

ESTUDO DA BARRIGA-PRETA EM CAUDAS DE LAGOSTA DO GÊNERO *PANULIRUS* WHITE. IV – ENSAIO PRELIMINAR SOBRE FENOLASES

Masayoshi Ogawa⁽¹⁾

Ikuo Ochiai⁽²⁾

Takahiro Kurotsu⁽²⁾

Tsuneo T. Kozima⁽²⁾

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

Atualmente, vem sendo aceito que o fenômeno da *barriga-preta* (melanose) em camarão, lagosta e *krill* deve-se a uma reação enzimática oxidativa (Alford & Fieger, 1952; Faulkner *et al.*, 1954; Bailey *et al.*, 1960a,b; Kakimoto & Kanazawa, 1956a,b; Noguchi *et al.*, 1979) na qual tomam parte enzimas do grupo fenolase.

Com relação à lagosta, Ogawa *et al.* (1983b e 1985) definiram a referida reação como sendo induzida por um desequilíbrio na distribuição de substâncias (enzimas e substrato) no animal vivo, que sofre traumatismo, etc. Conseqüentemente, este apresentará manchas pretas durante a conservação em gelo ou sob congelamento.

No presente trabalho, procuramos confirmar a existência de enzimas fenolases, bem como verificar, a nível preliminar, algumas de suas características.

MATERIAL E MÉTODOS

Lagostas da espécie *Panulirus japonicus* (von Siebold) foram adquiridas vivas em Ohara e Katsuura (Província de Chiba, Japão) e Omaezaki e Península Izu (Província de Shizuoka, Japão), durante o período de agosto a outubro de 1980. O comprimento e o peso total dos exemplares variaram de 14,4 a 24,5 cm e de 121 a 360 gramas.

Preparação de enzimas brutas

Após a lavagem das lagostas vivas, retiramos, com o auxílio de tesoura de aço inoxidável, a cutícula e película ventrais da cauda, as guelras, vísceras e gônadas, bem como a cutícula fina e membrana internas do cefalotórax (Extrato I).

Quanto ao Extrato II, constou da hemolinfa retirada de lagostas vivas, mediante a prática de pequenos cortes na região ventral da junção cauda/cefalotórax.

Para a obtenção de enzimas brutas de ambos os extratos, seguimos o método de Oshima (1980), com ligeiras modificações (figura 1).

(1) Professor Adjunto do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará e Pesquisador do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

(2) Department of Food Technology and Engineering, Tokyo University of Fisheries, Japan.

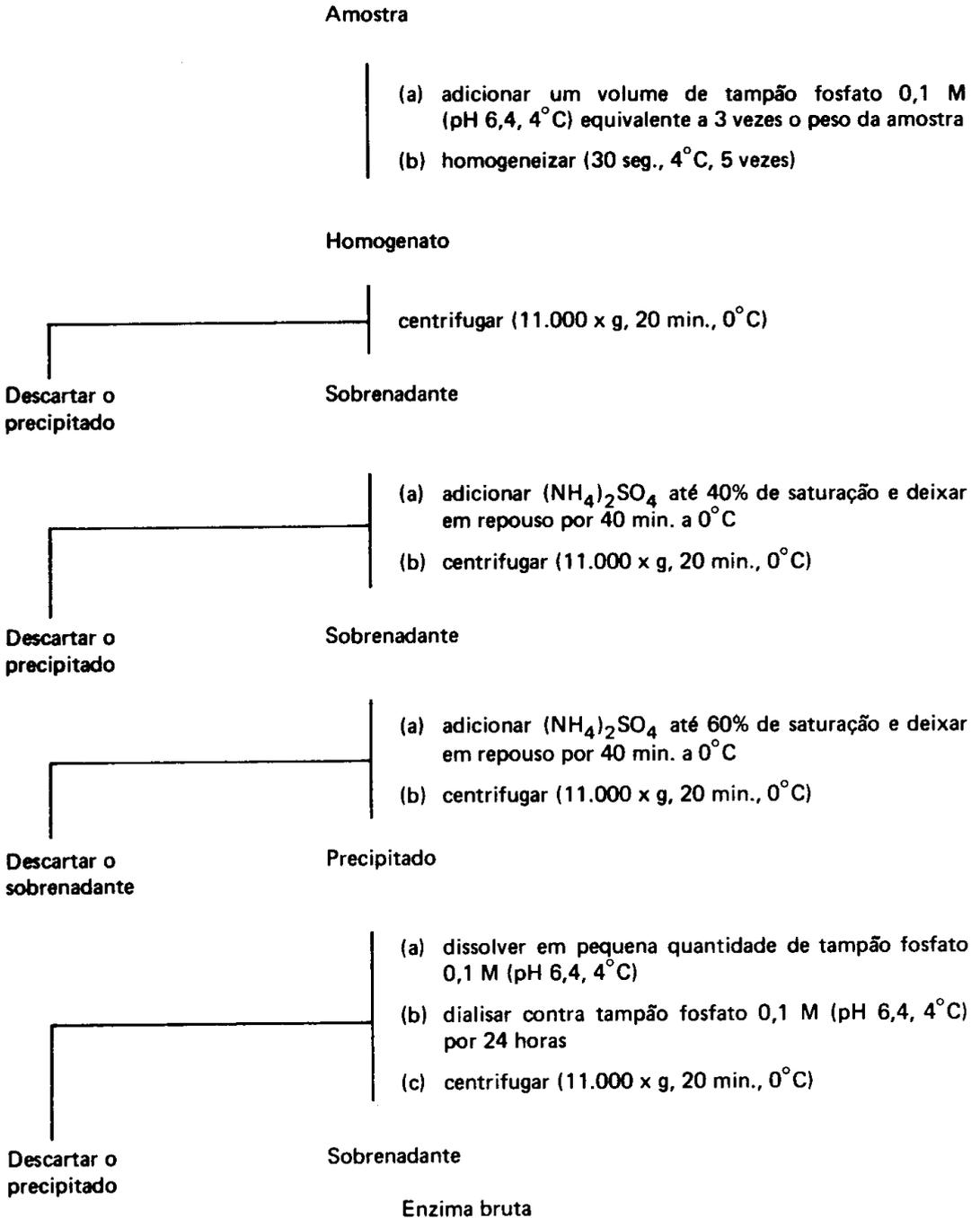


Figura 1 – Fluxograma de preparação de enzima bruta de lagosta.

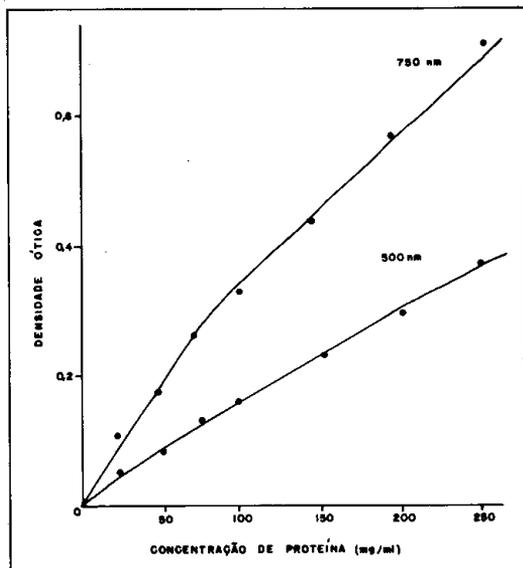


Figura 2 - Curvas padrão da relação entre densidade óptica e concentração de proteína pelo método modificado de Lowry.

A concentração de proteínas dos extratos enzimáticos foi avaliada pelo método modificado de Lowry (Umemoto, 1974), utilizando-se ovoalbumina (Wako Pure Chemical) e a curva padrão constante da figura 2.

Eletroforese em gel de poliacrilamida

Neste ensaio consideramos os métodos descritos por Ui *et al.* (1976) e o empregado por Oshima (1980) para o *krill*, *Euphausia superba*.

De cada extrato enzimático utilizamos 50 μ l (30 μ g de proteína) por tubo de vidro de 5 mm (diâmetro interno) x 70 mm (altura), ajustando-se a concentração e pH do gel para 7% e 9,5, respectivamente.

Inicialmente carregamos a coluna com 2mA, estabilizando-a em 3 mA quando o extrato alcançou o gel de separação. Utilizou-se um disco eletroforético SJ-1060-DC, Atto Corp. e um estabilizador VC. SJ-1061, Atto Corp. Todas as operações foram conduzidas em câmara resfriada pré-moldada, num ambiente de 4°C.

As colunas de gel foram imersas em fenilendiamina 0,1%, durante 20

minutos (Halim & Montgomery, 1978) ou tratadas com negro de amido 10B, e decoloradas segundo o método usual do ácido acético.

Estimação da atividade enzimática

Método da espectrofotometria

Esta técnica foi utilizada somente para o Extrato I. A fim de determinar a atividade enzimática desta amostra, empregamos catecol como substrato.

Desde que oxidado na presença de uma enzima, este o-difenol se transforma em o-benzoquinona. Esta substância, por sua vez, reage por via oxidativa não enzimática com a L-prolina, originando-se um pigmento violeta estável.

Estimou-se a formação do referido pigmento através dos métodos de Onishi *et al.* (1978) e Oshima (1980).

A reação foi conduzida em cubeta a 1 cm, a 25°C, sendo a absorbância lida após 1 e 4 minutos, a 530 nm, utilizando-se espectrofotômetro UV-365, Shimazu Seisakusho, dotado de registrador.

Para o cálculo da atividade enzimática empregamos a seguinte fórmula:

$$\frac{(E_2 - E_1) - \text{Branco}}{3} \times \frac{1}{\text{Concentração de substrato (M)}} \times \frac{100}{\text{proteína (mg)}}$$

onde E_1 e E_2 representam as absorbâncias após 1 e 4 minutos de reação.

Para determinarmos a influência da concentração de enzima no desenvolvimento da reação, utilizamos 0,2 ml de catecol 0,5 M + 0,2 ml de L-prolina 0,5 M + quantidades variáveis do extrato enzimático (350 μ g/ml de proteína), levando-se o volume final para 3,0 ml com tampão fosfato 0,1 M a pH 6,4. Elaboramos um branco substituindo o extrato enzimático por água destilada.

Quanto à influência da concentração do substrato no desenvolvimento da reação, esta se processou em meio contendo 0,2 ml de enzima + 0,2 ml de L-prolina 0,5 M + 2,4 ml de tampão

fosfato 0,1 M a pH 6,4 + 0,2 ml de catecol variando de 0,1 a 1,0 M. Na elaboração do branco, utilizamos água destilada ao invés do substrato.

A fim de avaliar a influência do pH no desenvolvimento da reação, fizemos variar este parâmetro em meio contendo 0,2 ml de enzima + 0,2 ml de catecol 0,5 M + 0,2 ml de L-prolina 0,5 M + 0,2 ml de L-prolina 0,5 M + 2,4 ml de tampão McIlvaine. Preparou-se um teste branco mediante substituição do extrato enzimático por tampão.

Método do eletrodo de oxigênio

Neste estudo consideramos os Extratos enzimáticos I e II.

Utilizamos um eletrodo galvânico do tipo Bioxygraph, da Kyusui Chemical Laboratory, conectado a um registrador de alta sensibilidade (FB-EB, da Chino Seisakusho).

Estimou-se a diminuição da demanda de oxigênio através da oxidação enzimática do catecol.

Tendo em vista equilibrar o oxigênio dissolvido, utilizou-se uma solução de tampão fosfato 0,1 M, após permanecer em repouso por 3 dias a 25°C.

No estudo da relação entre concentração e atividade enzimáticas, levamos a efeito reações em recipiente do "Bioxygraph", utilizando-se 0,3 ml de catecol 0,5 M e diferentes alíquotas do extrato enzimático, sendo o volume completado para 3,2 ml com tampão fosfato 0,1 M a pH 6,4.

Para verificarmos a influência da concentração do substrato frente à atividade enzimática, utilizamos 2,4 ml de tampão fosfato nas mesmas condições acima, 0,3 ml de catecol nas concentrações de 0,3, 0,4, 0,5 e 0,6 M, e 0,5 ml de extrato enzimático.

Quanto ao estudo do pH, utilizamos um meio contendo 0,3 ml de catecol 0,1 M, 2,4 ml de tampão fosfato (pH 4,0 a 7,0) e 0,5 ml de extrato enzimático. Após cada reação, efetuou-se

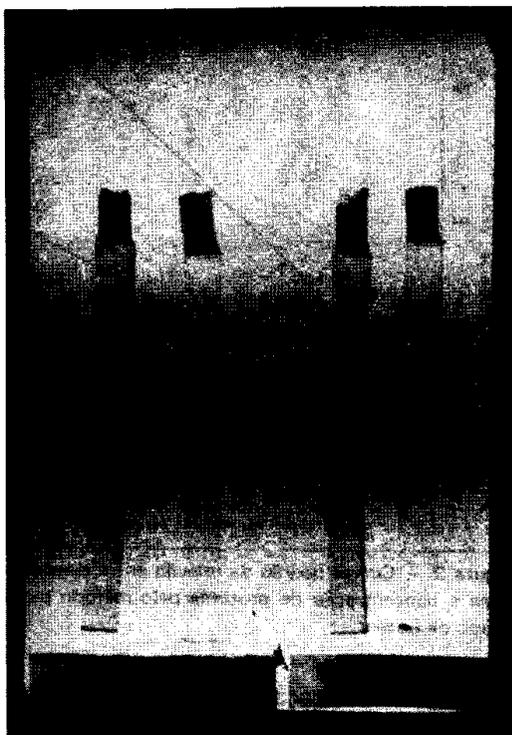


Figura 3 — Revelações eletroforéticas de enzimas dos extratos brutos I e II.

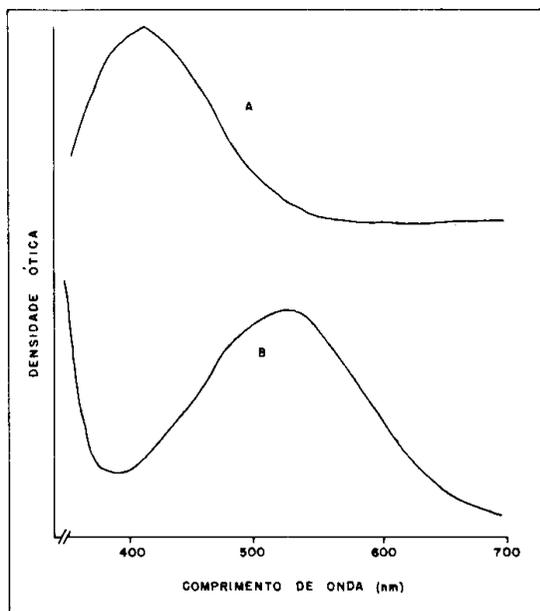


Figura 4 — Espectro de absorção da reação enzimática

- A: 0,2 ml de enzima bruta + 0,2 ml de catecol 0,5 M + 2,4 ml de tampão fosfato 0,1 M (pH 6,4).
- B: 0,2 ml de enzima bruta + 0,2 ml de catecol 0,5 M + 0,2 ml de L-prolina 0,5 M + 2,2 ml de tampão fosfato 0,1 M (pH 6,4).

uma nova medição de pH com potenciômetro (F - 7DE, Hitachi-Horiba).

Efetuamos testes brancos utilizando-se solução tampão ao invés da enzima ou do substrato. A soma dos níveis de oxigênio consumido nessas duas reações-controle foi subtraída das reações acima referidas.

A velocidade do consumo de oxigênio foi calculada com base em 1 mg de proteína, sendo os valores relativos apresentados contra 100% de atividade máxima.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Eletrforese

Uma vez coradas com negro de amido 10B, cada uma das amostras de extrato de enzima bruta apresentou uma faixa bem distinta encimada por duas faixas secundárias finas. Por outro lado, quando coradas com fenilenodiamina, estas amostras só apresentaram uma faixa da coloração intensa (figura 3), a qual indicou a presença de fenolases, sendo também revelada com o mesmo corante em uvas e peras (Cash *et al.*, 1976; Halim & Montgomery, 1978).

No caso do extrato de hemolinfa, a formação da faixa se deu no mesmo nível, para ambos os corantes utilizados. Todavia, este perfil não foi verificado para o extrato enzimático misto (Extrato I).

Trabalhando com extratos mais purificados, devido à utilização de colunas de Sephadex G-200 e DEAE - celulose, Naguchi *et al.* (1979) e Oshima (1980) encontraram faixas situadas na mesma altura das por nós encontradas. A despeito da menor purificação do nosso extrato, supõe-se que a referida enzima, responsável pelo fenômeno da malanose, seja a mesma para o *krill* e a lagosta.

Os primeiros autores sugerem que a natureza desta enzima é glicoprotéica, sendo o seu peso molecular bem superior a 12.000, dependendo do nível da faixa. Por outro lado, o segundo autor registra

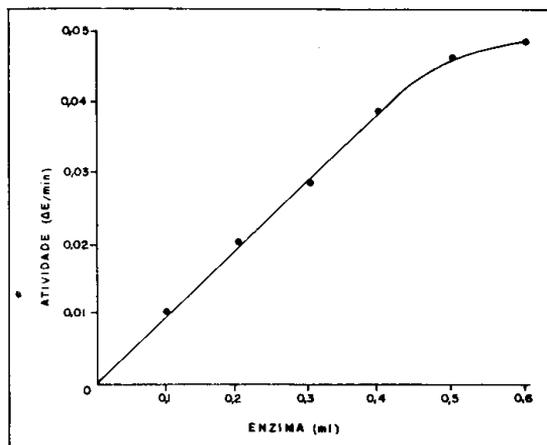


Figura 5 - Efeito da concentração da enzima bruta (I) sobre a atividade enzimática - método espectrofotométrico.

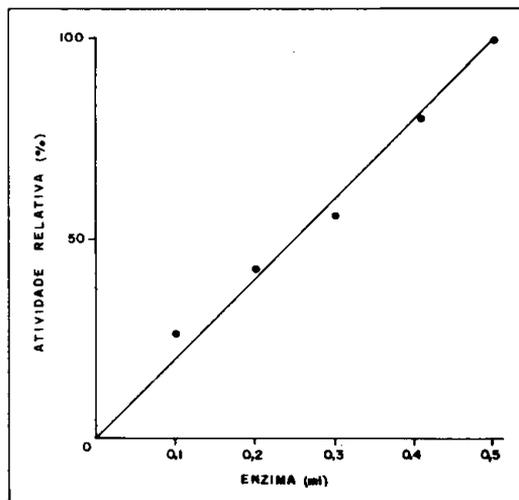


Figura 6 - Efeito da concentração da enzima bruta (I) sobre a atividade enzimática - método do eletrodo de oxigênio.

para esta enzima pesos moleculares da ordem de 31.400.

Estimação da atividade enzimática

Apesar de haver sido preparado a uma temperatura de 4°C, o Extrato I apresentou uma pequena alteração de cor, isto é, tornou-se cinza-claro. Por seu turno, o Extrato II não sofreu oxidação, embora tenha apresentado uma tonalidade azul-clara, em virtude da oxigenação da hemocianina. Estes resultados concordam com os encontrados por Kakimoto & Kanazawa (1956b). Trabalhando com a lagosta, estes autores não

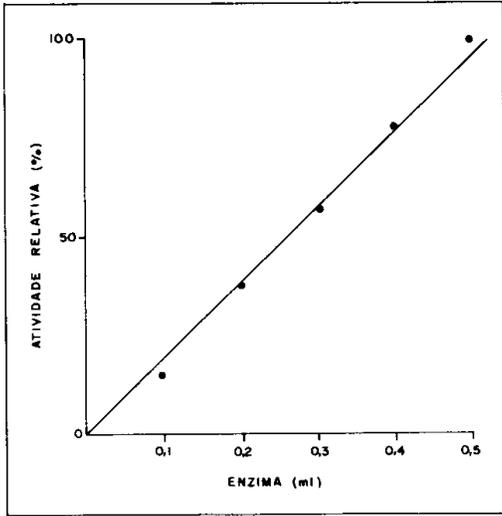


Figura 7 – Efeito da concentração da enzima bruta (II) sobre a atividade enzimática – método do eletrodo de oxigênio.

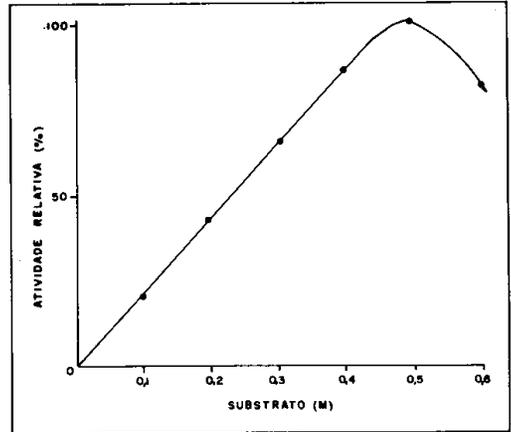


Figura 9 – Efeito da concentração de catecol sobre a atividade da enzima bruta (II) – método do eletrodo de oxigênio.

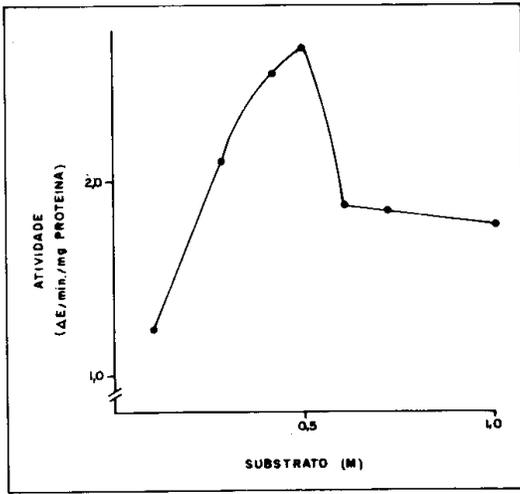


Figura 8 – Efeito da concentração de catecol sobre a atividade da enzima bruta (I) – método espectrofotométrico.

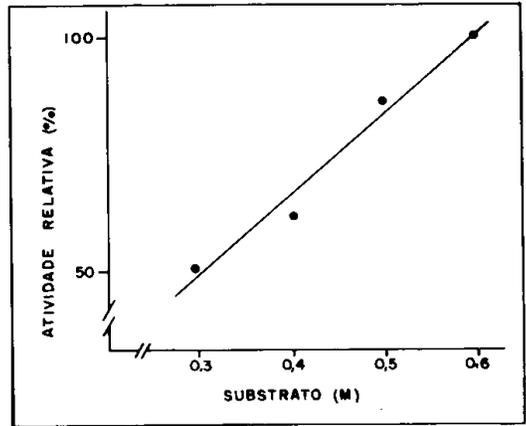


Figura 10 – Efeito da concentração de catecol sobre a atividade da enzima bruta (II) – método do eletrodo de oxigênio.

observaram o fenômeno da melanose em órgãos isolados ou hemolinfa deixados ao ambiente.

A figura 4 mostra as curvas A e B relativas aos espectros de absorção das misturas: Extrato I + catecol e Extrato I + catecol + L-prolina, respectivamente. As absorções máximas foram de 410 nm para A e de 522-523 nm para B. A primeira leitura foi idêntica à encontrada por Oshima (1980) em *krill* para enzimas do grupo catecol oxidase, ao

passo que a segunda situou-se um pouco abaixo. As diferenças ocorridas devem-se provavelmente a impurezas presentes no Extrato I.

Quanto à relação entre concentração do extrato e atividade da reação, observou-se uma proporcionalidade direta, não havendo influência dos métodos de avaliação empregados (figuras 5, 6 e 7).

No tocante ao Extrato I, a relação entre concentração do substrato (catecol) e atividade da reação foi crescente até a concentração de 0,5 M, a partir da qual decresceu (figuras 8 e 9). Este resultado também foi encontrado por Onishi *et al.* (1978) em *krill*, e se justifica segundo a afirmativa de Oshima (1980), de que a enzima catecol oxidase

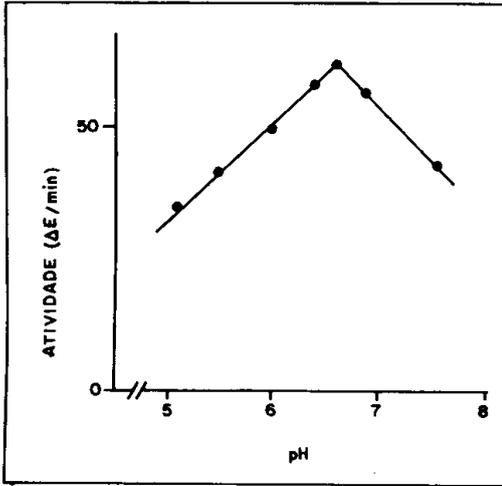


Figura 11 – Efeito do pH sobre a atividade da enzima bruta (I) – método espectrofotométrico.

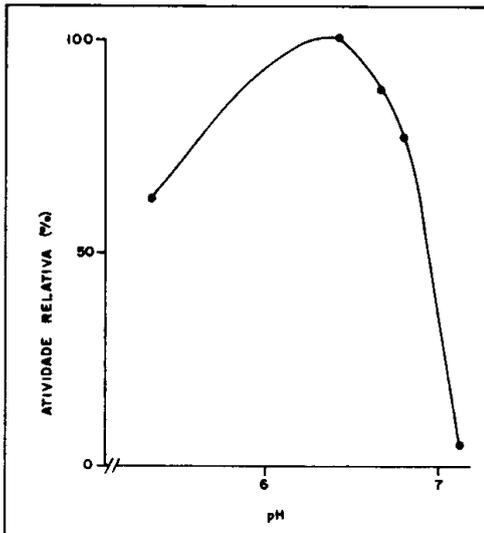


Figura 12 – Efeito do pH sobre a atividade da enzima bruta (I) – método do eletrodo de oxigênio.

deste crustáceo tem menor afinidade por substratos do que a de outros organismos.

A proporcionalidade da referida relação (figura 10) foi mais acentuada para o Extrato II, provavelmente devido ao menor número de substâncias em mistura e, conseqüentemente, maior atividade.

Os valores ótimos de pH do Extrato I, obtidos pelos métodos espectrofotométrico e do eletrodo de oxigênio,

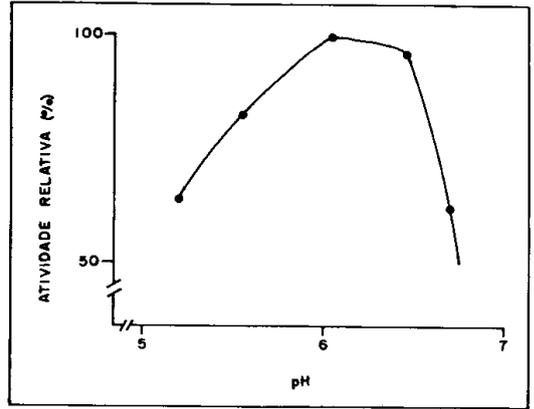


Figura 13 – Efeito do pH sobre a atividade da enzima bruta (II) – método do eletrodo de oxigênio.

situaram-se em torno de 6,6 (figura 11) e 6,4 (figura 12), respectivamente. Para o Extrato II, o segundo método revelou um pH da ordem de 6,2 a 6,5 (figura 13).

Trabalhando com a mesma espécie de lagosta do presente estudo, Kakimoto & Kanazawa (1956a) encontraram um pH de 7,0 para a mistura sangue + hepatopâncreas, utilizando tampão McIlvaine. Este valor situa-se acima daqueles por nós encontrados, provavelmente porque o material apresentava-se intacto.

Para a enzima catecol oxidase do *krill*, encontraram-se valores de pH de aproximadamente 6,4 (Nagayama *et al.*, 1979), 5,5 (Onishi *et al.*, 1978; Noguchi *et al.*, 1979) e 6,5 (Oshima, 1980). Os valores constatados pelos dois últimos autores baseiam-se em extratos mais purificados. Quanto à enzima dopa oxidase do camarão, apresentou uma faixa de pH ótimo de 6,4 a 7,6 (Antony & Nair, 1968). Entretanto, dependendo do grau de purificação e do tampão utilizado, estes valores variaram.

A maioria dos valores de pH do músculo das lagostas *Panulirus argus* e *Panulirus laevicauda* acometidas de *barriga-preta* situou-se em torno de 7,0 (Ogawa *et al.*, 1983a), portanto na faixa ótima para o desenvolvimento de reação enzimática.

O presente trabalho teve por objetivo a identificação da atividade enzimá-

tica de fenolases, sem levar em conta o processo de purificação. Apesar disto, verificou-se a existência de uma faixa distinta correspondente às referidas enzimas, mediante emprego da fenilenediamina. Desta forma, tencionamos completar esta série de estudos levando a efeito pesquisas futuras sobre purificação e estabilidade térmica e pH de enzima, inclusive em faixas abaixo de 0°C.

SUMMARY

English title: Study on black spots in spiny lobsters of genus *Panulirus* White. IV – Preliminary assay on fenolases.

This study verified the existence of fenolases in the organs and hemolymph of the spiny lobster, and estimated some characteristics related to concentration of enzyme and substrate (catechol), and pH.

In spite of initial purification, this enzyme showed the results similar to the krill on disc eletrophoretic pattern and some characteristics as to fenolases.

Particularly it is necessary to clarify thermo-stability (below 0°C) for black spot's inhibition in lobster during iced and frozen storage.

BIBLIOGRAFIA

Alford, J. A. & E. A. Fieger, 1952. The non-microbial nature of the black spots on icepacked shrimp. *Food Technol.*, 6: 217-219.

Antony, P. D. & M. R. Nair, 1968. Studies on phenolase enzymes in prawns I. The distribution and physical properties of phenolases in penaeid prawns. *Fish. Technol.*, 5 (1): 31-36.

Bailey, M. E.; E. A. Fieger & A. F. Novak, 1960a. Physicochemical properties of the enzymes involved in shrimp melanogenesis. *Food Res.*, 25 (5): 557-564.

Bailey, M. E.; E. A. Fieger & A. F. Novak, 1960b. Phenol oxidase in shrimp and crab. *Food Res.*, 25 (5): 565-572.

Cash, J. N.; W. A. Sistrunk & C. A. Sfutte, 1976. Characteristics of concord grape

polyphenoloxidase involved in juice color loss. *J. Food Sci.*, 41 (6): 1398-1402.

Faulkner, M. B.; B. M. Watts & H. J. Humm, 1954. Enzymatic darkening of shrimp. *Food Res.*, 19 (3): 302-310.

Halim, D. H. & M. W. Montgomery, 1978. Polyphenol oxidase of d'anjou pears (*Pyrus communis* L.). *J. Food Sci.*, 43 (2): 603-605.

Kakimoto, D. & A. Kanazawa, 1956a. Studies on the black discoloration of lobster – I. Origin of discoloration. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 22 (8): 471-475.

Kakimoto, D. & A. Kanazawa, 1956b. Studies on the black discoloration of lobster – II. Relation between tyrosinase and black discoloration. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 22 (8): 476-479.

Nagayama, F.; T. Yasuie; K. Ikeru & C. Kawamura, 1979. Lipase, carboxylesterase and catechol oxidase of the antarctic krill. *Trans. Tokyo Univ. Fish.*, (3): 153-159.

Noguchi, A.; K. Sugawara; K. Umeda & S. Kimura, 1979. Some properties of partially purified tyrosinase of *Euphausia superba*. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkai-shi*, 26 (5): 23-28.

Ogawa, M.; A.C.S. Meneses; N. B. Perdigão & T. T. Kozima, 1983a. Black discoloration of spiny lobster of genus *Panulirus* White – I. Influence of storage conditions and quality evaluation of discolored spiny lobster tails. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 49 (6): 975-982.

Ogawa, M.; T. Kurotsu; I. Ochiai & T. T. Kozima, 1983b. Black discoloration of spiny lobster of genus *Panulirus* White – II. Mechanism of black discoloration in spiny lobster tails stored in ice. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 49 (7): 1065-1075.

Ogawa, M.; E. O. Magalhães-Neto; E. M. O. Viana & T. T. Kozima, 1985. Black discoloration of spiny lobster of genus *Panulirus* White – IV. Influence of freezing, storing and thawing on melanin formation in lobster tails. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 51 (1): 127-131.

Onishi, T.; T. Watanabe & M. Suzuki, 1978. Tyrosinase of antarctic krill and prevention of its blackening by dipping in acidic solution. *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.*, (96): 1-9.

Oshima, T., 1980. Nankyoku okiami (*Euphausia superba*) no catechol oxidase. Tese apresentada à "Tokyo University of Fisheries" para obtenção do título de Master of Fisheries. 186 pp., Tokyo.

Ui, N.; K. Miyazaki; K. Hosoi; Y. Suzuki; Y. Nagao; Y. Matsuo & B. Horio, 1976. 5. Denkiteki seishitsu wo riyoshita houhou, pp. 211 – 312, in Ui, N.; N. Tamiya & K. Narita, *Tanpakushitsu no Kagaku I*, 4ed., Tokyo Kagaku Dokin K. K., 501 pp., Tokyo.

Umemoto, S., 1974. I. Seibutsukagaku jikkenshou. 18 – Tanpakushitsu no jinsokuteiryō, pp. 203 – 217, in Saitoh, T.; H. Uchiyama; S. Umemoto & T. Kawabata, *Suisan Seibutsukagaku Shokuhingaku jikkenshou*. Koseisha-Koseikaku, 509 pp., Tokyo.