

CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DO SISTEMA ENZIMÁTICO DE FÍGADO DE CANGULO *Balistes vetula* LINNAEUS.

Grace Nazareth Diogo Theophilo¹
Gustavo Hitzschky Fernandes Vieira²
Silvana Saker-Sampaio³
Alexandre Holanda Sampaio⁴

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

O cangulo (*Balistes vetula* Linnaeus), peixe demersal encontrado em fundos coralinós e rochosos, participa com grande relevância na produção da pesca artesanal, embora o volume atual de captura se apresente aquém de seu potencial produtivo. Apesar da população ainda se encontrar subexplorada, existem amplas possibilidades de que sua exploração venha a se desenvolver em bases industriais (Menezes, 1981).

O cangulo aparece comumente como subproduto da pesca do pargo e lagosta, ocorrendo com grande incidência nas linhas pargueiras e nos manzuás no momento de suas despescas. Em ambos os casos, os indivíduos são lançados ao mar, considerando que não há espaço suficiente para seu acondicionamento e também porque o baixo valor econômico da espécie não justifica o seu transporte para os portos de desembarque.

A produção de cangulo no ano de 1987, de acordo com os dados fornecidos pelo IBAMA foi de 527,8 toneladas. Contudo, a produção ocasional não é computada nos dados oficiais, uma vez que o registro da produção artesanal é procedido somente para os barcos que realizam pescarias de ida e vinda.

No Nordeste brasileiro, o aproveitamento do pescado restringe-se unicamente ao tecido muscular, utilizado para o consumo humano. Entretanto, existem muitas indicações de que o pescado consiste em uma fonte promissora de várias substâncias de ação biológica, entre as quais destacam-se as enzimas proteolíticas.

Essas enzimas, também chamadas de proteases ou proteinases, têm a propriedade de hidrolisar a molécula de proteína na ligação peptídica, resultando em compostos de estruturas mais simples.

As enzimas proteolíticas são empregadas em vários processos para obtenção de produtos nas indústrias alimentícia, farmacêutica, de cosméticos e, ainda, nos curtumes para limpeza e amaciamento de couros e peles.

No Brasil tem havido pouco empenho no estudo e elaboração de produtos considerados nobres, apesar do grande potencial existente. Mesmo que as enzimas ainda não representem um grande peso econômico no mercado brasileiro, é fundamental começar seu estudo agora, pois elas se tornarão um insumo muito importante a ponto de terem a importação substituída (Revista Brasileira de Tecnologia, 1988).

Inúmeros foram os trabalhos realizados em produtos marinhos buscando um maior entendimento sobre as características das proteases. Sabe-se hoje, que as enzimas proteolíticas podem se apresentar de diversas formas nos tecidos vivos dos animais.

Dentre as enzimas proteolíticas existentes no trato digestivo dos organismos marinhos, a tripsina e a quimiotripsina são as mais comu-

(1) Engenheiro de Pesca graduado pela 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 Laboratório de Ciências do Mar.

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

mente encontradas. A caracterização da tripsina purificada de pescado tem revelado um número significativo de propriedades similares à tripsina dos mamíferos (Croston, 1960; Tomásek *et al.*, 1970; Reeck & Neurath, 1972; De Haën & Gertler, 1974; Zwilling *et al.*, 1975; De Haën *et al.*, 1977; Cohen *et al.*, 1981).

Há um grande interesse no estudo das proteases de organismos marinhos, tendo em vista dois aspectos fundamentais: (1) conhecer mais profundamente a fisiologia e a bioquímica da espécie, o que facilita o entendimento mais racional de sua biologia, e (2) avaliar a viabilidade de uma extração rentável dessas enzimas, considerando sua ampla aplicação em vários ramos industriais.

O presente trabalho também se enquadra nesses dois aspectos, visto que seu objetivo é fornecer subsídios sobre a extração e caracterização de proteases de fígado de cangulo, *Balistes vetula* Linnaeus, mesmo que em caráter ainda preliminar.

MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo, foi utilizado fígado de cangulo, *Balistes vetula* Linnaeus, capturado na costa de Fortaleza, em pescarias de ida e vinda, e adquirido na praia do Mucuripe.

O fígado foi extraído da cavidade abdominal, macerado em graal de porcelana e homogeneizado em Potter (TRI - R STIR - R modelo K 41) durante 2 minutos a 8000 rpm em câmara fria a 4° C.

O fígado homogeneizado foi suspenso em acetona (- 15° C) na proporção de 1:5 (p/v) e deixado em agitação por 60 minutos. Fimdo este período, a mistura foi filtrada a vácuo e o filtrado suspenso novamente em acetona. Esta etapa foi repetida por mais duas vezes, quando, então, o material foi tratado com acetona: éter etílico (1 : 1) a - 15° C e novamente filtrado a vácuo, resultando na obtenção de pó cetônico.

Do pó cetônico foi preparado um extrato em tampão fosfato 0,01 M contendo cloreto de sódio 0,1 M pH 7,0, na proporção de 1 : 50 (p/v), denominado extrato bruto, que foi utilizado para determinações de proteína e de atividade proteolítica.

Os extratos brutos de fígado de cangulo foram submetidos ao fracionamento por precipitação com sulfato de amônio - $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ sólido. Esse sal foi gradualmente adicionado ao

extrato para 20% de saturação, sendo o precipitado removido por centrifugação a 20.000 x g por 15 minutos a 4° C. O sobrenadante resultante foi usado para as próximas precipitações com 40, 60, 80 e 100 % de saturação com $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$. 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.

O liofilizado das frações 0/20, 20/40, 40/60, 60/80 e 80/100 foi suspenso em tampão fosfato 0,01 M contendo cloreto de sódio 0,1 M pH 7,0.

No extrato bruto e nas frações obtidas por precipitação com $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ o teor de proteína foi determinado pelo método do microbiureto (Goa, 1953), usando albumina sérica bovina (Sigma) como padrão.

Nos ensaios posteriores ao fracionamento com $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, a concentração de proteína foi determinada pelo método do reagente fenólico de Folin (Lowry *et al.*, 1951) usando como padrão a tirosina (Merck).

A atividade proteolítica foi determinada como a capacidade de hidrolisar a caseína ou hemoglobina. A reação enzimática foi desenvolvida pela adição de 0,5ml do extrato de fígado a 5,0 ml de hemoglobina bovina (Sigma) a 1% em tampão citrato ou caseína (segundo Hammarsten, E. Merck AG Darmstadt) a 1% em solução tampão fosfato ou borato (Dawson *et al.*, 1969). A incubação foi procedida a 40° C durante 60 minutos, quando a reação foi paralisada pela adição de 1,0 ml de ácido tricloroacético (TCA) a 40% (Ainouz *et al.*, 1972). Depois de 30 minutos em repouso, a mistura foi filtrada em papel Whatman n.º 42, sendo a atividade proteolítica determinada na fração solúvel em TCA e medida pela absorbância em 750 nm em espectrofotômetro (Bausch & Lomb modelo Spectronic 20), após a reação com o Folin - Ciocalteau (Lowry *et al.*, 1951). O branco da reação foi obtido pela adição do substrato após o TCA ter sido adicionado. Todos os valores de absorbância das amostras foram subtraídos dos valores dos brancos correspondentes.

Para a escolha da concentração de substrato a ser usada, foram feitos experimentos em que a concentração da caseína variou de 10 a 70 mg, conservando-se o volume de extrato igual a 0,5 ml. A reação enzimática e as condições de incubação foram idênticas ao descrito anteriormente.

A determinação do pH ótimo do sistema enzimático presente em fígado de cangulo (extrato bruto e frações obtidas pelo sulfato de amônio) foi efetuada utilizando-se tampão ácido cítrico 0,1 M — Na_2HPO_4 0,2 M nos pHs 2,6; 3,0; 3,6; 4,0; 4,6 e 5,0, tampão KH_2PO_4 0,1M — NaOH 0,1M nos pHs 6,0; 6,5; 7,0 e 7,5 e tampão $\text{KCl} + \text{H}_3\text{BO}_3$ 0,5M — NaOH 0,5M nos pHs 8,0; 8,5; 9,0 e 10,0 (Dawson *et al.*, 1969). Os substratos usados (hemoglobina e caseína a 1 %) também foram preparados nos respectivos pHs.

O tempo e a temperatura considerados ótimos foram determinados mediante a incubação em temperaturas de 40, 50, 55 e 60° C em intervalos de 15, 30, 45 e 60 minutos. A reação enzimática foi semelhante aos demais ensaios.

A termoestabilidade do sistema enzimático foi avaliada submetendo-se o extrato à temperatura de 40, 50 e 60° C durante 15, 30, 45 e 60 minutos. Decorrido cada período de tempo, o extrato era retirado da temperatura, onde era determinada a atividade enzimática a 50° C com 60 minutos de incubação. Os resultados da atividade foram transformados em porcentagem de atividade tomando como base o extrato não submetido a exposição de calor, cuja atividade proteolítica foi considerada 100%.

A atividade proteolítica do sistema enzimático de fígado de cangulo foi definida arbitrariamente como unidade de proteinase (U.P.), sendo a quantidade de produto da reação enzimática (40° 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.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o objetivo de estabelecer as condições ótimas de ensaio, foi utilizado fígado de cangulo *Balistes vetula* Linnaeus como fonte de enzima.

A atividade proteolítica foi determinada em uma faixa de pH que variou de 2,6 a 10,0, sendo que quando a hemoglobina foi usada como substrato, a maior atividade registrada correspondeu somente a 30 % daquela encontrada em pH 8,5, onde para o extrato bruto, a atividade foi máxima (Figura 1). Essa baixa atividade do sistema enzimático ácido o torna desprezível e impróprio para ser utilizado como

parâmetros para estudos fisiológicos e/ou bioquímicos. Contudo, há estudos que têm demonstrado uma razoável atividade proteolítica na faixa ácida, como observado no peixe carnívoro *Silurus glanis* (Jonas *et al.*, 1983) e na sardinha (Noda & Murakami, 1981) onde a enzima foi comparada à pepsina presente nos mamíferos.

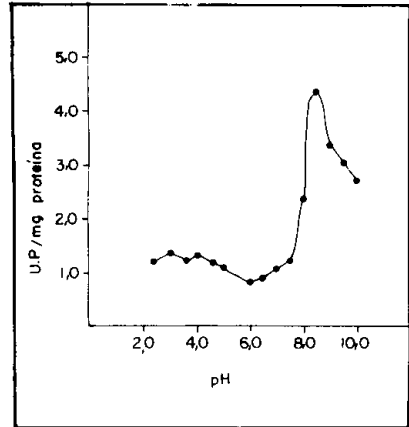


Figura 1 - Variação da atividade proteolítica específica do sistema enzimático presente em fígado de cangulo, *Balistes vetula*, no extrato bruto em função do pH de reação.

Makinodan & Ikeda (1969 a e 1969 b) estudando as proteases de músculo de várias espécies de peixe encontraram um pH ótimo de 2,8 — 3,0 para a hemoglobina e outro em 8,0 para a caseína. Em músculo de albacora (*Thunnus alalunga*), Groninger Jr. (1964) registrou máxima atividade em pH 2,4 — 2,5, e no fluido sarcoplasmático de pescada (*Merluccius productus*) e bacalhau (*Gadus macrocephalus*) o pH ótimo foi igual a 3,5 — 3,9 e 3,2 — 3,6, respectivamente (Erickson *et al.*, 1983). A protease do peixe *Etroplus suratensis*, estudada por Sundaram & Sarma (1960) apresentou atividade máxima entre 9,5 e 10,5 e no ceco pilórico do salmão *Oncorhynchus tshawytscha* o pH ótimo para o sistema enzimático foi 9; 0 (Croston, 1960). De um modo geral, muitos organismos marinhos exibem elevada atividade proteolítica na faixa de pH ácido, embora quase sempre tenha sido atribuída a uma enzima com características de catepsina.

Imediatamente após o estabelecimento preliminar desse pH ótimo de reação, foi procedido o fracionamento por precipitação com sulfato de amônio, onde foi observado que a fração 40/60 foi aquela que apresentou maior atividade proteolítica específica. Com este tratamento, o extrato bruto foi purificado 8,5 ve-

zes, correspondendo a uma recuperação da atividade igual a aproximadamente 37 % (Tabela 1, figura 2). Este intervalo de saturação encontra-se em concordância com a maioria dos estudos sobre enzimas proteolíticas, que, de um modo geral, varia de 30 a 80 % (Crosston, 1960 ; Sundaram & Sarma, 1960 ; Groninger Jr. , 1964; Makinodan & Ikeda, 1969 ; 1969 a e 1969 b ; Reeck & Nevrath, 1972; Bauer & Eitenmiller, 1974; Murakami & Noda, 1981; Saker et al., 1982).

Na fração 40/60, obtida pelo tratamento por precipitação com sulfato de amônio, o pH ótimo ficou estabelecido como sendo 9,0 (Figura 3).

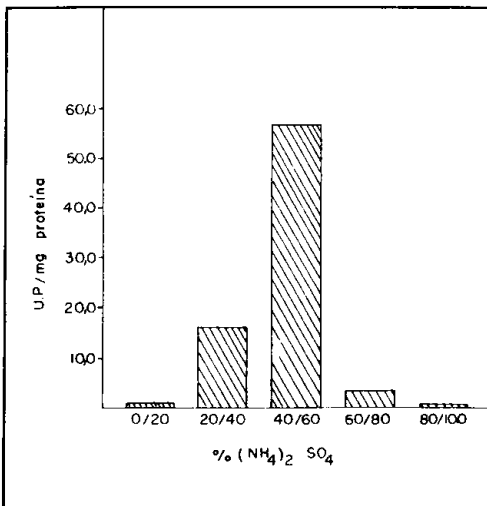


Figura 2 - Atividade proteolítica específica do sistema enzimático presente em fígado de cangulo, *Balistes vetula*, em função do tratamento com sulfato de amônia.

A relação enzima—substrato (Figura 4), mostrou que a saturação do complexo enzima—substrato foi atingido quando 50 mg da caseína reagiram com 0,5 ml de extratos preparados com 2 mg de liofilizado em 1 ml do tampão. Essa relação é semelhante àquela observada por Saker *et al.* (1982) para hepatopâncreas de lagostas jovens *Panulirus laeviscauda*. Em proteases de albacora *Thunnus alalunga* a saturação de enzima foi obtida com aproximadamente 50 mg de hemoglobina (Groninger Jr., 1964).

Para outros materiais biológicos os valores encontrados foram inferiores aos observados para o cangulo (Prisco & Vieira, 1976 ; Ainouz et al., 1981; Vieira *et al.*, 1985).

A determinação do tempo e temperatura ótimos de reação (Figura 5) foi estabelecida como 60 minutos e 50° C; dados que são semelhantes aos de outros trabalhos realizados com extratos de órgãos de pescado.

Takahashi *et al.* (1964 b) observaram que a temperatura ótima para a hidrólise da caseína pelos extratos de fígado de peixes ocorreu a 40 – 45° C em pH 2,5 e 50 – 55° C em pH 6,0. Entretanto, Makinodan & Ikeda (1969) investigando doze espécies de pescado, mencionaram que a temperatura ótima para 4 horas de reação, foi relativamente alta, 60 – 65° C para proteases ativas na faixa de pH alcalino, em comparação com 45 – 50° C para as da faixa ácida.

Na carpa, Makinodan & Ikeda (1969 a e 1969 b) estudaram as proteases ácidas e alcalinas e encontraram ótimos de 50° C por 1 hora e 65° C por 2 horas de incubação, respectivamente. Por outro lado, nos estudos com cinco proteases isoladas de ceco pilórico e estômago de sardinha, Noda *et al.* (1982) observaram atividade máxima a 30° C por 24 horas, e Murakami & Noda (1981), também estudando as proteases de órgãos digestivos de sardinha, incubaram a mistura de reação a 30° C por 20 minutos.

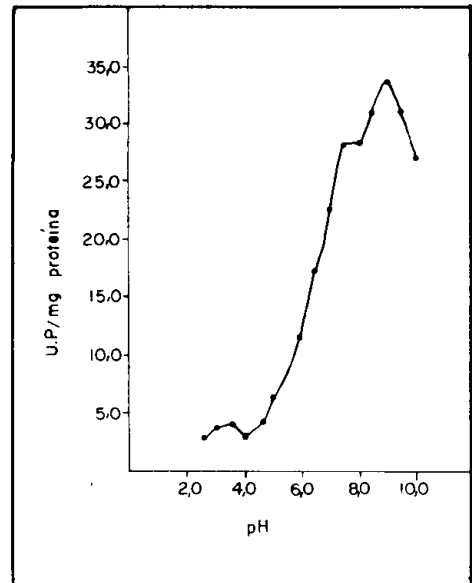


Figura 3 - Variação da atividade proteolítica específica do sistema enzimático presente em fígado de cangulo, *Balistes vetula*, submetido ao fracionamento com sulfato de amônia, no intervalo de 40-60% de saturação em função do pH de reação.

Lin *et al.* (1980), caracterizando as proteases de músculo e rim de pescado com substratos marcados com isótopo radioativo (^{14}C), encontraram máxima atividade das proteases alcalinas no intervalo de 45 a 60°C por 60 minutos e Drucker (1972) também usando substrato marcado radioativamente, encontrou que a atividade proteolítica máxima ocorreu a 37°C por 30 minutos.

O sistema enzimático presente em fígado de cangulo revelou-se altamente estável ao calor (Figura 6), onde a 40°C por 60 minutos ele é ativado, perdendo somente cerca de 29 % de sua atividade original quando exposto a 50°C por 60 minutos. Entretanto, a 60°C a perda de atividade foi da ordem de 94 % após decorridos 60 minutos. Este aspecto inerente ao sistema enzimático de fígado de cangulo confere certa segurança na preparação e manuseio do extrato enzimático, sem oferecer grandes riscos de inativação.

Alguns autores relacionam o efeito da temperatura com o tempo de aquecimento. Makinodan & Ikeda (1969 a) registraram que a

70°C por 10 minutos a atividade caiu 50 %, enquanto que a 60°C e a 65°C as perdas foram da ordem de 30 e 80 %, respectivamente, para uma incubação de 30 minutos.

CONCLUSÕES

1 – O sistema enzimático presente em fígado de cangulo apresentou máxima atividade proteolítica em pH 9,0, usando a caseína como substrato.

2 – A temperatura ótima foi 50°C com o tempo de incubação de 60 minutos.

3 – Na relação enzima–substrato ficou estabelecida a razão de 50 mg de caseína para 0,5 ml do extrato preparado com 2 mg de liofilizado/ml do tampão.

4 – O sistema enzimático permaneceu estável à temperatura de 40°C por 60 minutos, perdendo 94 % de sua atividade quando submetido a 60°C por 60 minutos.

5 – A fração 40/60, obtida pelo fracionamento por precipitação com sulfato de amônio foi a que apresentou maior atividade proteolítica específica.

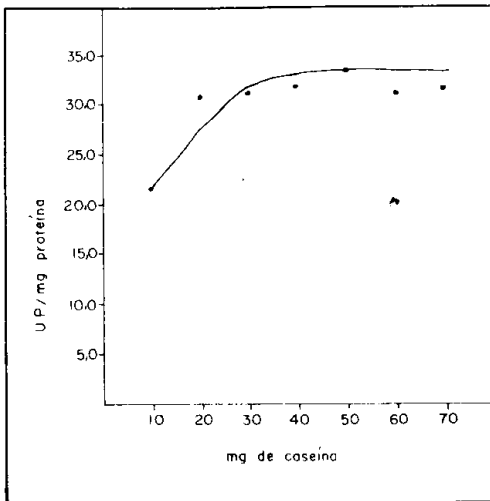


Figura 4 - Variação da atividade proteolítica específica do sistema enzimático presente em fígado de cangulo, *Balistes vetula*, submetido ao fracionamento com sulfato de amônia, no intervalo 40-60% de saturação, em função da concentração de substrato.

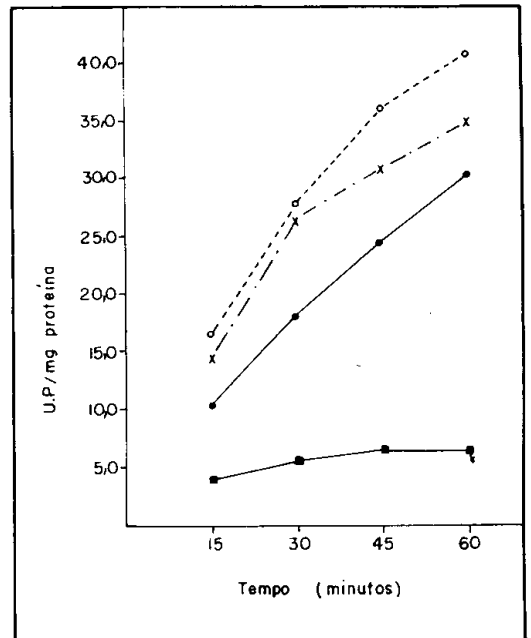


Figura 5 - Variação da atividade proteolítica específica do sistema enzimático presente em fígado de cangulo, *Balistes vetula*, submetido ao fracionamento com sulfato de amônia no intervalo de 40-60% de saturação, em função da temperatura e do tempo de ensaio (40°C ●—●; 50°C ○—○; 55°C x—x; 60°C ●—●).

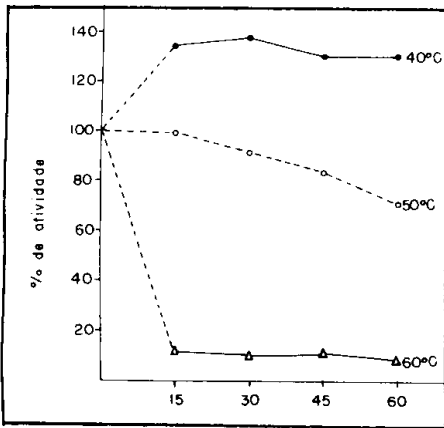


Figura 6 - Variação percentual da atividade proteolítica específica do sistema enzimático presente em fígado de cangulo, *Balistes vetula*, submetido ao fracionamento com sulfato de amônia no intervalo de 40-60% de saturação e pré-incubação a 40°C (●—●); 50°C (○—○); e 60°C (○—○), em função do tempo.

SUMMARY

This research work is aimed at supplying information about the preliminary characterization of the enzymatic system in the liver of triggerfish, *Balistes vetula* Linnaeus.

The enzymatic reaction was developed by adding 0.5ml of the raw extract either at 5.0ml 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 1,0 ml of trichloroacetic acid at 40%. The absorbance reading at 750 nm in a Bausch & Lomb Spectronic 20 spectrophotometer was taken after the reaction with the Folin phenolic reagent.

The optimum pH established for the reaction was at 9.0, using casein as substrate.

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, 5ml of the extract containing 2mg of lyophilized in 1.0 ml of buffer.

The enzymatic system of the triggerfish's liver under a temperature of 40°C was kept stable even after sixty minutes had elapsed. When the temperature was 60°C with a sixty-minute heating of the extract there occurred a reduction of 94%.

From the fractioning by precipitation with ammonium sulphate, the 40/60 fraction was that one which reached the greatest specific proteolytic activity of all fractions.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AINOUZ, I.L.; J. Xavier-Filho & E. Gomes-Filho.—Atividade proteolítica em sementes de *Vigna sinensis* seridó. *Ciênc. Cult.* **24**: 104, 1972.
- 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.
- 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.
- COHEN, T.; A. Gertler & Y. Birk — Pancreatic proteolytic enzymes from carp (*Cyprinus carpio*). I. Purification and physical properties of trypsin, chymotrypsin, elastase and carboxypeptidase B. *Comp. Biochem. Physiol.*, **69 B**: 639- 46, 1981.
- CROSTON, C.B.—Tryptic enzymes of chinook salmon: *Arch. Biochem. Biophys.*, **89**: 202- 06, 1960.
- DAWSON, R.M.C.; D.C. Elliott & K.M. Jones — *Data for biochemical research*. 2. ed. Oxford University Press, xi + 654pp, 1969.
- DE HAËN, C. & A. Gertler — Isolation and amino-terminal sequence analysis of two dissimilar pancreatic proelastases from African lungfish *Protopterus aethiopicus*. *Biochem.*, **13** (13): 2673-77, 1974.
- DE HAËN, C.; K.A. Walsh & H. Neurath — Isolation and amino-terminal sequence analysis of a new pancreatic trypsinogen of the African lungfish *Protopterus aethiopicus*. *Biochem.*, **16** (20): 4421- 25, 1977.
- DRUCKER, H.—Sensitive radiochemical assay for proteolytic activities. *Analytic. Biochem.*, **46**: 598-603, 1972.
- ERICKSON, M.C.; D.T. Gordon & A.F. Anglemier — Proteolytic activity in the sarcoplasmic fluids of parasitized Pacific whiting (*Merluccius productus*) and unparasitized true cod (*Gadus macrocephalus*). *J. Food Sci.*, **48**: 1315- 19, 1983.
- 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 albacora (*Germo alalunga*) muscle. *Arch. Biochem. Biophys.*, **108**: 175- 82, 1964.
- JÓNÁS, E.; M. Ragyanszki; J. Oláh & L. Boross — Proteolytic digestive enzymes of carnivorous (*Silurus glanis* L.), herbivorous (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) and omnivorous (*Cyprinus carpio* L.) fishes. *Aquacult.*, **30**: 145- 54, 1983.
- LIN, T.; H.K. Su & T.C. Lanier — Characterization of fish muscle protease using radio-labeled protein substrates. *J. Food Sci.*, **45**: 1036- 39, 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. I. On the existence of two kinds of proteinases active in acid and in slightly alkaline pH range. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **35** (7) : 672-76, 1969.

- 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): 749-57, 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.
- MENEZES, M.F. — **Aspectos da biologia e biometria do cangulo *Balistes vetula* Linnaeus no Nordeste do Brasil.** Anais do II Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca, pp. 483 — 99, Recife-PE, 1981.
- MURAKAMI, K. & M. Noda — Studies on proteinases from the digestive organs of sardine. I. Purification and characterization of three alkaline proteinases from the pyloric caeca. **Bioch. Biophys. Acta**, **658**: 17-26, 1981.
- NODA, M. & K. Murakami — Studies on proteinases from digestive organs of sardine. II. Purification and characterization of two acid proteinases from the stomach. **Bioch. Biophys. Acta**, **658**: 27-34, 1981.
- NODA, M.; V.T. Vo; I. Kusakabe & K. Murakami — Substrate specificity and salt inhibition of five proteinases isolated from the pyloric caeca and stomach of sardine. **Agric. Biol. Chem.**, **46** (6): 1565- 69, 1982.
- 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): 503-510, 1972.
- Revista Brasileira de Tecnologia — IPT — Décadas de pesquisas. S. Paulo **19** (2): 6-13, 1988.
- 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. Cien. Mar**, **22** (1/2): 57-66, 1982.
- SUNDARAM, S. & P.S. Sarma — Purification and properties of a protease from the gut of *Eetroplus suratensis*. **Biochem. J.**, **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 Univ. 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 Univ. Mie**, **5** (1): 137-44, 1969.
- TOMÁŠEK, V.; F. Sorm; R. Zwilling & G. Pfeleiderer — Serine — containing active center of trypsin-like protease of cray fish *Astacus leptodactylus*. **Febs. Letters**. **6**(3): 229- 31, 1970.
- VIEIRA, G.H.F.; L.C. Silva; S. Saker-Sampaio & A.H. Sampaio — Ensaio preliminar ao estudo das proteases em hemolinfa de jovens da lagosta *Panulirus laeviscauda* (Latreille). **Arq. Cien. Mar**, **24**: 73-39, 1985.
- ZWILLING, R.; H. Neurath; L.H. Ericsson & D.L. Enfield — The amino-terminal sequence of an invertebrate trypsin (crayfish *Astacus leptodactylus*): homology with other serine proteases. **Febs. Letters**, **60**(2): 247- 49, 1975.

TABELA I

Fracionamento do sistema enzimático presente em fígado de cangulo *Balistes vetula* Linnaeus por sulfato de amônia.

Frações	Volume (ml)	Proteína		Atividade		Proteolítica		Recuperação da atividade (%)	Vezes de purificação
		mg/ml	Total (mg)	U.P./ml	Total (U.P.)	Específica (U.P./mg p)			
Extrato bruto	100	1,740	174,00	7,59	759,0	4,36	100,00	1,00	
0/20	50	—	—	—	—	—	—	—	
20/40	50	0,143	7,15	2,23	111,5	16,32	14,69	3,74	
40/60	50	0,099	4,95	5,60	280,0	56,58	36,89	8,46	
60/80	50	0,088	4,40	0,23	11,5	3,54	1,52	0,35	
80/100	50	0,066	3,30	—	—	—	—	—	

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

* A proteína foi determinada pelo método do microbiureto.