

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA

ENSAIO SOBRE A ATIVIDADE PROTEOLÍTICA EM
SUB-PRODUTOS DE PESCADO

Antonio Romildo Ximenes Carneiro

Dissertação apresentada ao Departamento
de Engenharia de Pesca do Centro de Ciências
Agrárias da Universidade Federal do Ceará, co
mo parte das exigências para obtenção do tí-
tulo de Engenheiro de Pesca.

FORTALEZA-CEARÁ-BRASIL
JULHO-1985

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C287e Carneiro, Antonio Romildo Ximenes.

Ensaio sobre a atividade proteolítica em sub-produtos de pescado / Antonio Romildo Ximenes Carneiro. – 1985.

46 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 1985.

Orientação: Prof. Gustavo Hitzschky F. Vieira.

1. Pescado - Beneficiamento. I. Título.

CDD 639.2

Prof. Ass. Gustavo Hitzschky F. Vieira
Professor Orientador

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Adjunto: José Raimundo Bastos
Presidente

Prof. Ass. Antonio Renato Soares Casimiro

VISTO

Prof. Adjunto: Raimundo Saraiva da Costa
Chefe do Departamento de Engenharia de Pesca

Prof. Adjunto: Moisés Almeida de Oliveira
Coordenador do Curso de Engenharia de Pesca

AGRADECIMENTOS:

Ao Prof. Gustavo Hitzschky Fernandes Vieira por sua valiosa e dedicada orientação.

Aos Engenheiros de Pesca Alexandre Holanda Sampaio e Silvana Saker Sampaio pela ajuda nos trabalhos de laboratório.

A Profa. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira e a Química Norma Barreto Perdigão pela colaboração prestada no decorrer deste trabalho.

Ao Laboratório de Ciências do Mar pelo uso de suas instalações.

A bibliotecária Célia Maria Freitas Freire pela valiosa ajuda na pesquisa bibliográfica.

Aos colegas Domingos Sávio e Petronilia pelo apoio e incentivo.

A amiga Rossana pela colaboração na tradução dos manuscritos.

A Maria Helena pelo constante apoio, incentivo e companheirismo.

A todas pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram na realização deste trabalho.

ENSAIO SOBRE A ATIVIDADE PROTEOLÍTICA EM SUB-PRODUTOS DE PESCADO

Antonio Romildo Ximenes Carneiro

1. INTRODUÇÃO

A pesca artesanal no Nordeste brasileiro é composta em sua maioria, por embarcações pequenas (jangadas, botes, canoas, etc) que exploram estoques pesqueiros geralmente constituídos por espécies de baixo valor comercial.

O cangulo Balistes vetula linnaeus e os tubarões da família Carcharhinidae se encontram entre as espécies com grande representatividade na captura artesanal, sendo consumidos principalmente pela camada da população de baixa renda.

O cangulo participa com grande relevância neste tipo de exploração pesqueira, sendo sua abundância elevada, pois sua população ainda se encontra subexplorada (MENEZES, 1981).

O desembarque de cangulo no ano de 1983 na região Nordeste do Brasil, segundo dados da SUDEPE (1983), foi de 701.593 kg, cabendo ao Ceará 67% desta produção.

Quando da despesca dos manzuas na captura da lagosta, é comum se verificar a inclusão de espécimes de cangulo dentro do covo, atraído pela isca da lagosta. Esta produção não contabiliza nos dados de pesca artesanal, chega a ser bastante significativa, levando-se em conta o enorme esforço de pesca aplicado na captura da lagosta. Sua comercialização é realizada a baixíssimo custo, devido ao mau acondicionamento nos barcos lagosteiros, pois trata-se de peixe de baixo valor comercial e quando não muito são lançados ao mar. Na pesca do pargo, também há uma relativa participação do cangulo na captura através das linhas pargueiras, que aqui também, são lançados ao mar, pois como mencionado na pesca da lagosta, não há local para seu estoque bem como o valor comercial não viabilizar o seu desembarque nos portos pesqueiros.

O tubarão é uma espécie marinha com grande abundância na costa nordestina, tendo já sido estudada sua real potencialidade em termos industriais pela SUDENE E SUDEPE, e que sua captura máxima sustentável está em torno de 36.178 toneladas anuais (SUDENE, 1983).

Atualmente, existem várias empresas de pesca que estão elaborando projetos, visando a produção industrial do tubarão, abrindo um novo campo nas indústrias de pesca.

A captura do tubarão até hoje, é realizada na mesma modalidade do cangulo, sendo a sua presença quase que ocasional no produto da pesca. Não existe uma atividade específica na exploração desse recurso pesqueiro.

O índice de aproveitamento do tubarão é total, obtendo-se dele, óleo de fígado, farinha de resíduos, filé salgado e seco, pele, barbatanas, dentes, gelatina, cola, etc., todas com ampla aceitação e algumas com boa cotação no mercado internacional. Vários têm sido os estudos de aproveitamento de tubarões, realizados por entidades de pesquisa, e entre eles podemos verificar os trabalhos de OGAWA et al., (1973); OGAWA et al., (1973a); PARENTE & NUNES (1973); MACHADO & BURGOS (1978); SUDENE (1983).

A utilização de produtos e sub-produtos de pescado para a elaboração de substâncias sofisticadas de alto valor econômico vem ganhando uma grande importância científica.

Um substancial número de produtos farmacêuticos e bioquímicos podem ser derivados de tecidos e órgãos de pescado, entre os quais se encontram ácidos nucleicos, nucleosídeos, potaminas, insulina, cortisona, sais biliares e enzimas proteolíticas (WINDSOR & BARLOW, 1981).

As proteases ou enzimas proteolíticas são compostos que hidrolizam as proteínas transformando-as em substâncias menores e mais simples. Sua ação sobre as proteínas, proporciona, conseqüentemente, um efeito direto no crescimento de qualquer organismo (DABROWSKI & GLOGOWSKI, 1977).

BRAVERMAN (1963) classifica as enzimas proteolíticas em dois grupos:

- **Proteinases:** são aquelas capazes de hidrolizar qualquer molécula de proteína.
- **Peptidases:** são aquelas que catalizam (aceleram) a quebra de pequenos fragmentos de peptídeos.

Um grande número de enzimas proteolíticas é conhecido e as principais são a pepsina, tripsina e quimiotripsina.

A pepsina é a principal enzima proteolítica do suco gástrico, ocorrendo aparentemente em todos os vertebrados, embora as propriedades individuais da enzima, possa variar algumas vezes. Sua ação no organismo é bastante conhecida, iniciando a quebra digestiva, no estomago de quase todas as proteínas, sendo o seu pH em torno de 1,0 ou 2,0 e exibe atividade catalítica máxima em soluções moderadamente ácidas desnaturando-se em valores de pH acima de 5.0. Pode ser obtida na forma cristalizada em carnes, salmão e atuns (BRAVERMAN, 1963).

A tripsina é outra importante protease, sendo uma enzima de atividade fortemente proteolítica capaz de quebrar proteínas nos seus fragmentos polipeptídicos. A atividade ótima desta enzima situa-se próximo ao pH 8,0. É secretada pelas células pancreáticas sob a forma de um precursor inativo, o tripsinogênio, que é convertido em tripsina ativa pela enteroquinase, enzima presente no suco intestinal, por ela mesma ou por certas proteinases (MAHLER & CORDES, 1961).

A quimiotripsina é uma enzima com certas semelhanças da tripsina, possuindo o mesmo sítio de origem; velocidade de síntese; atividade endopeptidásica, peso molecular; ponto isoelétrico; composição dos aminoácidos e natureza catalítica do processo. Juntamente com a tripsina, sua ação é dar continuidade a digestão das proteínas, no duodeno. Ocorre no suco pancreático como a mistura do chimiotripsinogeno A e B (MAHLER & CORDES, 1961).

Os organismos marinhos são produtores de enzimas proteolíticas, as quais parecem ser mais estáveis e de maior atividade da que aquelas extraídas de outros animais (WINDSOR & BARLOW, 1981).

Vários estudiosos têm pesquisado sob enzimas proteolíticas em organismos marinhos, tanto sobre a possibilidade de extração e purificação para fins bioquímicos e farmacêuticos, para conhecimento mais profundo sobre as transformações post mortem que ocorrem no pescado e ainda como estudo fisiológico e bioquímico de uma espécie de animal. (CROSTON, 1960; GRONINGER, Jr., 1964; MAKINODAN & IKEDA, 1969; 1969a; 1969b; DABROWSKI & GLOGOWSKI, 1977; LIN et al., 1980; SAKER et al., 1982; ERICKSON, et al., 1983; VIEIRA et al., 1985).

As proteases ou enzimas proteolíticas é um grupo de enzimas que têm uma variada utilidade industrial, sendo usadas na indústria de bebidas (cervejas, vinhos, etc.) como clarificante, no amolecimento de carnes, nos costumes para limpeza e amaciamento do couro, na preparação de produtos farmacêuticos (peptopancrease, panikleoflat, etc.), na indústria de comestíveis, na indústria de pescado para elaboração de concentrado proteico de pescado (HALE, 1969).

O presente trabalho objetiva o conhecimento das propriedades do sistema proteolítico em fígado de cangulo Balistes vetula (Linnaeus) e tubarão lombo preto Carcharhinus obscurus (Lisueur), visando a possibilidade do aproveitamento das enzimas proteolíticas destas duas espécies de pescado, bem como possibilitar o conhecimento das características enzimáticas.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o presente estudo, utilizamos fígados de cangulo Balistes vetula (Linnaeus) e de tubarão lombo preto Carcharhinus obscurus (Lesueur) capturados na costa de Fortaleza, em pescarias de ida e vinda, adquiridas na colônia de pescadores do Mucuripe.

O fígado foi retirado da cavidade abdominal, através de um corte transversal e mascerado em graal sob condições de refrigeração.

Os extratos foram homogeneizados em tampão fosfato 0,01M em cloreto de sódio 0,1M, pH 7,0 na proporção de 1:10 (p:v) e centrifugados a 20.000xg durante 15 minutos em centrífuga modelo HT International Equipament Company, à temperatura em torno de 4°C. Os sobrenadantes foram conservados em congelador até o momento de sua utilização, sendo desprezados os precipitados.

Nos extratos, foram determinadas as concentrações de proteína e atividade proteolítica.

A concentração de proteína foi determinada pelo método do Micro-biureto (GOA, 1953), usando-se como padrão a albumina sérica bovina (Sigma, Figura 1), sendo os resultados expressos em miligrama (mg) de proteína por mililitro (ml).

A atividade proteolítica foi determinada como a capacidade de hidrolizar a caseína e a hemoglobina.

A reação enzimática desenvolveu-se pela adição de 1,0 ml do extrato de fígado a 5,0 ml de caseína (segundo HAMMARSTEN, E. Merck AG Darmstadt) ou hemoglobina bovina (Sigma) a 1% em tampão fosfato 0,01M em NaCl 0,1M e tampão citrato respectivamente. A incubação ocorreu a 40°C durante 60 minutos. Parou-se a reação com 1,0ml de ácido tricloro acético (TCA) a 40% (AINOUZ et al., 1972). Após 30 minutos de repouso, a mistura foi filtrada em papel de filtro quantitativo Framex, faixa branca, sendo a atividade proteolítica determinada na fração solúvel em TCA e medida pela absorvância, em 750nm em espectrofotômetro.

tômetro Varian Techtron modelo 635K, 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 densidade ótica das amostras foram subtraídos dos valores dos brancos. A unidade de atividade correspondeu a variação de 0,1 de densidade ótica. A atividade proteolítica foi expressa em unidade de atividade (U. A.) por mililitro (ml) e a atividade específica determinada por meio da divisão da atividade proteolítica pela concentração de proteína em miligrama por mililitro.

A determinação do pH ótimo das proteases efetuou-se utilizando-se tampão fosfato 0,01M em cloreto de sódio (NaCl) 0,1M para o substrato caseína nos seguintes pHs: 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0; 11,0 e 12,0 e tampão citrato, para a hemoglobina, nos pHs: 1,0; 1,5; 2,0; 2,6; 3,0; 3,6; 4,0; 4,6 e 5,0. Tanto a caseína como a hemoglobina foram preparadas também nos respectivos pHs. A reação enzimática foi desenvolvida como descrita anteriormente e os resultados foram expressos em unidade de atividade por mililitro.

Para a escolha da concentração ideal de substrato a ser usada, foram feitos experimentos em que a concentração do substrato (caseína e hemoglobina) variou de 10 a 70mg, conservando-se o volume de 1,0ml do extrato. A reação enzimática foi idêntica às anteriores e os resultados expressos em unidade de atividade por mililitro.

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', 40', 50' e 60'. A reação enzimática foi semelhante aos demais ensaios e os resultados expressos em unidade de atividade por mililitro.

A termo-estabilidade foi determinada submetendo-se o extrato a temperaturas de 30, 40 e 50°C durante 15, 30, 45 e 60 minutos. Após cada tempo, o extrato era retirado da temperatura e, nele, determinada a atividade enzimática. Os resultados foram expressos em unidade de atividade por mililitro, sendo transformados em percentagens de atividade relativa ao ex

trato não submetido ao calor, cuja atividade foi considerada 100%.

Os extratos de fígado das duas espécies, preparados com tampão fosfato 0,01M em cloreto de sódio 0,1M pH 7,0 na proporção de 1:10 (p/v) foram usados para purificação com sulfato de amônia $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. O sulfato de amônia sólido foi gradualmente adicionado ao extrato inicialmente para 20% de saturação, deixado em repouso em banho de gelo por 15 minutos e o precipitado foi removido por centrifugação a 20.000xg por 15 minutos a 40°C. O sobrenadante resultante foi usado para as próximas precipitações com 40, 60, 80 e 100% de saturação. Os precipitados obtidos foram suspensos em tampão fosfato pH 7,0 e dializados em geladeira, contra água destilada e deionizada durante um período de tempo suficiente para que a água não apresentasse reação positiva com o hidróxido de bário. O conteúdo de proteína e as atividades proteolíticas foram determinadas em todas as frações. Os resultados obtidos foram expressos em Unidade de Atividade por miligrama de proteína (U.A. x mg de Proteína⁻¹).

RESULTADOS

Para a determinação das condições ótimas de ensaio, o extrato de fígado foi utilizado como fonte de enzima.

A curva de atividade proteolítica em relação ao pH, para o cangulo Balistes vetula (Linnaeus), usando a hemoglobina, indica que o máximo de atividade foi alcançado no pH 2,6, sugerindo ser este o pH ótimo para a reação enzimática nesta faixa. (Tabela I, Figura 2). Em pH 3,6, observa-se um leve aumento na atividade proteolítica, representando cerca de 90% daquela obtida em pH 2,6. Na faixa mais alcalina, quando o substrato foi a caseína, verifica-se que o pico máximo de atividade foi em pH 10,7 (Tabela I, Figura 3).

Para o tubarão Carcharhinus obscurus (Lisueur), usando-se a hemoglobina, a atividade máxima ocorreu em pH 2,6, semelhante a encontrada para o cangulo (Tabela II, Figura 4), não sendo observado atividade na faixa de pH alcalino.

Inicialmente, pode-se observar que a atividade proteolítica é crescente quando há um aumento da temperatura de incubação (Tabelas III e IV, Figuras 5,6 e 7). Na temperatura de 40°C e no tempo de 60 minutos esta atividade apresentou um incremento percentual mais elevado, quando comparado aos demais (30°C e 50°C) tanto para o cangulo (pHs 2,6 e 10,7) quanto para o tubarão, razão pela qual foram escolhidas como o tempo e temperatura ótimos de reação. Verifica-se que apesar do acréscimo no início do tempo, as enzimas do cangulo na temperatura de 50°C, perderam certa atividade quando atingiram os 60 minutos de reação (Tabela III, Figuras 5 e 6). Para o tubarão, o comportamento da enzima a 50°C foi totalmente inferior à 40°C, desde o início da atividade (Tabela IV, Figura 7).

A fim de que a reação enzimática se desenvolvesse na presença de excesso de substrato (hemoglobina e caseína 1%) foi determinada a relação enzima-substrato. Pelas curvas obtidas, nota-se que a relação de 50mg de substrato para 1,0ml do extrato de fígado de cangulo e tubarão (Tabelas V e VI, Figuras 8,9 e 10).

DISCUSSÃO

GRONNINGER, Jr (1964) trabalhando com proteases do músculo de albacora, encontrou um pH ótimo de atividade para a enzima em torno de 2,4-2,5, usando a hemoglobina como substrato.

MAKINODAN & IKEDA (1969 e 1969a) estudando as enzimas proteolíticas presentes em várias espécies de pescado (carpa, albacora, cavala, sardinha, bacalhau, sardinha e corvina), verificou que o pH ótimo variou de 2,4 a 3,8, sendo o substrato a hemoglobina.

DABROWSKI & GLOGOWSKI (1977) citam que o pH 3,0 apresentou elevada atividade proteolítica em fígado de truta e carpa, sendo o substrato a hemoglobina.

Recentemente Lin et al., (1980) e ERICKSON et al., (1983) encontraram valores de pH próximo a 3,0 para proteases de corvina e pescada.

A atividade proteolítica observada nos extratos de cangulo e tubarão, quando o substrato usado era a hemoglobina, também apresentou um máximo em pHs bastante ácidos, estando portanto em acordo com os autores acima citados (Tabelas I e II, Figuras 2 e 4). Observa-se, ainda, que no extrato de cangulo aparecem 2 picos correspondendo aos pHs 2,6 e 3,6, sugerindo a presença de dois sistemas enzimáticos na faixa ácida, fenômeno também observado por GRONNINGER, Jr. (1964) em extrato de músculo de albacora.

A atividade caseolítica máxima encontrada no extrato de fígado de cangulo ocorrida em pH 10,7 (Tabela I, Figura 3), diverge de vários autores (CROSTON, 1960; MAKINODAN & IKEDA, 1969a; DABROWSKI & GLOGOWSKI, 1977; LIN et al., 1980; ERICKSON et al., 1983), cujos pHs ótimos encontrados foram 9,0, 8,0, 9,5, 8,5 e 7,8 em extratos de salmão, carpa, corvina, bacalhau e merluza, respectivamente.

As atividades proteolíticas frente aos substratos hemoglobina e caseína demonstram que há pelo menos dois sistemas de proteases em fígado de cangulo, enquanto no fígado de tubarão só foi observada protease na faixa ácida.

A ausência de protease quer na faixa ácida ou alcalina, tem sido encontrada em várias espécies de peixe e estaria vinculada ao tipo de alimentação que o indivíduo estaria submetido (MAKINODAN & IKEDA, 1969; HOYLE, 1973).

A temperatura ótima de reação em relação a atividade proteolítica em pH ácido foi semelhante para as duas espécies consideradas, situando-se em torno de 40°C, enquanto em pH alcalino a atividade máxima em extrato de cangulo situou-se em torno de 50°C (tabelas III e IV, Figuras 5, 6 e 7).

Em geral as proteases de pescado apresentam atividades máximas entre 40 e 50°C, como tem observado vários pesquisadores (CROSTON, 1960; MAKINODAN & IKEDA, 1969, 1969a, 1969b; SAKER *et al.*, 1982; VIEIRA *et al.*, 1985), ocorrendo variações dentro deste intervalo na dependência da variação do pH da reação. Ressalte-se que a atividade proteolítica ácida em extrato de cangulo frente a variação de temperatura, sempre foi muito mais elevada do que aquelas para os extratos de tubarão. Por outro lado, as proteases alcalinas apresentaram a nível de temperatura ótima, atividade 10 vezes superior às proteases ácidas.

A saturação enzima-substrato, tanto relativa a hemoglobina como para a caseína, foi semelhante na faixa ácida de pH como na faixa alcalina, para extrato das duas espécies (Tabelas V e VI, Figuras 8, 9 e 10), com a relação de 50mg do substrato para 1,0ml de extrato diluído de 10 vezes. Essa relação indica uma grande afinidade do sistema enzimático frente aos substratos usados, semelhante ao encontrado por SAKER *et al.*, (1982) e superiores aqueles encontrados por PRISCO & VIEIRA (1976); AINOZ *et al.*, (1981) e VIEIRA *et al.*, (1985).

As proteases ácidas e alcalinas oriundas dos extratos das duas espécies estudadas, tiveram comportamento diferentes quando submetidos a ação do calor (Tabelas VII, VIII e IX, Figuras 11, 12 e 13). As proteases ácidas oriundas de cangulo foram mais estáveis do que aquelas originadas de fígado de tubarão, sendo que as da primeira espécie experimentaram uma leve ativação à temperatura de 30°C. Por outro lado, nos extratos de tubarão houve uma crescente inativação do sistema enzimático à 40 e 50°C, sendo que nesta última temperatura ocorreu uma inativação completa a partir de 30 minutos de tratamento térmico.

As proteases alcalinas do cangulo também apresentam uma ativação quando os extratos foram tratados a 30°C. Entretanto a 40 e 50°C, houve uma redução crescente da atividade enzimática em relação ao tempo de exposição ao calor, atingindo uma perda máxima de 80% à temperatura de 50°C com 60 minutos.

As enzimas proteolíticas geralmente apresentam-se termo-estáveis, tanto quando ensaiadas a pH ácido ou alcalino. Isto tem sido observado em diversos estudos com músculo e vísceras de pescado (MAKINODAN & IKEDA, 1969; 1969a; SAKER *et al.*, 1982), entretanto esta resistência ao calor só é efetiva a temperaturas inferiores a 50°C e por tempo limitado. De qualquer modo, esta resistência do sistema enzimático ao calor facilita a manipulação dos extratos de fígado, podendo-se trabalhar com certa segurança e sem grandes riscos de inativação.

No processo de purificação dos sistemas enzimáticos (ácido e alcalino), a atividade específica foi sempre mais elevada nas frações 40-60% de saturação com sulfato de amônia (Tabelas X, XI e XII, Figuras 14, 15 e 16), estando de acordo com os estudos realizados por GRONINGER, Jr. (1964); MAKINODAN & IKEDA (1969a e 1969b), SAKER *et al.*, (1982).

Comparando-se as atividades proteolíticas após a purificação com sulfato de amônia dos extratos de cangulo, observa-se que as enzimas alcalinas apresentaram uma purificação muito mais elevada do que aquelas de comportamento ácido, na ordem de 7 vezes mais. Por outro lado, esse método de purificação foi pouco eficiente para as proteases ácidas oriundas de fígado de tubarão, visto que o máximo conseguido não atingiu a 2 vezes de purificação em relação ao extrato bruto.

Para os extratos de cangulo, considerando-se que as frações 40-60%, apresentam uma purificação de 7,8 e 55,2 vezes,

CONCLUSÕES

1. O extrato de fígado de cangulo Balistes vetula (Linnaeus), apresentou um sistema enzimático com ótimo de atividade nos pHs 2,6 e 3,6 (substrato hemoglobina) e pH 10,7 (substrato caseína).
2. O ótimo de atividade da enzima proteolítica encontrada no fígado do tubarão (Carcharhinus obscurus (Lisueur), foi o verificado no pH 2,6 (substrato hemoglobina).
3. A temperatura ideal de reação enzimática para as três enzimas, foi de 40°C com incubação por 60 minutos.
4. A relação enzima-substrato foi de 50mg de substrato (hemoglobina e caseína) para 1,0ml do extrato de fígado das duas espécies.
5. A atividade proteolítica do extrato de cangulo (pH 2,6 e 10,7), submetido a temperatura de 30°C, foi estável em todos os tempos de incubação. Com a incubação do extrato a 40 e 50°C por 60 minutos, essa atividade decresceu em torno de 61, 80, 39 e 94% do original, respectivamente.
6. No sistema enzimático do tubarão, a enzima permaneceu estável a 30°C, perdendo rapidamente sua estabilidade com o aumento da temperatura, sendo nulas nas temperaturas de 40 e 50°C, a partir de 60 e 30 minutos de incubação respectivamente.
7. A fração correspondente a 40-60% de saturação com sulfato de amônia, foi que apresentou maior atividade específica, considerando os extratos oriundos de cangulo e tubarão.

SUMÁRIO

O presente trabalho objetivou determinar as condições ótimas do sistema enzimático proteolítico e as características fundamentais das proteases de fígado de cangulo Balistes vetula (Linnaeus) e tubarão lombo preto Carcharhinus obscurus (Lacépède) a fim de possibilitar o conhecimento deste sistema, para obtenção de compostos bioquímicos e/ou farmacêuticos de grande uso nas indústrias alimentícia e farmacêutica.

Os animais foram adquiridos em pescarias de ida e vinda, na colônia de pesca do Mucuripe, trazidos ao laboratório onde era retirado o fígado para preparo do extrato.

O extrato de fígado foi homogeneizado em tampão fosfato 0,01M em NaCl 0,1M pH 7,0 na proporção de 1:10 (p/v) em banho de gelo e centrifugado por 15 minutos em 20.000xg a 4°C. O precipitado era desprezado e no sobrenadante determinava-se a atividade proteolítica e o teor de proteína.

A atividade proteolítica foi fixada através da aptidão de hidrólise da hemoglobina ou caseína na razão de 50mg de substrato para 1,0ml do extrato.

A reação enzimática desenvolveu-se pela adição de 1,0ml do extrato à 5,0ml de hemoglobina ou caseína a 1% em tampão citrato e tampão fosfato 0,01M em NaCl respectivamente.

A incubação foi feita a 40°C por 60 minutos, Parou-se a reação com 1,0ml de ácido tricloro acético (TCA) a 40%. A leitura da absorbância a 750nm foi feita após a reação com o reagente de Folin em espectrofotômetro.

A caracterização básica das enzimas relacionou-se com a determinação do pH ótimo, tempo e temperatura de reação, relação enzima substrato, termo estabilidade e condição ótima de purificação das enzimas.

o pH ótimo de reação observado para o cangulo apresentou três picos máximos (pH 2,6; 3,6 e 10,7), supondo-se a presença de enzimas do tipo pepsínico e trípico. Para o tubarão o ótimo foi observado no pH 2,6.

A temperatura ótima de reação foi determinada a 40°C por 60 minutos.

A quantidade de substrato escolhido foi de 50mg de hemoglobina ou caseína para 1,0ml do extrato de fígado.

As proteases estudadas, sofreram alterações em temperaturas de 40 e 50°C, perdendo sua atividade ao longo dos 60 minutos, sendo que a 30°C não houve queda da estabilidade das enzimas.

A melhor purificação com sulfato de amônia ocorreu na fração 40-60% de saturação, para os extratos de cangulo e tubarão.

BIBLIOGRAFIA

- AINUZ, I.L.; XAVIER-FILHO, J. & GOMES-FILHO, E. - 1972 - Atividade proteolítica em sementes de Vigna sinensis cv seridó. Ciência e Cultura, 204: 104
- AINUZ, I.L.; BENEVIDES, N.B. & FREITAS, A.L.P. - 1981 - Proteolytic activities in seeds of Vigna unguiculata (L) Walp. Biol. Plant., 23 (2):133-140.
- BRAVERMAN, J.B.S. - 1963 - Introduction to the Biochemistry of Foods. Elsevier Publishing Company. Amsterdam. 336pp.
- CROSTON, C.B. - 1960 - Tryptic Enzymes of Chinook Salmon. Arch. Biochem. Biophys., 89: 202-206.
- DABROWSKI, K. & GLOGOWSKI, J. - 1977 - Studies on the Role of Exogenous Proteolytic Enzymes in Digestion Process in Fish. Hidrobiologia., 54(2): 129-134.
- DATA FOR BIOCHEMICAL RESEARCH - 1969 - Edited by R.M.C. Dawson, D.C. Elliott, W.H. Elliott & K.M. Jones. Oxford University Press. 654pp.
- ERIKSON, M.C.; GORDON, D.T. & ANGLEMIER, A.F. - 1983 - Proteolytic Activity in the Sacroplasmic Fluids of Parasitized Pacific Whiting (Merluccius productus) and Unparasitized true Cod (Gadus macrocephalus). J. Food. Scienc., 48(4):1315-1319.
- 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.
- GRONINGER, Jr., H.S. - 1964 - Partial Purification and Some Properties of a Proteinase from Albacore (Germo alalunga) Muscle. Arch. Biochem. Biophys., 108:175-182.

- HALE, M.B. - 1969 - Relative Activities of Commercially-Available Enzymes in the Hydrolysis of Fish Protein. Food. Technology, 23: 107-110
- HOYLE, R.J. - 1973 - Digestive Enzyme Secretion After Dietary Variation in the American Lobster (Homarus americanus). J. Bull. Res. Bd. Can., 30(11): 1647-1653.
- LIN, T.; SU, H.K. & LANIER, T.C. - 1980 - Characterization of Fish Muscle Proteases Using Radio-Labeled Protein Substrates. J. Food. Scienc., 45: 1036-1039.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL R.J. - 1951 - Protein Measurements with the Folin Phenol Reagent. Jour. Biol. Chem., 193: 265-275.
- MACHADO, Z.L. & BURGOS, P.F.O. - 1978 - Pesquisas Tecnológicas sobre a Industrialização de Tubarões - Subsídios Técnicos para o Planejamento de Instalações Beneficiadoras. Série Estudos de Pesca. 7:7-13.
- MAHLER, H.R. & CORDES, E.H. - 1969 - Biological Chemistry. Haper International Edition. 872pp.
- MAKINODAN, Y. & IKEDA, S. - 1969 - Studies on Fish Muscle Protease - I. On the Existence of Two Kinds of Proteinases Active in Acid and Slightly Alkaline pH Range. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 35(7): 672-676.
- _____ - 1969a - Studies on Fish Muscle Protease-II. Purification and Properties of a Proteinase Active in Slightly Alkaline pH Ranges. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 35(8): 749-757.
- _____ - 1969b - Studies on Fish Muscle Protease-III. Purification and Properties of a Proteinase Active in Acid pH Ranges. Bull Jap. Soc. Sci. Fish., 35(8): 758-766.
- ZES, M.F. - 1981 - Aspectos da Biologia e Biometria do Can-gulo Balistes vetula (Linnaeus) no Nordeste do Brasil. Anais do II Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca.

- OGAWA, M.; NOBREGA, J.W.M. & BEZERRA, F.J. - 1973 - Sobre a Industrialização de Cações no Nordeste Brasileiro. I - Aproveitamento da Carne e Barbatanas. Arq. Ciên. Mar., 13(2):91-97.
- OGAWA, M.; KOMAKI, T. & NUNES, M.L. - 1973a - Sobre a Industrialização de Cações no Nordeste Brasileiro. III - Aproveitamento do Óleo Vitaminado de Fígado. Arq. Ciên. Mar., 13(2):105-107.
- PARENTE, E.J. de S. & NUNES, M.L. - 1973 - Sobre a Industrialização de Cações no Nordeste Brasileiro. II - Aproveitamento da pele. Arq. Ciên. Mar., 13(2):99-103.
- PRISCO, J.T. & VIEIRA, G.H.F. - 1976 - Effects of NaCl Salinity on Nitrogenous Compounds and Proteases During Germination of Vigna sinensis Seeds. Physiol. Plant., 36:317-320
- SAKER, S.A.; VIEIRA, G.H.F. & SAMPAIO, A.H. - 1982 - Ensaio Preliminar ao Estudo de Caracterização e Propriedades de Enzimas Proteolíticas em Hepatopâncreas de Jovens da Lagosta Panulirus laevicauda (Latreille). Arq. Ciên. Mar., 22 (1/2): 57-66.
- SUDENE - 1983 - Avaliação do Potencial de Tubarões da Costa Nordeste do Brasil. Série: Brasil. Estudos de Pesca, 10.
- SUDEPE - 1983 - Estatística de Pesca. Relatório anual. Controle de Desembarque.
- VIEIRA, G.H.F.; SILVA, L.C.; SAKER-SAMPAIO, S. & SAMPAIO, A.H. - 1985 - Ensaio Preliminar ao Estudo da Ação das Proteases em Hemolinfa de Jovens da Lagosta Panulirus laevicauda (Latreille). Arq. Ciên. Mar., 24:
- WINDSOR, M. & BARLOW, S. - 1981 - Introduction to Fishery by Products. Fishing News Book Ltd. England, 187pp.

TABELA I - Variação da atividade proteolítica em fígado de can-
gulo Balistes vetula (Linnaeus) em função do pH de
reação.

SUBSTRATO	pH	U.A. x ml ⁻¹
HEMOGLOBINA	2,0	50
	2,6	80
	3,0	69
	3,6	72
	4,0	60
CASEÍNA	5,9	14
	7,0	1
	7,8	4
	8,3	6
	9,5	11
	10,7	44
	11,8	7

TABELA III - Variação da atividade proteolítica de fígado de cangulo Balistes vetula (Linnaeus) em função do tempo e temperatura de incubação.

TEMPO (min)	T E M P E R A T U R A					
	30°		40°		50°	
	U.A. x ml ⁻¹		U.A. x ml ⁻¹		U.A. x ml ⁻¹	
	pH 2,6	pH 10,7	pH 2,6	pH 10,7	pH 2,6	pH 10,7
30	35	380	56	490	54	580
40	38	450	60	630	70	700
50	46	560	70	730	68	640
60	52	550	76	750	68	720

TABELA IV - Variação da atividade proteolítica de fígado de tubarão Carcharhinus obscurus (Lisueur) em função do tempo e temperatura de incubação.

TEMPO (min)	T E M P E R A T U R A		
	30°C	40°C	50°C
	U.A. x ml ⁻¹	U.A. x ml ⁻¹	U.A. x ml ⁻¹
30	12	42	20
40	14	46	34
50	20	54	36
60	24	58	40

TABELA V - Variação da atividade proteolítica de fígado de cangulo Balistes vetula (Linnaeus) em função da concentração do substrato.

CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO (mg/ml)	pH 2,6	pH 10,7
	HEMOGLOBINA	CASEÍNA
	U.A. x ml ⁻¹	U.A. x ml ⁻¹
10	50	40
30	78	58
50	92	66
70	94	62

TABELA VII - Variação percentual de atividade proteolítica no fígado de cangulo Balistes vetula (Linnaeus) usando como substrato a hemoglobina (pH 2,6) em função do tempo e temperatura de aquecimento do extrato.

TEMPO (min)	T E M P E R A T U R A					
	30°C		40°C		50°C	
	U.A. x ml ⁻¹	% de Ativ.	U.A. x ml ⁻¹	% de Ativ.	U.A. x ml ⁻¹	% de Ativ.
0	64	100	64	100	64	100
15	75	117	50	78	38	59
30	75	117	38	59	32	50
45	69	108	38	59	25	39
60	69	108	25	39	13	20

TABELA VIII - Variação percentual de atividade proteolítica no fígado de cangulo Balistes vetula (Linnaeus) usando como substrato a caseína (pH 10,7) em função do tempo e temperatura de aquecimento do extrato.

TEMPO (min)	T E M P E R A T U R A					
	30°C		40°C		50°C	
	U.A. x ml ⁻¹	% de Ativ.	U.A. x ml ⁻¹	% de Ativ.	U.A. x ml ⁻¹	% de Ativ.
0	194	100	620	100	620	100
15	200	103	620	100	540	87
30	220	113	440	71	400	65
45	215	111	380	61	100	16
60	200	103	380	61	40	6

TABELA IX -- Variação percentual de atividade proteolítica no fígado de tubarão Carcharhinus obscurus (Lisueur) usando como substrato a hemoglobina (pH 2,6) em função do tempo e temperatura de aquecimento do extra - to.

TEMPO (min)	T E M P E R A T U R A					
	30°C		40°C		50°C	
	U.A. x ml ⁻¹	% de Ativ.	U.A. x ml ⁻¹	% de Ativ.	U.A. x ml ⁻¹	% de Ativ.
0	40	100	40	100	40	100
15	40	100	32	80	37	93
30	38	95	6	15	0	0
45	38	95	6	15	0	0
60	38	95	0	0	0	0

TABELA X - Dados relativos a purificação com sulfato de amônia $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de protease de fígado de cangulo Balistes vetula (Linnaeus). No ensaio usou-se hemoglobina (pH 2,6), sendo a incubação à temperatura de 40°C durante 60 minutos.

% de Sulfato de Amônia	U.A. x ml ⁻¹	mgP x ml ⁻¹	U.A. x mg.P ⁻¹	Recuperação	Veze de Precipitação.
0	74	36,02	2,1	100	1,0
0-20	24	1,89	12,7	32	6,0
20-40	26	4,46	5,8	34	2,8
40-60	62	3,77	16,4	82	7,8
60-80	12	3,90	3,1	16	1,5
80-100	2	0,86	2,3	3	1,1

TABELA XI - Dados relativos a purificação com sulfato de amônia ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) de protease de fígado de cangulo Balis - tes vetula (Linnaeus). No ensaio usou-se a caseína' como substrato (pH 10,7), sendo a incubação à temperatura de 40°C durante 60 minutos.

% DE SULFATO DE AMÔNIA	U.A. x ml ⁻¹	mgP x ml ⁻¹	U.A. x mgP ⁻¹	Recuperação	Vezes de Purificação.
0	76	36,02	2,1	100	1,0
0 - 20	18	1,89	9,5	24	4,5
20-40	230	4,46	51,6	304	24,6
40-60	440	3,77	116,0	578	55,2
60-80	20	3,90	5,1	26	2,4
80-100	4	0,86	4,7	5	2,2

TABELA XII - Dados relativos a purificação com sulfato de amônia $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ de protease de fígado de tubarão Car - charhinus obscurus (Lisueur). No ensaio usou-se he moglobina como substrato (pH 2,6), sendo a incubação à temperatura de 40°C durante 60 minutos.

% de Sulfato de Amônia	U.A. x ml ⁻¹	mgP x ml ⁻¹	U.A. x mq.P ⁻¹	Recuperação	Vezes de Purificação.
0	28,0	18,86	1,48	100	1,0
0-20	2,0	4,30	0,46	7	0,31
20-40	0	2,06	0 0	0	0
40-60	12,0	4,46	2,69	43	1,81
60-80	8,0	3,26	2,45	29	1,65
80-100	2,0	1,03	1,94	7	1,31

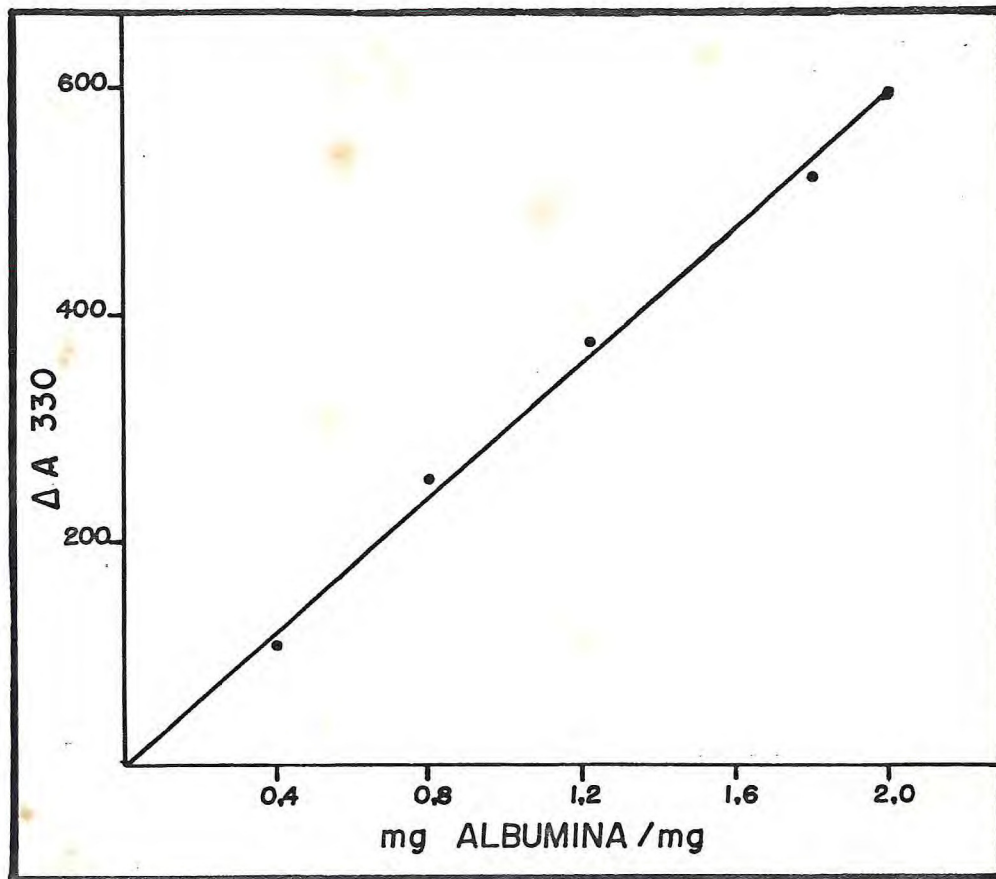


Figura 1 - Curva padrão da albumina sérica bovina (Sigma).

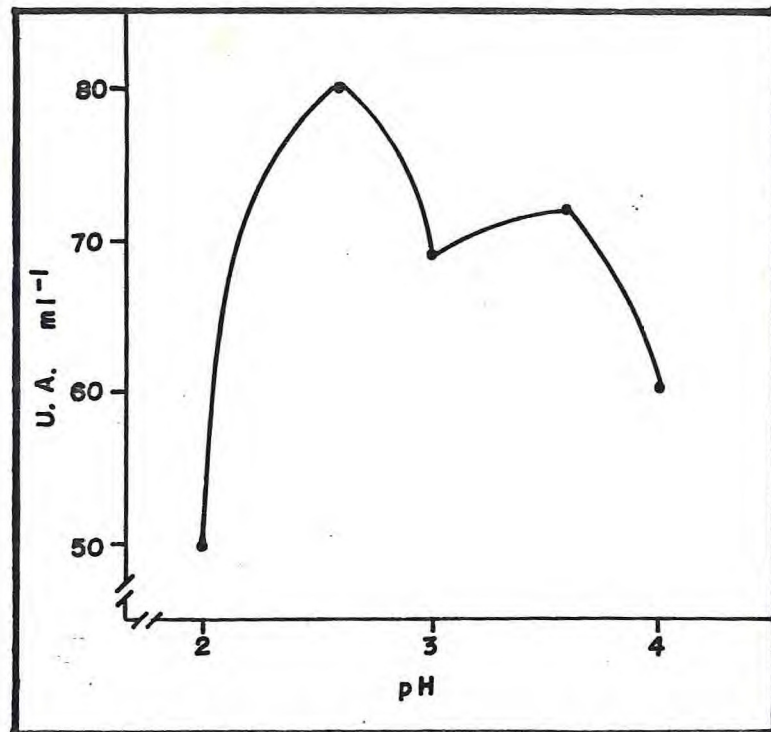


Figura 2 - Variação da atividade proteolítica em fígado de cangulo Balistes vetula (Linnaeus) em função do pH de reação, usando como substrato a hemoglobina.

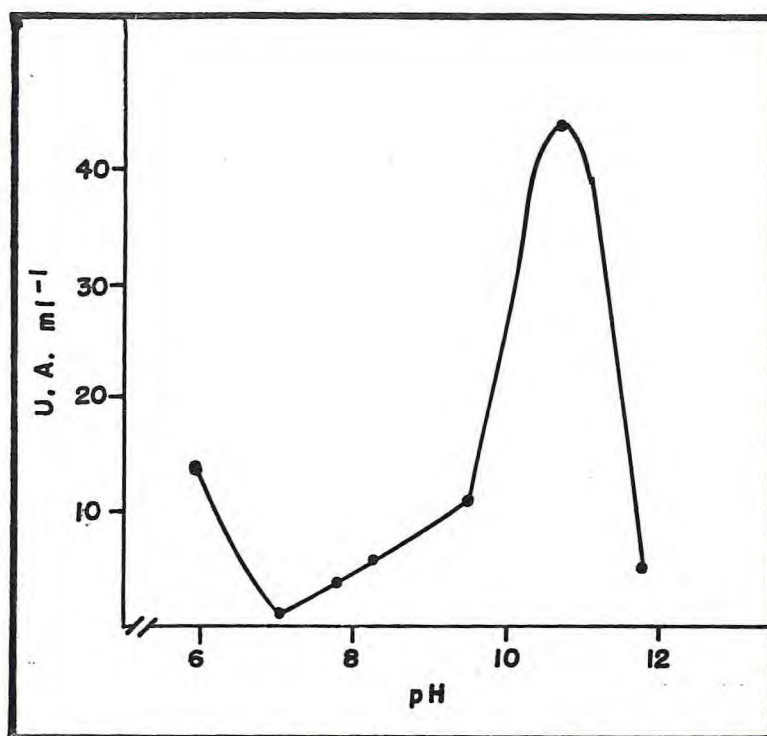


Figura 3 - Variação da atividade proteolítica em fígado de cangulo Balistes vetula (Linnaeus) em função do pH da reação, usando como substrato a caseína.

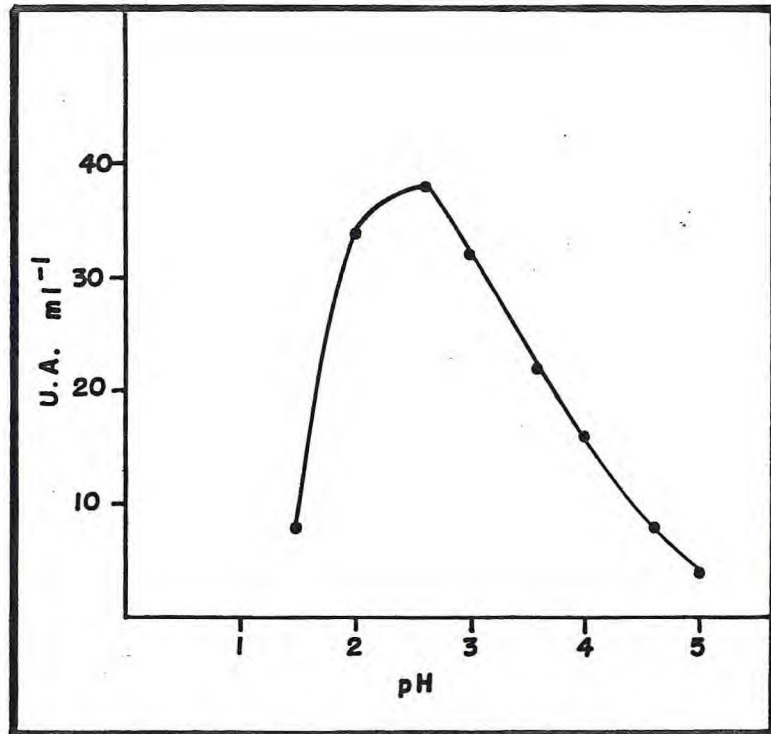


Figura 4 - Variação da atividade proteolítica em fígado de tubarão Carcharhinus obscurus (Lisueur) em função do pH de reação, usando como substrato a hemoglobina.

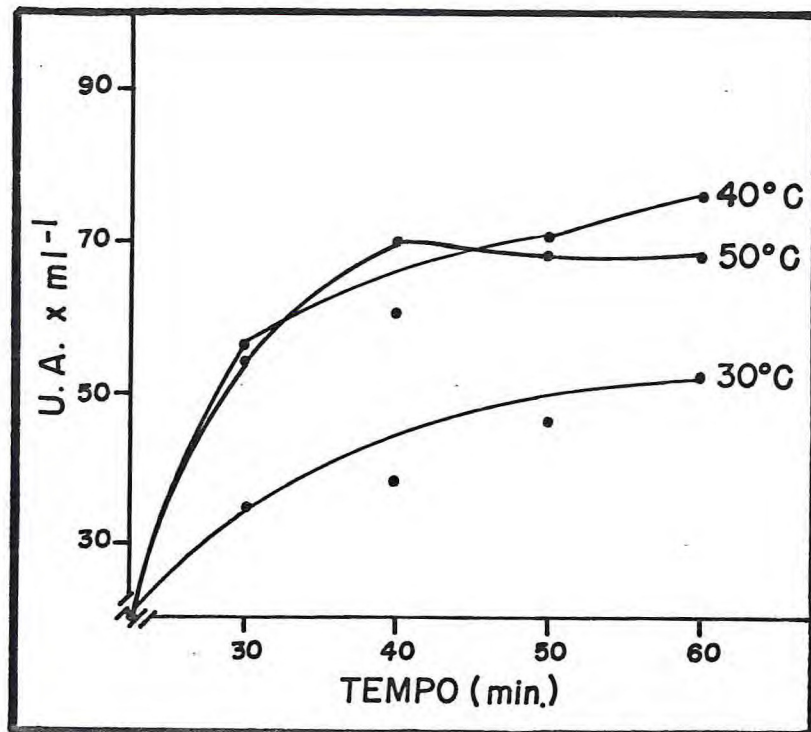


Figura 5 - Variação da atividade proteolítica de fígado de cangulo Balistes vetula (Linnaeus), em função do tempo e temperatura de incubação (pH 2,6).

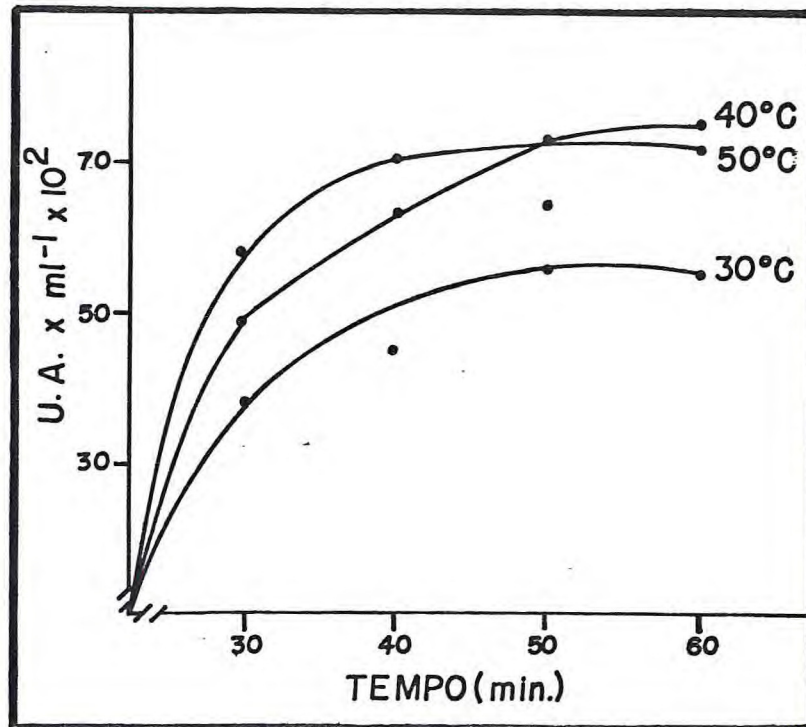


Figura 6 - Variação da atividade proteolítica de fígado de cangulo Balistes vetula (Linnaeus) em função do tempo e temperatura de incubação (pH 10,7).

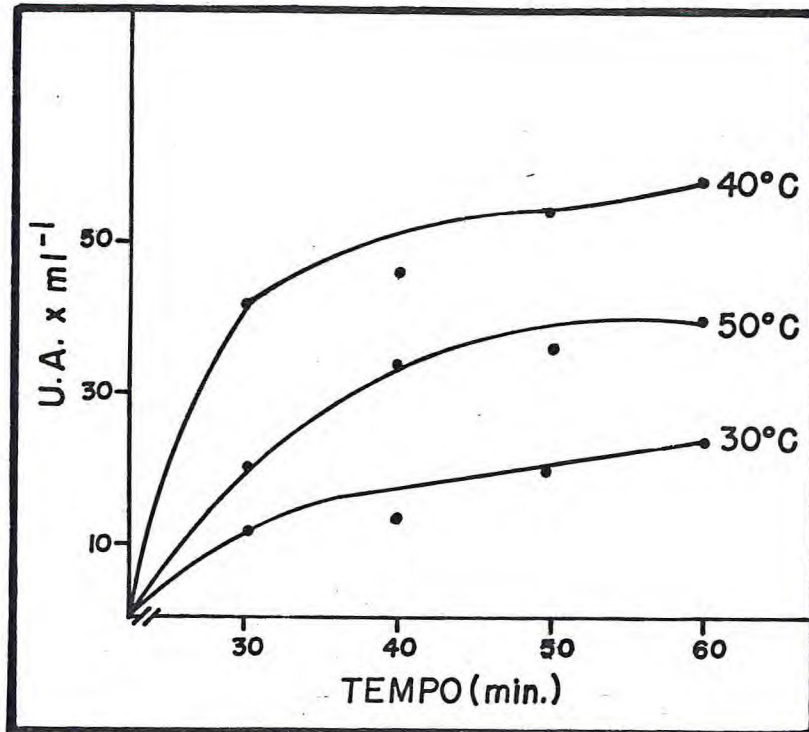


Figura 7 - Variação da atividade proteolítica de fígado de tubarão Cacharhinus obscurus (Lisueur) em função do tempo e temperatura de incubação.

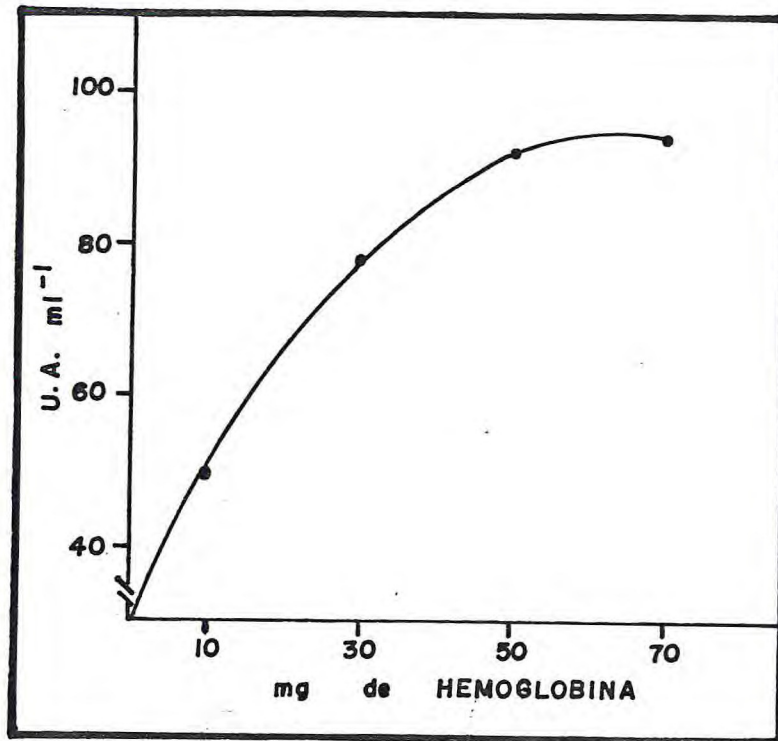


Figura 8 - Variação da atividade proteolítica de fígado de cangulo Balistes vetula (Linnaeus) em função da concentração do substrato (pH 2,6).

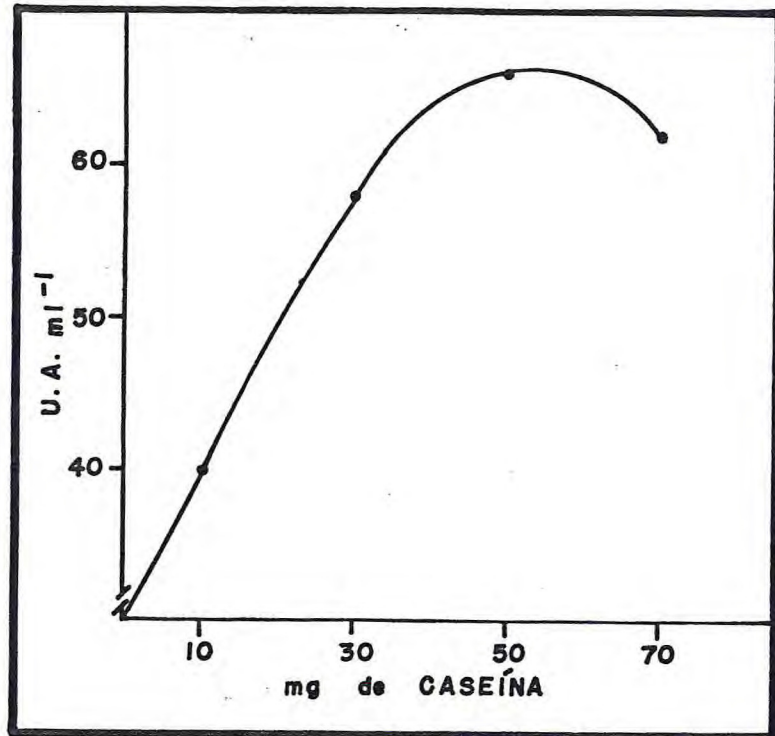


Figura 9 - Variação da atividade proteolítica de fígado de cangulo Balistes vetula (Linnaeus) em função da concentração do substrato (pH 10,7).

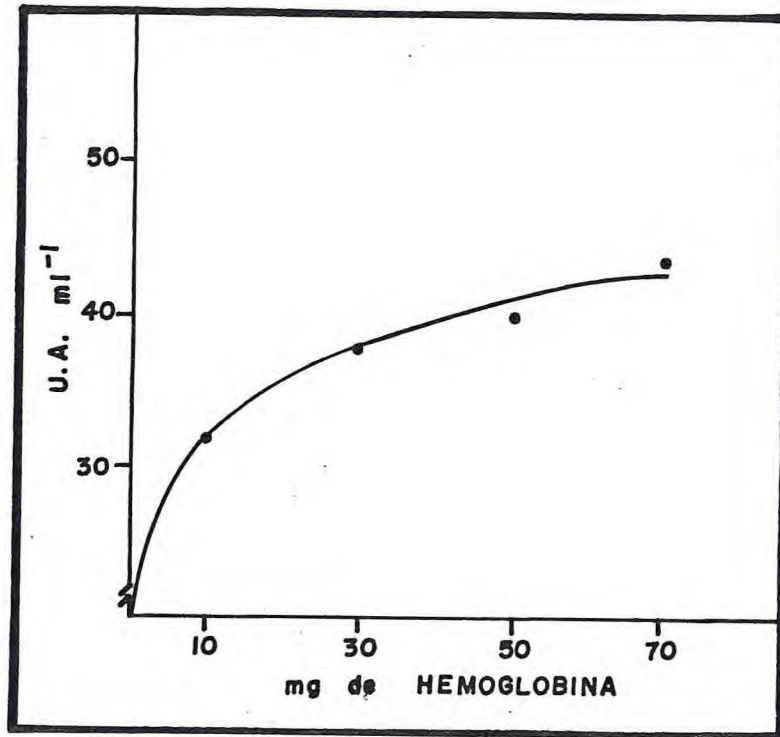


Figura 10 - Variação da atividade proteolítica de fígado de tubarão Carcharhinus obscurus (Lisueur) em função da concentração do substrato.

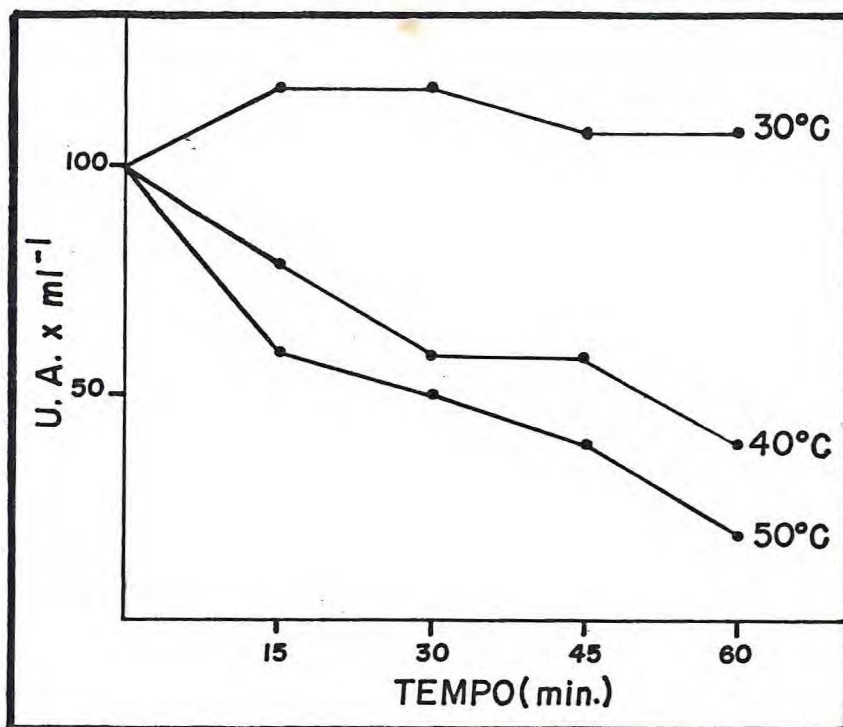


Figura 11 - Variação percentual de atividade proteolítica no fígado de cangulo Balistes vetula (Linnaeus) em função do tempo e temperatura de aquecimento do extrato. (pH 2,6).

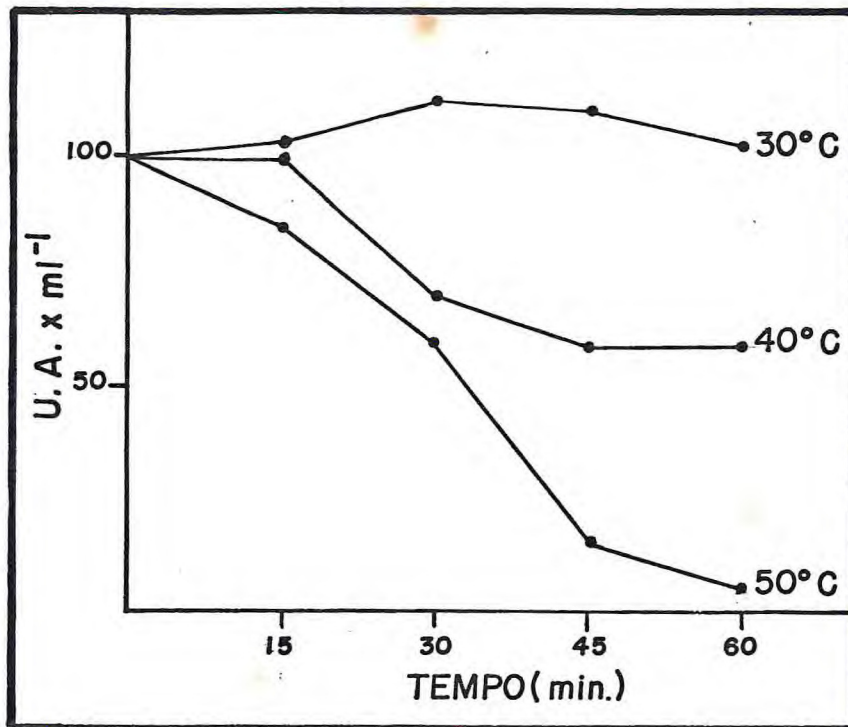


Figura 12 - Variação percentual de atividade proteolítica no fígado de cangulo *Balistes vetula* (Linnaeus) em função do tempo e temperatura de aquecimento do extrato. (pH 10,7).

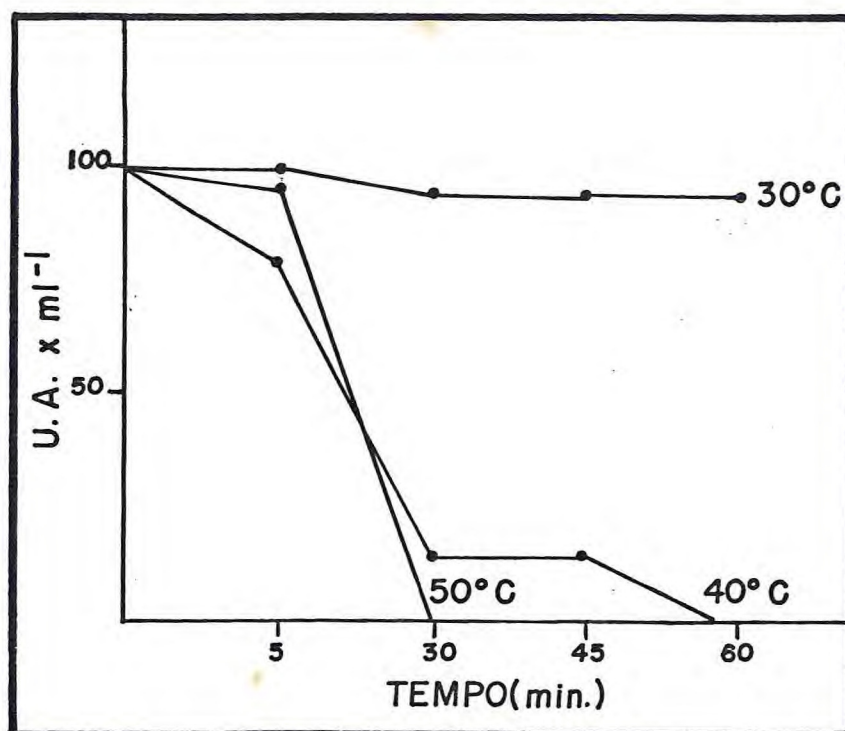


Figura 13 - Variação percentual de atividade proteolítica no fígado de tubarão Carcharhinus obscurus (Lisueur) em função do tempo e temperatura de aquecimento do extrato.

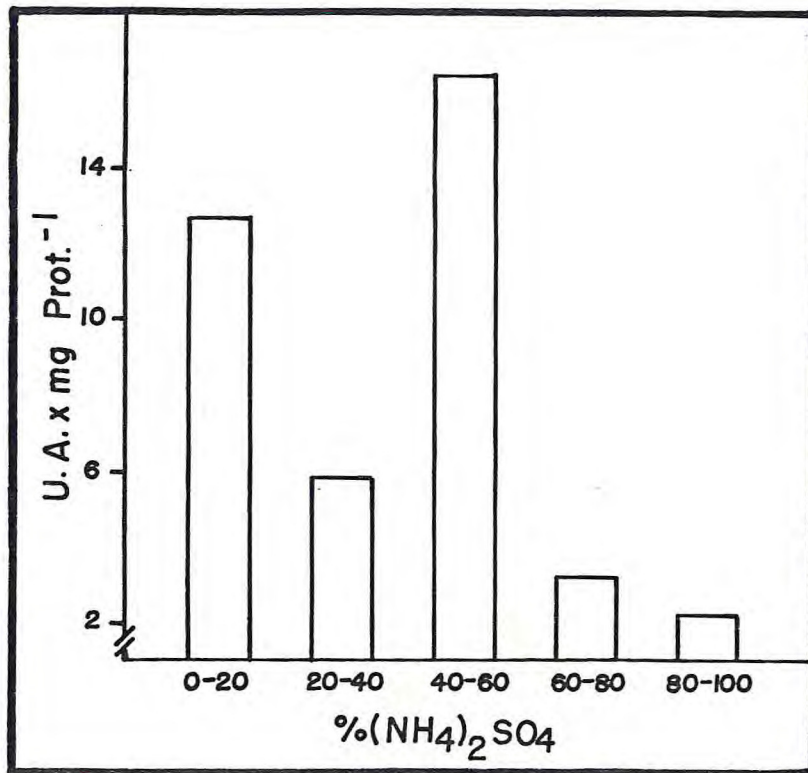


Figura 14 - Atividade específica da enzima de fígado de cangulo Balistes vetula (Linnaeus) em relação a sua saturação com sulfato de amônia. (pH 2,6).

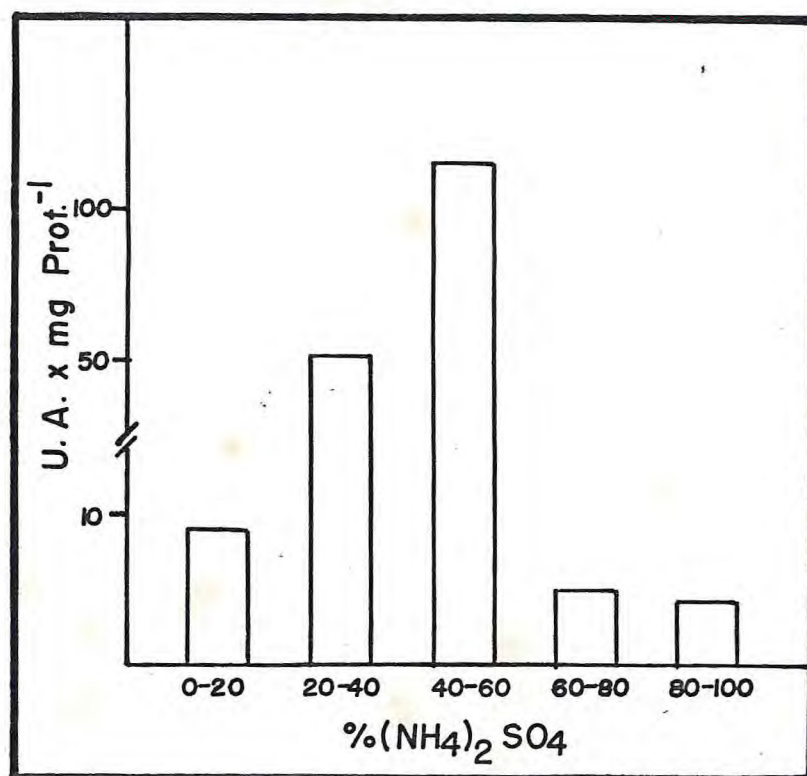


Figura 15 - Atividade específica da enzima de fígado de cangulo *Balistes vetula* (Linnaeus) em relação a sua saturação com sulfato de amônia. (pH 10,7).

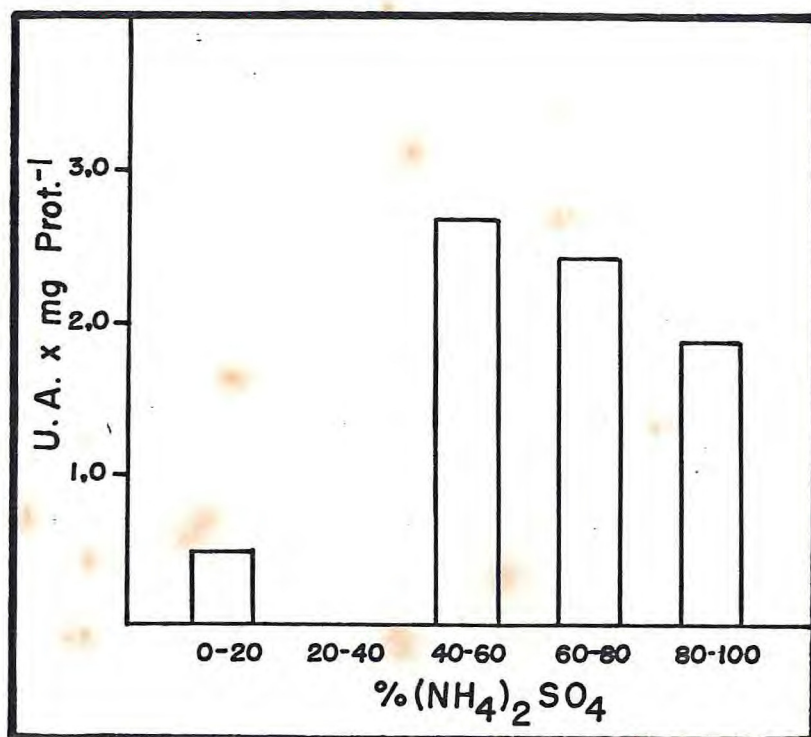


Figura 16 - Atividade específica da enzima de fígado de tubarão Carcharhinus obscurus (Lisueur) em relação a sua saturação com sulfato de amônia.