

## Identificación de Escómbridos de interés industrial en fresco y en conservas por Isoelectrofocalización

Guy Carvajal

Laboratorio de Microbiología – Instituto Tecnológico Pesquero  
Carretera a Ventanilla Km. 5.2 – Callao

### ABSTRACT

Water-soluble proteins of Scombroid fishes and peptides of canned fish have been examined by Isoelectric-focusing in polyacrilamide and agarose gels. These species were clearly differentiated by the separation patterns of sarcoplasmic proteins. Canned fishes also were distinguished by means of their peptides recovered with Cyanogen bromide and Urea which give species-specific migration patterns in polyacrilamide gels.

### RESUMEN

Se obtuvieron patrones de migración característicos de las proteínas solubles en agua, de algunas variedades de escómbridos peruanos. De manera similar se obtuvieron patrones específicos con los péptidos de las conservas recuperados con bromocianuro y úrea. Se observó la ventaja del método de Isoelectrofocalización para el reconocimiento de las especies tanto en fresco como en conservas, principalmente en aquellas de importancia industrial.

### INTRODUCCION

Desde la aplicación de la electroforesis zonal para la inspección de productos pesqueros por Larson (1969)<sup>(14)</sup>, varios métodos y soportes han sido utilizados con el objeto de mejorar la separación de las proteínas del pescado. Entre ellas se cuentan las electroforesis de bajo voltaje sobre papel, almidón o agar cuyas separaciones restringidas sólo diferencian familias, pero difícilmente especies emparentadas. El empleo de soportes de acetato de celulosa y acrilamida han permitido mejores separaciones, pudiéndose identificar pescados frescos pero no así productos cocinados o conservas. Utilizando la electroforesis de disco con geles de poliacrilamida y soluciones tampón con úrea y sulfato de sodio dodecilo, se obtuvo una mejor separación de las proteínas desnaturalizadas por el calor, método utilizado por Seki<sup>(3)</sup> para el fraccionamiento de las proteínas miofibrilares y por Mackie<sup>(6)</sup> para las proteínas de pescados cocidos.

Los inconvenientes de la electroferesis pueden ser superados por técnicas de alta resolución en gradientes de pH, como la Isoelectrofocalización<sup>(5, 11)</sup> que permite una correcta identificación de las especies al estado fresco o congelado, aunque pocos autores han demostrado con claridad patrones específicos en conservas de pescado. Para ello se requiere una recuperación de las proteínas desnaturalizadas con sustancias químicas, obteniéndose fragmentos de fracciones sarcoplasmáticas, miofibrilares y de sostén que luego son separados por técnicas de alta resolución. Así, Mackie<sup>(7)</sup> y Morel<sup>(9)</sup> obtuvieron patrones de algunas conservas con pescados del Atlántico.

El comercio de productos pesqueros ha tenido un desarrollo constante a nivel internacional tanto en variedad como calidad, lo cual determina algunos problemas de denominación o declaración cuya correspondencia varía de un país a otro. Algunas encuestas<sup>(10)</sup> han revelado la frecuente introducción al mercado de algunas especies de menor valor comercial, etiquetándolas por otras de mayor valor. Para dirimir estos fraudes, se requiere un método objetivo y estandar para confrontar resultados.

Este trabajo fue realizado con la intención de obtener patrones de identificación de los escómbridos utilizados en conservería, por cuyo valor se incurre en sustituciones, y por su importancia como producto de consumo internacional.

## MATERIALES Y METODOS

**Pescados Frescos y Congelados:** Se estudiaron ejemplares recibidos en el Instituto, clasificados según la clave taxonómica<sup>(2)</sup>.

**Conservas:** Fueron elaboradas en el Departamento de Conservas del Instituto, bajo las condiciones siguientes:

ORIGEN	TIPO	COCCION	ESTERILIZAC.
Atún congelado	Sólido en aceite	103°C – 135 min.	115°C – 75 min.
Barrilete congelado	Sólido en aceite	103°C – 135 min.	115°C – 75 min.
Bonito congelado	Desmenuzado en aceite	105°C – 80 min.	115°C – 75 min.
Caballa fresca	Entera en agua y sal	100°C – 35 min.	115°C – 90 min.
Sardina fresca	Entera en agua y sal	100°C – 35 min.	115°C – 90 min.
Jurel fresco	Entero en agua y sal	100°C – 35 min.	115°C – 90 min.

**Extracción de las Proteínas:** Las proteínas solubles en soluciones salinas débiles, extraídas del pescado fresco, fueron descritas en una publicación anterior<sup>(1)</sup>. En el caso de conservas se siguió el procedimiento siguiente: se pesó 2.5 gr de pescado, drenando previamente el líquido de gobierno. Se añadió 50 ml de ácido fórmico al 70%, agregando 1.25 g. de BrCN en un recipiente con tapa. Se homogenizó la suspensión algunos minutos hasta la rotura del tejido muscular y se dejó reposar 24 hs. a temperatura ambiental. El ácido fórmico y el BrCN fueron separados en un evaporador rotatorio a 40°C, redisolviendo el residuo en agua destilada y luego dializado en agua circulante durante 24 hs.

El dializado se secó por evaporación y se mezcló con 7.5 ml de Urea 10 M dejando reposar la suspensión una noche a temperatura ambiental. Se neutralizó con algunas gotas de NaOH 1N. Finalmente se centrifugó a 15000 rpm. durante 20 minutos. El sobrenadante fue utilizado como muestra.

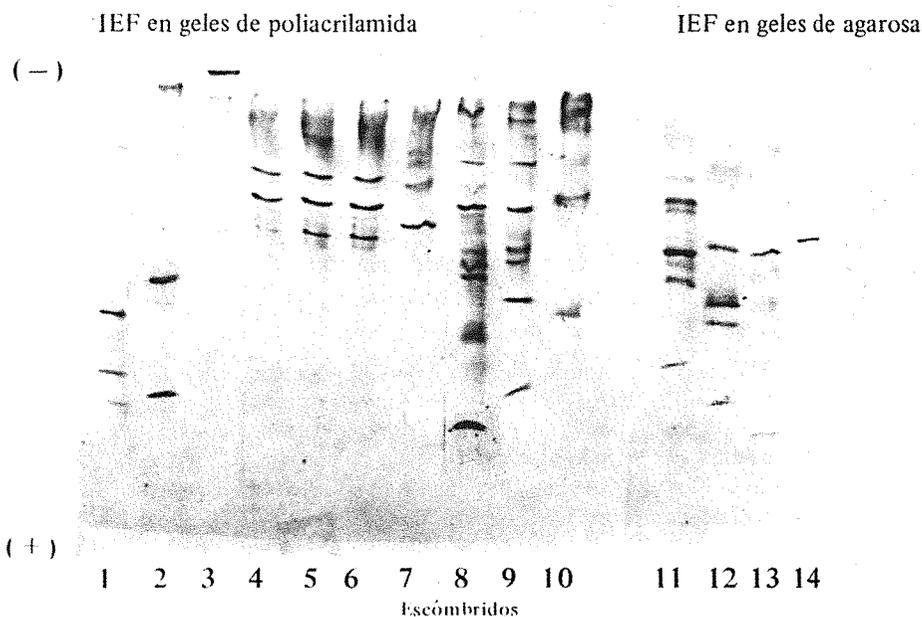
**Isoelectrofocalización (IEF):** Las muestras de pescado fresco y de conservas fueron sometidas a la IEF con geles de poliacrilamida (descritas en publicación anterior)<sup>(1)</sup> y geles de agarosa cuya preparación fue la siguiente: Se mezcló 0.18 gr de Isogel agarosa EF con 16.6 ml de agua destilada, disolviendo en caliente en 10 min. Se dejó enfriar a 75°C y se añadió 1.4 ml de anfolitos del rango de pH 3.5 – 9.5, vertiendo la solución con una jeringa de plástico de 20 ml a los moldes previamente

calentados a 75°C. El gel se llenó por capilaridad, evitando las burbujas de aire. Los moldes de vidrio, la deposición de las muestras y las condiciones de corrido fueron iguales que la IEF en poliacrilamida, salvo las tiras de papel de filtro, impregnadas de solución de NaOH 0.5M en el lado catódico y ácido acético 0.5M en el anódico. La solución fijadora se preparó con 50 gr de TCA, 5 gr de ácido sulfosalicílico y 500 ml de agua destilada. El lavado se efectuó con etanol al 95%. La solución de tinte se obtuvo con 0.25 gr de Azul de Coomassie disuelto en 50 ml de solución de desteñido la que se preparó con 35 ml de etanol al 95%, 10 ml de ácido acético y 100 ml de agua destilada.

### RESULTADOS Y DISCUSION

Las separaciones de las proteínas sarcoplasmáticas de las especies estudiadas se muestran en la foto 1. Corresponden a algunas variedades de escómbridos a los cuales se les ha agregado algunos ejemplos de otras familias, observándose en todas ellas una clara definición de especie. Comparando los patrones de los escómbridos más comunes como el atún, barrilete, pez sierra y bonito (bandas 4, 7, 8, 10) se les puede identificar fácilmente, notándose en ellos fracciones específicas que aparecen tanto en poliacrilamida como en agarosa. Existen un mayor número de fracciones localizadas en el lado alcalino y central que los diferencian de las otras familias (bandas 1, 2, 3, 9), que presentan además otras fracciones en el lado ácido.

FOTO 1. ELECTROFOREGRAMAS DE PESCADO FRESCO



1. anchoveta (*Engraulis ringens*), 2. machete (*Brevoortia maculata chilcae*), 3. tiburón (N.D.), 4, 5, 6. atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*), 7, 11. barrilete (*Katsuwonus pelamis*), 8, 13. pez sierra (*Scomberomorus maculatus sierra*), 9, 12. pez volador (*Hirundichthys rondeletti*), 10, 14. bonito (*Sarda chiliensis chiliensis*).

Para mostrar la reproductibilidad y sensibilidad del método, se corrieron tres muestras de ejemplares de atún y los resultados son idénticos, tal como se aprecia en las bandas 4, 5, 6.

En una publicación previa<sup>(1)</sup> se han descrito un gran número de especies, demostrando su especificidad genética, que puede ser utilizada para la identificación correcta en pescados al estado fresco como congelado, entero, fileteado o porciones.

Los resultados obtenidos en ambos tipos de geles son similares. En ambos se utilizó el mismo gradiente de pH, por lo que se observan proteínas localizadas en la misma zona que corresponde a su punto isoeléctrico. La razón de utilizar estos geles es el riesgo de toxicidad y dificultad de preparación por parte de la poliacrilamida que no lo ofrece la agarosa, aunque se obtiene menor nitidez en el último, por el tamaño de las proteínas que están por debajo de los 200000 daltons, nivel de menor resolución en Agarosa.

Las claras separaciones que se obtuvieron con el pescado fresco no son factibles con la carne de pescado sometidos a procesos de cocción más severos. En la preparación de conservas, el músculo de pescado es primero sujeto a una cocción previa, que puede ser efectuada con salmuera en caliente o por intermedio de una atmósfera de vapor, y segundo la esterilización, cuyo objeto es inhibir los microorganismos y enzimas que degenerarían el producto. Su intensidad está dada por el valor esterilizador cuya fórmula clásica

$$L = t \cdot 10^{\frac{T - 250^*}{Z}}$$
 sugiere que aumentando la temperatura y disminuyendo el tiempo se puede conseguir un baremo de esterilización diferente, pero que tiene el mismo valor esterilizador. Si a ésto se agrega la rotación del producto, se favorece la penetración del calor en productos que tienen una fase líquida. Esta rotación aumenta los intercambios térmicos, que en los procedimientos clásicos sólo se obtiene por conducción y convección.

Por el efecto de la cocción previa, las proteínas se desorganizan y polimerizan formando uniones hidrogenadas e hidrófobas, lo que las hace insolubles en las soluciones salinas utilizadas para su extracción. De todos los solventes capaces de romper estas uniones, sólo la úrea a fuerte concentración, entre 6M y 10M, pueden permitir extraer fragmentos protéicos capaces de migrar dentro de un campo eléctrico; pero la esterilización que es un procedimiento más severo sobre las proteínas, no permite su extracción con úrea, ya que se habrían formado enlaces en la metionina. A este nivel se tiene que romper estos enlaces y liberar los fragmentos de proteínas, que luego pueden ser solubilizados con úrea 6-10M.

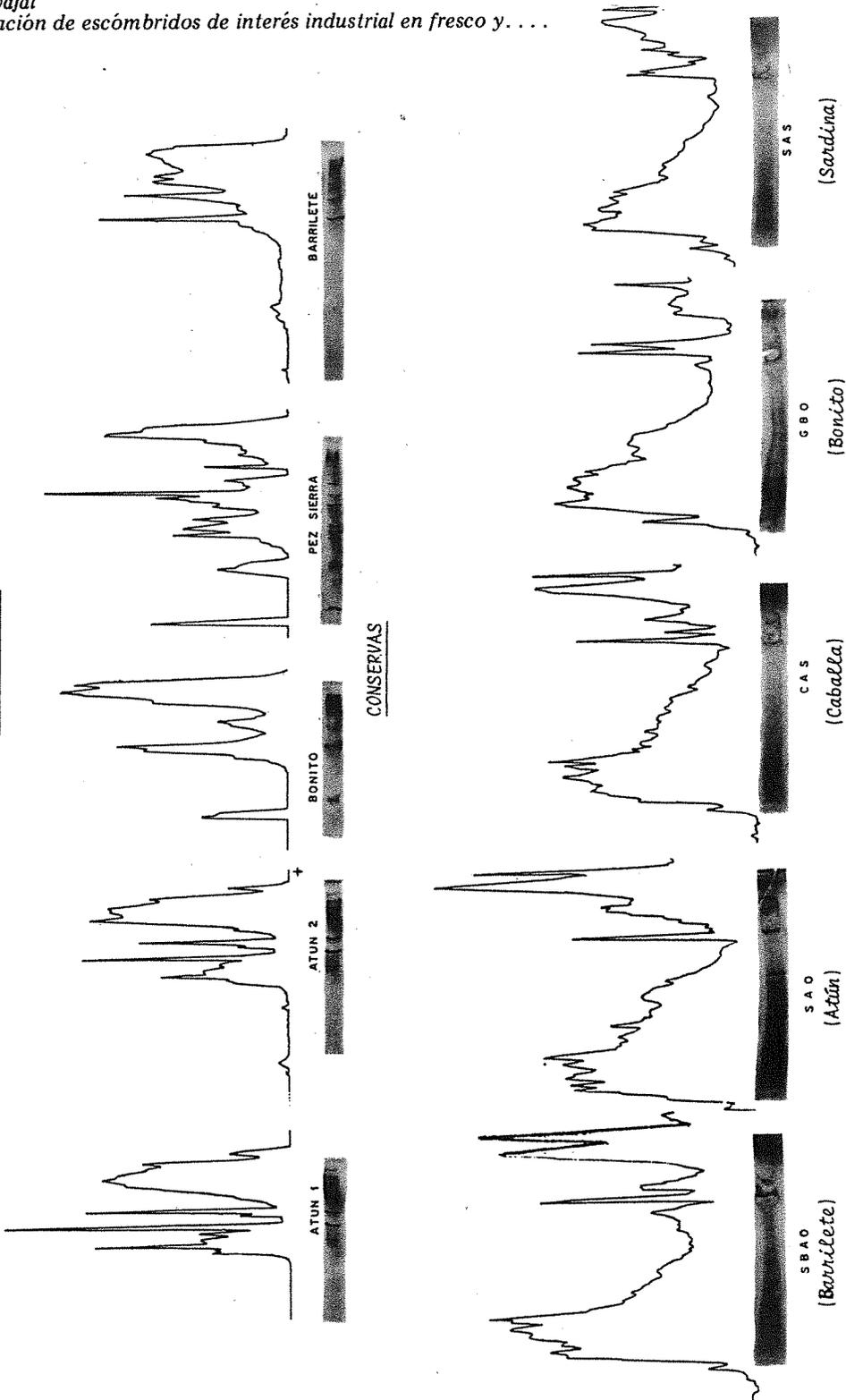
En los estudios de la estructura protéica se utilizan muchos compuestos químicos que actúan sobre diversos enlaces tales como el 2-mercaptoetanol y el sulfato de sodio dodecilo (enlaces S-S). Sólo el BrCN tiene la propiedad de unirse a los enlaces peptídicos de la metionina<sup>(8)</sup> y liberar dos moléculas de péptidos, que tienen el grupo carboxílico terminal en uno y el grupo amínico en el otro extremo.

Para el desarrollo de esta reacción se requiere un medio ácido por lo que se usa el ácido clorhídrico o el ácido fórmico, siendo el último más apropiado por su efecto protector y poder ser liberado por evaporación. Se tienen así péptidos, que luego de lavados y centrifugados pueden ser separados por isoelectrofocalización.

En la foto 2 se aprecia esta separación en geles de poliacrilamida, donde se pueden distinguir los patrones correspondientes a cada tipo de conservas. Algunas fracciones son características de algunas especies y son señaladas con flechas, tal es el caso del atún que presenta una fracción media que no la presentan las otras muestras. En el lado alcalino también el atún tiene fracciones distintas al resto, siendo el barrilete el único que se le asemeja. En cuanto al resto de fracciones, las diferencias con la caballa y el bonito son marcadas tanto en el número, intensidad y punto isoeléctrico. Esto corrobora que existe una especificidad genética aún a partir de la estructura primaria de la proteína, que permanece a pesar del efecto térmico.

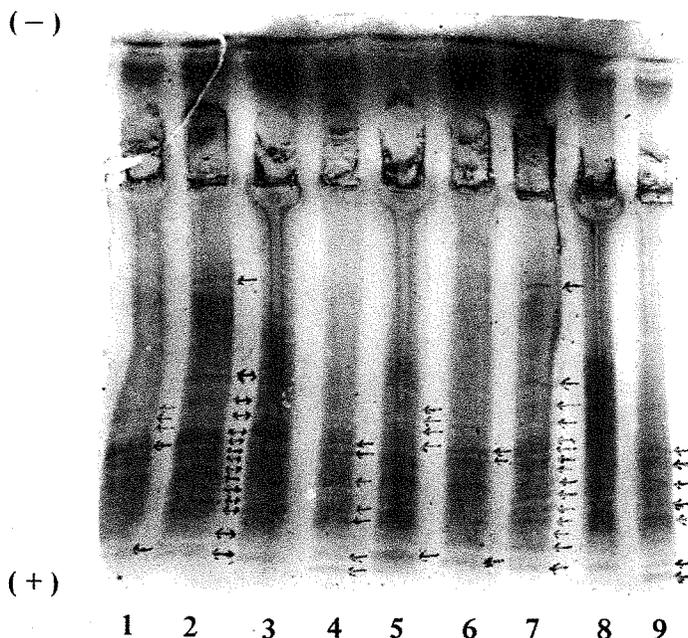
\* Referente a grados Fahrenheit  $250^{\circ} = 120^{\circ}\text{C}$ .

FIGURA N° 1. DENSITOGRAMAS  
PESCADO FRESCO



## FOTO 2. ELECTROFOREGRAMAS DE CONSERVAS

IEF en geles de poliacrilamida  
(reposo con BrCN - 24 hs)



1,5. Bonito desmenuzada en aceite, 2,7. Sólido de atún en aceite, 3,8. Sólido de barrilete en aceite, 4,9. Sardina en agua y sal, 6. Caballa en agua y sal.

### CONCLUSIONES

Al estado fresco, los patrones de migración de las proteínas sarcoplasmáticas del pescado estudiado, confirman la taxonomía de estas especies. Para estudios genéticos más especializados, su utilidad para definir con certeza variaciones intra-especie, es mayor conforme se obtenga mejor resolución en la separación electroforética. La isoelectrofocalización es por esta razón, el método más indicado, así, de este modo, el fraccionamiento de proteínas que han sido desnaturalizadas por medios físicos, sólo son identificables por pequeñas variaciones de pH y pI.

Se ha conseguido de esta manera reconocer las especies de gran interés industrial, tal como los escómbridos. Este interés es aún mayor cuando se trata de conservas, donde la inspección visual no permite diferenciar especies próximas.

Se tiene así también un método que aplicado al control bromatológico puede ayudar a establecer regulaciones comerciales, tanto para el comercio internacional, como para la defensa del consumidor. Gran variedad de alimentos marinos pueden ser controlados mediante una metodología estandarizada o normalizada.

Alimentos frescos y congelados, ya sean enteros o en porciones, no presentan dificultad, tampoco productos ahumados en frío. La dificultad es mayor conforme aumenta la temperatura de tratamiento, pero aún así, es factible obtener identificaciones válidas.

### AGRADECIMIENTO

El autor desea expresar su agradecimiento a todas las personas que apoyaron para la realización de este trabajo, representados por el Ing. L. Gushiken, Ing. J. Rochabrun y especialmente al Dr. K. Nagakura por parte de la Misión Japonesa.

### REFERENCIAS

1. Carvajal G. y Gallo M. (1984) – Electroforegramas de las proteínas de pescados peruanos. Bol Inv. Tec. Pes. Vol. 2 No. 1.
2. Chirichigno N. (1980) – Clave para identificar los peces marinos del Perú. Inst. del Mar. Informe 44. Callao.
3. Kokuryo H. and Seki N. (1980) – Degradation of fish myofibrillar proteins by heating at high temperatures. Bull. Japan Soc. Sci. Fish. 46 (4): 493-498.
4. Larson R.J. (1969) – Zone electrophoresis and its application to fishery product inspection. FAO FE: FIC 69/0/24.
5. Lundstrom R.C. and Roderick S.A. (1979) – Fish species identification by thin layer isoelectric focusing of sarcoplasmic proteins. Science Tools. 26 (3): 38-43.
6. Mackie I.M. (1972) – Some improvements in the polyacrylamide disc electrophoresis method of identifying the species of cooked fish. J. Ass. Pub. Anal. Vol. 10: 18-20.
7. Mackie I.M. (1972) – Identification of species of heat sterilized canned fish by polyacrylamide disc electrophoresis. Analyst. Vol. 97: 609-611.
8. Mackie I.M. (1980) – A review of some recent applications of electrophoresis and isoelectric-focusing in the identification of species of fish in fish and in fish products. Adv. in Food Sci. and Technol. 444-451.
9. Morel R.K. (1977) – Identification des espèces de poissons par electrofocalisation en gel de polyacrilamide. Science et Pêche Bull. Inst. Pech. Marit. 275.
10. Summer J.C. and Mealy S.W. (1983) – A survey of substitution of fish fillets in Melbourne. Food. Technol. (Australia) 35 (7): 332-334.
11. Yamada J. and Susuki A. (1982) – Identification of fish species by thin layer isoelectric-focusing of sarcoplasmic proteins. Bull. Japan Soc. Sci. Fish. 48 (1): 73-77.