

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION  
DE LA FENOLOXIDASA DEL CAMARON BLANCO  
(*Peneaus setiferus*) Y DE LA LANGOSTA  
ESPINOSA (*Panulirus argus*)**

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION  
OF PHENOLOXIDASE FROM WHITE SHRIMP  
(*Peneaus setiferus*) AND SPINY LOBSTER (*Panulirus argus*)**

O.J. FERRER<sup>1</sup>

M.R. MARSHALL<sup>2</sup>

**RESUMEN**

El fenómeno del pardeamiento enzimático ha sido estudiado extensivamente en frutas y vegetales, pero ha recibido poca atención en crustáceos. El pardeamiento enzimático que ocurre en el camarón, algunas langostas y otros crustáceos hace que estos productos sean rechazados por el consumidor. La fenoloxidasa (FO) (CE 1.14.18.1), ha sido reportada como responsable del pardeamiento enzimático de frutas, vegetales y crustáceos por su habilidad para catalizar la oxidación de compuestos fenólicos produciendo el pigmento negro "melanina". Se realizaron estudios con la fenoloxidasa precedente del camarón blanco (*Peneaus setiferus*) y de la langosta espinosa (*Panulirus argus*) con el fin de purificarla y estudiar sus propiedades. La FO se encontró en el exoesqueleto de la langosta espinosa en formas inertes (FOI1 y FOI2) y/o activa (FOAE), dependiendo del ciclo de muda de la langosta. Las fenoloxidasas inertes se activaron con tripsina, produciendo dos formas activas (TAFO1 y TAFO2) con un incremento de la actividad enzimática de hasta 120 veces. La elastasa, la quimotripsina y el repetido congelamiento y descongelamiento no activaron la FO. La FOI1 se activó durante el almacenamiento a 4°C de un extracto enzimático parcialmente purificado. Sin embargo, solamente una forma activa de FO se encontró, como se demostró por electroforesis. En cuanto a la fenoloxidasa del

1) Universidad del Zulia, Facultad de Agronomía, Maracaibo.

2) Universidad de La Florida, Departamento de Ciencia de los Alimentos y Nutrición Humana, Gainesville, Florida.

camarón, ésta se encontró siempre en forma activa y el tratamiento con tripsina no aumentó su actividad enzimática, y migró como una sola banda en geles de poliacrilamida.

**Palabras claves:** fenoloxidasa, melanosis, crustáceos.

### ABSTRACT

Extensive research have been carried out on enzymatic browning of fruits and vegetables, but much less research have been performed in the seafood area. Melanosis that occurs in shrimp and lobster connotes spoilage by consumers who are reluctant to buy the discolored product. Phenoloxidase (CE 1.14.18.1) has been reported is responsible for catalyzing the oxidation of phenolic compounds to a dark pigment called melanin which leads to the darkening of many light fruits, vegetables and crustaceans. Studies were carried out on phenoloxidase from spiny lobster (*Panulirus argus*) and from white shrimp (*Peneaus setiferus*) to purify and to study their properties. Phenoloxidase was found in spiny lobster exoskeleton as inert (IPO1 and IPO2) and/or active (EAPO) forms depending on the molting satge of the lobster. The inert phenoloxidases were activated by trypsin, producing two active phenoloxidase forms (TAPO1 and TAPO2) with up to 120-fold increased phenoloxidase activity. Elastase, chymotrypsin and repeated freezing and thawing failed to activate phenoloxidase. The IPO1 bacame active during storage of a partially purified extract at 4°C; however, only one active phenoloxidase form (EAPO) was demonstrated by electrophoresis. Regarding shrimp phenoloxidase, this enzyme was found always as an active form and was not activated by trypsin. Shrimp phenoloxidase migrated as a single band whe run electrophoretically in poliacrylamide gels.

**Key words:** phenoloxidase, melanosis, crustacean.

### INTRODUCCION

Muchos crustáceos como el camarón, la langosta espinosa y algunas especies de cangrejo son susceptibles a cambios que deterioran su calidad durante almacenamiento bajo refrigeración (4°C). Uno de los principales problemas que se presenta es la formación de "manchas negras" en la cabeza y cola del crustáceo. Este fenómeno conocido como pardeamiento enzimático o melanosis se debe a la enzima fenoloxidasa. Esta enzima también se conoce por los nombres de tirosinasa, polifenoloxidasa, catecolasa y cresolasa. Dicho pardeamiento va en detrimento del producto, debido a que el consumidor rechaza el crustáceo melanótico. Para aliviar este problema la industria ha venido utilizando de manera casi universal el bisulfito de sodio. En el camarón el bisulfito de sodio es empleado con muy buenos resultados, sumergiendo el producto en una solución al 1.25% por 1 min (3).

En Estados Unidos, recientemente el uso del bisulfito ha sido objeto de un gran análisis ya que se ha comprobado que puede inducir asma y otras reacciones adversas tales como hipotensión, y en algunos casos incluso la muerte en ciertas personas sensibles. A pesar de que la mayoría de estos problemas han estado relacionados con el consumo de frutas y vegetales, esto ha afectado a la industria camaronera, ya que las autoridades sanitarias norteamericanas han reglamentado que el camarón para consumo humano (en los Estados Unidos) no puede contener más de 100 ppm de sulfito en la parte comestible del producto.

Muy pocas investigaciones se han realizado con respecto a la fenoloxidasa del camarón y de los crustáceos en general. Savagaon and Sreenivasan (13) han propuesto que la fenoloxidasa del camarón existe en forma latente la cual se activa por medio de la tripsina, y también por una enzima endógena con actividad triptica encontrada en los tejidos del camarón. Otras proteasas tales como quimotripsina y pepsina no mostraron ningún efecto activante. Ellos propusieron que el mecanismo de activación era por proteólisis limitada, donde la proteasa activante formaba isoenzimas. Sin embargo, Madero (9), trabajando con camarones rosados, no encontró este tipo de activación. La enzima estaba ya activa y la adición de tripsina y otras proteasas no incrementó la actividad de la fenoloxidasa.

También se ha demostrado que la tripsina activa la fenoloxidasa del cangrejo de aguas profundas (10, 11) y de la langosta espinosa (5). Estos mecanismos de activación aún no han sido dilucidados completamente.

En crustáceos e insectos, la enzima fenoloxidasa interviene en el proceso de esclerotización donde cataliza la oxidación de difenoles a las correspondientes quinonas, las cuales reaccionan con ciertos grupos laterales de aminoácidos presentes en las proteínas uniendo las cadenas proteicas (15). La N- acetildopamina (2) y el ácido 3,4-dihidroxi-benzoico (12) son agentes de entrecruzamiento que se han identificado en los crustáceos y algunos insectos.

La fenoloxidasa también podría intervenir en el proceso de reparación de heridas sufridas por la cutícula (7), así como también en forma indirecta en el proceso de calcificación de dicha cutícula (15).

El objetivo de esta investigación fue aislar y caracterizar la enzima fenoloxidasa presente en la langosta espinosa y en el camarón blanco. Estos estudios podrían proveer información básica valiosa sobre las fenoloxidasas de estos crustáceos, lo cual ayudaría a encontrar otros modos de inhibición de la melanosis diferentes al sulfito.

## MATERIALES Y METODOS

Los camarones blancos (*Peneaus setiferus*) y las langostas espinosas (*Panulirus argus*) se obtuvieron frescos e inmediatamente se usaron para la extracción de la fenoloxidasa.

### Extracción de la fenoloxidasa

A los camarones se les quitó la cabeza prontamente y éstas se convirtieron en polvo moliéndolas con nitrógeno líquido en una licuadora. Este polvo se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta que se necesitó. La fenoloxidasa de la langosta se preparó homogeneizando en una licuadora 1 parte del exoesqueleto de la langosta (en peso) con 4 partes (en volumen) de buffer de fosfato 0.05 M y pH 7.2. La homogeneización se hizo por 2 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . La mezcla se centrifugó a 10000g a  $4^{\circ}\text{C}$  por 20 min y el sobrenadante (extracto crudo) se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta que se necesitó.

### Purificación de la fenoloxidasa

Camarón: el polvo obtenido se mezcló con solución tampón de fosfato pH 7.2 y 0.05 M en proporción 1:5 y se agitó por 3 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ . La mezcla se centrifugó luego a 10000g por 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante se fraccionó con sulfato de amonio y el precipitado obtenido entre 40 % y 75 % se redisolvió en un mínimo volumen del buffer de fosfato. Esta fracción redisuelta se dializó toda la noche contra buffer de fosfato. Se mezcló con 3 volúmenes de acetona a  $-30^{\circ}\text{C}$ , y se dejó en reposo por 3 horas a  $-30^{\circ}\text{C}$  antes de centrifugarse de nuevo. El precipitado se liofilizó y se guardó a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Langosta: un ml del extracto crudo se sometió a electroforesis preparativa no desnaturalizante (5). Varias bandas con actividad de fenoloxidasa (diferentes formas enzimáticas) se detectaron con solución de DL-DOPA 5 mM. Dichas bandas se separaron unas de otras rebanando la gel de poliacrilamida y disolviendo las rebanaditas de gel con la forma enzimática en 10 ml de buffer de fosfato 0.05 M y pH 7.2 con la ayuda de un triturador de tejidos. La mezcla se centrifugó y el sobrenadante se utilizó para el análisis de la actividad de la fenoloxidasa.

### Determinación de la actividad de la fenoloxidasa

La actividad de la fenoloxidasa se determinó mezclando 0.1 ó 0.2 ml de la preparación enzimática con 2.8 ml de DL-DOPA 10 mM en buffer de fosfato 0.05 M a pH 6.5 en presencia y en ausencia de tripsina al 0.1 % a  $23^{\circ}\text{C}$  (13). La velocidad inicial se determinó midiendo la rata de incremento de la absorbancia a 475 nm por 3 min usando un espectrofotómetro LKB modelo 4050. La actividad de la fenoloxidasa se expresó como  $\mu\text{moles}$  de DL-DOPA

transformados por min a 475 nm, pH 7.2 y 23°C en las condiciones descritas arriba.

### **Tratamientos de activación**

La rata de reacción inicial se determinó espectrofotométricamente en el extracto crudo de fenoloxidasa en presencia de 0.1 ml de soluciones al 1% de elastasa, quimotripsina y tripsina. El efecto del repetido congelamiento y descongelamiento sobre la actividad enzimática también se determinó.

### **Electroforesis analítica y determinación del peso molecular**

La técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida (14) se utilizó para la determinación del peso molecular y la detección de posibles isoenzimas (mejor llamadas formas enzimáticas) presentes. Una fuente de poder Bio-Rad modelo 3000/300 se usó en la electroforesis. Tubos de gel de 0.5 cm de diámetro interno por 12.5 cm de altura, conteniendo 5 % acrilamida se corrieron a un amperaje constante de 3 ma por tubo. El volumen de muestra aplicado fue de 50 ml y el buffer de la cámara electroforética fue tris-(hidroximetil) amino metano 0.01 M/glicina 0.04 M, pH 8.3.

Los pesos moleculares de las diferentes formas de fenoloxidasa se determinaron usando el kit de patrones proteicos de peso molecular de la compañía Sigma Chemical. El procedimiento se detalla en el Boletín Técnico No. MKR-137 (14). Las proteínas usadas como patrones fueron lactalbúmina (Pm = 14200), anhidrasa carbónica (PM = 29000), albúmina de huevo (PM = 45000), albúmina de suero de bovino (PM = 66000 y PM = 132000 para el monómero y dímero, respectivamente), y ureasa (PM = 240000 y 480000 para el dímero y el tetrámero, respectivamente). La determinación de los pesos moleculares se hicieron usando un volumen de muestra de 50 ml en geles de 4, 5, 6, 7, 8 y 9% acrilamida.

### **Efecto del almacenaje sobre la actividad de la fenoloxidasa**

Los extractos crudos de la fenoloxidasa del camarón y de la langosta preparados como ya se ha descrito se guardaron en un refrigerador a 4°C por 5 días. La actividad enzimática se midió cada día en la ausencia de tripsina. Sin embargo, el primer día se usó tripsina para la activación de la fenoloxidasa. Los días 1, 3 y 5 se tomaron alícuotas para realizar electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante. Dos réplicas se realizaron.

### **pH óptimo**

Las soluciones tampón utilizadas fueron de concentración 0.1 M y tenían la siguiente composición y pH: tampón de citrato (pH's 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0), tampón de fosfato (pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 y 12.0) y tampón de glicina (pH 9.0 y 10.0). Una solución de DL- DOPA 10 mM se preparó en agua destilada y un volumen igual (1.4 ml) de esta solución se mezcló con el buffer deseado para

dar una concentración de DL-DOPA 5 mM y 0.05 M del buffer respectivo. A esta mezcla se le agregó 0,2 ml de la preparación enzimática apropiada y la rata inicial de reacción se midió espectrofotométricamente a 475 nm usando un espectrofotómetro Gilford modelo 250. La oxidación no enzimática del DL-DOPA que ocurre por encima de pH 8.0 se corrigió usando un blanco de DL-DOPA a pH's mayores de 8.0. Se realizaron tres réplicas del experimento completo.

### **Estabilidad al pH**

Los tampones usados fueron similares a los usados en el experimento de pH óptimo. Un volumen de 0.1 ml de la preparación enzimática se mezcló con 0.3 ml del tampón apropiado y la mezcla se incubó por 30 min en baño de hielo. Después 2.6 ml de DL-DOPA 5 mM en buffer de fosfato 0.05 M y pH 6.5 se añadieron y la rata de reacción inicial medida como se describió anteriormente.

### **Estabilidad térmica**

Se tomaron alícuotas de 0.5 ml de la preparación enzimática purificada y se calentaron por 30 min a 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60°C. Las muestras fueron después colocadas en un hielo por 5-15 min y la actividad enzimática medida. Un volumen de 0.2 ml de la preparación calentada se usó para la determinación enzimática, la cual se realizó a temperatura ambiente (23°C). Se hicieron dos réplicas del experimento completo.

### **Energía de activación**

La actividad enzimática de las preparaciones de fenoloxidasa se determinó a 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50°C usando 2.8 ml de DL-DOPA 10 mM en buffer de fosfato 0.05 M (pH 6.5) y 0.2 ml de la preparación enzimática. La rata inicial de reacción se midió a 475 nm usando un espectrofotómetro Beckman DU 8 con control de temperatura y equipado con un paquete de "software" de cinética. Tres réplicas se realizaron del experimento completo.

### **Constante de Michaelis**

La constante de Michaelis ( $K_m$ ) se determinó de las representaciones recíprocas de Lineweaver-Burk (Lehninger, 1975). La actividad de la fenoloxidasa se determinó espectrofotométricamente a 23°C usando varias concentraciones de DL-DOPA en el rango de 0 a 10 mM en buffer de fosfato 0.05 M y pH 6.5. Se hicieron tres réplicas del experimento completo.

## **RESULTADOS Y DISCUSION**

La actividad específica de los extractos crudos de la fenoloxidasa de la langosta variaron grandemente de muestra a muestra. Se encontraron valores de actividad específica (Tabla 1) desde 0.01 a 0.80  $\mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}$

proteína<sup>-1</sup> para la actividad libre y desde 0.33 a 36.68  $\mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}$  proteína<sup>-1</sup> para los extractos activados con tripsina (26 especímenes analizados). Esta amplia variación se ha atribuido al ciclo de muda de la langosta (Ferrer, 1987, Ferrer *et al.*, 1989). La actividad específica de la FO del camarón fué de 0.001  $\mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}$  proteína<sup>-1</sup>.

**TABLA 1** Actividad específica de la FO libre y tripsina-activada FO (TAFO) en extractos de la cutícula de las langostas analizadas durante la temporada de 1985-1986

MUESTRA	TAFO ACT. UE/ml**	FO LIBRE ACT. UE/ml	CONTENIDO PROTEINA mg/ml	ACT.ESP. TAPO UE/mg	ACT. ESP* FO LIBRE UE/mg
10-01-85	0.35	0.15	0.50	0.70	0.30
10-08-85	2.37	0.17	0.84	2.82	0.20
10-21-85	0.30	0.05	0.64	0.47	0.08
10-29-85	0.54	0.14	0.66	0.82	0.21
01-08-86	0.59	0.04	0.31	1.90	0.13
01-20-86	0.87	0.05	0.28	3.11	0.18
01-21-86	0.17	0.03	0.28	0.61	0.11
10-22-85	0.07	0.01	0.19	0.37	0.05
10-23-85	0.14	0.03	0.24	0.58	0.13
12-12-85	0.94	0.05	0.40	2.35	0.13
12-16-85	0.27	0.03	0.40	0.68	0.08
04-19-86A	3.32	0.03	0.40	8.30	0.08
04-19-86B	0.49	0.02	0.32	1.53	0.06
04-19-86C	3.70	0.05	0.48	7.71	0.10
05-15-86A	7.54	0.06	0.40	18.85	0.15
05-15-86B	8.88	0.19	0.24	37.00	0.79
05-15-86C	2.80	0.05	0.33	8.48	0.15
06-16-86A	0.06	0.002	0.19	0.32	0.01
06-16-86B	0.17	0.02	0.28	0.61	0.07
06-16-86C	0.11	0.02	0.30	0.37	0.07
06-16-86D	0.11	0.02	0.21	0.52	0.10
08-20-86A	10.77	0.09	0.46	23.41	0.20
08-20-86B	7.41	0.06	0.41	18.07	0.15
09-16-86A	6.72	0.06	0.38	17.68	0.16
09-16-86B	2.22	0.04	0.36	6.17	0.11

\* Actividades de la fenoloxidasasa

\*\* UE (unidades de enzima) expresadas en  $\mu\text{moles de DL-DOPA/min}$

## Actividad de la fenoloxidasa

Algunos extractos crudos de la fenoloxidasa de la langosta tenían muy baja actividad enzimática. Sin embargo, un incremento gradual de la actividad de la fenoloxidasa ocurrió durante el almacenaje a 4°C, con la más alta actividad obteniéndose el tercer día, seguida luego por una baja (Fig. 1). Esto se cumplió para todos los extractos con altos niveles de tripsina-activada fenoloxidasa (TAFO), mientras que los extractos con bajos niveles de fenoloxidasa libre y baja TAFO no se comportaron de la misma manera (datos no mostrados). La fenoloxidasa del camarón blanco tampoco se comportó de esta manera, ningún incremento en la actividad de la fenoloxidasa se notó durante el almacenaje.

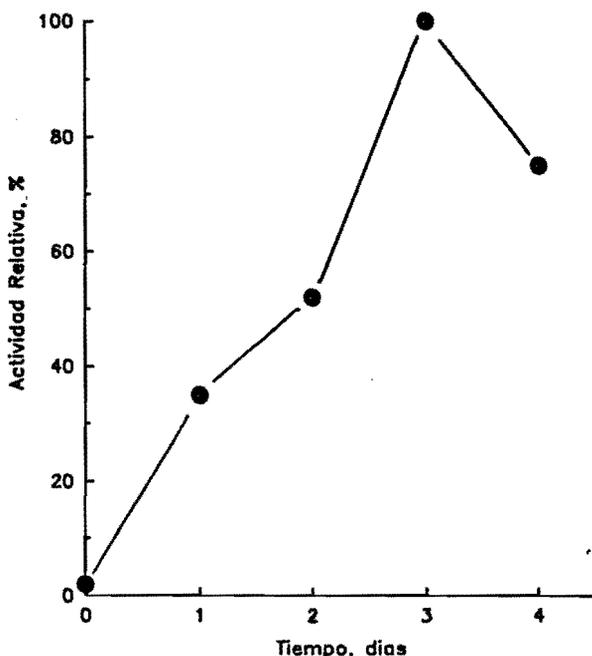
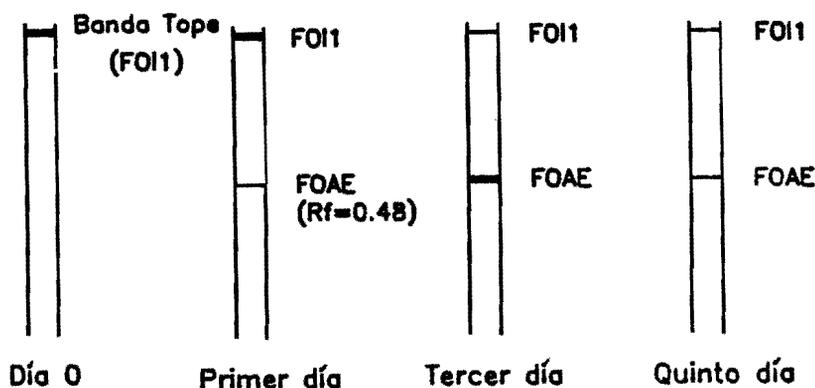


Figura 1. Efecto del almacenamiento sobre la actividad de la FO

El análisis electroforético no desnaturizante en geles de poliacrilamida mostró la presencia de una forma importante de FO en el tope de la gel después del teñido con DL-DOPA (Figura 2). Esta banda con actividad de FO casi no migró en la gel aún a concentraciones de poliacrilamida en el gel del 3%. Esta forma de FO se denotará como FOI1 (fenoloxidasa inerte 1). El patrón electroforético varió de langosta a langosta, pero en general la banda más importante estaba localizada en el tope de la gel, especialmente en aquellos extractos con baja actividad de FO libre.

El análisis electroforético también se realizó en los extractos en los días 1, 3 y 5 (Figura 2). Después de teñir los geles con DL-DOPA 5 mM, una nueva banda se desarrolló con Rf de 0.48, la banda en el tope gradualmente fué desapareciendo, y para el día 5 había desaparecido casi por completo. Se pensó que la nueva banda era una forma activa de la FO derivada de la FO inerte en el tope de la gel (FOI1), y probablemente producida por la acción de una "proteasa endógena" presente en el extracto crudo. La presencia de una "proteasa endógena" en extractos preparados similarmente ha sido señalada por Savagaon y Sreenivasan (13) y por Ferrer (5).



**Figura 2. Formación de la fenoloxidasa activada endógenamente (FOAE) demostrada por electroforesis**

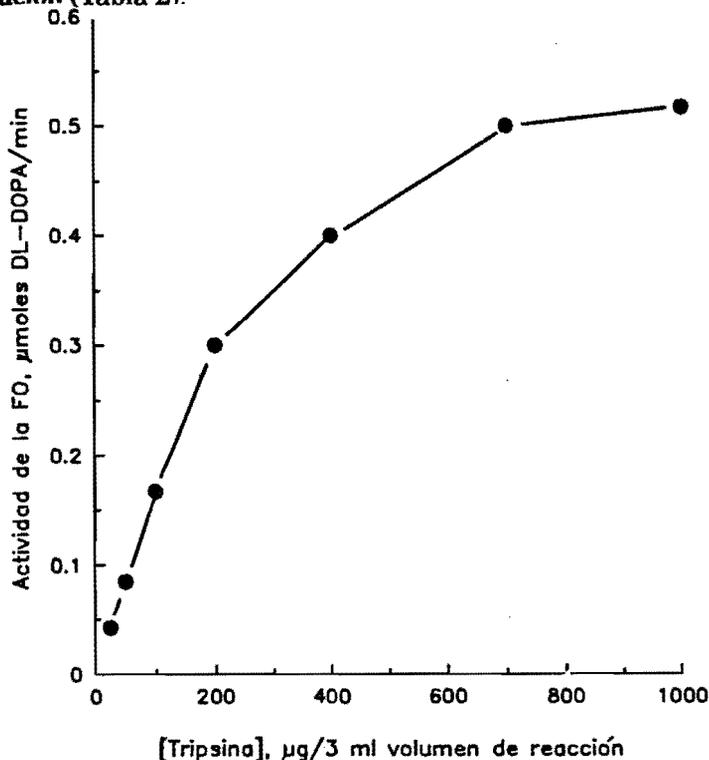
Para chequear la actividad de la FOI1, una muestra del extracto crudo se analizó electroforéticamente como antes. La banda en el tope de la gel se aisló rebanando los primeros 2 mm del tope de la gel, homogeneizando con buffer de fosfato 0.05 M (pH 7.2) usando un triturador de tejidos, y centrifugando a 10000g por 20 min para separar los pedazos de gel. Los geles no se tiñeron con DL-DOPA. Al sobrenadante se le midió la actividad de FO y se encontró que era 15 veces más alta que la del extremo crudo. No se encontró ninguna explicación a este fenómeno en este momento; sin embargo, se especuló la posible presencia de un inhibidor en el extracto crudo que pudiese haber sido removido durante la electroforesis. Cuando el extracto proveniente de la gel se mezcló con una alícuota del extracto crudo, no se observó ninguna disminución de la actividad de la FO, indicando que en realidad no existía ningún inhibidor. La actividad de esta forma de FO pudo haber sido debida a su desnaturalización por la electroforesis.

Se observó que la actividad de los extractos que contenían la banda tope de la gel incrementaba con el tiempo de almacenamiento, aún si el extremo estaba congelado. El análisis electroforético de este extremo después de 24

horas de almacenamiento a 4° C mostró una sola banda con la alta actividad de FO con un Rf de 0.47. Este valor de Rf fué muy similar a aquel encontrado para la FO activa del extracto crudo almacenado.

### **Efecto de algunas proteasas y otros tratamientos sobre la activación de la fenoloxida de la langosta y el camarón**

La fenoloxidasa de la langosta se activó también con tripsina. La presencia de 0.1 ml de tripsina al 1% en una mezcla de 2.8 ml de DL-DOPA y 0.1 ml de un extracto crudo de fenoloxidasa inerte rápidamente incrementó la actividad enzimática entre 2 y 120 veces en algunos casos. Bajo estas condiciones de ensayo un período de latencia (lag) apareció en el comienzo de la reacción y después la actividad de la FO fué incrementando gradualmente alcanzando el máximo a los 2.5 min. La pendiente más pronunciada se usó para el cálculo de la rata de reacción. La actividad de la FO se incrementó a medida que incrementaba también la concentración de tripsina (hasta una concentración máxima de 1m de tripsina/3 ml del volumen total reacción donde se hizo asintótica (Figura 3). La quimotripsina y la elastasa no activaron la fenoloxidasa, como tampoco la repetida congelación y descongelación (Tabla 2).



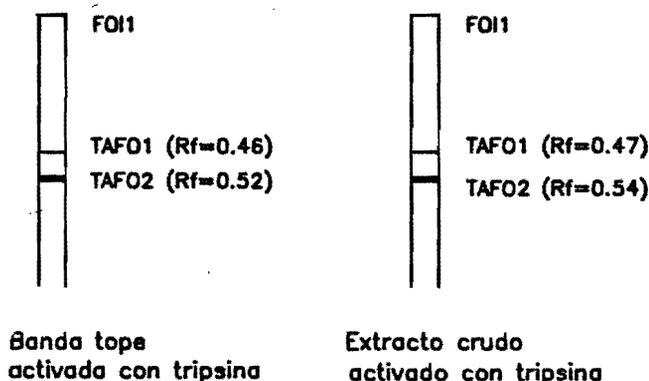
**Figura 3. Efecto de la concentración de tripsina sobre la actividad de la FO de un extracto crudo**

**TABLA 2 Efecto de varios tratamientos sobre la actividad de una preparación cruda de fenoloxidasa de la langosta espinosa**

TRATAMIENTO	ACTIVIDADES DE FO ( $\mu$ moles DL-DOPA/ min)
Sin tratamiento	< 0.003
Elastasa al 1%	< 0.003
Quimotripsina al 1%	< 0.003
Congelamiento/descongel.	< 0.003
Tripsina al 1%	0.528 $\pm$ 0.045

Ninguno de los tratamientos arriba mencionados activó la fenoloxidasa del camarón. Esta fenoloxidasa del camarón podría existir en un estado no latente que no necesita activación por ninguna enzima proteolítica, incluso tripsina.

El análisis electroforético de un extracto crudo de FO activada por la tripsina mostró la presencia de dos bandas con gran actividad de FO. Esto indicó que el modo de acción de la tripsina era diferente en alguna manera al modo de acción de la "proteasa endógena". Pareciese que la tripsina hidrolizara la FOI1 (la banda tope) para producir dos tripsina- activadas FO's (TAFO1 y TAFO2) con menor peso molecular (Figura 4). resultados similares se obtuvieron al actuar la tripsina sobre la banda tope (FOI1) aislada de la gel de poliacrilamida. La TAFO2 se consideró que era la forma de tripsina-activada FO dominante debido a la mayor intensidad de color que presentaba después del teñido con DL-DOPA (Figura 4). Esta TAFO2 fué caracterizada posteriormente. Se concluyó que las dos formas activas de FO producidas por la tripsina resultaron de la acción de esta enzima sobre la banda tope de la FOI1.



**Figura 4. Electroforesis de la banda tope y un extracto crudo activados con tripsina**

## Propiedad de la fenoloxidasa del camarón y la langosta espinosa

Varias de las propiedades y algunos parámetros cinéticos y termodinámicos de la fenoloxidasa se suman en la Tabla 3. El sustrato usado en todas las determinaciones fué DL- DOPA. Ninguna de las formas de la FO actuó sobre la tirosina, así que no fué posible usar la tirosina como sustrato. Se ha reportado (4) que la fenoloxidasa de la cutícula de los insectos no presenta actividad de monofeniloxidasa; sin embargo, la fenoloxidasa de la sangre si la presenta. Los difenoles que se necesitan para que se formen las quinonas para la esclerotización (endurecimiento) de la cutícula se podrían producir en la sangre del insecto por la cual se transportarían a la cutícula. Un mecanismo similar podría ocurrir en la langosta.

TABLA 3 Valores de Km, PM, Ea y efecto del pH sobre las distintas formas de la fenoloxidasa estudiadas

Parámetro	IFO1	TAFO 2	FOAE	FO CAM
Km, mN	0.81	0.36	0.92	
Ea (cal/mol)	12190	7840	10280	13700
Estabilidad al pH	10-12	7-9	6-10	8.0
pH óptimo	7.0	7.0	8.0	6.5-7.5
Peso Molecular		64000	62500	30000

La oxidación de DL-DOPA por la fenoloxidasa produce el pigmento negro melanina; sin embargo, existe muy poca formación de melanina en el proceso de esclerotización (1,4). Se ha propuesto que la N-acetildopamina es el compuesto principal envuelto en las reacciones para la esclerotización de la cutícula de los insectos (1). El grupo N- acetil puede prevenir la formación de la melanina. También el ácido 3,4 dihidrobenzoico se ha reportado como otro compuesto importante que toma parte en la esclerotización de algunos insectos (12). Estos dos compuestos forman enlaces de entrecruzamiento probablemente con proteínas y probablemente sean verdaderos sustratos de la fenoloxidasa.

Debido a que las langostas se ennegrecen durante el almacenaje bajo refrigeración, el DL-DOPA podría ser el sustrato para este problema en particular. El sustrato DOPA podría también ser el sustrato para la formación de melanina que ocurre cuando la cutícula de la langosta se rompe por alguna herida o golpe (7).

### Formas de fenoloxidasa adicionales

La electroforesis analítica en geles de poliacrilamida se realizó en un extremo crudo de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente. Los geles de poliacrilamida se tiñeron con DL- DOPA 5 mM (pH 6.5) conteniendo

tripsina al 1%. Una banda adicional con actividad de fenoloxidasa se desarrolló (llamada forma inerte de fenoloxidasa 2, IFO2), lo que indicaba la posibilidad de que más de una forma inerte de fenoloxidasa era activada por la tripsina (Figura 5). Sin embargo, cuando el extracto crudo se trató con tripsina antes de la electroforesis, solamente dos bandas se formaron después de teñir con DL- DOPA 5 mM como se muestra en las Figuras 4 y 5.

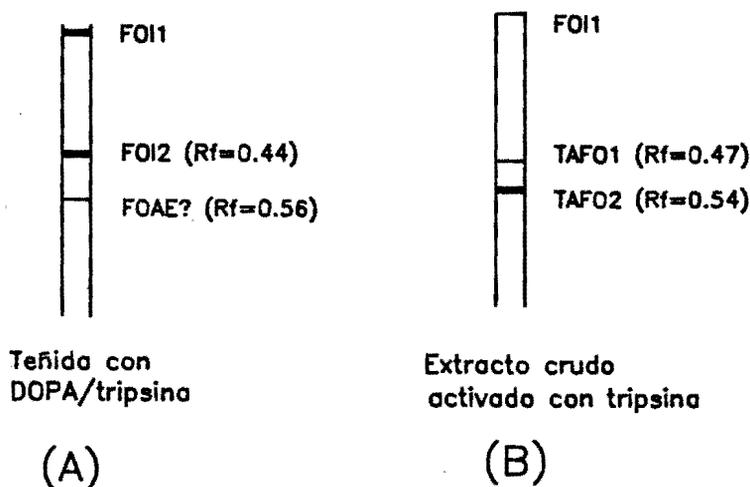


Figura 5. Electroforesis de un extracto inerte de FO teñido con DOPA/tripsina (A) y un extracto crudo de FO activado con tripsina (B)

El extracto crudo inerte se fraccionó con sulfato de amonio, encontrándose que la mayor parte de la actividad de la fenoloxidasa inerte precipitaba en la fracción de 30-50% de sulfato de amonio. El análisis electroforético realizado sobre esta fracción mostró la formación de nueva banda (Figura 6a). Al desarrollar las geles con una mezcla de DL-DOPA y tripsina se desarrolló una banda que correspondía a la segunda forma de fenoloxidasa inerte (IFO2) con Rf de 0.45 (Figura 6b). Cuando el extracto se trató con tripsina antes de la electroforesis, solamente se desarrollaron dos bandas con actividad de FO como siempre había ocurrido en los otros ensayos (Figura 4, 5 y 6c). El análisis electroforético de esta preparación después de 3 días a 4°C mostró solamente la presencia de una banda con actividad de fenoloxidasa tal como se muestra en la Figura 2.

Todos estos resultados obtenidos parecen indicar que todas las formas con actividad de fenoloxidasa, bien sean activas o inactivas, provienen de la molécula de IFO1 (banda tope). Proteólisis parcial de esta molécula podría haber ocurrido produciendo formas activas y/o inactivas de fenoloxidasa. También, el tratamiento con sulfato de amonio pudo haber roto la molécula de IFO1 produciendo nuevas formas de fenoloxidasa. Los resultados obtenidos

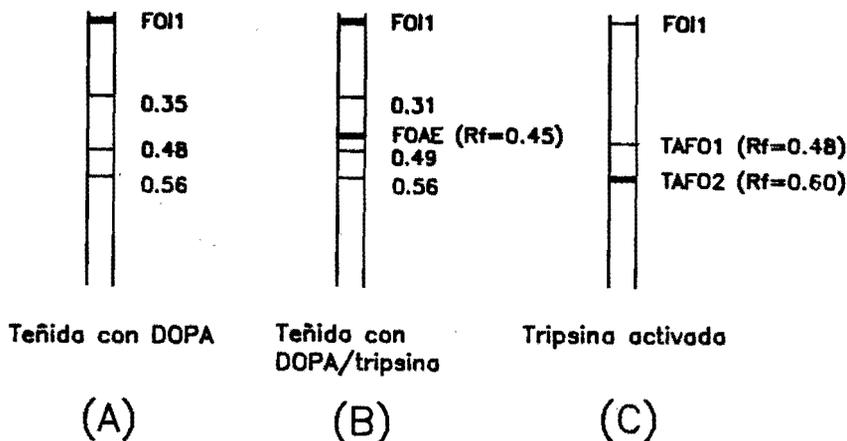


Figura 6. Electroforesis de una fracción precipitada con sulfato de amonio (30-50%) de extracto crudo no activado, usando DL-DOPA (A) y DOPA/tripsina (B) como soluciones teñidoras, y una fracción activa con tripsina (C)

también indicaron que había formación de solamente una forma activa (FOAE) cuando la proenzima (enzima inerte) se activaba por la acción de la "proteasa endógena" y dos formas activas (TAFO1 y TAFO2) cuando la proenzima se activaba con tripsina sin importar el número de formas de fenoloxidasa iniciales detectadas antes de la activación. El modo de acción de la "proteasa endógena" pareciese ser un poco diferente al de la tripsina según demuestran los resultados obtenidos con el análisis de electroforesis y los otros ensayos.

#### LITERATURA CITADA

- 1.- ANDERSEN, S.O. 1971. Phenolic compounds isolated from insect hard cuticle and their relationship to the sclerotization. *Insect Biochem.* 1:157.
- 2.- ANDERSEN, S.O. 1979. Biochemistry of the insect cuticle. *Ann. Rev. Entomol.* 24:29.
- 3.- BAILEY, M.E., and FIEGER E.A. 1954. Chemical prevention of black spot (melanogenesis) in ice stored shrimp. *Food Technol.* 8:317.
- 4.- BRUNET, P.C. 1980. The metabolism of the aromatic amino acids concerned in the cross-linking of insect cuticle. *Insect Biochem.* 10:467.
- 5.- FERRER, O.J. 1987. Activation, characterization, inhibition and seasonal variation in the phenoloxidase level of Florida spiny lobster (*Panulirus argus*). Ph. D dissertation. University of Florida, IFAS, Department of Food Science and Human Nutrition. Gainesville, FL.

- 6.- FERRER, O.J, KOBURGER, J.A, SIMPSON, B.K, GLEESON, R.A, y MARSHALL, M.R. 1989. Phenoloxidase levels in Florida Spiny Lobster (*Panulirus argus*): Relationship to season and molting stage. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 93B(3):595.
- 7.- LAI-FOOK, J. 1966. The repair of wounds in the integument of insects. *J. Insect Physiol.* 12:195.
- 8.- LEHNINGER, A. 1975. "Biochemistry." Worth Publishers, Inc., New York.
9. MADERO-, C.F. 1982. Purification and characterization of phenoloxidase from brown shrimp. Ph.D. dissertation. Texas A&M University, College Station, TX.
- 10.- MARSHALL, M.R., OTWELL, W.S., and WALKER, B.L. 1984. Preliminary study on the isolation and activation of polyphenoloxidase from deep sea crab (*Geryon* sp.). *Proceedings of the Ninth Annual Tropical and Subtropical Fisheries Conference of the Americas*. 9:118.
- 11.- MARSHALL, M.R., WALKER, B.L. and OTWELL, W.S. 1985. Activation and zymogenic nature of a phenoloxidase isolate from deep sea crab (*Geryon* sp.). University of Florida, Gainesville, FL. Unpublished data.
- 12.- PRYOR, M.G., RUSSELL, P.B., and TODD, A.R. 1946. Protocatehuic acid, the substance responsible for hardening of the cockroach ootheca. *Biochem. J.* 40:627.
- 13.- SAVAGAON, K.A., and SREENIVASAN, A. 1978. Activation mechanism of pre-phenoloxidase in lobster and shrimp. *Fishery Technol.* 15:49.
- 14.- SIGMA CHEMICAL COMPANY. 1984. Nondenatured protein molecular weight marker kit. Technical Bulletin No. MKR-137. St. Louis, MO.
- 15.- STEVENSON, J.R. 1985. Dynamics of the integument: In "The Biology of Crustacea" (Volume 9): Integument, pigments, and hormonal processes. D.E. Bliss and L.H. Mantel, Editors. Academic Press, New York.