

CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA ENZIMÁTICO DE HEPATOPÂNCREAS DE LAGOSTA DO GÊNERO *PANULIRUS* WHITE.

Silvana Saker-Sampaio¹
Gustavo Hitzschky Fernandes Vieira²
Alexandre Holanda Sampaio³
Grace Nazareth Diogo Theophilo⁴

Laboratório de Ciências do Mar
Universidade Federal do Ceará
Fortaleza — Ceará — Brasil

As lagostas *Panulirus argus* (Latreille) e *Panulirus laeviscauda* (Latreille) estão incluídas entre os principais recursos pesqueiros do Nordeste brasileiro, sendo uma importante fonte de divisas para o Estado do Ceará.

A pesca da lagosta consiste em uma atividade voltada prioritariamente para a exportação onde somente a carne da cauda possui valor econômico. Assim, no momento da captura, esses animais são descabeçados e seus cefalotórax lançados ao mar. Conseqüentemente, muitas substâncias que poderiam ser extraídas do cefalotórax são desperdiçadas, do mesmo modo que, uma gama de produtos, que também poderiam ser obtidos a partir desta matéria-prima.

No processo metabólico dos crustáceos, o hepatopâncreas — localizado no cefalotórax, como as demais vísceras, desempenha papel central, atuando como armazenador de gordura, glicogênio e cálcio (Passano, 1960 ; Van Weel, 1974). Segundo Travis (1955) o hepatopâncreas atua na segregação das enzimas digestivas, absorção e transformação do alimento, sendo o maior depósito de estocagem das reservas orgânicas e minerais e, conseqüentemen-

te, o órgão mais importante sob o aspecto de que, a partir dele, tais reservas são mobilizadas quando requeridas por outros tecidos.

Muitos trabalhos têm indicado que os organismos marinhos são produtores de enzimas proteolíticas, as quais parecem ser mais estáveis e de maior atividade do que aquelas extraídas de bovinos (Siebert, 1958 ; Reek & Neurath, 1972 ; Titani *et al.*, 1983 ; Simpson & Haard 1984).

No Brasil tem havido pouco empenho no estudo para a elaboração de produtos nobres, apesar do grande potencial existente. Somente no ano de 1985 o Brasil importou 204 toneladas de enzimas, a um custo de US\$ 4,7 milhões, cujo destino foi principalmente, as indústrias alimentícia e farmacêutica (Revista Brasileira de Tecnologia, 1988).

A matéria-prima para extração de proteases existe em abundância no Nordeste brasileiro, podendo ser oriunda de subprodutos do pescado. No caso particular de hepatopâncreas de lagosta como fonte de proteases, sua produção somente em Fortaleza — Ceará foi da ordem de 266 toneladas durante o ano de 1987.

As enzimas proteolíticas ou proteases atuam na hidrólise da molécula de proteína através do rompimento das ligações peptídicas, dando como resultado, compostos de estruturas mais simples; sendo amplamente empregadas na indústria alimentícia como auxiliar nos produtos de panificação, no amaciamento de carnes, no processo de clarificação de cervejas, como agente coagulante na manufatura de queijos, no enriquecimento de resíduos alimentares. Além

(1) Engenheiro de Pesca do Laboratório de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará.

(2) Professor Adjunto do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará e Bolsista-pesquisador do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

(3) Engenheiro de Pesca do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Ceará.

(4) Engenheiro de Pesca graduado pela Universidade do Ceará.

de sua aplicação na indústria de alimentos, as proteases também são largamente utilizadas na fabricação de produtos farmacêuticos, cosméticos e nos curtumes para limpeza e tratamento de couros e peles.

A grande importância das enzimas proteolíticas, nas mais diversas aplicações e, ainda, a utilização de uma fonte barata e abundante são os argumentos básicos para justificar a pesquisa em questão. Assim, o estudo das características do sistema enzimático presente em hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White e, a possibilidade de seu aproveitamento para elaboração de um produto nobre, incentivaram a realização deste trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

As lagostas do gênero *Panulirus* White foram capturadas na Costa de Fortaleza e adquiridas vivas junto à Colônia de Pescadores do Mucuripe em Fortaleza — Ceará.

Os hepatopâncreas foram removidos dos cefalotórax e, em seguida, macerados em graal de porcelana e homogeneizados em Potter (TRI — R STIR — R modelo K 41) a aproximadamente 8.000 rpm por 2 minutos a 4°C.

Os hepatopâncreas homogeneizados foram suspensos em acetona (— 15°C), na proporção de 1 : 5 (p/v) e deixados em agitação por 1 hora. Após este período, o material foi filtrado a vácuo e ressuspenso em acetona. Esta operação foi repetida mais duas vezes, sendo por último feito um tratamento com acetona e éter etílico na proporção de 1:1 a — 15°C e, em seguida, filtrando o material a vácuo e obtendo o pó cetônico.

A partir do pó cetônico foi preparado um extrato na proporção de 1:100 (p/v) em tampão fosfato 0,01 M contendo cloreto de sódio 0,1 M pH 7,0, por homogeneização em Potter durante 1 minuto a 5.000 rpm, centrifugação (centrífuga IEC modelo HT) 20.000 x g por 30 minutos a 4°C e filtração em papel Whatman 42.

O extrato assim obtido, denominado extrato bruto, foi utilizado para determinação de proteína e atividade proteolítica.

Ao extrato bruto de hepatopâncreas foi adicionado, gradualmente, sulfato de amônio — (NH₄)₂ SO₄ sólido de modo a atingir 20% de saturação. O precipitado foi removido por centrifugação a 20.000 x g por 30 minutos a

4°C. O sobrenadante resultante foi usado para as próximas precipitações com 40, 60 80 e 100% de saturação com (NH₄)₂ SO₄. Os precipitados obtidos foram suspensos em tampão fosfato 0,01 M contendo cloreto de sódio 0,1 M pH 7,0 e dialisados contra água destilada a 4°C, durante um período de tempo suficiente para que a reação entre a água e o hidróxido de bário apresentasse resultado negativo.

As frações obtidas, denominadas 0/20, 20/40, 40/60, 60/80 e 80/100, foram suspensas em tampão fosfato 0,01 M contendo cloreto de sódio 0,1 M pH 7,0.

No extrato bruto e nas frações obtidas por fracionamento com (NH₄)₂ SO₄ o teor de proteína foi determinado pelo método do microbiureto (Goa, 1953), usando como padrão a albumina sérica bovina (Sigma).

Nos ensaios posteriores ao fracionamento por precipitação com (NH₄)₂ SO₄ a concentração de proteína foi determinada pelo método do Folin (Lowry *et al.*, 1951), usando como padrão a tirosina (Merck).

A atividade enzimática foi definida como a capacidade de hidrolisar a caseína ou hemoglobina.

A reação enzimática, com 10 ml de volume final, desenvolveu-se pela adição de 1,0 ml do extrato bruto de hepatopâncreas de lagosta a 5,0 ml de hemoglobina (Sigma) a 1% em solução tampão citrato ou caseína (segundo Hammarsten, E. Merck AG Darmstadt) a 1% em solução tampão fosfato ou borato.

A incubação foi realizada à temperatura de 40°C por 60 minutos em banho—maria (Unitemp — Fanen). Parou-se a reação enzimática com a adição de 1,0 ml de ácido tricloroacético (TCA) a 40% (Ainouz *et al.*, 1972). Após 30 minutos de repouso, a mistura foi filtrada em papel Whatman 42, sendo a atividade proteolítica estimada na fração solúvel em TCA e quantificada pela leitura da absorbância a 750 nm em espectrofotômetro (Bausch & Lomb modelo Spectronic 20), depois da reação com o reagente fenólico de Folin — Ciocalteu (Lowry *et al.*, 1951). O branco da reação foi obtido pela adição do substrato após a colocação do TCA a 40%. Todos os valores de absorbância dos brancos foram subtraídos dos valores das amostras.

Para a determinação da concentração ideal de substrato a ser usada, foram feitos ensaios com caseína (10 a 70 mg), mantendo-se o volume do extrato constante e igual a 1,0 ml. A reação procedeu-se a 40°C por 60 minutos.

A determinação do pH ótimo do sistema enzimático foi estudada no extrato bruto na proporção de 1:100 (p/v), usando-se tampão ácido cítrico 0,1 M — Na₂PO₄ 0,2 M nos pHs 2,6; 3,0; 3,6; 4,0; 4,6 e 5,0, tampão KH₂PO₄ 0,1 M — NaOH 0,1 M nos pHs 6,0; 6,5; 7,0 e 7,5 e tampão KCl + H₃BO₃ 0,5 M — NaOH 0,5M nos pHs 8,0; 8,5; 9,0; 9,5 e 10,0 (Dawson *et al.*, 1969). Os substratos (hemoglobina e caseína a 1 %) também foram preparados nos mesmos intervalos de pH, sendo que de 2,6 a 5,0 o substrato empregado foi a hemoglobina e de 6,0 a 10,0, esta foi substituída pela caseína.

Nas frações obtidas pelo tratamento com (NH₄)₂ SO₄ onde maior atividade enzimática foi observada, outra curva de pH foi efetuada no intervalo de 6,0 a 10,0. As condições de ensaio obedeceram aos mesmos padrões anteriores.

A temperatura e o tempo de reação foram estabelecidos mediante a incubação do ensaio enzimático a 40, 50, 55 e 60° C por 30, 60, 90 e 120 minutos.

A estabilidade térmica foi avaliada submetendo-se o sistema enzimático a pré-incubação em temperaturas de 40, 50 e 60° C por 15, 30, 45 e 60 minutos. Decorrido cada intervalo de tempo, o extrato era retirado do banho-maria e nele determinada a atividade enzimática a 50° C por 60 minutos. Os resultados de atividade proteolítica específica foram transformados em percentagem de atividade, considerando-se 100% a atividade do extrato não submetido ao aquecimento prévio.

O comportamento do sistema enzimático de hepatopâncreas foi pesquisado frente aos compostos: cloreto de cálcio (CaCl₂ · 2H₂O), cloreto de sódio (NaCl), cloreto de ferro III (Fe₃Cl₂ · 6H₂O), etilenodiaminotetracético (EDTA), cloreto de manganês (MnCl₂ · 4H₂O), tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃ · 5H₂O), ácido ascórbico (C₆H₈O₆), ácido cítrico (H₃C₆H₅O₇), 2 — mercaptoetanol (HSCH₂CH₂OH) e bissulfito de sódio (Na₂S₂O₅) na concentração de 1mM. A reação enzimática sem a adição de qualquer reagente químico (controle) foi considerada 100%. A reação ocorreu a 50° C por 60 minutos.

A atividade proteolítica do sistema enzimático de hepatopâncreas foi definida arbitrariamente como unidade de proteinase (U.P.), sendo a quantidade de produto da reação enzimática (50° C e 60 minutos), solúvel em TCA e equivalente a 50 µg de tirosina. Os resultados

dessa atividade proteolítica foram expressos em U.P. /ml e a atividade proteolítica específica, em U.P./mg de proteína.

A partir da fração 20/40, obtida por precipitação do extrato bruto com (NH₄)₂ SO₄, foi preparado um extrato na proporção de 15 mg de liofilizado por ml de tampão fosfato 0,01 M contendo cloreto de sódio 0,1 M pH 7,0, o qual foi passado em coluna de gel de Sephadex G — 100 (Pharmacia), medindo 26 x 1,7 cm. O suporte foi tratado conforme instruções do fabricante (Gel Filtration) e as colunas foram equilibradas e eluídas com o mesmo tampão. Todas as cromatografias foram feitas a temperatura ambiente (ca 26 ° C), usando o fluxo de 30 ml/hora e os efluentes coletados em frações de 3,0 ml, com auxílio de bomba peristáltica (Pharmacia) graduada em 3,4 e coletor Beckman. A eluição foi seguida pela leitura de absorbância em espectrofotômetro (Varian série 634) a 280 nm. Posteriormente, o teor de proteína e a atividade proteolítica foram determinados nos efluentes.

As massas moleculares foram estimadas, usando-se a fórmula de Determan & Michel (1966):

$$\text{Log } M = 5,941 - 0,847 (V_e/V_o),$$

onde:

V_e = volume de eluição

V_o = volume de exclusão

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O primeiro passo para a purificação do sistema enzimático foi o tratamento com (NH₄)₂ SO₄. As frações 20/40 e 40/60 foram aquelas que exibiram maior atividade proteolítica específica (tabela I, figura 1), com recuperação de aproximadamente 9,4 e 18,7% e purificação da ordem de 2,5 e 1,8 vezes, respectivamente.

O fracionamento por precipitação com (NH₄)₂ SO₄ tem sido um processo amplamente utilizado para enzimas proteolíticas (Sundaram & Sarma, 1960; Gates & Travis, 1969; Huang & Tappel, 1971; Bauer & Eitenmiller, 1974 ; Noda & Murakami, 1981 ; Saker *et al.*, 1982 ; Hara *et al.*, 1984 ; Vieira, *et al.*, 1985). De um modo geral, o intervalo de 20 a 80% de saturação é aquele verificado com maior frequência para pescado, embora não seja muito diferente, quando outros materiais são pesquisados (Tallan *et al.*, 1952; Kolszalka & Miller, 1960 ; Martins & Whitaker, 1968; Prisco & Vieira, 1976; Ainouz *et al.*, 1981).

TABELA I

Fracionamento do sistema enzimático presente em hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White por sulfato de amônio.

FRAÇÕES	VOLUME (ml)	PROTEÍNA *		ATIVIDADE PROTEOLÍTICA			RECUPERAÇÃO DA ATIVIDADE (%)	VEZES DE PURIFICAÇÃO
		(mg/ml)	TOTAL (mg)	(UP/ml)	TOTAL (UP)	ESPECÍFICA (UP / mgP)		
Extrato bruto	100	3,07	307	40,26	4.026	13,11	100	1
0/20	50	zero	—	zero	—	—	—	—
20/40	50	0,235	11,75	7,59	379,5	32,30	9,43	2,46
40/60	50	0,657	32,85	15,09	754,5	22,97	18,74	1,75
60/80	50	0,289	14,45	4,77	238,3	16,51	5,92	1,26
80/100	50	zero	—	1,52	76,0	—	—	—

Os dados referem-se à extração de 1 g de pó cetônico.

* A proteína foi determinada pelo método do microbiureto.

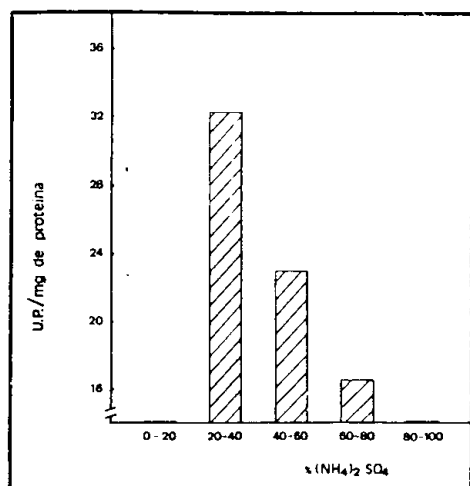


Figura 1 - Atividade proteolítica específica do sistema enzimático presente em hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White, em função do seu tratamento com sulfato de amônio.

A classificação das enzimas proteolíticas digestivas dos invertebrados tem sido frequentemente baseada nos estudos de pH ótimo, utilizando como matéria-prima extratos brutos de tecidos do trato digestivo. Entretanto, tal dado fornece pouca informação sobre a natureza dos componentes proteolíticos envolvidos na digestão da proteína e o pH ótimo, isoladamente, constitui-se um fraco critério de classificação.

A atividade proteolítica do sistema enzimático de hepatopâncreas observada na faixa de pH de 2,6 a 6,0, usando hemoglobina a 1%, como substrato, correspondeu a aproximadamente 30 % da atividade registrada no intervalo de 7,0 a 10,0, com caseína a 1 % (Figura 2).

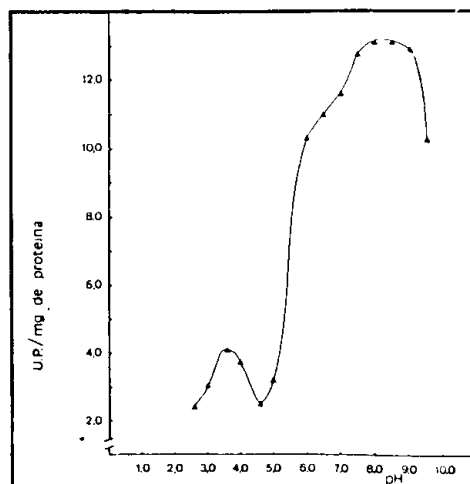


Figura 2 - Variação da atividade proteolítica específica do sistema enzimático presente em hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White no extrato bruto, em função do pH de reação.

Nas frações 20/40 e 40/60 foi elaborada uma nova curva de pH cujos valores variaram de 6,0 a 9,5. O pH ótimo foi, então, estabelecido como sendo igual a 8,0 (Figura 3). Os teores de proteína determinados pelo Folin foram 0,129 e 0,189 mg/mg de liofilizado, respectivamente para as duas frações supra-citadas. Esses valores de concentração de proteína foram os mesmos para todas as determinações dos parâmetros de caracterização do sistema enzimático de hepatopâncreas, exceto quando alguma referência for mencionada.

Estudos de proteases em crustáceos têm revelado, na sua maioria, que as proteases alcalinas são as predominantes; o pH ótimo situa-se em um intervalo mais amplo e a atividade enzimática é mais alta do que aquela observada em peixes (Takahashi *et al.*, 1964 *a* e 1964 *b*; Brockerhoff *et al.*, 1970; Trellu & Ceccaldi, 1976). Segundo Vonk (1960) as enzimas digestivas dos crustáceos e outros invertebrados apresentam muitas semelhanças, quando comparadas com as dos vertebrados, exceto pela ausência de enzimas do tipo pepsínica. Embora de ocorrência muito rara, Lee *et al.* (1980) indicaram a presença de significativa atividade enzimática, inclusive pepsina, em extrato de hepatopâncreas de camarão de água-doce *Macrobrachium rosenbergii*.

Os valores relativos ao estudo do efeito da concentração de substrato sobre a atividade enzimática das frações 20/40 e 40/60 estão mostrados na figura 4, onde a saturação do complexo enzima-substrato ocorreu com 50 mg de caseína. Esse nível de saturação foi semelhante ao encontrado por Groninger Jr. (1964); Makinodan & Ikeda (1969 *a e b*); Saker *et al.* (1982) e Siqueira (1986).

A determinação do tempo e temperatura ótimos de reação mostrou que a 50°C durante 60 minutos, o sistema enzimático exibiu máxima atividade para ambas as frações (Figuras 5 e 6), razão pela qual foram escolhidos para os ensaios.

Outros estudos com crustáceos têm sempre procurado ressaltar que existe uma relação muito estreita entre o tempo e a temperatura de incubação. As enzimas proteolíticas pesquisadas em hepatopâncreas de várias espécies de camarão têm demonstrado que a hidrólise máxima da caseína ocorreu a 49°C em *Penaeus setiferus* (Gates & Travis 1969) e a 55°C com 60 minutos de incubação em *Trachypenaeus curviro-*

tris (Asahara, 1973). As enzimas digestivas de *Penaeus japonicus* (Maugle *et al.*, 1982) e de *P. kerathurus* (Galgani *et al.* 1984) apresentaram atividade maior a 40°C e 50°C, respectivamente, para uma incubação de 30 minutos.

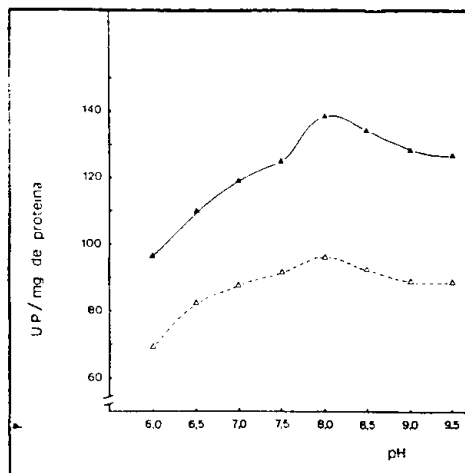


Figura 3 - Variação da atividade proteolítica específica do sistema enzimático presente em hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White, submetido ao fracionamento com sulfato de amônio no intervalo de 20-40% (▲—▲) e 40-60% (△—△) de saturação, em função do pH de reação.

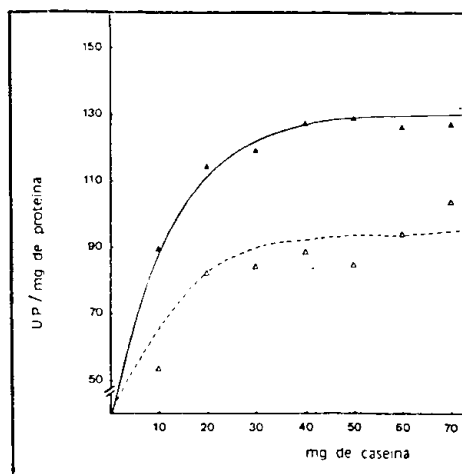


Figura 4 - Variação da atividade proteolítica específica do sistema enzimático presente em hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White, submetido ao fracionamento com sulfato de amônio no intervalo de 20-40% (▲—▲) e 40-60% (△—△) de saturação, em função da concentração de substrato. A reação enzimática foi realizada a 40°C por 60 minutos.

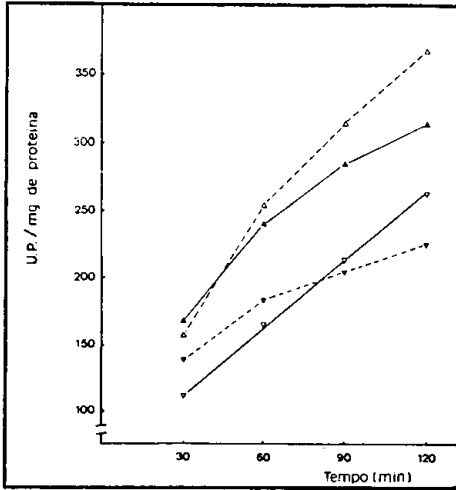


Figura 5 - Variação da atividade proteolítica específica do sistema enzimático presente em hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White, submetido ao fracionamento com sulfato de amônio no intervalo de 20-40% de saturação, em função da temperatura e do tempo de ensaio (40°C ▽; 50°C △; 55°C ▲; 60°C ▼).

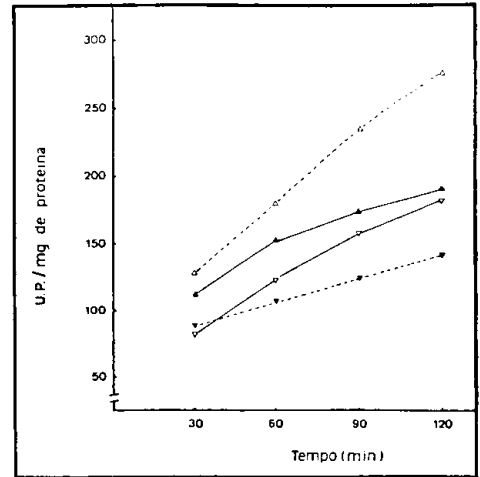


Figura 6 - Variação da atividade proteolítica específica do sistema enzimático presente em hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White, submetido ao fracionamento com sulfato de amônio no intervalo de 40-60% de saturação, em função da temperatura e do tempo de ensaio (40°C ▽; 50°C △; 55°C ▲; 60°C ▼).

Em *Parahaliporus sibogae*, Muramatsu & Kakiuchi (1978) observaram atividade proteolítica máxima a 37° C com 15 minutos de incubação. Outros crustáceos decápodos estudados por Sather (1969) exibiram a mesma temperatura ótima, mas para uma incubação de 4 horas.

A termoestabilidade do sistema enzimático (Figuras 7 e 8) revelou que a 40° C há uma ativação enzimática mesmo após decorridos 60 minutos de incubação. As frações 20/40 e 40/60 exibiram uma perda da ordem de 35 a 37% da atividade inicial após 60 minutos de exposição a 50° C, ao passo que a 60° C a perda foi, em média, 77% com apenas 15 minutos de aquecimento. Essa propriedade, inerente ao sistema enzimático de hepatopâncreas de lagosta, confere uma certa margem de segurança no decorrer da preparação e manuseio do extrato enzimático, sem oferecer grandes riscos de inativação.

Makinodan & Ikeda (1969 a) mostraram que as proteinases alcalinas de músculo de carpa *Cyprinus carpio* foram estáveis a 65° C por 10 minutos, mas a 70° C a perda correspondeu a 50% da atividade original. De modo contrário, as proteinases ácidas parecem menos estáveis ao calor, tendo experimentado inativação quase total pelo aquecimento a 55° C durante 10 minutos (Makinodan & Ikeda, 1969 b).

Também classificadas como termolábeis foram a enzima de músculo de camarão *Penaeus setiferus*, que sofreu inativação total com 10 minutos de exposição a 50° C (Eitenmiller, 1974) e, aquela presente em hepatopâncreas de camarão *Parahaliporus sibogae* (Muramatsu & Kakiuchi, 1978), cuja perda de 50% da atividade foi registrada a 50° C por 15 minutos.

A maioria das enzimas pode experimentar alguma alteração em sua atividade quando em contato com certos compostos químicos, os quais podem ativar ou inibir a velocidade de reação.

A fração 20/40 sofreu inibição da atividade original em 60, 40 e 11% na presença de $HgCl_2$, EDTA e $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ a 1 mM, respectivamente. Entretanto, o $Na_2S_2O_5$ provocou uma ativação da ordem de 10% e os demais compostos não interferiram sobre a atividade do sistema enzimático (Tabela II).

Para a fração 40/60, $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$, $C_6H_8O_6$ e $Na_2S_2O_5$ foram responsáveis pelo aumento de 8, 30 e 32%, respectivamente na atividade inicial. Por outro lado, $HgCl_2$, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, EDTA, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $H_3C_6H_5O_7$ e $HSCH_2CH_2OH$ inibiram fortemente a atividade e, os demais não tiveram qualquer influência sobre a atividade enzimática (Tabela II).

A proteinase de hepatopâncreas de camarão *Trachypenaeus curvirostris* foi ativada pelo

tiosulfato de sódio, hidroquinona, íons de manganês, magnésio, lítio e cálcio e, inibida pelo 2-mercaptoetanol, ácido ascórbico, ácido cítrico, EDTA, íons de ferro II e ferro III, mercúrio e chumbo (Asahara, 1973). Sakai & Matsumoto (1981) observaram que a proteinase ácida de músculo de lula *Ommastrephes sloani pacificus* experimentou incremento em sua atividade com a adição de EDTA.

A fração 20/40 submetida à filtração em gel de Sephadex G - 100 (Figura 9) apresentou três picos (I, II e III), cujas massas moleculares foram estimadas em 124.000, 34.000 e 6.000 daltons, respectivamente.

Os efluentes da coluna foram testados para a atividade proteolítica (pH 8,0), mostrando que provavelmente duas enzimas estão presentes em hepatopâncreas de lagostas do gênero *Panulirus* White.

CONCLUSÕES

1 - O sistema enzimático de hepatopâncreas de lagosta apresentou máxima atividade proteolítica específica em pH 8,0, usando caseína 1% como substrato.

2 - A temperatura ótima foi 50°C com o tempo de incubação da mistura de reação igual a 60 minutos.

3 - A saturação do complexo enzima-substrato ocorreu com 50 mg de caseína.

4 - O sistema enzimático foi considerado termoestável, com perda significativa de atividade somente quando submetido a 60°C.

5 - As frações 20/40 e 40/60 oriundas do tratamento por precipitação com sulfato de amônio foram as que revelaram maior atividade proteolítica específica, aumentando a atividade original em 2,5 e 1,8 vezes, correspondendo a uma recuperação de 9,4 e 18,7%, respectivamente.

6 - A atividade registrada na fração 20/40 foi inibida pelo HgCl_2 , EDTA e $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 1mM.

7 - A fração 40/60 foi ativada quando em contato com $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ e $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, sendo inibida por $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, EDTA, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ e $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$.

8 - A filtração em gel de Sephadex G - 100, a partir da fração 20/40, permitiu a observação de duas enzimas, cujas massas moleculares foram estimadas em 124.000 e 34.000 daltons.

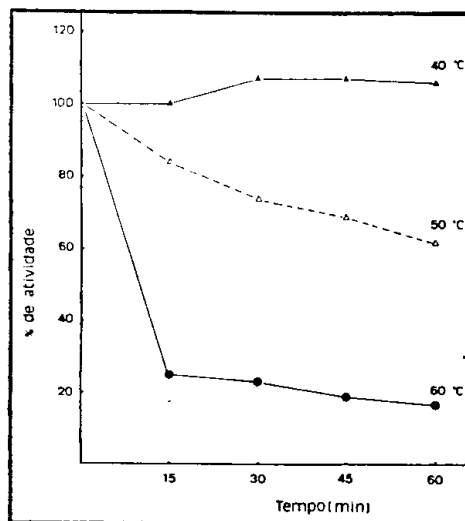


Figura 7- Variação percentual da atividade proteolítica específica do sistema enzimático presente em hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White, submetido ao fracionamento com sulfato de amônio no intervalo de 20-40% de saturação e pré-incubação a 40 (▲—▲) 50 (△—△) e 60°C (●—●), em função do tempo.

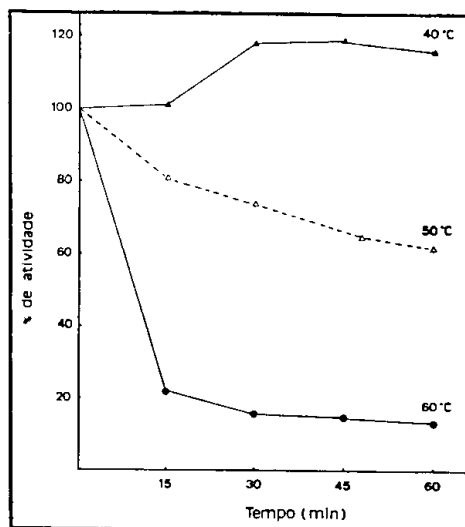


Figura 8- Variação percentual da atividade proteolítica específica do sistema enzimático presente em hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White, submetido ao fracionamento com sulfato de amônio no intervalo de 20-40% de saturação e pré-incubação a 40 (▲—▲) 50 (△—△) e 60°C (●—●), em função do tempo.

TABELA II

Dados relativos à ação de compostos químicos, com concentração igual a 1 mM, sobre a atividade proteolítica específica do sistema enzimático de hepatopâncreas de lagosta *Panulirus White*, nas frações obtidas pelo fracionamento com sulfato de amônio no intervalo de 20-40 e 40-60% de saturação.

COMPOSTOS QUÍMICOS (1 mM)	FRAÇÃO					
	20/40			40/60		
	Atividade UP/mg liofiliz.	proteolítica Específica (UP/mg Proteína)	% de atividade	Atividade UP/mg liofiliz.	proteolítica Específica (UP/mg/Proteína)	% de atividade
CONTROLE	38,51	298,53	100,0	41,67	220,45	100,0
CaCl ₂ ·2H ₂ O	39,86	309,01	103,5	38,29	202,57	91,9
HgCl ₂	15,31	118,72	39,8	14,64	77,45	35,1
NaCl	36,93	286,31	95,9	40,54	214,49	97,3
FeCl ₃ · 6H ₂ O	36,03	279,33	93,6	17,12	90,56	41,1
EDTA	22,97	178,07	59,7	25,22	133,46	60,5
MnCl ₂ ·4H ₂ O	37,84	293,30	98,3	32,66	172,78	78,4
Na ₂ S ₂ O ₃ · 5H ₂ O	34,23	265,36	88,9	45,04	238,32	108,1
Ácido ascórbico	37,39	289,81	97,1	54,05	285,98	129,7
Ácido cítrico	37,39	289,81	97,1	35,58	188,27	85,4
2 - mercaptoetanol	35,58	275,84	92,4	36,93	195,42	88,7
Na ₂ S ₂ O ₅	42,34	328,21	109,9	55,18	291,94	132,4

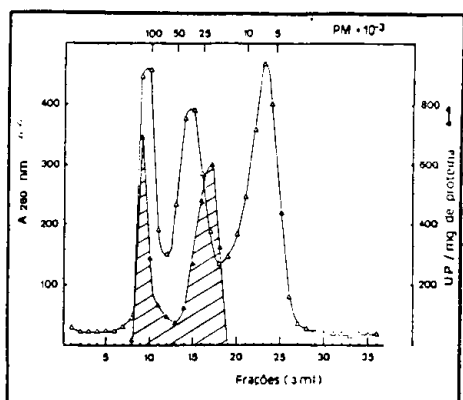


Figura 9 - Filtração em gel de Sephadex G-100 da fração obtida por precipitação do extrato de hepatopâncreas de lagosta do gênero *Panulirus* White com sulfato de amônio no intervalo de 20-40% de saturação.

SUMMARY

The present research work is aimed at supplying information about the characterization of the enzymatic system in the hepatopancreas of lobsters of genus *Panulirus* White.

The enzymatic reaction was developed by adding 1.0 ml of the raw extract either at 5.0 ml of bovine hemoglobin (Sigma) or casein (according to Hammarsten, E. Merck AG Darmstadt) both at 1%. The incubation occurred at 40° C for sixty minutes, and once it is finished, the reaction was stopped with 1.0ml of trichloroacetic acid at 40%. The absorbance reading at 750nm in a Bausch & Lomb Spectronic 20 spectrophotometer was taken after the reaction with Fenol phenolic reagent.

The interval of optimum pH initially established for the reaction ranged from 7.5 to 9.0. However, after the fractioning by precipitation with ammonium sulphate the reaction reached its maximum activity at pH 8.0.

The best temperature for the development of the reaction was attained at 50° C during a sixty-minute incubation.

The chosen quantity of substrate was 50mg of casein at 1% for 0.5 ml of the extract containing 1 mg of lyophilized in 3.0ml of buffer with an incubation at 50° C for sixty minutes.

The enzymatic system of the lobster's hepatopancreas under a temperature of 40° C was slightly activated even after sixty minutes had elapsed. The fractions 20/40 and 40/60 showed a loss of about 35 to 37% of activity after sixty

minutes at 50° C. When the temperature was 60° C with a fifteen-minute heating of the extract there occurred an average reduction of 77%.

The 20/40 fraction underwent activity inhibition through the addition of mercury chloride ($HgCl_2$), etilenodiaminotetracetic acid (EDTA) and sodium tiosulphate ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) at 1mM. The fraction 40/60 was activated by sodium tiosulphate ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$), ascorbic acid ($C_6H_8O_6$) and sodium bisulphite ($Na_2S_2O_5$) at 1mM and inhibited by mercury chloride ($HgCl_2$), iron chloride III ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$), etilenodiaminotetracetic acid (EDTA), manganese chloride ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$), citric acid ($H_3C_6H_5O_7$) and 2-mercaptoethanol ($HSCH_2CH_2OH$) at 1mM.

The enzymatic system present in the hepatopancreas of lobsters of genus *Panulirus* White displayed activity comparable to the one found for three commercial enzymes A, B and C, despite the still very high protein concentration, owing to the primary state of purification in which is the enzymatic system of hepatopancreas, only considering the fractioning by precipitation with ammonium sulphate - $(NH_4)_2SO_4$.

After the material elution in a Sephadex G - 100 column gel, the specific proteolytic activity assumes a superior value ranging 1.5 to 2.5 times that found for the commercial proteases.

BIBLIOGRAFIA

- AINOUZ, I.L.; N.B. Benevides & A.L.P. Freitas - Proteolytic activities in seeds of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Biol. Plant.*, **23**(2): 133-40, 1981.
- AINOUZ, I.L.; J. Xavier-Filho & E. Gomes-Filho - Atividade proteolítica em sementes de *Vigna sinensis* seridó. *Ciê. Cult.*, **24**: 104, 1972.
- ASAHARA, M. Studies on proteolytic enzyme in the liver of shrimp, *Trachypenaeus curvirostris*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **39** (9): 987-91, 1973.
- BAUER, B.A. & R.R. Eitenmiller - A study of some kinetic properties of partially purified *Penaeus setiferus* arylamidase. *J. Food. Sci.*, **39**: 10-14, 1974.
- BROCKERHOFF, H.; R.J. Hoyle & P.C. Hwang - Digestive enzymes of the American lobster (*Homarus americanus*). *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **27**(8): 1357-70, 1970.
- DAWSON, R.M.C.; D.C. Elliot; W.H. Elliot & K.M. Jones - *Data for biochemical research*. 2. ed. Oxford University Press, xi + 654pp, 1969.

- DETERMAN, H. & W. Michel—The correlation between molecular weight and elution behavior in the gel chromatography of proteins. **J. Chromatog.**, **25**: 303-13, 1966.
- EITENMILLER, R.R.—Cathepsin activity of *Penaeus setiferus* muscle. **J. Food Sci.**, **39**: 6-9, 1974.
- GALGANI, F.G.; Y. Benyamin & H.J. Ceccaldi — Identification of digestive proteinases of *Penaeus kerathurus* (Forsk.) : a comparison with *Penaeus japonicus* Bate. **Comp. Biochem. Physiol.**, **78 B** (2): 355-61, 1984.
- GATES, B.J. & J. Travis—Isolation and comparative properties of shrimp trypsin. **Biochem.**, **8** (11): 4483-89, 1969.
- GOA, J. — A. micro biuret method for protein determination. Determination of total protein in cerebrospinal fluid. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, **5**: 218-22, 1953.
- GRONINGER Jr., H.S.—Partial purification and some properties of a proteinase from Albacore (*Germo alalunga*) muscle. **Arch. Biochem. Biophys.**, **108**: 175-82, 1964.
- HARA, K.; H. Arano & T. Ishihara—Purification of alkaline protease of rotifer *Brachionus plicatilis*. **Bull. Japan Soc. Sci. Fish.**, **50**(9): 1605-09, 1984.
- HUANG, F.L. & A.L. Tappel—Action of cathepsins C and D in protein hydrolysis. **Biochem. Biophys. Acta**, **236**: 739-48, 1971.
- KOSZALKA, T.R. & L.L. Miller — Proteolytic activity of rat skeletal muscle. II. Purification and properties of an enzyme active optimally at pH 8,5 to 9,0. **J. Biol. Chem.**, **235** (3): 669-72, 1960.
- LEE, P.G.; N.J. Blake & G.E. Rodrick—A quantitative analysis of digestive enzymes for the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Proc. World Maricul. Soc.**, **11**: 392-402, 1980.
- LOWRY, O.H.; N.J. Rosenbrough; A.L. Farr & R.J. Randall — Protein measurements with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, **193**: 265-75, 1951.
- MAKINODAN, Y. & S. Ikeda—Studies on fish muscle protease. II. Purification and properties of a proteinase active in slightly alkaline pH range. **Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.**, **35** (8): 749-51, 1969.
- MAKINODAN, Y. & S. Ikeda—Studies on fish muscle protease. III. Purification and properties of a proteinase active in acid pH range. **Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.**, **35** (8): 758-66, 1969.
- MARTINS, C.B. & J.R. Whitaker—Catheptic enzymes and meat tenderization. 1. Purification of cathepsin D and its action on actomyosin. **J. Food Sci.**, **33** (1): 59-64, 1968.
- MAUGLE, P.D.; O. Deshimaru; T. Katayama & K.L. Simpson—Characteristics of amylase and protease of the shrimp *Penaeus japonicus*. **Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.**, **48**(12): 1753-57, 1982.
- MURAMATSU, T. & H. Kakiuchi—Proteolytic activity of extracts from the hepatopancreas of shrimp, *Parahaliporus sibogae* (De Man). **Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.**, **44** (2): 171- 74, 1978.
- PASSANO, L.M. — Molting and its control, pp. 473-536, In: Waterman, T.H. (ed.), **The physiology of crustacea**, London, Vol. I. Academic Press, xvii + 670pp. London, 1960.
- PRISCO, J.T. & G.H.F. Vieira—Effects of NaCl salinity on nitrogenous compounds and proteases during germination of *Vigna sinensis* seeds. **Physiol. Plant.**, **36**: 317- 20, 1976.
- REECK, G.R. & H. Neurath — Pancreatic trypsinogen from the African lungfish. **Biochem.**, **11** (4): 503- 10, 1972.
- Revista Brasileira de Tecnologia — IPT, décadas de pesquisas. S. Paulo, **19** (2): 6-13, 1988.
- SAKAI, J. & J.J. Matsumoto. Proteolytic enzymes of squid mantle muscle. **Comp. Biochem. Physiol.**, **68 B**: 389- 95, 1981.
- SAKER, S.A.; G.H.F. Vieira & A.H. Sampaio—Ensaio preliminar ao estudo de caracterização e propriedades de enzimas proteolíticas em hepatopâncreas de jovens da lagosta *Panulirus laeviscauda* (Latreille). **Arq. Ciên. Mar**, **22** (1/2): 57-66, 1982.
- SATHER, B.T.—A comparative study of amylases and proteinases in some decapode crustacea. **Comp. Biochem. Physiol.**, **28**: 371- 79, 1969.
- SIEBERT, G.—Aktivität eiweiss spaltender enzyme in fischen. **Experientia**, **XIV** (2): 65- 5, 1958.
- SIMPSON, B.K. & N.F. Haard—Purification and characterization of trypsin from the Greenland cod (*Gadus ogac*). 1. Kinetic and thermodynamic characteristics. **Can. J. Biochem. Cell Biol.**, **62**: 894-900, 1984.
- SIQUEIRA, G.N.V.D. Caracterização preliminar de proteases em fígado de cangulo *Balistes vetula* Linnaeus. Fortaleza, 1986 (monografia de Graduação. Departamento de Engenharia de Pesca. UFC).
- SUNDARAM, S. & P.S.—Sarma—Purification and properties of a protease from the gut of *Eetroplus suratensis*. **Biochem.**, **77**: 465- 71, 1960.
- TAKAHASHI, T.; T. Morishita & S. Tachino — Studies on the digestive enzymes of spiny lobster, *Panulirus japonicus* (V. Siebold). **Rep. Fac. Fish., Prefectural Uni. Mie**, **5** (1): 127- 35, 1964.
- TAKAHASHI, T.; T. Morishita & S. Tachino — On the proteolytic enzyme of liver in marine animal. **Rep. Fac. Fish., Prefectural Uni. Mie**, **5** (1): 137- 44, 1964.
- TALLAN, H.H.; M.E. Jones & J.S. Fruton—On the proteolytic enzymes of animal tissues. X. Beef spleen cathopsin C. **J. Biol. Chem.**, **194** (2): 793-805, 1952.
- TITANI, K.; T. Sasagawa; R.G. Woodbury; L.H. Ericsson; H. Dörsam; M. Kraemer; H. Neurath & R. Zwilling—Amino acid sequence of crayfish (*Astacus fluviatilis*) trypsin II. **Biochem.**, **22**: 1429-55, 1983.
- TRAVIS, D.F.—The molting cycle of spiny lobster, *Panulirus argus* Latreille. II. Pre-ecdysial histological and histochemical changes in the hepatopancreas and integumental tissues. **Biol. Bull.**, **108**: 88-112, 1955.
- TRELLU, J. & H.J. Ceccaldi—Variations des activités enzymatiques de l'hépatopancréas et du muscle de *Palaemon serratus* Pennant (Crustacé Décapode) au cours dy cycle d'intermue. **Société de Biologie de Marseille**: 115- 20, 1976.

VAN WEEL, P.B.—“Hepatopancreas”? Review article
Comp. Biochem. Physiol., **47 A**: 1-9, 1974.

VIEIRA, G.H.F.; L.C. Silva; S. Saker-Sampaio & A.H.
Sampaio.—Ensaio preliminar ao estudo das protea-
ses em hemolinfa de jovens da lagosta *Panulirus*
laevicauda (Latreille). *Arq. Ciên. Mar*, **24**: 73- 9,
1985.

VONK, H.J.—Digestion and metabolism, pp. 291-316,
in Waterman T.H. (ed.), London, *The physiology*
of crustacea. Vol. 1. Academic Press, xvii +
670 pp., 1960.
