

ENSAIO PRELIMINAR AO ESTUDO DE CARACTERIZAÇÃO E PROPRIEDADES DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS EM HEPATOPÂNCREAS DE JOVENS DA LAGOSTA PANULIRUS LAEVICAUDA (LATREILLE)

Silvana Araújo Saker
Gustavo Hitzschky Fernandes Vieira⁽¹⁾
Alexandre Holanda Sampaio

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

As lagostas, incluídas entre os mais importantes recursos pesqueiros do Nordeste brasileiro, têm sido objeto de estudo nos principais países produtores, sob os mais diversos ângulos. No Brasil poucas são as informações sobre a fisiologia e bioquímica desses animais.

No processo metabólico dos crustáceos, o hepatopâncreas desempenha papel central, atuando como armazenador de glicogênio, gordura e cálcio. Nele estão contidas as enzimas responsáveis pelo metabolismo da purina, segregação dos ácidos biliares e muitas reações do metabolismo dos crustáceos (Passano, 1960).

A muda figura entre as principais transformações que ocorrem nos crustáceos, sendo responsável pelo crescimento e desenvolvimento do animal (Aiken, 1980). Paralelamente ao ciclo de muda, ocorre uma estocagem e mobilização dos produtos da digestão, sendo o hepatopâncreas o principal órgão envolvido nesse processo (Travis, 1955).

Embora os conhecimentos sobre a estocagem de proteína e sua utilização sejam escassos, as proteínas parecem ser o mais importante componente da reserva orgânica armazenada durante o período compreendido entre duas mudas

sucessivas. Dessa forma, o crescimento normal dos tecidos é possibilitado nos estágios de pós-muda.

Estudos realizados por Vonk (1960) com o crustáceo *Maja squinado* demonstraram a presença de, pelo menos, quatro componentes proteolíticos no hepatopâncreas e suco intestinal: proteinases, carboxipeptidases, aminopeptidases e dipeptidases. A proteinase do *Maja* pode muito bem ser relacionada com a tripsina dos vertebrados, parecendo estar presente no suco estomacal e no hepatopâncreas como enzima ativada.

O presente trabalho aborda, em caráter preliminar, as propriedades do sistema proteolítico do hepatopâncreas de jovens da lagosta *Panulirus laevicauda* (Latreille) e estuda, ainda, seu comportamento em relação aos estágios do ciclo de muda.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizamos lagostas jovens da espécie *Panulirus laevicauda* (Latreille) capturadas nas praias do Meireles e do Farol, em Fortaleza — Ceará, nos meses de janeiro a junho de 1982.

A determinação dos estágios do ciclo de muda foi feita pelo método de Drach (1939), citado por Travis (1955) e Aiken (1980).

(1) Pesquisador do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Os ensaios para as determinações e caracterizações do sistema enzimático foram feitos em lagostas no estágio C do ciclo de muda.

Os hepatopâncreas foram homogeneizados com tampão fosfato 0,01 M em cloreto de sódio (NaCl) 0,1 M, pH 7,0, na proporção de 1:10 (p/v).

Os extratos foram centrifugados a 20.000 x g por 15 minutos a 4°C em centrífuga International modelo HT. Os sobrenadantes foram conservados em congelador até o momento de sua utilização.

Nos extratos foram determinadas as concentrações de proteína e nitrogênio amino solúvel, e a atividade proteolítica.

A concentração de proteína foi determinada pelo método do Micro-biureto (Goa, 1953), usando-se como padrão a albumina sérica bovina (Sigma), sendo os resultados expressos em miligrama de proteína por mililitro.

O teor de nitrogênio amino solúvel foi determinado mediante o método de Yemm & Cocking (1955), usando-se uma curva padrão da L-Leucina (Merck). Os resultados obtidos foram expressos em mg de nitrogênio amino solúvel por ml.

A atividade proteolítica, capacidade de hidrolizar a caseína, foi determinada pela reação de 0,1 ml do extrato, 5,0 ml de caseína (segundo Hammarsten, E. Merck AG Darmstadt) a 1% em tampão fosfato 0,01 M e cloreto de sódio 0,1 M pH 7,0. O tempo de reação foi de 60 minutos a 50°C. Parou-se a reação com 1,0 ml de ácido tricloroacético (TCA) a 40% (Ainouz *et al.*, 1972). Após 30 minutos de repouso, a mistura foi filtrada em papel filtro quantitativo Framex, faixa branca, sendo a atividade proteolítica determinada na fração solúvel em TCA e medida pela absorbância em 750 nm em espectrofotômetro Varian Techtron modelo 635 K, depois da reação com o reagente de Folin (Lowry *et al.*, 1951). O tempo zero ou branco da reação foi obtido pela adição do substrato após ter sido adicionado TCA a 40%. Todos os valores de densi-

dade ótica das amostras foram subtraídos dos valores dos brancos. A uma unidade de atividade correspondeu a variação de 0,1 de densidade ótica. A atividade proteolítica foi expressa em unidade de atividade (U. A.) por ml e a atividade específica, determinada através da divisão da atividade proteolítica pela concentração de proteína, sendo os resultados expressos em U. A./mg proteína.

O pH ótimo foi determinado usando-se a mistura de reação nos pHs 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0, 11,0 e 12,0.

O tempo e a temperatura ótimos foram determinados mediante a incubação da enzima e substrato em temperaturas de 30, 40 e 50°C, durante períodos de 30, 60, 90 e 120 minutos.

A relação enzima-substrato foi determinada variando-se o substrato de 10 a 70 mg, conservando-se o volume final de 10 ml.

Os resultados da atividade enzimática relativa aos experimentos citados foram expressos em unidade de atividade por ml (U. A./ml).

A termo-estabilidade foi determinada submetendo-se previamente o extrato a temperaturas de 40, 50 e 60°C durante 15, 30 e 60 minutos, sendo, em seguida, determinada a atividade enzimática em cada fração. Os resultados, em U. A./ml, foram transformados em porcentagens de atividade, sendo considerada 100% a atividade do extrato não submetido ao calor.

Os tampões acetato nos pHs 4,0 e 5,0, fosfato nos pHs 6,0 e 7,0 e borato nos pHs 8,0, 9,0 e 10,0, foram usados também na preparação de extrato de hepatopâncreas.

Os extratos de hepatopâncreas, preparados com tampão acetato pH 5,0 na proporção de 1:5 (p/v), foram usados para o fracionamento com sulfato de amônia. Este foi sendo adicionado gradativamente ao extrato para atingir uma saturação de 20% e, após 15 minutos (25°C), o precipitado foi removido por centrifugação (20.000 x g, 15 minutos,

4°C). O sobrenadante foi utilizado para as próximas precipitações a 40, 60, 80 e 100% de saturação. Os precipitados obtidos foram suspensos em tampão fostato pH 7,0 e dialisados contra água destilada (4°C), até que a reação da água com o hidróxido de bário fosse negativa. O conteúdo de proteína e as atividades proteolíticas foram determinadas em todas as frações, sendo estes expressos em U. A./mg proteína.

Nos diversos estágios de muda foram determinadas a atividade proteolítica,

concentração de proteína e nitrogênio amino solúvel.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade proteolítica apresentou um pico máximo em pH 7,0 e outro, de menor intensidade, em pH 9,0, correspondente a 84% do valor naquele pH (figura 1). Isto sugere a possibilidade da presença de duas proteases capazes de hidrolizar a caseína em hepatopâncreas de jovens da lagosta *Panulirus laevicauda*.

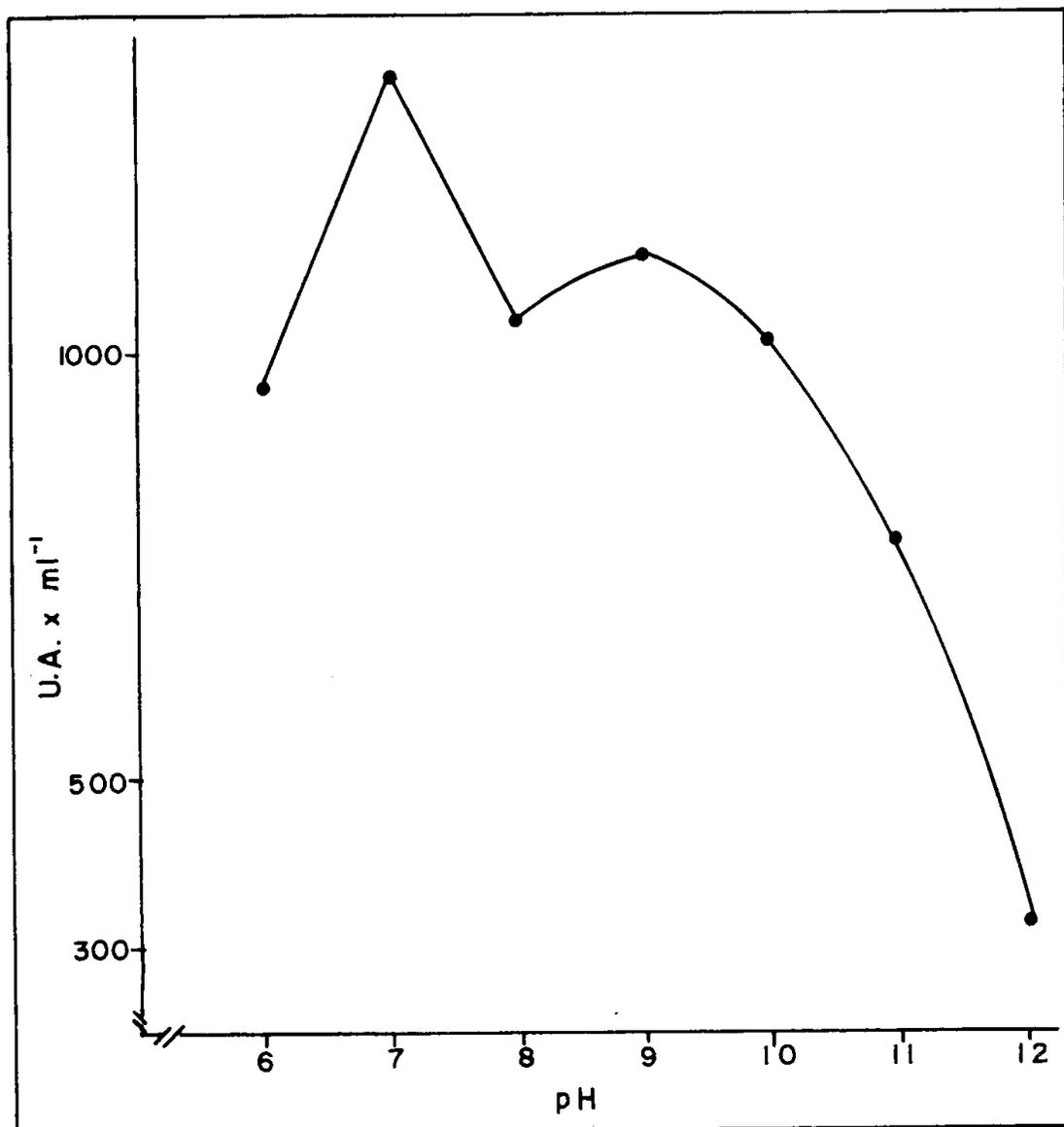


Figura 1 — Variação da atividade proteolítica de hepatopâncreas de jovens da lagosta *Panulirus laevicauda* (Latreille), em função do pH.

Mansour-Beck (1932), trabalhando com hepatopâncreas de *Maja squinado*, encontrou uma protease com atividade máxima em intervalo de pH de 6,0 a 6,4, uma carboxipeptidase e aminopeptidase com máximo de pH em 8,2 e uma dipeptidase com máximo de atividade em pH 8,4.

Em trabalhos mais recentes, tem-se evidenciado atividade proteolítica máxima em pHs que variam de 6,0 a 8,4 (Gates & Travis, 1969; De Villez, 1975; Trelu & Ceccaldi, 1976).

Inicialmente, pode-se observar que a atividade proteolítica é crescente quando há aumento de temperatura de incubação. Esta atividade apresentou um incremento porcentual mais elevado, à temperatura de 50°C e no tempo de 60 minutos, razão pela qual este tratamento foi escolhido para os ensaios enzimáticos (figura 2).

A temperatura de incubação a 50°C situa-se próxima daquelas encontradas na literatura para proteases de organismos marinhos, quando a caseína foi utili-

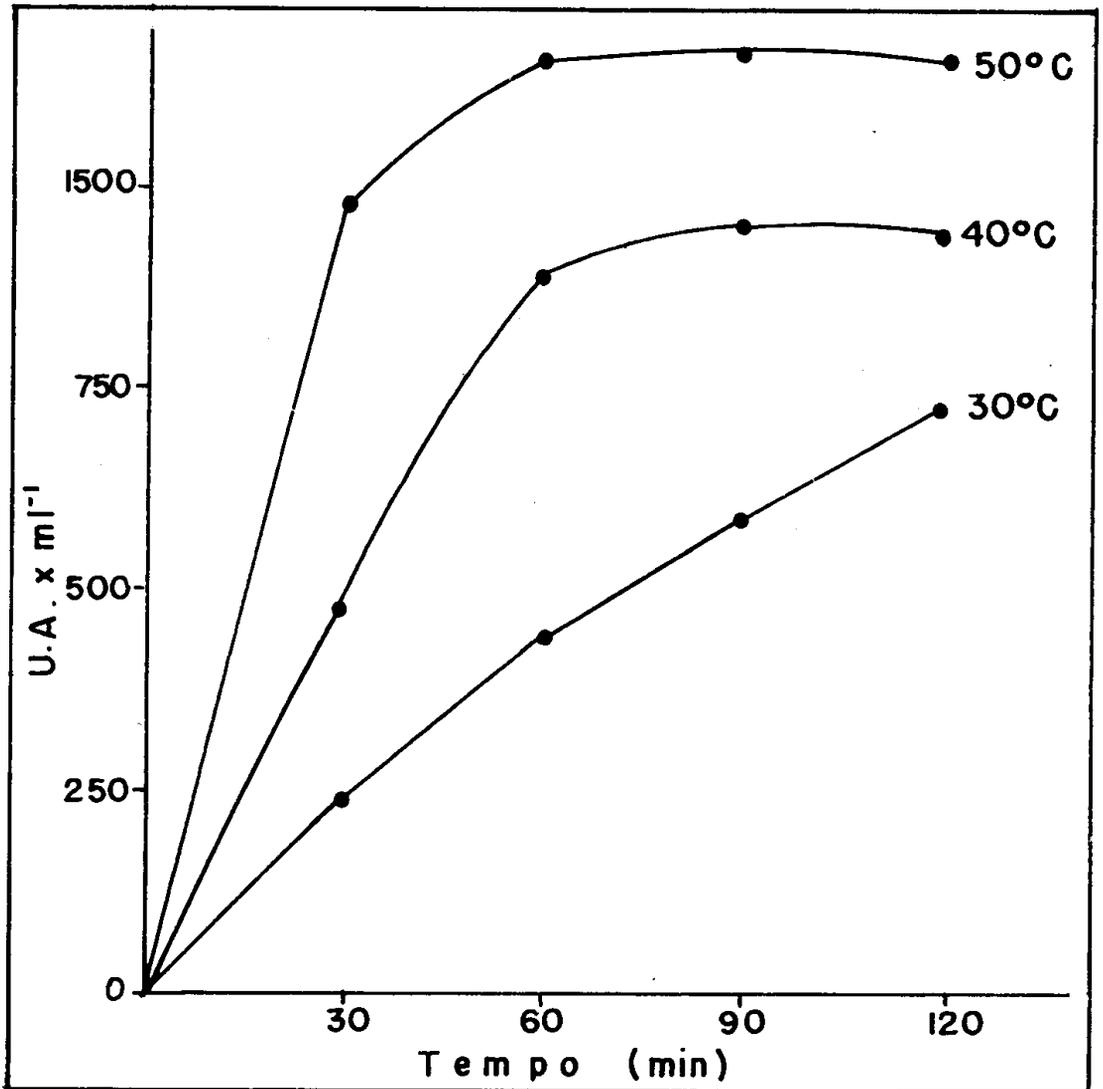


Figura 2 — Variação da atividade proteolítica de hepatopâncreas de jovens da lagosta *Panulirus laeviscauda* (Latreille), em função do tempo e temperatura de incubação.

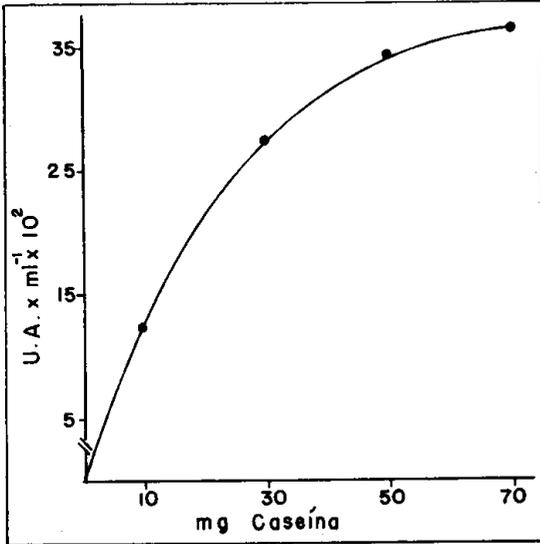


Figura 3 — Variação da atividade proteolítica de hepatopâncreas de jovens de lagosta *Panulirus laeviscauda* (Latreille), em função da concentração do substrato.

zada como substrato (Croston, 1960; Dabrowski & Glogowski, 1977).

A saturação de enzima-substrato ocorreu segundo a relação de 50 mg de caseína para 0,1 ml de extrato 1:10 (p/v), ou seja, 50 mg de substrato para 5 mg de proteína/ml no extrato (figura 3). Estes valores indicam uma grande atividade no extrato estudado, superiores àqueles encontrados por Prisco & Vieira (1976) e Ainouz *et al.* (1981).

O sistema enzimático apresentou-se bastante estável em relação às temperaturas a que foi submetido. A 40 e 50°C houve uma ativação nos primeiros 30 minutos de aquecimento do extrato, ocorrendo um decréscimo após 45 minutos. Entretanto, a 60°C houve uma redução crescente em relação ao tempo,

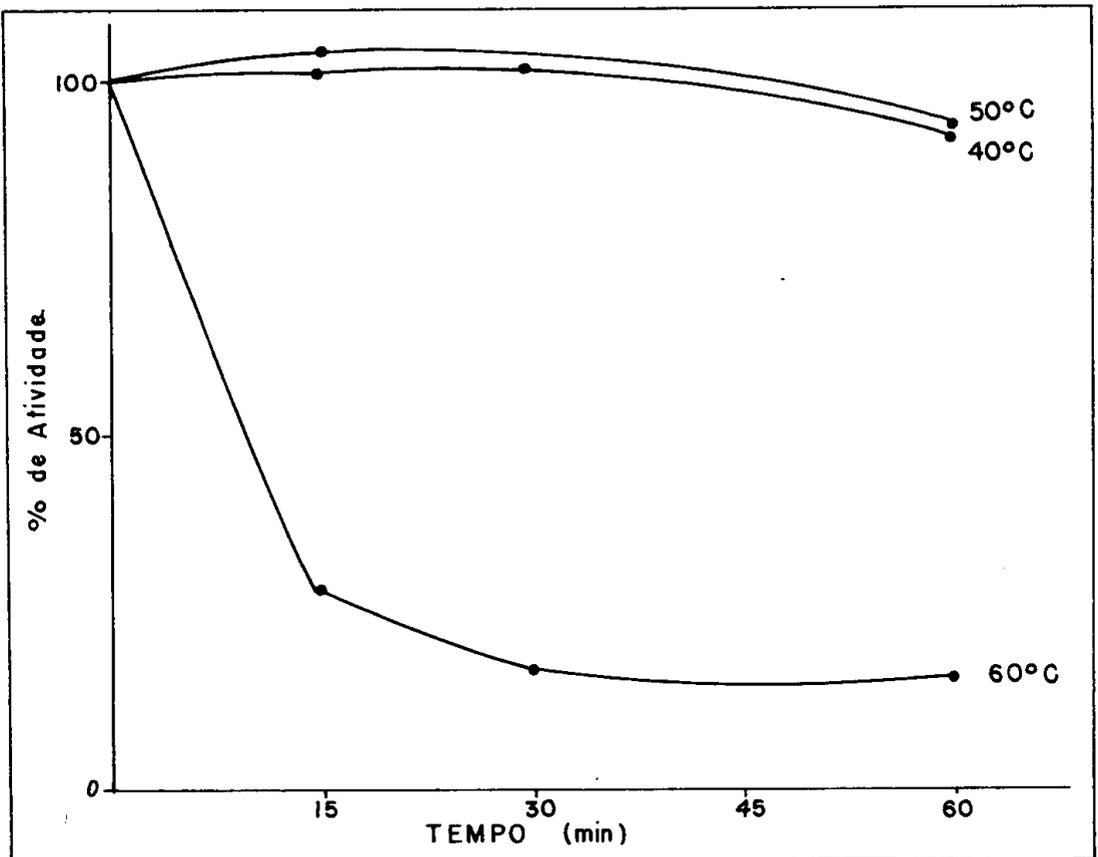


Figura 4 — Variação percentual da atividade proteolítica no hepatopâncreas de jovens da lagosta *Panulirus laeviscauda* (Latreille), em função do tempo e temperatura de aquecimento do extrato.

atingindo uma perda de 84% da atividade com 60 minutos de exposição do extrato ao calor (figura 4).

O tampão acetato no pH 5,0 foi o que se mostrou mais eficiente na extração do sistema proteolítico do hepatopâncreas de jovens da lagosta *Panulirus laevicauda*, vindo por ordem decrescente o tampão fosfato pH 6,0 e 7,0 (figura 5). Há indicações na literatura como sendo o tampão fosfato pH 7,0 o mais eficiente para a extração de proteases (Makinodan & Ikeda, 1969; Prisco & Vieira, 1976; Ainouz *et al.*, 1981).

No processo de purificação do sistema enzimático, verificou-se que a atividade proteolítica máxima ocorreu na fração de 40-60% de saturação com sulfato de amônia, seguindo-se as frações 20-40% e 60-80% (tabela I; figura 6). Gates & Travis (1969), Makinodan &

Ikeda (1969), Beverly & Eitenmiller (1974) indicam que, para a maioria das enzimas proteolíticas, o intervalo de purificação situa-se na fração 40-60%. Considerando que esta fração apresenta uma grande purificação, da ordem de 5,7 vezes (565%) em relação ao extrato bruto, pode-se admitir este tratamento com sulfato de amônia como a primeira etapa de purificação para o sistema enzimático encontrado em hepatopâncreas de lagosta jovem *Panulirus laevicauda*.

O pico máximo de atividade proteolítica específica ocorreu no estágio C, sendo seu valor mínimo observado no estágio D (tabela II; figura 7). O comportamento das proteases e de proteínas, em relação ao ciclo de muda em animais, é variável de espécie para espécie. Segundo Trelu & Ceccaldi (1976) as proteases

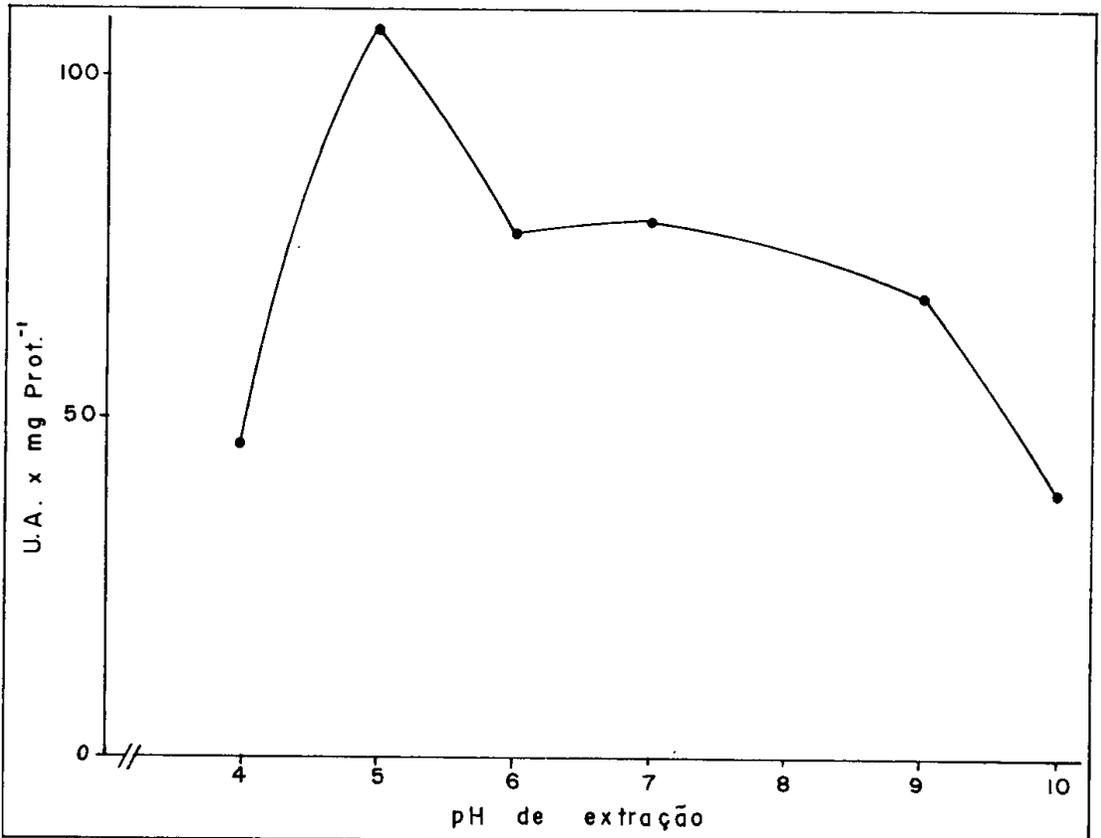


Figura 5 — Variação da atividade proteolítica específica do hepatopâncreas de jovens da lagosta *Panulirus laevicauda* (Latreille), em função do pH da solução de extração.

de *Carcinus maenas* têm seu máximo de atividade no estágio C, enquanto que em *Palaemon serratus* a atividade máxima ocorre nos estágios C e D.

O teor mais elevado de proteína ocorreu no estágio D e o mais baixo no estágio B (tabela II). Passano (1960) indica que a renovação de proteína no hepatopâncreas de *Callinectes* atinge o máximo durante o estágio D. Neste está-

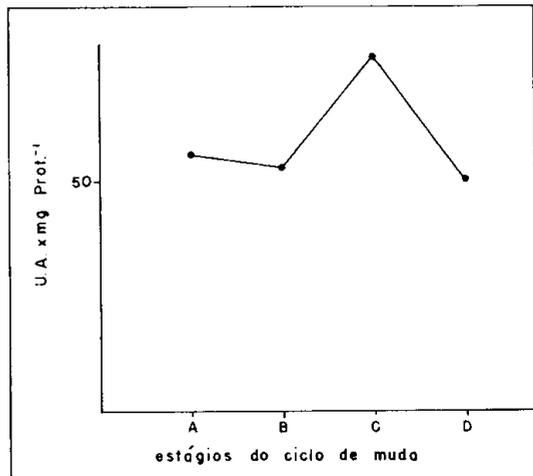
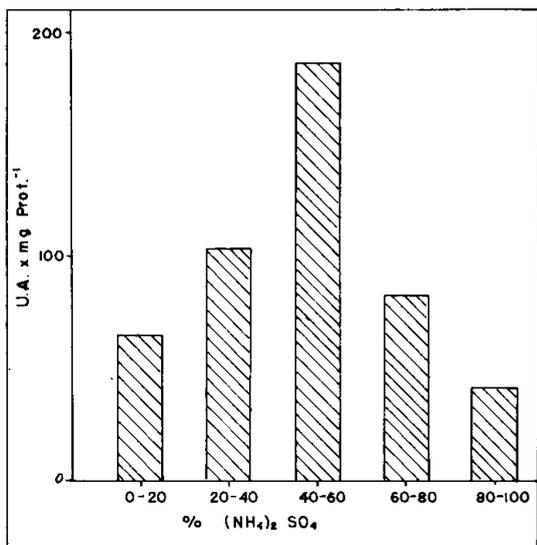


Figura 6 — Atividade específica da enzima de hepatopâncreas de jovens da lagosta *Panulirus laeviscauda* (Latreille), em relação a sua saturação com sulfato de amônia.

Figura 7 — Variação da atividade proteolítica do hepatopâncreas de jovens da lagosta *Panulirus laeviscauda* (Latreille), em relação aos estágios de muda.

TABELA I

Atividade específica proteolítica de hepatopâncreas de jovens da lagosta *Panulirus laeviscauda* (Latreille), em relação a sua saturação com sulfato de amônia.

% de sulfato de amônia	U.A./ml	mg Proteína/ml	U.A./mg Proteína	Recuperação (%)	Veze de Purificação
0	3.525	106,3	33,2	100,0	1,0
0 — 20	275	4,1	67,1	3,9	2,0
20 — 40	1.425	13,7	104,0	12,9	3,1
40 — 60	2.775	14,8	187,5	13,9	5,7
60 — 80	200	2,4	83,3	2,3	2,5
80 — 100	100	2,4	41,7	2,3	1,3

TABELA II

Variação da atividade proteolítica e concentração de nitrogênio amino solúvel de hepatopâncreas de jovens da lagosta *Panulirus laeviscauda* (Latreille), em relação aos estágios do ciclo de muda.

Estágio do ciclo de muda	U.A./ml			mg Proteína/ml			U.A./mg Proteína			mg N-amino sol./ml		
	Mi	Ma	M̄	Mi	Ma	M̄	Mi	Ma	M̄	Mi	Ma	M̄
A	1.500	5.900	3.700	42,9	77,2	60,0	35,0	76,4	55,7	2,2	4,0	3,1
B	450	3.250	2.271	22,3	87,5	46,9	20,2	105,3	53,1	1,3	2,9	2,1
C	1.550	6.950	4.042	30,9	125,2	59,9	19,7	181,4	76,9	2,5	6,1	4,1
D	550	6.650	3.808	51,5	101,2	72,9	9,7	75,2	50,4	2,4	3,0	2,7

Convenção: Mi — valor mínimo; Ma — valor máximo; M̄ — valor médio.

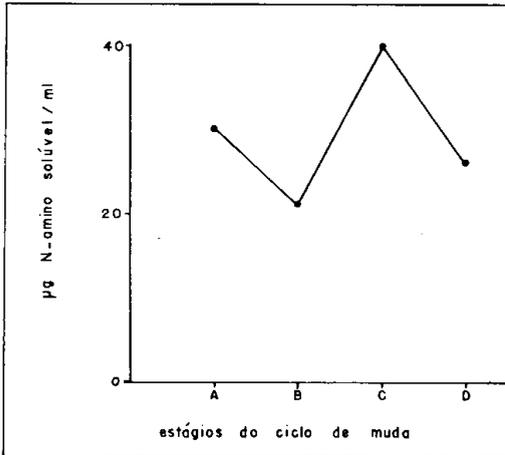


Figura 8 — Concentração de nitrogênio amino solúvel em hepatopâncreas de jovens da lagosta *Panulirus laeviscauda* (Latreille), com relação aos estágios de muda.

gio, o crustáceo inicia sua inatividade após uma fase de extrema atividade verificada no estágio C. Segundo Trellu & Ceccaldi (1976), no estágio D há uma diminuição das atividades enzimáticas, coincidindo com o início da fase de jejum fisiológico do animal que, nesse momento, começa a requisitar as reservas acumuladas no hepatopâncreas, durante a fase ativa (estágio C), para utilizá-las em seu processo vital. Isto explicaria a maior atividade proteolítica ter ocorrido no estágio C, decrescendo no estágio D, quando o animal diminui intensamente suas atividades metabólicas e, conseqüentemente, suas necessidades nutricionais.

O nitrogênio amino solúvel teve sua concentração máxima no estágio C, sendo a mínima observada no estágio B (tabela II; figura 8). A concentração máxima de nitrogênio amino solúvel corresponde com o máximo de atividade proteolítica, indicando coerência dos dados, visto que o N — amino solúvel é um produto de degradação de proteínas.

CONCLUSÕES

1 — A enzima apresentou um pH ótimo para a caseína em 7,0, sendo que em pH 9,0 observou-se cerca de 84% da atividade proteolítica obtida em pH 7,0.

2 — O ótimo de temperatura ocorreu a 50°C e o tempo de incubação da reação foi de 60 minutos.

3 — Para a relação enzima-substrato ficou estabelecida a razão de 50 mg de caseína para 50 mg de proteína do extrato correspondendo a 0,1 ml do mesmo diluído de 10 vezes.

4 — O sistema enzimático foi estável às temperaturas de 40 e 50°C, perdendo aproximadamente 84% de sua atividade quando submetido a 60°C por 60 minutos.

5 — O pH mais eficiente para a extração da enzima foi o 5,0 usando o tampão acetato de sódio.

6 — A fração correspondente a 40-60% de saturação com sulfato de amônia foi a que apresentou maior atividade específica. A purificação foi aproximadamente de 5,7 vezes em relação ao extrato bruto, com uma recuperação de enzima da ordem de 13,9%.

7 — A maior atividade específica ocorreu no estágio C e a menor no estágio D do ciclo de muda.

8 — A concentração máxima de proteína no hepatopâncreas foi observada no estágio D e a mínima no estágio B.

9 — A concentração mais elevada de nitrogênio amino solúvel em relação aos estágios do ciclo de muda foi verificada no estágio C, enquanto a mínima foi no estágio B.

SUMMARY

English title: Preliminary study for the characterization of proteolytic enzymes in hepatopancreas of juveniles of lobster *Panulirus laeviscauda* (Latreille).

This paper is a preliminary study of some fundamental characteristics of the proteolytic system of hepatopancreas of juveniles of lobster *Panulirus laeviscauda*, collected at Fortaleza (Ceará State, Brazil), in the period from January through July, 1982, and its relation to the molting stages determined through the method of Drach (1939).

The enzymatic essays and protein contents have been determined using lobsters in stage C, except for those to which other molting cycle stages are referred.

The extract of hepatopancreas was homogenized in buffer phosphate 0.01 M in NaCl 0.1 M, pH 7.0 at a proportion 1.10 (weight/volume) in ice bath and centrifuged for 15 minutes at 20,000 x g and 4°C.

The optimum reaction pH was 7.0, although at pH 9.0 the activity maintained only 85 per cent of that presented at pH 7.0. The optimum reaction temperature was 50°C, for 60 minutes of incubation.

The enzymatic system showed to be very thermo-stable, since only at 60°C the proteasis has undergone some changes, losing 84 per cent of its activity when 60 minutes have elapsed.

In the process of purification the 40-60 per cent solution of saturation with ammonia sulphate showed its maximum proteolytic activity. The purification of the enzymatic system was about 5.7 times, in relation to the raw extract.

The most efficient buffer for proteasis extraction was found to be the sodium acetate at pH 5.0.

On a preliminary basis, it was observed that the highest specific proteolytic activity and highest soluble nitrogen amine occurred at stage C, while the highest protein content was observed at stage D of the molting cycle.

BIBLIOGRAFIA

Aiken, D. E. — 1980 — Molting and growth, pp. 91-163, in J. S. Cobb & B. F. Phillips (eds), *The biology and management of lobsters, vol. I*. Academic Press Inc., 463 pp., New York.

Ainouz, I. L.; J. Xavier-Filho & E. Gomes-Filho — 1972 — Atividade proteolítica em

sementes de *Vigna sinensis* cv seridó, *Ciência e Cultura*, São Paulo, 204 : 104.

Ainouz, I. L.; N. B. Benevides & A. L. P. Freitas — 1981 — Proteolytic activities in seeds of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Biol. Plant., Praga*, 23 (2) : 133-140.

Beverly, A. B. & R. R. Eitenmiller — 1974 — A study of some kinetic properties of partially purified *Penaeus setiferus* arylamidase. *Jour. Food Sci.*, 39 : 10-14.

Croston, C. B. — 1960 — Tryptic enzymes of chinook salmon. *Anch. Biochem. Biophys.*, 89 : 202-206.

Dabrowski, K. & J. Glogowski — 1977 — Studies on the role of exogenous proteolytic enzymes in digestion process in fish. *Hydrobiologia*, 54 (2) : 129-134.

DeVillez, E. J. — 1975 — Observations on the proteolytic enzymes in the digestive fluid of the barnacle *Balanus nubilus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 51 A : 471-474.

Drach, P. — 1939 — Mue et cycle d'interne chez les crustacés décapds. *Ann. Inst. Oceanogr.*, 19 : 103-391.

Gates, B. J. & J. Travis — 1969 — Isolation and comparative properties of shrimp trypsin. *Biochemistry*, 8 (11) : 4483-4489.

Goa, J. — 1953 — A micro biuret method for protein determination. Determination of total protein in cerebrospinal fluid. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 5 : 218-222.

Lowry, O. H. ; N. J. Rosebrough; A. L. Farr & R. J. Randall — 1951 — Protein measurements with the folin phenol reagent. *Jour. Biol. Chem.*, 193 : 265-275.

Makinodan, Y. & S. Ikeda — 1969 — Studies on fish muscle protease — II. Purification and properties of a proteinase active in slightly alkaline pH range. *Bull. Japan. Soc. Scient. Fish.*, Tokyo, 35 (8) : 749-757.

Mansour — Beck, J. J. — 1932 — Die proteolytischen enzyme von *Maja squinado* Latr. *Z. Vergleich. Physiol.*, 17 : 153-203.

Passano, L. M. — 1960 — Molting and its control, pp. 473 — 536, in T. H. Waterman (ed.), *The physiology of crustacea, vol. I*. Academic Press, XVII + 670 pp., New York.

Travis, D. F. — 1955 — The molting cycle of the spiny lobster *Panulirus argus* (Latreille). II. Pre-ecdysial histological and histochemical changes in the hepatopancreas and integumental tissues. *Biol. Bull.*, 108 : 88-112.

Trellu, J. & H. Ceccaldi — 1976 — Variations des activités enzymatiques de l'hépatopancréas et du muscle de *Palaemon serratus* Pennant (Crustacé Décapode) au cours du cycle

d'intermue. *Soc. Biol. Marseille*, Marseille, pp. 115-120.

Prisco, J. T. & G. H. F. Vieira — 1976 — Effects of NaCl salinity on nitrogenous compounds and proteases during germination of *Vigna sinensis* seeds. *Physiol. Plant.*, Stockholm, 36 : 317-320.

Vonk, H. J. — 1960 — Digestion and metabolism, pp. 291-316, in T. H. Waterman (ed.), *The physiology of crustacea, vol. 1*. Academic Press, XVII + 670 pp., New York.

Yemm, E. W. & E. Cocking -- 1955 — The determination of amino acids with ninhydrin. *Analyst*, 80 : 209-213.