Characidae

SUB-FAMÍLIA Serrasalminae

GÊNERO *Colossoma*

ESPÉCIE *Colossoma macropomum*

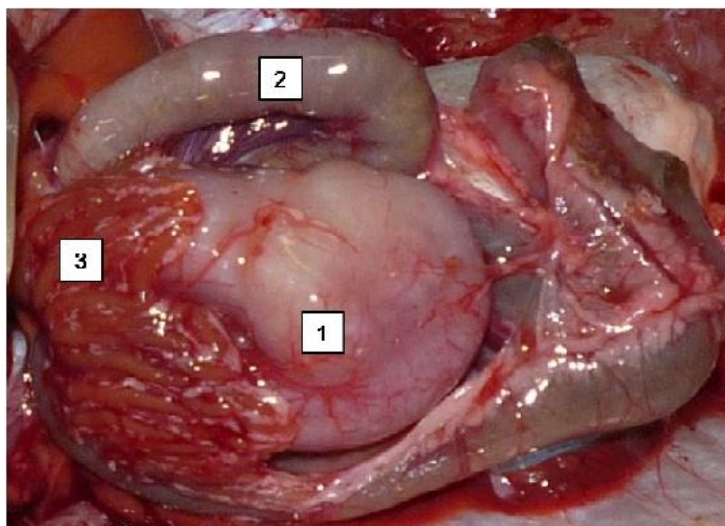
Figura 5- tambaqui, *Colossoma macropomum*.



Fonte: <http://www.fishbase.org>.

O tambaqui possui hábito alimentar onívoro, filtrador e frugívoro (NUNES *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2007b). A presença de dentes molares e afiados possibilita ao tambaqui consumir frutos e sementes, mesmo que estes estejam protegidos e recobertos com cascas fibrosas e duras. Além disso, essa espécie possui um elevado número de rastros branquiais que viabilizam o processo de filtragem de zooplâncton (VIDAL JÚNIOR *et al.*, 1998). A característica mais relevante das espécies do gênero *Colossoma* é a presença de um grande número de cecos pilóricos, que variam de 30 a 40, mas podendo chegar até a 75 (HONDA, 1974 apud MACHADO-ALLISON, 1982). Este órgão tem função similar ao pâncreas de outros vertebrados, sendo responsável pela produção de enzimas alcalinas (ZEDZIAN; BARNARD, 1967). O tambaqui possui um perfil de enzimas para cada secção do trato gastrointestinal. Estudos observaram a predominância e aumento de proteases no estômago de indivíduos alimentados com alto nível de proteína. As lipases e amilases foram encontradas em todo o trato, havendo uma maior produção de amilases pelos cecos pilóricos. Foi constatado ainda um alto poder de adaptação desse animal, podendo haver mudanças no perfil enzimático digestivo de acordo com a qualidade do alimento ingerido (ALMEIDA *et al.*, 2006).

Figura 6- Trato digestório do tambaqui. 1- estômago, 2- intestino, 3- cecos pilóricos.



Fonte: MARCUSCHI, 2010-a.

Dados estatísticos da produção nacional dessa espécie apontam para um contínuo crescimento, partindo de 8.000 t em 1994 para 111.084,1 t em 2011 (BRASIL, 2010; MPA, 2013).

Este animal apresenta alta capacidade adaptativa, sendo bastante resistente à doenças. Quanto às características ambientais, ele tolera águas com baixa concentração de oxigênio (SILVA *et al.*, 2007) e com pH ácido (entre 3,8 e 4,9), como as do rio Negro (ARIDE *et al.*, 2007). É a primeira espécie sobre a qual se conhece o suficiente de modo a manejar os estoques naturais e promover sua criação em cativeiro de forma bastante produtiva (ARAÚJO-LIMA e GOULDING, 1997).

Estudos abordando essa espécie vêm sendo desenvolvidos há cerca de 15 anos pelo Laboratório de Enzimologia da Universidade Federal de Pernambuco - LABENZ - (BEZERRA *et al.*, 2000; 2001; ESPÓSITO *et al.*, 2009-a; 2009b; ASSIS *et al.*, 2007; 2010; 2012; MARCUSCHI *et al.*, 2010-b; CARVALHO, *et al.*, 2012), estes abrangem a composição alimentar das rações, obtenção de subprodutos através do processamento dos resíduos, como por exemplo, colágeno e lectinas com atividade antimicrobiana, e também estudo do perfil enzimático do animal, visando técnicas de purificação e caracterização para que essas proteínas possam ser aplicadas em diversos setores industriais.

2.2 Enzimas

As enzimas são as proteínas mais notáveis e especializadas presentes em todos os organismos vivos. Esses catalisadores biológicos estão no centro de cada um dos processos bioquímicos e apresentam um poder catalítico extraordinário, sendo essenciais tanto para a manutenção, quanto para o crescimento e a diferenciação celular. Exceto por um pequeno grupo de moléculas de RNA catalíticas, todas as enzimas são proteínas. (GUPTA *et al.*, 2002; NELSON e COX, 2011).

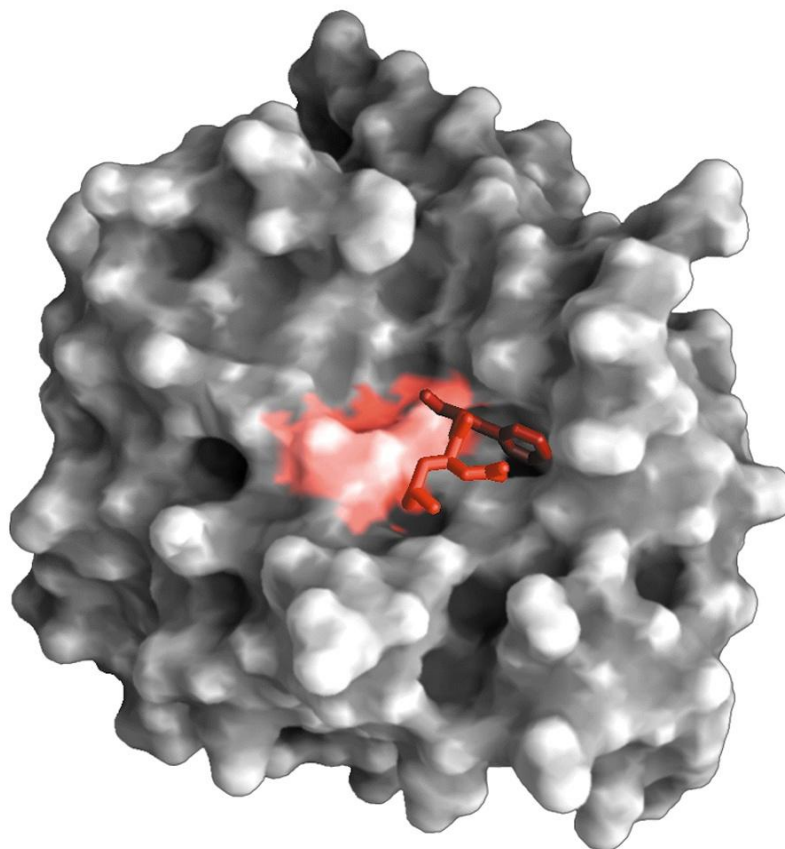
Durante o curso da evolução, as enzimas desenvolveram-se para diminuir seletivamente as energias de ativação das reações necessárias para a sobrevivência. A ação catalítica das enzimas aumenta a velocidade da reação sem afetar seu equilíbrio. Essas biomoléculas são mais eficientes do que catalisadores sintéticos ou inorgânicos, pois apresentam maior especificidade pelo substrato, originam menos subprodutos indesejados, aumentam muito mais a velocidade de reação e, em geral, não exigem temperaturas, pressão ou pH extremos para atuar (VOET *et al.*, 2000; NELSON e COX, 2011).

A catálise enzimática tem sido utilizada pelo homem há milhares de anos, em processos tais como a fermentação do suco da uva para obtenção do vinho e fabricação de

queijos e pães, embora a elucidação química dessas moléculas e de sua ação tenha ocorrido apenas no século XIX.

As reações catalisadas por enzimas ocorrem em uma fenda denominada sítio ativo (figura 7), esta região tem sua superfície delimitada por resíduos de aminoácidos que envolvem e catalisam a transformação química do substrato em seus respectivos produtos.

Figura 7- Ligação de um substrato no sítio ativo de uma quimi tripsina. Alguns dos resíduos chave do sítio ativo aparecem como uma mancha vermelha na superfície da enzima.



Fonte: NELSON e COX, 2011.

A IUBMB (União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular) dividiu as enzimas em seis grandes classes, de acordo com a reação química catalisada por elas:

Tabela 1 – 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. Liasas	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, 2011.

2.2.1 α -Amilase

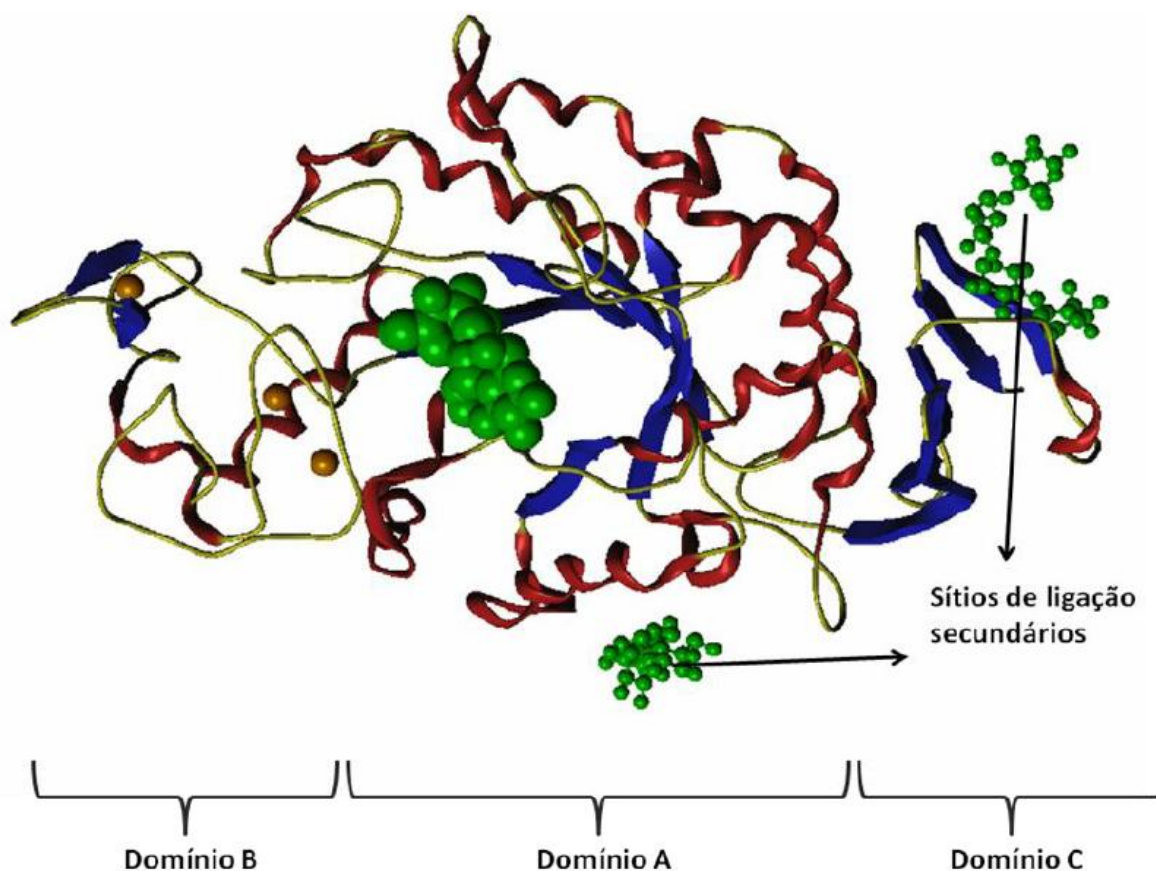
As amilases são enzimas amplamente encontradas nos tecidos de animais, plantas, fungos, leveduras e bactérias. De acordo com o tipo de reação e os polissacarídeos produzidos através de sua catálise, elas podem ser classificadas em: α , β e γ -amilase (ARAI *et al.*; GASPERICK *et al.*; NIKOLOV e REILLY, 1991).

A família da α -amilase, ou família 13 glicosil hidrolase, de acordo com a classificação de Henrissat (1991), é constituída por cerca de 30 enzimas, que se distinguem através de propriedades específicas, sejam elas no sítio ativo ou mesmo na conformação geral da enzima (VAN DER MAAREL *et al.*, 2002). Existem cerca de 20 reações diferentes e produtos específicos encontrados nessa família (PANDEY, 2000; ACHREJOWICZ e WOJCÍK, 2000; JANECEK *et al.*, 2003).

A α -amilase [EC 3.2.1.1] é uma endocarbohidrase responsável pela hidrólise de ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$ presentes no amido e glicogênio. Nesse processo são produzidos maltose, maltotriose e oligossacarídeos maiores a partir da amilose; maltose, glicose e dextrinas através da amilopectina (WILD, 1964).

Essas enzimas apresentam estrutura tridimensional altamente conservada, havendo homologia entre amilases de diferentes fontes. Sua conformação básica consiste de uma cadeia polipeptídica única dobrada em três domínios: A, B, e C (FRIFEDBERG, 1983; PRAKASH & JAISWAL, 2010).

Figura 8 – Estrutura tridimensional da α -amilase.



Fonte: Adaptada de MÓTYÁN *et al.*, 2011.

O domínio catalítico A é o mais conservado entre as famílias de α -amilases, este é formado por um barril N-terminal com dobramento simétrico de oito fitas- β paralelas arranjadas em um barril circulado por oito α -hélices (PRAKASH & JAISWAL, 2010). Neste barril se encontram quatro regiões relacionadas ao sítio ativo, são elas:

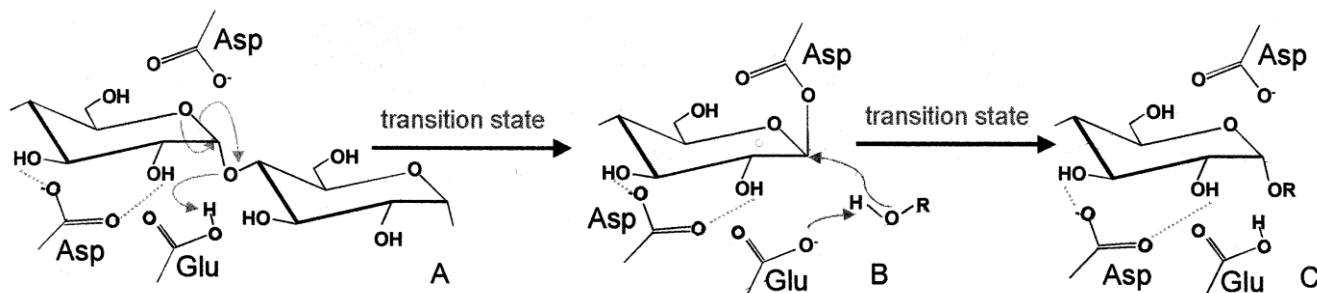
- Primeira região – resíduo de histidina na região C-terminal da terceira fita- β que interage com o resíduo de glicose do substrato;
- Segunda região – resíduo de ácido aspártico na quarta fita- β que age como nucleofílico durante a catálise;
- Terceira região – resíduo de ácido glutâmico na quinta fita- β que age como doador/aceptor de prótons;
- Quarta região – resíduo de histidina e ácido aspártico na sétima fita- β que podem formar pontes de hidrogênio com a molécula de glicose do substrato (VAN DER MAAREL *et al.*, 2002).

O domínio B está localizado entre a terceira fita- β e a terceira α -hélice do barril, sendo formado por uma estrutura irregular rica em folhas- β . Sua função está relacionada à especificidade da enzima, uma vez que o mesmo forma grande parte da ligação com o substrato, conferindo flexibilidade à molécula (JANECEK *et al.*, 1997). O domínio C atua na estabilização do domínio catalítico e na ligação com o substrato, este representa a região C-terminal, sendo constituído por um sanduíche- β (MACGREGOR, 1988).

Estudos que investigaram a ação catalítica da α -amilase reportam que essas enzimas atuam através de um mecanismo de dupla substituição. Este envolve dois resíduos catalíticos encontrados no sítio ativo: um resíduo de ácido glutâmico, que age como catalisador ácido/básico, e um resíduo de aspartato, que tem caráter nucleofílico. Essa catálise se dá através de cinco passos descritos abaixo:

1. Após o substrato se ligar no sítio ativo, há a protonação do oxigênio da molécula de glicose pelo doador de prótons, enquanto que o resíduo de aspartato nucleofílico ataca o C1 da molécula de glicose;
2. É formado um estado de transição oxocarbono, seguido pela formação de um intermediário covalente;
3. A molécula de glicose protonada deixa o sítio ativo, enquanto que uma molécula de água ou uma nova unidade de glicose se move dentro do sítio ativo e ataca a ligação covalente entre o C1 da glicose e o resíduo de aspartato;
4. Novamente é formado um estado de transição;
5. Há a ativação de uma molécula de água pelo doador de prótons, o resíduo de glutamato, que está desprotonado. Essa molécula de água ativada hidrolisa então a ligação covalente entre o oxigênio nucleófilo e o carbono C1 da glicose, completando, assim, o ciclo catalítico.

Figura 9 – Mecanismo de catálise da α -amilase.



Fonte: VAN DER MAAREL *et al.*, 2002.

O mecanismo de deslocamento duplo, proposto por Koshland (1953), mostra apenas dois dos três resíduos catalíticos desempenhando um papel direto na catálise. O terceiro resíduo de AA conservado se liga a grupos OH do substrato por meio de pontes de hidrogênio e desempenha um papel importante na degradação do substrato (UITDEHAAG *et al.*, 1999). Outros resíduos de aminoácidos podem ser encontrados na catálise das α -amilases, como histidina, arginina e tirosina. Estes atuam posicionando corretamente o substrato no sítio ativo, além auxiliar na estabilização do estado de transição e na polarização da estrutura de elétrons do substrato (NAKAMURA *et al.*, 1993; LAWSON *et al.*, 1994; STROKOPYTOV *et al.*, 1996; UITDEHAAG *et al.*, 1999). Uma quinta região pode ser identificada em algumas enzimas da família da α -amilase (JANECEK, 1992; 1995), esta região também contém um resíduo de aspartato que atua como ligante de cálcio.

Amilases de origem animal, na sua maioria, apresentam atividade ótima entre 30 e 50°C e na faixa de pH 7.0 - 7.2, apresentando maior tolerância a meios alcalinos do que ácidos. Sua atividade decresce com o tempo, com o aumento de temperatura e concentração de pequenos sacarídeos como glicose e maltose, que inibem sua ação hidrolítica (SHERMAN *et al.*, 2005). Diferenças na atividade da α -amilase também podem resultar através das propriedades do substrato digerido. Estudos que avaliaram a ação da α -amilase pancreática de porco sobre amido de várias fontes vegetais encontraram diferentes graus de hidrólise, o que sugere que a atividade amilolítica depende da organização das estruturas de amilose e amilopectina presentes no substrato ao qual a enzima é exposta (PRINGSHEIM e GINSBURG, 1936).

Em vertebrados superiores, as enzimas podem se apresentar distintamente, exibindo claramente suas áreas funcionais. Nos peixes, isto não é mostrado de forma clara, uma vez que as mesmas podem estar distribuídas ao longo do trato digestório (LUNDSTEDT *et al.*, 2004). Elas também podem ser influenciadas pela idade e a espécie do animal, bem como pela quantidade e composição da dieta ministrada (PEREZ *et al.*, 1998). A atividade da amilase, em geral, foi considerada por vários autores sendo mais dependente de hábitos nutricionais que a atividade proteolítica. Sabe-se que peixes herbívoros e onívoros, como o tambaqui, apresentam atividade amilolítica maior que peixes carnívoros (HIDALGO *et al.*, 1999). Enzimas como as amilases e lipases são menos estudadas quando comparadas às proteases, entretanto alguns autores relataram a presença de uma atividade palpável destas enzimas no trato digestório de peixes (NAGASE, 1964; CHIU e BENITEZ 1981; UGWUMBA, 1993; PELLETIER *et al.*, 1994; HIDALGO *et al.*, 1999; FERNÁNDEZ *et al.*, 2001; BLIER *et al.*, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2006; DEBNATH *et al.*, 2007).

Essas enzimas possuem grande importância industrial, exibindo várias aplicações, que vão desde a indústria alimentícia à produção de biocombustíveis. Uma vez que cada aplicação diferente requer amilases com propriedades específicas, se torna necessária a busca por novas fontes destas enzimas (GUPTA *et al.*, 2003).

2.3 Aplicações biotecnológicas de α -amilases

Nos peixes, as enzimas digestivas desempenham o papel principal na hidrólise de proteínas, carboidratos e lipídios possibilitando a formação de unidades pequenas desses nutrientes para absorção (FURNÉ *et al.*, 2005). Essas enzimas digestivas vêm sendo purificadas, semipurificadas, caracterizadas a partir das vísceras e reportadas na literatura como biomoléculas de grande potencial para diversas aplicações tecnológicas (KISHIMURA *et al.*, 2006; 2008; ESPÓSITO *et al.*, 2009a; 2009b).

A α -amilase corresponde a aproximadamente 25% do mercado enzimático mundial, o que torna essas enzimas tão interessantes é o fato de que a maioria dessas proteínas apresentam atividade biológica em condições adversas de pH e temperatura (REDDY *et al.*, 2003; SIVARAMAKRISHNAN *et al.*, 2006; KLOMKLAO, 2008). Essas enzimas começaram a ser produzidas no começo do século passado em decorrência do interesse industrial da produção de glicose a partir de materiais amiláceos. Amilases termoestáveis vêm gradativamente substituído a hidrólise química na indústria de amido (PANDEY *et al.*, 2000), e apresenta ainda extensas aplicações comerciais na produção de açúcar e cerveja (LEVEQUE *et al.*, 2000), nas indústrias têxteis e curtume (HENDRIKSEN *et al.*, 1999), na fabricação de detergentes (LIN *et al.*, 1998), na indústria alimentícia e produção de biocombustível (CURVELO-SANTANA *et al.*, 2008).

2.3.1 α -Amilases como aditivo em detergentes comerciais

A indústria de detergentes consome cerca de 40% da produção mundial de enzimas, representando uma das maiores e mais sucedidas aplicações da biotecnologia industrial moderna (IGARASHI *et al.*, 2003). O primeiro detergente contendo enzimas data de antes de 1913, este era composto de carbonato de sódio e um extrato pancreático bruto (RAO *et al.*,

1998). Porém, esta prática só foi se intensificar a partir da década de 1960, com a introdução da Alcalase® (Novozymes), uma subtilisina extraída da bactéria *Bacillus licheniformis* (MAURER, 2004; WOLFGANG, 2004). A maioria das enzimas utilizadas nos detergentes enzimáticos é de origem bacteriana. No entanto, novas fontes de enzimas continuam sendo investigadas, como por exemplo, os organismos aquáticos.

Um pré-requisito essencial para a utilização de enzimas na formulação de detergentes é que essas sejam alcalinas e termostáveis. Essas características são importantes devido ao pH do sabão em pó, que é geralmente entre 9-12, e a temperatura de lavagem que varia de 40 a 60°C (TAKAMI *et al.*, 1989; MANACHINI; FORTINA, 1998). No entanto, existem outros fatores envolvidos na seleção de enzimas para detergentes, como sua compatibilidade com o sabão em pó e os componentes presentes na sua fórmula, tais como agentes surfactantes, oxidantes, perfumes e alvejantes (KUMAR *et al.*, 1998).

Amilases são a segunda classe de enzimas mais utilizadas na formulação de detergentes enzimáticos, cerca de 90% de todos os detergentes líquidos contém esta enzima (MITIDIERI, *et al.*, 2006). A utilização de α -amilases em detergentes tem como objetivo degradar resíduos de alimentos que contém amido, como batata, molhos, cremes, chocolate e etc. (SOUZA *et al.*, 2010). O amido tende a se espalhar no tecido agindo como um forte aglutinante de partículas de sujeira, acumulando inclusive manchas de origem lipídica e proteica, portanto, a não degradação do amido torna a lavagem menos satisfatória (ITO *et al.*, 1998).

Vários autores têm investigado a aplicação de α -amilases como aditivo em detergentes, e encontrado resultados positivos quanto à eficácia dessas enzimas. A-amilases do micro-organismo *Bacillus subtilis* mostraram alta compatibilidade com várias marcas de sabão em pó (MUKHERJEE *et al.*, 2009; ROY *et al.*, 2012). Mitidieri *et al.* (2006) compararam a ação da α -amilase extraída do *Aspergillus niger* com enzimas presentes em detergentes comerciais (enziplus®, enzitec® e endozime®) e obtiveram resultados semelhantes entre a α -amilase de estudo e as demais encontradas nas formulações de detergente. O mesmo resultado foi encontrado para α -amilases oriundas do *Bacillus licheniformis* (LUND *et al.*, 2012; ROY e MUKHERJEE, 2013). Apesar de, até o momento, não haver estudos reportando a utilização de α -amilases extraídas de peixes em formulações de detergentes, estudos visando a purificação e caracterização dessas biomoléculas, remetem à características importantes dessas enzimas que são necessárias nesse setor industrial, como serem alcalinas e atuarem em temperaturas entre 40 e 60°C. A tabela abaixo ilustra os resultados encontrados nesses estudos.

Tabela 2- Caracterização de α -amilases de várias espécies de peixes.

Referência	Organismo	pH	Temperatura
Fernandez <i>et al.</i> , 2001	<i>P. pagrus</i>	6.5	Estável 90 min a 50°C
	<i>B. boops</i>	7.0	Tem. Ótima 30°C
	<i>D. annularis</i>	9.0	Estável 90 min a 60°C
	<i>P. erythrinus</i>	8.5	Estável 60 min a 50°C
	<i>P. bogaraveo</i>	8.0	Tem. Ótima 40°C
Moreal <i>et al.</i> , 2001	<i>Oreochromis niloticus</i>	7.0	Temperatura ótima 35°C
	<i>Sarotherodon Melanotheron</i>		
Wu <i>et al.</i> , 2010	Taiwan tilápia	8.0	Temperatura ótima 50°C
			Estável 30 min entre 20-50°C
Munilla-Morán e Saborido-Rey, 1996	<i>Scophthalmus maximus</i>	7.0-7.5	Temperatura ótima 45°C
	<i>Sebastes mentella</i>		Temperatura ótima 40°C
	<i>Sparus aurata</i>		Temperatura ótima 40-45°C

O uso de enzimas, em particular as amilases, em processos industriais, satisfaz as exigências das normas de baixo impacto ambiental, pois dispensam o uso de produtos cáusticos em suas formulações, além de contribuírem com a redução de gastos energéticos associados ao aumento da qualidade do produto (LIN, 1998).

3. REFERÊNCIAS

- ACHREMOWICZ, B.; WOJCICKI, W. Amylolytic enzymes and other o-glycosidic hydrolases, Agric. Univ, **Lublin Editorial Office**, Lublin, (in Polish), 2000.
- ALENCAR, R.B.; BIONDI, M.M.; PAIVA, P.M.G.; VIEIRA, V.L.A.; CARVALHO JR, L.B.; BEZERRA, R.S. Alkaline proteases from the digestive tract of four tropical fishes. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.6, p.279-284, 2003.
- ALMEIDA, L. C.; LUNDSTEDT, L. M.; MORAES, G. Digestive enzyme responses of tambaqui (*Colossoma macropomum*) fed on diferente levels of protein and lipid. **Aquaculture Nutrition**, v. 12, p. 443-450, 2006.
- ALVAREZ-GONZÁLEZ, C. A.; MOYANO-LOPEZ, F. J.; CIVERA-CERECEDO, R.; CARRASCO-CHAVEZ, V.; ORTÍZ-GALINDO, J. L.; NOLASCO-SORIA, H.; TOVAR-RAMÍREZ, D.; DUMAS, S. Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* II: Electrophoretic analysis. **Fish Physiol Biochem**, v. 36, p.29–37, 2010.
- ARAI, T.; KAWABATA, A.; TANIGUCHI, H. Purification and some properties of Ichuimo b-amylase. **Agric. Biol. Chem**, v. 55, p. 393–405, 1991.
- ARAÚJO-LIMA, C.R.M.; GOULDING, M. So fruitful fish: ecology, conservation, and aquaculture of the Amazon's tambaqui. **New York: Columbia University Press**, p. 157, 1997.
- ARIDE, P. H. R.; ROUBACH, R.; VAL, A. L. Tolerance response of tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier) to water pH. **Aquaculture Research**, v. 38, p. 588-594, 2007.
- ARRUDA, L. F. Aproveitamento do resíduo do beneficiamento da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) para obtenção de silagem e óleo como subprodutos. 78 f. **Dissertação (Mestrado)** - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.
- ASPMO, S.I.; HORN, S.J.; EIJSINK, V.G.H. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. **Process Biochemistry**, v.40, p.1957-1966, 2005.
- ASSIS, C. R. D.; AMARAL, I. P. G.; CASTRO, P. F.; CARVALHO JR, L. B.; BEZERRA, R. S. Effect of dichlorvos on the acetylcholinesterase from tambaqui (*Colossoma macropomum*) brain. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.26, p.1451-1453, 2007.
- ASSIS, C. R. D.; CASTRO, P. F.; AMARAL, I. P. G.; CARVALHO, E. V. M. M.; CARVALHO, L. B.; BEZERRA, R. S. Characterization of acetylcholinesterase from the brain of the Amazonian tambaqui (*Colossoma macropomum*) and in vitro effect of organophosphorus and carbamate pesticides. **Environmental Toxicology and Chemistry**, p. n/a-n/a, 2010.

ASSIS, C. R. D.; LINHARES, A.G.; OLIVEIRA, V. M. ; FRANÇA, R. C. P ; CARVALHO, E. V. M. M. ; BEZERRA, R. S. ; CARVALHO JR, L. B. . Comparative effect of pesticides on brain acetylcholinesterase in tropical fish. **Science of the Total Environment**, v. 441, p. 141-150, 2012.

APIWATANAPIWAT, W.; MURATA, Y.; KOSUGI, A.; YAMADA, R.; KONDO, A.; ARAI, T.; RUGTHAWORN, P.; MORI, Y. Direct ethanol production from cassava pulp using a surface-engineered yeast strain co-displaying two amylases, two cellulases, and β -glucosidase. **Appl Microbiol Biotechnol** V.90:377–384, 2011.

BANO, S.; UL QADER, S. A.; AMAN, A.; AZHAR, A. Partial purification and some properties of partially purified α -amylase by *Bacillus subtilis* KIBGE-HAS. **Ind J Biochem Biophys**, v.46 p. 401–4, 2009.

BEZERRA, R. R.; SANTOS, J. F.; LINO, M. A. S.; VIEIRA, V. L. A.; CARVALHO JR, L. B. Characterization of stomach and pyloric caeca proteinases of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Journal of Food Biochemistry**, v.24, p. 189-199, 2000.

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

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.

BLANCO M.; SOTELO, C. G.; CHAPELA, M. J.; PÉREZ-MARTÍN, R. I. Towards sustainable and efficient use of fishery resources: present and future trends. **Trends in Food Science e Technology**. Vol. 18, pp. 29-36, 2007.

BLIER, P. U.; LEMIEUX, H.; DEVLIN, R. H. Is the growth rate of fish set by digestive enzymes or metabolic capacity of the tissues? Insight from transgenic coho salmon. **Aquaculture**, v. 209, p. 379–384, 2002.

BON, E. P. S. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado. **Interciência**, 506 p. ISBN 9788571931893, Rio de Janeiro, 2008.

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

BRASIL. MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. Produção pesqueira e aquícola. Estatística 2008 e 2009. Disponível em: <[HTTP://www.mpa.gov.br/#imprensa/2010/AGOSTO/nt_AGO_19-08producao-de-pescado-aumenta](http://www.mpa.gov.br/#imprensa/2010/AGOSTO/nt_AGO_19-08producao-de-pescado-aumenta)>.

BURHAN, A.; NISA, U.; GOKHAN, C.; OMER, C.; ASHABIL, A.; OSMAN, G. Enzymatic properties of a novel thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkalophilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1397–1403, 2003.

CAMARGO, G. O. S DE; POUEY, L. O. F. J. Aquicultura - Um mercado em expansão. **Revista Brasileira de Agrociência**. V. 11, p. 393-396, 2005.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2001. 752p.

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.

CARVALHO, E. V. M.; BEZERRA, R. F.; BEZERRA, R. S.; ARAUJO, J. M.; SANTOS, A. J. G.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Detection of the first lectin with antimicrobial activity present in serum of the Amazonian fish tambaqui *Colossoma macropomum*. **Fisheries Science**, v. 02, p. 01-25, 2012.

CHATZIFOTIS, S.; POLEMITOU, I.; DIVANACH, P.; ANTONOPOULOU, E. Effect of dietary taurine supplementation on growth performance and bile salt activated lipase activity of common dentex, *Dentex dentex*, fed a fish meal/soy protein concentrate-based diet. **Aquaculture**, v. 275, p. 201-208, 2008.

CHIU, Y.N.; BENITEZ, L.V. Studies on the carbohydrases in the digestive tract of milkfish *Chanos chanos*. **Mar. Biol**, v. 61, p. 247-254, 1981.

DEBNATH, D.; PAL, A. K.; SAHU, N. P.; YENGKOKPAM, S.; BARUAH, K.; CHOUDHURY, D.; VENKATESHWARLU, G. Digestive enzymes and metabolic profile of *Labeo rohita* fingerlings fed diets with different crude protein levels. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B v. 146, p.107-114, 2007.

DERDE, L.J.; GOMAND, S.V.; COURTIN, C.M.; DELCOUR J.A. Characterisation of three starch degrading enzymes: Thermostable α -amylase, maltotetraogenic and maltogenic α -amylases. **Food Chemistry**, v. 135, p. 713-721, 2012.

ESPÓSITO, T.S.; AMARAL, I.P.G.; BUARQUE, D.S.; OLIVEIRA, G.B.; CARVALHO JR., L.B.; BEZERRA, R.S. Fish processing waste as a source of alkaline proteases for laundry detergent. **Food Chemistry**, v. 112, p. 125-130, 2009-a.

ESPÓSITO, T.S.; AMARAL, I.P.G.; MARCUSCHI, M.; CARVALHO JR.; BEZERRA, R.S. Surfactants- and oxidants-resistant alkaline proteases from common carp (*Cyprinus carpio*) processing waste. **Journal of Food Biochemistry**, v.33, p. 821-834, 2009-b.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (2012). **The State Of World Fisheries And Aquaculture**. Disponível on-line: <http://www.fao.org>. Acessado em: 22/09/2013.

FERNÁNDEZ, I; MOYANO, F. J.; DÍAS, M; MARTINEZ, T. Characterization of α -amylase activity in five species of Mediterranean sparid fishes (*Sparidae*, *Teleostei*). **Journal of Exper Mar Biol and Ecol**, v. 262, p. 1-12, 2001.

FERREIRA, A. C. Modelo de Avaliação da Economia Hídrica de Reservatórios Hidrelétricos em Operação. **Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Itajubá** 307 pp, 2007.

FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia. Brazilian Journal of Animal Science**, v. 37, p. 08-14, 2008.

FISHBASE, 2013. Disponível em: <<http://www.fishbase.org/search.php>>. Acessado em 10.10.2013.

FRIEDBERG. On the primary structure of amylases. **FEBS Letters** v. 152, p. 139-140, 1983)

FURNÉ, M.; HIDALGO, M. C.; LÓPEZ, A.; GARCÍA-GALLEGU, M.; MORALES, A. E.; DOMEZAIN, A.; DOMEZAINÉ, J.; SANZ, A. Digestive enzyme activities in Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. **Aquaculture** v. 250, p. 391–398, 1995.

GASPERIK, J.; KOVAC, Z.; MINARIKAVA, O. Purification and characterization of the amylolytic enzymes of *Saccharomycopsis fibuligera*. **Int. J. Biochem**, v. 73, p. 21–26, 1991.

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

GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; IHL, M.; BIFANI, V.; SILVA, A.; MONTERO, P. Edible films made from tuna-fish gelatin with antioxidant extracts of two different muta ecotypes leaves (*Ugni molinae* Turcz). **Food Hydrocolloids**, v.21, p.1133-1143, 2007.

GOULDING, M.; CARVALHO, M.L. Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae). An important Amazonian food fish. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.1, p. 107–133, 1982.

GOYAL, N.; GUPTA, K. S.; SONI, S. K. A novel starch digesting thermostable alpha-amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 723-734, 2005.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological Enzyme Research perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, no. 11, p. 1599–1616, 2003.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; LARENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 59, p. 15-32, 2002.

HENDRIKSEN, H. V.; PEDERSEN, S.; BISGARD-FRANTZEN, H. A process for textile warp sizing using enzymatically modified starches. **Patent Application WO 99/35325**, 1999.

HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochem. J**, v. 280, p. 309–316, 1991.

HIDALGO, M. C.; UREA, E.; SANZ, A. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. **Aquaculture**, v. 170, p. 267–283, 1999.

HSIEH, M.; YIN, L.; JIANG, S. Purification and characterization of the amylase from a small abalone *Haliotis sieboldii*. **Fisheries Science**, v. 74, p. 425-432, 2008.

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

IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). **Estatística da Pesca 2006**. 2008.

IGARASHI, K.; HAGIHARA, H.; ITO, S. Trends Glycosci. **Glycotechnol.**, v. 82, p. 101–114, 2003.

ITO, S.; KOBAYASHI, T.; ARA, K.; OZAKI, K.; KAWAI, S.; HATADA, Y. **Extremophiles** 2 p.185–190, 1998.

JAMAI, L.; ETTAYEBI, K.; YAMANI, E. J.; ETTAYEBI, M. Production of ethanol from starch by free and immobilized *Candida tropicalis* in the presence of α -amylase. **Bioresource Technology**, v.98, p. 2765-2770, 2007.

JANECEK *et al.* Starch- and glycogen-debranching and branching enzymes: prediction of structural features of the catalytic (β/α)-barrel domain and evolutionary relationship to other amylolytic enzymes. **Journal of Protein Chemistry**, v. 12, p791-805, 1993.

JANECEK, S. Close evolutionary relatedness among functionally distantly related members of the (beta/alpha)₈-barrel glycosyl hydrolases suggested by similarity of their fifth conserved sequence region. **FEBS Lett**, v. 377, p. 6–8, 1995.

JANECEK, S. New conserved amino acid region of α -amylase in the 3rd loop of their (beta/alpha)₈-barrel domains. **Biochem. J**, v.288, p. 1066–1070, 1992.

JANECEK, S.; SVENSSON, B.; MACGREGOR, E. A. Relation between domain evolution, specificity, and taxonomy of the α -amylase family members containing a C-terminal starch-binding domain, Eur. **J. Biochem.**, v. 270, p. 635–645, 2003.

KANEKO, T.; OHNO, T.; OHISA, N. Purification and characterization of a thermostable raw starch digesting amylase from a *Streptomyces* sp. Isolated in a milling factory. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 6, p. 1073-1081, 2005.

KIM, S. K.; MENDIS, E. Bioactive compounds from marine processing byproducts – A review. **Food Research International**, v.39, p. 383–393, 2006.

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

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

KOSHLAND, D.E. Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. **Biol. Rev.**, v. 28, p. 416–436, 1953.

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

KUMAR, A. e GUPTA, M.N. Immobilization of trypsin on an enteric polymer Eudragit S-100 for the biocatalysis of macromolecular substrate. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.5, p.289-294, 1998.

LAWSON, C.L.; VAN MONTFORT, R.; STROKOPYTOV, B.; ROZEBOOM, H.J.; KALK, K.H.; DE VRIES, G.E.; PENNINGA, D.; DIJKHUIZEN, L.; DIJKSTRA, B.W. Nucleotide sequence and X-ray structure of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 in a maltose-dependent crystal form. **J. Mol. Biol.**, v. 236, p. 590–600, 1994.

LEADLAY, P. F. An Introduction to Enzyme Chemistry. **Cambridge: The Royal Society of Chemistry**, p.82, 1993.

LEVEQUE, E.; JANECEK, S.; HAYE, B.; BELARBI, A. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 3–14, 2000.

LIAO, B.; HILL, G. A.; ROESLER, W. J. Amylolytic activity and fermentative ability of *Saccharomyces cerevisiae* strains that express barley α -amylase. **Biochemical Engineering Journal** v. 53 p. 63–70, 2010.

LIAO, B.; HILL, G. A.; ROESLER, W. J. Stable expression of barley α -amylase in *S. cerevisiae* for conversion of starch into bioethanol. **Biochemical Engineering Journal**, v. 64, p. 8-16, 2012.

LIN, L. L.; CHYAU, C. C.; HSU, W. H. Production and properties of a raw-starch-degrading amylase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus sp.* TS-23. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 28, p. 61–68, 1998.

LOVSHIN, L. L. The Colossomids. In: NASH, C.E.; NOVOTNY, A.J. (eds.). **World animal science: production of aquatic animals: fishes**. The Netherlands: Elsevier Science, p.153-159, 1995.

LUND, H.; KAASGAARD, S. G.; SKAGERKIND, P.; JORGENSEN, L.; JORGENSEN, C. I.; VAN DER WEERT, M. Protease and amylase stability in the presence of chelators used in laundry detergent applications: correlation between chelator properties and enzymatic stability in liquid detergents. **J. Surfact. Deterg.**, v. 15, p. 265-276, 2012.

LUNDSTEDT, L. M.; MELO, J. F. B.; MORAES, G. Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition. **Comp Biochem Physiol**, v. 137B, p. 331–339, 2004

MACGREGOR *et al.* α -Amylase structure and activity. **Journal of Protein Chemistry**, v. 7, p 399-415, 1988.

MACHADO-ALLISON, A. Estudios sobre la subfamilia Serrasalminae (Teleostei, Characidae). Parte 1. Estudio comparado de los juvenis de las “Cachamas” de

Venezuela (Gêneros *Colossoma* y *Piaractus*). **Acta Biológica Venezuéllica**, v. 11, n. 3, p. 1-101, 1982.

MANACHINI, P. L.; FORTINA, M. G. Production in sea-thermostable alkaline proteases by a halotolerant strain of *Bacillus licheniformis*. **Biotechnology Letters**, v. 20, p. 565-568, 1998.

MARCUSCHI, M. Purificação e caracterização de uma tripsina do peixe amazônico tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Pernambuco**, 2010-a.

MARCUSCHI, M.; ESPÓSITO, T. S.; MACHADO, M. F. M.; HIRATA, I. Y.; MACHADO, M. F.M.; SILVA, M. V.; CARVALHO JR., L. B.; OLIVEIRA, V.; BEZERRA, R. S. Purification, characterization and substrate specificity of a trypsin from the Amazonian fish tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 396, p. 667–673, 2010-b.

MAURER, K. Detergents proteases. **Curr. Opin. Biotechnol**, v. 15, p. 330–334, 2004.

MITIDIERI, S.; MARTINELLI, A. H. S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: a comparative study with commercial detergent formulations. **Bioresour. Technol.**, v. 97, p. 1217–1224, 2006.

MOREAU, Y.; VÉRONIQUE, D.; KOUKIEKOLO, R.; MARCHIS-MOUREN, G.; SANTIMONE, M. Starch digestion in tropical fishes: isolation, structural studies and inhibition kinetics of alpha-amylase from two tilapias *Oreochromis niloticus* and *Sarotherodon melanotheron*. **Comparative Biochemistry an Physiology part B**, v. 128, p. 543-552, 2001.

MPA – Ministério da pesca e aquicultura. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura. Brasil, 2010.

MPA – Ministério da pesca e aquicultura. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura. Brasil, 2013.

MUKHERJEE, A. K.; BORAH, M.; RAI, S. K. To study the influence of different components of fermentable substrates on induction of extracellular alpha-amylase synthesis by *Bacillus subtilis* DM-03 in solid-state fermentation and exploration of exploration of feasibility for inclusion of alpha-amylase in laundry detergent formulations. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, p. 149-156, 2009.

MUNILLA-MORÁN, R.; SABORIDO-REY, F. Digestive enzymes in marine species. I. Proteinase activities in gut from redbfish (*Sebastes mentella*), seabream (*Sparus aurata*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). **Comparative Biochemistry and Physiology (Part B)**, v. 113, p. 395-402, 1996.

NAGASE, G. Contribution to the physiology of digestion in Tilápia mosambica: digestive enzymes and effects of diets on their activity. **Zeitschrift Fur Vergleichende Physiologie**, v.49, p.270-284, 1964.

NAHAMPUN, H. N.; LEE, J. C.; JANE, J. L.; WANG, K. Ectopic expression of bacterial amylopullulanase enhances bioethanol from maize grain. **Pant Cell Rep.**, v. 32, p. 1393-1405, 2013.

NAKAMURA, A.; HAGA, K.; YAMANE, K. Three histidine residues in the active center of cyclodextrin gluconotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. 1011 effects replacement on pH dependence and transition-state stabilization. **Biochemistry**, v. 32, p. 6624–6631, 1993.

NALINANON, S.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; KISHIMURA, H. Use of pepsin for collagen extraction from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). **Food chemistry**, v.104, p.593-601, 2007.

NELSON, J. S. Fishes of the world. 2 ed. **New York: John Wiley e Sons Inc.** 523 p, 1984.

NIKOLOV, Z. L; REILLY, P. Enzymatic depolymerization of starch. In: Tonathan S (ed.). **Biocatalysts for Industry**. Plenum Press, p. 37–62, 1991.

NUNES, E. S. S.; CAVERO, B. A. S.; PEREIRA-FILHO, M.; ROUBACH, R. Enzimas exógenas na alimentação de juvenis de tambaqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n.1, p. 139-143, 2006.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. Aquicultura no Brasil o desafio é crescer. Brasília. 276pp, 2008.

PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C. R.; SOCCOL, V. T.; SINGH, D.; AND MOHAN, R. Advances in microbial amylases, **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 31, p. 135–152, 2000.

PELLETIER, D.; DUTIL, J.-D.; BLIER, P.; GUDERLEY, H. Relation between growth rate and metabolic organisation of white muscle, liver and digestive tract in cod, *Gadus morhua*. **J. Comp. Physiol**, v.164 B, p. 179–190, 1994.

PÉRES, A.; ZAMBONINO INFANTE, J.L.; CAHU, C.L. Dietary regulation of activities and mRNA levels of trypsin and amylase in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. **Fish Physiol. Biochem**, v. 19, p. 145–152, 1998.

PRINGSHEIM, H.; GINSBURG, S. Amylolysis of phosphoric esters of starch and glycogen. **Bull. Soc. Chim. Biol.**, v. 17, p. 1599–1606, 1935. **Chem. Abstr.**, v. 30 p.13640, 1936.

PRAKASH E JAISWAL. α -Amylase: An ideal representative of thermostable enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnol**, v. 167, p 2123-2124, 2009.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 62, p. 597–635, 1998.

REDDY, N. S.; NIMMAGADA, A.; SAMBASIVA RAO, R. S. An over view of the microbial alpha amylase minireview. **Afri J Biotechnol.**, v. 26, p. 45–48, 2003.

ROY, J. K.; RAI, S. K.; MUKHERJEE, A. K. Characterization and application of a detergent-stable alkaline alpha-amylase from *Bacillus subtilis* strain AS-SO1a. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, p. 219-229, 2012.

ROY, J. K. e MUKHERJEE, A. K. Applications of a high maltose forming, thermo-stable alpha-amylase from an extremely alkalophilic *Bacillus licheniformis* strain AS08E in food and laundry detergent industries. **Biochemical Engineering Journal**, v. 77, p. 220-230, 2013.

SANTOS, C. Aquicultura e pesca a mudança do modelo exploratório. p. 13-32 *In*: Dias, Marcos Tavares; Manejo e Sanidade de peixes em cultivo. **EMBRAPA Amapá**. 724 pp, 2009.

SEAP (2003). Ministério de Pesca e Aquicultura – MPA.

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

SHERMAN, H. C.; CALDWELL, M. L.; ADAMS, M. Establishment of the optimal hydrogen-ion activities for the enzyme hydrolysis of starch by pancreatic and malt amylases under varied conditions of time and temperature. **J. Am. Chem. Soc.**, v.49, p. 2000–2005, 1927.

SHERMAN, H. C.; PUNNETT, P. W. Products of the action of certain amylases upon soluble starch with special reference to the formation of glucose. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 38 p. 1877–1885, 1916.

SILVA, J. A. M.; PEREIRA-FILHO, M.; CAVERO, B. A. S.; OLIVEIRA-PEREIRA, M. I. Digestibilidade aparente dos nutrientes e energia de ração suplementada com enzimas digestivas exógenas para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818). **Acta amazônica**, Manaus, v. 37, n.1, p. 157-164, 2007-a.

SILVA, A. M. D.; GOMES, L. C.; ROUBACH, R. Growth yield, water and effluent quality in ponds with different management during tambaqui juvenile production. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 42, n. 5, p. 733-740, maio 2007-b.

SIVARAMAKRISHNAN, S.; GAUGADHARAN D.; NAMPATHIRI, K. M.; SOCOL, C. R.; PANDEY, A. A-amylases from microbial sources – An overview on recent developments, **Food Technol. Biotechnol.**, v.44, p. 173–184, 2006.

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.

SOUZA, P. M. MAGALHAES, P. O. **Braz. J. Microbiol.**, v. 41, p. 850–861, 2010.

STROKOPYTOV, B.; KNEGTEL, R.M.A.; PENNINGA, D.; ROOZEBOOM, H.J.; KALK, K.H.; DIJKHUIZEN, L.; DIJKSTRA, B.W. Structure of cyclodextrin glycosyltransferase

complexed with a maltononaose inhibitor at 2.6 Å resolution. Implications for product specificity. **Biochemistry**, v. 35, p. 4241–4249, 1996.

TAKAMI, H.; AKIBA, T.; HORIBOSHI, K. Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 120-124, 1989.

UGWUMBA, A. A. A. Carbohidrases in the digestive tract of the African bony-tongue *Heterotis niloticus* (Pisces: Osteoglossidae). **Hydrobiologia**, v. 257, p. 95-100, 1993.

UITDEHAAG, J. C. M.; MOSI, R.; KALK, K. H.; VAN DER VEEN, B. A.; DIJKHUIZEN, L.; WITHERS, S. G.; DIJKSTRA, B. W. X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the α -amylase family. **Nature Struct. Biol.**, v. 6, p. 432–436, 1999.

VAL, A.L.; HONCZARYK, A. Criando peixes na Amazônia. **Manaus: INPA (Editora)**, Manaus, Brasil. P.160, 1995.

VAN DER MAAREL, M. J. E. C.; VAN DER VEEN, B.; UITDEHAAG, J. C. M.; LEEMHUIS, H.; AND DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family, **J. Biotechnol.**, v. 94, p. 137–155, 2002.

VAN WORMHOUDT, A.; FAVREL, P. Electrophoretic characterization of *Palaemon elegans* (Crustacea: Decapoda) amylase system: study of amylase polymorphism during the intermolt cycle. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 89-B, p. 201-207, 1988.

VIDAL JR.; M. V.; DONZELE, J. L.; CAMARGO, A. C. S.; ANDRADE, D.; SANTOS, L. C. Níveis de proteína bruta para tambaqui (*Colossoma macropomum*), na fase de 30 a 250 gramas. 1. Desempenho de tambaquis. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 27, n.3, p. 421-426, 1998.

VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. Fundamentos de Bioquímica. **Editora Artes médicas Sul LTDA**, São Paulo. 931 pp, 2000.

VONK, H. J.; WESTERN, J. R. H. Vertebrate carbohydrases. In: Vonk HJ, Western JRH (eds). **Comparative Biochemistry and Physiology of Enzymatic Digestion**. Academic Press, London p. 195–255, 1984.

WARREN, R. A. J. Microbial hydrolysis of starch, Annu. **Rev. Microbiol.**, v. 50, p. 183–212, 1996.

WILD, G. M. Action patterns of starch enzymes, Iowa State Coll. **J. Sci.**, v. 28, p. 419–420, 1954.

WU, M. C.; LIN, J.; KUO, S. T.; LIN, Y. Purification of amylase from tilapia by magnetic particle. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 24, p. 139-151, 2010.

YAMADA, R.; YAMAKAWA, S.; TANAKA, T.; OGINO, C.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Direct and efficient ethanol production from high-yielding rice using a *Saccharomyces*

cerevisiae strain that express amylases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 393-396, 2011.

YAMAKAWA, S.; YAMADA, R.; TANAKA, T.; OGINO, C.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Repeated fermentation from raw starch using *Saccharomyces cerevisiae* displaying both glucoamylase and α -amylase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 50, p. 343-347, 2012.

ZHANG, Y.; LIU, W.; LI, G.; SHI, B.; MIAO, Y.; WU, X. Isolation and partial characterization of pepsin-soluble collagen from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Food Chemistry**, v.103, p.906-912, 2007.

4. OBJETIVOS

4.1. Geral

Purificar parcialmente e caracterizar α -amilases presentes no intestino e cecos pilóricos do peixe *Colossoma macropomum* e avaliar a sua compatibilidade com detergentes comerciais.

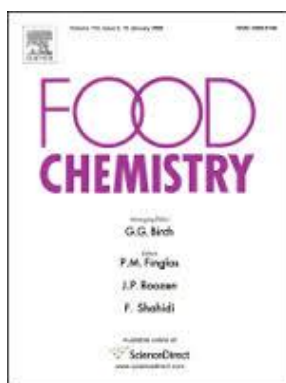
4.2. Específicos

- Obter frações com atividade amilolítica a partir do extrato bruto do intestino e cecos pilóricos do tambaqui utilizando fracionamento salino;
- Determinar a fração de melhor rendimento;
- Purificar parcialmente α -amilases;
- Definir os parâmetros físico-químicos da atividade amilolítica;
- Avaliar o efeito de metais e inibidor de amilase sobre a atividade amilolítica;
- Avaliar o efeito de surfactantes, agente oxidante e detergente comercial sobre a estabilidade da atividade amilolítica.

5. ARTIGO

Partial purification and characterization of an α -amylase from the amazonian fish tambaqui (*Colossoma macropomum*) and its compatibility with commercial detergents.

To be submitted to Food Chemistry



ISSN – 0308-8146; Qualis – A2; Fator de Impacto 3.334

Amália Cristine Medeiros Ferreira¹, Marina Marcuschi¹, Ranilson de Souza Bezerra¹

¹Laboratório de Enzimologia – LABENZ, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil.

*Corresponding author: Ranilson S. Bezerra.

Laboratório de Enzimologia – LABENZ, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Univesitária, Recife-PE, Brazil, CEP 50670-910, Tel.: + 55-XX-81-21268540,

Fax: + 55-XX-81-21268576, E-mail address: ransoube@uol.com.br

Abstract

α -Amylases were partially purified from intestine and pyloric caeca of tambaqui (*Colossoma macropomum*) using thermal treatment, followed by salt fractionation with ammonium sulphate and p-aminobenzamidine-agarose chromatography. Biochemical characterization revealed an optimal activity at pH 7.0 (at 40°C) for AMY-1 and at pH 8.5 (at 45°C) for AMY-2, both were thermostable for 30 min at 40°C and had their activity reduced by the ions CuCl_2 and HgCl_3 . These enzymes were stable in the presence of ionic surfactants (SDS and sodium choleate) and nonionic (Tween 20 and Tween 80). They also were stable when incubated with H_2O_2 (15%) for 60 min. Furthermore they showed high compatibility with all the brands of commercial laundry detergents tested in this study, which suggests the use of these enzymes as additives for cleaning.

Key words: tambaqui, fishery waste, α -amylases, commercial detergents.

Introduction

The α -amylase (E.C. 3.2.1.1) is an enzyme that hydrolyses α -(1 $\rightarrow$ 4) glycosidic linkages to produce dextrans, which are then gradually hydrolyzed to produce smaller oligosaccharides (Windish and Maarte, 1965). Amylases share about 25% of the industrial enzyme market of the world (Gupta et al., 2003). They are extensively used in starch saccharification process, bio-ethanol production, textile, food and brewing industries, and used as a detergent additive to improve the wash performance of detergents (Kim et al., 1995; Roy et al., 2012). The α -amylases can be obtained from various natural resources as plant, animal, and microorganisms, and play an essential role in digestive physiology of carbohydrates.

Some authors report that digestive enzymes can be obtained from fish process by products, mainly from the viscera, representing an important source of these biomolecules with various biotechnological applications (Bezerra, 2001; Espósito, 2009; 2010). The contamination caused by the residues from fish processing has created an imperative challenge that needs to be efficiently dealt. Therefore, alternatives, including the commercial use of the by-products and waste, are urgently required (Castillo-Yáñez et al., 2005).

The use of enzymes in detergents formulations known as “green chemicals in detergents” enhances the ability of the detergents to remove tough stains, making the detergent environmentally safe (Hmidet et al., 2009). Detergent enzymes account for about 40% of the total worldwide enzyme production and thus they represent one of the largest and most successful applications of modern industrial biotechnology (Igarash et al., 2003). Amylases are second largest enzymes used in the formulation of enzymatic detergent, and about 90% of all liquid detergents contain these enzymes (Mitidieri et al., 2006).

The tambaqui (*Colossoma macropomum*) is an important Amazonian fish being the second most species produced in Brazilian aquaculture with estimated production of 111.084 t in 2011 (Araújo-Lima and Goulding 1997; MPA, 2013). Studies report the use of digestive enzymes of *tambaqui* in several industrial sectors, such as the food industry and detergents (Espósito et al., 2009; Marcuschi et al., 2010), however the potential of α -amylases from this fish has not yet been studied.

This present work aim the partial purification and characterization of α -amylases from *C. macropomum* pyloric caeca and intestine, and test the viability of its biotechnological use in detergent formulations.

2. Materials and methods

2.1 Enzyme purification

Juvenile specimens of tambaqui (*Colossoma macropomum*) were sacrificed in an ice bath and had their intestine and pyloric caecum collected and homogenized in 10 mM sodium-phosphate, pH 7.5 (200 mg/mL). The resulting homogenate was centrifuged at 10.000 xg for 25 min at 4°C to remove cell debris. The enzyme was purified from the homogenate supernatant through a three-step procedure: (1) incubation for 30 min at 45°C (heat treatment); (2) ammonium sulphate fractionation for 2 h at 4°C for the final salt saturation of 0–30% (fraction F1), 30–60% (fraction F2) and final supernatant (protein soluble in 60% salt concentration); (3) Chromatography (2 cm³ with 1 mL of p-aminobenzamidine–agarose, Sigma-Aldrich®). These fractions were pooled, dialyzed against 100 mM phosphate-sodium pH 7.5 for 24 h at 4°C and used in the following assays.

2.2 Determination of amylase activities

Amylase activity was determined according to Bernfeld method (1955) using soluble starch 2% as substrate. Briefly, 20 µl of the enzyme preparation was mixed with 125 µl of 10 Mm sodium–phosphate pH 7.5 at 37°C. Reaction was initiated by the addition of 125 µl of substrate and stopped 10 min later with addition of 300µL DNSA. Activity was measured by estimating the reducing sugars released after this time. A blank without substrate and a control containing no enzyme extract were run simultaneously with the reaction mixture. All the assays were carried out in triplicate. One unit of activity was defined as the amount of enzyme able to produce 1µg of maltose per minute.

2.3 Effect of pH and temperature

Optimal pH for amylase activity was determined using citrate-HCl, citrate-phosphate, Tris-HCl, and glycine-NaOH, ranging from 2.5 to 11.5 at 37°C. Optimal temperature and the effect of temperature on the stability of amylase activity was determined by incubating

enzyme with a substrate pre-equilibrated at temperatures ranging from 25°C to 70°C, followed by measurement of residual activity. Assays were performed in triplicate.

2.4 Effect of metal ions

The effect of metal ions on amylolytic activity was conducted according to methodology adapted from Souza et al (2007). The ions Ca^{+2} , Cu^{+2} , Hg^{+3} , Al^{+3} , Pb^{+2} , K^{+} , Zn^{+4} , Ba^{+2} , Cd^{+4} and Na^{+} have been assessed on concentration of 5mM. An aliquot containing amylase and ion solution (1:1) was incubated for 30 min at 37°C, then amylolytic activity was held.

2.5 Effect of inhibitor

Inhibition was measured according to Fernández et al (2001). Enzyme extracts were incubated during 30 min with specific inhibitor type 1 (sigma) (50µg/mL) at 37°C. The enzyme and substrate blank were similarly assayed without enzyme and substrate solution, respectively. The 100% values were established without any of the inhibitor.

2.6 Effect of surfactants agents and oxidizing agents

Stability towards ionic (Sodium choleate) and non-ionic surfactants (SDS, Tween 20 and Tween 80) was investigated by incubation at solution concentrations of 1% (w/v) for 30 min at 40°C after which the enzyme activity was assayed.

Hydrogen peroxide stability of the amylases was investigated by incubating samples (600 µL) with H_2O_2 (600 µL) at concentrations of 15% at 40°C for 60 min.

2.7 Compatibility with commercial detergents

The amylase at a concentration of 0.20 mg/mL was incubated at 40°C with commercially available detergents: Ala® (Unilever); Ace® (Protec & Gamble); Brilhante® (Unilever), Roma® (Johnson&Johnson) and liquid detergents Tixan Ypê® and Ace Ação instantânea®

(Procter & Gamble) to a final concentration of 7 mg/mL. Samples (20 μ L) were removed after a time interval of 20 min (total period of 60 min). The residual amylolytic activity in each sample was determined at 37°C, assayed and compared with the control sample incubated at 40°C without detergent.

2.8. Statistical analysis

All data was analysed using one-way analysis of variance (ANOVA) complemented with Turkey's test. Differences were reported as statistically significant when $p < 0.05$. The statistical program used was GraphPad Prism version 5.

3. Results e discussion

3.1 Purification of α -amylases

The partial purification of α -amylases was performed through three steps: thermal treatment; salt fractionation; and chromatography. Salt fractionation was performed using ammonium sulphate at concentrations of 0-30% (f-1) and 30-60% (f-2). The fraction 30-60% showed higher amylolytic activity in pyloric caeca and intestine and it was used in the next step of purification. A column of p-aminobenzamidine-agarose chromatography (Sigma®) was used to increase the degree of purification of these enzymes. In this last step, was made a joint purification of trypsins (unpubl. data) and amylases, using an affinity column for trypsins. The amylases were disconnected from the matrix through the change in ionic charge of the column by adding tris-HCl with 1M de NaCl. The efficiency of the purification and the specific activity was of 23% and 11.63 (U/mg) for AMY-1 (isolated from intestine) and of 33% and 17.192 (U/mg) for AMY-2 (isolated from pyloric caeca). To evaluate the protein profile of the samples, electrophoresis of SDS-PAGE (Laemmly, 1970) and zymograms (Fernández, 2001) were performed, where it's possible to see the partial purification of these α -amylases and the presence of isoforms.

3.2 Biochemical characterization of α -amylase (from *tambaqui*) isolated

After steps of purification, the physico-chemical properties of α -amylases partially purified were investigated. All amylases had higher activity in an alkaline medium, showing a discrete activity in the acidic range (Figure 1). Amylases were shown to be highly sensitive to a acid

pH, indicating that the digestion of carbohydrates in the guts takes place mainly in alkaline medium (Fernández et al., 2001). AMY-1 presented activity peak at pH 7.0, while for AMY-2 the optimum was at pH 8.5. Similar results were found for α -amylases from digestive tract of various fishes. *Boops boops* pH 7.0, *Pagellus erithrinus* pH 8.5 (Fernández, et al., 2001), *Oreochromis niloticus* and *Sarotherodon melanotheron* pH 7.0 (Moreau et al., 2001), *Scophthalmus maximus*, *Sebastes mentella* and *Sparus aurata* pH 7.0-7.5 (Munilla-Morán and Saborido-Rey, 1996), Taiwan tilapia pH 8.0 (Wu, et al., 2010). After increasing pH, the amylolytic activity is reduced, AMY-1 and AMY-2 showed residual activity of 30 and 40% at pH 10.5, respectively, and then they lost considerably their catalytic action. Changes in pH may affect both the substrate and enzyme by changing the charge distribution and conformation of the molecules (Klomklao et al., 2006). Most enzymes undergo irreversible denaturation in a very acid or alkaline solution, resulting in a loss of activity (Silva et al., 2011).

AMY-1 and AMY-2 exhibited optimum temperature of 40 and 45°C, respectively, and suffered a sharp drop in activity at temperatures above 55° C, getting totally inactive. The result of this study is similar to previous reports showing that the optimum temperature of fish amylase is between 25 and 50°C (Wu et al., 2010). Structural conformation and amylolytic activity are highly related, so the loss of activity at elevated temperatures may be related to structural changes caused by thermal denaturation (Mac Gregor, 2001). Thermostability study demonstrated that heating the AMY-1 and AMY-2 for 30 min at 40°C had no effect on enzyme activity, furthermore heating beyond this temperature resulted in a gradual loss of activity. AMY-1 and AMY-2 retained 40 a 60% of the initial activity a 55°C after 30 min.

Biochemical characterization of α -amylase from *tambaqui* fits in some parameters required in the choice of enzymes for commercial and industrial detergent, like acting in alkaline pH and optimum temperature compatible with the washing temperatures (40-60°C), which highlights the potential use of these enzymes as additives to detergents.

Similar interactions were observed between AMY-1 and AMY-2 and the metal ions to which these enzymes have been exposed. They were strongly inhibited by Cu^{2+} , showing residual activity of 25.1 and 18.4%, and Hg^{3+} 12.1 and 15.6% respectively to AMY-1 e AMY-2. Similar results were found for α -amylase from *S. cerevisiae* (Galdino et al, 2011). The ion Al^{+3} did not interfere in amylolytic activity of the purified enzymes. The remaining ions reduced amylolytic activity, on average, in 20-30%.

The effect of specific inhibitor of amylase, from the plant *Triticum aestivum*, on amylolytic activity was also evaluated. The reduction in activity caused by the inhibitor was similar in both α -amylases; around 46% of inhibition of amylolytic activity (Table 1) can be observed. Studies addressing the characterization of α -amylases from various species of fish have different levels of inhibition (ranging from 0 to 65%) and related this difference to the presence of isoforms (Fernandéz et al., 2001).

3.3 Surfactants and oxidizing agents

Both enzymes showed significant stability in the presence of ionic and nonionic surfactants agents. However, AMY-1 was more stable than AMY-2, keeping up activity in 110.6%. It has been reported that different ingredients of laundry detergents, such as anionic surfactants, bleaching agents and stabilizers influence the stability of enzymes (Maurer, 2004); however stability in the presence of detergents varies according to the source of the enzyme. AMY-1 and AMY-2 maintained activity of 102.8 ± 0.01 and 105.4 ± 0.09 , respectively, when incubated with H_2O_2 (15%) during 60 minutes.

3.4 Compatibility of α -amylase with commercial laundry detergents

The amylases are used in the detergents to degrade the residues of foods (such as potatoes, gravies, custard, chocolate, etc.) to dextrins and other smaller oligosaccharides. The suitability of any hydrolytic enzymes for inclusion in detergent formulation is dependent on its stability and compatibility with detergent components (Mukherjee et al., 2008; Mitidieri et al., 2006). An ideal detergent enzyme should be stable and active in the detergent solution for a long period of time. It should also maintain adequate temperature stability in order to be effective throughout a wide range of washing temperatures (Banik & Prakash, 2004; Moreira et al., 2002). AMY-1 and AMY-2 showed high compatibility with all the commercial laundry detergents tested in this study, retaining activity of up 116% and 152%, respectively, during the washing time of 60 minutes at 40°C, which emphasizes the use of these enzymes in this sector. Increase in enzyme activity may be attributed to the stimulatory effect of the some of the detergent components (Maurer, 2004).

Most of the enzymatic detergents use α -amylase of bacterial origin; however, the use of amylases in detergent formulations is problematic since the enzyme must offer stability and also an ideal level of activity in commercially used formulations (Roy et al., 2012). The amylases extracted from digestive tract of tambaqui exhibited a high applicability as an additive in the formulation of detergents, as they are resistant to surfactants agents and oxidizing agents and their activity was not reduced in the presence of commercial detergents. Reuse of viscera of fish as a source of α -amylases, in addition to contributing to the reduction of the impact generated by the fishing industry, is an important low-cost source of enzymes for industrial applications.

4. Conclusions

α -Amylases with high amylolytic activity can be obtained from pyloric caeca and intestine of tambaqui through fractionation (using 30-60% of ammonium sulphate) and p-aminobenzamidine-agarose chromatography. This new method of purification developed in this review corresponds to an efficient and cost-effective technique that allows, at the same time, the isolation of trypsins and amylases. The α -amylases showed important biochemical characteristics, suggesting its potential use as an additive to commercial and industrial detergents.

Acknowledgments

This work was supported by CNPq, (Brazil), Laboratório de Enzimologia (LABENZ) and Universidade Federal de Pernambuco.

References

- Alencar, R.B., Biondi, M.M., Paiva, P.M.G., Vieira, V.L.A., Carvalho Jr, L.B., Bezerra, R.S. (2003). Alkaline proteases from the digestive tract of four tropical fishes. *Brazilian Journal of Food Technology*, 6, 279-284.
- Araújo-Lima, C.R.M., Goulding, M. (1997). So fruitful fish: ecology, conservation, and aquaculture of the Amazon's *tambaqui*. New York: Columbia University Press, 157.
- Banik, R.M. and Prakash, M. (2004). Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus*. *Microbiological Research*, 159 135-140.
- Bezerra, R. S., Vieira, V. L. A., Carvalho Jr, L. B. (2001). Proteases no trato digestivo de peixes. Tripsina do *tambaqui* (*Colossoma macropomum*), modelo alternativo para o aproveitamento de subprodutos na indústria pesqueira. *Biotechnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 22, 46-49.
- 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. (2001). Partial purification and characterization of a thermostable trypsin from pyloric caeca of *tambaqui* (*Colossoma macropomum*). *Journal of Food Biochemistry*, 25, 199-210.
- Castillo-Yáñez, F.J., Pacheco-Aguiar, R., García-Carreño, F.L., Toro, M.A.N. (2005). Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of monterrey sardine *Sardinops sagax caerulea*. *Comparative Biochemistry and Physiology (Part B)*, 140, 91-98.
- Espósito, T. S., Marcuschi, M., Amaral, I. P. G., Carvalho Jr., L. B., Bezerra, R. S. (2010). Trypsin from the Processing Waste of the Lane Snapper (*Lutjanus synagris*) and Its Compatibility with Oxidants, Surfactants and Commercial Detergents. *J. Agric. Food Chem.* 58, 6433–6439.
- Espósito, T.S., Amaral, I.P.G., Buarque, D.S., Oliveira, G.B., Carvalho Jr., L.B., Bezerra, R.S. (2009). Fish processing waste as a source of alkaline proteases for laundry detergent. *Food Chemistry*, 112, 125-130.
- Fernández, I, Moyano, F. J., Díaz, M, Martinez, T. (2001) Characterization of α - amylase activity in five species of Mediterranean sparid fishes (*Sparidae*, *Teleostei*). *Journal of Exper Mar Biol and Ecol*, 262, 1-12.
- Galdino, A. S., Silva, R. N., Lottermann, M. T., Álvares, A. C. M., Moraes, L. M. P., Torres, F. A. G., Freitas, S. M., Ulhoa, C. J. (2011). Biochemical and structural characterization of amy-1: na alpha-amylase from *Cryptococcus flavus* expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme research*, 2011, 1-7.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., Chauhan, B. (2003). Microbial α -amylases: a biotechnological Enzyme Research perspective. *Process Biochemistry*, 38, 1599–1616.
- Hmidet, N., Ali, N.E., Haddar, A., Kanoun, S., Alya, S.K., Nasri, M. (2009). Proteases alcalinas e termoestável α co-produzido por-amylase de *Bacillus licheniformis* NH1: caracterização e aplicação potencial como aditivo detergente. *Biochem. Eng. J.* 47, 71–79.

- Igarashi, K., Hagihara, H., Ito, S. (2003). Trends Glycosci. Glycotechnol., 82, 101–114.
- Kim, T.U., Gu, B.G., Jeong, J.Y., Byun, S.M., Shin, Y.C. (1995). Purification and characterization of a 424 maltotetraose-forming alkaline (alpha)-amylase from an alkalophilic *Bacillus* strain, GM8901. Appl. Environ Microbiol. 310, 5–3112.
- Klomklao, S. (2008). Digestive proteinases from marine organisms and their applications. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 30, 37-46.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680–685.
- Mac Gregor. (2001). Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes. Biochimica et Biophysica Acta, 1546, 1-20.
- Marcuschi, M., Espósito, T. S., Machado, M. F. M., Hirata, I. Y., Machado, M. F.M., Silva, M. V., Carvalho Jr., L. B., Oliveira, V., Bezerra, R. S. (2010). Purification, characterization and substrate specificity of a trypsin from the Amazonian fish *tambaqui* (*Colossoma macropomum*). Biochemical and Biophysical Research Communications, 396, 667–673.
- Maurer, K. (2004). Detergents proteases. Curr. Opin. Biotechnol, 15, 330–334.
- Mitidieri, S., Martinelli, A. H. S., Schrank, A., Vainstein, M. H. (2006). Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: a comparative study with commercial detergent formulations. Bioresour. Technol., v. 97, 1217–1224.
- Moreau, Y., Véronique, D., Koukiekolo, R., Marchis-Mouren, G., Santimone, M. (2001). Starch digestion in tropical fishes: isolation, structural studies and inhibition kinetics of alpha-amylase from two tilapias *Oreochromis niloticus* and *Sarotherodon melanotheron*. Comparative Biochemistry and Physiology part B, 128, 543-552.
- Moreira, K.A., Albuquerque, B.F., Teixeira, M.F.S., Porto, A.L.F. and Lima Filho, J.L. (2002) Application of protease from *Nocardia* sp. as a laundry detergent additive. World Journal of Microbiol. Biotechnol. 18, 307-312.
- MPA – Ministério da pesca e aquicultura. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura. Brasil, 2013.
- Mukherjee, A. K., Borah, M., Rai, S. K. (2009). To study the influence of different components of fermentable substrates on induction of extracellular alpha-amylase synthesis by *Bacillus subtilis* DM-03 in solid-state fermentation and exploration of exploration of feasibility for inclusion of alpha-amylase in laundry detergent formulations. Biochemical Engineering Journal, 43, 149-156.
- Munilla-Morán, R., Saborido-Rey, F. (1996). Digestive enzymes in marine species. I. Proteinase activities in gut from redfish (*Sebastes mentella*), seabream (*Sparus aurata*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). Comparative Biochemistry and Physiology (Part B), 113, 395-402.

Roy, J. K., Rai, S. K., Mukherjee, A. K. (2012). Characterization and application of a detergent-stable alkaline alpha-amylase from *Bacillus subtilis* strain AS-SO1a. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50, 219-229.

Silva, J. F., Espósito, T. S., Marcuschi, M., Ribeiro, K., Cavalli, R. O., Oliveira, V., Bezerra, R. S. (2010). Purification and partial characterisation of a trypsin from the processing waste of the silver mojarra (*Diapterus rhombeus*). *Food Chemistry*.

Souza, A.A.G., Amaral, I.P.G., Espírito Santo, A.R., Carvalho Jr, L.B., Bezerra, R.S. (2007) Trypsin-like enzyme from intestine and pyloric caeca of spotted goatfish (*Pseudupeneus maculatus*). *Food Chemistry*, 100, 1429-1434.

Wu, M. C., Lin, J., Kuo, S. T., Lin, Y. (2010) Purification of amylase from tilapia by magnetic particle. *Journal of Food Processing and Preservation*, 24, 139-151.

Table 1 – Effect of metal ions (5mM) and inhibitor of amylase (50µg/mL) on AMY-1 and AMY-2 isoled of tambaqui. Relative activity (%).

	AMY-1	AMY-2
Control	100	100
Ion		
Ca ²⁺	82.3 ± 5.6	87.6 ± 3.8
Cu ²⁺	*** 25.1 ± 7.0	*** 18.4 ± 4.6
Hg ³⁺	*** 12.1 ± 10.4	*** 15.6 ± 5.2
Al ³⁺	100.7 ± 0.9	101.1 ± 3.1
Pb ²⁺	** 78.3 ± 4.5	81.2 ± 4.3
K ⁺	** 76.9 ± 0	89.2 ± 3.6
Zn ²⁺	* 73.9 ± 7.5	* 78.2 ± 0.6
Ba ²⁺	** 78.6 ± 6.1	81.2 ± 1.9
Cd ⁴⁺	** 63.2 ± 3.7	** 68.4 ± 6.9
Na ⁺	* 82.0 ± 2.6	84.0 ± 3.9
Amylase inhibitor	*** 53.0 ± 7.9	*** 54.3 ± 10.3

Table 2 – Effect of commercial detergents (7mg/mL) and oxidizing agent (15%) on amylolytic activity. 60 minutes at 40°C.

	AMY-1	AMY-2
Control	100	100
Ace [®]	88.7±3.52	116.9±3.1
Ala [®]	116.1±5.73	122.5±7.2
Brilhante [®]	95.1±9.1	103.7±7.9
Tixan ypê [®]	86.8±2.5	117.2±10.3
Ace [®]	105.8±10.8	** 145.0±8.9
Roma [®]	108.2±5.7	** 152.2±4.5
H ₂ O ₂	102.8±3.5	105.4±2.2

Figure legends

Figure 1 – SDS-PAGE and zymograms of purification of α -amylases (from *tambaqui*) isolated. A – Molecular-weight size marker; B- crude extract AMY-1; C pool AMY-1; D- crude extract AMY-2; E- pool AMY-2; F- AMY-1; G- AMY-2.

Figure 2 – Biochemical characterization of α -amylases from *tambaqui* (—○—: AMY-1; —●—: AMY-2). A – Optimum pH; B – Optimum temperature; C – Thermal stability.

Figure 3 – Effect of surfactants (1%) on amylolytic activity. (■) Control; (▒) Sodium choleate; (░) Tween 20; (░░) Tween 80; and (□) SDS.

Figure 1

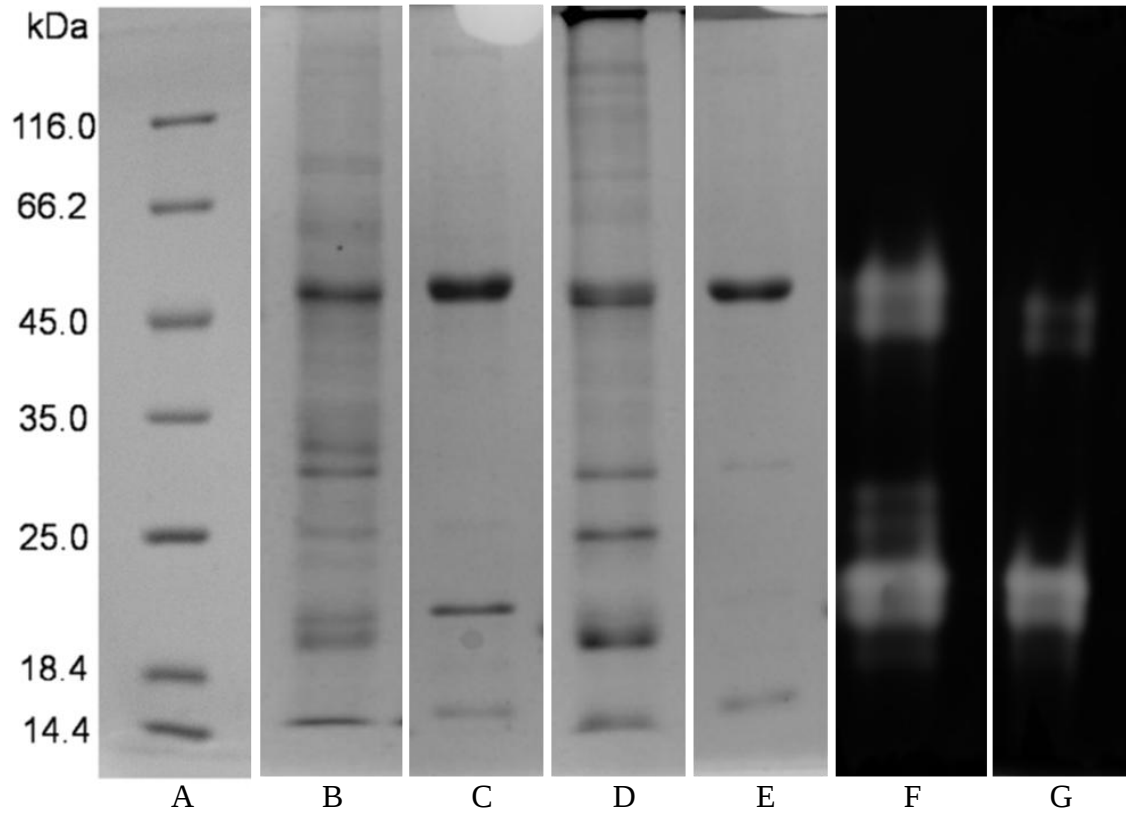


Figure 2

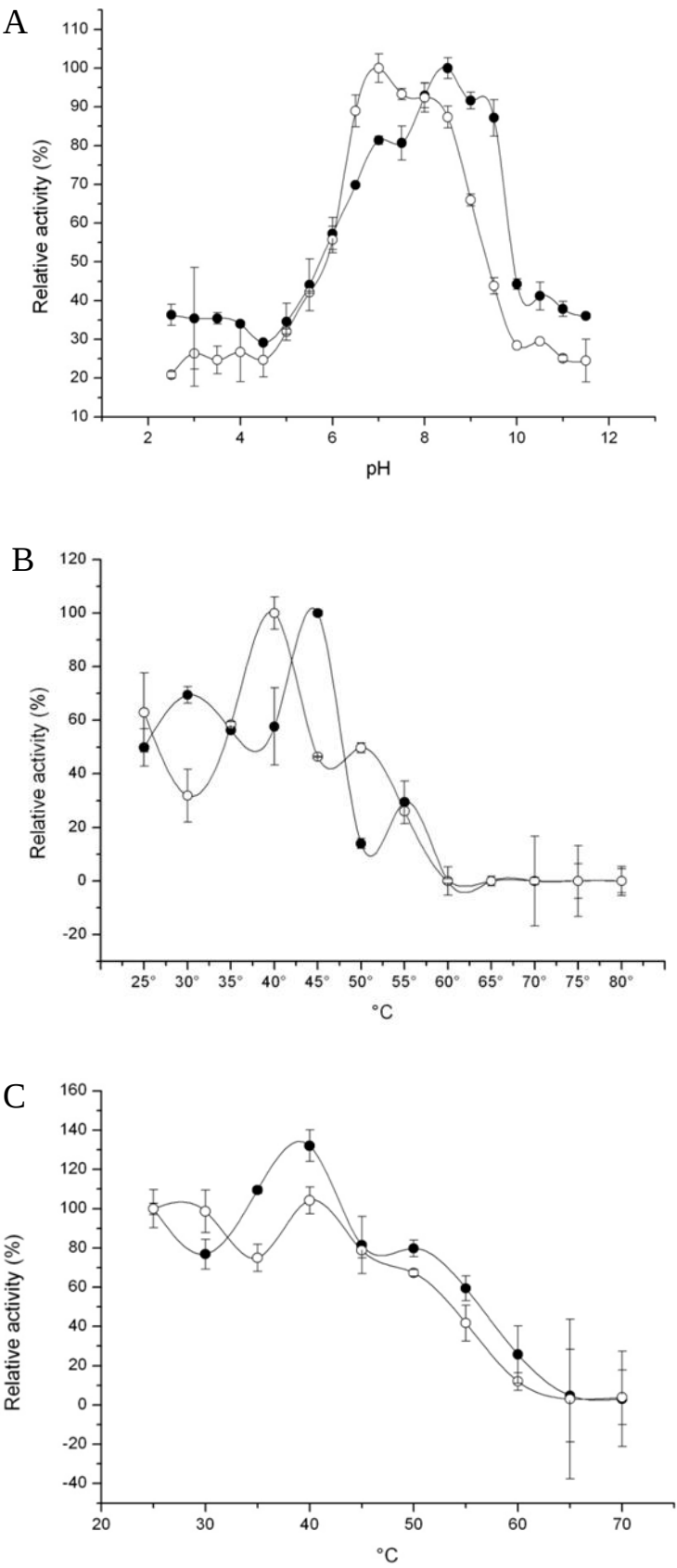
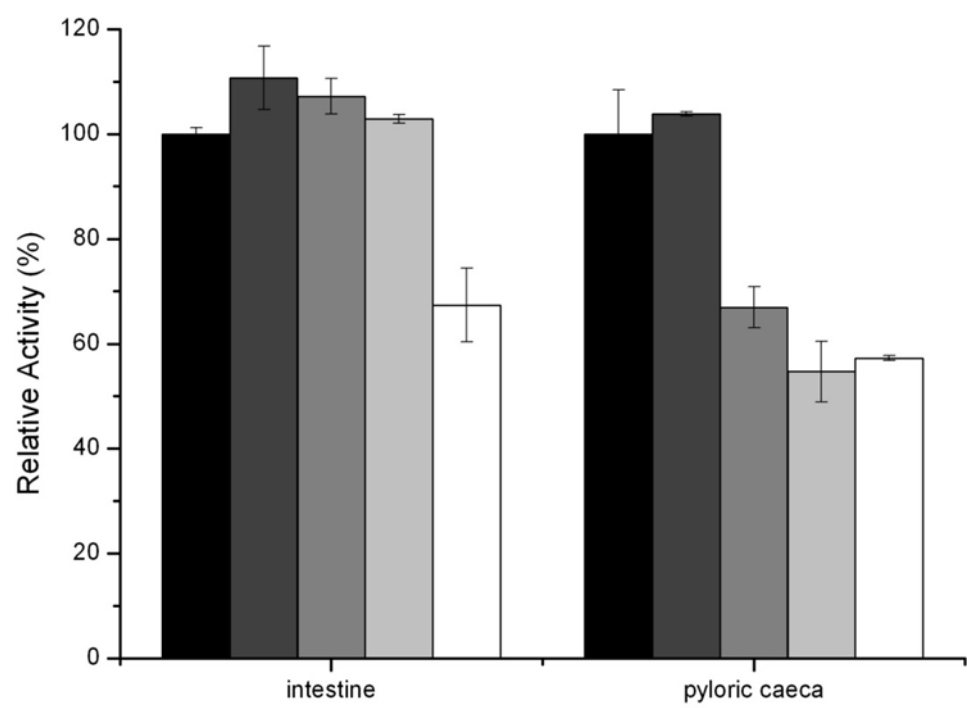


Figure 3



6. CONCLUSÕES

1. α -Amilases podem ser parcialmente purificadas através de tratamento térmico, precipitação salina com uma concentração de 30-60% de sulfato de amônio, e cromatografia p-aminobenzamidina-agarose;

2. Neste trabalho foi desenvolvida uma nova metodologia para purificação parcial de α -amilases, correspondendo a um método eficaz e econômico, uma vez que, concomitantemente, é possível purificar tripsinas e amilases;

3. As α -amilases purificadas do intestino e cecos pilóricos apresentaram temperatura ótima de, respectivamente, 40 e 45°C, e ambas apresentaram estabilidade durante 30 minutos a 40°C;

4. Foi observada uma diferença quanto ao pH ótimo das enzimas, a α -amilase pilórica apresentou maior atividade no pH de 8.5, enquanto que para a α -amilase intestinal, o pH ótimo foi 7.0;

5. As α -amilases apresentaram considerável resistência aos íons metálicos aos quais foi exposta, tendo sua atividade reduzida apenas na presença dos íons Cu^{+2} e Hg^{+3} .

6. As α -amilases são estáveis na presença de vários surfactantes, agente oxidante e detergentes comerciais levando a concluir que essas enzimas podem ser utilizadas como aditivo em detergentes.

ANEXOS

Instruções para autores – Food Chemistry

Types of paper

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). Research papers should not contain more than 40 references.

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). Review articles should not contain more than 80 references.) If it is felt absolutely necessary to exceed this number, please contact the editorial office for advice before submission.

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. These papers should not contain more than 30 references.

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

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

The work described in your article must have been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; EU Directive 2010/63/EU for animal experiments http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm.

Guidelines in the US and Canada, Europe and Australia specifically state that hypothermia (use of ice slurries) is not an acceptable method for killing fish in the research environment. We are aware that in the past papers using the same or similar methods have been accepted in *Food Chemistry*. However, the journal reserves the right to change/enforce submission criteria especially in the relation to publication of ethical research.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), 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, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open Access and Subscription.

For Subscription articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions.

Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). 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: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For Open Access articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for: Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>. Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open Access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An Open Access publication fee is payable by authors or their research funder

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No Open Access publication fee

All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY): lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology),

to text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access. Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The publication fee for this journal is **\$2,200**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Authors must provide and use an email address unique to themselves and not shared with another author registered in EES, or a department.

Referees

Authors are required to submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of 3 potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

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.

Use of wordprocessing software 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 co-authors. 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.

Article structure

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.

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full

postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The abstract should not exceed 150 words.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' is ambiguous and should not be used.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts. TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black e white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Please insert the following text before the standard text - 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.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or

on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. 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.

Example: CTAHR (College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawaii). Tea (*Camellia sinensis*) a New Crop for Hawaii, 2007. URL http://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/tea_04_07.pdf. Accessed 14.02.11.

All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. See Types of Paper for reference number limits. 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 e 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.

Reference style

Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be ordered from <http://books.apa.org/books.cfm?id=4200067> or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK.

List: references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., e Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., e White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., e Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, e R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution 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 provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with 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>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes) Further considerations
- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

Additional information

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.

Use of the Digital Object Identifier

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. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*): <http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059> When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our ProofCentral system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately - please upload all of your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

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). For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints/myarticlesservices/booklets>).

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQ> and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.