

ALTERNATIVAS AL USO DE LOS AGENTES SULFITANTES PARA LA PREVENCIÓN DEL PARDEAMIENTO ENZIMÁTICO EN EL CAMARÓN BLANCO (*Peneaus schmitti*) PROCEDENTE DEL LAGO DE MARACAIBO, MUNICIPIO URDANETA, ESTADO ZULIA, VENEZUELA

Alternatives to the use of sulfiting agents to prevent enzymatic browning in white shrimp (*Peneaus schmitti*) from Maracaibo Lake, Urdaneta County, Zulia State, Venezuela

Obdulio J. Ferrer

Facultad de Agronomía
Universidad del Zulia
Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela

RESUMEN

El camarón blanco, *Peneaus schmitti*, se obtuvo fresco y se descabezó inmediatamente al llegar al laboratorio. Las cabezas se congelaron para usarlas en la extracción de la fenoloxidasa y las colas se trataron químicamente por inmersión en soluciones de polifosfato de sodio al 1 por ciento, ácido ascórbico al 1, 2 y 3 por ciento, ácido cítrico al 1, 2 y 3 por ciento y bisulfito de sodio al 0.5 y 1.25 por ciento (este último como control), y combinaciones diversas de dichos tratamientos. Se realizó también un blanco con agua potable. En algunos tratamientos se desarrolló la melanosis a los 3 días, mientras que en otros tardó 6 o más días en aparecer. El mayor problema de melanosis se presentó con el tratamiento "blanco" y el menor problema se presentó con el tratamiento "control". En general, los tratamientos conteniendo bisulfito de sodio inhibieron por mayor tiempo la aparición de la melanosis, seguidos en efectividad por las combinaciones de ácido ascórbico y ácido cítrico, en mayor concentración. La mayor parte de dicha actividad se encontró en la cabeza del crustáceo, y muy poca en la cola. Este tipo de camarón puede ser comercializado en forma fresca (no congelado), forma en la cual, conserva una mejor textura y tiene un precio mucho mayor que el camarón en forma congelada. El camarón se mantuvo en buenas condiciones organolépticas hasta por 9

días, no se presentaron signos visuales de descomposición microbiológica o enzimática en ningún tratamiento.

Palabras claves: Fenoloxidasa, melanosis, crustáceos.

ABSTRACT

White shrimp, *Peneaus schmitti*, was obtained fresh and was deheaded on the same day. Shrimp heads were frozen and used to extract phenoloxidase. Shrimp tails were chemically treated by dipping in 1% sodium polyphosphate; 1, 2 and 3% ascorbic acid; 1, 2 and 3% citric acid; 0.5% and 1.25% sodium bisulfite solutions, and treatment combinations. A blank with potable water was also run. In some treatment melanosis was developed on the third day, while in other treatments melanosis was developed on the sixth day or later. The mayor browning problem occurred with the treatment labeled "blank", and the minor problem was present in the treatment labeled "control". Generally, bisulfite treatments were the most effective for melanosis inhibition, followed in effectiveness by ascorbic and citric acid at their highest phenoloxidase activity. Most of the phenoloxidase activity was found in the shrimp head and very little activity was found in the shrimp tail. Due to these characteristics, white shrimp may be marketed as fresh, having better texture and flavor, and thus a higher price. There were no visual signs of spoilage or impairment of organoleptic properties in shrimps up to 9 days, in any treatment.

Key words: Phenoloxidase, melanosis, crustacean.

INTRODUCCIÓN

El camarón es uno de los crustáceos que sufre pardeamiento enzimático incluso bajo refrigeración a 4°C, originándose "manchas negras" en su cabeza y cola. Este fenómeno conocido también como melanosis se debe a la enzima fenoloxidasa, la cual también se conoce con el nombre de tirosinasa, polifenoloxidasa, catecolasa y cresolasa [16].

El pardeamiento enzimático va en detrimento del producto debido a que el consumidor rechaza el crustáceo melanótico. Para aliviar este problema la industria camaronera ha venido utilizando de manera casi universal el bisulfito de sodio. En el camarón, el bisulfito de sodio es empleado con buenos resultados, sumergiendo el producto en una solución al 1.25 por ciento por 1 minuto [2].

Sin embargo, el uso del bisulfito o de cualquier otro agente sulfitante en general ha sido cuestionado, ya que se ha comprobado que pueden inducir asma y otras reacciones adversas tales como hipotensión, y en algunos casos hasta 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. Por otro lado, la tendencia de las autoridades sanitarias es que, el camarón no debería contener sulfito.

El pardeamiento enzimático se puede prevenir por otros medios diferentes al agente sulfitante, ya sean físicos o químicos. Dichos tratamientos incluyen el calor, tal como el escaldado de los vegetales para inactivar o destruir térmicamente las enzimas; la exclusión del oxígeno molecular, lo cual causa una limitación en uno de los sustratos de la enzima; a la adición de compuestos quelantes para atrapar al cobre, ya que el cobre es un cofactor de la enzima [11]; el uso de agentes reductores que transforman las quinonas en difenoles, impidiendo de esta manera su polimerización; y, el uso de algunos inhibidores enzimáticos. El tratamiento térmico no es usado en la industria camaronera porque altera la delicada estructura del camarón, y los consumidores son reacios a comprar el camarón ya cocido. La exclusión de oxígeno es usualmente realizada en frutas. El oxígeno es desplazado de la fruta por una solución de azúcar. Esto se realiza en vacío.

La adición de agentes quelantes, tales como el ácido cítrico, se ha usado para inhibir el pardeamiento en papas [3]. Los polifosfatos, específicamente el tripolifosfato, se han usado para inhibir la fenoloxidasa en camarones, pero a unas concentraciones extremadamente altas [10]. Algunos otros agentes quelantes, incluyendo el EDTA [12], el ditiocarbamato de dietilo [1], y la feniltiourea [10] inhiben el pardeamiento. De estos compuestos, solamente el ácido cítrico y los polifosfatos han sido aprobados para usar en los alimentos.

El ácido ascórbico es el agente reductor más usado para prevenir o retardar el pardeamiento enzimático. Tan pronto como las quinonas intermediarias se forman, ellas son reducidas nuevamente a difenoles de tal manera que no pueden formarse los polímeros coloreados. Tal coloración se puede prevenir mientras exista ácido ascórbico [7,8].

La cisteína y otros tioles compatibles con alimentos, inhiben el pardeamiento enzimático, reaccionando con las quinonas intermediarias [1,13] para formar un complejo quinona-cisteína. Sin embargo, la cisteína también puede inhibir la reacción reduciendo las quinonas a difenoles [13].

El objetivo de esta investigación fue ensayar alternativas diferentes al sulfito para la preservación del camarón, tratar de disminuir la concentración de bisulfito usada en el tratamiento del camarón y aislar la enzima responsable del pardeamiento del crustáceo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los camarones del conocido como pata colorada, cuyo nombre científico es *Peneaus schmitti*, se obtuvieron frescos del Lago de Maracaibo, sector La Cañada, Municipio Urdaneta. Estos se colocaron en cavas con hielo y se trasladaron al Laboratorio del Instituto de Investigaciones Agronómicas de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia, donde se descabezaron el mismo día. La cabeza se utilizó para los ensayos de la fenoloxidasa, mientras que las colas se usaron para los ensayos de inmersión.

Extracción de la fenoloxidasa

La fenoloxidasa se extrajo homogeneizando en una licuadora 1 parte (en peso) de las cabezas del camarón con 4 partes (en volumen) de tampón de fosfato 0.05 M y pH 7.2. La homogeneización se hizo por 2 min a 4°C.

La mezcla se centrifugó a 10000g a 4°C por 20 min y se desechó el precipitado. El sobrenadante (extracto crudo) se precipitó con sulfato de amonio. Para esto se tomaron 100 ml del extracto crudo y se le agregó 70 g de sulfato de amonio sólido para precipitar la proteína. Dicha precipitación se realizó en un baño de hielo. Se centrifugó en frío y al precipitado así obtenido, se le eliminó el exceso de sal. Se redisolvió el precipitado en 50 ml de buffer de fosfato pH 7.2.

Preparación de la Sepharosa 4B-tirosina

Se pesaron 9 g de Sepharosa 4B activada [17] y se le agregó 1 L de HCl 1 mM. La mezcla se filtró a través de un crisol de vidrio poroso usando vacío. El sólido resultante es un gel hinchado con un volumen de aproximadamente 31.5 ml. Este gel se colocó cuantitativamente en una fiola de 125 ml y se le agregó el ligando (tirosina) disuelto en buffer de bicarbonato 0.1 M y pH 8.3, a razón de 10 mg de tirosina por ml de

gel, esto es 0.315 g de tirosina en total. La mezcla se agitó por 2 horas a temperatura ambiente.

El exceso de ligando se lavó con suficiente cantidad de bicarbonato 0.1 M y pH 8.3 y con buffer de acetato 0.1 M, pH 4.0 conteniendo cloruro de sodio 0.5 M. El gel resultante, Sepharosa 4B-tirosina se usó luego en la purificación de la fenoloxidasas.

Purificación de la fenoloxidasas por cromatografía de afinidad

A la solución enzimática se le añadió Sepharosa-tirosina preparada según el procedimiento descrito anteriormente. Se agitó gentilmente por varios minutos y luego se filtró con un crisol de vidrio poroso, tipo C, y se lavó varias veces con buffer de fosfato 0.05 M, pH 7.2.

Para desadsorber la enzima fenoloxidasas, se agregó al residuo sólido 5 ml de HCl 5mM. Se agitó por 10 min y se filtró. El líquido se recogió en un recipiente conteniendo 5 ml de buffer de fosfato 0.05 y pH 7.2.

Cromatografía de elución en columna y liofilización de la enzima

La solución enzimática resultante del paso anterior, se eluyó en una columna de 1 cm de diámetro por 15 cm de alto para desalinizarla y eliminarle la mayor parte del ácido. Se recogieron fracciones de 5 ml y se combinaron aquellas fracciones que presentaban fuerte absorción a 280 nm y se liofilizaron usando un liofilizador marca Labconco, modelo Freeze Dryer 8.

Determinación de la actividad de la fenoloxidasas

Se tomaron 0.4 ml del filtrado y se le agregaron 5 ml de DL-DOPA 10 mM en tampón de fosfato 0.05 M y pH 6.5 y se le determinó la actividad a 27°C, colorimétricamente, midiendo la variación de la absorbancia con respecto al tiempo a 480 nm [14,15].

Electroforesis analítica

Se utilizó la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida [17] para la separación y detección de la fenoloxidasas. Se usó una fuente de poder Gelman modelo 38206 suministrando un amperaje constante de 4 mA por tubo. Los tubos fueron de 0.5 cm de diámetro interno por 10 cm de altura, conteniendo geles con 5 por ciento de acrilamida. El volumen de muestra aplicado fue de 200 µl (aproximadamente 4 mg de proteína). El tampón usado en la cámara electroforética fue tris-(hidroximetil) aminometano 0.01 M/glicina 0.04 M y pH 8.3.

Al final de la electroforesis los geles se tiñeron con solución de DL-DOPA 10 mM (teñido específico para fenoloxidasas) y con la solución del colorante azul de coomassie, conteniendo 40 por ciento de metanol y 7 por ciento de ácido acético. Este teñido se realizó después de la fijación de las bandas realizada

sumergiendo los geles por un mínimo de 2 horas en la solución fijadora. La migración relativa (Rf) de cada banda se calculó dividiendo la distancia migrada por la banda entre la distancia migrada por el marcador.

Tratamiento de inmersión para la preservación del camarón

El camarón, *Peneaus schmitti*, se obtuvo fresco, se colocó en cavas con hielo y se trasladó al Laboratorio del Instituto de Investigaciones Agronómicas donde se descabezó inmediatamente.

Las cabezas se congelaron para usarlas en la extracción de la enzima fenoloxidasas, y las colas se trataron con polifosfato de sodio al 1 por ciento, ácido ascórbico al 1, 2 y 3 por ciento, ácido cítrico al 1, 2 y 3 por ciento y bisulfito de sodio al 0.5 y 1.25 por ciento, y combinaciones diversas de dichos tratamientos. Se realizó también un blanco con agua potable. Los diversos tratamientos aplicados se especifican en la TABLA I.

Los camarones se trataron con las soluciones arriba mencionadas, sumergiéndolos en proporción 1:4 (camarón:solución) en peso, por 5 min. Se realizó un blanco con agua potable y un control con bisulfito de sodio al 1.25 por ciento. Los camarones así tratados se colocaron en bolsas plásticas debidamente identificadas y se guardaron en una cava de anime con hielo. Esta cava se colocó en un cava-cuarto a 4°C.

A intervalos de 24 o 48 horas, los camarones se examinaron visualmente para determinar su desarrollo melanótico o pardeamiento y se tomaron fotografías de ellos.

Los experimentos se replicaron en los meses de agosto y diciembre.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tratamientos de inmersión

Los tratamientos de inmersión fueron realizados en los meses de agosto y diciembre de 1990, realizándose duplicados en cada corrida. Los resultados obtenidos para cada corrida fueron muy similares.

En algunos tratamientos (blanco) se desarrolló la melanosis a los 3 días, mientras que en otros, tardó 6 o más días en aparecer. El mayor problema de melanosis se presentó con el tratamiento "blanco" (agua potable) y el menor problema con el tratamiento "control" (1.25 por ciento de bisulfito). En general, los tratamientos conteniendo bisulfito de sodio inhibieron por mayor tiempo la aparición de la melanosis, seguidos en efectividad por las combinaciones de ácidos ascórbico y ácido cítrico, en mayor concentración TABLA II.

Este tipo de camarón es bastante resistente a la melanosis. En general, exceptuando al blanco, los camarones no se mancharon sino hasta después del sexto día, y el manchado no fue tan fuerte. El tratamiento con agua potable, denominado

TABLA I

COMBINACIONES DE LOS TRATAMIENTOS QUÍMICOS REALIZADOS
(PORCENTAJE)

Tratamiento	Polifosfato A	Ac. ascórbico B	Ac. cítrico C	Bisulfito D	Tratamiento	Polifosfato A	Ac. ascórbico B	Ac. cítrico C	Bisulfito D
Blanco	Agua potable solamente				Blanco	Agua potable solamente			
Control				1.25	Control				1.25
AB1C1D	1	1	1	0.50	AC1	1	-	1	-
AB1C2D	1	1	2	0.50	AC2	1	-	2	-
AB2CC2D	1	2	2	0.50	AC3	1	-	3	-
AB2C3D	1	2	3	0.50	AB1	1	1	-	-
AB3C1D	1	3	1	0.50	AB2	1	2	-	-
AB3C2D	1	3	2	0.50	AB3	1	3	-	-
AB3C3D	1	3	3	0.50	B1D	-	1	-	0.50
B1C1D	-	1	1	0.50	B2D	-	2	-	0.50
B1C2D	-	1	2	0.50	B3D	-	3	-	0.50
B1C3D	-	1	3	0.50	C1D	-	-	1	0.50
B2C1D	-	2	1	0.50	C2D	-	-	2	0.50
B2C2D	-	2	2	0.50	C3D	-	-	3	0.50
B2C3D	-	2	3	0.50	B1C1	-	1	1	-
B3C1D	-	3	1	0.50	B1C2	-	1	2	-
B3C2D	-	3	2	0.50	B1C3	-	1	3	-
B3C3D	-	3	3	0.50	B2C1	-	2	1	-
AB1C1	1	1	1	-	B2C2	-	2	2	-
AB1C2	1	1	2	-	B2C3	-	2	3	-
AB1C3	1	1	3	-	B3C1	-	3	1	-
AB2C1	1	2	1	-	B3C2	-	3	2	-
AB2C2	1	2	2	-	B3C3	-	3	3	-
AB2C3	1	2	3	-	AD	1	-	-	0.50
AB3C1	1	3	1	-	A	1	-	-	-
AB3C2	1	3	2	-	B1	-	1	-	-
AB3C3	1	3	3	-	B2	-	2	-	-
AC1D	1	-	1	0.50	B3	-	3	-	-
AC2D	1	-	2	0.50	C1	-	-	1	-
AC3D	1	-	3	0.50	C2	-	-	2	-
AB1D	1	1	-	0.50	C3	-	-	3	-
AB2D	1	2	-	0.50	D	-	-	-	0.50
AB3D	1	3	-	0.50					

TABLA II

TIEMPO EN APARECER LA MELANOSIS EN EL CAMARÓN SEGÚN EL TRATAMIENTO QUÍMICO

Tratamiento	Grupo	Tiempo sin melanosis (Días)	Tratamiento	Grupo	Tiempo sin melanosis (Días)
Control	1	9	Control	1	9
D	2	7	AB1C1	3	6
AB1C1D	2	7	AB1C2	3	6
AB1C2D	2	7	AB1C3	3	6
AB1C3D	2	7	AB2C1	3	6
AB2C1D	2	7	AB2C2	3	6
AB2C2D	2	7	AB2C3	3	6
AB2C3D	2	7	AB3C1	3	6
AB3C1D	2	7	AB3C2	3	6
AB3C2D	2	7	AB3C3	3	6
AB3C3D	2	7	AC1	3	6
B1C1D	2	7	AC2	3	6
B1C2D	2	7	AC3	3	6
B1C3D	2	7	AB1	3	6
B2C1D	2	7	AB2	3	6
B2C2D	2	7	AB3	3	6
B2C3D	2	7	B1C1	3	6
B3C1D	2	7	B1C2	3	6
B3C2D	2	7	B1C3	3	6
B3C3D	2	7	B2C1	3	6
AC1D	2	7	B2C2	3	6
AC2D	2	7	B2C3	3	6
AC3D	2	7	B3C1	3	6
AB1D	2	7	B3C2	3	6
AB2D	2	7	B3C3	3	6
AB3D	2	7	B1	4	5
B1D	2	7	B2	4	5
B2D	2	7	B3	4	5
B3D	2	7	C1	4	5
C1D	2	7	C2	4	5
C2D	2	7	C3	4	5
C3D	2	7	A	5	3
AD	2	7	Blanco	5	3

"blanco", fue el primero en mancharse (después de 3 días), sin embargo, tampoco este manchado fue intenso, sino más bien muy leve. Se piensa que este tipo de camarón puede ser comercializado en forma fresca (no congelado), forma en la cual conserva una mejor textura y tiene un precio mucho mayor que el camarón en forma congelada.

Conservando el camarón en la forma antes descrita, se mantuvo en buenas condiciones organolépticas y microbiológicas hasta por 9 días, no presentándose signos de descomposición, microbiológica ni enzimática.

El tratamiento con ácido ascórbico a concentraciones elevadas creó unas manchas blancas en la carne del camarón, pero sin desmejorar su apariencia.

Para alargar aún más la vida útil del producto, se podría realizar también un tratamiento con agua clorinada. Este tratamiento es de uso común en las plantas camaronerías, y es usado para controlar la carga microbiana del camarón.

A pesar de que no se realizó ningún ensayo sobre la vida útil del camarón descabezado comparado a la del camarón completo, se recomienda descabezar los camarones para evitar problemas de textura debido a la digestión enzimática que ocurre en la unión de la cabeza y cola del crustáceo, y también para eliminar las branquias donde existe una alta concentración de microorganismos [9]. Por otro lado, como el camarón sin cabeza ocupa menos volumen que el camarón entero, esto repercutiría en una baja en los costos de transporte.

Fenoloxidasa del camarón

Ensayos preliminares demostraron que la mayor parte de la actividad de la enzima fenoloxidasa se encontraba principalmente en la cabeza del camarón. Muy poca actividad se encontró en la cola del crustáceo. Por tal motivo, se utilizaron las cabezas para la extracción de la enzima fenoloxidasa, obteniéndose extracto crudo preparado según la metodología descrita anteriormente.

Dicho extracto tenía la característica de no activarse durante almacenamiento, a diferencia de los extractos obtenidos de la langosta espinosa [4,5]. También presentaba muy poca actividad, obteniéndose respuesta melanótica después de 48 horas de incubación de una alícuota del extracto con DL-DOPA 5 mM, a temperatura ambiente, TABLA III.

Estas lecturas se obtuvieron después de corregirse los valores para el blanco (solución de DL-DOPA solamente). Resultados similares fueron obtenidos por Ferrer y Marshall [6] trabajando con camarón blanco.

En nuestros ensayos, la cantidad y la actividad de la enzima obtenida fue muy baja, razón por la cual no se pudo caracterizar, según su constante de Michaelis, pH y temperatura óptima, y otros parámetros usados para la caracterización de enzimas.

La enzima aparentemente se encuentra en forma pura

TABLA III

ACTIVIDAD DE LA FENOLOXIDASA EXPRESADA EN ABSORBANCIA VERSUS TIEMPO DE INCUBACIÓN

Tiempo de incubación (hr)	Absorbancia
0.5	0.03
26	0.21
48	0.55

según el análisis de electroforesis. Se observó en dicho análisis la aparición de una sola banda (en el tope) al revelar la gel con solución de DL-DOPA (revelado específico para fenoloxidasa) y al revelarla con solución colorante (revelado para proteínas).

La falta de migración de la enzima fenoloxidasa podría ser debida a dos factores: el primer factor podría estar relacionado con un alto peso molecular de la enzima, razón por la cual no migraría en geles con 5 por ciento de acrilamida sino que podría migrar en geles con 3 ó 2 por ciento. Este tipo de fenoloxidasas con alto peso molecular y que se quedan en el tope de la gel han sido reportadas por Ferrer y col. [5]. Ellos han encontrado fenoloxidasas con alto peso molecular. En segundo lugar, es posible que el pH usado en la electroforesis (8.3) fuese igual o muy aproximado al punto isoeléctrico de la enzima, en cuyo caso la carga neta de la enzima sería igual a cero o aproximadamente cero y ésta no migraría en un campo eléctrico. El investigar cuál de las dos posibilidades era la correcta no estaba dentro de los objetivos de este trabajo, pero podría ser estudiado en trabajos posteriores.

CONCLUSIONES

El camarón blanco, *Peneaus schmitti*, no es muy susceptible a la melanosis, probablemente debido al bajo nivel de actividad enzimática de la fenoloxidasa encontrado. Por lo tanto, el control de la melanosis con agentes químicos se hace mucho más fácil.

Debido a la buena calidad de este camarón, en cuanto a la resistencia a la melanosis se refiere, se recomienda entonces usar bajas concentraciones de bisulfito de sodio (no mayor del 0.5 por ciento) en las inmersiones, y 1 por ciento de polifosfato de sodio, puesto que este compuesto preserva la jugosidad del producto al restringir el goteo de agua. La utilización de los otros dos productos, ácido ascórbico y ácido cítrico sería opcional. En caso de restricciones severas con las concentraciones residuales de bisulfito, éste sería reemplazado por ácido ascórbico y ácido cítrico al 1 por ciento, manteniendo

siempre el tratamiento con polifosfato para evitar la merma de peso del producto.

La enzima fenoloxidasas se encuentra en la cabeza del camarón y no en la cola, con muy bajo nivel de actividad enzimática.

Debido a la resistencia a la melanosis, a su gran tamaño y a los bajos niveles de actividad de fenoloxidasas encontrados en este tipo de camarón, debería ser de muy buena aceptación en consumidores exigentes (Ej. el consumidor norteamericano), razón por la cual podría ser exportado y vendido a buen precio. Sin embargo, se hace necesario evaluar dicho producto microbiológicamente para conocer si cumple con las regulaciones sanitarias de los países importadores. La utilización de agua clorinada como tratamiento de inmersión ha sido ampliamente usada para controlar la carga microbiana del producto.

AGRADECIMIENTO

El autor expresa su más sincero agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES), por el financiamiento total de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Antony, P.D. and Nair, M.R. Studies on phenolase enzyme in prawns II. The inhibitory action of the enzyme by certain chemical agents. *Fishery Technol.* 12(2):112. 1975.
- [2] Bailey, M.E. and Fieger, E.A. Chemical prevention of black spot (melanogenesis) in ice stored shrimp. *Food Technol.* 8:317. 1954.
- [3] Feinberg, B.; Schwimmer, S.; Reeve, R., and Juilly, M. Vegetables. In: *Food Dehydration (volume 2). Products and Technology.* W.B. Van Arsdell and M.J. Copley, Editors. Avi Publishing Co., Westport, CT. 1964.
- [4] Ferrer, O.J. Activación, caracterización y variación estacional de los niveles de la fenoloxidasas de la cutícula de la langosta espinosa (*Panulirus argus*). Trabajo de ascenso para Profesor Titular. Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela. 1990.
- [5] Ferrer, O.J.; Koburger, J.A.; Otwell, W.S.; Gleeson, R.A.; Simpson, B.K. and Marshall, M.R. Phenoloxidasas from the cuticle of Florida Spiny lobster (*Panulirus argus*): Mode of Activation and Characterization. *Food Sci.* 54(1):63. 1989.
- [6] Ferrer, O.J. y Marshall, M.R. Aislamiento y Caracterización de la fenoloxidasas del camarón blanco (*Peneaus setiferus*) y de la langosta espinosa (*Panulirus argus*). *Revista de la Facultad de Agronomía de LUZ*, Volumen 8 (5). 1991.
- [7] Golan-Goldhirsh, A. and Whitaker, J.R. Effect of ascorbic acid, sodium bisulfite, and thiol compounds on mushroom polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 32:1003. 1984.
- [8] Ingraham, L.L. Effect of ascorbic acid on polyphenol oxidase. *J. Am. Chem. Soc.* 78:5095. 1956.
- [9] Koburger, J.A.; Miller, M. and Otwell, W.S. Thawed lobster tails: some quality changes. *Proceedings of the Tenth Annual Tropical and Subtropical Fisheries Technological Conference of the Americas* 10:201. 1985.
- [10] Madero, C.F. and Finne, G. Properties of phenoloxidasas isolated from gulf shrimp. *Proceedings of the Seventh Annual Tropical and Subtropical Fisheries Technological Conference of the Americas* 7:328. 1982.
- [11] Makino, N.; McMahonill, P. and Mason, H.S. The oxidation of copper in resting tyrosinase. *Journal Biol. Chem.* 249:6062. 1974.
- [12] Mayer, A.M. Inhibition and substrate specificity of lettuce phenolase. *Phytochemistry* 1:237. 1962.
- [13] Muneta, P. and Walradt, J. Cysteine inhibition of enzymatic blackening with polyphenol oxidase from potatoes. *J. Food Sci.* 33:606. 1968.
- [14] Savagaon, K.A. and Sreenivasan, A. Purification and properties of latent and isoenzymes of phenoloxidasas in lobster (*Panulirus homarus* Linn.). *Indian Journal. Biochem. Biophys.* 12:94. 1975.
- [15] Savagaon, K.A. and Sreenivasan, A. Activation mechanism of pre-phenoloxidasas in lobster and shrimp. *Fishery Technol.* 15:49. 1978.
- [16] Schwimmer, S. *Source Book of Food Enzymology.* The Avi Publishing Co., Westport, CT. 1981.
- [17] Sigma Chemical Company. Nondenatured protein molecular weight marker kit. *Technical Bulletin No. MKR-137.* St. Louis, MO. 1984.