

## Tesis de Posgrado

# Actividad proteolítica en la maduración de anchoíta salada

Perez Borla, Olinda

1985

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Perez Borla, Olinda. (1985). Actividad proteolítica en la maduración de anchoíta salada. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1907\\_PerezBorla.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1907_PerezBorla.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Perez Borla, Olinda. "Actividad proteolítica en la maduración de anchoíta salada". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1985.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1907\\_PerezBorla.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1907_PerezBorla.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ACTIVIDAD PROTEOLITICA EN LA MADURACION  
DE ANCHOITA SALADA

OLINDA PEREZ BORLA

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

1 9 8 5

Doc 1407  
p. 2

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JORGE J. SANCHEZ

A MIS PADRES

## AGRADEZCO

Al Dr. Jorge J. Sánchez por la comprensión con que guió mi trabajo y por su constante interés en mi formación científica.

A los Dres. Carlos E. Cardini y Raúl E. Truco por sus valiosos consejos y sugerencias.

A los compañeros que con su amistad y estímulo me ayudaron a seguir adelante.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, al Centro de Investigaciones de Tecnología Pesquera (INTI), al Instituto de Investigaciones Bioquímicas (Fundación Campomar), y al Centro de Estudios Farmacológicos y de Principios Naturales, que al darme acceso a becas, laboratorios y materiales, hicieron posible la realización de este trabajo.

## I N D I C E

	<u>Página</u>
ABREVIATURAS	ix
LISTA DE TABLAS	x
LISTA DE FIGURAS	xiii
INTRODUCCION	1
MATERIALES	
Pescado	24
Anchoíta salada	24
Reactivos	25
METODOS	
M 1. Toma de muestras	27
M 2. Preparación de extractos de tejido	
M 2.1. Extractos de anchoíta entera	27
M 2.2. Extractos de músculo y vísceras	28
M 3. Preparación de las proteínas miofi- brilares	29
M 4. Determinación de actividad proteo- lítica	
M 4.1. Medición de actividad proteo- lítica con caseína	30
M 4.2. Medición de actividad proteo- lítica con hemoglobina	30
M 4.3. Medición de actividad tipo tripsina	31
M 4.4. Medición de actividad tipo quimotripsina	31

M 4.5. Medición de la actividad proteolítica endógena y de la actividad autolítica	31
Expresión de la actividad proteolítica	32
Medición de las proteínas totales	32
M 4.6. Estudio electroforético de la actividad proteolítica endógena y de la actividad autolítica	33
M 5. Evaluación subjetiva del grado de maduración	34
RESULTADOS	
1 - Medida de actividad proteolítica de anchoíta parcialmente madura	36
2 - Efecto del tiempo de maduración sobre la capacidad y la actividad proteolítica de anchoíta	39
3 - Efecto del tiempo de maduración sobre la capacidad proteolítica de músculo de anchoíta	42
4 - Efecto del pH sobre la capacidad proteolítica del músculo de anchoíta fresca y en maduración	44
5 - Efecto del tiempo de maduración sobre la capacidad y la actividad proteolítica de las proteínas sarcoplasmáticas de músculo de anchoíta	44
6 - Efecto del tiempo de maduración sobre la capacidad y la actividad de las proteasas ácidas de músculo de anchoíta	52
7 - Efecto del tiempo de maduración sobre la capacidad y la actividad de las proteasas alcalinas de músculo de anchoíta	52

8 - Interacción entre las proteínas miofibrilares y sarcoplasmáticas durante la maduración	68
8.1 - Efecto del tiempo de maduración sobre la capacidad de interacción entre las proteínas sarcoplasmáticas y miofibrilares de músculo de anchoíta	73
8.2 - Efecto del tiempo de maduración sobre la capacidad de interacción entre las proteasas ácidas y las proteínas miofibrilares de músculo de anchoíta	73
8.3 - Efecto del tiempo de maduración sobre la interacción entre las proteasas alcalinas y las proteínas miofibrilares de músculo de anchoíta	75
8.4 - Interacción entre las proteínas miofibrilares y sarcoplasmáticas de músculo de anchoíta de distinto grado de maduración	77
9 - Capacidad proteolítica del músculo de anchoíta y grado de maduración	80
10 - Efecto del tiempo de maduración sobre la capacidad y la actividad proteolítica de vísceras de anchoíta	84
11 - Efecto del tiempo de maduración sobre la capacidad y la actividad de las proteasas ácidas de vísceras de anchoíta	85
12 - Efecto del tiempo de maduración sobre la capacidad y la actividad de las pro-	



	teasas alcalinas de vísceras de anchoíta	90
13 -	Cambios en la composición de las miofibrillas de anchoíta durante la maduración	96
14 -	Cambios en las proteínas sarcoplasmáticas de músculo de anchoíta durante la maduración	103
15 -	Interacción de las proteínas miofibrilares y sarcoplasmáticas de músculo de anchoíta	105
16 -	Interacción de las proteínas miofibrilares y las proteasas de vísceras de anchoíta	107
	DISCUSION	110
	RESUMEN	117
	BIBLIOGRAFIA	119

ABREVIATURAS

EDTA: etilen diamin tetraacetato sódico

TCA: ácido tricloroacético

SDS: dodecil sulfato de sodio

Tris: Tris(hidroximetil) amino metano

LISTA DE TABLAS

	<u>Página</u>
I - Composición aproximada de la sal de roca por análisis espectrográfico	8
II - Valores analíticos promedio de la sal solar	9
III - Proteínas miofibrilares de músculo esquelético	16
IV - Actividad proteolítica endógena de anchoíta entera parcialmente madura	37
V - Efecto del tiempo de maduración sobre la capacidad y la actividad caseinolítica de anchoíta entera	41
VI - Efecto del tiempo de maduración sobre la capacidad proteolítica endógena de músculo de anchoíta	43
VII - Inhibición por ClNa 15% de la capacidad autolítica de las proteínas sarcoplasmáticas de músculo de anchoíta a través de la maduración	53
VIII - Inhibición por ClNa 15% de la capacidad autolítica de las proteínas sarcoplasmáticas de músculo de anchoíta, medida a pH alcalino a través de la maduración	63
IX - Inhibición por ClNa 15% de la capa-	

	acidad caseinolítica alcalina de la fracción sarcoplasmática de músculo de anchoíta a través de la maduración	67
X	- Autodegradación de las proteínas miofibrilares de anchoíta a través de la maduración	69
XI	- Autodegradación de las proteínas miofibrilares de anchoíta medida a pH alcalino a través de la maduración	70
XII	- Efecto del tiempo de maduración sobre la capacidad proteolítica endógena de la fracción sarcoplasmática de músculo de anchoíta (Capacidad de interacción)	74
XIII	- Efecto del tiempo de maduración sobre: a- la capacidad, y b- la actividad proteolítica endógenas de la fracción sarcoplasmática de músculo de anchoíta, medidas a pH alcalino (Capacidad de interacción e interacción)	76
XIV	- Capacidad de interacción de las proteínas miofibrilares y sarcoplasmáticas de músculo de anchoíta de distinto grado de maduración	78
XV	- Inhibición por ClNa 15% de la capacidad autolítica de las vísceras de anchoíta a través de la maduración	87

- XVI - Inhibición por ClNa 15% de la capacidad caseinolítica de las vísceras de anchoíta a través de la maduración 89
- XVII - Inhibición por ClNa 15% de la capacidad autolítica de las vísceras de anchoíta, medida a pH alcalino a través de la maduración 92
- XVIII - Inhibición por ClNa 15% de la capacidad caseinolítica de las vísceras de anchoíta, medida a pH alcalino a través de la maduración 97

LISTA DE FIGURAS

	<u>Página</u>
1 - Actividad proteolítica de anchoíta entera parcialmente madura.	38
2 - Efecto del tiempo de maduración sobre la capacidad y la actividad proteolítica endógena de anchoíta entera	40
3 - Efecto del pH sobre la capacidad proteolítica endógena de músculo de anchoíta fresca	45
4 - Efecto del pH sobre la capacidad proteolítica endógena de músculo de anchoíta parcialmente madura	46
5 - Efecto del pH sobre la capacidad proteolítica endógena de músculo de anchoíta fresca y parcialmente madura	47
6 - Efecto del pH sobre la capacidad proteolítica de músculo de anchoíta fresca y parcialmente madura sobre hemoglobina	48
7 - Efecto del tiempo de maduración sobre la capacidad y la actividad autolítica de las proteínas sarcoplasmáticas de músculo de anchoíta (campana 1980-1981)	49
8 - Efecto del tiempo de maduración sobre la capacidad y la actividad autolítica de las proteínas sarcoplasmáticas de músculo de anchoíta (campana 1982-1983)	50

- 9 - Efecto del tiempo de maduración sobre la capacidad autolítica de las proteínas sarcoplasmáticas de músculo de anchoíta (campaña 1979-1980) 51
- 10 - Efecto del tiempo de maduración sobre la capacidad y la actividad autolítica de las proteínas sarcoplasmáticas de músculo de anchoíta, medidas a pH ácido (campaña 1980-1981) 54
- 11 - Efecto del tiempo de maduración sobre la capacidad y la actividad autolítica de las proteínas sarcoplasmáticas de músculo de anchoíta, medidas a pH ácido (campaña 1982-1983) 55
- 12 - Efecto del tiempo de maduración sobre la capacidad autolítica de las proteínas sarcoplasmáticas de músculo de anchoíta, medida a pH ácido (campaña 1979-1980) 55
- 13 - Efecto del tiempo de maduración sobre la capacidad proteolítica de la fracción sarcoplasmática de músculo de anchoíta, medida sobre hemoglobina a pH ácido (campaña 1980-1981) 56
- 14 - Efecto del tiempo de maduración sobre la capacidad proteolítica de la fracción sarcoplasmática de músculo de anchoíta, medida sobre hemoglobina a pH ácido (campaña 1982-1983) 57
- 15 - Efecto del tiempo de maduración sobre la capacidad proteolítica de la fracción sarcoplasmática de músculo

	de anchoíta, medida sobre hemoglobina a pH ácido (campaña 1979-1980)	58
16 -	Efecto del tiempo de maduración sobre la capacidad y la actividad autolítica de las proteínas sarcoplasmáticas de músculo de anchoíta, medidas a pH alcalino (campaña 1980-1981)	60
17 -	Efecto del tiempo de maduración sobre la capacidad y la actividad autolítica de las proteínas sarcoplasmáticas de músculo de anchoíta, medidas a pH alcalino (campaña 1982-1983)	61
18 -	Efecto del tiempo de maduración sobre la capacidad autolítica de las proteínas sarcoplasmáticas de músculo de anchoíta, medida a pH alcalino (campaña 1979-1980)	62
19 -	Efecto del tiempo de maduración sobre la capacidad y la actividad de tipo quimotripsina de la fracción sarcoplasmática de músculo de anchoíta	64
20 -	Efecto del tiempo de maduración sobre la capacidad y la actividad caseinolítica de la fracción sarcoplasmática de músculo de anchoíta, medidas a pH alcalino	65
21 -	Capacidad autolítica de las proteínas de músculo y grado de maduración (campaña 1980-1981)	81
22 -	Capacidad autolítica de las proteínas de músculo y grado de maduración (campaña 1979-1980)	82



23 - Capacidad autolítica de las proteínas de músculo y grado de maduración (campaña 1982-1983)	84
24 - Efecto del tiempo de maduración sobre la capacidad y la actividad autolítica de vísceras de anchoíta	86
25 - Efecto del tiempo de maduración sobre la capacidad y la actividad caseinolítica de vísceras de anchoíta	88
26 - Efecto del tiempo de maduración sobre la capacidad y la actividad autolítica de vísceras de anchoíta, medidas a pH alcalino	91
27 - Efecto del tiempo de maduración sobre la capacidad y la actividad caseinolítica de vísceras de anchoíta, medidas a pH alcalino	93
28 - Efecto del tiempo de maduración sobre la capacidad y la actividad de tipo tripsina de vísceras de anchoíta	94
29 - Efecto del tiempo de maduración sobre la capacidad y la actividad de tipo quimotripsina de vísceras de anchoíta	95
30 - Cambios en la composición de las miofibrillas durante la maduración	98

31 - Proteínas totales y miofibrilares de músculo fresco y presalado	100
32 - Proteínas miofibrilares de músculo fresco y presalado fuera de la fracción miofibrilar	101
33 - Secuencia de separación de las miofibrillas de músculo fresco y en maduración	102
34 - Cambios en la composición de las proteínas sarcoplasmáticas durante la maduración	104
35 - Interacción de las proteínas miofibrilares y sarcoplasmáticas de músculo de anchoíta	106
36 - Interacción de las proteínas miofibrilares y las proteasas de vísceras de anchoíta	108

INTRODUCCION

En todo organismo vivo se desarrollan procesos de síntesis y degradación ordenados según las necesidades del mismo. Las reacciones químicas que se producen durante esos procesos son controladas, en su gran mayoría, por enzimas que regulan las velocidades de reacción de modo de mantener la organización del ser vivo.

Esas enzimas están compartimentalizadas en sistemas, órganos, células y partículas subcelulares. Además en los organismos superiores es común la coexistencia con microorganismos que pueden ser: simbiotes, parásitos o contaminantes (bacteriosis, virosis); todos ellos aportan su dotación de endo y exoenzimas, y están acotados en su desarrollo por los mecanismos de control de que el organismo superior vivo dispone.

Después de la muerte esa organización cesa, no existe ya control sobre los microorganismos, la compartimentalización se deteriora o desaparece y se liberan las enzimas, dando así inicio a procesos degradativos indiscriminados.

En nuestro ecosistema la muerte implica también ingresar a la cadena trófica. El hombre en su carácter de eslabón superior de esa cadena ha procurado limitar los desordenados procesos degradativos post-mortem, a fin de evitar que el organismo, ahora alimento, se deteriore y resulte desagradable o nocivo para su salud. Los métodos que ha empleado para ello pueden designarse en forma genérica como métodos de conservación.

Varían en eficacia y sofisticación, pudiendo mencionar algunos desde los más primitivos a los más modernos:

- tratamiento térmico: cocción, esterilización, etc.
- agregado de aditivos: sales, ácidos, azúcares, etc.
- deshidratación
- frío
- irradiación
- otros

Hesseltine y Wang (1) piensan que el hombre conoció primero el secado y ahumado de carnes, y que más tarde descubrió la utilidad de la sal en combinación con aquellos y con la fermentación. Ciertamente hay indicios concretos que el agregado de sal a los alimentos a fin de extender su tiempo de conservación, se practica desde la más remota antigüedad; siendo un ejemplo la producción de salsa de soja desde hace más de 3000 años (2), mencionada en el libro de Chau Lai escrito 1000 años A.C.

Desde entonces la salazón se ha empleado extensamente, en particular con los productos de la pesca, ya que es bien conocido que éstos si no son tratados en forma adecuada, sufren rápido deterioro al punto que en zonas cálidas pueden estar afectados antes de llegar a tierra para su consumo.

La variedad de especies que se preserva con sal es muy amplia y los productos obtenidos según la región

muy diversos, ellos se han ido incorporando paulatinamente a la dieta, integrándose como parte de los hábitos alimentarios en la tradición de cada pueblo. Así por ejemplo en Europa Central es muy común el consumo de marinados de pescado (salado, sazonado y cocido) y de bacalao salado y seco. En la península escandinava se agregan otros productos: gaffelbitar, surstroming, anchovy, rakorret, etc., que se obtienen mezclando sal, ácido acético, azúcar y o especies, y dejándolos varias semanas en contacto o no con la salmuera que se forma. En todo el sudeste asiático y especialmente en Japón son muy populares los productos de pescado, entre ellos las salsas y pastas como el nuoc-mam o el bagoon, obtenidos por fermentación, cocción y o secado del pescado adicionado con sal, especies, azúcares, almidón, etc.. Más familiares para nosotros son los productos de las regiones del Mar Mediterráneo, en particular la anchoíta salada que se prepara a partir de *Engraulis encrasi-cholus* Linnaeus, pez perteneciente a la familia de los cupleidos. Todos los métodos conocidos para prepararla son empíricos y se han ido transmitiendo de generación en generación hasta el presente. La siguiente puede considerarse una descripción global del proceso (3).

"Se utilizan anchoítas de tamaño correspondiente a 35-40 piezas por Kg con el mayor contenido graso posible (ésto depende de la época de captura). Una vez en

la fábrica se las mezcla enteras con sal y se las coloca en grandes bateas de concreto, donde permanecen 2-3 días, a esta operación se la llama presalado. Luego se las descabeza manualmente, de modo que al mismo tiempo se retiran parte de las vísceras. Se las acomoda en recipientes sobre un lecho de sal de aproximadamente 5mm, paralelas entre sí; al completar la primera capa se espolvorea con sal y se agrega otra capa de pescados ubicados en ángulo recto con la anterior, y así sucesivamente hasta llenarlo, colocando una última capa de sal y sobre ella una tapa de madera que se carga con pesas, generalmente bloques de concreto, estimándose necesarios 5 a 6 Kg por cada 10 Kg de anchoíta. Los recipientes pueden ser latas para 20 Kg o barriles de madera para 50, 100, ó 200 Kg.

Dos o tres días mas tarde el pescado ha disminuído en volumen considerablemente, entonces se saca la capa superior de sal rellenando los recipientes con pescado y sal, agregando por último la tapa de madera y los bloques.

Los fluídos expulsados del pescado y la salmuera que rebalsan, (las tapas son solo una cubierta, no hermética) se recogen y utilizan para regar las latas durante el proceso, facilitando la eliminación de la sangre y la grasa removidas de los tejidos por acción conjunta de la sal y la prensa. Se considera que la reco-

lección y reciclaje de estos líquidos de lavado tiene mucha influencia en la calidad del producto final. Si esta salmuera es insuficiente se usa salmuera fresca saturada (25%). El tratamiento continúa a temperatura ambiente por 6 a 7 meses o más, hasta que la apariencia, olor y sabor del pescado coincidan con las características propias del producto final".

En estas condiciones la anchoíta puede comercializarse entera, directamente en sal, o fileteada y envasada con aceite sin esterilizar.

Estos procesos en los que las características organolépticas del material crudo varían debido a la salida de agua desde los tejidos, la penetración de sal en ellos y el transcurso del tiempo, se denominan maduración. Son una de las muchas formas de curado a las que se puede someter una carne, entendiéndose por curado (4) a las distintas combinaciones de deshidratación con ahumado o adobado.

Los factores que gobiernan la evolución correcta de la maduración son muchos, y conforman un complejo mosaico de parámetros interrelacionados. Entre otros podemos citar: propiedades de la materia prima, características de la sal, condiciones físicas del proceso: prensa, temperatura, etc..

Según varios autores además del grado de frescura del pescado, su contenido graso es muy importante (5)(6)



(7) (8), ya sea desde el punto de vista de la textura, sabor y aroma (9), como fisicoquímico: a mayor contenido graso menor velocidad de penetración de sal (4) (8). Los productos madurados solo se fabrican con pescado graso, y aunque la oxidación lipídica es un serio problema económico e higiénico sanitario, se lo restringe eficazmente manteniendo en anaerobiosis el interior de las latas.

Hay muchas otras propiedades del pescado que sin duda modifican el proceso de maduración, por ejemplo: para las anchoítas saladas al estilo italiano a partir de pescado capturado en primavera, el proceso se completa en cuatro meses, mientras que con pescado de otoño se necesitan diez meses (10). El arenque salado tipo matje solo se puede fabricar durante una corta temporada anual que coincide con el período de madurez sexual del pez (11). Hasta ahora los conocimientos sobre las características adecuadas de la materia prima, sus relaciones y consecuencias son insuficientes (9).

Para la preservación del pescado que se comercializa se emplea sal de roca proveniente de minas, o sal solar obtenida del mar. Tabla I (12). Tabla II (13).

Ronsivalli (4) y Tressler (14) opinan que la composición de la sal es uno de los principales determinantes de su velocidad de penetración en la carne. Este último investigador basándose en experiencias que realizó con gádidos concluyó que las impurezas mas significa-

TABLA I: COMPOSICION APROXIMADA DE LA SAL DE ROCA  
POR ANALISIS ESPECTROGRAFICO (Instituto Nacional de Tec-  
nología Industrial)

Componente	Muestra N°1 (g/100g)	Muestra N°2 (g/100g)
Aluminio	0,005 (*)	0,005 (*)
Calcio	0,1	0,5
Cobre	0,001	0,0005
Hierro	0,03	0,005
Magnesio	0,03	0,03
Plata	0,001	0,0005
Silicio	0,03	0,007
Sodio	componente principal	componente principal

(\*) Presencia dudosa por posibles interferencias

TABLA II: VALORES ANALITICOS PROMEDIO DE LA SAL  
SOLAR (Fisheries Research Board of Canada. Bulletin N°112)

Componente	Región: América del Norte (%)	Región: Mar Me- diterráneo (%)
Agua	2,94	2,21
Cloruro de sodio	96,5	98,0
Cloruro de calcio	0,82	0,09
Sulfato de calcio	1,45	0,68
Cloruro de magnesio	0,82	0,26
Sulfato de magnesio	0,27	0,30
Insoluble	0,10	0,38

tivas de la sal, los iones  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  disminuyen la velocidad de penetración y afectan el color y la consistencia del pescado, dándole también sabor amargo. El cobre, un impurificante menor, también es indeseado, ya que cataliza la decoloración del producto. Si bien algunos industriales atribuyen ventajas particulares a la presencia de ciertos iones (el calcio, por ejemplo, hace la carne más blanca y más consistente, lo que es positivo para algunos productos y negativo para otros), la sal pura es más controlable y de calidad superior ya que no presenta riesgo de efectos extraños.

Para el salado también se atribuye importancia a la granulometría de la sal, y aunque investigadores como Bowry, que trabajó en salado de arenque (15) la han negado, otros (8) justifican esa afirmación empírica; según ellos una sal muy fina se disuelve rápido y da velocidad inicial de penetración alta, coagulando y deshidratando excesivamente las capas periféricas del pescado, convirtiéndolas en una barrera que retarda la penetración, resultando la velocidad final menor que la conveniente. En contrapartida si se usa sal gruesa, de disolución lenta, la penetración será perjudicialmente pobre, permitiendo la proliferación bacteriana.

Otra de las propiedades de la sal que se deben considerar es su calidad bacteriológica; se ha encontrado (16) que la sal de mar contiene en el orden de  $10^5$  micro-

organismos por gramo, y que la sal mineral está mucho menos contaminada en lo que se refiere a bacterias, mientras que ambas tienen el mismo nivel de hongos, en el orden de  $10^4$  por gramo. En los primeros estadíos del salado esta microflora se suma a la original del pescado (bacterias marinas del tipo psicrófilo y mesófilo: florobacter, achromobacter, pseudomonas) y a la que tuvo acceso a él durante el manipuleo; pero a diferencia de ellas que mueren o son inhibidas por la alta concentración de sal, puede sobrevivir durante la maduración, ya que son halófilas obligadas o facultativas. Investigaciones realizadas en pescado salado por Tropa (17) y Erichsen (18) comprobaron la existencia de algunas especies microbianas como micrococos y pediococos que no son patógenas, pero pueden disminuir la calidad del producto. Una de las alteraciones más conocidas es la coloración roja en el pescado, producida por bacterias halófilas asociadas solo a la sal solar y no a la sal de roca(19) (20).

Durante la maduración la diferencia de presión osmótica entre los tejidos y el medio a causa de la alta concentración de sal en éste, no es el único factor deshidratante, pues la aplicación de prensa complementa significativamente ese efecto produciendo también remoción de grasa, sangre y aire, contribuyendo a mantener baja la actividad acuosa del pescado y en anaerobiosis el sistema.

A veces la magnitud de la prensa se varía durante el proceso aumentándola o disminuyéndola, pero no hay reglas precisas para ello (3) (21).

En lo que concierne a la influencia de la temperatura en la maduración existen opiniones divergentes. Las temperaturas empleadas habitualmente oscilan entre 0°C y 37°C. En general se acepta que a mayor temperatura, mayor velocidad de penetración de sal, pero también mayor posibilidad de desarrollo microbiano (4), por ello los escandinavos prefieren trabajar entre 0°C y 4°C (5) (6). Charles Lepierre y Mercier Marques (22) indican la conveniencia de realizar el proceso a temperatura ambiente cuando ésta varía entre 15°C y 30°C, pues los productos obtenidos a temperatura constante de 37°C y 50°C eran de calidad inferior o inaceptables. Más recientemente (8) (10) experiencias de maduración a temperatura controlada muestran que entre 18°C y 20°C el proceso es lento pero asegura la obtención de buenos resultados.

La información precedente proviene de estudios realizados sobre diversas especies saladas con métodos distintos, es de caracter fragmentario y a veces contradictoria, y no permite elaborar aún una explicación completa del proceso de maduración. Este desconocimiento, agregado a la aparición y constante perfeccionamiento de las técnicas de preservación térmica (cánning) y por frío, hicieron que el salado que, en el siglo pasado y principios de éste, tanto

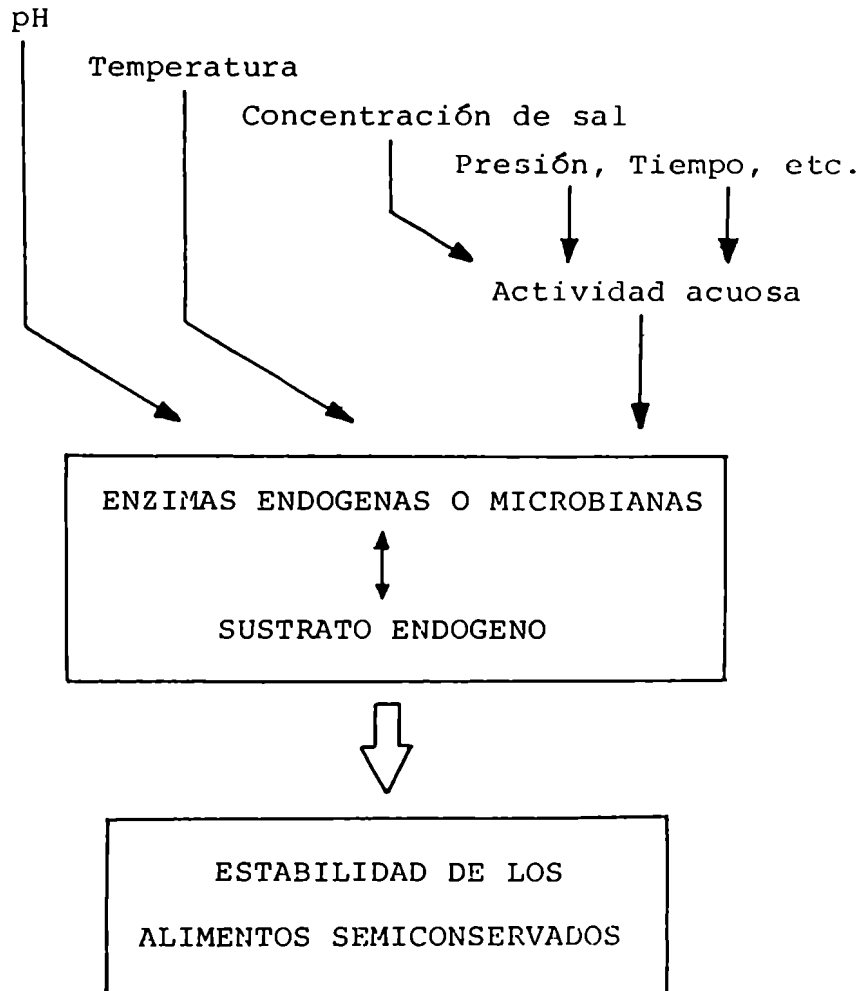
contribuyó al desarrollo de la industria pesquera, perdiendo importancia. Así particularmente en los países desarrollados, quedó relegado, llegándose a utilizar solo para aumentar la aceptación del sabor del pescado (23) o como aderezo de otros alimentos.

En la segunda mitad de este siglo la explosión demográfica y luego la crisis energética agudizaron la necesidad de un uso más efectivo de los recursos proteicos, en particular de aquellos relativamente menos explotados: los del mar. Se produce entonces una reactualización del interés en los viejos métodos de preservación por salado debido a su simplicidad y bajo consumo de energía. Estos métodos se presentan como los más adecuados en países con pocos recursos para desarrollar una buena cadena de frío o importantes plantas procesadoras.

Pero el salado continúa siendo hoy un proceso tan artesanal como en sus comienzos y es necesario mejorar la tecnología para llegar a una utilización más eficiente y económica del recurso natural.

Los productos salados y madurados se consideran alimentos de humedad intermedia cuya actividad acuosa está entre 0,6 y 0,85. En ellos la sal por disminución de la actividad acuosa y efecto osmótico ha producido una selección de microorganismos, impidiendo el crecimiento de algunos y favoreciendo el de otros. A estos productos se los clasifica como semiconservas, ya que no han sido sometidos

a tratamiento térmico alguno, y su estabilidad como materia comestible depende de un delicado balance de factores que se apoya principalmente en el control de las reacciones enzimáticas del sistema:



Numerosos trabajos y muchas controversias se han desarrollado y desarrollan sobre el origen de esas enzimas y el rol que cumplen respecto de la estabilidad y los caracteres organolépticos del producto. A pesar de ello hay una considerable falta de datos sobre la bioquí-



mica de los procesos que se desarrollan, encontrándose en la literatura informes a veces contradictorios.

Dado que estos son alimentos de alto contenido proteico es particularmente importante determinar las modificaciones de las proteínas debidas al proceso de conservación. Siendo las proteínas miofibrilares el 40% de las proteínas totales y el 65% de las proteínas del tejido muscular del pescado (24); un dato de interés para la comprensión de los cambios post-mortem en el tejido muscular es el conocimiento de la estructura interna y de la composición de la fibra muscular estriada. En la Tabla III se ve la composición de la fibra en carnes rojas, según Hamm (25).

Investigaciones realizadas en Noruega sobre arenque y sardina en maduración (7) (26), en Filipinas sobre fermentación de arenque (27) y en nuestro país con anchoíta salada (28) mostraron que existe descomposición de las proteínas que se evidencia por un marcado aumento de los productos de degradación: péptidos, bases volátiles, aminoácidos, aminos, etc.. Algunos autores (7) (8) (29) consideran que esas modificaciones ocurren principalmente por vía enzimática. Como punto de referencia para este tema podrían tomarse los estudios realizados sobre degradación enzimática de proteínas durante el deterioro de pescado y también su mecanismo de "turn-over" in vivo.

TABLA III: PROTEINAS MIOFIBRILARES DE MUSCULO ES-  
QUELETICO (Hamm, R.; Fleischwirtschaft)

Nombre	Peso Molecular	% de la miofibrilla	Fecha de identificación en músculo
Miosina	470.000	50 - 55	1941
Actina	46.000	21 - 23	1941
Tropomiosina	70.000	6	1946
Troponina	70.500	6	1965
Actinina	180.000	1	1965
Proteína C	140.000	2 - 3	1971
Proteína M	88.000	3	1968
Desmina	55.000	0,4	1978
Conectina	----	5	1976

Las proteasas ácidas fueron las únicas conocidas en pescado antes de 1960. En 1965 Siebert (30) purificó una catepsina de músculo de bacalao a la que consideró causal de los primeros estadios del deterioro del músculo de pescado, y que al igual que las catepsinas D de otros tejidos animales se encuentra en los lisosomas (31). Estas enzimas promoverían el crecimiento bacteriano proveyendo nutrientes esenciales tales como productos de degradación tisular de bajo peso molecular (32). Algunas exopeptidasas como las catepsinas A, B<sub>2</sub>, C, etc. degradan parcialmente las moléculas de proteína, pero una digestión rápida y extensiva ocurre solo si actúan endopeptidasas. Reddi (33) en lenguado de invierno y Doke (34) en *Tilapia mosambica*, informaron hidrólisis de la fracción sarcoplasmática de las proteínas musculares por la fracción lisosomal en condiciones óptimas de pH ácido. Posteriormente Schwartz y Bird (35) demostraron que las catepsinas B y C (endopeptidasas lisosomales) purificadas de músculo esquelético de rata, degradaban las cadenas pesadas de miosina. Okitani (36) purificó de músculo esquelético de conejo otra endopeptidasa ácida: la catepsina L que degrada cadenas pesadas de miosina,  $\alpha$  actinina, actina, tropomiosinas T e I. Sin embargo el pH de músculo de pescado no disminuye mucho después de la muerte, solo llega aproximadamente a 6,3 - 6,6, lo que dificulta relacionar

la acción de las proteasas ácidas lisosomales con la autólisis como tradicionalmente se hizo, en parte por desconocimiento de otras enzimas y también porque en las carnes de animales domésticos el pH post-mortem es menor que 6,0.

La discusión sobre las enzimas involucradas en la degradación proteica intracelular de músculo u otros tejidos se ha desarrollado durante años. Aunque el lisosoma indudablemente está involucrado en el catabolismo proteico, nunca fue posible visualizar miofibrillas dentro de la vacuola lisosomal. Ultimamente por medio de agentes lisosomotrópicos, que alteran el pH intralisosomal y, o inhiben algunas de sus proteasas, se ha confirmado la existencia de otras etapas en la ruta del catabolismo de las proteínas intracelulares (37), ya que por ejemplo la ruptura de miosina no se afecta por la aplicación de uno de esos agentes: la cloroquina; por lo tanto parece que, como mínimo, el paso inicial en la degradación de miosina en músculo ocurre fuera del lisosoma (38).

También el conocimiento de otras enzimas en el tejido muscular ha contribuido a evidenciar que no es posible limitar el estudio de la proteólisis muscular intracelular a la región ácida. Hasta el presente el presente las proteasas aisladas de músculo activas a pH básico incluyen: una proteasa alcalina informada por

Noguchi y Kandatsu (39); una proteasa alcalina aparentemente unida a miofibrillas informada por Mayer y colaboradores (40), y una serín proteasa activa a pH suavemente alcalino encontrada por Katunuma (41) y estudiada por Yasogawa (42). Posteriormente Woodbury (43) y colaboradores presentaron evidencias de que esas enzimas se originan en mastocitos antes que en células musculares. Makinodan e Ikeda (44) encontraron y caracterizaron una proteasa alcalina en músculo de carpa, cuyo pH óptimo es 8,0 y temperatura óptima 60°C a 65°C, no exhibiendo actividad alguna por debajo de 55°C. También Tzong-Shin Lin y Lanier (45) purificaron parcialmente una proteasa alcalina en músculo esquelético de Atlantic croaker, que degrada actomiosina de pescado in vitro entre 50°C y 60°C.

Otra proteasa de músculo esquelético de conejo, con un pH óptimo 7,5, fue caracterizada primero por Krebs (46) (47) y después purificada a homogeneidad por Dayton (48) (49) en músculo de pollo; se la conoce como proteasa neutra activada por calcio: CANP (Ca activated neutral protease), y también como factor sarcoplasmático calcio activado: CASF (Ca activated sarcoplasmic factor), o factor calcio activado: CAF (Ca activated factor), o calpaína. Existen dos tipos de CANP: mCANP y  $\mu$ CANP, que requieren para activarse cantidades milimolares y micromolares de calcio respectivamente;

ambas formas se han encontrado en varios tejidos de distintas especies, se sabe que in vivo el tipo molecular mas abundante es la mCANP. Dado que la concentración intracelular de calcio en músculo es del orden micromolar, la forma activa es la  $\mu$ CANP (50). El conocimiento del mecanismo de activación de la forma mCANP in vivo es importante para comprender la relación de la estructura de esta proteasa y su rol fisiológico. Actualmente está en discusión la idea que la mCANP es precursora de la  $\mu$ CANP y que la conversión puede ocurrir por autólisis controlada de la primera (51). La CANP es la primera proteasa muscular que tiene efecto demostrable sobre las miofibrillas, in vitro, al pH fisiológico (52); degrada la línea Z de las miofibrillas, hidroliza tropomiosina, troponinas T e I, y la proteína C. El producto principal de degradación de la proteína C por CANP es un polipéptido de 30.000 Dt que aparece tambien durante el almacenamiento post-mortem de las carnes. Esta proteasa no afecta a la miosina, actina,  $\alpha$  actinina y troponina C (53). En 1983 Tanada y colaboradores (54) purificaron la CANP de músculo de carpa de peso molecular 80.000, pH óptimo 7,0 y propiedades generales coincidentes con las CANP de pollo, cerdo, conejo y vaca. Según los según los autores sería una proteasa semejante a la mCANP, y continúan desarrollando estudios sobre la presencia de la forma  $\mu$ CANP en músculo de carpa.

Es posible que las proteasas mencionadas intervengan junto a otras en alguna forma concertada, no conocida todavía, diagramando un sistema o sistemas degradativos en el turn-over proteico in vivo y en el deterioro post-mortem del músculo esquelético.

Desde el punto de vista de la conservación de alimentos la factibilidad de que durante la maduración de Engraulis anchoíta salada ocurran reacciones de este tipo y su secuencia no se conoce.

Si además de lo expuesto se toma en consideración que:

1)- La actividad de las enzimas depende de la especie y de las condiciones fisiológicas del (alimentación, grado de desarrollo, época de captura) (55) (56),

2)- El pescado en maduración es un producto de humedad y la disminución de actividad de agua se asocia al control de las actividades enzimáticas en forma disímil, por ejemplo: para valores de actividad de agua entre 0,6 y 0,85 la oxidación lipídica es mayor que entre 0,3 y 0,5 (57); mientras que la polifenol oxidasa está fuertemente inhibida (58),

es evidente que falta sustentación para extrapolar la diversa información disponible a la resolución de los problemas ligados con la producción de semiconservas, y que la explicación completa del fenómeno de maduración de anchoíta salada requiere un estudio previo de la especie y el proceso particular de conserva-

ción.

El objetivo de este trabajo es conocer el comportamiento de la proteólisis enzimática durante la maduración. Este conocimiento podría contribuir a la futura optimización del proceso, ya que a través de la implementación de controles científicamente estandarizados y del acortamiento de los tiempos de producción se lograría aumentar la eficiencia y disminuir los costos, minimizando los riesgos de perjudicar la calidad, la estabilidad y los caracteres organolépticos del producto artesanal.

En función de ese interés se desarrolló el siguiente conjunto de experiencias:

a - determinación de la existencia de enzimas proteolíticas activas en el pescado en maduración.

b - observación de posibles cambios en esas actividades durante la maduración.

c - estudio del efecto del pH y la concentración del cloruro de sodio sobre esas actividades.

d - posible degradación enzimática de la fracción miofibrilar por acción de la fracción sarcoplasmática.

e - observación de la evolución de la degradación de las proteínas musculares con el tiempo de maduración.



MATERIALES

### PESCADO

Se utilizó anchoíta, Engraulis anchoíta, capturada en la plataforma continental argentina entre 37,4° latitud sur y 28,8° latitud sur durante las campañas de pesca primavera, meses de septiembre a diciembre. Los ensayos de laboratorio se efectuaron inmediatamente después del arribo a tierra, esto es 6 a 8 horas posteriores a la captura; o después de no mas de 24 horas en hielo.

### ANCHOITA SALADA

Las experiencias se realizaron sobre muestras tomadas en distintos estadios de maduración, de latas de 10 kg de anchoíta salada, preparada:

1- a escala industrial en saladeros de la zona, (campañas 1977 - 1978 y 1978 - 1979)

2- en planta piloto reproduciendo el proceso industrial: la materia prima fue pescado de un peso promedio de 35 a 40 piezas por kg. Luego de un presalado de 24 horas en salmuera saturada, se lo descabezó y evisceró parcialmente en forma manual, y se lo dispuso en latas de 10 kg, en capas alternadas con sal de roca de grano entrefino. Durante los primeros 30 días de maduración se aplicó una prensa de  $200 \text{ g/cm}^2$ , disminuyéndola después a  $150 \text{ g/cm}^2$ . El proceso se desarrolló a temperatura ambiente, determinando su finalización per-

sonal especializado en la evaluación de los caracteres organolépticos del producto.

REACTIVOS

El cloruro de sodio y la caseína tipo Hammarsten se obtuvieron de Merck, la hemoglobina de Merck o Difco. El benzoil arginin etil éster (BAEE), el benzoil tiro-sin etil éster (BTEE) y la seroalbúmina bovina fueron adquiridos a Sigma. La acrilamida se obtuvo de Merck y Fluka y la bisacrilamida de Eastman Kodak y Sigma. Todos los demás reactivos fueron de grado analítico.

METODOS

### M1 . TOMA DE MUESTRAS

Durante las campañas 1977-1978, 1978-1979, 1979-1980, 1980-1981 y 1982-1983 se tomaron muestras de anchoíta a medida que se desarrollaba la maduración, relevando los sucesivos estadios del proceso, a intervalos regulares desde que se inicia (tiempo cero, tomando pescado en las condiciones que llega a la planta) y hasta que ha adquirido los caracteres organolépticos del producto maduro, esto es generalmente 8 a 9 meses después. En todos los casos se muestreó cada lata de 10 kg una sola vez, tomando de ella 2 ó 3 capas de anchoíta de la zona media superior.

### M2 . PREPARACION DE EXTRACTOS DE TEJIDO

Todas las operaciones se realizaron entre 0 y 4°C. Se prepararon extractos de:

- 1- anchoíta entera
- 2- músculo y vísceras

partiendo de 5 a 10 ejemplares a los que se limpió quitándoles las escamas, cola y piel.

#### M2.1. Extractos de anchoíta entera

El material ya limpio se desmenuzó para obtener una muestra conjunta. Una alícuota se homogeneizó con 4 volúmenes de ClNa 4% en el caso de anchoíta fresca, o de agua destilada para la anchoíta salada, a fin de tener una concentración final de ClNa de aproximadamente

0,6 M; el procedimiento se realizó en licuadora a máxima velocidad durante 3 minutos. El homogenato (Hm) se filtró por tres capas de muselina y el extracto crudo resultante se dializó toda la noche contra 20 veces su volumen de ClNa 0,6 M obteniéndose el extracto crudo dializado (Ec).

#### M 2.2. Extractos de músculo y vísceras

En el material limpio se separó cuidadosamente el músculo del paquete visceral, descartando columna vertebral, peritoneo y gónadas.

##### M 2.2.1.

El músculo desmenuzado y las vísceras se procesaron por separado como en M 2.1. Una alícuota del extracto crudo de músculo y otra del de vísceras se centrifugaron durante 20 minutos a 10.000 x g, descartando los precipitados. Los extractos crudos y sus respectivos sobrenadantes se dializaron contra 20 volúmenes de agua destilada resultando los extractos crudos dializados de músculo (Ecm) y de vísceras (Ecv), la fracción sarcoplasmática o soluble de las proteínas de músculo (Sbm) y el sobrenadante de vísceras dializado (Sbv).

##### M 2.2.2.

El músculo desmenuzado de pescado fresco se homogeneizó con 10 volúmenes de ClNa 0,25 M y el de pescado salado con agua destilada, a fin de tener una concentración final de ClNa de aproximadamente 0,25 M. Las vísceras

ras se homogeneizaron con 5 volúmenes de agua destilada. Se centrifugó cada extracto crudo durante 20 minutos a 10.000 x g descartando los precipitados. Los sobrenadantes de músculo se dializaron contra 20 volúmenes de ClNa 0,25 M y los de vísceras contra 20 volúmenes de agua destilada, obteniéndose la fracción sarcoplasmática o soluble de las proteínas de músculo (Sbm) y el sobrenadante de vísceras (Sbv) dializados.

### M 3. PREPARACION DE LAS PROTEINAS MIOFIBRILARES

Se hizo según el método de Gill (59). Todas las operaciones se realizaron entre 0 y 4°C. El músculo limpio y desmenuzado se homogeneizó durante 2 minutos en licuadora a máxima velocidad, con 5 volúmenes de buffer fosfato de sodio y potasio 20 mM, pH 7,0 ,  $N_3Na$  1 mM, EDTA 1 mM y ClNa 100 mM (Buffer A), para el caso de músculo fresco; y con 25 volúmenes del mismo buffer pero sin ClNa (Buffer B) en el caso de anchoíta salada, de modo de tener una concentración final de ClNa de aproximadamente 100 mM. El homogenato se centrifugó a 600 x g durante 15 minutos. El precipitado se lavó y centrifugó seis veces con Buffer A, y luego tres veces más con ClNa 100 mM, obteniéndose las miofibrillas (Pm).

El sobrenadante separado al centrifugar el homogenato a 600 x g se centrifugó durante 15 minutos a 8.500 x g, descartando el precipitado, y el sobrenadan-

te obtenido se filtró por papel Whatman N°1, constituyendo ese filtrado la fracción sarcoplasmática de las proteínas musculares.

#### M 4. DETERMINACION DE ACTIVIDAD PROTEOLITICA

##### M 4.1. Medición de actividad proteolítica con caseína

Las determinaciones fueron hechas con una modificación del método de Anson (60). El sustrato, caseína tipo Hammarsten solubilizada en medio neutro o alcalino (buffer fosfato de sodio 200 mM, pH 7,0 ó OHNa 25 mM), se incubó con extractos de tejido en condiciones que se indicarán en cada experiencia; la reacción se detuvo agregando un volumen de TCA 10%, se dejó 30 minutos a temperatura ambiente, y el precipitado resultante se separó por centrifugación a 5.000 x g durante 15 minutos. Se leyó la absorbancia del sobrenadante a 275 nm. Los blancos de reacción se prepararon en forma semejante: no se incubaron y se adicionó el TCA inmediatamente antes que los extractos de tejido.

##### M 4.2. Medición de actividad proteolítica con hemoglobina

Se utilizó el mismo método que en M 4.1. sustituyendo el sustrato, caseína, por hemoglobina solubilizada en OHNa 25 mM y dializada contra agua destilada toda la noche.



#### M4.3. Medición de actividad tipo tripsina

La actividad esterásica de tipo tripsina de los extractos de tejido se midió según el método espectrofotométrico de Schwert y Takenaka (61). El sustrato fue BAEE, la reacción se desarrolló directamente en la cubeta del espectrofotómetro y se inició al agregar una alícuota de extracto de tejido en condiciones que se detallarán en cada experiencia; se registraron las variaciones de absorbancia a 253 nm cada 5 minutos. Se tomaron como control los valores de absorbancia de una mezcla semejante en la que se reemplazó la alícuota de muestra por agua destilada.

#### M4.4. Medición de actividad tipo quimotripsina

La actividad esterásica de tipo quimotripsina de los extractos de tejido se midió con el método de Hummel (62). La reacción se inició al incorporar una alícuota del extracto de tejido a un medio que contenía el sustrato: BTEE, bajo condiciones que se detallarán en cada experiencia. Se registraron las variaciones de absorbancia a 256 nm cada 5 minutos. En los controles se reemplazaron las alícuotas de muestra por agua destilada.

#### M4.5. Medición de la actividad proteolítica endógena y de la actividad autolítica

Las determinaciones fueron hechas con una modificación del método de Anson (60). Una alícuota de la frac-

ción de tejido (Ec, Ecm, Sbm, Sbv, suspensión de Pm en 2 volúmenes de buffer fosfato de sodio 20 mM, pH 7,0) que se utilizó como sustrato y/o fuente de proteasas se incubó en condiciones que serán indicadas en cada experiencia; la reacción se detuvo agregando un volumen de TCA 10%, se dejó 30 minutos a temperatura ambiente y el precipitado resultante se separó por centrifugación a 5.000 x g durante 15 minutos. Se leyó la absorbancia del sobrenadante a 275 nm. Los blancos de reacción se obtuvieron en forma semejante: no se incubaron y se adicionó el TCA antes que el extracto de tejido correspondiente.

#### Expresión de la actividad proteolítica

La actividad específica se expresó como la diferencia de absorbancias a una dada longitud de onda, producida en un intervalo de tiempo definido, referida a la cantidad de proteína presente en el medio de incubación.

$$\text{Actividad específica} = (A_{y \text{ nm}} \times h - A_{y \text{ nm}} 0 \text{ h}) \text{ mg}^{-1} = \Delta A_y \times h \cdot \text{mg}^{-1}$$

#### Medición de las proteínas totales

La concentración de proteína en los extractos de tejido se midió con el método de Lowry (63), usando seroalbúmina bovina como estandar.

#### M4.6. Estudio electroforético de la actividad proteo-

lítica endógena y de la actividad autolítica

Después de incubar las alícuotas de extracto de tejido como en M4.5. , se detuvo la reacción agregando 2 volúmenes de buffer desnaturante: urea 8 M , SDS 2,5% , EDTA 5 mM, 2 mercapto etanol 1%, en tris-glicina 100 mM, pH 8,8 y calentando a 100°C durante 5 minutos. Se utilizaron como referencia mezclas no incubadas, tratadas del mismo modo. En cada caso se obtuvieron las distribuciones electroforéticas de las proteínas presentes con el método de Porzio y Pearson (64) que permite obtener buena resolución de las proteínas contráctiles, especialmente de la cadena de miosina pesada, sin afectar la separación de las proteínas regulatorias de menor peso molecular. Se trabajó con geles de poliacrilamida al 10%, con una relación en peso acrilamida/bisacrilamida de 100:1, en concentración final de buffer Tris-glicina 0,4 M, glicerol 5%, SDS 0,1% , EDTA 0,1 mM. La corrida se hizo en un sistema de buffer continuo Tris-glicina 200 mM, pH 8,8 , SDS 0,1%, iniciando la entrada de las muestras al gel aplicando 1,5 mA por gel, aumentando después a 3 mA por gel. Finalizada la electroforesis las proteínas separadas en el gel se fijaron con isopropanol - ácido acético - agua (25 - 10 - 65) varias horas; luego se tiñieron con azul de Coomassie R 250 al 0,01% en metanol 50%, ácido acético 7%. Los geles se destiñieron por lavado con áci-

do acético 10%, metanol 5%.

M 5. EVALUACION SUBJETIVA DEL GRADO DE MADURACION

Personal especializado evaluó en forma empírica el grado de maduración de las muestras de anchoíta a través de sus caracteres organolépticos.

RESULTADOS

1 - MEDIDA DE ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE ANCHOITA PAR-  
CIALMENTE MADURA

Con el objeto de establecer la existencia de actividad proteolítica en los tejidos de anchoíta durante la maduración se trabajó con extractos de anchoíta entera y un sistema de incubación que reprodujese algunas de las condiciones del proceso industrial.

La Tabla IV muestra los valores de actividad endógena medidos en concentraciones de sal industrial o de ClNa variables entre: 0,7% y 12 ó 15% respectivamente. Como se puede ver no hay diferencias frente a los dos reactivos. No hay inhibición significativa por ClNa, ni por sal industrial.

La Figura 1 muestra los valores de actividad proteolítica de extractos de anchoíta entera, medidos en un medio adicionado con caseína como sustrato exógeno; se observa inhibición proporcional a la concentración de ClNa.

La anchoíta parcialmente madura tiene capacidad de hidrolizar proteínas exógenas y endógenas aún en concentraciones de ClNa semejantes a las del proceso industrial.

TABLA IV: ACTIVIDAD PROTEOLITICA ENDOGENA DE ANCHOITA ENTERA PARCIALMENTE MADURA

Se incubaron alícuotas de extracto crudo de anchoíta entera de 125 días de maduración (M 2.1. , campaña 1977-1978) con buffer fosfato de sodio 20 mM pH 6,2 y diferentes concentraciones de ClNa o sal industrial, durante 2 h a 30°C, volumen final 1 ml (il 4.5).

ClNa (%)	Actividad específica ( $\Delta A_{275}$ 2h. $\text{mg}^{-1}$ )	Sal industrial (%)	Actividad específica ( $\Delta A_{275}$ 2h. $\text{mg}^{-1}$ )
15	0,11	--	---
11	0,11	12	0,13
9	0,15	9	0,14
7	0,15	7	0,13
5	0,16	5	0,14
3,5	0,12	3,5	0,14
1,5	0,14	--	---
0,7	0,12	0,7	0,13

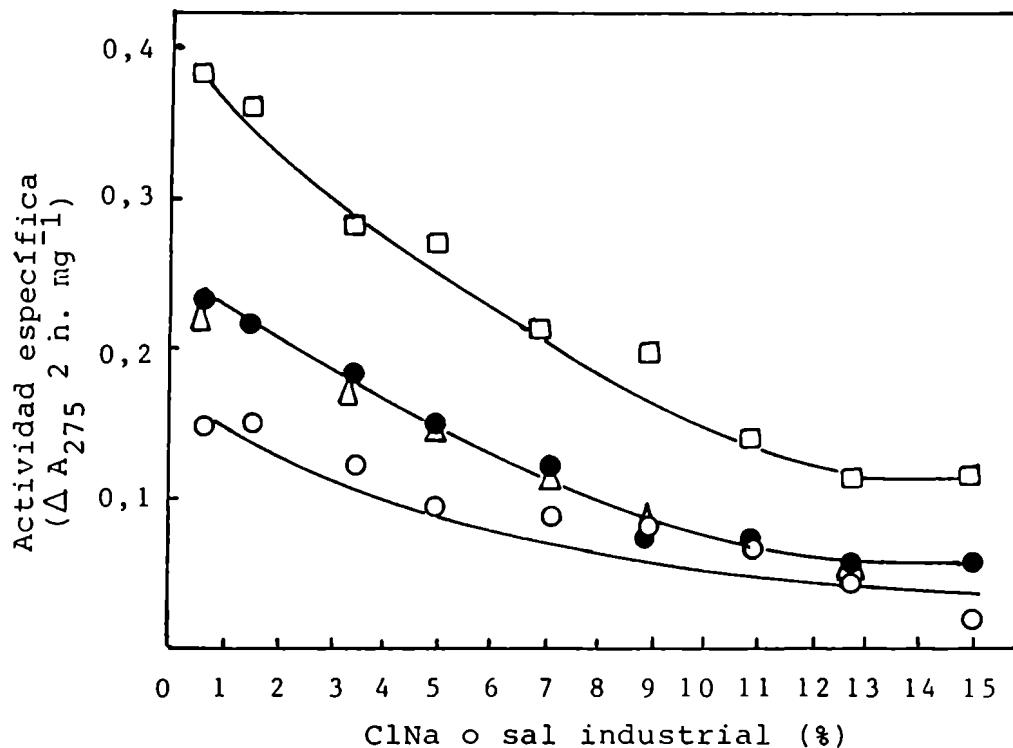


FIGURA 1: ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE ANCHOITA ENTERA PARCIALMENTE MADURA

Se incubaron alícuotas de extracto crudo de anchoíta entera de 125 días de maduración (M 2.1. , campaña 1977-1978) con caseína 0,5%, buffer fosfato de sodio 20 mM pH 6,2 y diferentes concentraciones de: i) ClNa a: ○-○ 25°C, ●-● 30°C, □-□ 37°C; ii) sal industrial Δ-Δ 30°C; durante 2 h, volumen final 1. ml (M 4.1).



Durante todo el desarrollo de este trabajo se adoptó la siguiente nomenclatura:

CAPACIDAD PROTEOLITICA: actividad proteolítica medida sin ClNa en el medio de incubación.

ACTIVIDAD PROTEOLITICA: actividad proteolítica medida en medios de incubación con una concentración final de ClNa del 15%.

## 2 - EFECTO DEL TIEMPO DE MADURACION SOBRE LA CAPACIDAD Y LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE ANCHOITA

En la Figura 2 se ve que la capacidad y la actividad proteolítica endógena de extractos de anchoíta entera son máximas en la etapa del presalado; después de 30 días de maduración disminuyen, permaneciendo en valores aproximadamente constantes y semejantes a los del pescado fresco hasta el final del proceso. La inhibición por ClNa 15% a través de la maduración es poco significativa.

En la Tabla V se dan los valores de capacidad y de actividad proteolítica de anchoíta entera sobre caseína: después de 20 días de proceso la capacidad proteolítica disminuye respecto de su valor en pescado fresco entre 27% y 47%. La inhibición por ClNa 15% varía entre 75% y 87%.

Dado que la actividad proteolítica endógena de los extractos de anchoíta entera parcialmente madura

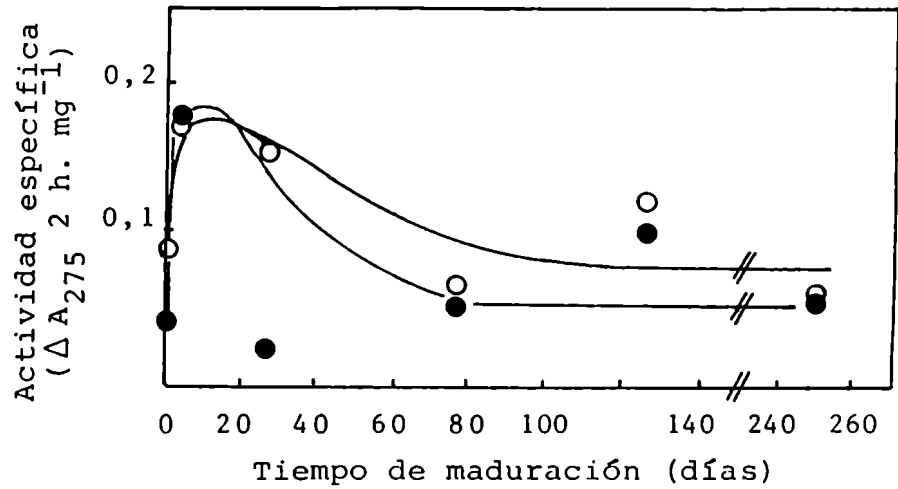


FIGURA 2: EFECTO DEL TIEMPO DE MADURACION SOBRE LA CAPACIDAD Y LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA ENDOGENA DE ANCHOITA ENTERA

Se incubaron alícuotas de extracto crudo de anchoíta entera de distintos estadios de maduración (M 2.1. , campaña 1977-1978) con buffer fosfato de sodio 20 mM pH 6,2 en O—O ClNa 0% y ●—● ClNa 15%, durante 2 h a 30°C, volumen final 1 ml (M 4.5)

TABLA V: EFECTO DEL TIEMPO DE MADURACION SOBRE LA CAPACIDAD Y LA ACTIVIDAD CASEINOLITICA DE ANCHOITA ENTERA

Se incubaron alícuotas de extracto crudo de anchoíta entera (M 2.1. , campaña 1977-1978) con: caseína 0,5%, buffer fosfato de sodio 20 mM pH 6,2 en: ClNa 0% y ClNa 15%, durante 2 h a 30°C, volumen final 1 ml (M 4.1)

Tiempo de maduración (días)	Actividad específica ( $\Delta A_{275}$ 2 h. $\text{mg}^{-1}$ )	
	ClNa 0%	ClNa 15%
0	0,15	0,02
presalado	0,12	0,01
26	0,11	0,00
75	0,08	0,02
127	0,08	0,01
250	0,08	0,02

es mayor o igual que la del pescado fresco, mientras que al avanzar el proceso (prensado, lavados, etc.) se pierde gran parte del paquete visceral, lo que supondría un menor aporte de enzimas al sistema, es posible que la actividad proteolítica de alguno de los tejidos en maduración sea mayor que la del tejido fresco.

Con el objeto de confirmar esta hipótesis se midió, a través del proceso, la actividad proteolítica de los tejidos muscular y visceral por separado. También se estudiaron algunos indicadores de propiedades de las proteasas presentes. Se trabajó en distintas condiciones de pH y con distintos sustratos, midiendo la capacidad y la actividad proteolítica de:

- Extracto crudo de músculo.
- Fracción sarcoplasmática o soluble muscular.
- Fracción soluble visceral.

A continuación se detallan los resultados de estas experiencias.

### 3 - EFFECTO DEL TIEMPO DE MADURACION SOBRE LA CAPACIDAD PROTEOLITICA DE MUSCULO DE ANCHOITA

En la Tabla VI están indicados los valores de capacidad autolítica del músculo de anchoíta fresca y parcialmente madura. En 50 días de proceso la capacidad autolítica del músculo aumentó un 100%. Aunque en distinta magnitud, este comportamiento se repitió en todas las

TABLA VI: EFECTO DEL TIEMPO DE MADURACION SOBRE LA CAPACIDAD PROTEOLITICA ENDOGENA DE MUSCULO DE ANCHOITA

Se incubaron alícuotas de extracto crudo de músculo de anchoíta de distintos estadios de maduración ( M 2.1 , campaña 1978-1979) con buffer fosfato de sodio 20 mM pH 6,2 , durante 2 h a 37°C, volumen final 1 ml (M4.5 )

Tiempo de maduración (días)	Actividad específica ( $\Delta A_{275} \text{ 2 h. mg}^{-1}$ )
0	0,10
50	0,20

campañas estudiadas posteriormente.

#### 4 - EFFECTO DEL pH SOBRE LA CAPACIDAD PROTEOLITICA DEL MUSCULO DE ANCHOITA FRESCA Y EN MADURACION

En las Figuras 3 y 4 se puede observar que el máximo de capacidad autolítica del músculo fresco y en maduración corresponde aproximadamente a pH 8,5.

La Figura 5 permite comparar los valores de capacidad proteolítica en función del pH de: músculo fresco y parcialmente maduro. Después de 50 días de proceso la capacidad autolítica muscular a pH ácido y neutro es 100% mayor que la del músculo fresco, y a pH alcalino 150% mayor.

En la Figura 6 se ven los valores de capacidad proteolítica del músculo de anchoíta fresca y parcialmente madura sobre hemoglobina, medida a distintos pH. La capacidad del músculo de anchoíta para hidrolizar esta proteína exógena es máxima a pH 3,5; a los 50 días de proceso aumenta con respecto a la del músculo fresco entre 70% y 90% en todos los valores de pH que se la midió.

#### 5 - EFFECTO DEL TIEMPO DE MADURACION SOBRE LA CAPACIDAD Y LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE LAS PROTEINAS SARCOPLASMATICAS DE MUSCULO DE ANCHOITA

Las Figuras 7, 8 y 9 muestran que la capacidad y

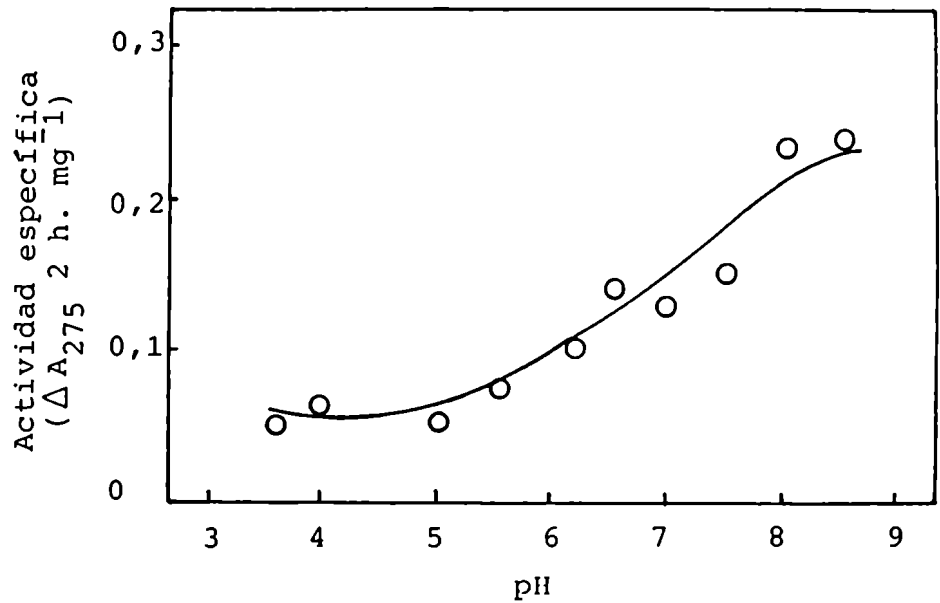


FIGURA 3: EFECTO DEL pH SOBRE LA CAPACIDAD PROTEOLITICA ENDOGENA DE MUSCULO DE ANCHOITA FRESCA

Se incubaron alícuotas de extracto crudo de músculo de anchoíta fresca (M 2.2.1, campaña 1978-1979) con buffer citrato de sodio 20 mM pH 3,5 a 4,0; buffer acetato de sodio 20 mM pH 3,6 a 5,5; buffer fosfato de sodio 20 mM pH 6,0 a 8,0, y buffer borato de sodio 20 mM pH 8,0 a 9,0; durante 2 h a 37°C, volumen final 1 ml (M 4.5)

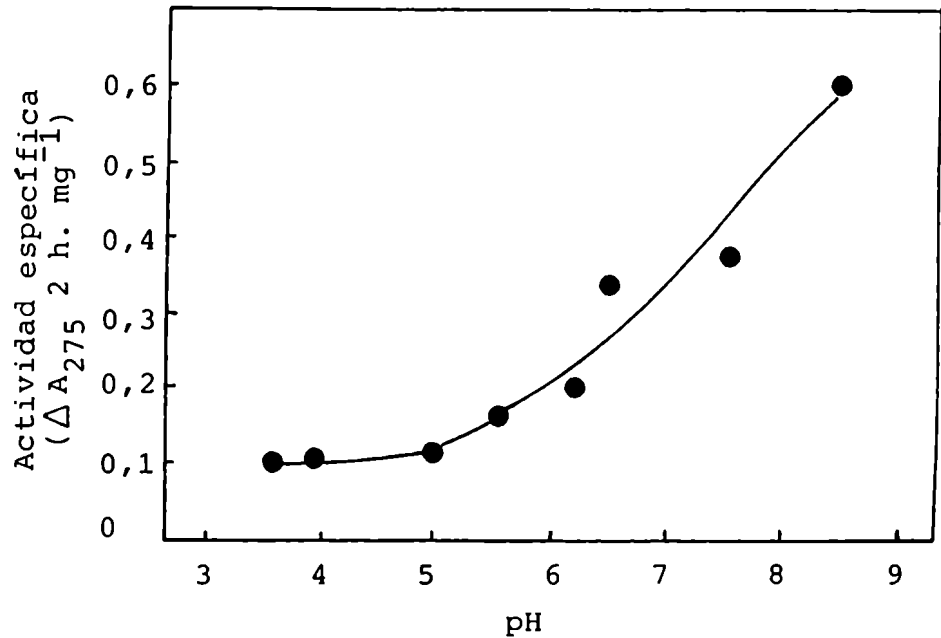


FIGURA 4: EFECTO DEL pH SOBRE LA CAPACIDAD PROTEOLITICA ENDOGENA DE MUSCULO DE ANCHOITA PARCIALMENTE MADURA

Se incubaron alícuotas de extracto crudo de músculo de anchoíta de 50 días de maduración (M 2.2.1, campaña 1978-1979) con buffer citrato de sodio 20 mM pH 3,5 a 4,0; buffer acetato de sodio 20 mM pH 3,6 a 5,5; buffer fosfato de sodio 20 mM pH 6,0 a 8,0, y buffer borato de sodio 20 mM pH 8,0 a 9,0; durante 2 h a 37°C, volumen final 1 ml (M 4.5)



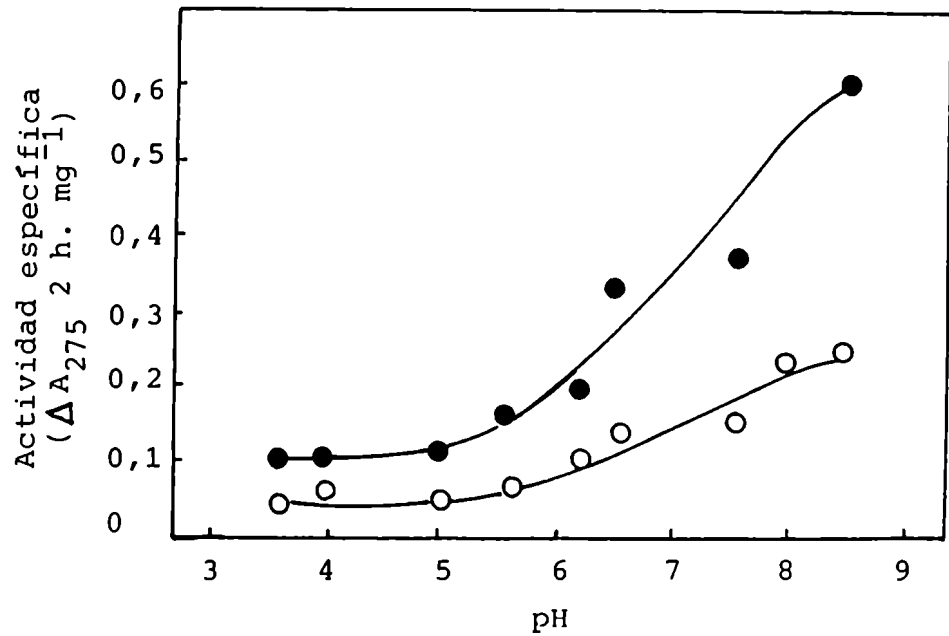


FIGURA 5: EFECTO DEL pH SOBRE LA CAPACIDAD PROTEOLITICA ENDOGENA DE MUSCULO DE ANCHOITA FRESCA Y PARCIALMENTE MADURA

○—○ Extracto crudo de músculo fresco.

●—● Extracto crudo de 50 días de maduración.

Condiciones de incubación: iguales a las de las Figuras 3 y 4.

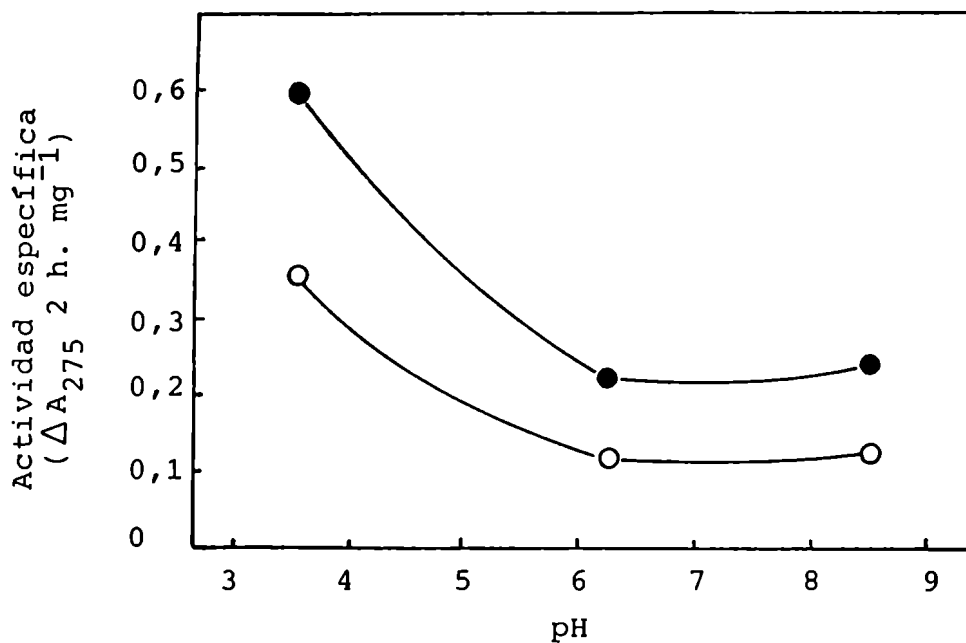


FIGURA 6: EFECTO DEL pH SOBRE LA CAPACIDAD PROTEOLITICA DE MUSCULO DE ANCHOITA FRESCA Y PARCIALMENTE MADURA MEDIDA SOBRE HEMOGLOBINA

Se incubaron alícuotas de extracto crudo de músculo de: ○—○ anchoíta fresca, y de ●—● anchoíta de 50 días de maduración (M 2.2.1 campaña 1978-1979) con hemoglobina 1,5%, buffer citrato de sodio 20 mM pH 3,5, buffer fosfato de sodio 20 mM pH 6,2, o buffer borato de sodio 20 mM pH 8,5; durante 2 h a 37°C, volumen final 1 ml (M 4.2) En cada punto se descontó la actividad proteolítica endógena (M 4.5)

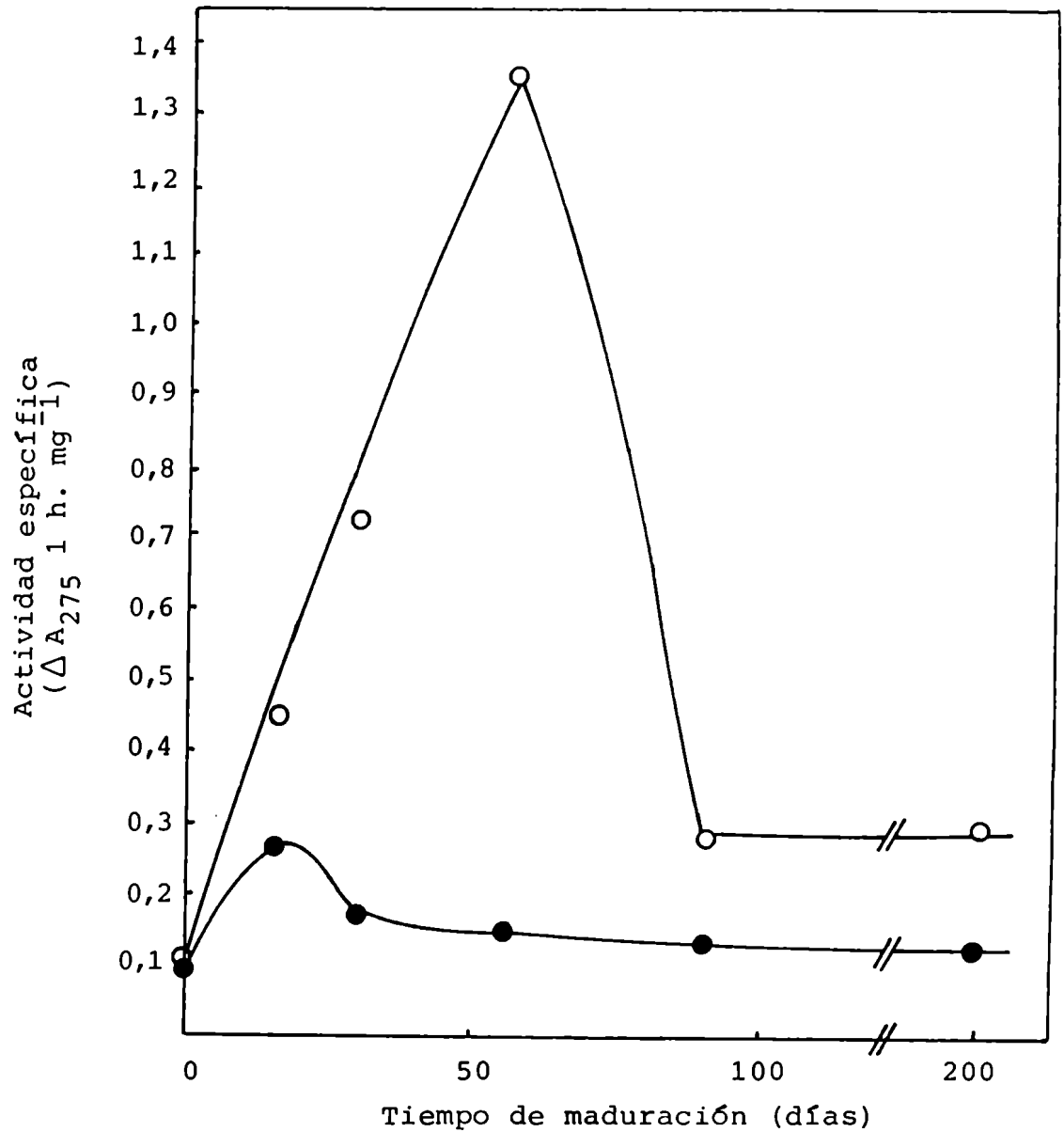


FIGURA 7: EFECTO DEL TIEMPO DE MADURACION SOBRE LA CAPACIDAD Y LA ACTIVIDAD AUTOLITICA DE LAS PROTEINAS SARCOPLASMATICAS DE MUSCULO DE ANCHOITA

Se incubaron alícuotas de sobrenadante de músculo de anchoíta de distintos estadios de maduración (M 2.2.1, campaña 1980-1981) con buffer fosfato de sodio 20 mM pH 6,2 en: o—o ClNa 0% y ●—● ClNa 15%, durante 1 h a 37°C, volumen final 0,5 ml (M 4.5).

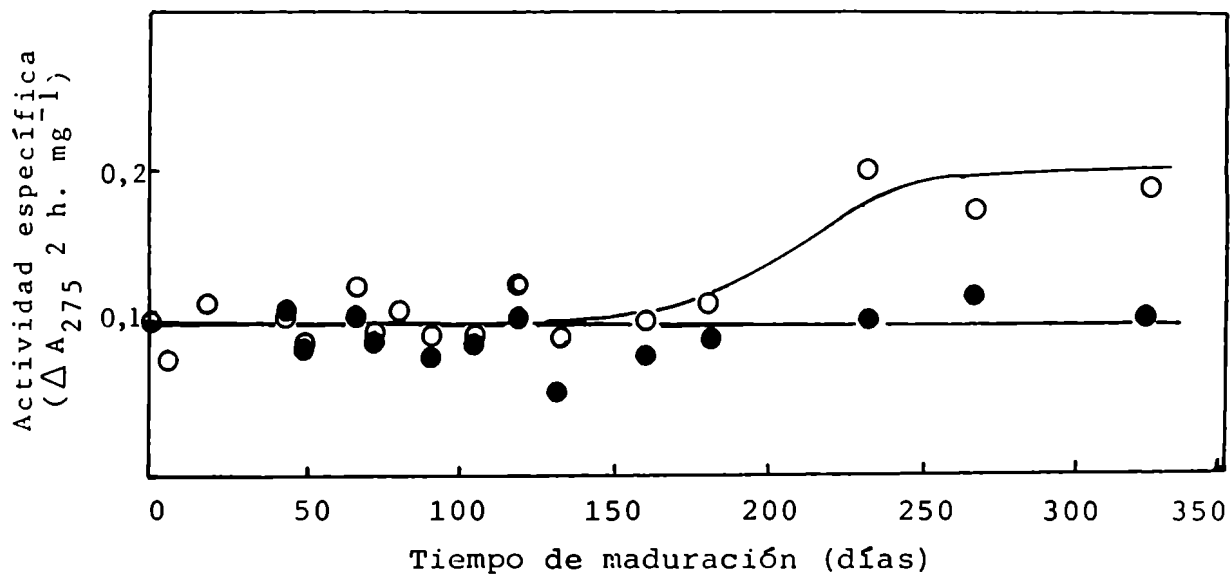


FIGURA 8: EFECTO DEL TIEMPO DE MADURACION SOBRE LA CAPACIDAD Y LA ACTIVIDAD AUTOLITICA DE LAS PROTEINAS SARCOPLASMATICAS DE MUSCULO DE ANCHOITA

Se incubaron alícuotas de sobrenadante de músculo de anchoíta de distintos estadíos de maduración (M 2.2.2, campaña 1982-1983) con buffer fosfato de sodio 20 mM pH 6,2 en: O—O ClNa 0% y ●—● ClNa 15%, durante 2 h a 37°C, volumen final 1 ml (M 4.5)

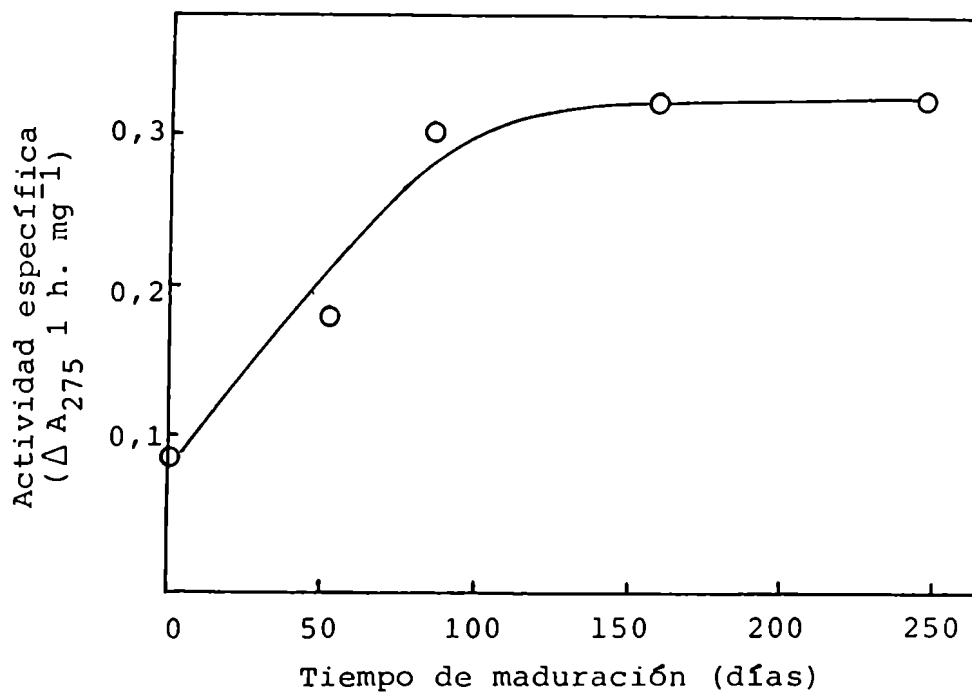


FIGURA 9: EFECTO DEL TIEMPO DE MADURACION SOBRE LA CAPACIDAD AUTOLITICA DE LAS PROTEINAS SARCOPLASMATICAS DE MUSCULO DE ANCHOITA

Se incubaron alícuotas de sobrenadante de músculo de anchoíta de distintos estadios de maduración (M 2.2.1, campaña 1979-1980) con buffer fosfato de sodio 20 mM pH 6,2, durante 1 h a 37°C, volumen final 0,5 ml (M 4.5)

la actividad autolítica de las proteína sarcoplasmáticas del músculo en maduración nunca son menores que la capacidad autolítica del músculo fresco.

De los valores de la Tabla VII se ve que la inhibición por ClNa 15% es nula en músculo de anchoíta fresca, y que durante la maduración es mayor o igual que cero.

#### 6 - EFECTO DEL TIEMPO DE MADURACION SOBRE LA CAPACIDAD Y LA ACTIVIDAD DE LAS PROTEASAS ACIDAS DE MUSCULO DE ANCHOITA

En las Figuras 10, 11 y 12 se ve que los valores de actividad autolítica de las proteínas sarcoplasmáticas del músculo en maduración, medidos a pH 3,5 , son durante todo el proceso mayores o del mismo orden que la capacidad autolítica del músculo fresco. En general no hay inhibición por ClNa 15%.

Las Figuras 13, 14 y 15 muestran los valores de capacidad proteolítica de las proteínas sarcoplasmáticas del músculo en maduración sobre hemoglobina, medidos a pH 3,5. Cualitativamente repiten el comportamiento de la autólisis.

#### 7 - EFECTO DEL TIEMPO DE MADURACION SOBRE LA CAPACIDAD Y LA ACTIVIDAD DE LAS PROTEASAS ALCALINAS DE MUSCULO

TABLA VII: INHIBICION POR ClNa 15% DE LA CAPACIDAD AUTOLITICA DE LAS PROTEINAS SARCOPLASMATICAS DE MUSCULO DE ANCHOITA A TRAVES DE LA MADURACION

Se calculó según:

$$\frac{(\text{capacidad autolítica} - \text{actividad autolítica})}{\text{capacidad autolítica}} \times 100$$

Tiempo de maduración (días)	Campana 1980-1981	Tiempo de maduración (días)	Campana 1982-1983
	Inhibición por ClNa (%)		Inhibición por ClNa (%)
0	0	0 a 100	0
16	40	119	3
30	77	133	5
56	89	163	9
91	54	170	17
195	55	232	44
		267	50
		324	50

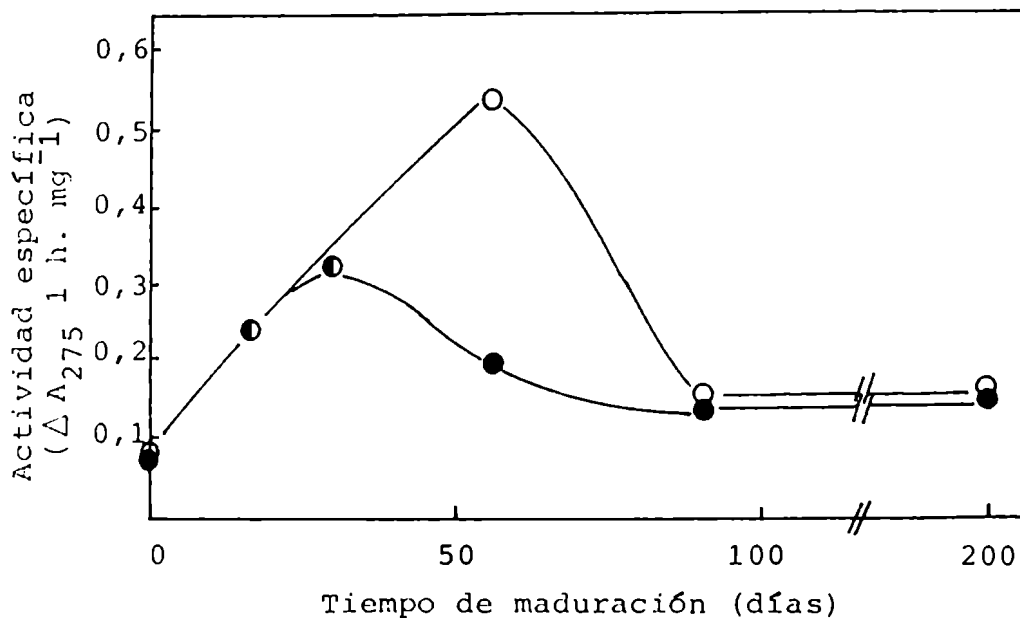


FIGURA 10: EFECTO DEL TIEMPO DE MADURACION SOBRE LA CAPACIDAD Y LA ACTIVIDAD AUTOLITICA DE LAS PROTEINAS SARCOPLASMATICAS DE MUSCULO DE ANCHOITA, MEDIDAS A pH ACIDO

Se incubaron alícuotas de sobrenadante de músculo de anchoíta de distintos estadios de maduración (M 2.2.1, campaña 1980-1981) con buffer citrato de sodio 20 mM pH 3,5 en: O—O ClNa 0% y ●—● ClNa 15%, durante 1 h a 37°C, volumen final 0,5 ml (M 4.5)



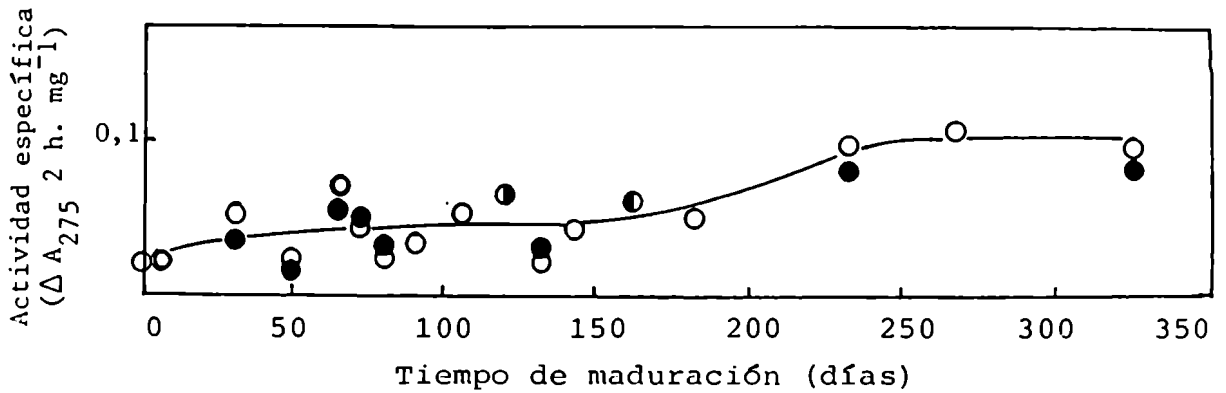


FIGURA 11: EFECTO DEL TIEMPO DE MADURACION SOBRE LA CAPACIDAD Y LA ACTIVIDAD AUTOLITICA DE LAS PROTEINAS SARCOPLASMATICAS DE MUSCULO DE ANCHOITA, MEDIDAS A pH ACIDO

Se incubaron alícuotas de sobrenadante de músculo de anchoíta de distintos estadios de maduración (M 2.2.2, campaña 1982-1983) con buffer citrato de sodio 20 mM pH 3,5 en: ○—○ ClNa 0% y ●—● ClNa 15%, durante 2 h a 37°C, volumen final 1 ml (M 4.5)

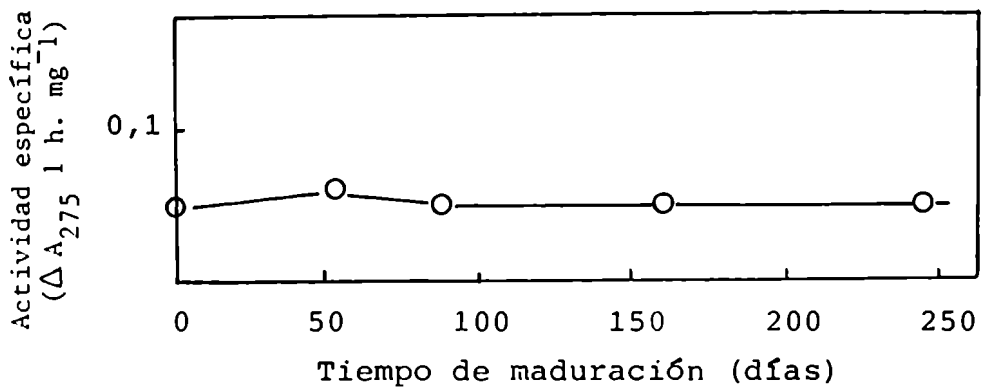


FIGURA 12: EFECTO DEL TIEMPO DE MADURACION SOBRE LA CAPACIDAD AUTOLITICA DE LAS PROTEINAS SARCOPLASMATICAS DE MUSCULO DE ANCHOITA, MEDIDA A pH ACIDO

Se incubaron alícuotas de sobrenadante de músculo de anchoíta de distintos estadios de maduración (M 2.2.1, campaña 1979-1980) con buffer citrato de sodio 20 mM pH 3,5, durante 1 h a 37°C, volumen final 0,5 ml (M 4.5)

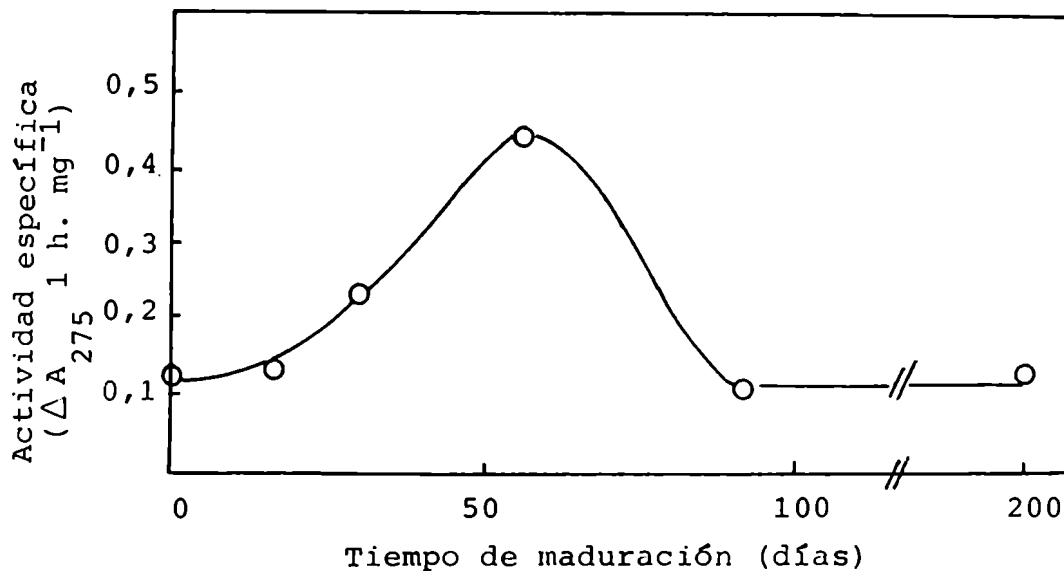


FIGURA 13: EFECTO DEL TIEMPO DE MADURACION SOBRE LA CAPACIDAD PROTEOLITICA DE LA FRACCION SARCOPLASMATICA DE MUSCULO DE ANCHOITA, MEDIDA SOBRE HEMOGLOBINA A pH ACIDO

Se incubaron alícuotas de sobrenadante de músculo de anchoíta de distintos estadios de maduración (M 2.2.1, campaña 1980-1981) con hemoglobina 1,5%, buffer citrato de sodio 20 mM pH 3,5, durante 1 h a 37°C, volumen final 0,5 ml (M 4.2). En cada punto se descontó la capacidad autolítica (M 4.5)

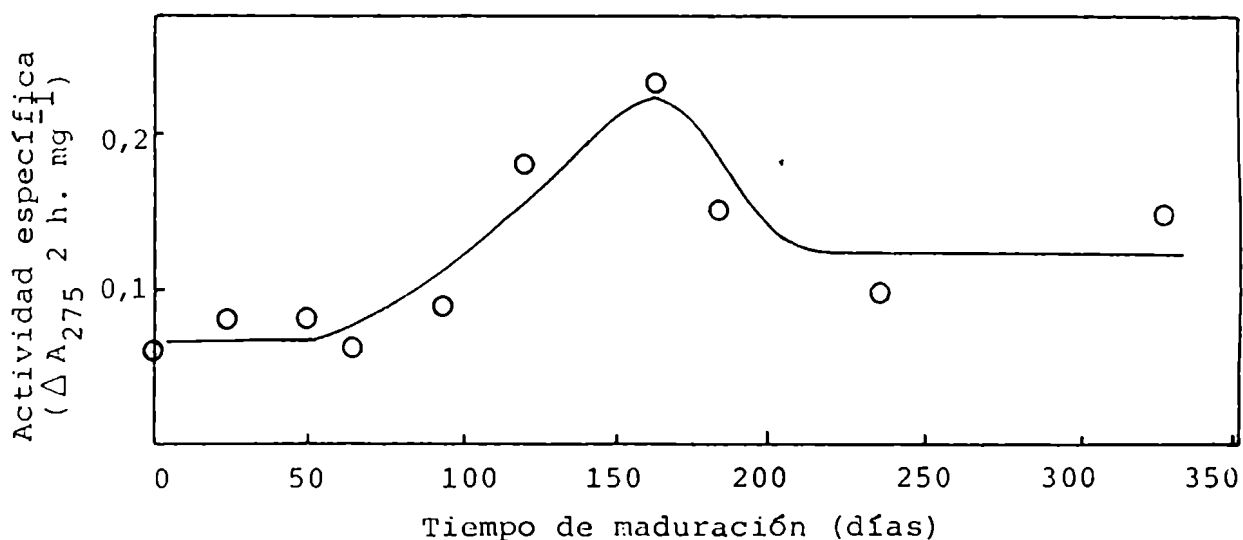


FIGURA 14: EFECTO DEL TIEMPO DE MADURACION SOBRE LA CAPACIDAD PROTEOLITICA DE LA FRACCION SARCOPLASMATICA DE MUSCULO DE ANCHOITA, MEDIDA SOBRE HEMOGLOBINA A pH ACIDO

Se incubaron alícuotas de sobrenadante de músculo de anchoíta de distintos estadios de maduración (M 2.2.2, campaña 1982-1983) con hemoglobina 1,5%, buffer citrato de sodio 20 mM, pH 3,5, durante 2 h a 37°C, volumen final 1 ml (M 4.2). En cada punto se descontó la capacidad autolítica (M 4.5)

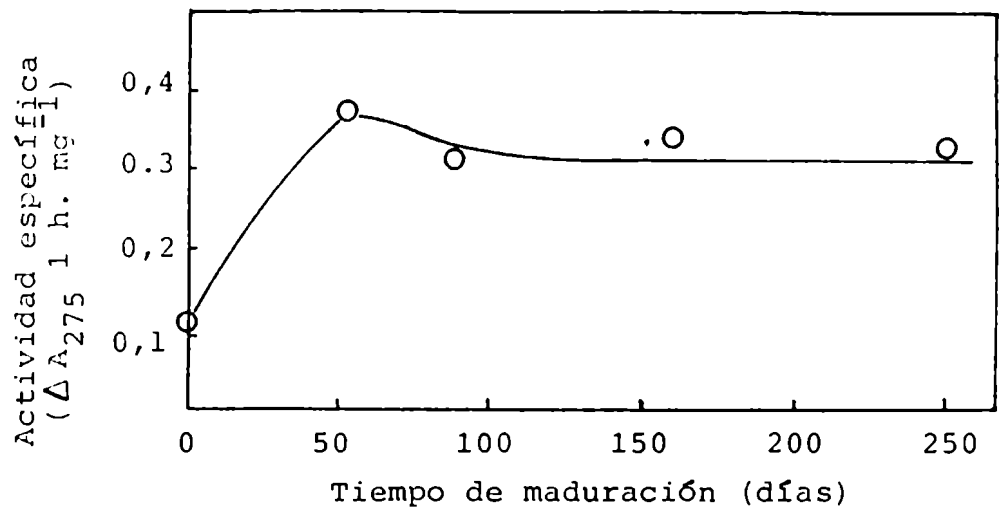


FIGURA 15: EFECTO DEL TIEMPO DE MADURACION SOBRE LA CAPACIDAD PROTEOLITICA DE LA FRACCION SARCOPLASMATICA DE MUSCULO DE ANCHOITA, MEDIDA SOBRE HEMOGLOBINA A pH ACIDO

Se incubaron alícuotas de sobrenadante de músculo de anchoíta de distintos estadios de maduración (M 2.2.1, campaña 1979-1980) con hemoglobina 1,5%, buffer citrato de sodio 20 mM pH 3,5; durante 1 h a 37°C, volumen final 0,5 ml (M 4.2). En cada punto se descontó la capacidad autolítica (M 4.5).

DE ANCHOITA

En las curvas de las Figuras 16, 17 y 18 se puede observar que la actividad autolítica de las proteínas sarcoplasmáticas de músculo en maduración, medida a pH alcalino, es mayor o igual que la capacidad autolítica del músculo fresco.

En la Tabla VIII están indicados los porcentajes de inhibición de la capacidad autolítica por ClNa 15%. Aunque varía según la campaña, la magnitud de la inhibición de las proteasas alcalinas de músculo en maduración es mayor que la de músculo fresco.

En la Figura 19 se ven los valores de capacidad y actividad proteolítica sobre BTEE de las proteínas sarcoplasmáticas de músculo en maduración. En los primeros 80 días ambas disminuyen respecto del valor en músculo fresco, después se mantienen aproximadamente constantes. Durante los dos meses iniciales la actividad proteolítica es aproximadamente 20% mayor que la capacidad proteolítica, efecto que se revierte al avanzar el proceso observándose que después de 80 días de maduración el ClNa 15% inhibe la capacidad proteolítica de tipo quimotripsina aproximadamente un 30%.

En la Figura 20 se puede observar que la capacidad proteolítica de las proteasas alcalinas de músculo en maduración sobre caseína es mayor que la de músculo fresco.

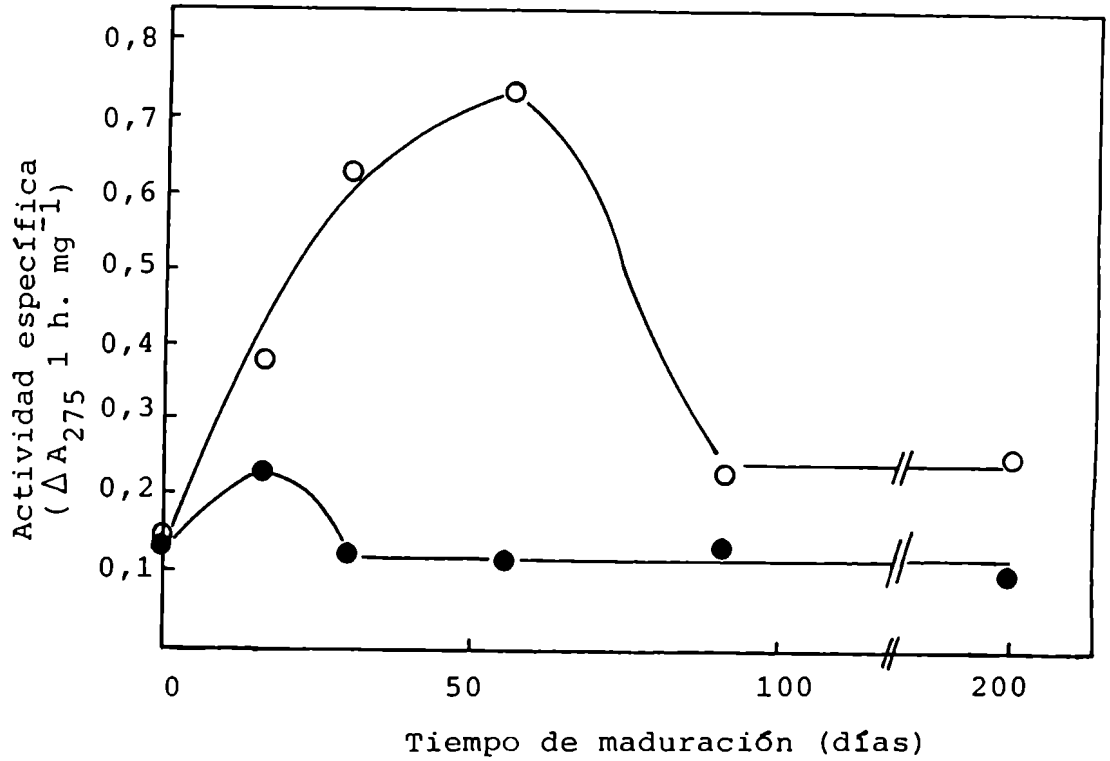


FIGURA 16: EFECTO DEL TIEMPO DE MADURACION SOBRE LA CAPACIDAD Y LA ACTIVIDAD AUTOLITICA DE LAS PROTEINAS SARCOPLASMATICAS DE MUSCULO DE ANCHOITA, MEDIDAS A pH ALCALINO

Se incubaron alícuotas de sobrenadante de músculo de anchoíta en distintos estadios de maduración (M 2.2.1, campaña 1980-1981) con buffer borato de sodio 20 mM pH 8,5 en O—O ClNa 0% y ●—● ClNa 15%, durante 1 h a 37°C, volumen final 0,5 ml (M 4.5)

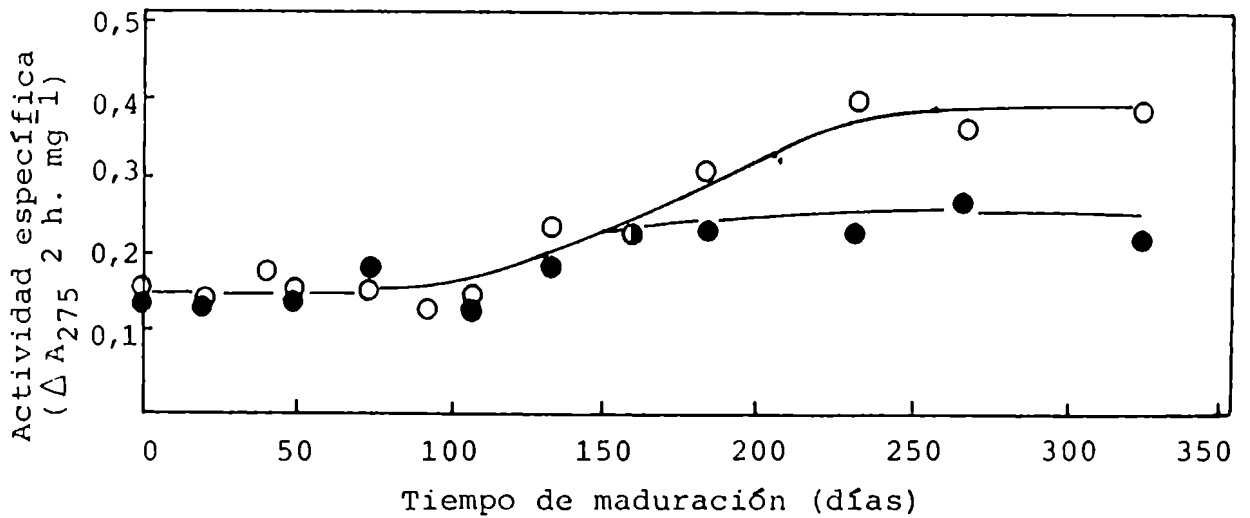


FIGURA 17: EFECTO DEL TIEMPO DE MADURACION SOBRE LA CAPACIDAD Y LA ACTIVIDAD AUTOLITICA DE LAS PROTEINAS SARCOPLASMATICAS DE MUSCULO DE ANCHOITA, MEDIDAS A pH ALCALINO

Se incubaron alícuotas de sobrenadante de músculo de anchoíta de distintos estadíos de maduración (M 2.2.2, campaña 1982-1983) con buffer borato de sodio 20 mM pH 8,5 en : ○—○ ClNa 0% y ●—● ClNa 15%, durante 2 h a 37°C, volumen final 1 ml (M 4.5)

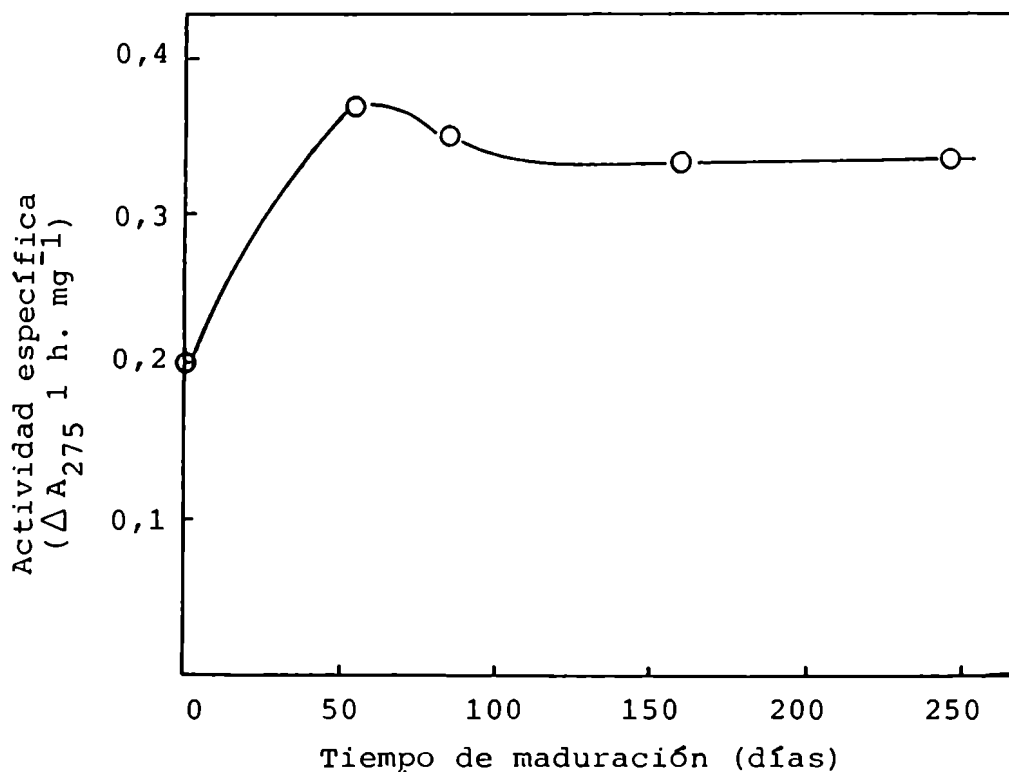


FIGURA 18; EFECTO DEL TIEMPO DE MADURACION SOBRE LA CAPACIDAD AUTOLITICA DE LAS PROTEINAS SARCOPLASMATICAS DE MUSCULO DE ANCHOITA, MEDIDA A pH ALCALINO

Se incubaron alícuotas de sobrenadante de músculo de anchoíta de distintos estadios de maduración (M 2.2.1, campaña 1979-1980) con buffer borato de sodio 20 mM pH 8,5, durante 1 h a 37°C, volumen final 0,5 ml (M 4.5)



TABLA VIII: INHIBICION POR ClNa 15% DE LA CAPACIDAD AUTOLITICA DE LAS PROTEINAS SARCOPLASMATICAS DE MUSCULO DE ANCHOITA, MEDIDA A pH ALCALINO, A TRAVES DE LA MADURACION

Se calculó según:

$$\frac{(\text{capacidad autolítica} - \text{actividad autolítica})}{\text{capacidad autolítica}} \times 100$$

Tiempo de maduración (días)	Campaña 1980-1981	Tiempo de maduración (días)	Campaña 1982-1983
	Inhibición por ClNa (%)		Inhibición por ClNa (%)
0	0	0 a 160	0
16	40	180	17
30	80	232	34
56	85	267	37
91	43	324	37
195	60	--	--

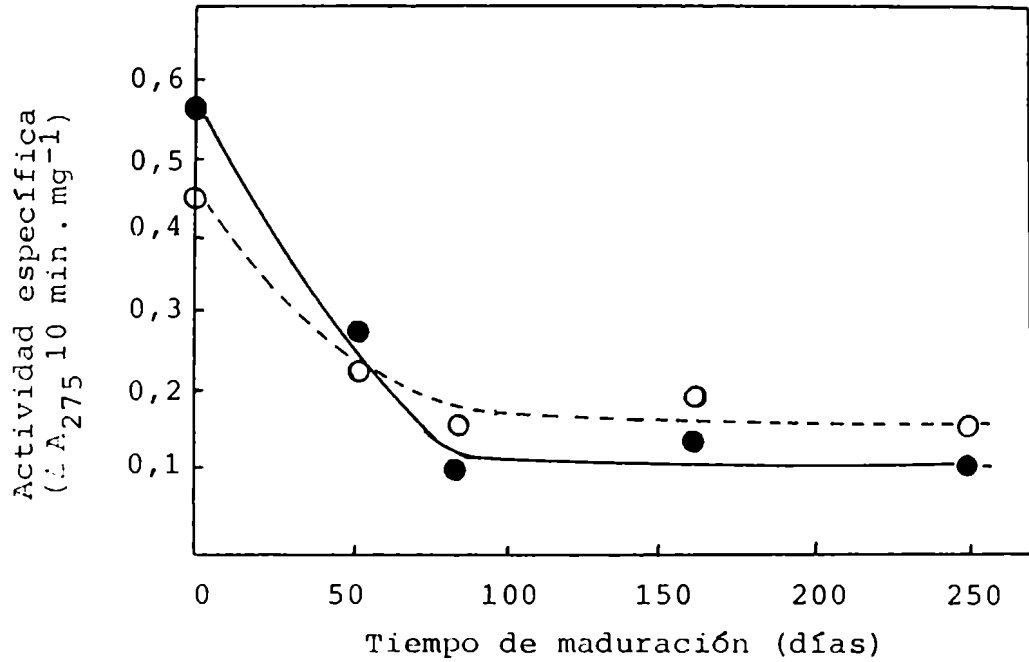


FIGURA 19: EFECTO DEL TIEMPO DE MADURACION SOBRE LA CAPACIDAD Y LA ACTIVIDAD DE TIPO QUIMOTRIPSINA DE LA FRACCION SARCOPLASMATICA DE MUSCULO DE ANCHOITA

Se incubaron alícuotas de sobrenadante de anchoíta de distintos estadios de maduración (M2.2.1., campaña 1979-1980) con BTEE 0,5 mM, buffer Tris-ClH 55 mM, pH 7,8 , Cl<sub>2</sub>Ca 55 mM, y O--O ClNa 0% ó ●—● ClNa 15%, durante 10 min a temperatura ambiente, volumen final 1 ml (M4.4.)

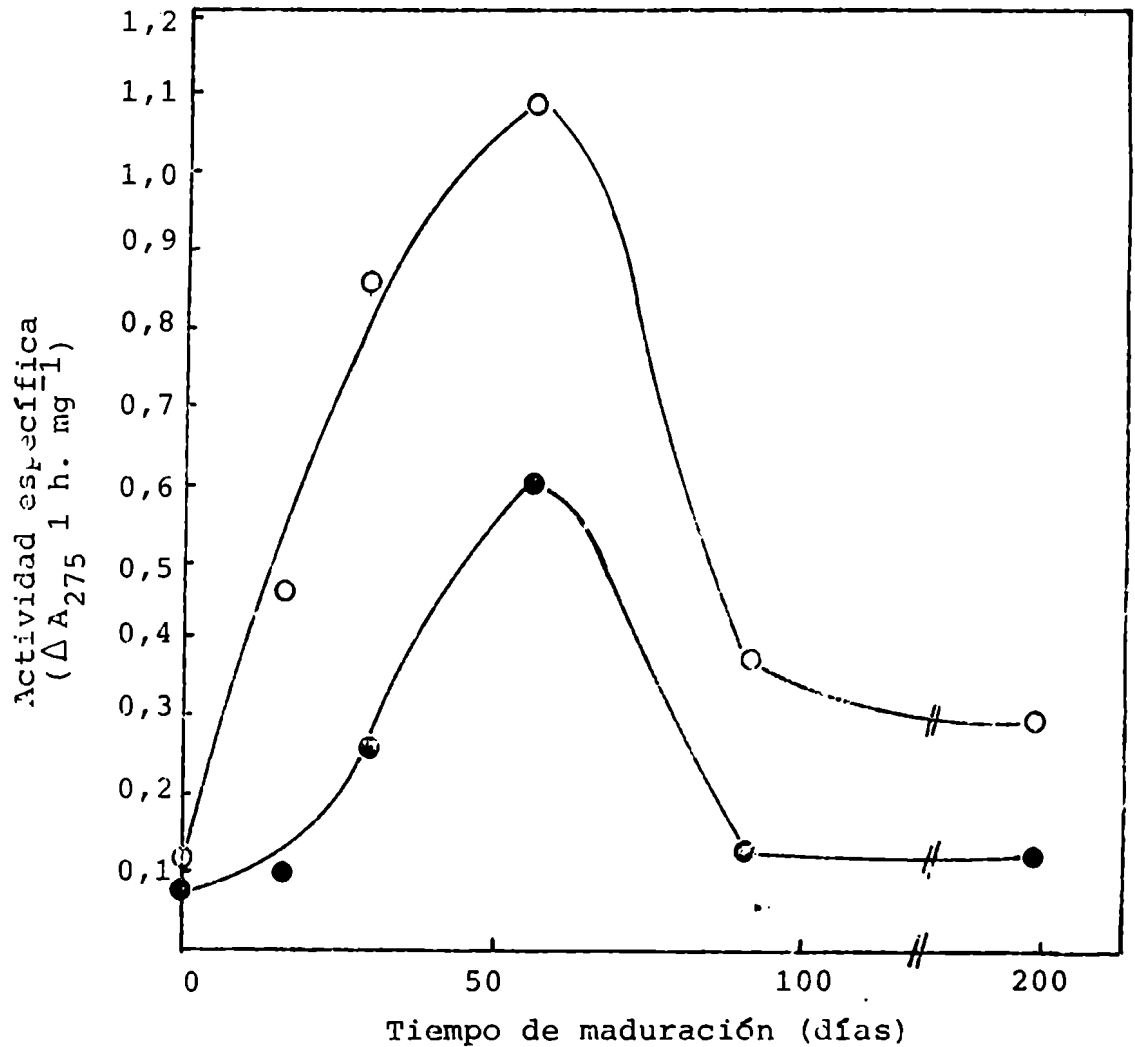


FIGURA 20: EFECTO DEL TIEMPO DE MADURACION SOBRE LA CAPACIDAD Y LA ACTIVIDAD CASEINOLITICA DE LA FRACCION SARCOPLASMATICA DE MUSCULO DE ANCHOITA, MEDIDAS A pH ALCALINO

Se incubaron alícuotas de sobrenadante de músculo de anchoíta de distintos estadios de maduración (M 2.2.1, campaña 1980-1981) con: caseína 0,5%, buffer borato de sodio 20 mM pH 8,5 en: ○-○ ClNa 0% y ●-● ClNa 15%, durante 1 h a 37°C, volumen final 1 ml (M 4.1). En cada punto se descontó la capacidad o actividad autolítica (M 4.5).

Los valores de la tabla IX indican los porcentajes de inhibición de la capacidad caseinolítica por ClNa 15%; son mayores sobre las proteasas alcalinas de músculo en maduración que sobre las de músculo fresco.

El aumento de capacidad y actividad proteolítica frente a un sustrato, con disminución simultánea frente a otro al avanzar la maduración, supondría la existencia de por lo menos dos proteasas alcalinas.

Los resultados expuestos en los puntos 3 a 7 confirman que la capacidad y la actividad autolítica del músculo de anchoíta, medidas a pH ácido, neutro y alcalino, aumentan durante la maduración.

Considerando la labilidad de los lisosomas a los que en ningún momento después de la captura (6 a 8 h) e inicio del salado se les da protección osmótica adecuada (65), y que la alta concentración de ClNa en los tejidos (aproximadamente 15%) causa separación de las enzimas unidas a membranas (66), se descarta que los incrementos de capacidad y actividad autolítica vistos en los extractos crudos (puntos 3 y 4) y en la fracción sarcoplasmática muscular aún después de varios meses de iniciado el proceso, se originen en el pasaje de proteasas desde la fracción insoluble a la soluble (Sbm) durante la preparación de la misma.

Algunas de las razones que explicarían esos aumen-

TABLA IX: INHIBICION POR ClNa 15% DE LA CAPACIDAD CASEI-  
NOLITICA ALCALINA DE LA FRACCION SARCOPLASMATICA DE MUSCU-  
LO DE ANCHOITA, A TRAVES DE LA MADURACION

Se calculó según:

$$\frac{(\text{capacidad caseinolítica} - \text{actividad caseinolítica})}{\text{capacidad caseinolítica}} \times 100$$

Tiempo de maduración (días)	Inhibición por ClNa (%)
0	27
16	78
30	70
56	45
91	68
195	59

tos son:

- disminución de la actividad de algún inhibidor de proteasas presente en la fracción sarcoplasmática.

- variaciones en la estructura de las proteínas de la fracción sarcoplasmática (proteasas y/o sustratos).

#### 8 - INTERACCION ENTRE LAS PROTEINAS MIOFIBRILARES Y SARCOPLASMATICAS DURANTE LA MADURACION

Considerando que las proteínas insolubles (proteínas miofibrilares) constituyen inicialmente el 65% del músculo, sería importante estudiar la interacción entre las proteínas miofibrilares y sarcoplasmáticas desde el punto de vista de la actividad proteolítica, y sus modificaciones durante la maduración.

Se define interacción (I) entre proteínas miofibrilares (Pm) y sarcoplasmáticas (Sbm) como:

$$I = \frac{\{ \Delta A_{275}^{Sbm Pm} - (\Delta A_{275}^{Sbm} + \Delta A_{275}^{Pm}) \} \cdot x \cdot h}{\text{proteína incubada mg}} ; |I| = \frac{\text{nm} \cdot \text{h}}{\text{mg}}$$

Los valores de las Tablas X y XI:  $\Delta A_{275}^{Pm} \cdot 20 \text{ h} \cdot \text{mg}^{-1}$  obtenidos al incubar alícuotas de una suspensión de proteínas miofibrilares, a pH neutro y alcalino respectivamente, indican posible autodegradación de las mismas; este comportamiento no muestra una tendencia definida durante el pro-

TABLA X: AUTODEGRADACION DE LAS PROTEINAS MIOFIBRILARES DE ANCHOITA A TRAVES DE LA MADURACION

Se incubaron alícuotas de una suspensión de proteínas miofibrilares de anchoíta de distintos estadios de maduración (M 3., campaña 1982-1983) con buffer fosfato de sodio 20 mM pH 6,2 , durante 20 h a 37°C, volumen final 1 ml (M4.5.)

Tiempo de maduración (días)	Autodegradación ( $\Delta A_{275} 20 \text{ h} \cdot \text{mg}^{-1}$ )
0	0,07
6	0,05
13	0,00
36	0,01
64	0,04
70	0,08
91	0,13
105	0,07
163	0,00
232	0,09
267	0,11
324	0,07

TABLA X I : AUTODEGRADACION DE LAS PROTEINAS MIOFIBRI-  
LARES DE ANCHOITA MEDIDA A pH ALCALINO A TRAVES DE LA  
MADURACION

Se incubaron alícuotas de una suspensión de proteínas miofibrilares de anchoíta de distintos estadios de maduración (M 3. , campaña 1982-1983) con buffer borato de sodio 20 mM pH 8,5, durante 20 h a 37°C, volumen final 1 ml (M 4.5)

Tiempo de maduración (días)	Autodegradación ( $\Delta A_{275}^{20 \text{ h. mJ}^{-1}}$ )
0	0,08
6	0,05
13	0,03
27	0,06
36	0,07
50	0,07
56	0,08
64	0,08
70	0,09
78	0,14
84	0,01
105	0,15
133	0,04
163	0,08
182	0,20
232	0,19
267	0,10
324	0,19



ceso. Dado que persiste después de los exhaustivos lavados realizados durante el aislamiento de las proteínas miofibrilares según el método de Gill (59) y según el método empleado por Drabikowski (67) que incluye detergentes, no se trataría de una contaminación con proteasas sarcoplasmáticas. La posibilidad que sea una actividad proteolítica propia de las proteínas miofibrilares se contrapone con su resistencia a tratamientos térmicos drásticos (68). Si bien estas hipótesis no pueden descartarse, para la interpretación de las siguientes experiencias se considerará que la autodegradación miofibrilar es no enzimática. Esto significa que en el cálculo de interacción se excluirá del término que representa la cantidad de proteína incubada a las proteínas miofibrilares:

$$I = \frac{\{ \Delta A_{275}^{Sbm Pm} - (\Delta A_{275}^{Sbm} + \Delta A_{275}^{Pm}) \} \cdot x \cdot n}{\text{proteína sarcoplasmática mg}}$$

Dado que no se está trabajando con enzimas purificadas sino con un sistema relativamente complejo o crudo, son varios los factores que determinan el valor de la interacción entre las proteínas miofibrilares y sarcoplasmáticas calculado según I. Un valor negativo o nulo indicaría que: o bien las proteínas miofibrilares no son hidrolizadas por las proteasas sarcoplasmáticas, o que esa hidrólisis es de magnitud relativamen-

te baja y coexiste con cierta disminución de la autólisis de las proteínas sarcoplasmáticas. Esta segunda posibilidad se debería a la distinta especificidad de las proteasas sarcoplasmáticas frente a los posibles sustratos disponibles (proteínas miofibrilares y sarcoplasmáticas), o a la presencia de inhibidores aportados al sistema por las proteínas miofibrilares.

Si el valor calculado de I es mayor que cero indicaría que las proteínas miofibrilares son hidrolizadas por las proteasas sarcoplasmáticas, siendo la magnitud de esa proteólisis endógena de suficiente magnitud como para superar alguna disminución en la autólisis de las proteínas sarcoplasmáticas.

La interacción así definida es una medida de la capacidad o de la actividad proteolítica endógena de la fracción sarcoplasmática muscular, es decir de la capacidad o de la actividad de las proteasas de la fracción sarcoplasmática para hidrolizar proteínas miofibrilares. La capacidad de interacción se refiere a valores de I calculados a partir de medidas de actividad hechas sin ClNa en el medio de incubación, o sea medidas de capacidad proteolítica. Cuando I se calcula a partir de valores de actividad proteolítica, o sea mediciones hechas en presencia de ClNa 15%, se la denomina interacción.

8.1. - Efecto del tiempo de maduración sobre la capacidad de interacción entre las proteínas sarcoplasmáticas y miofibrilares de músculo de anchoíta

La Tabla XII muestra los valores de la capacidad de interacción entre las proteínas sarcoplasmáticas y miofibrilares a través de la maduración. En anchoíta fresca y durante los primeros 70 días del proceso es menor que cero, y mayor después de 90 días. La interacción presenta una alternancia de valores mayores y menores que cero sin una tendencia definida (datos no mostrados).

8.2. - Efecto del tiempo de maduración sobre la capacidad de interacción entre las proteasas ácidas y las proteínas miofibrilares de músculo de anchoíta

Para la autodegradación de las proteínas miofibrilares (datos no mostrados) se sigue el mismo criterio que en el caso de la autodegradación medida a pH neutro y alcalino: se la considera no enzimática.

Los valores de la capacidad de interacción entre las proteasas ácidas y las proteínas miofibrilares son muy bajos (datos no mostrados), globalmente se vio que en anchoíta fresca y hasta los primeros 6 días de maduración son menores que cero, y mayores desde los 13 días en adelante. La interacción, que también es muy baja, presentó alternancia de valores mayores y menores que

TABLA XII: EFECTO DEL TIEMPO DE MADURACION SOBRE LA CAPACIDAD PROTEOLITICA ENDOGENA DE LA FRACCION SARCOPLASMATICA DE MUSCULO DE ANCHOITA (CAPACIDAD DE INTERACCION)

Se incubaron alícuotas de sobrenadante de músculo de anchoíta de distintos estadios de maduración (M 2.2.2., campaña 1982-1983) con una suspensión de proteínas miofibrilares del estadio de maduración correspondiente; buffer fosfato de sodio 20 mM pH 6,2 , durante 20 h a 37°C, volumen final 1 ml (M 4.5.)

Tiempo de maduración (días)	Capacidad de interacción ( $\Delta A_{275} 20 \text{ h. mg}^{-1}$ )
0	-0,12
6	-0,07
13	-0,10
36	-0,03
64	-0,04
70	-0,05
91	0,00
105	0,02
163	0,08
182	0,17
232	0,26
267	0,12
324	0,20

cero sin una tendencia definida (datos no mostrados).

8.3. - Efecto del tiempo de maduración sobre la interacción entre las proteasas alcalinas y las proteínas miofibrilares de músculo de anchoíta

La Tabla XIII muestra los valores de interacción y de capacidad de interacción entre las proteasas alcalinas y las proteínas miofibrilares. La interacción es igual a cero en músculo fresco, y mayor durante todo el proceso. La capacidad de interacción es menor que cero en músculo fresco y mayor durante la maduración.

Los valores de capacidad de interacción indicados en las tablas precedentes muestran globalmente un comportamiento que se puede resumir como: las proteínas miofibrilares de anchoíta fresca y/o de los primeros estadios de maduración no son hidrolizadas, o lo son poco, por las proteasas de las fracciones sarcoplasmáticas correspondientes; al avanzar la maduración la magnitud de esa hidrólisis endógena aumenta.

Entre las hipótesis que justificarían tal comportamiento están:

- cambios en la estructura o en la composición proteica de la fracción miofibrilar.

- disminución de la actividad de algún inhibidor de proteasas sarcoplasmáticas presente en la fracción miofibrilar.

TABLA XIII: EFECTO DEL TIEMPO DE MADURACION SOBRE: a- LA CAPACIDAD, Y LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA ENDOGENAS DE LA FRACCION SARCOPLASMATICA DE MUSCULO DE ANCHOITA, MEDIDAS A pH ALCALINO (INTERACCION Y CAPACIDAD DE INTERACCION)

Se incubaron alícuotas de sobrenadante de músculo de anchoíta en distintos estadios de maduración (M 2.2.2, campaña 1982-1983) con una suspensión de proteínas miofibrilares del estadio de maduración correspondiente; buffer borato de sodio 20 mM pH 8,5, durante 20 h a 37°C, en: a- ClNa 0% y b- ClNa 15%. Volumen final 1 ml (M 4.5)

Tiempo de maduración (días)	a- Capacidad de interacción ( $\Delta A_{275} 20 \text{ h. mg}^{-1}$ )	b- Interacción ( $\Delta A_{275} 20 \text{ h. mg}^{-1}$ )
0	-0,06	0,00
6	0,07	--
13	0,22	0,02
27	0,16	0,11
36	0,22	0,17
50	0,23	0,12
56	0,18	0,13
64	0,19	0,07
70	0,40	0,19
78	0,26	0,08
84	0,32	0,20
105	0,34	0,17
133	0,58	0,30
163	0,42	0,22
182	0,20	0,06
232	0,32	0,02
267	0,47	0,10
324	0,33	0,14

- modificaciones en la estructura de las proteasas sarcoplasmáticas que varíen, por ejemplo, su respuesta a inhibidores, su afinidad por distintos sustratos, etc..

- disminución de la actividad de algún inhibidor de proteasas sarcoplasmáticas presente en la misma fracción.

A fin de estudiar algunos aspectos de la importancia relativa de estas hipótesis se midió la interacción entre las proteínas miofibrilares y sarcoplasmáticas de músculo de anchoíta de distinto grado de maduración.

#### 8.4. - Interacción entre las proteínas miofibrilares y sarcoplasmáticas de músculo de anchoíta de distinto grado de maduración

La Tabla XIV muestra los valores de capacidad de interacción de: b- las proteínas sarcoplasmáticas de músculo en maduración con las proteínas miofibrilares de músculo fresco. d- las proteínas sarcoplasmáticas de músculo fresco con las proteínas miofibrilares de músculo en maduración. a- y c- los controles respectivos.

Dado que las proteasas sarcoplasmáticas alcalinas de anchoíta en maduración hidrolizan a las proteínas miofibrilares de anchoíta fresca ( $b - Sbm_{324}^{Pm_F} > 0$  ;  $a - Sbm_{\frac{1}{2}}^{Pm_F} \leq 0$ ), mientras que las proteínas miofibrilares de anchoíta en

TABLA XIV: CAPACIDAD DE INTERACCION DE LAS PROTEINAS MJO FIBRILARES Y SARCOPLASMATICAS DE MUSCULO DE ANCHOITA EN DISTINTO ESTADO DE MADURACION

Se incubaron con buffer citrato de sodio 20 mM pH 3,5 , o buffer fosfato de sodio 20 mM pH 6,2, o buffer borato de sodio 20 mM pH 8,5, durante 20 h a 37°C, volumen final 1 ml (M4.5.)

- alícuotas de una suspensión de proteínas miofibrilares de anchoíta fresca con: a- alícuotas de sobrenadante de músculo de anchoíta fresca, b- alícuotas de sobrenadante de músculo de anchoíta en maduración.

- alícuotas de una suspensión de proteínas miofibrilares de anchoíta en maduración con: c- alícuotas de sobrenadante de músculo de anchoíta del estadio de maduración correspondiente, d- alícuotas de sobrenadante de anchoíta fresca.

pH	Capacidad de interacción ( $\Delta A_{275} 20 h \cdot mg^{-1}$ )			
	a- $Pm_F Sbm_F$	b- $Pm_F Sbm_{324}$	c- $Pm_{324} Sbm_{324}$	d- $Pm_{324} Sbm_F$
3,5	-0,07	-0,20	0,02	-0,06
6,2	-0,12	-0,23	0,20	-0,16
8,5	-0,15	0,20	0,33	-0,10



maduración no son hidrolizadas (o lo son poco) por las proteasas sarcoplasmáticas de anchoíta fresca ( $d-Sb_{m_F}Pm_{324} \leq 0$ ;  $c-Sb_{m_{324}}Pm_{324} > 0$ ); el aumento de la hidrólisis de proteínas miofibrilares al avanzar la maduración ( $a-Sb_{m_F}Pm_F \leq 0$ ;  $c-Sb_{m_{324}}Pm_{324} > 0$ ), se justificaría (por lo menos en el caso de hidrólisis alcalina) por cambios de la estructura de las proteasas sarcoplasmáticas y/o disminución de la actividad de algún inhibidor de proteasas presente en la fracción sarcoplasmática, y no por variación de la estructura de las proteínas miofibrilares, ni por disminución de la actividad de algún inhibidor miofibrilar de las proteasas sarcoplasmáticas alcalinas.

Las proteasas sarcoplasmáticas ácidas y neutras de anchoíta en maduración hidrolizan poco a las proteínas miofibrilares de anchoíta fresca ( $b-Sb_{m_{324}}Pm_F > 0$ ;  $a-Sb_{m_F}Pm_F \leq 0$ ), lo mismo que las proteasas sarcoplasmáticas de anchoíta fresca a las proteínas miofibrilares de anchoíta en maduración ( $d-Sb_{m_F}Pm_{324} < 0$ ;  $c-Sb_{m_{324}}Pm_{324} > 0$ ) en estos casos el aumento de la hidrólisis de las proteínas miofibrilares observado al avanzar la maduración, aunque más tardíamente que en medio alcalino, ( $a-Sb_{m_F}Pm_F \leq 0$ ;  $c-Sb_{m_{324}}Pm_{324} > 0$ ), se justificaría por modificaciones de la estructura de las proteínas miofibrilares, o disminución de la actividad de algún inhibidor miofibrilar de las proteasas sarcoplasmáticas, acompañado de modificaciones en la estructura de las proteasas sarcoplasmáticas y/o disminu-

ción de la actividad de inhibidores en la fracción sarcoplasmática (recordar que  $d-Sb_{m_p} Pm_{324} < 0$  ).

Los resultados expuestos en los puntos 8.1. a 8.4. coinciden con los de los puntos 5 a 7 en indicar que las proteasas de músculo en maduración están en condiciones mas favorables de hidrolizar las proteínas musculares que las proteasas de músculo fresco; siendo este comportamiento mas notorio en el caso de las proteasas alcalinas.

#### 9 - CAPACIDAD PROTEOLITICA DEL MUSCULO DE ANCHOITA Y GRADO DE MADURACION

El grado de maduración de la anchoíta salada se determina en forma empírica a través de la evaluación sensorial de características tales como: color, aroma, textura y sabor.

La Figura 21 muestra el grado de maduración de la anchoíta salada durante la campaña 1980 - 1981 , dado que se obtuvo maduración completa en sólo 200 días se la considera rápida. Como se puede ver esta aceleración del proceso coincide, ya en los primeros días del proceso (menos de 60 días), con la existencia en el músculo en maduración de capacidades autolíticas de seis (pH 8,5), siete (pH 3,5) y once (pH 6,2) veces mayores que las correspondientes en músculo fresco.

En la Figura 22 se ve el grado de maduración de la

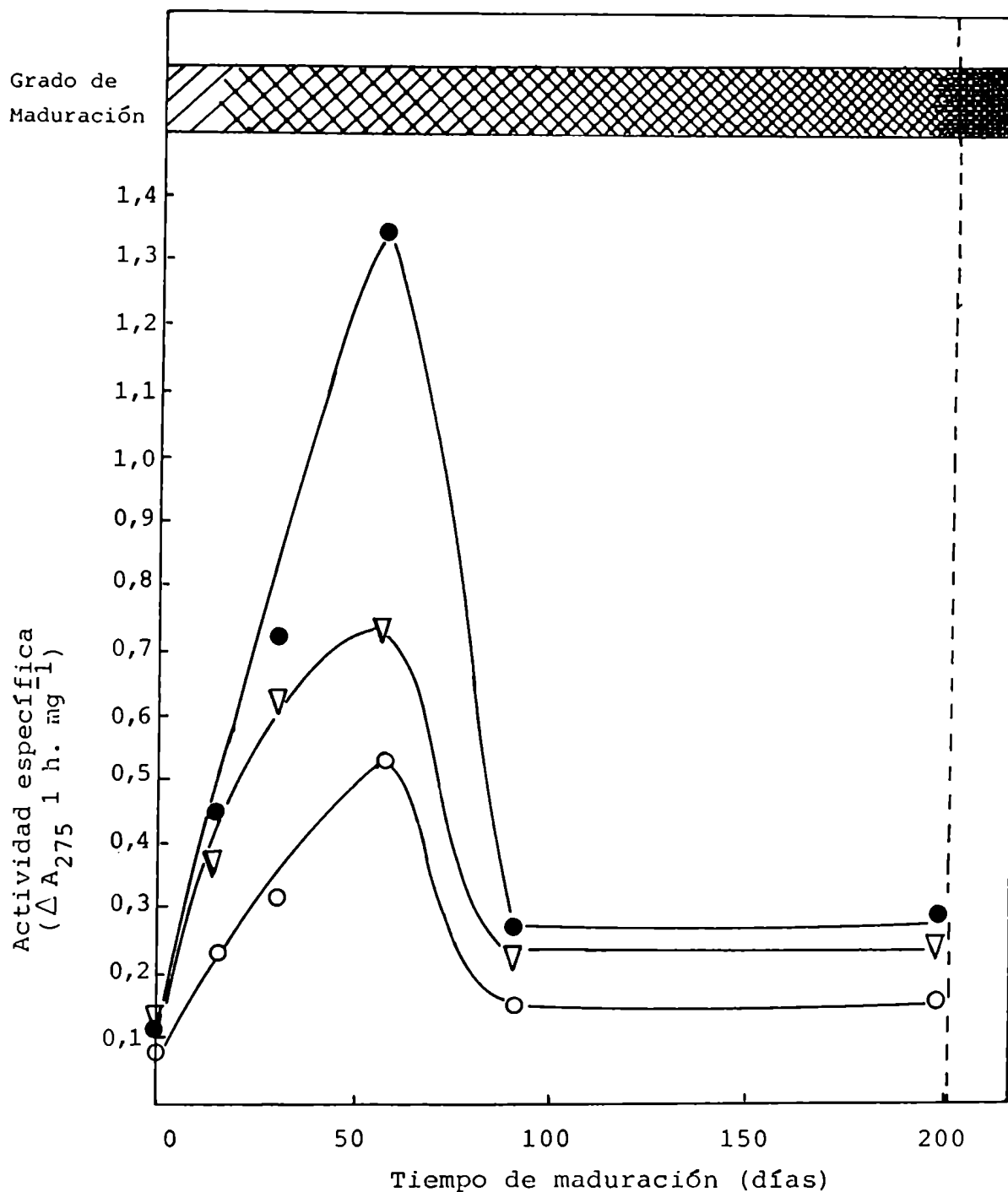


FIGURA 21: CAPACIDAD AUTOLITICA DE LAS PROTEINAS DE MUSCULO Y GRADO DE MADURACION. CAMPAÑA 1980 - 1981

Evaluación sensorial del grado de maduración:

▨ inmadura; ▩ parcialmente madura; ■ madura

Capacidad autolítica de las proteínas de músculo:

○—○ sobrenadante de músculo, pH 3,5, ClNa 0%, 1 h a 37°C (Figura 10)

●—● sobrenadante de músculo, pH 6,2, ClNa 0%, 1 h a 37°C (Figura 7)

▽—▽ sobrenadante de músculo, pH 8,5, ClNa 0%, 1 h a 37°C (Figura 16)

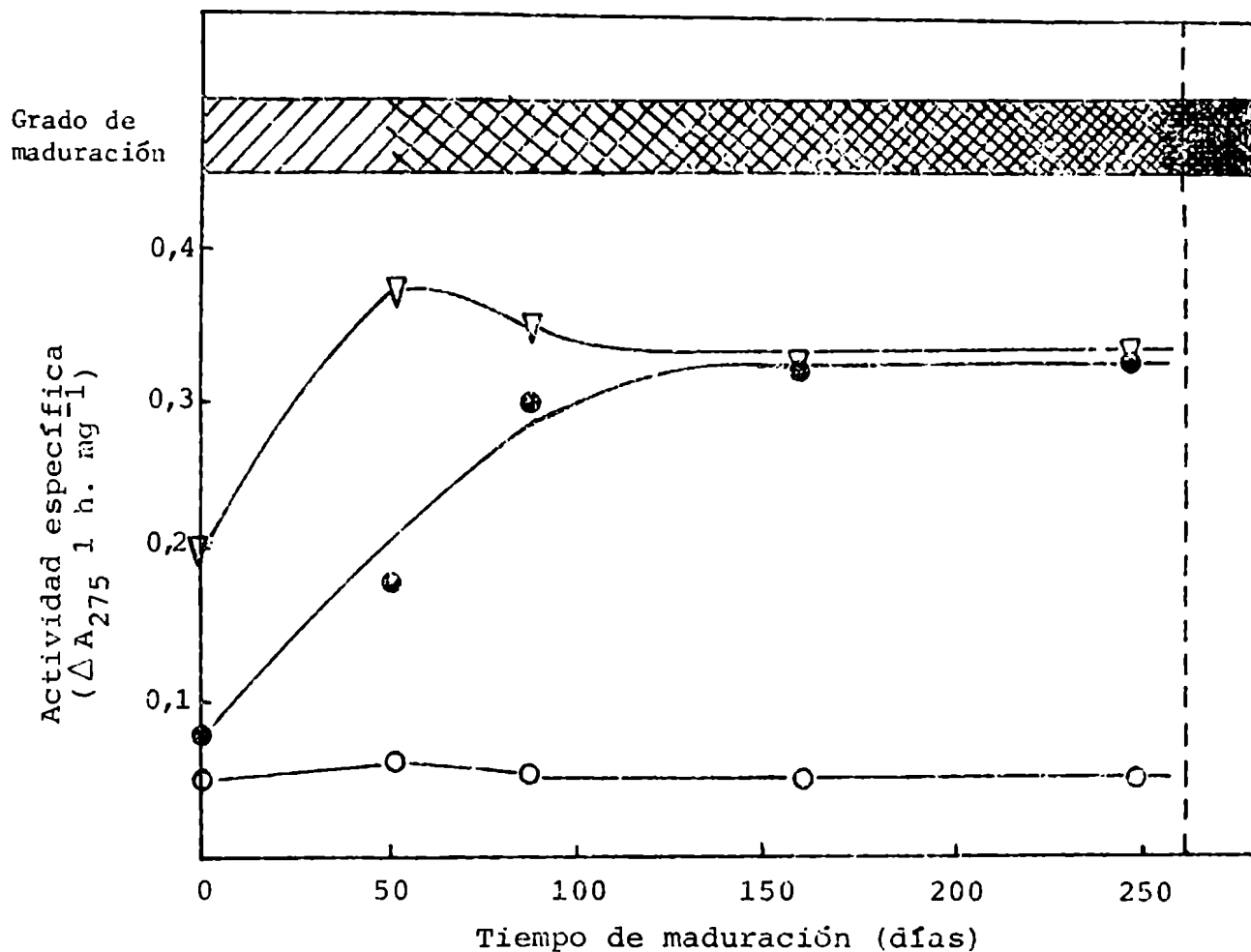





FIGURA 22: CAPACIDAD AUTOLITICA DE LAS PROTEINAS DE MUSCULO Y GRADO DE MADURACION. CAMPAÑA 1979 - 1980

Evaluación sensorial del grado de maduración:

 inmadura;  parcialmente madura;  madura

Capacidad autolítica de las proteínas de músculo:

- sobrenadante de músculo, pH 3,5, ClNa 0%, 1 h a 37°C (Figura 12)
- sobrenadante de músculo, pH 6,2, ClNa 0%, 1 h a 37°C (Figura 9)
- ▽--▽ sobrenadante de músculo, pH 8,5, ClNa 0%, 1 h a 37°C (Figura 18)

anchoíta salada durante la campaña 1979 - 1980. El producto maduro se obtuvo en el término de 9 meses, que es el usual en la industria nacional. Si bien los valores de capacidad autolítica del músculo fresco no son muy diferentes a los de la campaña 1980 - 1981, al avanzar el proceso nunca se incrementaron en más de dos veces a pH 8,5 y cuatro veces a pH 6,2 , (a pH 3,5 fue aproximadamente constante) y ésto ocurrió alrededor de los 80 días de maduración. Los valores de capacidad autolítica muscular mas altos medidos durante esta campaña son, según el pH, entre dos y diez veces menores que los correspondientes valores máximos de la campaña 1980 - 1981.

La Figura 23 muestra el grado de maduración de la campaña 1982 - 1983. Se puede observar que el proceso fue mas lento que lo habitual, completándose la maduración en 11 meses. Coincidiendo con ésto se ve que los valores de capacidad autolítica del músculo fresco son algo menores que los del material usado en otras campañas. Sólo después de 150 a 200 días de maduración la capacidad autolítica aumentó dos (pH 6,2), tres (pH 8,5) y cinco (pH 3,5) veces, alcanzando valores alrededor de 50% menores que los que en la campaña 1979 - 1980 ya se registraban antes de los 60 días de maduración.

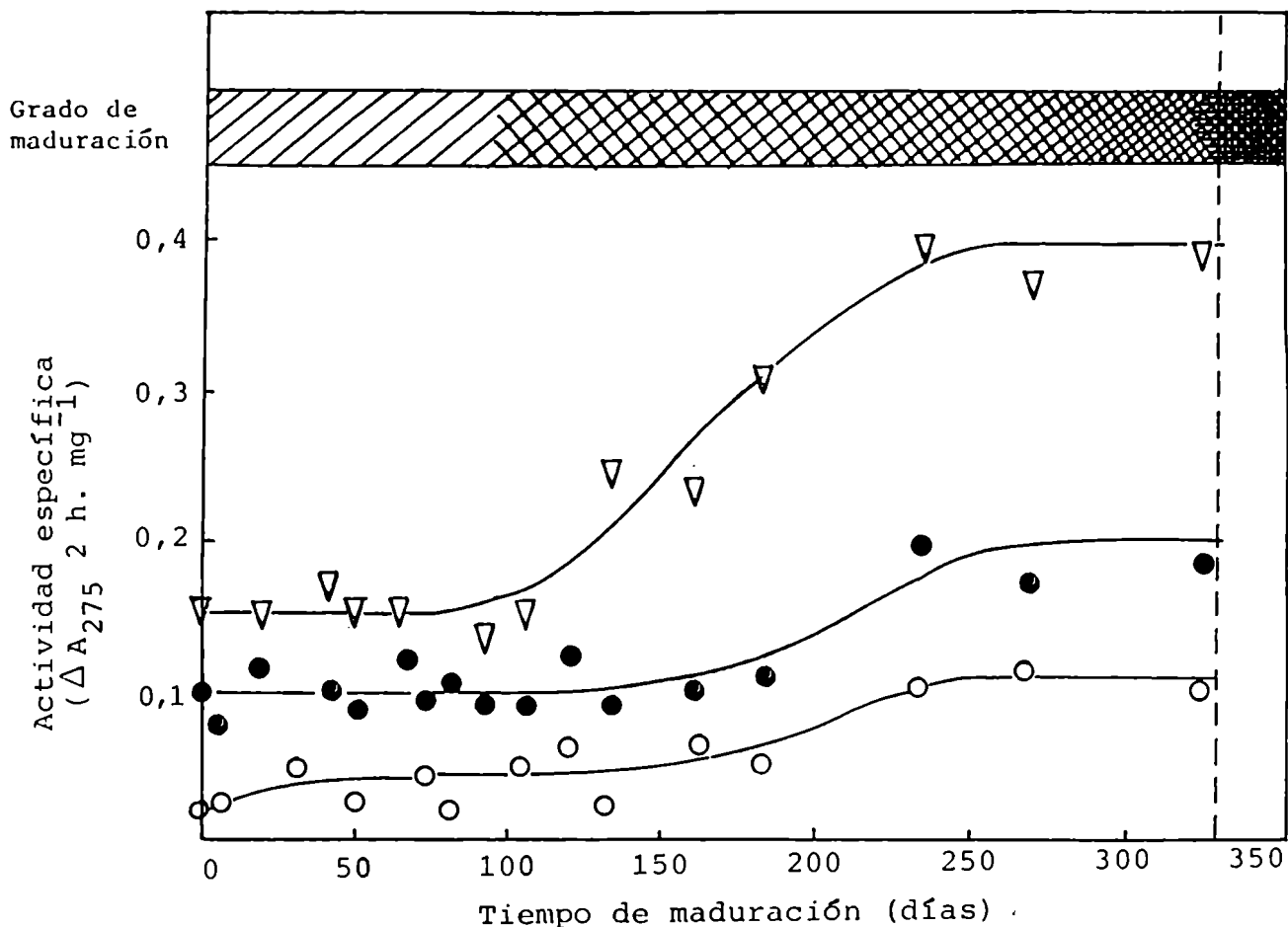


FIGURA 23: CAPACIDAD AUTOLITICA DE LAS PROTEINAS DE MUSCULO Y GRADO DE MADURACION. CAMPAÑA 1982 - 1983

Evaluación sensorial del grado de maduración:

▨ inmadura; ▩ parcialmente madura; ■ madura

Capacidad autolítica de las proteínas de músculo:

○—○ sobrenadante de músculo, pH 3,5, ClNa 0%, 2 h a 37°C (Figura 11)

●—● sobrenadante de músculo, pH 6,2, ClNa 0%, 2 h a 37°C (Figura 8)

▽—▽ sobrenadante de músculo, pH 8,5, ClNa 0%, 2 h a 37°C (Figura 17)

Y LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE VISCERAS DE ANCHOITA

En la Figura 24 se ve que la capacidad autolítica de las vísceras de anchoíta es, durante todo el proceso, mayor o del mismo orden que la capacidad autolítica de las vísceras frescas. La actividad autolítica es mayor durante los primeros 40 días del proceso, y después disminuye a valores aproximadamente constantes.

En la Tabla XV están indicados los porcentajes de inhibición por ClNa 15% de la capacidad autolítica de las proteasas viscerales; es mayor en las vísceras de anchoíta fresca que en las de anchoíta en maduración.

La Figura 25 muestra los valores de capacidad y actividad caseinolítica de las vísceras de anchoíta. Pasados 30 días de maduración disminuyen respecto del valor en vísceras frescas, manteniéndose después aproximadamente constantes.

En la Tabla XVI se dan los porcentajes de inhibición por ClNa 15% de la capacidad proteolítica sobre caseína. Se ve que es del mismo orden en vísceras de anchoíta frescas y en maduración.

11 - EFECTO DEL TIEMPO DE MADURACION SOBRE LA CAPACIDAD Y LA ACTIVIDAD DE LAS PROTEASAS ACIDAS DE VISCERAS DE ANCHOITA

Solo se registró proteolisis en medio ácido en an-

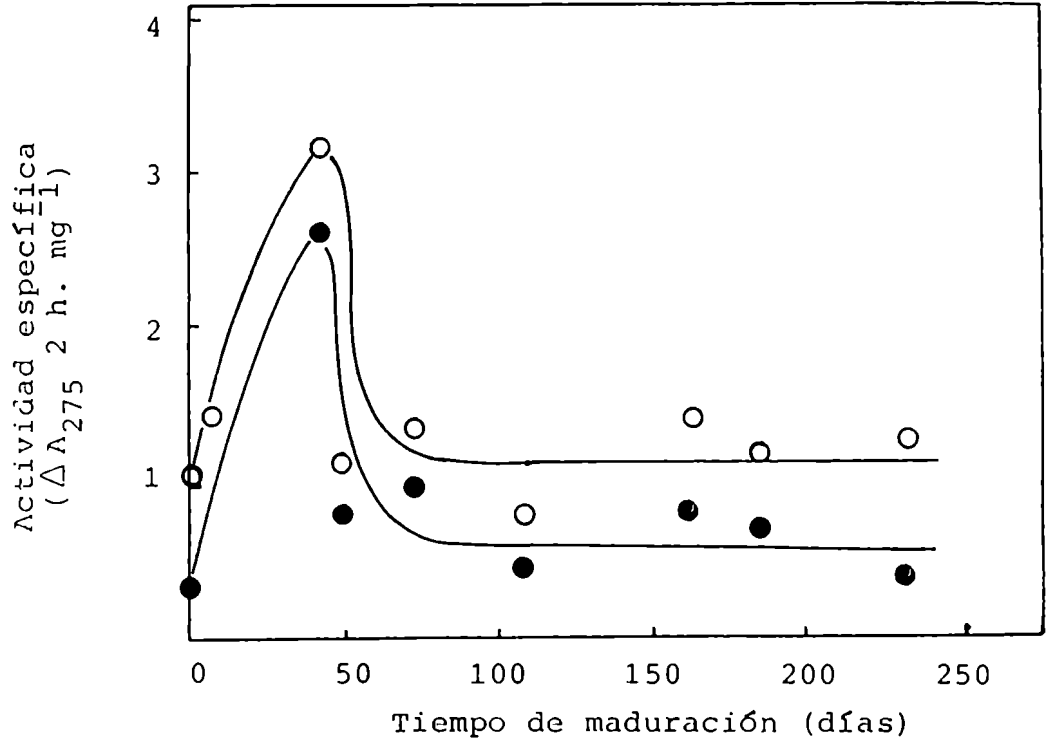


FIGURA 24: EFECTO DEL TIEMPO DE MADURACION SOBRE LA CAPACIDAD Y LA ACTIVIDAD AUTOLITICA DE VISCERAS DE ANCHOITA

Se incubaron alícuotas de sobrenadante de vísceras de anchoíta de distintos estadios de maduración (M 2.2.2, campaña 1982-1983) con buffer fosfato de sodio 20 mM pH 6,2, en O—O ClNa 0% y ●—● ClNa 15%, durante 2 h a 37°C, volumen final 1 ml (M 4.5)



TABLA XV : INHIBICION POR ClNa 15% DE LA CAPACIDAD AUTO-  
LITICA DE LAS VISCERAS DE ANCHOITA A TRAVES DE LA MADU-  
RACION

Se calculó según:

$$\frac{(\text{capacidad autolítica} - \text{actividad autolítica})}{\text{capacidad autolítica}} \times 100$$

Tiempo de maduración (días)	Inhibición por ClNa (%)
0	71
40	16
50	40
56	25
105	41
163	41
182	41
232	41

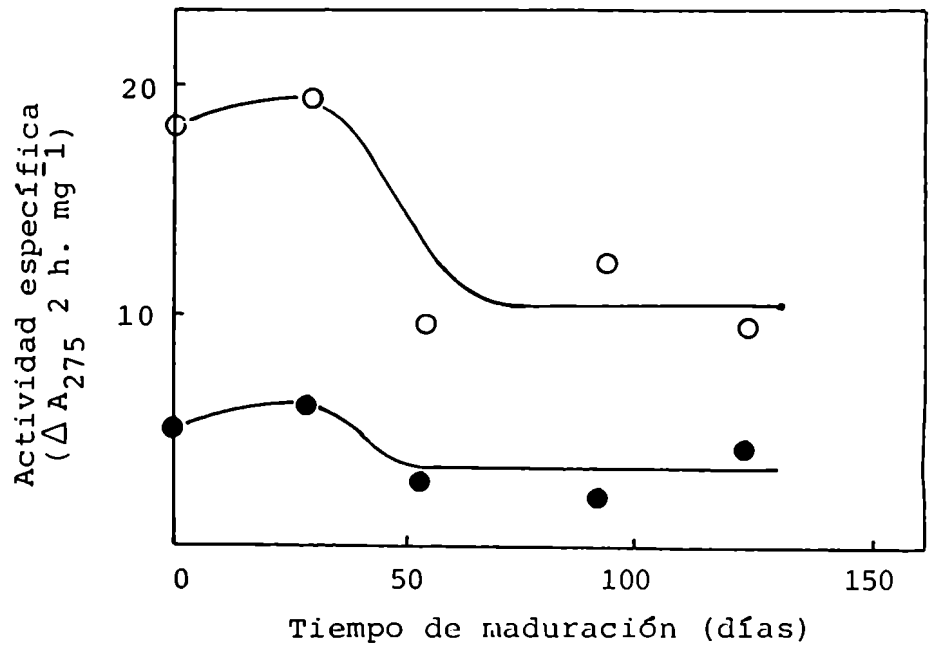


FIGURA 25: EFECTO DEL TIEMPO DE MADURACION SOBRE LA CAPACIDAD Y LA ACTIVIDAD CASEINOLITICA DE VISCERAS DE ANCHOI-TA

Se incubaron alícuotas de sobrenadante de vísceras de anchoíta de distintos estadios de maduración (M 2.2.1, campaña 1980-1981) con caseína 0,5%, buffer fosfato de sodio 20 mM pH 6,2, en ○—○ ClNa 0% y ●—● ClNa 15%, durante 2 h a 37°C, volumen final 1 ml (M 4.1)

TABLA XVI : INHIBICION POR ClNa 15% DE LA CAPACIDAD CASEINOLITICA DE LAS VISCERAS DE ANCHOITA A TRAVES DE LA MADURACION

Se calculó según:

$$\frac{(\text{capacidad caseinolítica} - \text{actividad caseinolítica})}{\text{capacidad caseinolítica}} \times 100$$

Tiempo de maduración (días)	Inhibición por ClNa (%)
0	70
30	68
56	69
91	73
120	73

choíta fresca con el paquete visceral completo. En las vísceras remanentes después de la evisceración parcial post-presalado, anchoíta en maduración, ya no es posible medir actividad proteolítica a pH 3,5 .

12 - EFFECTO DEL TIEMPO DE MADURACION SOBRE LA CAPACIDAD Y LA ACTIVIDAD DE LAS PROTEASAS ALCALINAS DE VISCERAS DE ANCHOITA

En la Figura 26 se ve que la capacidad y la actividad autolítica de las proteasas alcalinas de las vísceras de anchoíta en maduración son mayores que las de las vísceras de anchoíta fresca durante los primeros 40 días del proceso, después disminuyen a valores menores que la capacidad proteolítica de las vísceras frescas.

Los valores de la Tabla XVII indican que la inhibición de la capacidad autolítica alcalina por ClNa 15% es mayor en las vísceras de anchoíta fresca que en la parcialmente madura.

En las curvas de las Figuras 27 , 28 y 29 puede observarse que la capacidad y la actividad caseinolítica alcalina, las tipo tripsina y las tipo quimotripsina de las vísceras de anchoíta de hasta aproximadamente 40 días de maduración son algo mayores que las de las vísceras de anchoíta fresca, después disminuyen a valores aproximadamente constantes. También se ve que la capacidad de las proteasas tipo tripsina y tipo quimotripsina de las

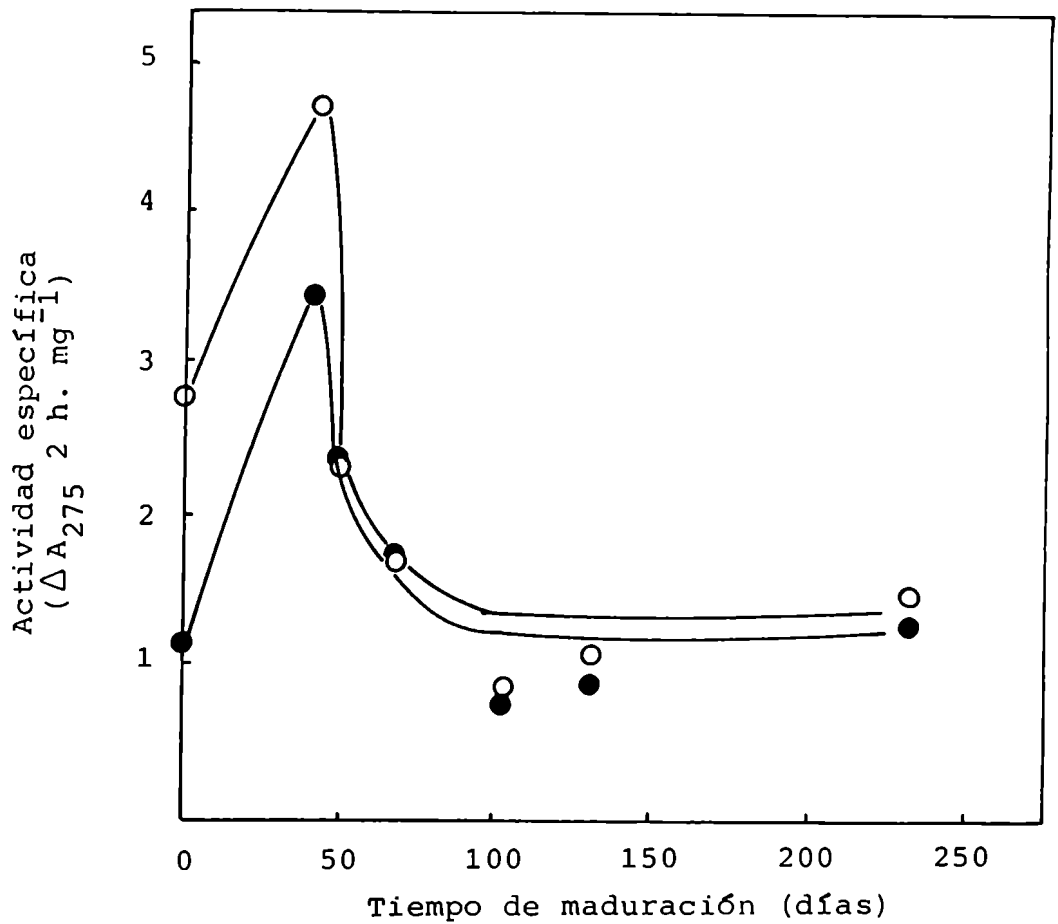


FIGURA 26: EFECTO DEL TIEMPO DE MADURACION SOBRE LA CAPACIDAD Y LA ACTIVIDAD AUTOLITICA DE VISCERAS DE ANCHOI-TA, MEDIDAS A pH ALCALINO

Se incubaron alícuotas de sobrenadante de vísceras de anchoíta de distintos estadios de maduración (M 2.2.2. campaña 1982-1983) con buffer borato de sodio 20 mM pH 8,5, en: ○—○ ClNa 0% y ●—● ClNa 15%, durante 2 h a 37°C, volumen final 1 ml (M 4.5).

TABLA XVII : INHIBICION POR ClNa 15% DE LA CAPACIDAD AUTOLITICA DE LAS VISCERAS DE ANCHOITA, MEDIDA A pH ALCALINO, A TRAVES DE LA MADURACION

Se calculó según:

$$\frac{(\text{capacidad autolítica} - \text{actividad autolítica})}{\text{capacidad autolítica}} \times 100$$

Tiempo de maduración (días)	Inhibición por ClNa (%)
0	59
42	28
50 a 250	10

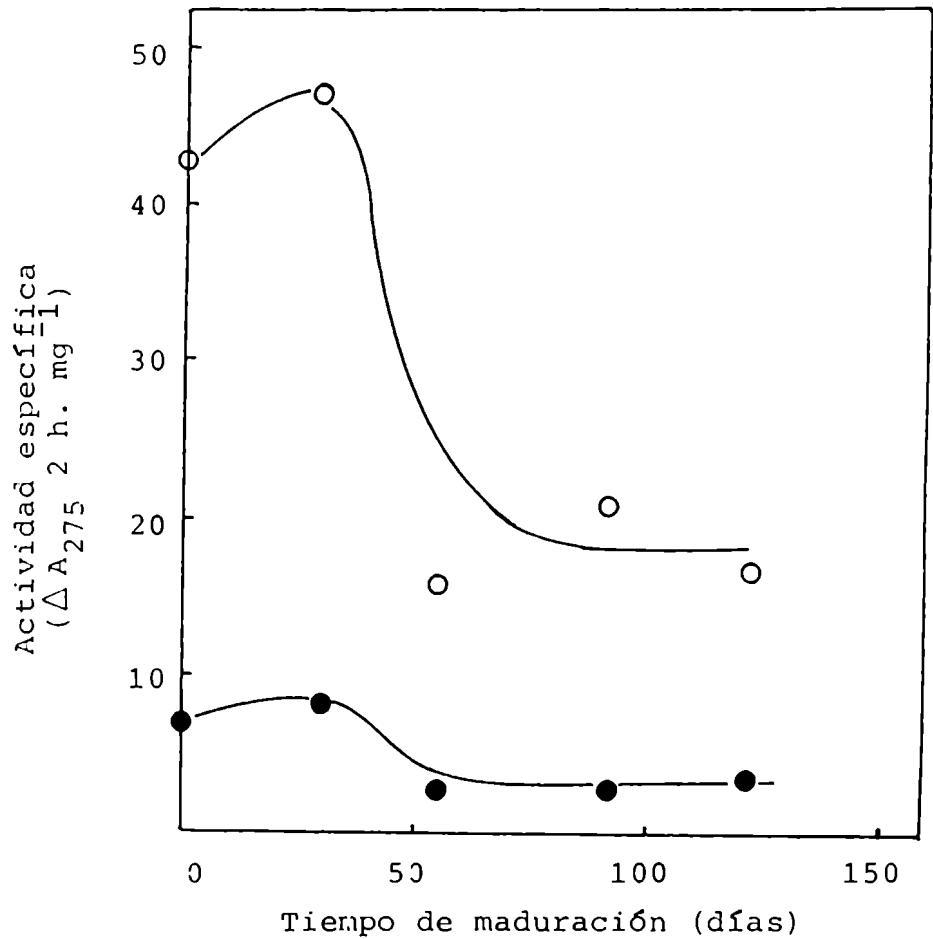


FIGURA 27: EFECTO DEL TIEMPO DE MADURACION SOBRE LA CAPACIDAD Y LA ACTIVIDAD CASEINOLITICA DE VISCERAS DE ANCHOITA, MEDIDAS A pH ALCALINO

Se incubaron alícuotas de sobrenadante de vísceras de anchoíta de distintos estadios de maduración (M 2.2.1, campaña 1980-1981) con caseína 0,5%, buffer borato de sodio 20 mM pH 8,5, en ○—○ ClNa 0% y ●—● ClNa 15%, durante 2 h a 37°C, volumen final 1 ml. (M 4.1.)

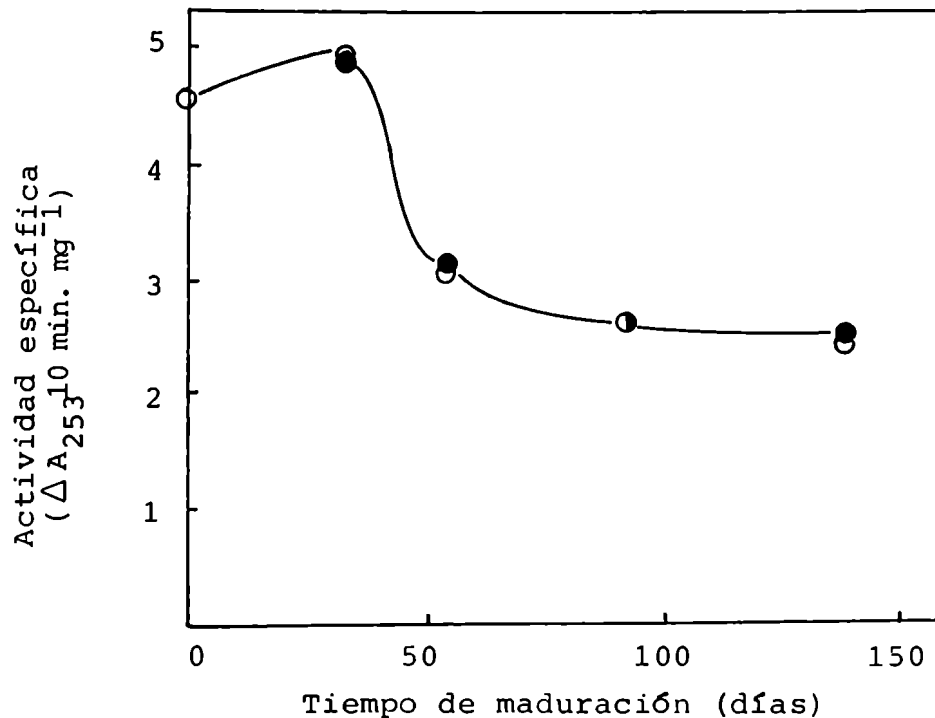


FIGURA 28: EFECTO DEL TIEMPO DE MADURACION SOBRE LA CAPACIDAD Y LA ACTIVIDAD DE TIPO TRIPSINA DE VISCERAS DE ANCHOITA

Se incubaron alícuotas de sobrenadante de vísceras de anchoíta de distintos estadios de maduración (M 2.2.1, campaña 1980-1981) con BAEE 0,5 mM, buffer Tris-ClH 50 mM pH 8,0, y O—O ClNa 0% ó ●—● ClNa 15%, durante 10 min a temperatura ambiente; volumen final 1 ml (M 4.3)



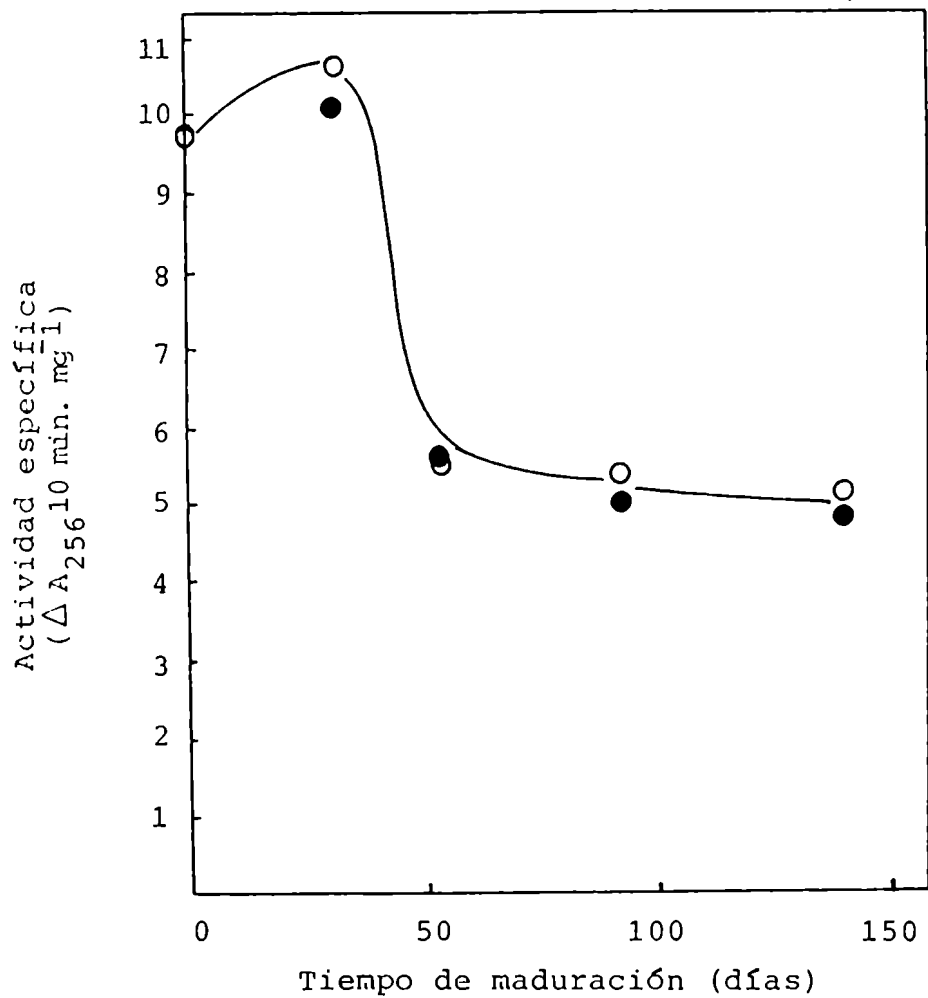


FIGURA 29: EFECTO DEL TIEMPO DE MADURACION SOBRE LA CAPACIDAD Y LA ACTIVIDAD DE TIPO QUIMOTRIPSINA DE VISCERAS DE ANCHOITA

Se incubaron alícuotas de sobrenadante de vísceras de distintos estadíos de maduración (M 2.2.1, campaña 1980-1981) con BTEE 0,5 mM, buffer Tris-ClH 55 mM pH 7,8 , Cl<sub>2</sub>Ca 55 mM, y O—O ClNa 0% ó ●—● ClNa 15%, durante 10 min a temperatura ambiente; volumen final 1 ml (M 4.4)

vísceras de anchoíta parcialmente madura no es inhibida por ClNa 15%.

En la Tabla XVIII se observa que el porcentaje de inhibición por ClNa 15% de la capacidad caseinolítica alcalina es del mismo orden en las vísceras de anchoíta fresca y parcialmente madura.

Dado que por razones metodológicas no se midió la capacidad y actividad proteolítica de cada víscera por separado, los valores medidos en estadios de maduración distintos muestran el comportamiento global del paquete visceral remanente; este comportamiento no solo es afectado por las condiciones y avance del proceso, sino también por la composición del paquete visceral; por ejemplo: los ciegos pilóricos, ricos en enzimas, se degradan durante los primeros meses de la maduración; mientras que la parte final del intestino, pobre en enzimas, se mantiene hasta el final del proceso.

### 13 - CAMBIOS EN LA COMPOSICION DE LAS MIOFIBRILLAS DE ANCHOITA DURANTE LA MADURACION

En la Figura 30 se ve que, comparando con la distribución electroforética de las miofibrillas de músculo fresco, uno de los cambios más notorios a través de la maduración es la disminución de la cadena de miosina pesada, y que esto ocurre ya en las miofibrillas de

TABLA XVIII: INHIBICION POR ClNa 15% DE LA CAPACIDAD CASEINOLITICA DE LAS VISCERAS DE ANCHOITA, MEDIDA A pH AL-CALINO, A TRAVES DE LA MADURACION

Se calculó según:

$$\frac{(\text{capacidad caseinolítica} - \text{actividad caseinolítica})}{\text{capacidad caseinolítica}} \times 100$$

Tiempo de maduración (días)	Inhibición por ClNa (%)
0	83
30	83
56	83
91	86
120	80



FIGURA 30: CAMBIOS EN LA COMPOSICION DE LAS MIOFIBRI-  
LLAS DURANTE LA MADURACION

Electroforetogramas en gel de poliacrilamida - SDS de las proteínas miofibrilares de músculo: a- fresco, b- presalado, c- 13 días, d- 20 días, e- 36 días, f- 50 días, g- 133 días, h- 267 días, i- 324 días. Se sembraron 75 - 80  $\mu$ g de proteína en cada gel.

músculo presalado; en este caso la variación se debe a extracción de miosina desde la miofibrilla, dado que, por penetración de sal, en algún momento del presalado la concentración de ClNa es la necesaria para que se produzca extracción (69) (70) .

La Figura 31 muestra que la cadena de miosina pesada en los homogenatos de músculo fresco y músculo presalado son comparables. Al separar del homogenato la fracción miofibrilar (M.3.) la cadena de miosina pesada del músculo presalado disminuye mucho, pero como se ve en la Figura 32, todavía se la recupera parcialmente en la fracción insoluble que se separa de las proteínas sarcoplasmáticas y en los lavados de las miofibrillas.

En la Figura 33 se observa que a los 13 días de maduración la cadena de miosina pesada y las proteínas de alto peso molecular (excepto las que no entran al gel) han disminuído drásticamente respecto de las correspondientes fracciones de músculo fresco: homogenato (representa las proteínas totales presentes en el músculo), miofibrillas, fracción insoluble y lavados. A los 133 días de maduración no se ve miosina pesada y se acentuó la disminución de todas las proteínas en todas las fracciones.

En la Figura 30 los cambios en la composición de las miofibrillas que se aprecian más claramente durante la maduración son: la ya mencionada disminución de la

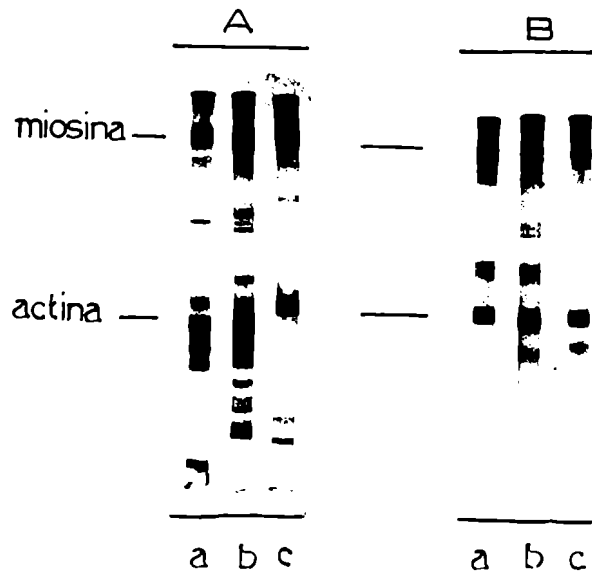


FIGURA 31: PROTEINAS TOTALES Y MIOFIBRILARES DE MUSCULO FRESCO Y PRESALADO

Electroforetogramas en gel de poliacrilamida - SDS de:  
A- proteínas de músculo fresco, B- proteínas de músculo presalado 24 h.

a y d: proteínas totales.

b y e: proteínas miofibrilares no lavadas.

c y f: proteínas miofibrilares.

Se sembraron 100 µg de proteína en cada gel.

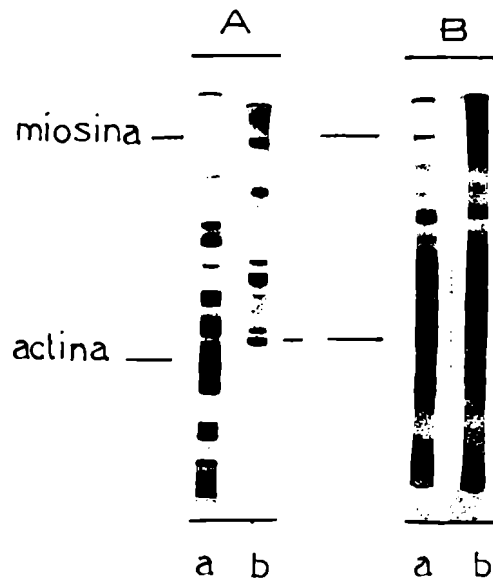


FIGURA 32: PROTEINAS MIOFIBRILARES DE MUSCULO FRESCO Y PRESALADO FUERA DE LA FRACCION MIOFIBRILAR

Electroforetogramas en gel de poliacrilamida - SDS de:  
A- proteínas de músculo fresco, B- proteínas de músculo presalado 24 h.

a y c: proteínas en los lavados de las miofibrillas.  
b y d: proteínas en la fracción insoluble separada de la fracción sarcoplasmática.

Se sembraron 100  $\mu$ g de proteína en cada gel.

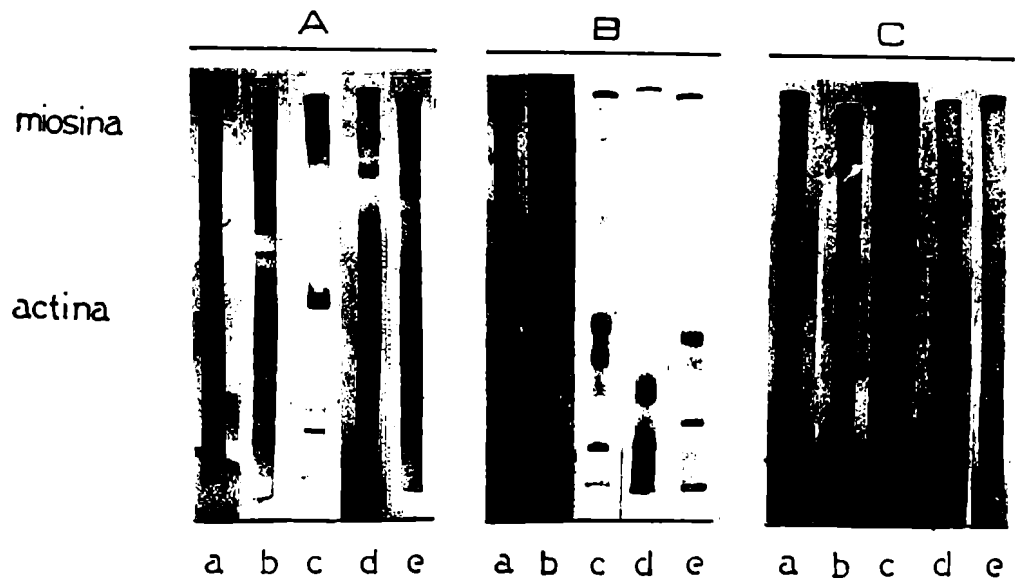


FIGURA 33: SECUENCIA DE SEPARACION DE LAS MIOFIBRILLAS DE MUSCULO FRESCO Y EN MADURACION

Electroforetogramas en gel de poliacrilamida - SDS de:  
A- proteínas de músculo fresco, B- proteínas de músculo de 13 días de maduración, C- proteínas de músculo de 133 días de maduración.

a, f y k: proteínas totales.

b, g y l: proteínas miofibrilares no lavadas.

c, h y m: proteínas miofibrilares.

d, i y n: proteínas en los lavados de las miofibrillas.

e, j y o: proteínas en la fracción insoluble separada de la fracción sarcoplasmática.

Se sembraron 100 µg de proteína en cada gel.



cadena de miosina pesada, disminución de las proteínas de alto peso molecular que no entran al gel, disminución de actina, aumento de las proteínas de peso molecular menor que 45.000 Dt, y aparición de productos de degradación que conforman un gradiente de pesos moleculares (evidenciada por una tinción débil con azul de Coomasie en todo el gel).

#### 14 - CAMBIOS EN LAS PROTEINAS SARCOPLASMATICAS DE MUSCULO DE ANCHOITA DURANTE LA MADURACION

En la Figura 34 se ve que en los primeros 13 días de maduración hay una importante disminución de las proteínas de peso molecular mayor que 45.000 Dt . En esta-díos más avanzados también disminuyen las proteínas de peso molecular menor. La proteína de 45.000 Dt es la que más se conserva durante el proceso.

Dos de los hechos que aparecen como causa de los cambios en la composición proteica del músculo durante la maduración son:

- en los primeros 2 a 3 días del proceso: extracción por ClNa y pérdida parcial de algunas proteínas junto al exudado durante la prensa (Figuras 31 y 32)

- durante todo el proceso: proteólisis endógena, dado que como se vio en los puntos 5 a 7 y 8.1. a 8.4.

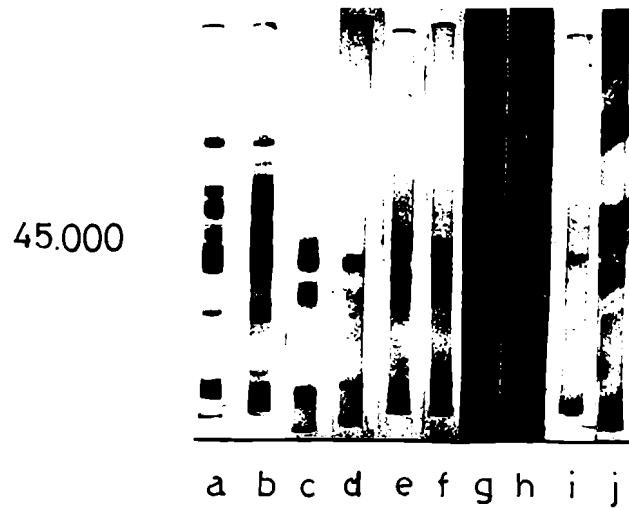


FIGURA 34: CAMBIOS EN LA COMPOSICION DE LAS PROTEINAS SARCOPLASMATICAS DURANTE LA MADURACION

Electroforetogramas en gel de poliacrilamida - SDS de las proteínas sarcoplasmáticas de músculo: a- fresco, b- presalado, c- 6 días, d- 13 días, e- 20 días, f- 27 días, g- 50 días, h- 133 días, i- 267 días, j- 324 días. Se sembraron 100 µg de proteína en cada gel.

la capacidad y actividad proteolítica del músculo persisten a través de toda la maduración. Los resultados de las experiencias que se exponen a continuación (punto 15) concuerdan con esta hipótesis.

15 - INTERACCION DE LAS PROTEINAS MIOFIBRILARES Y SARCOPLASMATICAS DE MUSCULO DE ANCHOITA

En la Figura 35 se ve que la capacidad de las proteasas de la fracción sarcoplasmática de músculo de 13 días y de 324 días de maduración para degradar proteínas miofibrilares de anchoíta fresca, a pH ácido, neutro o alcalino, es mayor que la de las proteasas de músculo fresco. En la Figura 35 B- y C- se ve que la degradación de la cadena pesada de miosina es mayor que en A-. En ambos estadios de maduración las proteasas alcalinas muestran mayor capacidad hidrolítica. La Figura 35 C- y D- muestra que la presencia de ClNa 15% en el medio de incubación inhibe parcialmente la proteólisis, por ejemplo: se ve que la degradación parcial de actina es menor que cuando se incuba en ausencia de ClNa. En la Figura 35 A- y D- se ve que aún en concentraciones de ClNa 15%, la hidrólisis de las proteínas miofibrilares de músculo fresco por las proteasas sarcoplasmáticas de músculo maduro es mayor que la debida a las proteasas de músculo fresco en ausencia de ClNa.

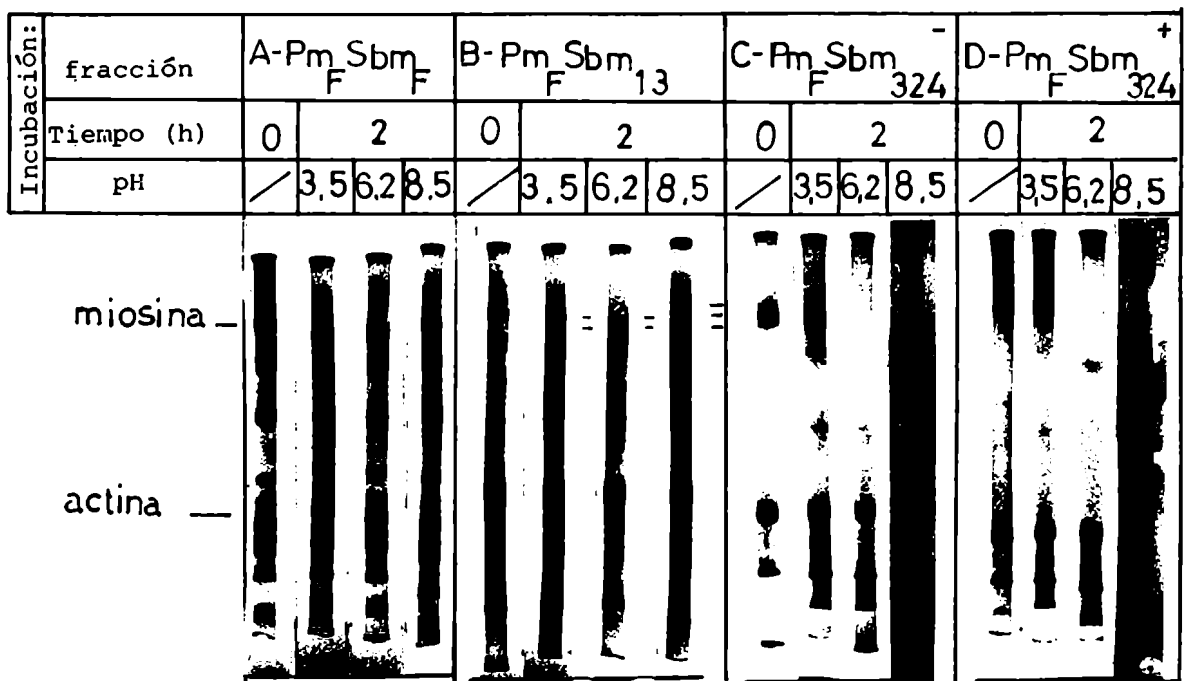
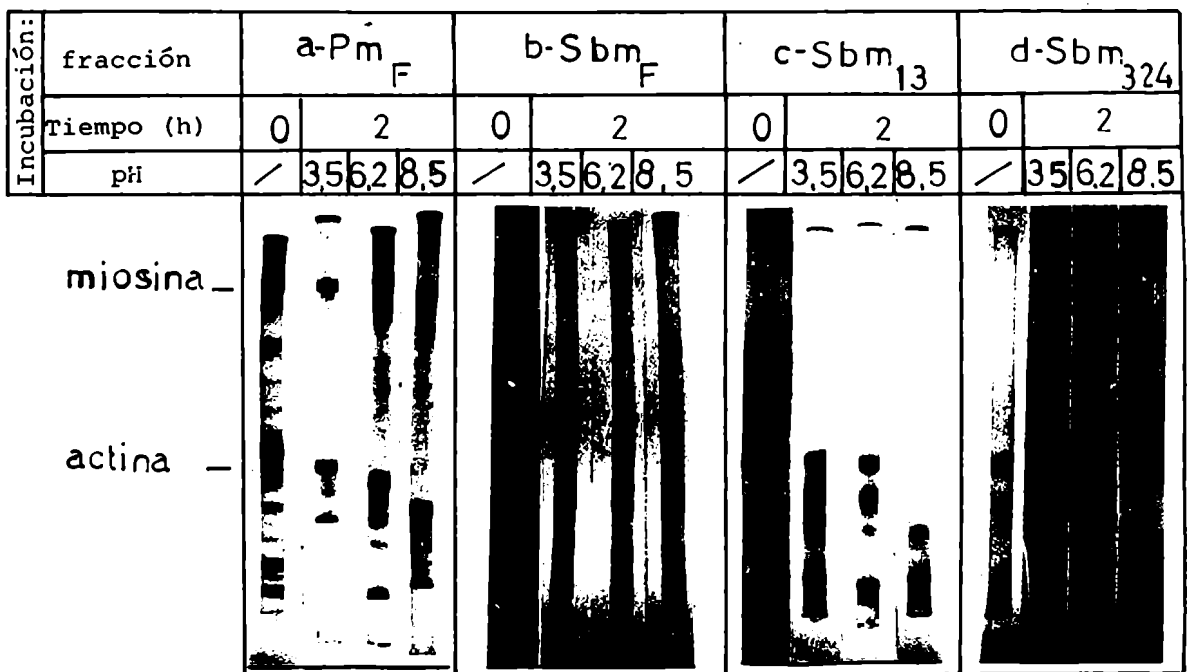


FIGURA 35: INTERACCION DE LAS PROTEINAS MIOFIBRILARES Y SARCOPLASMATICAS DE MUSCULO DE ANCHOITA

Electroforetogramas en gel de poliacrilamida - SDS; muestran la degradación de las proteínas miofibrilares de músculo fresco por acción de: A- proteínas sarcoplasmáticas de músculo fresco, B- proteínas sarcoplasmáticas de músculo de 13 días de maduración, C- proteínas sarcoplasmáticas de músculo maduro (Sbm<sub>324</sub><sup>-</sup>), D- proteínas sarcoplasmáticas de músculo maduro, incubación en ClNa 15% (Sbm<sub>324</sub><sup>+</sup>). Se tomaron como referencia los electroforetogramas a, b, c, d y los de las proteínas sin incubar: a- autodegradación de las proteínas miofibrilares de músculo fresco, b- autólisis de las proteínas sarcoplasmáticas de músculo fresco, c- autólisis de las proteínas sarcoplasmáticas de músculo de 13 días de maduración, d- autólisis de las proteínas sarcoplasmáticas de músculo maduro (Sbm<sub>324</sub>)

16 - INTERACCION DE LAS PROTEINAS MIOFIBRILARES Y LAS  
PROTEASAS DE VISCERAS DE ANCHOITA

La Figura 36 a- muestra la capacidad y la actividad de las proteasas viscerales de anchoíta fresca para hidrolizar proteínas miofibrilares de músculo fresco. A pH ácido y alcalino ambas son mayores que a pH neutro. Además se ve que a pH ácido el ClNa 15% inhibe parcialmente la degradación.

En la Figura 36 b- se ve la capacidad de las proteasas de las vísceras remanentes en anchoíta de 50 días de maduración para hidrolizar las proteínas miofibrilares de músculo de 50 días de maduración: es mayor a pH alcalino que a pH neutro, y mayor a pH neutro que a pH ácido. A los tres pH utilizados el ClNa 15% inhibe parcialmente la degradación.

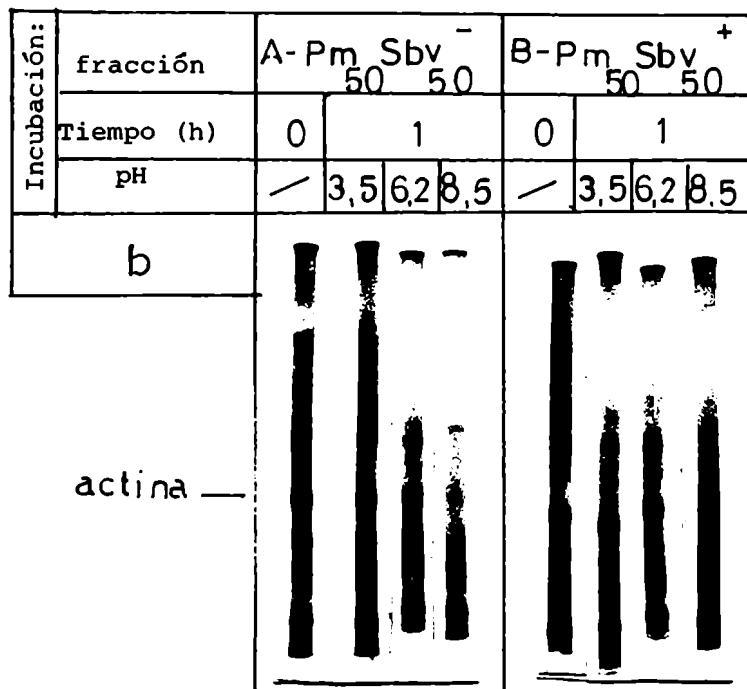
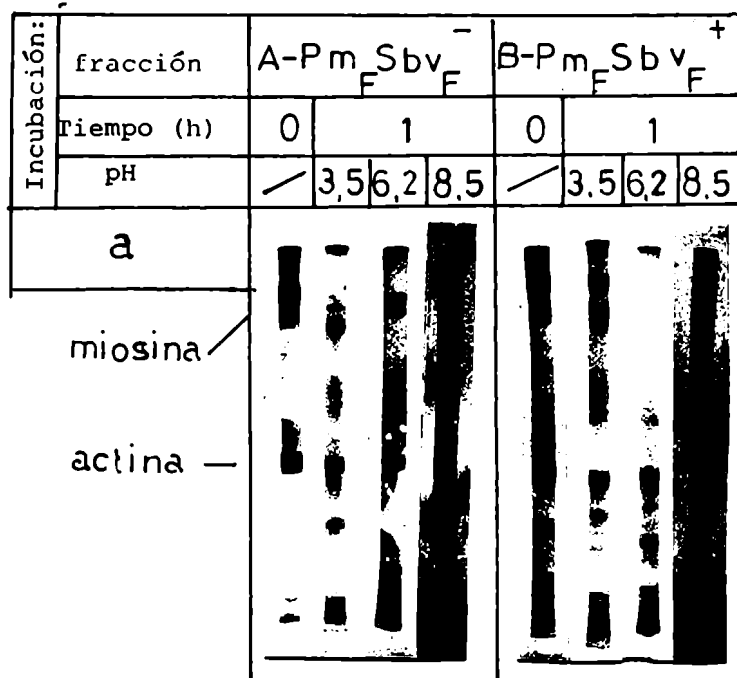


FIGURA 36: INTERACCION DE LAS PROTEINAS MIOFIBRILARES Y LAS PROTEASAS DE VISCERAS DE ANCHOITA

Electroforetogramas en gel de poliacrilamida - SDS, muestran:

a- degradación de las proteínas miofibrilares de músculo fresco por acción de: A- proteasas de vísceras de anchoíta fresca (Sbv<sub>F</sub><sup>-</sup>), B- proteasas de vísceras de anchoíta fresca, incubación en ClNa 15% (Sbv<sub>F</sub><sup>+</sup>)

b- degradación de las proteínas miofibrilares de músculo de 50 días de maduración por acción de: A- proteasas de vísceras de anchoíta de 50 días de maduración (Sbv<sub>50</sub><sup>-</sup>), B- proteasas de vísceras de anchoíta de 50 días de maduración, incubación en ClNa 15% (Sbv<sub>50</sub><sup>+</sup>)

La fracción enzimática (Sbv<sub>F</sub><sup>-</sup> y Sbv<sub>50</sub><sup>-</sup>) no contribuye a la formación de ninguna banda de proteína debido a que su concentración es muy baja.

DISCUSSION

Es bien conocido que después de la captura el pescado es especialmente susceptible a la acción de microorganismos, tanto de la flora que le es propia (proveniente del tracto intestinal, piel, agallas, etc.) como de la que lo contamina durante su manipuleo en la pesca. Los cambios degradativos que sufre se atribuyen a la acción de las enzimas de sus propios tejidos y de la microflora.

El proceso de salado y maduración de anchoíta previene efectivamente la evolución de esa degradación, evitando el deterioro. Sin embargo el mismo proceso incluye cambios físicos y químicos que se traducen en la modificación de los caracteres organolépticos de la anchoíta. Por trabajos realizados en nuestro laboratorio podemos mencionar entre esas modificaciones la disminución de la concentración proteica y el aumento de la concentración de los aminoácidos libres en el músculo (71); además este trabajo de tesis mostró la persistencia de la actividad proteolítica endógena de los tejidos a través de la maduración. El conjunto de lo expuesto evidencia que por lo menos algunas de esas modificaciones se deben a la acción de las proteasas tisulares.

A diferencia de otras investigaciones sobre actividad proteolítica en pescado salado (7) (72) en las que solo se medía la actividad de las proteasas sobre sustratos exógenos y sin considerar el efecto del ClNa so-



bre las mismas, en este trabajo el estudio de las actividades proteolíticas tisulares se desarrolló principalmente sobre la capacidad autolítica y endógena de las proteínas de los tejidos en maduración y su comportamiento bajo concentraciones de ClNa iguales a las del proceso.

Esta forma de aproximación al problema mostró que, al pH del proceso: 6,2 , la capacidad autolítica de las proteasas en el músculo en maduración es mayor que la de las proteasas en el músculo fresco, y que en concentraciones de ClNa coincidentes con las del proceso la autólisis durante la maduración es mayor o igual que la de músculo fresco. La comparación de la capacidad proteolítica endógena del músculo en maduración (es decir la capacidad de las proteasas sarcoplasmáticas de músculo para hidrolizar proteínas miofibrilares), con la del músculo fresco se hizo en función de mediciones de actividad según el método de Anson (60) y también a través de las variaciones de los perfiles de distribución de las proteínas musculares en geles de poliacrilamida-SDS. Con ambos métodos los resultados fueron coincidentes, indicando que la capacidad de las proteasas de músculo en maduración para hidrolizar proteínas miofibrilares es mayor que la del músculo fresco.

Las proteasas musculares que persisten a través de la maduración tienen distintas características de pH óp-

timo, de respuesta a ClNa y de especificidad frente a distintos sustratos.

En coincidencia con lo encontrado por Kiesvaara (7) la actividad de tipo catepsina en el músculo no desaparece por el salado. Las capacidades autolítica y proteolítica endógena a pH ácido tampoco se inactivan durante la maduración, ni se observa inhibición por ClNa. Aunque, durante el proceso, los valores de esas actividades conservan o superan la magnitud que tenían en el músculo fresco, son relativamente bajos.

Las proteasas alcalinas musculares, además de incrementar su capacidad autolítica y proteolítica endógena durante la maduración son, en ese tejido, las de valores relativos más altos y producen mayor degradación de algunas proteínas miofibrilares (por ejemplo de la cadena de miosina pesada) aún en presencia de concentraciones de ClNa semejantes a las del proceso.

Del comportamiento frente a sustratos exógenos se ve que durante la maduración conservan su actividad por lo menos dos proteasas alcalinas musculares con distinta afinidad de sustrato: una proteasa de tipo quimotripsina, cuya actividad disminuye a través del proceso, y una actividad caseinolítica que se incrementa. La existencia de dos proteasas alcalinas coincide con lo encontrado por Busconi (73) en músculo de corvina fresca y en experiencias actualmente en curso en nuestro labora-

torio sobre músculo de anchoíta fresca. (74)

De entre las hipótesis que justificarían los aumentos de capacidad y actividad proteolítica, medidas a pH ácido y neutro, en músculo de anchoíta, a través de la maduración, este trabajo muestra que se requieren modificaciones en la estructura de las proteínas y/o actividad de algún inhibidor de proteasas en la fracción sarcoplasmática; en el caso de la proteólisis endógena esos cambios deben ser acompañados por modificaciones en la actividad de inhibidores de proteasas y/o estructura de la fracción proteica miofibrilar. Con respecto a las proteasas alcalinas, modificaciones en la estructura de las proteínas y/o actividad de inhibidores de proteasas en la fracción sarcoplasmática justifican el aumento de capacidad y actividad proteolítica a través de la maduración, no requiriendo en el caso de la proteólisis endógena modificaciones en la fracción miofibrilar, dado que ya en los primeros días del proceso estas proteasas muestran capacidad para hidrolizar proteínas miofibrilares aún de anchoíta fresca.

Estos resultados junto a los valores comparativamente altos de capacidad y actividad autolíticas y endógenas de las proteasas alcalinas a través de la maduración indican que, si bien las proteasas ácidas, neutras y alcalinas de músculo estarían en condiciones de producir modificaciones en las proteínas musculares du-

rante la maduración, las proteasas alcalinas serían las de mayor importancia relativa en el proceso.

En estudios recientes sobre músculo de anchoíta fresca y parcialmente madura se detectó la presencia de inhibidor/es de tripsina (74). También se sabe de la existencia de inhibidores de proteasas alcalinas en músculo fresco de carpa (75) y corvina (76)

Los hechos hasta aquí señalados, unidos a la ya mencionada información preliminar sobre la presencia de por lo menos dos proteasas alcalinas sugieren, como etapa posterior a este trabajo, la necesidad de una mayor caracterización de las proteasas alcalinas y sus inhibidores en músculo de anchoíta fresca y en maduración.

Respecto a la posible incidencia de proteasas microbianas en los fenómenos descritos, es muy poco lo que conocemos. Experiencias realizadas en nuestros laboratorios durante la campaña 1982-1983 (77) indicaron que ya en el presalado hay una disminución entre 91,5% y 97,5% de la flora aeróbica y anaeróbica. A los 68 días se aislaron organismos caracterizados como *Pediococcus* que se incrementaron progresivamente, persistiendo hasta el final del proceso. Los *Pediococcus* aislados fueron identificados a nivel de especie como *Pediococcus halophilus*, estudios de sus características indicaron resultados negativos frente al test de hidrólisis de gelatina (78).

Otro aspecto interesante de destacar en este trabajo es la correlación hallada entre el incremento de la autólisis alcalina y/o neutra de las proteínas musculares con la velocidad de maduración. Aunque los estudios realizados no permiten establecer cuantitativamente la relación entre incremento de actividad y disminución del tiempo de maduración, si muestran que un mayor incremento de la capacidad autolítica muscular alcalina y/o neutra producido durante los primeros estadios del proceso (1 a 2 meses) tiene como respuesta la aceleración de la maduración; mientras que si ese incremento se retrasa la maduración es más lenta.

Desde otro punto de vista Kiesvaara (7) atribuye a las proteasas viscerales gran importancia en la maduración de arenque salado. De este trabajo sobre anchoíta se ve que la capacidad de las proteasas alcalinas viscerales para hidrolizar proteínas miofibrilares y otros sustratos, aunque disminuye marcadamente, persiste a través del proceso y que algunas de ellas no son inhibidas por ClNa. Estos hechos concuerdan con la autodegradación visceral y la degradación de la pared ventral adyacente que ocurren durante la maduración, además apoyan la participación de la proteólisis catalizada por enzimas viscerales en la evolución de algunos caracteres organolépticos tales como: aroma y sabor. Sin embargo la acción de las proteasas viscerales sobre toda la

masa muscular (músculo dorsal y caudal) requiere difusión de las enzimas bajo condiciones de prensa y actividad de agua que no la favorecen. Este trabajo no puede descartar ni probar tal hipótesis, pero muestra que la actividad de tipo quimotripsina que disminuye en el tejido visceral también disminuye en el músculo a medida que avanza la maduración; ésto se opone a la teoría de la difusión.

En base a lo expuesto en esta tesis se realizarán nuevas experiencias orientadas a acelerar la maduración, para ello se adicionará la materia prima con proteasas alcalinas. Las primeras pruebas en este sentido se hicieron durante la campaña 1978-1979 (datos no mostrados) y, si bien dieron un aumento inicial de la velocidad de maduración y productos de buena calidad, no acortaron el tiempo necesario para su producción.

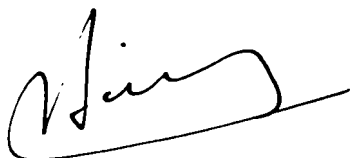
Dado que en la anchoíta madura conservan su actividad tanto las proteasas musculares como las viscerales, y que para su comercialización este producto no es sometido a proceso de inactivación alguno, las enzimas serán importantes factores condicionantes del tiempo de conservación del producto final.

RESUMEN

LA CAPACIDAD Y LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA ENDOGENAS DEL MUSCULO DE ANCHOITA EN MADURACION PERSISTEN Y SON, DURANTE TODO EL PROCESO, MAYORES O IGUALES QUE LAS DEL MUSCULO FRESCO.

EN EL MUSCULO LAS PROTEASAS ALCALINAS SON RELATIVAMENTE LAS MAS IMPORTANTES.

LA MAGNITUD Y OPORTUNIDAD DEL INCREMENTO DE LA CAPACIDAD PROTEOLITICA MUSCULAR ALCALINA Y/O NEUTRA ES UNO DE LOS DETERMINANTES DE LA VELOCIDAD DE MADURACION.



Dr. Jorge J. Sánchez  
Director de Tesis



Lic. Olinda Pérez Borla

BIBLIOGRAFIA



- 1 - Hesselatine, C. W. y Wang, H. L. (1967) *Biotechnol. Bioeng.* 9: 275.
- 2 - Groff, E. H. (1919) *Philip. J. Sci.* 15: 307.
- 3 - Cheftel, H. (1965) *Fish as food*, ed. G. Borgstrom, p. 219, Academic Press, Vol 3, New York.
- 4 - Ronsivalli, L. J. y Learson, R. J. (1973) *Food Dehydration*, eds. W. B. Van Arsdel; M. J. Copley y A. I. Morgan, p. 275, Avi, Vol.2, Westport.
- 5 - Alm. F. (1965) *Fish as food*, ed. G. Borgstrom, p. 195, Academic Press, Vol. 3, New York.
- 6 - Voskresensky, N. A. (1965) *Fish as food*, ed. G. Borgstrom, p. 107, Academic Press, Vol. 3, New York.
- 7 - Kiesvaara, M. (1975) Academic dissertation, Technical Research Centre of Finland, Publication 10.
- 8 - Pereira Galvao, L. A. y Aresta Branco, A. (1968) *Instituto Português de Conservas de Peixe.* 639:436
- 9 - Tulsner, M. (1978) *Lebensmittelindustrie* 25: 169.
- 10 - Pirazzoli, P.; Baldrati, G.; Incerti, I. y Ambroggi, F. (1981) *Industria Conserve* 56: 77.
- 11 - Unlever Limited (1975) Patent specification 1403221, Patent Office, London.
- 12 - Instituto Nacional de Tecnología Industrial (1981) Informe de laboratorio OT 28056/81/0.
- 13 - Beatty, S. A. y Fougere, H. (1957) *Fisheries Research Board of Canada, Bulletin* N°112.
- 14 - Tressler, D. K. (1920) *U. S. Bur. Fish Doc.* 884: 1.

- 15 - Boury, M. (1938) Revue des Travaux de l'Office des Peches Maritimes 41: 2.
- 16 - Petrowa, E. K. (1933) Arch. Mikrobiol. 4: 326.
- 17 - Tropa, E. (1956) Consideracoes Etiológicas, ed. Com. Reg. Com. Bacalhau, Lisboa.
- 18 - Erichsen, I. (1973) Process Biochem. 8: 21.
- 19 - Tanner, F. W. (1944) Curing of fishery products, ed. U.S. Dept. of Interior Res. Rept. 18.
- 20 - Venkataraman, R. y Sraemvasan, A. (1954) Proc. Indian Acad. Sc. 39: 17.
- 21 - Baldrati, G.; Guidi, G.; Pirazzoli, P. y Porreta, A. (1977) Industria Conserve 52: 221.
- 22 - Lepierre, Ch. y Mercier Marques, J. (1951) Proceedings of the 2nd. International Congress on canned foods XXXV-1, Paris.
- 23 - Deng, J. C. (1977) J. Fd. Sci. 42 (2): 348.
- 24 - Jebesen, J. W. (1962) Fish in nutrition, eds. E. Heen y R. Kreuzer, p. 69, Fishing News (Books) Ltd., London.
- 25 - Hamm, R. (1981) Fleischwirtschaft 12: 1
- 26 - Alm, F. (1956) Proc. Symposium on Nutritive Aspects of Preserved Food. Swed. Inst. Food Preserv. Research, Goteborg, Publ. N°115: 108.
- 27 - Orejana, F. M. y Liston, J. (1981) J. Food Sci. 47: 198.
- 28 - Filsinger, B.; Zugarramurdi, A.; Sánchez, J. J.;

- Trucco, R. E. y Lupín, H. M. (1978) La Alimentación Latinoamericana 108: 26.
- 29 - Whitaker, J. R. (1978) Food Technology 5: 175.
- 30 - Siebert, G. y Schmitt, A. (1965) The technology of fish utilization, ed. R. Kreuzer, p. 47, Fishing News (Books) Ltd., London.
- 31 - Tappel, A. L. (1965) The technology of fish utilization, ed. R. Kreuzer, p. 129, Fishing News (Books) Ltd., London.
- 32 - Pedraja, R. R. (1970) Fd. Technol. 24: 47.
- 33 - Reddi, P. K.; Constantínides, S. M. y Dymsha, H. A. (1972) J. Food Sci. 37: 643.
- 34 - Doke, S. N.; Ninjoor, V. y Nadkarni, G. B. (1980) Agric. Biol. Chem. 44: 1521.
- 35 - Schwart, W. N. y Bird, J. W. C. (1977) Biochem. J. 167: 811.
- 36 - Okitani, A.; Matsukura, U.; Kato, H. y Fujimaki, M. (1980) J. Biochem. 87: 1133.
- 37 - Wildenthal, K.; Wakeland, J. R.; Ord, J. M. y Stull, J. T. (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. 96: 793.
- 38 - Key, J.; Siemankowski, L. M.; Siemankowski, R. F.; Greweling, J. A. y Goll, D. E. (1982) Biochem. J. 201: 267.
- 39 - Noguchi, T. y Kandatsu, M. (1971) Agric. Biol. Chem. 35: 1092.

- 40 - Mayer, M.; Amin, R. y Shafrir, E. (1974) Arch. Biochem. Biophys. 161: 20.
- 41 - Katunuma, N.; Kominami, E.; Kobayashi, K.; Banno, Y.; Suzuki, K.; Chichibu, K.; Hamaguchi, Y. y Katsunuma, T. (1975) Eur. J. Biochem. 52: 37.
- 42 - Yasogawa, N.; Sanada, Y. y Katunuma, N. (1978) J. Biochem. 83: 1355.
- 43 - Woodbury, R. G.; Everitt, M.; Sanada, Y.; Katunuma, N., Lagunoff, D. y Neurath, H. (1978) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75: 5311.
- 44 - Makinodan, Y. e Ikeda, S. (1969) Bull. Japan Soc. Sci. Fish 35: 749.
- 45 - Tzong-Shin Lin y Lanier, T. C. (1980) J. Food Biochem. 4: 17.
- 46 - Meyer, W. L., Fisher, E. H. y Krebs, E. G. (1964) Biochemistry 3: 1033.
- 47 - Huston, R. B. y Krebs, E. G. (1968) Biochemistry 7: 2112.
- 48 - Dayton, W. R.; Goll, D. E.; Zeece, M. G.; Robson, R. M. y Reville, W. J. (1976) Biochemistry 15: 2150
- 49 - Dayton, W. R.; Reville, W. J.; Goll, D. E. y Stromer, M. H. (1976) Biochemistry 15: 2159.
- 50 - Suzuki, K. e Ishiura, S. (1983) J. Biochem. 93: 1463.
- 51 - Inomata, M.; Hayashi, M.; Nakamura, M.; Imahori, K. y Kawashima, S. (1983) J. Biochem. 93: 291.

- 52 - Reville, W. J.; Goll, D. E.; Stromer, M. H.;  
Robson, R. M. y Dayton, W. R. (1976) J. Cell  
Biol. 70: 1.
- 53 - Cheng, Ch. S. y Parrish, F. C. (1977) J. Food  
Sci. 42: 1621.
- 54 - Taneda, T.; Watanabe, T. y Seki, N. (1983)  
Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 49: 219.
- 55 - Koburok, B.; Durr, F. y Schober, B. (1980) Le-  
bensmittelindustrie 27: 111.
- 56 - Cheng, Ch. S.; Hamann, D. D.; Webb, N. B. y  
Sidwell, V. (1979) J. Food Sci. 44: 1087.
- 57 - Lerici, C. R. y Piva, M. (1981) Industrie Alimen-  
tari 20 (11): 763.
- 58 - Tome, D.; Nicolas, J. y Drapron, R. (1978) Le-  
bensm. Wiss. U. Technol. 11: 38.
- 59 - Gill, T. A.; Keith, R. A. y Smith Lall, B. (1979)  
J. Food Sci. 44: 661.
- 60 - Anson, M. L. (1938) J. Gen. Physiol. 22: 79.
- 61 - Schwert, G. W. y Takenaka, Y. (1955) Biochim.  
Biophys. Acta 16: 570.
- 62 - Hummel, B. C. W. (1959) Can. J. Biochem. Physiol.  
37: 1393.
- 63 - Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. y  
Randall, R. J. (1951) J. Biol. Chem. 193: 265.
- 64 - Porzio, M. A. y Pearson, A. M. (1977) Biochim.  
Biophys. Acta 490: 27.

- 65 - de Duve, C. (1983) Eur. J. Biochem. 137: 391
- 66 - Penefsky, H. S. y Tzagoloff, A. (1971) Methods in Enzymology, ed. W. B. Jakoby, p. 204, Academic Press, vol XXII, New York.
- 67 - Drabikowski, W.; Górecka, A. y Jakubiec-Puka, A. (1977) Int. J. Biochem. 8: 61.
- 68 - Busconi, L.; Comunicación personal.
- 69 - Zugarramurdi, A y Lupin, H. M. (1976) Rev. Lat. Ing. Quim. Aplic. 6: 90.
- 70 - Offer, G. y Trinick, J. (1983) Meat Sco. 8: 245.
- 71 - Pellizari, E.; Comunicación personal.
- 72 - Gutierrez, M. y Establier, R. (1972) Inv. Pesq. 36 (2): 341.
- 73 - Busconi, L.; Folco, E. J.; Martone, C.; Trucco, R. E. y Sánchez, J. J. (1984) FEBS Lett. 176 (1):211
- 74 - Pérez Borla, O. y Sánchez, J. J.; manuscrito en preparación
- 75 - Toyohara, H.; Makinodan, Y.; Tanaka, K. e Ikeda, S. (1983) Agric. Biol. Chem. 47 (5): 1151.
- 76 - Folco, E. J.; BUSconi, L.; Martone, C.; Trucco, R. E. y Sánchez, J. J. (1984) FEBS Lett. 176 (1): 215.
- 77 - Villar, M.; Ruiz Holgado, A. P.; Sánchez, J. J.; Trucco, R. E. y Oliver, G.; manuscrito en preparación.
- 78 - Villar, M.; Ruiz Holgado, A. P.; Sánchez, J. J.; Trucco, R. E. y Oliver, G. (1985) Appl. Environ. Microbiol. 49: 664.