

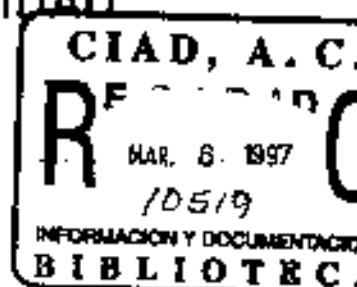
Centro de Investigación en Alimentación Y Desarrollo, A. C.

IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES MARINAS
POR METODOS ELECTROFORETICOS

POR

GUILLERMINA GARCIA SANCHEZ

TESIS APROBADA POR LA
DIRECCION DE CIENCIA Y TECNOLOGIA
DE LOS ALIMENTOS
COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS ESPECIALIDAD
EN NUTRICION Y ALIMENTOS



CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CUADROS.	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.	VIII
RESUMEN	XI
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
Producción Pesquera del Estado de Sonora.....	3
Características del Músculo de Pescado.....	5
Composición Química Muscular y Factores que la Afectan.....	6
Agua.....	7
Lípidos..	8
Proteína.....	8
Carbohidratos..	10
Minerales.....	10
Vitaminas.....	11
Compuestos nitrogenado no proteicos.....	12
Características de la Fracción Proteica..	14
Proteínas del estroma.....	14
Proteínas miofibrilares.	15
Proteínas sarcoplásmicas.....	16
Estructura del Músculo de Pescado.....	20
Célula muscular.	21
Métodos Utilizados en la Identificación de Especies.....	21

CONTENIDO (Continuación)

	Página
Métodos Electroforéticos.....	26
Métodos Electroforéticos en Gel.....	29
Separación proteica bajo condiciones no-desnaturalizantes.....	29
Separación proteica bajo condiciones desnaturalizantes.....	30
Métodos de isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida (IEF)	32
MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
Reactivos.....	35
Estandarización y Optimización de los Procesos Electroforéticos	36
Obtención e Identificación de la Especies.....	36
Determinación de Proteína en el Músculo	39
Extracto Sarcoplásmico..	39
Obtención.....	39
Determinación de proteína.....	41
Estabilidad.....	41
Preparación de la muestra para electroforesis e isoelectroenfoque desnaturalizante.....	41
Geles.....	42
Para electroforesis desnaturalizante.....	43
Para isoelectroenfoque desnaturalizante.....	45
Condiciones de Corrido de los Geles.....	48
Para electroforesis desnaturalizante.....	50

CONTENIDO (Continuación)

	Página
Para isoelectroenfoque desnaturalizante.....	51
Procedimientos Post-corridas.....	51
Tinción para electroforesis desnaturalizante.....	51
Determinación de pesos moleculares.....	52
Medición de gradiente de pH para isoelectroenfoque desnaturalizante.	
Utilización del potenciómetro.....	52
Tinción para isoelectroenfoque desnaturalizante.....	53
Determinación de puntos isoelectrónicos.	
Utilización de estándares.....	55
Respaldo fotográfico.....	55
Secado de los geles.....	56
Estudio sobre el Efecto de los Procesos de Congelación-Descongelación.....	56
Diseño del Programa Computacional.....	58
Comparación de los Patrones Electroforéticos de Peso Molecular.....	61
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	63
Estandarización y Optimización de los Procesos Electroforéticos.....	63
Determinación de Proteína en el Músculo y Determinación de Proteína del Extracto Sarcoplásmico.....	63
Estabilidad del Extracto Sarcoplásmico.....	65

CONTENIDO (Continuación)

	Página
Análisis de los Patrones de Bando para el Cálculo de Pesos Moleculares de Proteínas Sarcoplásmicas del Músculo de Cabrilla, Baya y Lengado.....	68
Efecto de la Adición de Inhibidores.....	68
Comparación de los Patrones Proteicos de las Especies... .	72
Efecto del Muestreo Sobre los Patrones de Bando.	75
Efecto de los Procesos de Congelación-Descongelación Sobre las muestras Preparadas para Electroforesis.....	77
Comparación de los Patrones Electroforéticos de Lengado y una Muestra Comercial	77
Análisis de los Patrones de Isoelectroenfoque Desnaturalizante de Cabrilla, Lengado y Baya.....	85
Mediciones de Gradiente de pH Dentro de los Geles.....	85
Efecto de la Concentración de Proteína, Muestreo y Gradiente de pH sobre los Patrones de pl...	87
Concentración de proteína.....	87
Efecto del muestreo.....	91
Gradiente de pH.....	92
Comparación de los Patrones de pl de las Especies.	93
CONCLUSIONES.	98
BIBLIOGRAFÍA.....	100
APÉNDICES.....	111
I. Pantalla de Presentación del Menú Principal.....	112
II. Pantalla de Presentación para la Opción:	
1. Entrada de Especie Desconocida.....	113

CONTENIDO (Continuación)

	Página
III. Resultados de la Comparación de una Muestra Hipotética con Lenguado por Prueba de Punto Isoeléctrico.....	114
IV. Pantalla de Presentación para la Opción. 4. Agregar Otra Especie.....	116
V. Resultados de la Comparación de la Muestra LMCI con Lenguado por Prueba de Peso Molecular.....	117
VI. Resultados de la Comparación de la Muestra LMCI con Baya por Prueba de Peso Molecular.....	118
VII. Resultados de la Comparación de la Muestra LMCI con Cabrilla por Prueba de Peso Molecular.....	119
VIII. Resultados de la Comparación de la Muestra LSSI con Lenguado por Prueba de Peso Molecular.....	120
IX. Resultados de la Comparación de la Muestra LSSI con Baya por Prueba de Peso Molecular.....	121
X. Resultados de la Comparación de la Muestra LSSI con Cabrilla por Prueba de Peso Molecular.....	122
XI. Resultados de la Comparación de la Muestra LSCI con Lenguado por Prueba de Peso Molecular.....	123
XII. Resultados de la Comparación de la Muestra LSCI con Baya por Prueba de Peso Molecular.....	124
XIII. Resultados de la Comparación de la Muestra LSCI con Cabrilla por Prueba de Peso Molecular.....	125

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Estadísticas pesqueras de Sonora. Producción de 1991-1995 (volumen en toneladas).....	4
2	Captura de las especies baya, cabrilla y lenguado (volumen en kg)	5
3	Principales componentes del músculo de pescado (valores medios y rangos)	7
4	Clasificación de los peces según su contenido lipídico muscular.....	9
5	Principales vitaminas hidrosolubles encontradas en la porción comestible de pescado crudo (valor medio y rangos)	13
6	Cantidades de proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares encontradas en el músculo de diferentes especies.....	18
7	Métodos utilizados en la identificación de especies animales en carnes y productos cárnicos.....	25
8	Características morfológicas utilizadas en la identificación de las especies bajo estudio	38
9	Mezclas de anfólitos utilizados en la preparación de los geles de isoelectroenfoque con diferentes rangos de pH... .	47
10	Condiciones preliminares analizadas para la estandarización de las corridas de isoelectroenfoque y electroforesis desnaturalizantes.....	50

ÍNDICE DE CUADROS (Continuación)

Cuadro		Página
11	Concentración de proteína total y sarcoplásmica en el músculo de cabrilla, lenguado y baya.	64
12	Valores de log de PM y PM promedio obtenidos sobre gel de poliacrilamida-SDS para las especies de cabrilla (C), baya (B) y lenguado (L) con y sin inhibidores.....	70
13	Valores de PM e intervalos de confianza al 95% obtenidos para las especies de cabrilla, lenguado y baya.....	74
14	Pesos moleculares encontrados para las especies comerciales de lenguado y lenguado bajo estudio (pesos en kDa).....	80
15	Valores de pI determinados para las especies de lenguado, cabrilla y baya (promedio e intervalos de confianza al 95%).....	95

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
<p>1 Estructura de músculo de pescado: (a) representación de la organización de los miotomos dentro del músculo. Las líneas internas (en negro) representan el tejido conectivo que rodea y separa los miotomos; (b) micrografía de una sección delgada de músculo de salmón mostrando la organización de las fibras y el tejido conectivo en un miotomo. F = Fibra, E= Endomesium, P = Perimesium.....</p>	22
<p>2 Diagrama de la organización de la célula muscular: (a) Fibras musculares rodeadas por el retículo sarcoplásmico y membrana celular; (b) Esquema de la ultraestructura del músculo de bacalao (<i>Gadidae spp</i>) donde se muestran los componentes que ocupan el volumen celular y las miofibrillas.....</p>	23
<p>3 Ubicación de los campos pesqueros de “Bahía de Kino Viejo” y “El Desemboque”.....</p>	37
<p>4 Preparación del gel de electroforesis desnaturalizante.....</p>	44
<p>5 Preparación del gel de isoelectroenfoco desnaturalizante.....</p>	49
<p>6 Corte del caril en blanco (dummy) para realizar la medición del gradiente.....</p>	54
<p>7 Esquema de secado de los geles obtenidos.....</p>	57
<p>8 Porcentajes de NNP en los extractos de cabrilla, lenguado y baya con y sin inhibidores.....</p>	66

ÍNDICE DE FIGURAS (Continuación)

Figura		Página
9	Patrones proteicos de peso molecular obtenidos sobre gel de poliacrilamida-SDS de los extractos sarcoplásmicos de cabrilla (C), lenguado (L) y baya (B).....	69
10	Patrones proteicos de PM de los extractos sarcoplásmicos de cabrilla (C), lenguado (L) y baya (B) con inhibidores (CI)...	76
11	Patrones proteicos sobre gel de poliacrilamida-SDS de extractos sarcoplásmicos de lenguado (a), baya (b) y cabrilla (c) con inhibidores, sometidos a cinco ciclos (D1-D5) sucesivos de congelación-descongelación.....	78
12	Patrones proteicos sobre gel de poliacrilamida-SDS obtenidos de los extractos sarcoplásmicos de lenguado con y sin inhibidores, pertenecientes a este estudio y adquirido comercialmente.....	79
13	Comportamiento de los gradientes de pH encontrados dentro de los geles utilizados para las corridas de isoelectroenfoque.....	86
14	Curva de regresión lineal obtenida para geles con gradiente de pH de 3.5-10.0 (a) y de 4.0-6.0 (b).....	88
15	Patrones de pl sobre geles de urea-poliacrilamida con gradientes de 4.0-6.0 de los extractos proteicos de cabrilla (C), lenguado (L) y baya (B) con inhibidores (Figuras a, b y c respectivamente).....	89

ÍNDICE DE FIGURAS (Continuación)

Figura		Página
16	Patrones de pl sobre geles de urea con gradiente de 3.5-10.0 de los extractos sarcoplásmicos con inhibidores de cabrilla (C) y baya (B), (Figura a) y lenguado (L) (Figura b)...	90
17	Patrones de pl de las especies cabrilla (C), lenguado (L) y baya (B).....	94

RESUMEN

Se evaluó el efecto de inhibidores de acción bacteriana (azida de sodio y EDTA) y enzimática (floruro de fenilmetilsulfonil) durante la obtención y almacenamiento de extractos de proteína sarcoplásmica de pescado. La evaluación de la estabilidad de los extractos mediante la determinación de NNP, mostró que éstos son estables al menos en sus primeras 48 horas a 0°C, con excepción del de cabrilla sin inhibidores (CSI). En contraste, en los estudios electroforéticos se detectó el efecto protector de los inhibidores sobre las proteínas sarcoplásmicas, al observarse diferencias en los patrones de bandeo entre los extractos con y sin inhibidores en determinaciones realizadas antes de 48 hrs a partir de su obtención. Los resultados indican la necesidad del uso de inhibidores durante la preparación y almacenamiento de los extractos.

Los patrones de bandeo para la determinación del peso molecular (PM) de las proteínas en extractos sarcoplásmicos de músculo de cabrilla (*Mycteropecta rosacea*), baya (*Mycteropecta jordani*) y lenguado (*Paralichthys woolmani*), indican que la electroforesis en condiciones desnaturalizantes pudo diferenciar sólo entre especies de distinto género. Para las especies del género *Mycteropecta*, se obtuvo un patrón característico con 12 bandas, mientras que para lenguado el patrón lo constituyeron 14. La diferenciación entre lenguado y las especies del género *Mycteropecta* fue posible mediante la utilización de las bandas "proteico-específicas" con PM de 138.4 kDa y 66.4 kDa presentes en el patrón de lenguado.

La comparación del patrón de bandeo de lenguado con el de dos muestras comercializadas como la misma especie, permitió en uno de los casos corroborar la especie, mientras que en el otro, los resultados sugieren un mal

manejo poscaptura del pescado o la sustitución de especie. Esto último se traduciría en fraude económico al consumidor.

No se observó una influencia significativa ($p \geq 0.05$) del proceso de congelación-descongelación sobre los patrones de bandeo para PM en extractos con inhibidores.

Mediante el uso del enfoque isoelectrico fue posible observar diferencias entre especímenes del mismo género. Para lenguado se obtuvo un patrón de 36 bandas proteicas, mientras que para cabrilla y baya se detectaron patrones con 30 y 27 bandas respectivamente. Así mismo, se observó que el patrón de bandeo de pI para cabrilla y baya se vio afectado ($p < 0.05$) por el muestreo sugiriendo la presencia de polimorfismo genético.

Los resultados obtenidos muestran la utilidad de las técnicas de electroforesis y enfoque isoelectrico de proteínas como herramientas metodológicas en el proceso de identificación de especies marinas. Sin embargo, la experiencia obtenida indica la necesidad de complementar estas herramientas con otras más específicas y selectivas como son las de biología molecular. Estas últimas permiten la identificación de polimorfismo genético en las especies, mediante el uso de las técnicas de electroforesis de isoenzimas, polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y polimorfismo del ADN amplificado al azar (RAPDs).

INTRODUCCIÓN

México posee extensos litorales los cuales son fuente de un amplia diversidad de especies marinas comestibles. De los estados productores, Sonora se encuentra ubicado en el primer lugar de la captura a nivel nacional (Semarnap, 1996). Dentro del Golfo de California existen especies como cabrilla, lenguado y baya, las cuales poseen excelentes características para ser comercializadas internacionalmente por la calidad su carne y el valor económico que poseen.

Actualmente, la implementación de programas de control de calidad a nivel nacional e internacional (Canadá, Estados Unidos y la Comunidad Económica Europea), tiene un gran impacto en la comercialización y consumo de pescado fresco y procesado (Gordon, 1985; Pontecovo, 1989; Anónimo, 1988). Por otro lado, la sustitución de especies de alto valor comercial por especies mas baratas, podría presentar implicaciones económicas tanto para los procesadores como para los consumidores. Estos aspectos han incrementado la demanda de procedimientos analíticos y de legislación para asegurar la calidad, integridad e identidad de los alimentos marinos.

Una de las principales inquietudes para la identificación tanto de especies de pescado fresco como procesado, es desarrollar un procedimiento confiable rápido, fácil y sensible, mediante el cual se evite la sustitución de especies y el fraude económico.

Diferentes procedimientos así como componentes musculares, se han utilizado para estimar la identidad de la especie animal que constituye un alimento. Los principales componentes musculares como agua, proteína y lípidos, se utilizan para agrupar y diferenciar especies; sin embargo, la presencia y cantidad de estos

compuestos dentro del músculo, varía en gran medida dependiendo de factores genéticos, ciclos de reproducción, estado fisiológico, condiciones medio ambientales, hábitat, tipo de alimentación, etc. (Pérez, 1985; Sikorski *et al.*, 1990. Pour-El, 1981; Rodríguez, 1984), por lo que resulta casi imposible utilizarlos con fines de identificación.

Los métodos electroforéticos, los cuales involucran el análisis de pequeñas cantidades de proteínas, son utilizados exitosamente en la obtención, purificación y aislamiento de bandas proteicas tanto en alimentos vegetales (Lee y Klein, 1990; Krobrehel *et al.*; 1988) como en animales (Scobbie y Mackie, 1988; Lundstrom, 1980; Wei *et al.*, 1990). Estos métodos se han convertido en una herramienta veraz, factible y viable para la identificación de especies. La elección de una técnica u otra, depende del tipo de muestra o de la información que se desee obtener, así como de los recursos que se posean para llevar a cabo la investigación.

Los objetivos del presente trabajo fueron definir las condiciones experimentales y evaluar la conveniencia de aplicar las técnicas electroforéticas de separación proteica por PM e isoelectroenfoque bajo condiciones desnaturalizantes, como un procedimiento rutinario de identificación de especies marinas. De igual forma, diseñar y desarrollar un programa computacional con los datos generados por el presente estudio, para iniciar la construcción de un banco de datos que permita llevar a cabo la identificación de muestras desconocidas de pescado. La información generada será de suma utilidad tanto para el mercado interno como el de importación-exportación.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Producción Pesquera en Sonora

En los últimos años la industria pesquera Sonorense ha experimentado importantes fluctuaciones en su producción motivada por diversos factores (Cuadro 1). Durante el período de 1990-1991, el volumen total de captura fue de 361,821 toneladas, lo cual colocó a la entidad como uno de los principales productores a nivel nacional.

Sin embargo, en los dos siguientes períodos de captura el descenso en la producción fue notable, llegándose a obtener en 1993 solamente el 31.30% respecto al volumen de captura de 1991. Dos de los principales factores que ocasionaron esta caída fueron, la difusa información sobre el cólera y la falta de inversión en el sector pesquero, excepto en la industria camaronícola.

Una nueva reestructuración de la industria pesquera y el incremento en la demanda de producto, tanto para el mercado nacional como para el de exportación, hicieron que en la temporada 1993-1994 Sonora volviera a repuntar como el principal productor nacional. Durante esta temporada se capturaron un total de 261,512 toneladas, lo cual representó el 21% de las 1'250,019 toneladas capturadas en el país (El Imparcial, 1995).

Las producción para el periodo 1995 fue de 363,656 toneladas, esta cifra represento un incremento del 36 % en volúmenes de captura con respecto a 1994, lo cual contribuyo a que la entidad mantuviera el primer lugar a nivel nacional. Para 1996 las expectativas son óptimas por lo que seguramente la entidad mantendrá el primer lugar nacional (Semamap, 1996).

Económicamente, la pesquería más importante es el camarón ya que el 75% de su producción se exporta. Sin embargo, tomando en cuenta el ingreso de nuestro país al Tratado de Libre Comercio (TLC) y la tendencia mostrada durante los últimos 10 años por los Estados Unidos de América y Canadá, en elevar el consumo de alimentos de origen marino (Gordon, 1985; Pontecovo, 1989, Anónimo, 1988), se espera que la pesquería de escama, tanto de especies dulceacuicolas como marinas, representen un renglón económico de gran interés.

Cuadro 1. Estadísticas pesqueras de Sonora. Producción de 1991-1995 (volumen en toneladas)

	1991	1992	1993	1994	1995
Sardina	309,448	107,941	70,315	200,576	282030
Camarón	9,023	6,785	9,014	11,703	18552
Escama	10,779	6,916	6,293	6,696	10701
Tiburón y Cazón	3,995	2,053	1,783	1,809	1498
Otras	8,882	7,763	6,285	10,830	15625
C.S.R.O.	16,045	10,350	13,253	21,905	28880
Acuacultura	4,089	3,648	6,317	7,998	7070
Total	361,821	145,484	113,260	261,514	363656

C.S.R.O.= Captura Sin Registro Oficial

Fuente: Secretaría del Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca (Semarnap), 1996.

Dentro de las especies más explotables y con mayor factibilidad de ser introducidas a mercados de importación-exportación, debido a la calidad de su carne y a su valor económico, se encuentran el lenguado, la cabrilla y la baya. El Cuadro 2 muestra la captura de estas especies durante 1994, 1995 y los primeros 10 meses de 1996. El incremento en la captura en este último año ha sido de alrededor de 330% para baya y 24% para cabrilla aproximadamente, mientras que para lenguado sólo se a capturado el 61% del volumen obtenido en 1995 para esta especie (Semarnap, 1996).

Cuadro 2. Captura de la especies baya, cabrilla y lenguado (volumen en kg.)

	1994	1995	1996
Baya	2,259	2636	8799
Cabrilla	20,484	16093	19996
Lenguado	786,317	1121912	691862

Fuente: Secretaría del Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca (Semarnap), 1996

Características del Músculo de Pescado

Los pescados y otros productos del mar, han tenido y tendrán siempre un lugar importante en la alimentación de la población mundial (LeCoeur y Lascoat, 1986). Desde el punto de vista nutricional, el músculo de pescado puede ser comparado favorablemente con otros alimentos de origen animal, ya que contiene proteínas de alto valor biológico y que poseen una digestibilidad de

95%, por lo que se convierte en una fuente excelente, disponible y eficaz de aminoácidos.

Desde el punto de vista estructural, el músculo de pescado se caracteriza por ser un sistema altamente organizado de proteínas por lo que queda sujeto a las mismas leyes fisicoquímicas y bioquímicas que rigen a cualquier sistema proteico (Rodger y Wilding, 1990; Chafel y Chaitel, 1976). Por otra parte, desde el punto de vista tecnológico, como material crudo puede ser manipulado para proveer una gran variedad de productos; sin embargo, presenta ciertas desventajas como es la de ser altamente percedero y de composición variable (Spinelli y Dawson, 1982).

Composición Química Muscular y Factores que la Afectan. La composición de los animales acuáticos es extremadamente variable. Los tres componentes químicos mayoritarios son agua, proteínas y lípidos; éstos representan el 98% del total de la masa muscular y tienen un gran impacto sobre el valor nutritivo, las propiedades funcionales, la calidad sensorial y la estabilidad durante el almacenamiento. Los carbohidratos, vitaminas y minerales, se encuentran en menor proporción y juegan un papel importante en los procesos bioquímicos posmortem; además, son corresponsales de las propiedades sensoriales, valor nutritivo e integridad de la masa muscular (Sikorski *et al.*, 1990).

El contenido total de los componentes musculares se ve afectado por diversos factores. Por un lado, los de naturaleza intrínseca como tipo de especie, edad, estado de maduración, ciclos de reproducción y preñez; por otro, los medio-ambientales como localización de la captura, condiciones de alimentación del animal, temperatura del agua y contaminación del hábitat, por ejemplo el contenido de metales pesados (Spinelli y Dassow, 1982; Borgstrom, 1961; Jacquot, 1961). Debido a lo anterior, se producen diferencias

significativas de composición no sólo entre especies sino también dentro de una misma especie, aún, entre sus diferentes músculos y órganos (Spinelli y Dassow, 1982; Sikorski *et al.*, 1990). El Cuadro 3 muestra la composición química de algunos peces señalando únicamente los tres compuestos mayoritarios.

Agua. En los peces es el principal componente del músculo y de otros tejidos, relacionándose inversamente con el contenido de lípidos (Stansby y Olcott, 1963). Se encuentra involucrada en la conformación y reactividad de las proteínas y tiene gran impacto en la hidratación proteica la cual es responsable de las propiedades reológicas y de jugosidad del músculo.

Cuadro 3. Principales componentes de músculo de pescado (valores medios y rangos).

Especies	% En Peso Húmedo		
	Proteína	Lípidos	Humedad
Arenque	18.2	15.7	60.1
<i>Clupea harengus</i>	15.2-21.9	2.4-29.	52.6-78.0
Bacalao	17.9	0.3	81.1
<i>Gadus morhua</i>	16.5-20.7	0.1-0.8	78.2-82.6
Atún aleta azul	24.7	3.9	70.4
<i>Thunnus thynnus</i>	23.3-27.5	1.2-8.0	67.7-72.6
Halibut del Pacífico	21.1	1.1	77.9
<i>Hipoglossus Stenolepis</i>	20.3-22.0	0.6-3.6	77.3-78.7
Salmón rosa	19.4	5.3	74.0
<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>	17.2-20.6	2.0-9.4	69.0-78.3

Fuente: Sikorski *et al.*, 1990.

Su porcentaje varía entre un 50 y 85 % dependiendo de la especie y del estado de maduración del pez. Durante la inanición, que es común en muchos peces en la etapa de desove, se reduce la reserva de energía de los tejidos y consecuentemente se incrementa el contenido de agua (Sikorski *et al.*, 1990).

Lípidos. Se consideran uno de los principales componentes de los productos marinos. Los lípidos se encuentran presentes entre las fibras de los músculos laterales o dentro de las células del músculo rojo. Se concentran principalmente en la capa grasa subcutánea de los peces grasos y en el hígado de los peces magros; se pueden encontrar también en las glándulas y en la cavidad abdominal (Sikorski *et al.*, 1990; Rodríguez 1984).

Entre los componentes de los lípidos marinos se encuentran fosfolípidos, esteroides, triacilglicérido, ceras y sus productos metabólicos, contienen además pequeñas cantidades de lípidos no comunes como gliceril esteres, glicolípidos, sulfolípidos e hidrocarburos (Sikorski *et al.*, 1990). Dentro de los factores que influyen en el contenido total de lípidos se encuentran la especie, edad, parte del cuerpo, pre- o postdesove, condiciones de alimentación y estación del año (Suzuki, 1982; Rodríguez, 1984). En base a lo anterior, el rango varía desde menos del 1% hasta aproximadamente 24% (Pérez, 1985), por lo que se acostumbra dividir a las especies en base a su contenido lipídico (Cuadro 4). No obstante esta clasificación, el contenido de lípidos varía dentro de límites tan amplios que para fines industriales, comerciales, técnicos y científicos se requiere una clasificación más detallada.

Proteína. Su importancia desde el punto de vista tecnológico es la de conformar la base estructural de la masa muscular; sin embargo su presencia es igualmente trascendental desde el punto de vista económico, industrial nutricio y científico.

Cuadro 4. Clasificación de los peces según su contenido lipídico muscular.

GRASOS (>15%)	SEMIGRASOS (5-15%)	MAGROS (0-5%)
Arenque	Barracuda	Bacalao
Macarela	Perca	Robalo
Salmón	Cabezudo	Merluza
Atún	Tiburón	Platija
Sardina	Mero	Chicharro
Trucha	-	Cherna
Jurel	-	Tilapia

Fuente: Rodríguez, 1984.

Para el músculo de pescado, la cantidad total de proteína varía entre el 15-24%, acercándose en la mayoría de los casos a 18%. Este porcentaje varía con respecto a la especie, el estado nutricional y el tipo de músculo (Suzuki, 1981; Pérez, 1985; Jacquot 1961, Sikorski *et al.*, 1990).

Existen varios grupos de proteínas que conforman la masa muscular: 1) las que forman la fracción sarcoplásmica, localizadas en el plasma ejecutando el trabajo bioquímico celular; 2) las proteínas miofibrilares, las cuales forman las miofibrillas que son responsables del sistema contráctil; y 3) las proteínas del estroma, las cuales constituyen al tejido conectivo responsables de mantener la integridad del músculo (Cheffel y Cheffel, 1976, Hashimoto *et al.*, 1979, Ziengler y Acton, 1984).

A pesar de que existe poca diferencia entre una especie y otra sobre la composición de aminoácidos de la fracción proteica (Braekkan y Boge, 1962), la expresión de las propiedades fisicoquímicas de las proteínas se encuentra

influenciada por diversos factores, entre ellos los medio-ambientales (Pour-EI, 1981).

Carbohidratos. Los carbohidratos, excepto por cantidades muy pequeñas de glucógeno, no se encuentran en proporciones importantes, por lo que generalmente no se consideran cuando se estima el valor nutricional del pescado (Bertullo, 1975).

Kilborne y McLeod (1920), reportaron que en el músculo de los peces teleostos el glucógeno se encuentra como máximo en un 0.3%; sin embargo, el contenido de glucógeno en el músculo puede variar con respecto a la especie y el estado fisiológico en que se encuentra el pez (Pérez, 1985). Kimura (1972), reporta que el colágeno de algunos peces e invertebrados marinos, posee azúcares asociados a su estructura, encontrándose principalmente glucosa, galactosa, manosa y fucosa y en menor proporción, arabinosa, xilosa y residuos de ribosa. El contenido total de carbohidratos varía entre 0.05 a 1.3% como máximo (Suzuki, 1981; Stansby y Olcott, 1963; Forrest *et al.*, 1975).

Minerales. El pescado es una fuente rica en sustancias minerales, las cuales se encuentran disueltas en el medio acuoso celular o en combinación con proteínas y otras sustancias (Rodríguez, 1984). El contenido total de minerales va de 0.8% a 2% (Suzuki, 1981; Bertullo, 1975) y varía dependiendo de la ubicación del hábitat del pez y de los elementos minerales que se encuentren disueltos en el agua de mar (Sikorski *et al.*, 1990; Causeret, 1962; Da Costa y Stern, 1956).

En los alimentos, los minerales se clasifican en dos grupos principales: macro- y microelementos. Los principales macroelementos que se encuentran en el músculo de pescado en cantidades de mg/100 g de peso húmedo son: sodio, 25 a 620; potasio, 25 a 710; magnesio, 10 a 230; calcio, 5 a 750; hierro, 0.01 a 50; fósforo, 0 a 1100; azufre, 100 a 300 y cloro de 20 a 500 (Sikorski *et al.*, 1990).

Por otra parte, los microelementos solamente se encuentran en cantidades entre 0.1 μg hasta algunas décimas de $\mu\text{g/g}$ de peso húmedo. Los principales son mercurio, 0.02 a 0.7 $\mu\text{g/g}$ (Schreiber, 1983; Sidwell *et al.*, 1978); cadmio, cantidades menores a 0.1 $\mu\text{g/g}$ (Sikorski *et al.*, 1990); plomo, 0.9 $\mu\text{g/g}$ (Sidwell *et al.*, 1978) y arsénico, 0.5 mg/g (Flanjak, 1982).

Vitaminas. En los peces podemos encontrar vitaminas liposolubles (A,E,D,F,K) en hígado, vísceras y en las partes grasas del cuerpo (Rodríguez, 1984, Bourges y Morales, 1986), e hidrosolubles en cantidades substanciales en músculo. Este último grupo está constituido principalmente por las vitaminas del complejo B (tiamina, riboflavina, ac. pantoténico, niacina, pindoxina y cianocobalamina) y por la vitamina C (Jacquot, 1961; Rodríguez, 1984).

El contenido de vitaminas liposolubles se encuentra afectado por la cantidad de grasa, lo cual provoca variaciones tanto entre especies como dentro de una misma especie. Existen importantes variaciones en su contenido asociadas a los ciclos de reproducción, a las condiciones climáticas y a la alimentación del pez (Higashi, 1961).

Dentro del músculo, las vitaminas A y D se encuentran en cantidades pequeñas o no detectables (Bayle, 1950; Causeret, 1950). En el caso de la vitamina A, los contenidos varían en el rango 25-50 UI por 100 g para el músculo de las especies magras, y de 100-4500UI por 100 g en músculo de especies grasas (Sikorski *et al.*, 1990). Para la vitamina D, los rangos varían entre 500-3,000 UI por 100 g de carne (Jacquot, 1961). Por otra parte, el contenido de vitamina E en el músculo de pescado y en el de algunos invertebrados marinos, se estima en el rango de 0.2-270 mg/100 g de peso húmedo (Sidwell *et al.*, 1978).

En el caso de las vitaminas hidrosolubles, los contenidos se ven influenciados con respecto a la especie, pudiéndose encontrar en rango muy amplios. Sidwell *et al.* (1978), analizaron 155 especies de pescados,

encontrando en el caso de tiamina rangos entre los 4-388 mg/100 g de peso húmedo. Una porción de productos marinos contribuye significativamente a satisfacer los requerimientos diarios de vitaminas B, sin embargo, en el caso del ácido ascórbico los contenidos son tan bajos que no tienen importancia desde el punto de vista nutricional (Cuadro 5).

Compuestos nitrogenados no proteicos. Los peces poseen en sus tejidos componentes que no son precipitados con ácido tricloroacético al 5%; a éstos se les denomina compuestos nitrogenados no proteicos. Entre éstos, el componente mayoritario es el óxido de trimetilamina (OTMA), seguido de urea, taurina, péptidos, aminoácidos, nucleótidos y compuestos que poseen bases púricas. En general, estos compuestos comprenden entre el 0.5 al 1% del total del peso del músculo (Suzuki, 1981). Los compuestos nitrogenados se encuentran en mayor proporción en músculo oscuro; juegan un papel importante en los procesos deteriorativos y en el sabor. Aunque existe una gran variedad de compuestos nitrogenados no proteicos, los más importantes son OTMA y TMA (Simmidu, 1961; Pérez, 1985).

El músculo de los elasmobranquios contiene mucho más OTMA que el de los teleosteos. El nivel de OTMA fluctúa con la especie, edad, tamaño del pez, condiciones medio-ambientales, la estación y lugar de captura (Pérez, 1985; Sikorski *et al.*, 1990). Lintzel *et al.* (1939), indica que los peces de agua dulce no contienen este compuesto durante ciertos períodos, aunque de cualquier manera, en los peces de agua dulce el contenido es mucho menor que en las especies marinas.

Los rangos en el contenido de OTMA son muy amplios. En el Abadejo de Alaska y bacalao se pueden encontrar cantidades de 1000 mg/100g de carne, mientras que en los peces de la familia Tetraodontidae solo se encuentran 156 mg en la misma cantidad de carne (Hebard *et al.*, 1982).

Cuadro 5. Principales vitaminas hidrosolubles encontradas en la porción comestible de pescado crudo (valor medio y rangos)

Vitamina	Familia Gadidae	Familia Pleuronectidae	Familia Clupidae	Familia Scombridae
Tiamina ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	71 18-150	83 40-180	46 60-170	120 10-430
Riboflavina ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	121 11-325	80 44-185	261 50-1000	164 13-660
Niacina ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	2.5 0.2-6.7	7.5 2.8-14.2	3.8 0.6-9.6	9.7 0-23.4
Piridoxina ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	221 170-228	400 347-430	310 160-450	647 190-920
Ac. Pantoténico ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	163 96-400	303 111-595	2427 970-9500	917 188-3280
Biotina ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	1.2 0.2-2.6	8.5 6.6-9.5	-	1.5
Ac. Fólico ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	5.0 1.8-6.7	2.6 2.0-2.9	10.3 1.7-14	2.1 0.6-3.2
Cobalamina ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	0.6 0.1-2.0	0.8 0.7-1.0	11.4 1.4-34	6.2 0.2-47
Ac. Ascorbico ($\text{mg}/100\text{ g}$)	-	0.0	9.0 0.0-27.7	2.6 0.0-10.7

Fuente: Sidwell *et al.*, 1978.

En cuanto al contenido de TMA, su presencia está ligada al OTMA, el cual por reducción oxidativa se transforma en TMA. Sin embargo, en ocasiones la presencia de TMA no depende del OTMA, pues en algunas especies se llega a encontrar preformado en pequeñas cantidades (Pérez, 1985).

Características de la Fracción Protéica. El músculo está compuesto por varios grupos de proteínas, las cuales atendiendo a su característica de solubilidad en solventes acuosos se clasifican en tres grupos: 1) Proteínas sarcoplásmicas, denominadas también proteínas metabólicas o miogénicas, constituyen la fracción que posee la mayor solubilidad de entre los tres tipos de proteínas; 2) Proteínas estromales o proteínas del tejido conectivo, las cuales en contraste con las proteínas sarcoplásmicas son consideradas la fracción con menor solubilidad y 3) Proteínas miofibrilares o del elemento contráctil, son la fracción que presentan una solubilidad intermedia entre las proteínas sarcoplásmicas y las del estroma (Spinelli y Dassow, 1982; Zeigler y Acton, 1984; Goll *et al.*, 1977).

Dentro del tejido muscular, las proteínas sarcoplásmicas representan aproximadamente del 20-30% del total de proteínas, mientras que las miofibrilares contribuyen con el 66-77%; el remanente, es decir del 10-15% de la proteína, es la fracción estromal (Morrissey *et al.*, 1982, Suzuki, 1981; Dyer y Dingle, 1961).

Debido a que dentro de este estudio, la fracción de más interés fue la sarcoplásmica se hará una descripción más detallada de esta fracción.

Proteínas del estroma. Se caracterizan por no presentar solubilidad en agua, soluciones diluidas de ácidos, álcalis ni en soluciones salinas de baja fuerza iónica (0.01-0.1 M) (Suzuki, 1981). Los principales componentes del estroma son el colágeno, el cual representa la fracción mayoritaria, y la elastina. Ambas

se encuentran estrechamente relacionadas con el control y regulación de la contracción muscular (Briskey y Fukazama, 1971; Suzuki, 1981; Fennema, 1985). El peso de la molécula intacta de colágeno no es conocido con exactitud, sin embargo se estima aproximadamente en 300,000 d, mientras que a la molécula de elastina se le estima un peso de 720,000 d (Veis, 1970; Hodge y Petruska, 1963)

Proteínas miofibrilares. Frecuentemente estas proteínas son definidas como la parte de la fracción muscular que son insolubles en agua y solubles en soluciones electrolíticas de fuerza iónica mayor a 0.5 (Dyer y Dingle, 1961; Hashimoto *et al.*, 1979). Actualmente, la solubilidad de las proteínas miofibrilares está sujeta a numerosos estudios.

Comúnmente es aceptada la hipótesis de que para la formación de geles de pescado se requiere una alta concentración de NaCl para solubilizar las proteínas miofibrilares (Suzuki, 1981; Lee, 1984, 1986; Shimizu, 1985). Sin embargo en contraparte a lo anterior, Hennigar *et al.* (1988) y Varelzidis *et al.* (1989), demostraron que se pueden obtener buenos geles de pescado sin que sea necesaria la adición de 2-3% de esta sal. Si esta hipótesis es correcta, algunas de las proteínas miofibrilares pueden ser solubles en soluciones con bajo contenido de sal. Stefansson y Hultin (1994), realizaron un estudio sobre las proteínas miofibrilares de bacalao, encontrando que estas mostraban solubilidad en agua a pH neutro si la fuerza iónica final era menor o igual a 0.0003.

Los principales componentes de la fracción miofibrilar son miosina, actina, actomiosina y proteínas reguladoras (Suzuki, 1981). La miosina es la proteína contráctil que se encuentra en mayor proporción (Gergely, 1970; Morrissey *et al.*, 1982; Samejima *et al.*, 1981), y posee un peso molecular alrededor de 4.8×10^5 d (Martin *et al.*, 1983; Yates y Greaser, 1983). Se caracteriza por tener alrededor de 2000 residuos de aminoácidos, tanto ácidos

como básicos, lo cual la convierte en una molécula sumamente cargada (Forrest *et al.*, 1975). Su punto isoeléctrico (pH en el cual la carga neta de la molécula es neutra y existe una densidad de carga grande) es de 5-5.5 (Schutt, 1986).

Proteínas sarcoplásmicas. Denominadas también proteínas miogénicas, comprenden a las proteínas que se encuentran de manera libre o contenidas en pequeñas partículas dentro del citoplasma y a los componentes del fluido extracelular (Scopes, 1970). En forma general los componentes intracelulares de estas proteínas se dividen en cuatro subgrupos principales: nucleares, mitocondriales, microsomales y citoplasmáticos (Goll *et al.*, 1977a). Gran parte de las proteínas sarcoplásmicas son enzimas que se encuentran asociadas a ciclos metabólicos como el de Krebs, glucólisis y cadena transportadora de electrones (Forrest *et al.*, 1975). A este grupo también pertenecen los componentes de lipoproteínas, las proteínas que se encuentran unidas a ácidos nucleicos y la cromoproteína tanto del músculo como de la sangre.

Dentro de las enzimas sarcoplásmicas, destaca el grupo involucrado en la degradación de compuestos nitrogenados, encontrándose proteasas, oligopeptidasas, dipeptidasas, transaminasas, amidasas, glutamato deshidrogenasas, carnosinasas, arginasas, nicotinamida adenin dinucleotidasa, adenosin trifosfatasa (ATPasa), adenosin deaminasa, trimetilamina demetilasa y tiaminasas (Sirkoski *et al.*, 1990).

Se ha encontrado también actividad de otras enzimas, como catecol oxidasa en la fracción sarcoplásmica de varios crustáceos, enzimas degradadoras de polisacáridos y lípidos en la especie langostilla del Antártico (*Euphasia superba*) (Sirkoski *et al.*, 1990) y actividad de lisozima en extractos de mucus, manto y órganos internos de moluscos (Mochizuki y Matsuchiya, 1983).

A pesar de que la fracción sarcoplásmica del músculo, contiene muchas de las proteínas que pueden ser extraídas con baja fuerza iónica del hígado y de otros tejidos (como por ejemplo algunas enzimas glucolíticas); esta fracción también posee pequeñas cantidades de proteínas que únicamente pueden ser encontradas en la célula muscular, ejemplo de esto son los factores que Heywood y *et al* (1974) y Thompson y Heywood (1974) encontraron que son necesarios para la iniciación de la síntesis de miosina y mioglobina.

En forma particular, mioglobina ocupa un lugar importante dentro de las proteínas sarcoplásmicas; su característica principal es la de impartir color rojo al músculo (Rodger y Wilding, 1990). El contenido de mioglobina varía dependiendo de la especie, así como del tipo de músculo y su función (Lawrie, 1979). Se encuentra en mayor proporción en los peces del tipo pelágico, como la sardina y la macarela, debido a que poseen una mayor proporción de músculo oscuro (Hashimoto *et al.*, 1979); y en menor concentración en los peces demasales como son la platija y el pargo (familia Lutjanidae) (Suzuki, 1981). En el Cuadro 6, se muestra el contenido de proteínas sarcoplásmicas de varias especies de pescados.

Las proteínas sarcoplásmicas son el grupo que posee la mayor solubilidad de entre las tres clases de proteínas musculares. Pueden ser obtenidas por simple presión del músculo de pescado o mediante la extracción con soluciones salinas de baja fuerza iónica (Suzuki, 1981). La fracción soluble intracelular abarca aproximadamente del 90 al 95% del total del extracto proteico obtenido por homogeneización del músculo con agua o con soluciones de sales neutras con una fuerza iónica menor al 0.15 (Scopes, 1970), a pH neutro (Whitaker y Tannenbaum, 1977).

Cuadro 6. Cantidades de proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares encontradas en el músculo de diferentes especies.

Espece de Pescado	Proteína Miofibrilar ¹	Proteína sarcoplásmica ¹
Anchoa, boquerón (<i>Engraulis japonica</i>)	6.8	8.1
Mero, cherna (<i>Stereolepis ischinagi</i>)	13.3 15.5 18.0	6.7 7.2 9.1
Pez plano, lenguado (<i>Kareius bicoloratus</i>)	12.0	7.0
Macarela, estomino (<i>Scomber japonicus</i>)	13.7 15.9	10.2 14.1
Aleta amarilla, serviola (<i>Seriola quinqueradiata</i>)	14.3 17.0	13.4 13.8
Barracuda roja (<i>Sphyræna pinguis</i>)	17.1	11.4
Lagarto (<i>Saurisa undosquamis</i>)	17.3	8.9
Grub fish (<i>Neoperis sexfasciata</i>)	18.3	7.8
Jurel, chicharro (<i>Trachurus japonicus</i>)	12.5 13.0	9.0 8.0

¹ nitrógeno proteico mg/g de carne de pescado

Fuente: Suzuki, 1981.

A pesar de que existe una gran variedad de proteínas sarcoplásmicas, en general el grupo presenta características físicas y químicas similares. Son del tipo globular, poseen baja viscosidad, baja capacidad de retención de agua y pesos moleculares que varían en el rango de 20,000 a 100,000 d; su punto isoeléctrico se encuentra en el rango de pH 6.0 a 7.0 (Whitaker y Tannenbaun, 1977; Morrissey *et al.*, 1982).

Wright *et al.* (1977), encontraron que la mayoría de las proteínas sarcoplásmicas del músculo experimentan desnaturalización térmica a temperaturas entre los 63°C y 68°C. Por otra parte con respecto a congelamiento, no ha encontrado algún efecto mayoritario del frío, independientemente de la formación de hielo, sobre las propiedades moleculares de este grupo de proteínas (Rodger y Wilding, 1990).

La composición de la fracción sarcoplásmica, se ve influenciada en gran medida por las condiciones utilizadas para la obtención del extracto, como son la velocidad y el tiempo de homogeneización del tejido, pH utilizado en la extracción, naturaleza del extractante y la fuerza de centrifugación usada para separar las proteínas sarcoplásmicas solubles de la fracción proteica insoluble y de los organelos subcelulares (Goll *et al.*, 1970).

Si músculo picado cuya fuerza iónica varía entre 0.16-0.18, es mezclado en partes iguales con agua de fuerza iónica entre 0.08-0.09, el extracto obtenido contendrá todas las enzimas asociadas con la glicólisis y muchas de las enzimas asociadas con la síntesis de carbohidratos y proteínas. Esto se debe en gran parte, a que estos procesos se llevan a cabo en el citoplasma de la célula muscular en donde las enzimas involucradas se encuentran de

manera libre, solubilizándose a la baja fuerza iónica existente, cuando la célula es rota. Por otra parte, si la homogeneización es suficientemente severa o si la extracción es hecha con baja fuerza iónica como para romper la mitocondria, la fracción citoplasmática contendrá las enzimas asociadas a la síntesis de lípidos y al ciclo del ácido cítrico, así como también enzimas lisosomales (Reville *et al.*, 1976).

Hultin (1974), encontró que algunas de las enzimas citoplasmáticas musculares pueden ligarse a la membrana celular, no solubilizándose después bajo algunas condiciones de extracción. Es evidente que las condiciones de extracción y homogenado son puntos claves para la obtención de la fracción sarcoplásmica, por lo que estas condiciones deben de ser cuidadosamente estandarizadas y descritas con detalle, cuando se discuta el estudio de las proteínas sarcoplásmicas.

Estructura del Músculo de Pescado. El músculo que forma el filete de pescado, es el que conocemos como músculo lateral mayor y se distribuye a todo lo largo de ambos lados del cuerpo. Está compuesto por el músculo ordinario, el cual es de color blanco o blanquizo, y por el músculo subcutáneo llamado también músculo oscuro debido a su gran concentración de mioglobina. En forma general es el músculo blanco el que usualmente se considera como alimento (Buttkus y Tomlinson, 1966).

El músculo esquelético del pescado se encuentra segmentado en un gran número de fragmentos llamados miotomos, los cuales se separan uno del otro por membranas delgadas de tejido conectivo llamadas miocomatas (Love, 1960; Suzuki, 1981). Cada miotomo está compuesto por un gran número de pequeñas fibras musculares de aproximadamente 3 cm de largo (Cheftel y Cheftel, 1976), las cuales se localizan oblicuamente a todo lo largo del eje

principal del filete de pescado (Rodger y Wilding, 1990; Sikorski *et al.*, 1990). En la Figura 1a se muestra el arreglo de los miotomos dentro del filete del pescado.

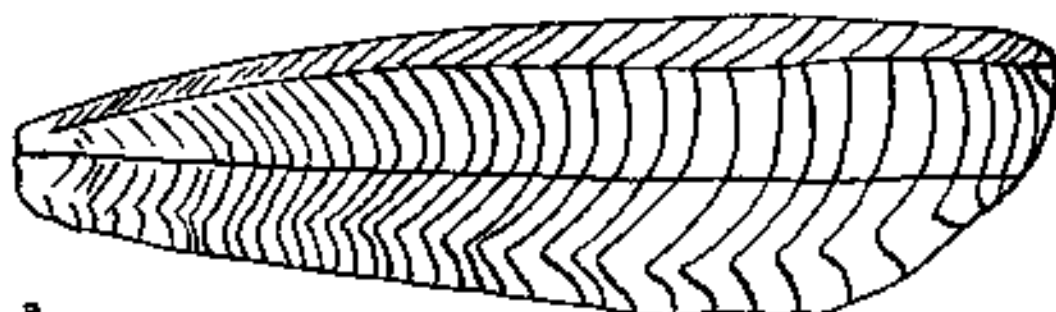
Dentro del miotomo las fibras aparecen arregladas en paquetes. (Figura 1b) , en donde cada paquete se rodea por una capa delgada de tejido conectivo llamado perimesium; a su vez cada fibra se rodea de otra capa llamada endomesium (Rodger y Wilding, 1990; Suzuki, 1981).

Célula muscular. La unidad básica del músculo es la fibra. Una célula muscular contiene todos los elementos típicos de un organismo eucariota; la mayor parte del volumen celular lo ocupan las miofibrillas, cada una de entre 1-5 μ m de diámetro. Estas se localizan paralelamente a lo largo del eje de la fibra (Sikorski *et al.*, 1990; Suzuki, 1981). y se encuentran rodeadas del retículo sarcoplasmático tal y como se muestra en la Figura 2a.

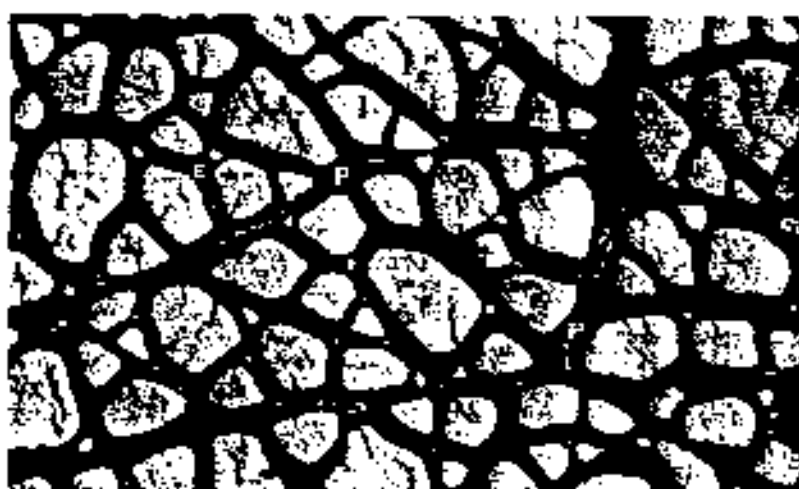
El resto del volumen celular lo ocupa el sarcoplasma, en el cual se encuentra embebidas las miofibrillas . Dentro del sarcoplasma se encuentran contenidos el núcleo y las mitocondrias, así como varios compuestos solubles, especialmente ATP (trifosfato de adenosina), creatina, mioglobina, enzimas glucolíticas, algunos ribosomas, depósitos de glucógeno etc. (Chafel y Chafel, 1976; Rodger y Wilding, 1990). En la Figura 2b se muestran algunos de los componentes celulares antes mencionados.

Métodos Utilizados en la Identificación de Especies

La presencia e identificación de la especie o especies que constituyen a un producto alimenticio, siempre ha sido uno de los principales parámetros considerados dentro de su calidad.



a



b

Figura 1. Estructura del músculo de pescado: (a) representación de la organización de los miotomos dentro del músculo. Las líneas internas (en negro) representan el tejido conectivo que rodea y separa los miotomos., (b) Micrografía de una sección delgada de músculo de salmón, mostrando la organización de las fibras y el tejido conectivo en un miotomo. F = Fibra muscular; E = Endomesium; P = Perimesium.

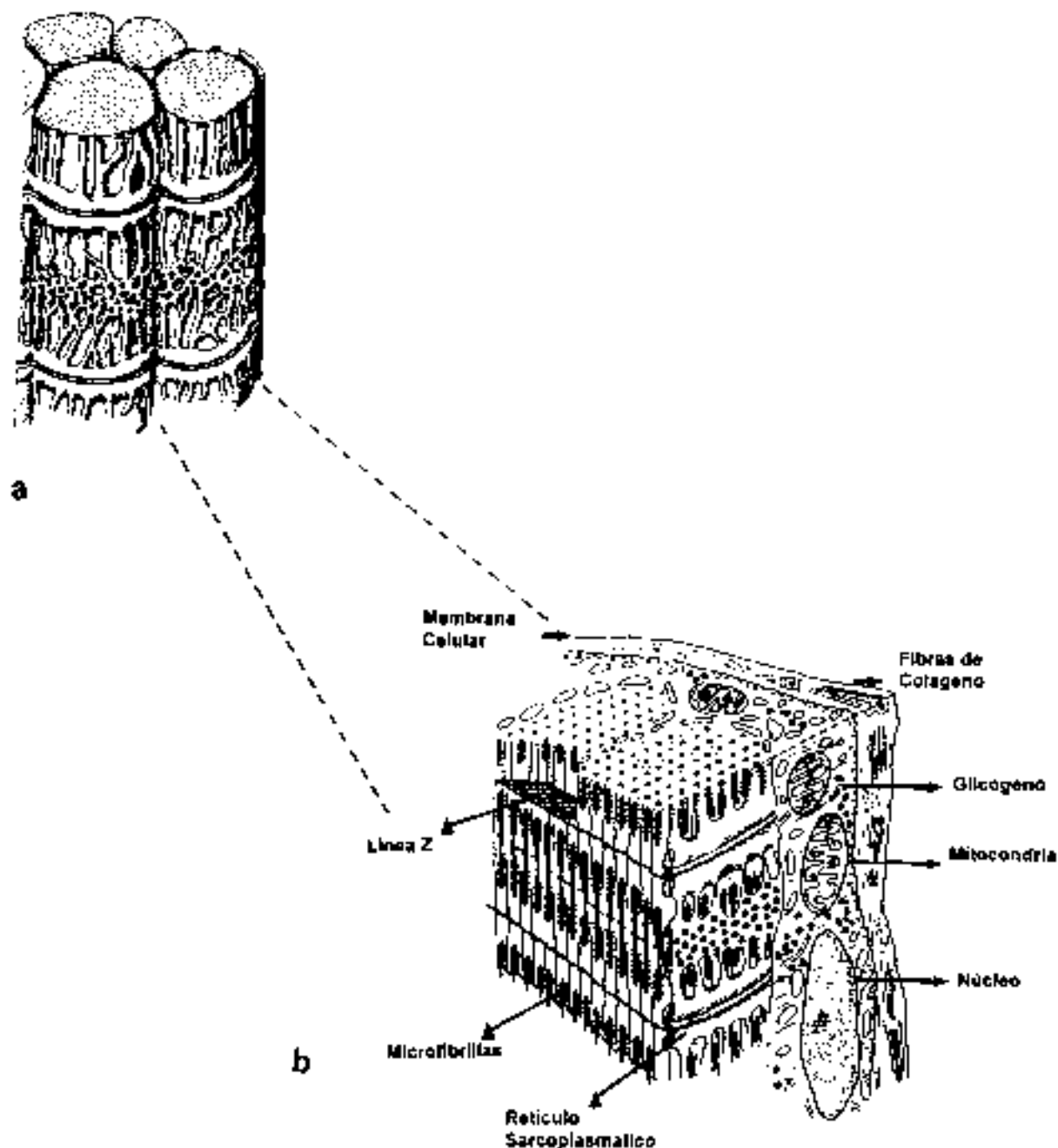


Figura 2. Diagrama de organización de la célula muscular: (a) Fibras musculares rodeadas por el retículo sarcoplasmático y membrana celular (b) esquema de la ultraestructura del músculo de Bacalao (*Gadidae spp*) donde se muestran los componentes que ocupan el volumen celular y las miofibrillas.

Diferentes procedimientos así como componentes musculares, se han utilizados para estimar la identidad de la especie animal que constituye un alimento. Los componentes musculares como los lípidos, proteínas y agua, son utilizados para agrupar y diferenciar especies; sin embargo, como ya menciono anteriormente, la presencia y cantidad de estos compuestos dentro del músculo varía en gran medida dependiendo de diversos factores, pudiéndose encontrar en rangos muy amplios, por lo que resulta casi imposible utilizarlos con fines de identificación.

Por otra parte, la determinación de 3-metilhistidina en extractos de hidrolizados musculares ha sido utilizada para determinar la presencia de carne en cualquier producto alimenticio; sin embargo, debido a que este compuesto puede aparecer comúnmente en muchas especies, es difícil utilizarlo con fines de identificación. Otros de los métodos utilizados son aquéllos que involucran el análisis de composición lipídica, o el análisis de péptidos estables al calor como anserina, carnosina, balenina (Hitchcock y Crimes, 1985).

Sin embargo son los métodos que involucran pequeñas cantidades de proteínas, los cuales han sido utilizados exitosamente para llevar a cabo la identificación de especies. Estos métodos se basan en el hecho de que se pueden encontrar diferencias entre las especies en la composición de aminoácidos, lo cual da por resultado diferencias en sus patrones proteicos.

Existen dos distintos procesos que pueden ser considerados para la detección cualitativa y cuantitativa de estas proteínas. El primero, es que la

solución de proteínas puede ser separada mediante técnicas electroforéticas o cromatográficas y una vez aislada puede ser reconocida o estimada; el segundo se basa en el hecho de que la proteína puede ser caracterizada sin resolución, utilizando inmunoagentes específicos (Hitchcock y Crimes, 1985). En el Cuadro 7 se muestran algunos métodos utilizados para la identificación de especies, siendo los métodos electroforéticos e inmunológicos los más frecuentemente aplicados.

Cuadro 7. Métodos utilizados en la identificación de especies animales en carnes y productos cárnicos

Métodos Electroforéticos	Métodos Inmunológicos	Otros Métodos
Electroforesis sobre gel de agarosa	Inmunodifusión en gel de agar	Patrón de ácidos grasos
Electroforesis sobre gel de poliacrilamida	Contra-Imunoelectroforesis	Dipeptidos de histidina
Electroforesis sobre gel de poliacrilamida-SDS	ELISA	Prueba directa de espectrofotometría de masas
Isoelectroenfoque sobre Gel de poliacrilamida	Ensayo Inmuno-Nefelométrico	

Fuente: Wijngaards and van Biert, 1985.

A pesar de que los métodos inmunológicos son preferidos en algunas ocasiones sobre las técnicas electroforéticas (Lin y Lanier, 1980), presentan

ciertas desventajas para su utilización, las cuales en su mayor parte, se encuentran relacionadas con el antisuero, como son: el tipo utilizado ya sea mono o policlonal, la especificidad que posea; que se encuentre disponible para todas especies y su facilidad de adquisición, dado que en la mayoría de los casos son vendidos por un número limitado de compañías.

Dentro del tipo de antisuero, se pueden producir problemas de reacciones cruzadas entre especies cercanas, que pueden dar falsos positivos durante la reacción antígeno (extracto muscular) y anticuerpo (antisuero) (Wijngaards y van Biert, 1985 ; Doberstein y Greuel, 1985.) y reacciones entre el antisuero y otros componentes de la muestra, como pueden ser el citrato y ascorbato (Hvass, 1985)

En base a lo anterior, la electroforesis se convierte en una de las principales opciones viables a elegir para llevar a cabo la identificación de especies. A continuación se describen algunas características y tipos de métodos electroforéticos.

Métodos Electroforéticos Una molécula cargada que es depositada en un campo eléctrico existente entre dos electrodos inmersos en una solución, migrará hacia uno de ellos. Las moléculas con carga neta positiva se desplazarán hacia el cátodo, mientras que las moléculas con carga neta negativa se desplazarán hacia el ánodo. Esta migración es llamada electroforesis.

Los métodos electroforéticos son la técnica más poderosa utilizada para la separación de proteínas (Hitchcock y Crimes, 1985); proporcionan gran resolución y son altamente reproducibles y confiables (Lundstrom, 1980; Weiet *al.*, 1990). Además proveen de parámetros fisicoquímicos que nos permiten la caracterización proteica en términos de punto isoeléctrico o peso molecular

(Whitaker y Tannenbaum, 1977). Estas técnicas son ampliamente utilizadas en la separación de aminoácidos, péptidos, nucleótidos, proteínas y polinucleótidos, incluyendo moléculas de RNA (Melvin, 1987; Garcilaso, 1983; Stryer, 1990).

En la industria de los alimentos, las técnicas electroforéticas son utilizadas en el aislamiento, purificación e identificación de bandas proteicas tanto en alimentos vegetales (Lee y Klein, 1990; Krobrehel *et al.*, 1988; Sauvare *et al.*, 1984), como en animales. Estas técnicas son empleadas con éxito en la identificación de especies marinas (Seki, 1976; Lundstrom, 1980; Wei *et al.*, 1990; Scobbie y Mackle, 1988; Rodríguez *et al.*, 1987; Huang *et al.*, 1995), siendo incluso eficientes en la identificación de especies cercanas (Lundstrom, 1983a,b; An *et al.*, 1989).

Lo anterior cobra suma importancia debido a que organismos como FDA (Federal Drugs Administration) requieren de métodos que le permitan regular y detectar la posible adulteración de productos de origen marino en el mercado (An *et al.*, 1988, 1990); además, diversos países han impuesto regulaciones de etiquetado para productos marinos (Mermelstein, 1993).

Actualmente la identificación de especies marinas en productos crudos se lleva a cabo utilizando distintas técnicas para el análisis de extractos acuosos tales como electroforesis en condiciones desnaturizantes, isoelectroenfoque o cromatografía en fase reversa (Gallardo *et al.*, 1995).

Utilizando electroforesis de proteínas sarcoplásmicas sobre gel de almidón, Gray y McKenzie (1970) obtuvieron los patrones proteicos de tres especies del género *Salmo*, logrando diferenciarlas sin importar el sexo, estado de madurez y localización geográfica.

Por otra parte, Wei *et al.* (1990), utilizaron isoelectroenfoque sobre gel de poliacrilamida utilizando extractos acuosos, como método para identificar y diferenciar muestras cocidas y crudas de especies de camarón rosa (*Penaeus*

duorarum), blanco (*Penaeus setiferus*) y roca (*Sicyonia brevirostris*) así como mezclas de estos.

Huang *et al.* (1995), utilizaron isoelectroenfoque desnaturizante, electroforesis desnaturizante sobre gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y electroforesis en dos dimensiones (2-D) para obtener perfiles proteicos del extractos acuosos de Pargo rojo (*Lutjanus campechanus*) y otras 11 especies cercanas que pueden ser utilizadas de forma ilegal para sustituir a pargo rojo, el cual es una de las especies comercialmente más importante del grupo de los pargos del Golfo de México, según catalogo de la FAO (1985).

Las combinaciones de electroforesis sobre gel de poliacrilamida-SDS e inmunoensayo (ELISA), fueron utilizadas con éxito por Anet *et al.* (1990), para la identificación de camarón de roca (*Sicyonia brevirostris*)

Una nueva opción en la aplicación de las técnicas electroforéticas es la cuantificación de mezclas de especies marinas en productos de surimi. Huang *et al.* (1990), desarrollaron una ecuación matemática para correlacionar bandas específicas de proteínas obtenidas mediante isoelectroenfoque y sus picos de área obtenidos mediante perfil densitométrico, logrando cuantificar el porcentaje de camarón rosa (*Penaeus duorarum*) existente en mezclas de surimi elaboradas a partir de Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*) y camarón.

Los métodos electroforéticos en sus diferentes modalidades, se han convertido en una herramienta veraz, factible y viable para la identificación de especies marinas. La elección de una técnica u otra depende del tipo de muestra o de la información que se desee obtener, así como de los recursos que se poseen para llevar a cabo la investigación. A continuación se mencionan brevemente algunos tipos de métodos electroforéticos.

Métodos Electroforéticos en Gel No obstante que la electroforesis puede ser llevada a cabo en soluciones, el uso de un medio de soporte o matriz es mucho más conveniente. Los geles son los más comúnmente empleados debido a tres razones principales. La primera es que inhiben las corrientes de convección y difusión producidas por gradientes de temperatura; la segunda, es que sirven de tamices moleculares que potencian la separación de las moléculas sin interactuar con ellas (Melvin, 1987; Stryer, 1990; Boyer, 1986), y la tercera, es que una vez llevado a cabo la electroforesis las moléculas en el medio de soporte pueden revelarse utilizando tinción no específica o mediante métodos enzimológicos e inmunoquímicos (Hitchcock y Crimes, 1985), autoradiografiarse o almacenarse (Hoefler, 1992).

Entre los geles más populares tenemos los de almidón, agar, agarosa y gel de poliacrilamida (Melvin, 1987). Las geles de poliacrilamida son las matrices más populares utilizados en la separación de proteínas debido a que es estable y no interactúa con las proteínas con lo cual se retardaría su migración (Dunbar, 1987).

Separación proteica bajo condiciones no-desnaturalizantes. Esta electroforesis en gel no-desnaturalizante es también llamada electroforesis bajo condiciones nativas y está basado en la separación de proteínas en función de su tamaño y carga. Al mismo tiempo que la acrilamida proporciona un tamaño de poro que sirve como cedazo para las moléculas con diferente tamaño, las moléculas más fuertemente cargadas al pH utilizado en la separación, poseerán una gran movilidad (Dunbar, 1987; Bollag y Edelstein, 1991). Este método nos permite separar moléculas que difieren en una sola carga. Además, la utilización de condiciones no desnaturalizantes minimiza la desnaturalización proteica en contraste con el uso de gel de poliacrilamida-SDS (Dunbar, 1987).

Es importante tomar en cuenta el efecto de algunas variables sobre la electroforesis en condiciones no-desnaturalizantes como son:

- a) La porosidad del gel. Está dada por la concentración de acrilamida utilizada (Bollag y Edelstein, 1991).
- b) La carga de la proteína. Muchas proteínas se encuentran cargadas negativamente a pH 8.8 que es el pH usado en la electroforesis en gel no desnaturizante; sin embargo, la electroforesis también se puede llevar a cabo a pH ligeramente ácidos, es decir, en el grado en que se quiera recobrar una proteína con actividad biológica se trabajará en un rango de pH que no dañe la proteína de interés (Hames, 1981).
- c) La fuerza iónica juega un papel muy importante durante la electroforesis, si esta fuerza es grande provocará un mayor incremento de calor durante la corrida; sin embargo, si es baja, las proteínas pueden agregarse. La fuerza iónica típicamente utilizada varía en un rango de 10-100 mM (McLellan, 1982; Thakker y Grady, 1984; Tuszynski *et al.*, 1978).
- d) Temperatura. Todos los pasos llevados a cabo durante la electroforesis deben ser realizados a temperatura de 0-4°C, con la finalidad de reducir la pérdida de actividad proteica por desnaturización (Bollag y Edelstein, 1991).

La electroforesis bajo condiciones no desnaturizantes, puede ser utilizada en la determinación de peso molecular dependiendo de los R_f calculados a partir de la migración de la proteína en el gel (Hedrick y Smith, 1966); también en la determinación de la actividad enzimática de las proteínas después de que han sido eluidas a través del gel (Gabriel, 1971; Lee, 1990).

Realizando un breve control de las condiciones, la actividad y la estructura de una proteína en un complejo proteico bajo estudio, puede ser mantenida utilizando este tipo de electroforesis.

Separación proteica bajo condiciones desnaturizantes. La utilización de geles de poliacrilamida como soporte para la electroforesis, permite separar y

diferenciar la fracción soluble proteica de la muestra analizada, haciendo posible la identificación y comparación de los patrones proteicos de muestras crudas en la cuales las proteínas no han sido desnaturalizadas (Laird *et al.*, 1982).

Sin embargo, en la identificación de especies cocidas, las proteínas han sido desnaturalizadas por calentamiento (Mackie, 1980; An *et al.*, 1990), haciendo menos efectiva la utilización de gel de poliacrilamida, por lo que varios autores (Lundstrom 1979, 1980; Melvin, 1987; Anet *et al.*, 1989b) han incorporado al gel el detergente dodecilsulfato de sodio (SDS) con la finalidad de incrementar la resolución de los patrones proteicos dentro del gel.

El uso de detergentes aniónicos como el SDS [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{OSO}_3^-\text{Na}^+$], provee una herramienta que permite separar las regiones hidrofóbicas de las proteínas. Este detergente se une a la proteína en proporción constante por unidad de peso, enmascarando las cargas negativas de la proteína para que sólo se tenga un efecto de proteínas cargadas negativamente debido al detergente SDS (Boyer, 1986; Dunbar, 1987; Wei *et al.*, 1990). Generalmente, siempre se agrega en presencia de agentes reductores de puentes disulfuro, en la mayoría de los casos β -mercaptoetanol. Esto confiere a la técnica una gran resolución en la separación electroforética mediante peso molecular.

Weber y Osborn (1969, 1975) y Laemmli (1970), usaron este método para determinar la movilidad de varios tipos de proteínas utilizando geles de poliacrilamida en presencia de SDS, estableciendo que las movilidades de las proteínas son una función lineal de los logaritmos del peso molecular. Normalmente se utiliza un estándar de proteínas con peso molecular conocido, comparando su movilidad electroforética relativa con las proteínas a las cuales se les quiere determinar el peso molecular.

El uso de geles de poliacrilamida con SDS (PAGE-SDS) es de bajo costo, reproducible y además es un método rápido que permite cuantificar, comparar y caracterizar proteínas (Laemmli, 1970; Bollag y Edelstein, 1991).

Métodos de isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida (IEF). Las proteínas también pueden separarse electroforéticamente según su contenido relativo de aminoácidos ácidos o básicos (Boyer, 1986). Algunos de estos aminoácidos tienen grupos laterales los cuales estarán cargados dependiendo del pH del medio en que se encuentren. La carga neta de cualquier proteína estará dada por la suma de las cargas positivas y negativas de los aminoácidos.

El punto isoeléctrico (pI) de una proteína es aquel pH en la cual su carga neta es cero, es decir no tiene actividad electroforética (cargas positivas = cargas negativas) (Vesterberg, 1976; Stryer, 1990). En la técnica de isoelectroenfoque, el término pI se refiere a la región de pH en la cual la proteína no migra más (el término común es se "enfoca") dentro del gel, después de un periodo determinado, utilizando un gel con una composición y temperatura definida (Chambach y Baumann, 1976).

El gradiente o zonas de pH en el gel, son creados utilizando polianfolitos, los cuales son polímeros multicargados con diferentes valores de punto isoeléctrico. Estos polianfolitos son adicionados a la formulación del gel, pudiéndose generar el gradiente durante la corrida de isoelectroenfoque o de una manera previa, sometiendo el gel a las condiciones de corriente antes de la aplicación de las muestras (Rilbe, 1976; Vesterber, 1976; Tollaksen *et al.*, 1981).

Para las proteínas sarcoplásmicas de músculo de pescado, los patrones de isoelectroenfoque de las especies son característicos y sirven para diferenciar entre las especies como las huellas digitales diferencian entre los individuos. El método fue desarrollado y aplicado en peces por Lundstrom y Roderick (1979), del Laboratorio Nacional de Pesquerías Marinas, en

Gloucester, MA, EUA. Mediante este método las proteínas con diferencias de pI de 0.01 unidades de pH pueden ser separadas con una gran resolución (Lundstrom, 1980).

La técnica de isoelectroenfoque es ampliamente utilizada en el estudio de proteínas sarcoplásmicas de peces (Lundstrom, 1980; Ukishima *et al.*, 1981), y ha sido utilizada ampliamente para la identificación de varias especies de pescado (Hamilton, 1982), principalmente especies no procesadas.

Sin embargo, debido a que las especies marinas cocidas o procesadas han sufrido alteraciones de sus moléculas de proteínas debido al calentamiento, se presentaban problemas para la identificación. La extractibilidad de proteínas desnaturalizadas fue incrementada por el uso de SDS o urea (O'Farrell, 1975; Tuszynty *et al.*, 1978), incrementado así la separación y la resolución en los patrones proteicos obtenidos (Keung *et al.*, 1985; An *et al.*, 1989a).

Krzymowek y Wiggin (1981), examinaron 79 muestras de carne de cangrejo cocinado o congelado utilizando urea como extractante de proteínas para su posterior identificación por IEF, obteniendo el 98% de exactitud en la identificación.

Por su parte, Hsieh *et al.* (1995), utilizaron la técnica de isoelectroenfoque para analizar la sustitución de especies en ventas al por menor de filetes de pargo, basándose en el hecho de que la nomenclatura de los peces comercializados en los mercados es confusa y un mismo pescado es frecuentemente vendido con diferentes nombres. Del total de las 121 muestras recolectadas, 81 habían sido etiquetadas como pargo rojo. Después del análisis, se estableció que solamente 24 (30%) de las 81 muestras fueron identificadas como verdaderos pargos rojos (*Lutjanus campechanus*), las 57 muestras restantes (70 %) fueron mal etiquetadas. El resto de las 121 muestras fueron correctamente etiquetadas como pargo. El sustituto más común del

pargo rojo fue el pargo escarlata (*Lutjanus sanguineus*), el cual es una especie importada de pargo del pacífico con piel rojiza.

Estas técnicas han sido utilizadas en la identificación de especies marinas, ya que proveen patrones electroforéticos confiables y reproducibles, pudiéndose diferenciar entre especies cercanas (Lundstrom, 1983a, 1983b, An *et al.*, 1989), tanto en peces como en mariscos crudos, productos marinos cocidos y procesados (An *et al.*, 1989a,b; Krzynowek y Wiggin 1979, 1981).

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se dividió en dos etapas. La primera consistió en estandarizar y optimizar las condiciones requeridas para el análisis electroforético y de isoelectroenfoco de las especies bajo estudio. En la segunda, las metodologías estandarizadas fueron utilizadas para obtener los datos experimentales de las repeticiones para cada una de las especies. Los datos obtenidos fueron utilizados para el diseño y elaboración de un programa computacional que permitió la comparación entre los patrones electroforéticos obtenidos de las especies estudiadas y de muestras comerciales.

Reactivos

Los reactivos utilizados fueron de las siguientes casas comerciales: agua grado HPLC, Ac. acético 99.7%, azida de sodio y carbonato de sodio de Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI); nitrato de plata, formaldehído al 37% y sulfato de cobre pentahidratado de Merck-México (Naucalpan de Juárez, Edo. de México); cloruro de potasio y 1-butanol de Merck (Darmstadt, Germany); Ac. tricloroacético (TCA) de Spectrum Chemical MFG. Corp. (Gardena, CA); tartrato de sodio, hidróxido de sodio, reactivo de Folin Ciocalteu, fluoruro de fenilmetilsulfonil (FFMS), Ac. etilendiamintetraacético (EDTA), acetato de sodio anhidro, tiosulfato de sodio pentahidratado, glicerol, azul de bromofenol, seroalbúmina bovina, agarosa, tris[hidroximetil]-aminometano hidroxicluro y anfolitos pmezclados de rangos 4/8 y 3/10 fueron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Los demás reactivos utilizados, incluyendo los estándares de amplio peso molecular y dos

dimensiones (2-D, SDS-PAGE), fueron de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA)

Estandarización y Optimización de los Procesos Electroforéticos

A continuación se describen los procesos llevados a cabo para la optimización y estandarización de las técnicas utilizadas en el estudio.

Obtención e Identificación de las Especies Para la obtención de la materia prima, se realizaron dos muestreos en los meses de Enero y Mayo de 1994, de las especies conocidas como cabrilla de roca, baya y lenguado.

Las especies fueron obtenidas directamente de las embarcaciones en los campos pesqueros de "Bahía de Kino Viejo" y "El desemboque". El primero ubicado a 107 km. de Hermosillo con coordenadas de 28°49'22" latitud y 111°56'27" longitud; el segundo, a 235 Km. de Hermosillo con coordenadas de 29°30'15" latitud y 112°23'38" longitud. Ambos con 10 m sobre el nivel del mar. La ubicación de los campos pesqueros se muestra en la Figura 3.

Con la finalidad de obtener muestras repetitivas, en el momento de su recolección fueron clasificadas e identificadas por género y especie, mediante la utilización de claves morfológicas. Para el establecimiento de estas claves (Cuadro 8), se recurrió a la asesoría y asistencia del Dr. Albert Van der Haiden (Unidad CIAD-Mazatlán). Bajo estos parámetros, las especies cabrilla de roca, baya y lenguado fueron identificadas respectivamente como: *Mycteropecta rosacea*, *Mycteropecta jordani* y *Paralichthys woolmani*.



Figura 3. Ubicación de los campos pesqueros de "Bahía de Kino Viejo" y "El Desemboque".

Cuadro 8. Características morfológicas utilizadas en la identificación de las especies bajo estudio.

Especie	<i>Mycteropecta jordani</i>	<i>Mycteropecta rosacea</i>	<i>Paralichthys woolmani</i>
Número			
Branquiespinas	21-26	38-43	16-21
Esp. dorsales	XI, 11-12	XI, 16-18	70-81
Esp. anales	III, 11-12	III, 10-11	55-60
Esp. opérculo	2	1	NP
Forma			
Aleta dorsal	continua	continua	única, continua
Aleta caudal	ligeramente recta	recta	doblemente truncada
Dientes	cónicos, plegados	cónicos plegados	agudos separados
Habitad	rocoso	rocoso	litoral, fondo
Color	grisáceo, borde de las aletas blanco	grisáceo claro, pecas café-rojizas	grisáceo oscuro, parte ventral blanco

NP= No presente

De cada especie se muestrearon de 15-20 kg. de pescado por repetición, lo cual es equivalente a 3 o 4 piezas, con excepción de baya en donde una sola pieza es equivalente al peso indicado. En cada muestreo se les informo a los pescadores que las especies se deseaban en forma entera sin eviscerar y sin corte de agallas ya que estas son utilizadas para la identificación.

Inmediatamente después de su adquisición, las muestras se enhielaron y se trasladaron a los laboratorios de la Dirección de Tecnología de Alimentos de Origen Animal del CIAD. El tiempo de traslado de las especies desde el momento de su captura hasta los laboratorios fue de aproximadamente 5 hrs.

En el laboratorio, los pescados fueron eviscerados evitando el rompimiento de las vísceras, fileteados, cortados en trozos pequeños, colocados en bolsas de plástico y etiquetados. Durante el faenado las muestras fueron mantenidas en cama de hielo.

Determinación de Proteína en Músculo. Durante el primer muestreo, una porción del músculo de las especies fue utilizada para la análisis del contenido de nitrógeno proteico, el cual fue determinado por el método de microkjedahl 960.52 de la AOAC (1990), realizándose el análisis por triplicado para cada una de las especies.

Extracto Sarcoplásmico.

Obtención. Se utilizaron dos sistemas extractantes para las proteínas sarcoplásmicas de las muestras crudas de cabrilla, lenguado y pargo. El primero de ellos fue agua deionizada; el segundo, una mezcla de agua conteniendo 0.1 mM de FFMS, 10 mM EDTA y 0.01% peso/volumen (p/v) de azida de sodio como

inhibidores de la acción enzimática de proteinasas y de crecimiento bacteriano, siguiendo las recomendaciones de Anet *et al* (1988).

Sin embargo, debido a que se observó que el FFMS permaneció sin disolver, se realizaron pruebas de solubilidad para este compuesto utilizando como solventes 2-propanol, dimetilsulfoxido (DMSO) y metanol. Finalmente, 2-propanol resultó ser el mejor disolvente, utilizándose 10 mL para disolver 0.1 mM de FFMS. La mezcla anterior fue adicionada al matraz conteniendo en solución EDTA y azida de sodio, aforándose a un volumen final de 1000 mL con agua bidestilada. De esta manera 2-propanol (1%) fue adicionado a la mezcla de compuestos inicial de manera constante para todos los experimentos.

Una vez preparados las soluciones extractantes, las muestras picadas fueron premolidas en un procesador de alimentos Taurus Modelo SR-150 de 60 Hz (Taurus Mexicana, México, DF), y mezcladas inmediatamente con el extractante en proporción de 1:3 (p/v) (An *et al*, 1988), utilizando un recipiente de vidrio de aproximadamente 500 mL. La parte superior del recipiente fue cubierta con parafilm para evitar al máximo posible la entrada de oxígeno al momento de la homogeneización.

Los recipientes conteniendo las mezclas se sumergieron en un baño de hielo y homogenizaron por 2 minutos utilizando un homogeneizador de tejido Tizzumizer Tekman Modelo SDT 1810 (Tekman Co. W. Germany). Posteriormente, los homogenados se centrifugaron a $17,700 \times g$ (aproximadamente 10,000 rpm, 5 °C, 30 min) por modificación al método de Huang *et al*. (1990), utilizando una centrifuga refrigerada Beckman Modelo J2-21 (Beckman Instruments Inc. Palo Alto, CA),.

El sobrenadante conteniendo la fracción sarcoplasmática se filtró sobre papel Whatman No. 4, recolectándose el fluido en probetas sumergidas en hielo, midiéndose directamente el volumen del extracto obtenido. El extracto se dividió en dos partes iguales, almacenándose en recipientes de plástico a 0°C. Una de

las fracciones se utilizó para determinar la estabilidad del extracto; la otra, para la determinación del contenido de proteína.

El tiempo de proceso desde el momento de recolección de la muestra hasta la obtención del extracto sarcoplásmico no excedió las 24 hrs.

Determinación de proteína La concentración de proteína del extracto se determinó siguiendo la metodología propuesta por Lowry *et al.* (1951), contra una curva estándar de 0.1, 0.2, 0.6, 0.8 y 1.0 mg/mL, utilizando una solución madre de seroalbúmina bovina (BSA) de 1.0 mg/mL. El extracto se diluyó en agua 15 veces (v/v), cuantificándose su absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Modelo Lamda 3-A (Perkin Elmer de México S.A. de C.V. México).

Estabilidad Se determinó la actividad enzimática del extracto sarcoplásmico monitoreando la acción proteolítica de las enzimas endógenas del extracto sobre las proteínas presentes. Lo anterior fue interpretado como el aumento en la cantidad de nitrógeno no proteico (NNP) cuantificable en la muestra, según lo reportado por Erickson *et al.* (1983).

Para realizar lo anterior, el extracto se almacenó durante 4 días a 0°C, tomándose muestras a los tiempos 0, 24, 48, 72 y 96 hrs. En cada toma de muestra se mezclaron 12 mL del extracto con 4 mL de TCA al 20%. La mezcla se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente y se filtró sobre papel Whatman No.1, cuantificándose el volumen obtenido. Inmediatamente después se almacenaron a -20°C hasta el momento de su utilización. El contenido de NNP se determinó mediante el método de micro-Kjeldhal 960.52 de la AOAC (1990), utilizando muestras de 0.6-1 g. Todos los análisis fueron realizados por duplicado.

Preparación de la muestra para electroforesis e isoelectroenfoque desnaturante Una vez determinada la concentración de proteína del extracto, se procedió a preparar la muestra para los ensayos electroforéticos bajo las siguientes condiciones:

a) Para la electroforesis desnaturalizante sobre gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), 500 μL del extracto se mezclaron con 500 μL de buffer (0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol y 10% 2-mercaptoetanol), siguiendo las recomendaciones del manual de Hoefer Scientific Instruments (1989). A la solución final se le adicionó azuf de bromofenol para tener una concentración final de 0.05% (p/v). La solución se calentó a temperatura de ebullición por 6 minutos e inmediatamente se enfrió sumergiéndola en un baño de hielo. Todas las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta el momento de su utilización.

b) Para el isoelectroenfoque desnaturalizante, se probaron dos sistemas de buffer muestra: uno con pH de 4-6 y el otro con pH de 3.5-10. Ambos se prepararon siguiendo las recomendaciones del manual de Hoefer Scientific Instruments (1992). El primer buffer fue preparado utilizando 5 % (v/v) de anfólitos con pH de 3.5-10.0 , 1 % (v/v) de anfólitos con pH de 4-6, urea 8 M, 6.6 % (v/v) de Tritón X-100, 15 % de glicerol (v/v), 1.6 % de ditioneitol (p/v); el resto del volumen fue agua deionizada. Una vez preparado el buffer, se mezclaron alícuotas de 500 μL 500 μL del extracto; las muestras se almacenaron inmediatamente a -20°C .

El segundo buffer inicialmente se preparó utilizando 6 % (v/v) de anfólitos de pH 3.5/10, 15 % (v/v) de glicerol aforándose al 100% con agua deionizada. Sin embargo, debido a la ausencia de detergentes y agentes desnaturalizantes se realizó una modificación al sistema añadiendo 10% de Triton X-100 al 20% y 1% de β -mercaptoetanol. Finalmente 500 μL de buffer fueron mezclados con 500 μL del extracto. Todas las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta el momento de su utilización.

Geles. Los geles para la separación de proteínas se elaboraron de la siguiente manera:

Para electroforesis desnaturalizante Se elaboraron geles de poliacrilamida-SDS, según el modelo descrito por Laemmli (1970), siguiendo las indicaciones del manual de Hoefer Scientific Instrument (1989).

Se utilizó como molde de los geles, una cámara electroforética Hoefer "Mighty Small" Modelo SE 200 para geles verticales de 9.0 x 5.7 cm (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA). Antes de su utilización, todas las partes de la cámara fueron lavadas con jabón enzimático, enjuagadas con agua destilada y secadas a temperatura ambiente. Tanto las placas de vidrio como las de alumina se limpiaron con algodón o papel absorbente impregnado de etanol, secándose perfectamente antes de su utilización.

La cámara electroforética fue ensamblada utilizando separadores de 1.5 mm de ancho, sellándose las uniones entre estos y las placas de vidrio y alumina con Cello-Seal (Hoefer Scientific Products, San Francisco, CA).

Se utilizó un sistema discontinuo de buffers para la elaboración de los geles. El gel inferior (10% T, 2.7% C pH 8.8), llamado también gel de separación, se obtuvo mezclando 4.0 mL de agua, 3.3 mL del monómero de acrilamida al 30% y Bis-acrilamida al 0.8%, 2.5 mL de buffer 1.5 M de Tris-Cl (pH 8.8), 100 μ L de SDS al 10% (p/v), 50 μ L de persulfato de amonio al 10% (p/v) y 5 μ L de N,N,N,N-Tetrametiletilendiamina (TEMED), para lograr un volumen total de 10 mL.

La mezcla del gel de separación se vació dentro de la cámara electroforética utilizando un pipeta pasteur (Figura 4), dejándose 1-1.3 cm de espacio vacío entre el gel y el borde de la placa de alumina. Inmediatamente después se depositó sobre el gel una capa de butanol saturado con agua, dejándose polimerizar durante 2 hrs a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se retiró el butanol invirtiendo la cámara y se dio un lavado con agua bidestilada, secándose el exceso de humedad con papel absorbente.

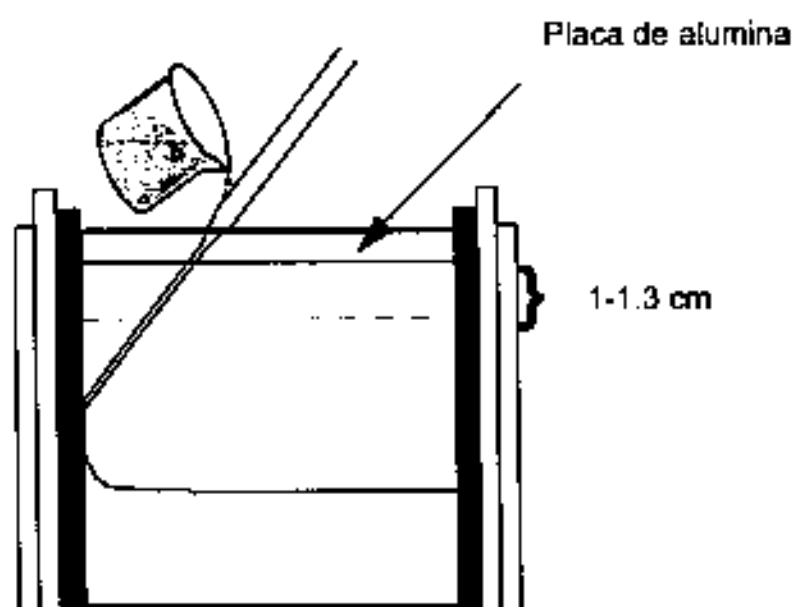


Figura 4. Preparación del gel de electroforesis desnaturante.

El gel superior (4% T, 2% C y pH 6.8) se elaboró 15 min antes de terminar la polimerización del gel de separación. Este se preparó mezclando 3 mL de H₂O deionizada, 0.87 mL de monómero de acrilamida al 30% y bis-acrilamida al 0.8%, 1.25 mL de buffer 0.5 M de Tris-Cl (pH 6.8), 50 μ L de SDS al 10% (p/v), 25 μ L de persulfato de amonio al 10% (p/v) como catalizador, y 2.5 μ L de TEMED para un volumen final de 5 mL.

El espacio vacío entre el gel de separación y el borde de la placa de alumina se llenó con el gel superior, introduciéndose dentro de él un peine de 1.5 mm de ancho con capacidad de formación de 10 canales. El período de polimerización del gel fue de aproximadamente 40 min, posteriormente se retiró el peine y el gel quedó listo para su utilización.

Es posible elaborar geles con días de anticipación. Para ello es necesario vaciar dentro de la cámara únicamente el gel de separación, depositar la capa de butanol:agua y cubrir todo el sistema con papel celofán o plástico adherente, manteniéndolo almacenado a 2°C. Bajo estas condiciones y cuidando que el butanol no se evapore, el gel puede ser viable durante 5 días, sin mostrar modificaciones aparentes.

Para isoelectroenfoque desnaturalizante. Para la formación de los geles de isoelectroenfoque se utilizó una cámara doble para geles verticales de 9.0 x 5.7 cm Hoefer "Mighty Small" Modelo SE 250 con sistema de circulación de agua (Hoefer Scientific Products, San Francisco CA).

Se elaboraron dos tipos de geles, uno con gradiente de pH de 4-6 y otro con gradiente de pH de 3.5-10.0. Para ambos geles se siguieron las recomendaciones propuestas por el manual de Hoefer Scientific Products (1992), realizándose modificaciones respecto a los volúmenes y tipos de anfolitos utilizados siguiendo las recomendaciones propuestas por Giulianet *et al.* (1984). A continuación se describen en forma separada, las modificaciones realizadas para la preparación de ambos geles.

Para los geles con gradiente de pH de 4-6, la modificación se llevó a cabo debido a que en el protocolo de Hoefler se requiere la adición de cuatro diferentes tipos de anfolitos premezclados para lograr el gradiente de pH de 4-6 dentro del gel, mientras que en las recomendaciones de Giulian *et al.* (1984) se requiere solamente la adición de dos tipos de anfolitos premezclados para lograr el mismo gradiente.

Por otra parte, en el caso de los geles con gradiente de pH de 3.5-10.0 la modificación se llevo a cabo unicamente con respecto al volumen de anfolitos utilizados. Lo anterior se debio a que en el protocolo de Hoefler el volumen de anfolitos que se requiere adicionar para la obtención del gradiente de pH es 2.5 veces mayor que el volumen recomendado por Giulian *et al.* (1984)

En el Cuadro 9 se muestran las distintas proporciones y tipos de anfolitos que pueden ser mezclados para la elaboración de un gel de isoelectroenfoque con un gradiente de pH determinado, según Giulian *et al.* (1984). En base a la información del Cuadro 9, se realizaron las modificaciones para cada gel quedando de la siguiente manera: en el caso de los geles con gradiente de pH de 4-6, se calculó que para un volumen final de 12 mL se requería la adición de 240 μ L de anfolitos con pH 4-6 y 48 μ L de anfolitos con pH 3.5-10; con respecto a los geles con gradiente de 3.5-10.0, se calculó que para un volumen de 12 mL se requería la adición de 288 μ L de anfolitos con pH de 3.5-10.0.

Una vez establecidas la modificaciones, se procedió a llevar a cabo la mezcla de los componentes para cada gel. En ambos casos las mezclas fueron realizadas en matraces eiermeyer de 25 mL para filtración al vacío de la siguiente manera: se depositaron inicialmente 3.832 mL de H₂O grado HPLC, 1.2 mL de glicerol, 800 μ L de Tritón X-100 al 30% v/v, 5.76 g de urea ultrapura y 2.2 mL de solución monómero de acrilamida (30% T, 2.7% de C). Esta mazcla se calentó ligeramente a 37°C por 5 min para favorecer la disolución de la urea (An *et al.*, 1989).

Cuadro 9. Mezclas de anfólitos utilizados en la preparación de geles de y isoelectroenfoco con diferentes rangos de pH.

Rango de pH deseado dentro del gel	Tipos de anfólitos utilizado	% Final en la Mezcla del Gel
3.5-10.0	3.5/10.0	2.4
4.0-6.0	3.5/10.0	0.4
	4.0/6.0	2.0
6.0-9.0	3.5/10.0	0.4
	6.0/8.0	1.0
	7.0/9.0	1.0
0.0-11.0	3.5/10.0	0.4
	9.0/11.0	2.0

Fuente: Giulian et al (1984).

Posteriormente los anfólitos fueron adicionados en los volúmenes y tipos necesarios para la elaboración de cada gel, es decir, en el caso de la elaboración de geles con gradiente de pH de 4-6 se adicionaron 240 μL de anfólitos de pH 4-6 y 48 μL de anfólitos con pH de 3.5-10.0, mientras que para el gel de gradiente de 3.5-10.0 se adicionaron 288 μL de anfólitos de pH 3.5-10.0. Una vez adicionados los anfólitos, la mezcla se desgasificó con vacío por varios minutos hasta que no se apreció la formación de burbujas que indicara la salida de oxígeno oculto.

Durante el proceso de desgasado se pueden producir burbujas muy grandes, las cuales pueden ser absorbidas por el tubo del sistema de vacío, demeritando el volumen final del gel, por lo que se debe de tener la precaución de vigilar y cortar el flujo de vacío cuando esto suceda, repitiendo la operación hasta que la formación de burbujas sea mínima.

Una vez desgasificada la muestra, se adicionaron 16 μ L de TEMED y 45 μ L de persulfato de amonio al 10% (p/v); se agitó ligeramente y se vació con ayuda de una pipeta pasteur dentro de la cámara electroforética previamente armada, llenándose aproximadamente hasta 0.3 cm antes del borde de la placa de alumina. Inmediatamente se colocó el peine de 1.5 mm de ancho con capacidad de formación de 10 carriles, teniendo cuidado de que no quedaran ocluidas burbujas de aire (Figura 5).

El gel se dejó polimerizar durante 30 min; posteriormente se retiró el peine y se lavaron los carriles con agua deionizada, eliminándose el exceso de agua mediante la inversión de la cámara electroforética.

Una vez elaborado el gel, se procedió a llenar la cámara superior con el catolito, que en este caso fue una solución de hidróxido de sodio 0.02 M (desgasificado previamente durante 24 hrs). Se comprobó que el sistema no tuviera fugas hacia la cámara inferior, llenándose esta con el anolito, que fue ácido acético 0.02 M.

Bajo estas condiciones, el gel fue precorrido a 200 V constante por 30 min. Posteriormente, la solución de catolito se retiró y solución nueva fue depositada dentro de la cámara, quedando el gel listo para depositar las muestras y realizar las corridas de isoelectroenfoque.

Todas las soluciones utilizadas en la elaboración del gel se prepararon con agua grado HPLC o con agua bidestilada pasada a través de un deionizador Barnstead Modelo D0800 (Barnstead/ThermoLyne Co., Dubuque, Iowa) con la finalidad de eliminar al máximo la presencia de iones que pudieran interferir durante la corrida de isoelectroenfoque, afectando con ello los resultados.

Condiciones de Corrido de los Geles. Tanto para electroforesis desnaturalizante como para isoelectroenfoque, se probaron distintas condiciones

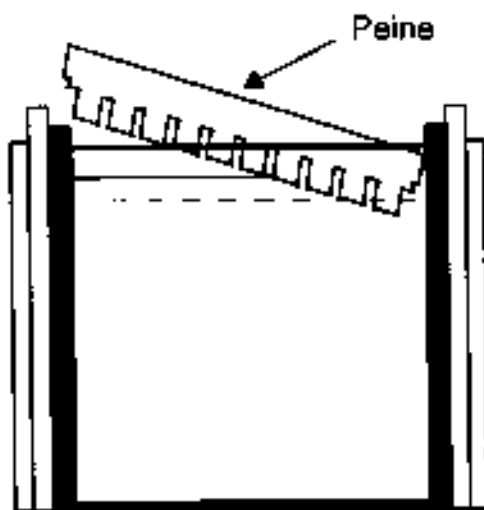
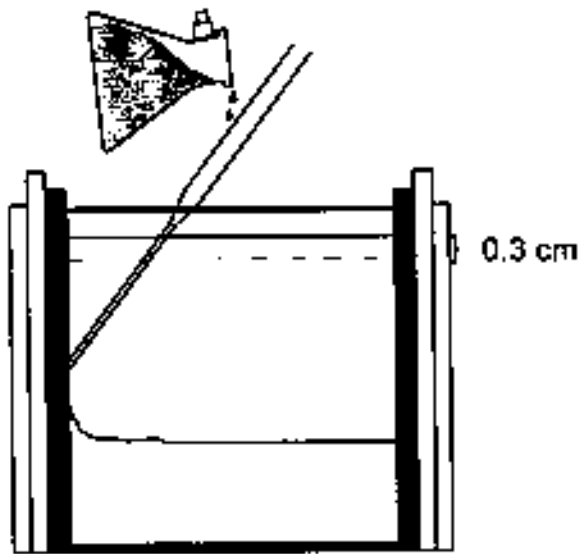


Figura 5. Preparación del gel de isoelectroenfoque desnaturalizante

de corrido, con la finalidad de elegir las que resultasen en la mejor resolución dentro del gel. Algunas condiciones fueron obtenidas de la bibliografía; otras fueron probadas al azar en base a los resultados acumulados de corridas preliminares. En el Cuadro 10 se muestran las condiciones probadas para la estandarización.

Cuadro 10. Condiciones preliminares analizadas para la estandarización de los corridas de isoelectroenfoque y electroforesis desnaturalizantes.

Análisis	Cantidad de Proteína (µg)			Condiciones de Corriente*		
Electroforesis Desnaturalizante	10	20	35 ^a	18 mA	30 mA ^d	80 V
Isoelectroenfoque Desnaturalizante	30	50	100 ^b	200 V/2.5 hrs ^c		400 V/5 hrs
				400 V/17 hrs ^a		

* Condición mantenida constante durante toda la corrida

^a An *et al.*, 1988.

^b Wei *et al.*, 1990; An *et al.*, 1989.

^c Roberson *et al.*, 1987

^d Scobbie y Mackie, 1988; An *et al.*, 1989

Para electroforesis desnaturalizante Las condiciones de 20 µg de proteína por muestra, 80 V constantes por un período de 2 hrs con 10 min a temperatura ambiente, ofrecieron los mejores resultados, por lo que se mantuvieron constantes para todos los análisis posteriores.

En cada gel se aplicaron 6 muestras y 2 estándares de amplio peso molecular conteniendo los siguientes marcadores: miosina (200,000 d), β-

galactosidasa (116,250 d), fosforilasa b (97,400 d), seroalbúmina bovina (66,200 d), ovoalbúmina (45,000 d), anhidrasa carbónica (31,000 d), inhibidor de tripsina (21,500 d), lisozima (14,400 d) y apoprotina (6,500 d).

Para isoelectroenfoque desnaturalizante Las condiciones finales fueron 50 µg de proteína por carril, 400 V constantes por 17 hrs con una temperatura de 5°C durante toda la corrida. En cada gel se aplicaron cinco muestras, manteniéndose los carriles de los extremos vacíos. Dos carriles se dejaron como blancos (dummys); el carril restante fue ocupado con el estándar de dos dimensiones (2-D SDS-PAGE), el cual contenía los siguientes marcadores con pI conocidos: conalbúmina tipo 1 de clara de huevo de gallina (6.0, 6.3, 6.6), seroalbúmina bovina (4.98, 5.07, 5.18), actina de músculo bovino (5.47, 5.50, 5.53), gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa de músculo de conejo (8.3, 8.5), anhidrasa carbónica bovina (5.9, 6.0), inhibidor de tripsina de soya (4.5) y mioglobina de caballo (7.0). Todas las muestras fueron aplicadas en el gel por duplicado, utilizando una jeringa Hamilton de 50 µL, cuidando de realizar varios lavados de la jeringa con agua bidestilada entre cada aplicación de las muestras.

Procedimientos Postcomidas. Los procesos que fueron llevados a cabo para cada análisis, son descritos a continuación en forma separada.

Tinción para electroforesis desnaturalizante La tinción se realizó siguiendo las indicaciones del manual de Hoefer Scientific Products (1992). Se utilizó una solución 0.125% de azul de Coomassie R-250 (p/v) en 40% de metanol (v/v) y 7% de ácido acético (v/v), adicionándose agua bidestilada hasta un volumen final de 100 mL.

El gel se depositó en un contenedor con la solución de tefido y se mantuvo en agitación constante por de espacio 4-8 hrs, en un agitador Labnet Modelo S-2035D (National Labnet Company, Woodbrige NJ).

Posteriormente, la solución teñidora se retiró y 100 mL de solución desteñidora I conteniendo 50% metanol (v/v), 10% de ácido acético (v/v) y agua, se depositaron sobre el gel manteniéndose con agitación suave por una hora. La solución fue retirada, aplicándose 100 mL de solución nueva. El gel se mantuvo en agitación por 1 a 2 hrs más, hasta que no se difundió más colorante al medio.

Se retiró la solución desteñidora I y se aplicó 100 mL de solución desteñidora II, conteniendo 7% de ácido acético, 5% de metanol y agua. El gel se mantuvo en agitación suave por espacio de 6-24 hrs, hasta que el patrón de bandeo proteico se apreció claramente sobre un fondo transparente o ligeramente azul. Una vez desteñado, el gel se conservó en 50 mL de solución desteñidora II a la cual se le adicionó 1% de glicerol, manteniéndose a 4°C.

Es posible reciclar las soluciones desteñidoras I y II, pasándolas a través de carbón activado para eliminar los residuos de colorante. Las soluciones recicladas pueden ser utilizadas 5 ó 6 veces más; posteriormente deben ser eliminadas.

Determinación de pesos moleculares Los pesos moleculares de las bandas obtenidas para cada una de las especies, se determinaron de acuerdo a la metodología propuesta por Weber y Osborn (1969).

Se calculó el coeficiente de migración (Rf) para cada banda proteica del estándar, así como el logaritmo de su peso molecular. Esta información fue suministrada al programa computacional Statgraphics versión 5.0 (Statistical Graphics Corporation, copyright 1985-1991), calculándose mediante regresión lineal simple ($p \leq 0.05$) la ecuación con la cual se determinaron los pesos moleculares de los patrones de cada especie.

Medición del gradiente de pH para isoelectroenfoque. Utilización del potenciómetro Después de terminada la corrida de isoelectroenfoque se determinó el gradiente de pH obtenido en el gel, siguiendo las recomendaciones de Bollag y Eldestein (1981).

Los carriles en blanco (dummies) fueron retiradas cortándose verticalmente a lo largo del gel, utilizando una navaja de hoja delgada. La tira obtenida se cortó a su vez en trozos pequeños de aproximadamente 1 cm², tal y como se muestra en la Figura 6.

Cada trozo se depositó en un vial conteniendo 1 mL de solución 10 mM de KCl, dejándose reposar por 30 min. Posteriormente, el pH de las soluciones de KCl se determinó utilizando un potenciómetro Corning Modelo M240 (Ciba Corning Diagnostics Ltd, Sudbury, England). Todas las lecturas fueron realizadas por duplicado.

Tinción para Isoelectroenfoque desnaturalizante Inicialmente se probaron dos tipos de tinciones para los geles de isoelectroenfoque, una con azul de Coomassie R-250 y otra con nitrato de plata, siguiendo las recomendaciones del manual de Hoefer Scientific Products (1992) y del Centro de Estudios en Salud (1991) respectivamente. Debido a que con la tinción de Coomassie se obtenía un menor número de bandas teñidas por patrón de bandeado, esta tinción fue eliminada manteniendo la tinción con nitrato de plata constante para el resto del experimento.

Para la tinción con nitrato de plata, el gel fue depositado en un recipiente de plástico adicionándose 25 mL de solución para fijación, la cual fue preparada con 40% de etanol (v/v) y 10% de ácido acético (v/v). El gel se agitó suavemente durante 30 minutos, remplazándose posteriormente la solución fijativa con 25 mL de solución de incubación, la cual contenía 30% etanol (v/v), 4.1% de acetato de sodio anhidro (p/v), 0.2% de tiosulfato de sodio pentahidratado (p/v) y 0.52% de glutaraldehído (v/v). El tiempo de incubación fue de aproximadamente 35 min, manteniéndose con agitación suave. Posteriormente, después de tres lavados de 5 min con agua deionizada, el gel fue sumergido en 25 mL de solución nitrato de plata al 0.1% (p/v), 20% de etanol (v/v) y 0.02% formaldehído, dejándose reaccionar con agitación suave por 20 min.

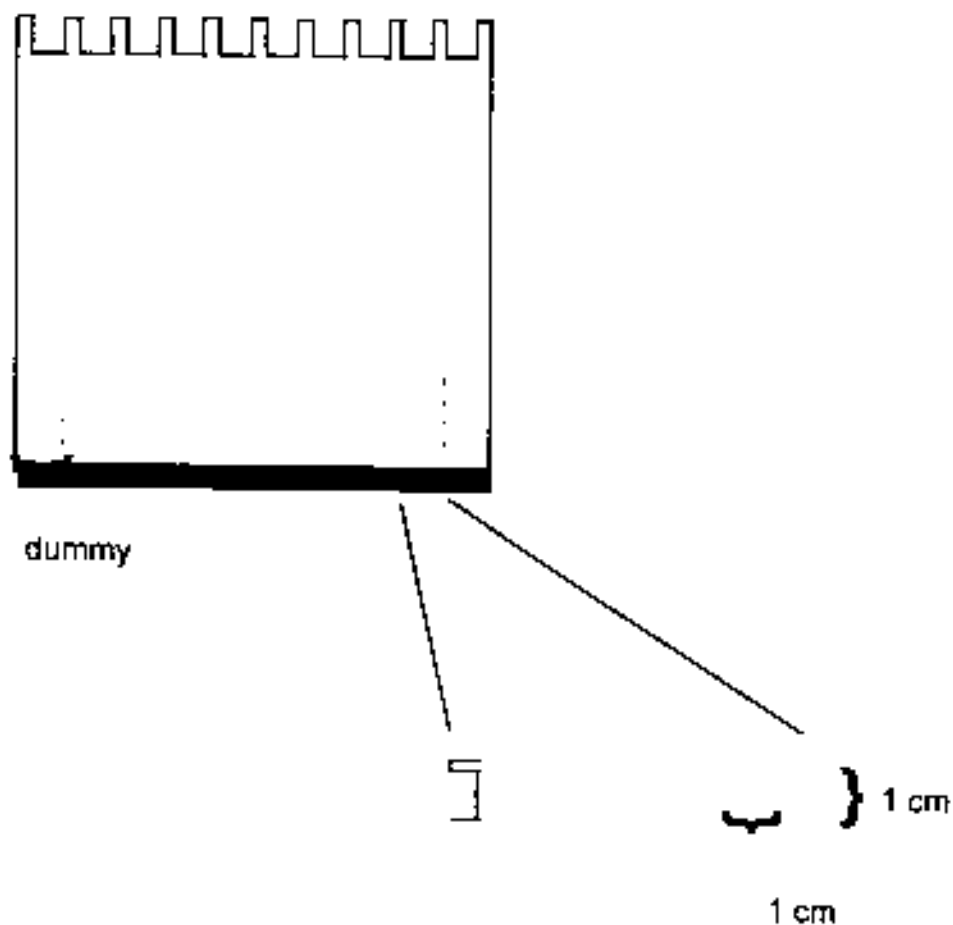


Figura 6. Corte de el carril en blanco (dummy) para realizar la medición de gradiente.

Inmediatamente se retiró la solución de nitrato y se adicionó 25 mL de solución reveladora (2.5% de carbonato de sodio (p/v), 20% de etanol y 0.01% formaldehído(v/v)), manteniéndose en contacto con el gel hasta lograr la intensidad deseada de coloración del patrón de bandeo. En ese momento la solución se retiró y la reacción de coloración se detuvo adicionando 25 mL de solución "stop" (20% de etanol (v/v), 1.46% (p/v) de EDTA libre de ácido y 0.31% (p/v) de NaOH), manteniéndose en agitación durante 10 min. La solución fue retirada dándose un lavado con agua destilada por 10 min. Una vez lavado el gel se depositó en solución de preservación preparada con 3% de glicerol y 5% de etanol, manteniéndose en refrigeración a 4°C.

Debido a que el formaldehído se evapora fácilmente a temperatura ambiente y el glutaraldehído pueden degradarse fácilmente con la luz, es recomendable adicionar estos compuestos a las soluciones de trabajo, inmediatamente antes del momento en que las soluciones vayan a ser utilizadas.

Determinación de puntos isoeléctricos. Utilización de estándares La determinación del punto isoeléctrico se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones del manual de Hoefer Scientific Instruments (1992). Para ello, se tomaron las distancias migradas dentro del gel de cada uno de los estándares, contruyéndose una curva de pH mediante regresión lineal simple ($p \leq 0.05$), utilizando el programa computacional Microsoft Excel versión 5.0 (Microsoft Corporation, copyright 1985-1994). La ecuación obtenida se utilizó para la determinación del punto isoeléctrico de los patrones de bandeo de las especies bajo estudio.

Respaldo fotográfico Una manera de almacenar y conservar la información de los patrones de bandeo obtenidos de las especies, es mediante impresiones fotográficas de los geles. Este respaldo se obtuvo utilizando una cámara fotográfica fija Polaroid Modelo MP-4 (Polaroid Corp., Cambridge, MA), bajo las siguientes condiciones: F22 (apertura del lente), tiempo 1/160, sin filtro, luz

variable de un transiluminador Modelo T1203 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), y cartucho de película en blanco y negro tipo 667 de Polaroid. Para cada corrida experimental se tomaron de 1 a 2 impresiones.

Secado de los geles. La información de los patrones proteicos de las especies también se almacenó secando los geles obtenidos. Para llevar a cabo lo anterior, se utilizó una placa de vidrio de dimensiones aproximadamente un 1 cm mayor a las del gel. Sobre ella se colocaron capas alternas de papel celofán de madera humedecido en agua, gel y nuevamente papel celofán. Se eliminaron las burbujas de aire ocluidas entre las capas, ejerciendo presión al rodar sobre ellas una varilla de vidrio.

Las orillas del papel celofán fueron sujetadas a la placa de vidrio utilizando pinzas de metal (Figura 7). El gel se guardó en un lugar oscuro, dejándose secar por espacio de 2-3 días a temperatura ambiente.

Estudio sobre el Efecto de los procesos de Congelación-Descongelación.

Se realizó un experimento para observar el efecto del proceso de congelación-descongelación sobre las muestras preparadas para electroforesis desnaturalizante, en base a las recomendaciones de Yépiz-Plascencia (1995, comunicación personal). Para llevar a cabo lo anterior, un microvial conteniendo aproximadamente 500 μL del extracto de cada una de las especies se descongeló rápidamente utilizando agua tibia. El contenido del microvial se agitó por inversión y se tomaron alícuotas de 50 μL , depositándose en viales etiquetados como D1 (descongelación uno). Todas las alícuotas se guardaron de nuevo a -20°C . El proceso fue repetido cuatro veces más, etiquetándose las nuevas alícuotas como D2, D3, D4 y D5 respectivamente. Posteriormente, a todas las alícuotas se les determinó su patrón electroforético en gel de poliacrilamida-SDS.

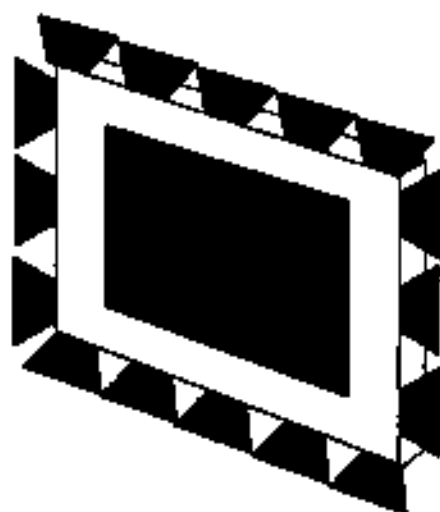
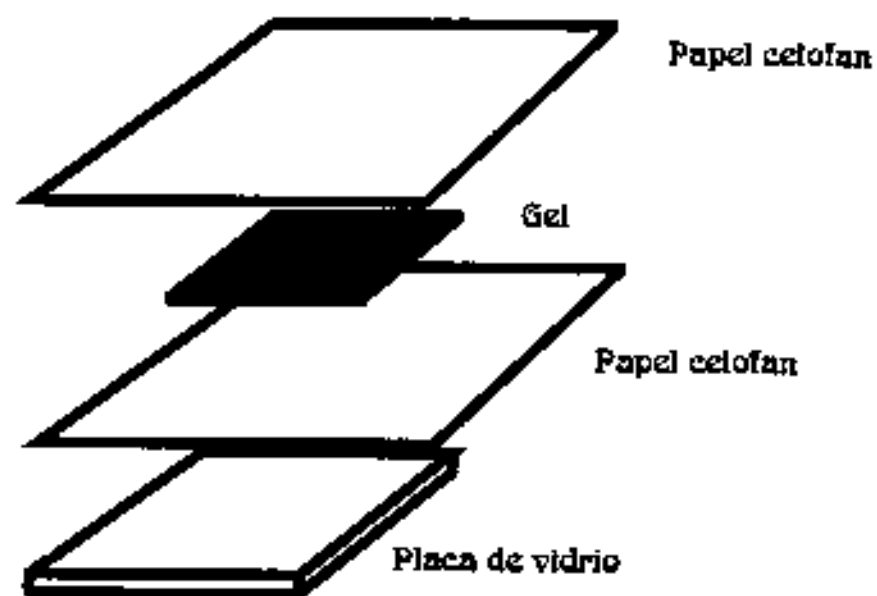


Figura 7. Esquema de secado de los geles obtenidos

Diseño del Programa Computacional.

Se desarrolló un programa computacional que permite tener una biblioteca electrónica de los patrones proteicos obtenidos para cada una de las especies bajo estudio. Este programa realiza comparaciones entre los patrones conocidos y patrones de especies o muestras no identificadas.

Para desarrollar el programa computacional, los resultados de 6 repeticiones de cada una de las bandas del patrón proteico de las especies, tanto para peso molecular como para punto isoeléctrico, fueron suministradas al programa Statgraphics versión 5.0 (Statistical Graphics Corporation, copyright 1985-1991); para cada banda se obtuvo el valor promedio y el intervalo de confianza al 95%. Posteriormente, los patrones de bandeos promedio de cada especie en las dos modalidades de electroforesis fueron utilizados como base para el programa computacional.

En base a nuestras indicaciones, el programa fue desarrollado por el Ing. Alfonso Aguilar, Jefe del Departamento de Servicios de Apoyo a la Investigación del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. El programa ejecutable se diseñó utilizando un software para manejo de base de datos tipo FoxPro II (FOXPRO/LAN 2.0, copyright 1989-1992 Microsoft Corporation World Wide Editor).

Inicialmente el programa despliega en pantalla un menú principal en el cual se brindan las opciones que posee, las que pueden ser elegidas utilizando el número que las precede (Apéndice 1). A continuación se detalla el manejo e información que posee cada opción.

1.- Entrada de especie desconocida. Al elegir esta opción del menú principal (Apéndice 1), el programa despliega una pantalla que nos permite alimentar los datos obtenidos del análisis de una especie desconocida, la cual se desea comparar con la base de datos. Los valores pueden provenir tanto del análisis de

peso molecular como de punto isoeléctrico. El programa pregunta primero el nombre que se le quiere dar al archivo de la especie a analizar, después pide los valores que se desean comparar aceptando como máximo un total de 40 datos, en el caso de que se tengan menos datos después de introducir el último valor se presiona la tecla ESC con la cual se finaliza la carga de datos (Apéndice 2) Se recomienda que los datos sean introducidos en forma ordenada del mayor al menor valor.

2.- Prueba de punto isoeléctrico. Esta opción nos permite llevar a cabo la comparación de los valores de la muestra analizada con los valores de punto isoeléctrico de las especies pertenecientes al programa base. Para iniciar el análisis, el programa pide el nombre del archivo que se desea comparar presionándose después la tecla ENTER, inmediatamente se despliega una pantalla de RESULTADOS la cual se encuentra dividida en dos secciones tal y como se muestra en el ejemplo del Apéndice 3.

En la primera sección se despliega la información proveniente de la comparación del número total de las bandas de la muestra desconocida *versus* la primera especie contenida en la base de datos. La información es presentada con los siguientes encabezados: "Comparación de la muestra (nombre del archivo seleccionado) con (nombre de la primera especie de la base de datos)"; posteriormente, despliega en tres columnas el número de bandas de la especie desconocida (etiquetándola con el nombre dado al archivo), el número de bandas de la especie con la cual se este comparando en la base de datos y la diferencia existente entre estos valores.

En la segunda sección el programa proporciona la información resultante de comparar el valor de cada una de las bandas de la especie desconocida con cada una de las bandas de la especie perteneciente a la base de datos tomando en cuenta el rango (intervalo de confianza) de cada banda. Finalmente el programa despliega el análisis total en 6 columnas con los siguientes encabezados: "límite inferior (lim. inf.)", "banda", "límite superior (lim. sup.)",

"nombre del archivo de la muestra analizada", "diferencia" y "% de diferencia". las tres primeras columnas pertenecen a los datos del programa base y muestran respectivamente el límite inferior del intervalo de confianza, el valor promedio y el límite superior del intervalo de confianza de la banda de la especie con la cual se realiza la comparación; los valores en las columnas se despliegan de mayor a menor. En la cuarta columna el programa coloca el valor de la banda de la especie analizada, utilizando la fila en la cual dicho valor encuentre su ubicación tomando en cuenta el intervalo de confianza del patrón base. La quinta columna proporciona la diferencia existente entre el valor promedio base ("banda") y el valor de la muestra analizada, mientras que la sexta columna muestra en porcentaje esta diferencia, considerando los extremos del intervalo con un valor del 100% respecto al valor promedio.

En el caso de que la muestra analizada tenga una banda que no pueda ubicarse dentro de ninguno de los valores de la especie base, el dato es ubicado en una fila independiente perteneciente a la columna que lleva el nombre del archivo, colocándose en la misma fila asteriscos en las columnas del patrón base así como en las columnas que proporcionan la información de "diferencia" y "% de diferencia". Por otra parte si algún valor del patrón base no encuentre ubicación dentro de ningún valor de la especie analizada se muestra el valor de la banda y su rango colocándose asteriscos en las siguientes columnas. Al finalizar la comparación el programa proporciona un resumen con la siguiente información: número de bandas totales de la muestra analizada, número de bandas similares que posee la muestra analizada con respecto a la especie perteneciente a la base de datos, número total de bandas que posee la especie perteneciente a la base de datos con la cual se esta comparando y el porcentaje de bandas similares de la muestra analizada con respecto a la especie del patrón base (Apéndice 3). Una vez finalizado el análisis el programa pregunta si se desea imprimir los resultados. Posteriormente , el programa procede a repetir el

proceso de comparación con los valores de la siguiente especie de la base de datos.

3.- **Prueba de peso molecular.** Al elegir esta opción, el programa realiza una comparación de la muestra analizada con los valores de peso molecular contenidos dentro del programa base para cada una de las especies. La comparación es realizada de manera similar a la efectuada con los datos de punto isoelectrico, desplegando en pantalla la información antes descrita

4.- **Agregar otra especie.** Esta opción permite introducir datos de nuevas especies que se deseen integrar al patrón base. Con la finalidad de proteger la integridad de la base de datos solamente se puede utilizar esta opción mediante un código de acceso el cual es manejado únicamente por los diseñadores del programa, esto permite mantener un control estricto sobre la información y al mismo tiempo brinda la posibilidad de anexar información de nuevas especies estudiadas permitiendo así ampliar continuamente el diseño base original.

5.- **Finalizar** Al elegir esta opción se le indica al programa que se desea dar por terminada la sesión de trabajo.

Comparación de los Patrones Electroforéticos de Peso Molecular. Se realizó una comparación entre los patrones obtenidos de las especies bajo estudio y los patrones electroforéticos de peso molecular de especies expeditas comercialmente bajo el nombre común de lenguado.

Para ello, dos muestras de la especie con un peso aproximado de 1.5 kg. fueron adquiridas al azar de dos distintos centros comerciales de la localidad. Las muestras fueron trasladadas en hielo hasta las instalaciones de los laboratorios de CIAD A.C., donde se procesaron bajo las mismas condiciones utilizadas para el análisis de las especies bajo estudio.

La información obtenida del análisis de peso molecular para las especies comerciales, fue suministrada dentro del programa computacional desarrollado, realizándose una comparación con los patrones electroforéticos de las especies bajo estudio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estandarización y Optimización de los Procesos Electroforéticos

Determinación de Proteína en el Músculo y Determinación de Proteína del Extracto Sarcoplásmico. El contenido de proteína total en el músculo de las especies en estudio se muestra en el Cuadro 11. Los valores promedio fueron de 19.7 % para cabrilla, 20.1 % para baya y de 21.1 % para lenguado. Los valores obtenidos concuerdan con la bibliografía, donde se reporta para músculo de pescado un rango en el contenido de proteína entre 15-24 % (Suzuki, 1981; Pérez, 1985; Sikorski *et al.*, 1990).

Por otra parte, la cantidad de proteína sarcoplásmica extraída del músculo no mostró diferencias significativas ($p \geq 0.05$), independientemente de que se hayan adicionado o no compuestos inhibidores durante el proceso de extracción (Cuadro 11). El valor mínimo fue para el extracto de baya sin inhibidores (BSI), con 2.80 g. proteína sarcoplásmica/100 g muestra, mientras que el máximo fue para lenguado sin inhibidores (LSI) con 2.97.

El hecho de que el uso de inhibidores de crecimiento bacteriano y actividad enzimática no mostraran influencia sobre la cantidad de proteína extraída, puede ser atribuible a una baja actividad tanto de enzimas endógenas como microbianas, resultado de su inhibición por la baja temperatura mantenida durante todo el proceso de obtención del extracto. Diferencias entre la cantidad de proteína extraída con y sin inhibidores implicaría la presencia de actividad enzimática. Esta acción enzimática podría resultar en la hidrólisis de proteínas musculares principalmente miofibrilares. Los péptidos resultantes de las proteínas

Cuadro 11. Concentración de proteína total y sarcoplásmica en músculo de cabrilla, lenguado y baya.

Espece	Proteína Total (%)	Proteína Sarcoplásmica (g/100 g de pescado)	Proteína Sarcoplásmica (g/100 g prot. total)
Cabrilla	19.70 ^a		
C + Sin inhibidores		2.85 ^a	14.46 ^a
C + con inhibidores		2.94 ^a	14.92 ^a
Lenguado	21.10 ^a		
L + Sin inhibidores		2.97 ^a	14.07 ^a
L + con inhibidores		2.95 ^a	13.98 ^a
Baya	20.11 ^a		
B + Sin inhibidores		2.80 ^a	13.92 ^a
B + con inhibidores		2.84 ^a	14.12 ^a

Cifras en columnas con igual superíndice son estadísticamente iguales ($p \geq 0.05$)

miofibrilares podrían ser extraídos al momento de obtener la fracción sarcoplásmica, aumentando la concentración de esta fracción en los extractos obtenidos sin la mezcla de inhibidores.

El porcentaje de proteína sarcoplásmica obtenida con respecto al contenido total de proteína, también se muestra en el Cuadro 11. El valor promedio considerando todas las especies fue del 14.2 %. De igual forma no se detectó diferencias por el uso de compuestos inhibidores ($p < 0.05$). Estos porcentajes se consideran bajos, tomando en cuenta que Sikorski *et al.* (1985), reportan que la fracción sarcoplásmica representa aproximadamente el 30 % de la proteína total del músculo.

Goll *et al.* (1970) reportaron que factores como velocidad y tiempo de homogenización del tejido, pH utilizado en la extracción, naturaleza del extractante y fuerza de centrifugación utilizada, tienen una gran influencia en la separación de las proteínas sarcoplásmicas de la fracción proteica insoluble. Lo anterior sugiere la necesidad de implementar más de un ciclo de extracción y condiciones más drásticas durante la homogenización del músculo, así como durante la centrifugación del homogenado. Estas operaciones pudiesen resultar en un mayor rompimiento de la célula muscular aumentando con esto la extracción de la fracción sarcoplásmica.

Estabilidad del Extracto Sarcoplásmico. Los valores de nitrógeno no proteico (NNP) en los extractos de cabrilla, lenguado y baya, para ambas condiciones de extracción, se muestran en la Figura 8.

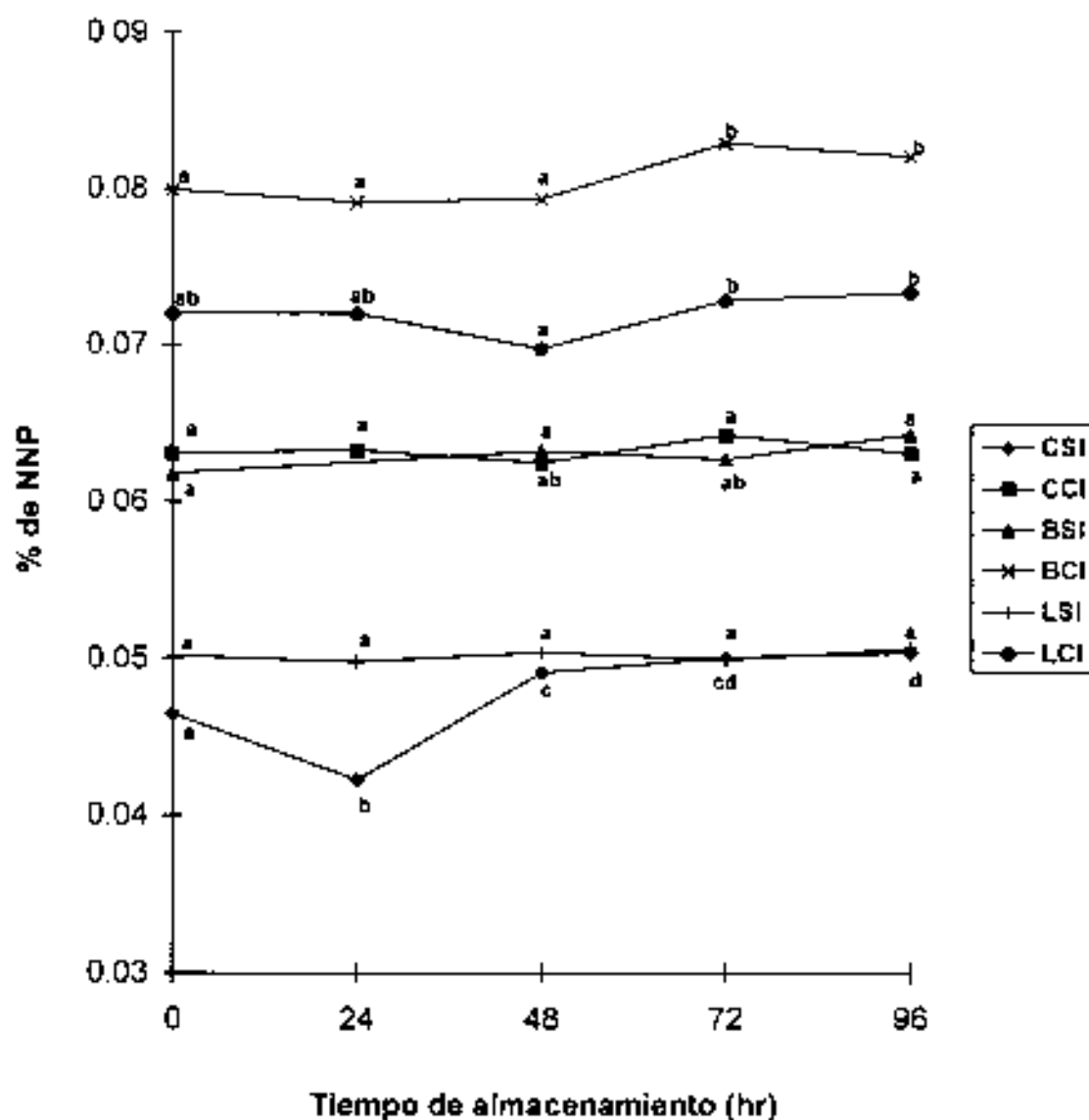


Figura 8. Porcentajes de NNP en los extractos de cabrilla lenguado y baya con y sin inhibidores. Para cada especie, tiempo de almacenamiento con diferente superíndice denota diferencia estadística ($p \geq 0.05$).

Todos los extractos, excepto el de cabrilla sin inhibidores (CSI), fueron estables en sus primeras 48 hrs, no detectándose variación significativa ($p \geq 0.05$) en su contenido de NNP. Particularmente los extractos de cabrilla con inhibidores (CCI), baya sin inhibidores (BSI) y lenguado con y sin inhibidores (LCI, LSI), fueron estables ($p \geq 0.05$) durante el periodo de 96 hrs en refrigeración, con promedios de 0.063 %, 0.63 %, 0.072 % y 0.050 % respectivamente. El extracto CSI mostró un aumento significativo ($p < 0.05$) a las 48 hrs, el de baya con inhibidores (BCI) a las 72 hrs y el de baya sin inhibidores (BSI) a las 96 hrs.

De manera general, los extractos CSI y BCI, mostraron un aumento significativo ($p < 0.05$) en su contenido inicial de NNP durante el periodo de almacenamiento. El aumento en el contenido de NNP entre las 0 y 96 hrs fue del 10 % y 3 %, para CSI y BCI respectivamente. Este aumento, que para fines prácticos pudiese ser considerado como ligero, sugiere una posible acción enzimática en el extracto, independientemente del uso de inhibidores. Los resultados indican que mantener los extractos a bajas temperaturas durante su almacenamiento es el factor más determinante en la inhibición de la acción enzimática, lo que se corrobora al observar los valores obtenidos para CCI, LCI y LSI, donde no se observó aumento conforme avanzó el periodo de almacenamiento.

Todos los extractos en los que se adicionó inhibidores mostraron mayores porcentajes de NNP que sus contrapartes sin ellos. El aumento promedio observado por la adición de los inhibidores, considerando los tres extractos, fue de 37.7%. Lo anterior se debe a que dos de los compuestos utilizados, azida de sodio (NaN_3) y EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_8$), contienen nitrógeno dentro de su formulación.

Se observó una amplia variación en el contenido inicial de NNP entre los extractos sin inhibidor, con un valor mínimo de 0.042 % para CSI y máximo de 0.064 % para BSI. Lo anterior significa que el contenido de NNP en el músculo

de las especies utilizadas es también diferente, con valores promedio de 0.136% para cabrilla, 0.191 % para baya y 0.158 % para lenguado.

La literatura reporta la estabilidad de extractos sarcoplásmicos de varias especies. Resultados de Erickson *et al* (1983), mencionan que la actividad proteolítica en extractos sarcoplásmicos de bacalao (*Gadus macrocephalus*) y de merluza del pacífico (*Mertuicius productus*), permanece estable durante durante 96 hrs de almacenamiento a 4 °C. Similarmente, Lugo-Sánchez (1993) reporta estabilidad similar en extracto sarcoplásmico de músculo de sardina Monterrey (*Sardinops sagax caerulea*), donde el porcentaje de NNP se mantuvo constante durante 96 hrs de almacenamiento a 0 °C.

En base a los resultados obtenidos se recomienda la adición de inhibidores así como mantener los extractos de proteína sarcoplásmica sin desnaturalizar a temperaturas de refrigeración, durante su obtención y almacenamiento y utilizarlos antes de 48 hrs.

Análisis de los Patrones de Bando para el Cálculo de los Pesos Moleculares de Proteínas Sarcoplásmicas del Músculo de Cabrilla, Baya y Lenguado

Efecto de la Adición de Inhibidores. En la Figura 9 se muestran los patrones electroforéticos para cabrilla, baya y lenguado bajo las dos condiciones de extracción utilizadas. La migración de cada banda de proteína se utilizó para el cálculo de su coeficientes de migración "RF". En el Cuadro 12 se muestran los logaritmos de peso molecular (log PM) y los pesos moleculares (PM) promedio calculados correspondientes a cada banda proteica.

Para el CSI muestra un patrón máximo de 10 bandas con rango de PM entre 105.9 kDa y 23.2 kDa. Un comportamiento similar presentan los extractos

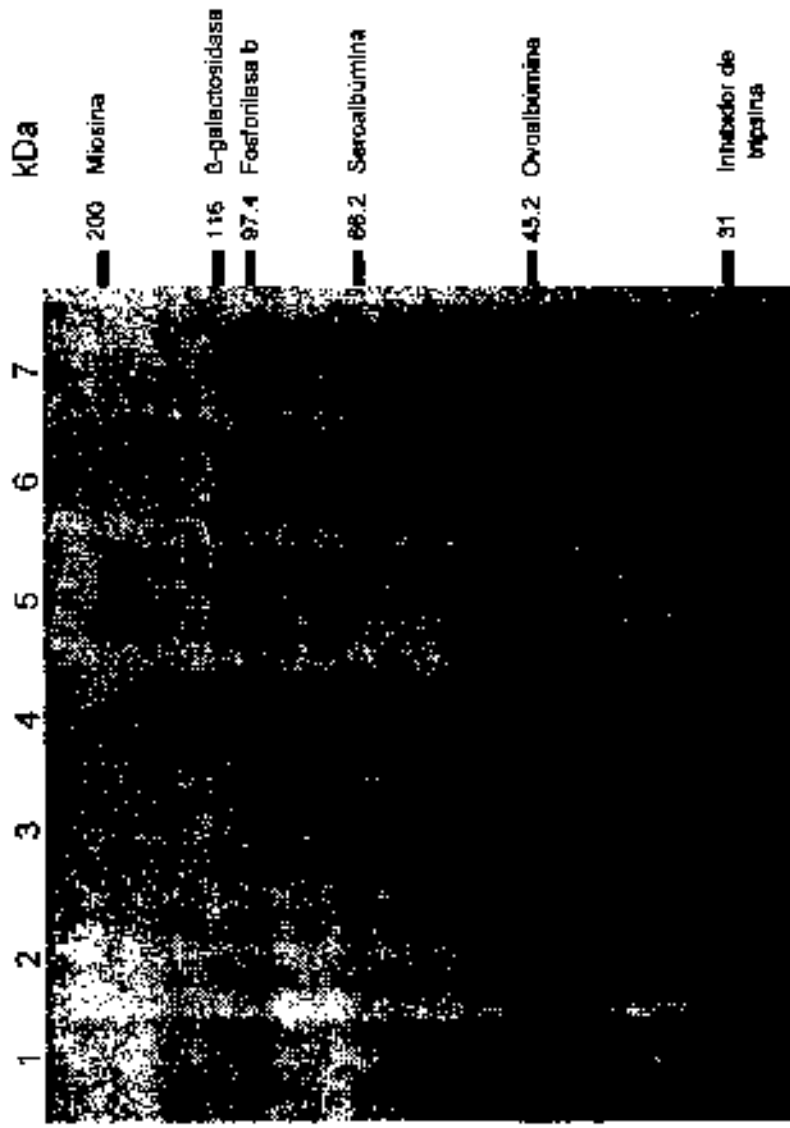


Figura 9. Patrones proteicos de PM obtenidos sobre gel de poliacrilamida-SDS de los extractos sarcoplásmicos de cabrilla (C), lenguado (L) y baya (B). Estándar incluido. Cada camil contiene 20 µg de proteína. Las abreviaciones indican SI = Sin inhibidores, CI = Con inhibidores. (1) CCI, (2) CSI, (3) LSI, (4) LCI, (5) Marcadores de PM, (6) BCI, (7) BSI, (-) señala bandas ausentes

Cuadro 12. Valores de log de PM y PM promedio obtenidos sobre gel poliacrilamida-SDS para las especies de cabrilla (C), baya (B) y lenguado (L) con y sin inhibidores.

Banda por Especie	CCI	CSI	PM Promedio (kDa)	LCI	LSI	PM Promedio (kDa)	BCI	BSI	PM Promedio (kDa)
1	5.03	5.02	105.9	5.14	5.15	139.6	5.02	5.02	104.7
2	4.85	4.85	70.8	5.01	5.01	102.3	4.87	4.86	73.3
3	4.84	4.84	69.2	4.85	4.86	71.6	4.85	4.84	69.9
4	4.80	ND	63.0	4.84	4.84	69.2	4.82	4.81	65.3
5	4.75	4.74	55.6	4.82	4.82	66.0	4.74	4.74	54.9
6	4.68	ND	47.9	4.74	4.75	55.6	4.68	4.68	47.8
7	4.65	4.65	44.7	4.68	ND	49.0	4.64	4.62	42.6
8	4.61	4.61	40.7	4.65	4.66	45.2	4.59	4.60	39.4
9	4.56	4.55	35.9	4.63	4.64	43.2	4.54	4.54	34.6
10	4.53	4.52	33.5	4.61	4.61	40.7	4.51	4.51	32.3
11	4.38	4.39	24.3	4.54	4.54	34.7	4.39	4.37	24.0
12	4.36	4.37	23.2	4.51	4.52	32.7	4.36	4.34	22.4
13				4.38	4.38	24.0			
14				4.35	4.35	22.4			

CI = Con Inhibidores SI = Sin Inhibidores ND = No detectado

Los valores son promedio de 4 repeticiones

de CCl; sin embargo, en éste aparecen dos nuevas bandas (banda por especie 4 y 6) con PM de 63.0 kDa ($\log PM = 4.8$) y 47.9 kDa ($\log PM = 4.68$) respectivamente. Para BSI y BCI, se obtuvieron patrones de 12 bandas características con un rango de PM promedios entre 104.7 kDa y 22.4 kDa. En los extractos de LCI se detectaron 14 bandas características con PM promedios en el rango de 139.6 kDa a 22.4 kDa, mientras que para LSI solamente 13. La banda por especie 7, con PM de 49.0 kDa presente en extracto de LCI, no se detectó en el patrón de LSI.

Lanier *et al.* (1981) y Makinodan *et al.* (1985), reportaron que la actividad autolítica presente en el músculo de pescado es resultado de la manifestación conjunta de un grupo de proteinasas, que pueden manifestarse tanto en el rango ácido como alcalino. Estas enzimas al utilizar a las proteínas como sustrato, forman productos de menor peso molecular debido a la degradación de las proteínas nativas (Siebert, 1962).

La evaluación cualitativa y cuantitativa de esta acción podría llevarse a cabo mediante electroforesis y el análisis del densitograma del patrón de bandas del extracto proteico. Es de suponer un mayor número de bandas en este patrón de existir acción enzimática sobre las proteínas nativas, siempre y cuando los productos resultantes no pasasen a formar parte del NNP como resultado de una hidrólisis intensiva sobre la proteína en cuestión.

En el presente estudio, para cada una de las especies y para cada repetición, los extractos con y sin inhibidores se obtuvieron de la misma muestra; una vez obtenidos, fueron manejados exactamente bajo las mismas condiciones. Los resultados del comportamiento del NNP mencionados anteriormente, mostraron que los extractos proteicos son estables al menos en las primeras 48 hrs, independientemente del uso de inhibidores (Figura 8). De lo anterior se esperaría que los patrones de bandeado de los extractos con y sin inhibidores para cada especie fuesen iguales.

Los resultados en el Cuadro 12 y Figura 9, muestran patrones de bandeo diferentes entre los extractos con y sin inhibidor para cabrilla y lenguado. El número de bandas siempre fue mayor en el patrón de los extractos con inhibidor, observándose una mejor resolución y claridad en los mismos. Estos resultados sugieren que bajo las condiciones experimentales del presente trabajo, se presentó en el extracto una mínima acción enzimática sobre ciertas proteínas específicas de la fracción sarcoplásmica antes de su desnaturalización, cuyos productos de hidrólisis pasarían a formar parte del NNP.

Lo anterior indica que la sola determinación de NNP en extractos de proteína muscular, pudiera no ser un índice adecuado para evaluar la estabilidad de los mismos contra la acción enzimática. Los pequeños cambios en la cantidad de NNP como resultado de esta acción enzimática, pudiesen ser absorbidos por la variación (precisión) del método.

El efecto que ejerce la adición de los inhibidores sobre las proteínas sarcoplásmicas susceptibles a la proteólisis, aunado al manejo de bajas temperaturas, dan por resultado una mayor protección del extracto sarcoplásmico, lográndose apreciar este efecto en los patrones electroforéticos obtenidos. En base a estos resultados, para la subsecuente obtención y comparación de los patrones electroforéticos experimentales, solamente se utilizaron los extractos de las muestras obtenidas con la mezcla de inhibidores.

Comparación de los Patrones Proteicos de las Especies. La detección y establecimiento de bandas proteico-específicas, facilita la correcta diferenciación de una especie desconocida al momento de intentar llevar a cabo su identificación. La importancia de estas bandas puede llegar a ser de tal magnitud, que su sola presencia o ausencia puede tomarse como factor determinante al momento de diferenciar especies pertenecientes al mismo o a diferente género.

Cabrilla y baya son especies que pertenecen al género *Mycteropecta*; ambas poseen patrones electroforéticos similares (Figura 9). Lo anterior puede conducir a errores en definir el patrón característico de cada especie y en su diferenciación, si solamente se toma como base la inspección visual del patrón electroforético al momento de pretender llevar a cabo su identificación.

La utilización de los Rf's y la obtención del PM de las bandas del patrón de cada especie, nos permiten establecer con mayor exactitud diferencias entre las mismas. En el Cuadro 13 se muestran condensados los resultados de los PM obtenidos para las tres especies bajo estudio; los datos fueron ordenados tomando en cuenta su peso molecular promedio y su intervalo de confianza al 95%. Se utilizaron únicamente los patrones de bandeado provenientes de los extractos obtenidos con la mezcla de inhibidores (CI).

Ambas especies pertenecientes al género *Mycteropecta* muestran un patrón de 12 bandas proteicas con rangos de PM muy similares. Sin embargo, es posible establecer diferencias entre ellas utilizando las bandas ubicadas en las líneas 9 y 11 (Cuadro 13), pertenecientes al patrón de cabrilla con PM de 44.7 kDa y 40.7 kDa respectivamente, para las cuales no fueron detectadas bandas con PM similares dentro del patrón de baya. Similarmente, en el patrón de baya las bandas ubicadas en las líneas 10 y 12, con pesos de 42.4 kDa y 38.9 kDa respectivamente, no lograron ser detectadas en cabrilla. La ubicación dentro del patrón electroforético de estas bandas sugiere que son las correspondientes a las bandas de 44.7 y 40.7 kDa detectadas dentro del patrón de cabrilla, no obstante los pesos moleculares promedios obtenidos para estas fueron menores.

Al determinar y analizar los intervalos de confianza (95 %) para los PM de cada una de las bandas anteriormente mencionadas, se establece que la bandas de cabrilla con PM de 44.7 y 40.7 kDa, son diferentes ($p < 0.05$) a las bandas de baya con PM de 42.4 y 38.9 kDa respectivamente y por lo tanto pudiesen ser específicas de la especie. Sin embargo, dada la semejanza del patrón

Cuadro 13 Valores de PM e intervalos de confianza al 95% obtenidos para las especies de cabrilla, lenguado y baya.

Línea	Cabrilla PM Promedio (kDa)	Baya PM Promedio (kDa)	Lenguado PM Promedio (kDa)
1			138.4 ± 1.3
2	105.3 ± 1.8	104.7 ± 1.7	102.8 ± 0.9
3	70.8 ± 1.2	72.4 ± 1.1	71.6 ± 0.6
4	69.2 ± 1.2	69.6 ± 1.1	69.2 ± 0.6
5			66.4 ± 0.6
6	63.0 ± 1.0	64.9 ± 1.0	
7	55.3 ± 1.0	54.9 ± 0.8	55.4 ± 0.5
8	47.9 ± 1.0	47.3 ± 0.7	48.7 ± 0.4
9	44.7 ± 1.3		45.0 ± 0.4
10		42.4 ± 0.7	42.8 ± 0.4
11	40.7 ± 0.7		40.5 ± 0.3
12		38.9 ± 0.6	
13	35.3 ± 0.6	34.5 ± 0.6	35.0 ± 0.3
14	33.1 ± 0.6	32.2 ± 0.5	32.9 ± 0.3
15	24.4 ± 0.4	23.9 ± 0.4	24.1 ± 0.2
16	23.0 ± 0.4	22.3 ± 0.4	22.3 ± 0.2

Los datos ubicados en el mismo renglón indican valores en los cuales sus intervalos de confianza se traslapan.

electroforético de estas dos especies y a la cercanía de las bandas en cuestión, se recomienda que éstas sean utilizadas con discreción al momento de llevar a cabo la diferenciación entre cabrilla y baya.

Por otra parte, es factible diferenciar lenguado (género *Paralichthys*) de cabrilla y baya (género *Mycteropecta*), utilizando las bandas proteicas con pesos de 138.4 kDa y 66.4 kDa, ubicadas en la línea 1 y 6 respectivamente pertenecientes al patrón del lenguado (Cuadro 13). Estas bandas no se encuentran presentes dentro de los patrones de cabrilla y baya. Lo anterior sugiere que ambas bandas, y en especial la de 138.4 kDa, pudiesen ser consideradas como bandas proteico-específicas del patrón de lenguado (*Paralichthys woolmani*), debido a que están ausentes en los patrones de cabrilla y baya.

Efecto del Muestreo Sobre los Patrones de Bando. Los patrones de bando para las tres especies bajo estudio, en las dos diferentes temporadas de muestreo, se muestran en la Figura 10.

Al analizar visualmente los patrones electroforéticos para cada una de las especies, se observa que son prácticamente iguales. Al determinar los intervalos de confianza (95 %) para cada par correspondiente de bandas (datos no tabulados), se determinó que los patrones de bando son iguales y por tanto el efecto del muestreo no fue significativo ($p \geq 0.05$). Los resultados concuerdan con lo reportado por distintos autores, donde se establece que los patrones electroforéticos de proteínas sarcoplásmicas de diferentes especies, mostraron ser independientes del área de muestreo, sexo, estado de maduración, localización geográfica (Gray y McKenzie, 1970), estado de alimentación, tamaño, edad y estado fisiológico del pez (Mackie, 1969). Los patrones electroforéticos parecen no estar afectados por estos parámetros, sugiriendo que

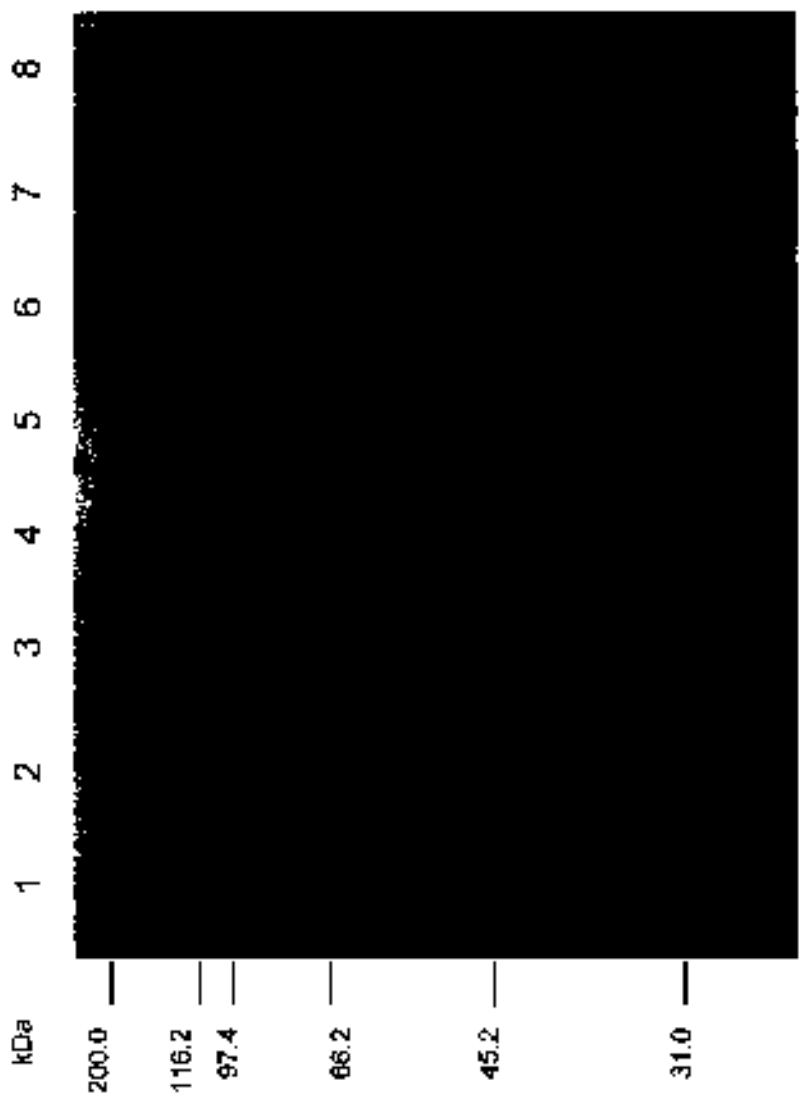


Figura 10. Patrones proteicos de PM de los extractos sarcoplásmicos de cabrilla (C), lenguado (L) y baya (B) con inhibidores (CI). Cada carril contiene 20 µg de proteína. La separación es sobre gel de poliacrilamida-SDS. Las números indican 1= primer muestreo, 2= segundo muestreo. (3 y 6) Marcadores de PM, (1) LC11, (2) LC12, (4) BC11, (5) BC12, (7) CC11 y (8) CC12.

esta metodología puede ser utilizada de una manera confiable para llevar a cabo la identificación de muestras desconocidas, independientemente del muestreo.

Efecto de los Procesos de Congelación-Descongelación Sobre las Muestras Preparadas para Electroforesis. En la Figura 11 se muestran los patrones de bandeo de los extractos de lenguado (11 a), baya (11 b) y cabrilla (11 c) sometidos a 5 ciclos consecutivos de congelación-descongelación. Al comparar los intervalos de confianza (95 %) de los PM (datos no tabulados) para las bandas correspondientes en los patrones resultantes de cada ciclo de congelación, se determinó que en muestras para electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes, la congelación no muestra un efecto significativo ($p \geq 0.05$) en la estabilidad del extracto.

La separación de la regiones hidrofóbicas de la proteína mediante el uso del detergente SDS y el mantenimiento de la reducción de los puentes disulfuro inter- e intramoleculares por el agente desnaturalizante β -mercaptoetanol, evitan la agregación proteica que pudiese haber ocurrido como resultado de los ciclos sucesivos de congelación-descongelación a los que fue sometido la muestra.

Comparación de los Patrones Electroforéticos de Lenguado y una Muestra Comercial. Los patrones electroforéticos de muestras experimentales de lenguado (*Paralichthys woolmanii*) y de muestras comerciales de la "misma" especie, se muestran en la Figura 12. Las migraciones de las bandas fueron traducidos a Rf y posteriormente a PM; los resultados se muestran en el Cuadro 14.

Cada una de las bandas proteicas en el extracto almacenado en congelación de LCI, se encontró dentro del intervalo de confianza (95 %) de la

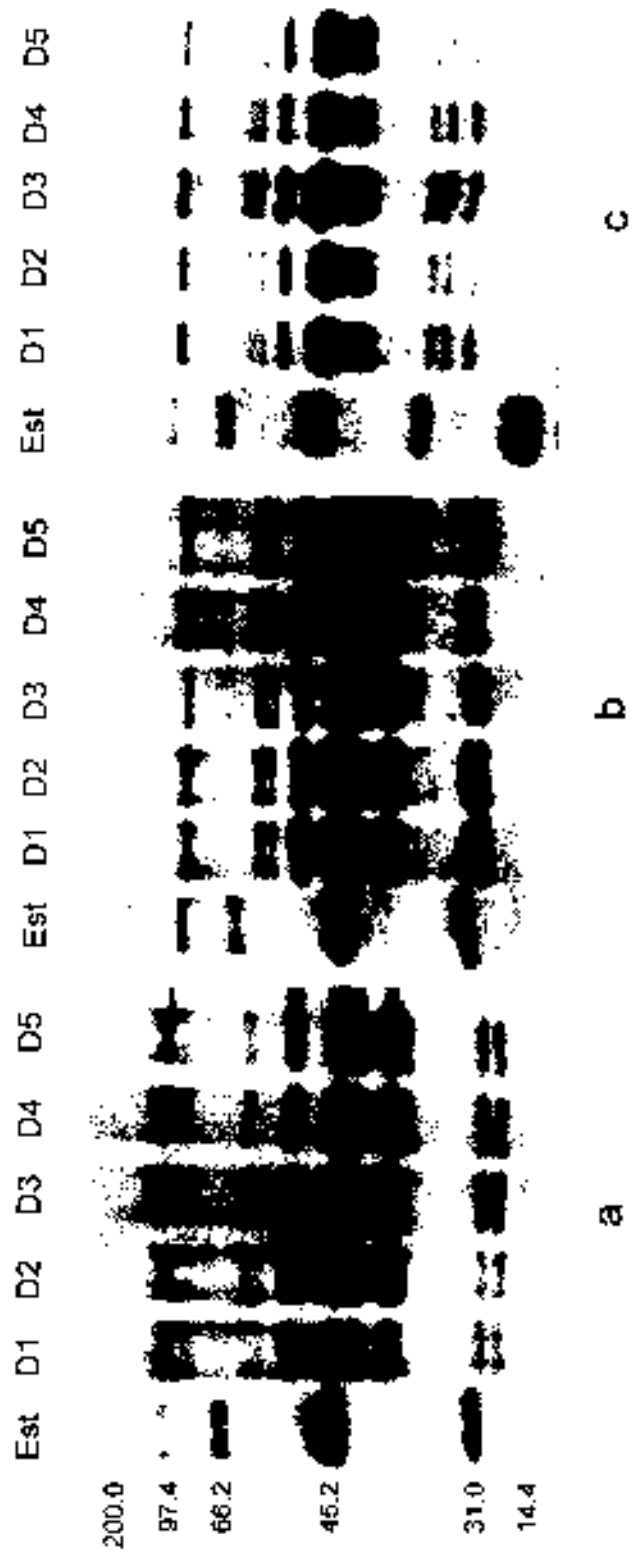


Figura 11. Patrones proteicos sobre gel de poliacrilamida-SDS de extractos sarcoplásmicos de lenguado (a), baya (b) y cabrilla (c) con inhibidores, sometidos a cinco ciclos (D1-D5) sucesivos de congelación-descongelación. Cada camil contiene 20 μ g de proteína. Est = estándar.

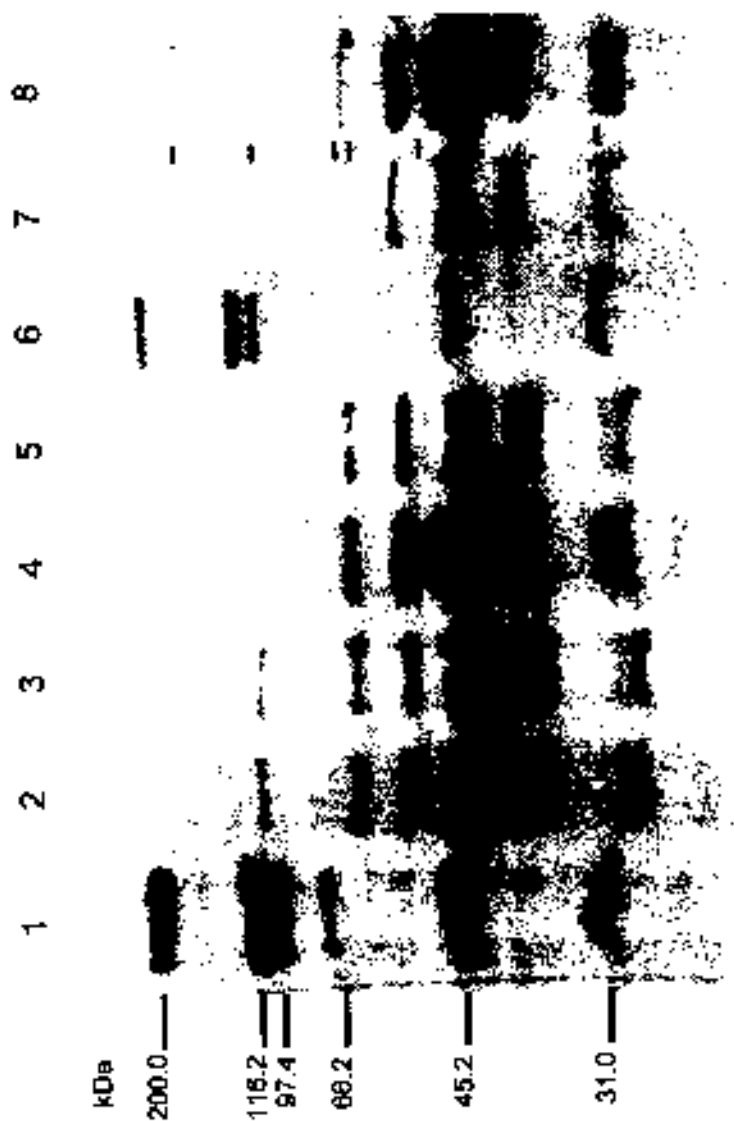


Figura 12. Patrones proteicos sobre gel de poliacrilamida-SDS obtenidos de los extractos sarcoplásmicos de lenguado con inhibidores y sin inhibidores, perteneciente a este estudio y adquirido comercialmente. Cada caril contiene 20 μ g de proteína. Las letras indican: L=lenguado, M=mercado, S=supermercado, SI= sin inhibidores, CI=con inhibidores. (1 y 6) Marcador de PM, (2) LSI, (3) LCI, (4) LMCI, (5) LMSI, (7) LSSI, (8) LSCI, (-) señala bandas ausentes con respecto al patrón de lenguado bajo estudio.

Cuadro 14. Pesos moleculares encontrados para las muestras comerciales de lenguado y lenguado bajo estudio (pesos en kDa).

Línea	LSI	LCI	LMSI	LMCI	LSSI	LSCI	Límites Mínimos y Máximos de Lenguado (Paralichthys wootmani)
1	138.04	138.04	138.04	138.04		138.04	137.10
2	102.33	102.33	102.33	102.33			101.90
3						100.00	
4						70.79	
5	69.18	72.24	72.4	72.44			71.00
6	67.21	69.58	69.18	69.18	69.18		68.60
7	57.54	66.07	67.61	67.61		67.61	65.80
8					56.23		
9		54.95	54.95	54.95		54.95	54.90
10		48.86	48.98	49.00		48.98	48.30
11	45.71	44.67	44.67	44.67	44.67	44.67	44.60
12	43.25	42.66	42.66	42.66			42.40
13					41.69	41.69	
14	40.61	40.61				40.74	40.20
15			39.81	39.81			
16					36.31		
17	34.67	34.77	34.67	34.67			34.70
18	33.11	32.66	33.11	32.36	33.88	33.11	32.60
19						24.55	
20	23.44	23.91	24.35	24.35	23.99	22.39	23.90
21	21.98	22.38	22.00	22.39			22.10

Los datos ubicados en misma línea indican valores similares tomando en cuenta el intervalo de confianza

banda respectiva que previamente había sido determinado para el mismo en la fase experimental inicial (Cuadro 13). Sin embargo, en el extracto LSI almacenado en congelación se encontraron variaciones con respecto a los resultados encontrados con anterioridad. Las bandas de PM promedio de 71.6 y 55.4 kDa (Cuadro 12), no se detectaron en este extracto; sin embargo, aparece una nueva banda con peso de 57.54 kDa ubicada en la línea 8 (Cuadro 14).

Con respecto a las muestras comerciales de LMCI y LMSI, la mayor parte de los valores de PM determinados para ambos extractos estuvieron dentro del intervalo de confianza (95 %) establecido previamente para cada banda de lenguado. Las bandas con pesos de 72.44 kDa (línea 5) y 67.61 kDa (línea 7) y 39.81 kDa (línea 15), se encontraron ligeramente desplazadas de los intervalos de confianza.

Los valores del patrón de bandeo de la muestra LMCI fueron suministrados dentro del programa computacional, los resultados obtenidos indicaron que el patrón de bandeo presentaba una correlación de 57.14 % con respecto al patrón de lenguado (Apéndice V), 58.33 % con respecto al patrón de baya (Apéndice VI) y 33.33 % con respecto al patrón de cabrilla (Apéndice VII). Sin embargo, debido a que los valores de algunas bandas de la especie analizada se encuentran muy próximos a los valores de la especie lenguado perteneciente al estudio se sugiere que probablemente se trate de las mismas bandas, aunado a lo anterior la muestra LMCI posee dentro de su patrón la banda de 138.4 kDa (Apéndice V) la cual es considerada como banda proteico-específica del patrón de lenguado (*Paralichthys woolman*).

La gran similitud de los patrones electroforéticos que presentan los extractos provenientes de la muestra comercial adquirida en el mercado con los patrones electroforéticos de lenguado perteneciente a nuestro estudio, sugiere que la muestra comercial fue correctamente etiquetada y comercializada como lenguado.

Para los extractos de LSSI y LSCI (Cuadro 14), se encontró una diferencia marcada entre los patrones obtenidos al ser comparadas con los extractos de nuestro estudio. La ausencia de inhibidores durante la preparación del extracto afectó considerablemente el patrón electroforético de la muestra de LSSI, detectándose solamente 7 bandas proteicas, de éstas únicamente las bandas de 69.18 kDa, 44.67 kDa, 33.88 kDa y 23.99 kDa (líneas 6,11,18 y 22), se correlacionan con bandas presentes en el patrón de lenguado establecido con anterioridad, el resto de las bandas detectadas mostraron valores que no cayeron dentro de los intervalos de confianza establecidos. Los valores del patrón de bandeado de la muestra LSSI fueron suministrados dentro del programa computacional, obteniéndose un 21.43 % de semejanza con el patrón de lenguado (Apéndice VIII), 16.67 % de semejanza con respecto al patrón de baya (Apéndice IX) y 25 % de semejanza con respecto al patrón de cabrilla (Apéndice X).

An et al. (1988), reportaron cambios en los patrones electroforéticos de extractos acuosos de tres especies de camarón (*Penaeus duorarum*, *Penaeus setiferus* y *Sycyonia brevirostris*) mantenidos a temperatura ambiente, cuando el inhibidor de proteasas fluoruro de fenilmetilsulfonil (FFMS) no se incorporó durante su preparación. Paralelamente a la desaparición de algunas bandas de los patrones, aparecieron nuevas bandas correspondientes a péptidos de menor peso molecular.

La acción de proteinasas sobre proteínas y péptidos de alto PM, da por resultado la aparición de nuevos péptidos; algunos de ellos pudieron ser detectados bajo las condiciones experimentales de nuestro estudio. Sin embargo, los péptidos menores a los 20 kDa probablemente no estén siendo retenidos dentro de los geles experimentales del presente estudio, debido al tamaño de poro utilizado. Una nueva banda aparece en los extractos de LSSI y LSI con peso de 56.23 kDa y 57.54 kDa respectivamente (Cuadro 14). Lo anterior podría ser el

resultado de proteólisis sobre la banda con PM promedio de 71.6 kDa (Cuadro 12), la cual no fue detectada en los extractos mencionados.

Se obtuvo un patrón de 12 bandas para el extracto de LSCI; de estas, solo ocho corresponden al patrón estándar de LCI, representando el 57.1% de semejanza entre ambos patrones. Al igual que para el extracto de LSSI, en este extracto se detectaron nuevas bandas (líneas 3, 4, 13 y 19). Los valores del patrón de bandeo de la muestra LSCI fueron suministrados dentro del programa computacional, los resultados mostraron un 50.0 % de semejanza con respecto al patrón de lenguado (Apéndice XI), 16.67 % de semejanza con respecto al patrón de baya (Apéndice XII) y 50% de semejanza con respecto al patrón de cabrilla (Apéndice XIII). El programa detectó dentro del patrón de la muestra LSCI la presencia de una banda con peso de 139.04 que cae dentro del intervalo de la banda proteico-específica de 138.4 kDa establecida previamente para la especie de lenguado, lo cual sugiere que la muestra probablemente pueda pertenecer a la especie lenguado.

Variaciones en la intensidad de los patrones electroforéticos de bandeo pueden ser apreciables si el proceso de extracción de la fracción sarcoplásmica se lleva a cabo en muestras de pescado que han sido previamente congeladas. Yowell y Flurkey (1986) compararon los extractos sarcoplásmicos de bacalao (*Gadidae spp*) obtenidos de filetes frescos, filetes congelados rápidamente (-196 °C) y filetes congelados lentamente (-15 °C). Estos investigadores encontraron una disminución del 47 % en la recuperación de proteína por efecto de la congelación.

Para este estudio, la importancia de haber obtenido los extractos sarcoplásmicos de las especies sin llevar a cabo una congelación previa del músculo de pescado, aunado al uso de los compuestos inhibidores de crecimiento bacteriano y de acción enzimática, permitieron establecer el patrón proteico de lenguado (*Paralichthys woolman*) en su forma fresca. A este patrón se le denominó

patrón base o estándar. La comparación de este patrón con muestras comerciales, mostró que las condiciones en las cuales se mantiene el músculo de pescado durante su manejo y comercialización afectan su patrón electroforético. Lo anterior dificulta el proceso de identificación de la especie por esta metodología.

Un extracto de músculo que ha sido sometido a procesos de conservación en los cuales las condiciones han sido mal manejadas y se ha abusado de la congelación-descongelación, da por resultado un patrón electroforético en el cual un gran número de bandas pudiesen no ser detectadas debido a fenómenos de agregación proteica. Un manejo inadecuado de temperaturas por arriba de los 0 °C, repercutiría en la acción bacteriana y de enzimas endógenas, que pudiesen resultar, por otro lado, en un número mayor de bandas en el patrón electroforético.

A este mismo respecto, el uso de inhibidores durante la preparación del extracto ejerce un efecto protector sobre el mismo. Sin su uso, el grado de degradación puede llegar a ser de tal magnitud que el patrón electroforético obtenido puede llegar a no ser identificado correctamente, como en el caso del presente estudio para la especie etiquetada comercialmente perteneciente al supermercado.

El programa computacional desarrollado en el presente estudio, reveló que las muestras comerciales adquiridas en el mercado, LMCI y LMSI, fueron correctamente etiquetadas como lenguado, mientras que las muestras comerciales adquiridas en el supermercado, LSCI y LSSI, pudiesen no ser la especie que se indica.

Análisis de los Patrones de Isoelectroenfoque Desnaturalizante de Cabrilla, Lenguado y Baya

Debido al efecto protector que la mezcla de inhibidores utilizada mostró sobre los patrones proteicos de PM obtenidos para las especies de nuestro estudio, se tomó la decisión de realizar el análisis de isoelectroenfoque únicamente en este tipo de extractos.

Mediciones del Gradiente de pH dentro de los Gels. Se utilizaron dos sistemas de gradientes para llevar a cabo las corridas de isoelectroenfoque. En la Figura 13 se muestran los resultados de los gradientes promedio logrados para cada tipo de gel.

Teóricamente, los gels fueron diseñados para obtener los gradientes de pH de 4.0-6.0 y de 3.5-10. Prácticamente, los gels lograron gradientes de pH promedio de 4.3 a 7.1 y de 4.7 a 8.8 respectivamente. Los coeficientes de variación encontrados entre repeticiones fueron para todas las distancias medidas inferiores al 5 %. Los gradientes obtenidos experimentalmente observaron un desplazamiento respecto al rango teórico esperado. Para el caso del gradiente teórico de 3.5 a 10.0, el desplazamiento fue de +1.2 unidades de pH en el lado ácido del gel y -1.2 en el básico; mientras que el gradiente teórico de 4.0-6.0 mostró un desplazamiento de +0.3 unidades de pH en lado ácido y +1.1 en el básico.

Krzymowek y Wiggan (1979), reportan desplazamientos de pH de -1.0 unidad en el lado catódico y +1.0 en el lado anódico en gels de urea con gradiente teórico de 7-9. Comportamientos similares de desplazamiento de rangos de pH en gels de urea con gradiente de 4.0-6.0, han sido reportados por Weiet

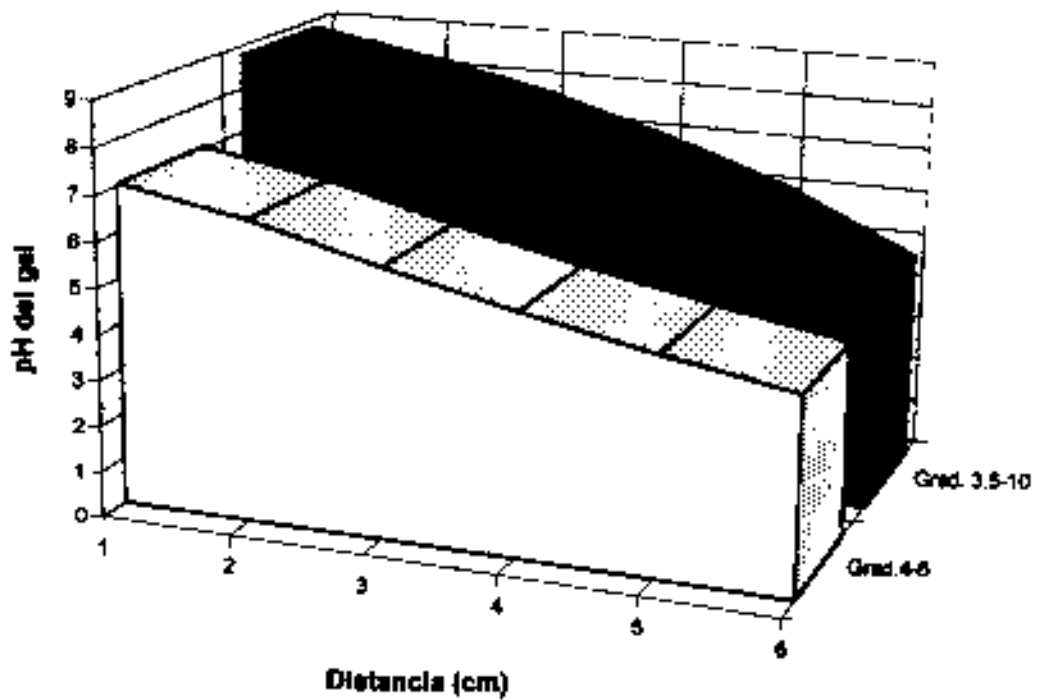


Figura 13. Comportamiento de los gradientes de pH encontrados dentro de los geles utilizados para las corridas de isoelectroenfoque.

al (1989). Se han detectado cambios en los pI de los anfólitos cuando los sistemas electroforéticos contienen urea y glicerol (Righetti *et al.*, 1974; Ui, 1970).

El desplazamiento obtenido en el gradiente experimental pudo deberse al efecto de estos dos compuestos, ya que formaban parte de la composición de los geles. No obstante que los gradientes teóricos y experimentales no coincidieron, si se logró una gran linealidad en la elaboración de los mismos ($R^2 > 0.95$). En la Figura 14 se muestran dos ejemplos de ecuaciones de regresión obtenidas para geles con gradientes de 3.5-10 y de 4.0-6.0, dentro de este experimento.

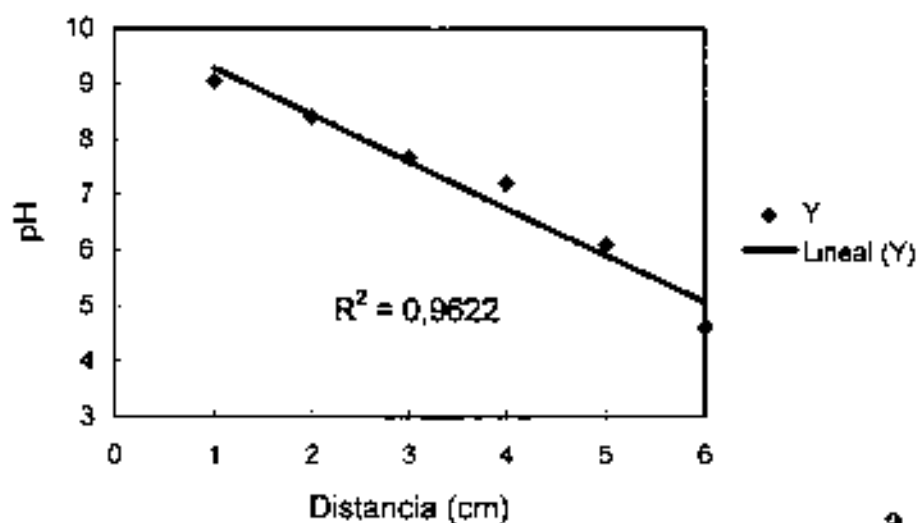
Existen reportes que indican que durante corridas de isoelectroenfoque, los valores de pI de proteínas encontrados en geles que contienen urea, son diferentes a los valores de pI en geles elaborados sin este compuesto (Gelsema *et al.*, 1979; Bio-Rad Laboratories., S/F).

La asignación de los valores de pI de nuestros estándares se realizó tomando en cuenta la aparición constante de la banda, su ubicación, intensidad de coloración y el gradiente de pH en el gel. La linealidad del gradiente de pH dentro de ambos tipos de geles es de suma importancia, debido a que indica que un gradiente estable de pH está siendo creado dentro del gel. Lo anterior facilitó y favoreció en gran medida la correcta asignación de los valores de pI de nuestros estándares.

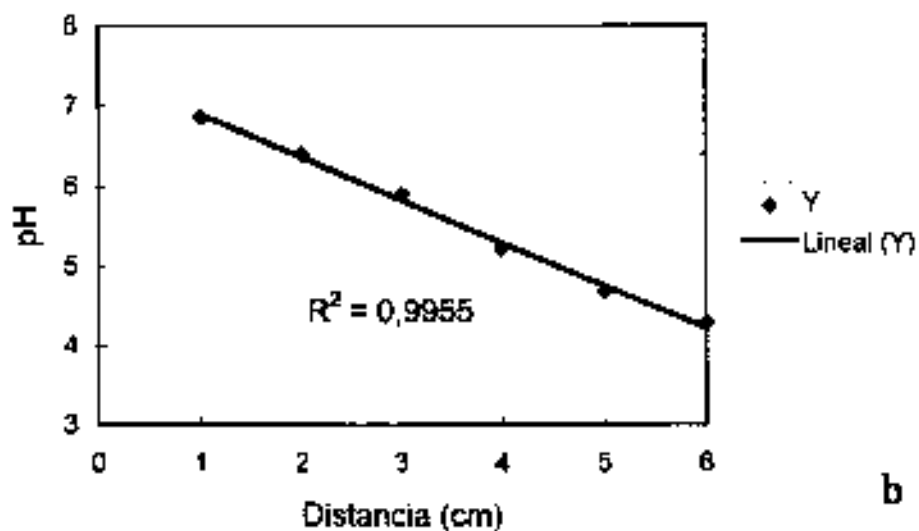
Efecto de la Concentración de Proteína, Muestreo y Gradiente de pH Sobre los Patrones de pI . En la Figuras 15 y 16 se muestran los patrones de pI obtenidos para los extractos de cabrilla, lenguado y baya con inhibidores (CCI, LCI, BCI) en geles con gradiente de pH 4.0-6.0 y 3.5-10.0 respectivamente.

Dos concentraciones de proteína, así como el efecto que pudiera tener el muestreo y el gradiente de pH de gel, se analizaron conjuntamente.

Concentración de proteína. Se observó la influencia de la concentración de proteína utilizada durante la corrida electroforética en el patrón de bandeo obtenido. Bandas proteicas que no pueden ser apreciadas claramente cuando se



a



b

Figura 14. Curva de regresión lineal obtenida para gels con gradiente de 3.5-10.0 (a) y de 4.0-6.0 (b).

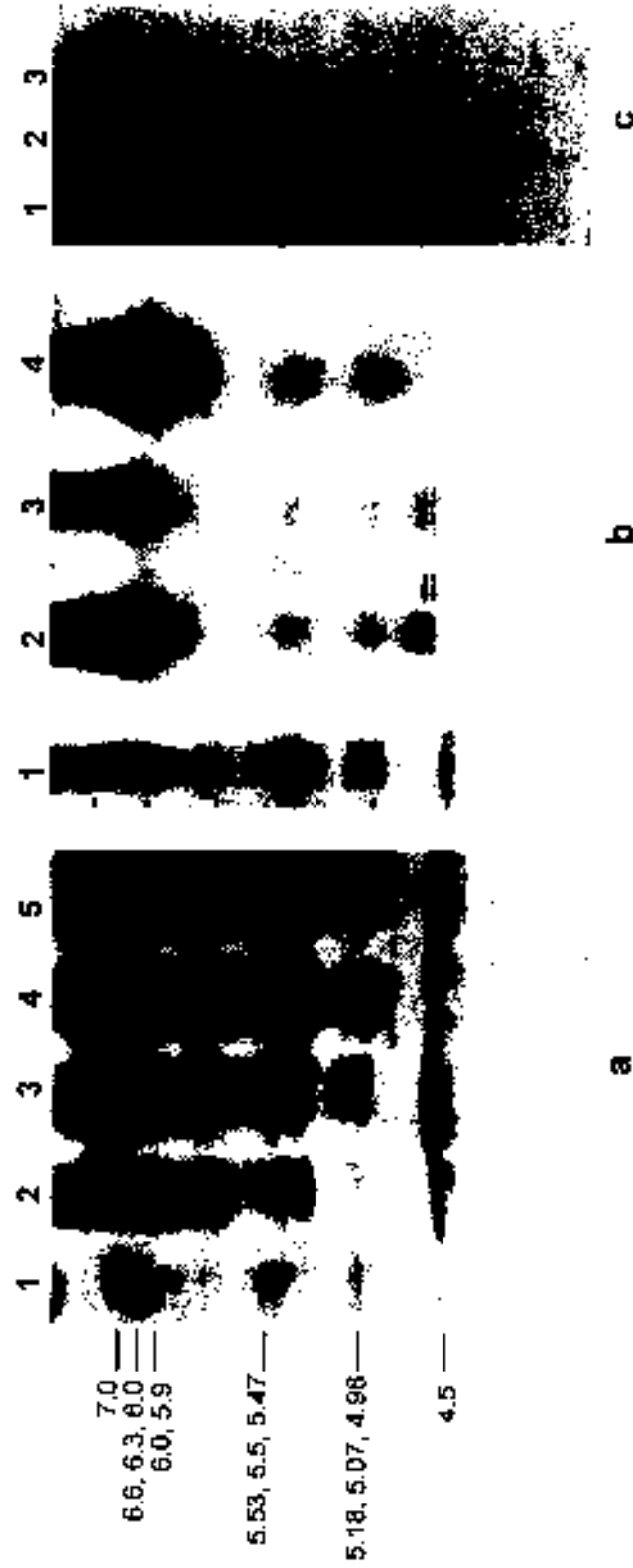


Figura 15. Patrones de pI sobre geles de urea-poliacrilamida con gradiente de 4.0-6.0 de los extractos proteicos de cabrilla (C), lengüado (L) y baya (B) con inhibidores (Figuras a, b y c respectivamente). Los números indican 1 = 50 µg de proteína, 2 = 100 µg de proteína; las letras indican a = primer temporada de muestreo, b = segunda temporada de muestreo. Figura a : (1) Marcador de pI, (2) Ca1, (3) Ca2, (4) Cb1, (5) Cb2; Figura b: (1) Marcador de pI, (2) Lb1, (3) Lb2, (4) La1; Figura c: (1) Marcador de pI, (2) Bb2, (3) Ba2. El marcador de pI contiene: Gliceraldehido 3-fosfato (pI 8.3,8.5), Mioglobina (pI 7.0), Canalbúmina de huevo (pI 6.6, 6.3, 6.0), Anhidrasa carbónica (pI 6.0, 5.9), Actina bovina (pI 5.53, 5.50, 5.47), Seroalbúmina (pI 5.18, 5.07, 4.98), Inhibidor de tripsina (pI 4.5).

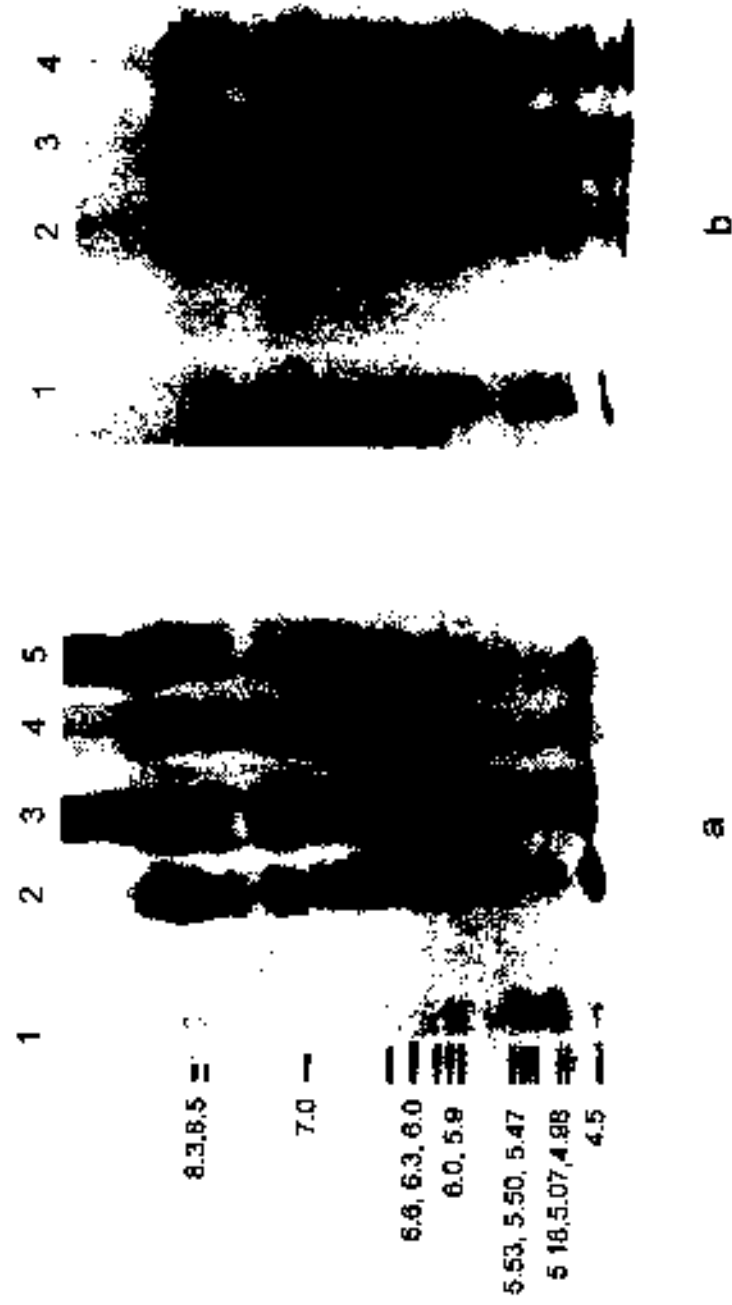


Figura 16. Patrones de pl sobre geles de urea con gradiente de 3.5-10 de los extractos sarcoplásmicos con inhibidores de cabrilla (C) y Baya (B) (Figura a) y Lenguado (L). (Figura b). Los números indican 1= 50 μ g de proteína, 2 = 100 μ g de proteína; las letras indican a= primer temporada de muestreo, b= segunda temporada de muestreo. Figura a: (1) Marcador de pl, (2) Ca2, (3) Cb2, (4) Ba2, (5) Bb2; Figura b: (1) Marcador de pl, (2) Lb1, (3) Lb2, (4) La2. El marcador de pl contiene: Gliceraldehído 3-fosfato (pl 8.3, 8.5), Mioglobina (pl 7.0), Conalbumina de huevo (pl 6.6, 6.3, 6.0), Anhidrasa carbónica (pl 6.0, 5.9), Actina bovina (pl 5.53, 5.50, 5.47), Seroalbumina (pl 5.18, 5.07, 4.88), Inhibidor de tripsina (pl 4.5).

aplican al gel 50 µg de proteína, pueden ser visualizadas con facilidad cuando se aplican 100 µg (Figura 15 a y b, y 16 b). En base a estos resultados se decidió utilizar 100 µg de proteína por carril para las separaciones de isoelectroenfoque en el resto del estudio.

Efecto del muestreo. Se detectaron ligeras variaciones entre los patrones de pI de los extractos provenientes de los dos muestreos. Algunas bandas que estuvieron presentes en el primer muestreo, no fueron detectadas en el segundo. Este efecto se detectó solo en los patrones de cabrilla y lenguado siendo más marcado cuando la separación se realizó sobre geles con gradiente de pH 4.0-6.0 (Figura 15 a y b).

En el caso de cabrilla, se observó que la banda con pI promedio de 4.78 (Figura 15a) aparece únicamente en el segundo muestreo. Un comportamiento similar se presentó en lenguado (Figura 15b) en los cuales se observó dos bandas definidas con pI próximo a 4.65 únicamente en los extractos del segundo muestreo.

Abrams *et al.* (1983), observaron la presencia o ausencia total de bandas proteicas dentro de patrones de pI de las especies *Glyptocephalus glyptocephalus* y *Mullus surmelutus*. Factores tales como área de captura, edad, sexo, temporada y el punto de muestreo, se descartaron como responsables de estas variaciones intra-específicas. Estos investigadores sugieren que la causa más probable son las condiciones fisiológicas del pez, específicamente la presencia de polimorfismo proteico-genético. Lundstrom (1981), utilizando isoelectroenfoque sobre proteínas sarcoplásmicas, detectó 16 variaciones dentro de los patrones de pI de *Lophius americanus*, basándose en el polimorfismo existente de 4 bandas proteicas.

Los resultados experimentales del presente estudio sugieren que el polimorfismo genético puede ser el responsable de la variación observada en el patrón de bandeado de enfoque isoelectroenfoque. Sin embargo, esta aseveración debe ser confirmada. Las variaciones encontradas deben ser correctamente

delimitadas y establecidas. Una opción a este problema es la utilización de la electroforesis de isoenzimas, en donde mediante el uso de tinciones selectivas para enzimas específicas (Mackie, 1980) como lactato deshidrogenasas, se identifica su polimorfismo y se calculan las frecuencias alélicas. Esta técnica permite caracterizar las expresiones genéticas de cada especie.

No obstante que se detectaron variaciones dentro de los patrones de bandeo de *pI* en dos de las especies en estudio, éstas representaron una mínima parte del patrón total. La mayor parte de las bandas proteicas detectadas para el primer muestreo, se mantuvieron de manera constante en los patrones del segundo. Lo anterior sugiere que un patrón representativo de *pI* para cada especie puede ser construido a partir de la información obtenida, bajo las condiciones del estudio.

Gradiente de pH. El gradiente de pH formado dentro de los geles tuvo un efecto marcado sobre la separación proteica por *pI* para las tres especies bajo estudio.

Para cabrilla se obtuvo una buena separación cuando se utilizaron geles con gradiente de pH 4.0-6.0 (Figura 15a), obteniéndose bandas bien definidas, sin embargo, la mayor parte del patrón se encontró comprimido hacia el lado catódico del gel, con *pI*'s superiores a los 4.5, haciendo que la distancia de migración (separación) existente entre una banda y otra fuese pequeña. Un comportamiento similar utilizando el mismo gradiente de pH, fue observado para los extractos de baya (Figura 15c) en donde la mayor parte de su patrón proteico se encuentra desplazado a pH superiores de 5.5. Para los extractos de lenguado (Figura 15 b) se detectó una amplia zona de barrido proteico en la parte catódica del gel utilizando el mismo gradiente. El barrido detectado en este extracto sugiere la presencia de un gran número de proteínas que se enfocan en puntos tan cercanos que no logran ser separados por el gradiente utilizado.

Este mismo efecto de desplazamiento del patrón de *pI* hacia el lado catódico observado en los extractos de cabrilla, baya y lenguado, ha sido reportado por Ludustrom (1980) y Abrams *et al* (1983) para macarela (*Trachurus*

trachurus). El patrón encontrado por estos investigadores presentó proteínas acumuladas hacia el área catódica con pI superiores a 6.5.

Para lograr una adecuada separación proteica cuando se lleva a cabo un proceso de identificación de especies por pI , se recomienda la utilización de geles con un gradiente de pH más amplio, como el de 3.5-10.0 (An *et al.*, 1989; Ludustrom, 1980; Abrams *et al.*, 1983).

La separación de los extractos de cabrilla, baya y lenguado sobre geles con gradiente de 3.5-10.0 se muestra en la Figura 16. Bajo esta condición, se obtuvieron bandas bien definidas y con una mejor distribución a lo largo de todo el gel. En base a estos resultados, las separaciones de isoelectroenfoque para el resto del experimento se realizaron sobre geles con gradiente de pH de 3.5-10.

Comparación de los Patrones Proteicos de pI de las Especies. En la Figura 17 se muestran los patrones de pI característicos obtenidos para las especies de cabrilla, lenguado y baya bajo las condiciones de separación establecidas en nuestro estudio. La distancia de migración de cada banda fue utilizada para determinar su pI mediante el uso de estándares de referencia.

En el Cuadro 15 se muestran los valores de pI promedio y el intervalo de confianza (95 %) obtenido para el patrón de pI para cada especie (Figura 17). Lenguado fue la especie que presentó el mayor número de bandas identificables, detectándose 36 bandas proteicas con pI 's en el rango de pH entre 4.47 y 9.17. Dentro del patrón se detectaron los siguientes pares de bandas con traslape de sus intervalos de confianza: las bandas con pI promedio de 6.03 y 6.00 (líneas 27 y 28); 5.81 y 5.80 (líneas 30 y 31); 5.30 y 5.24 (líneas 37 y 38). El resto de las bandas no presentaron este traslape.

Para el caso de baya, se detectaron 30 bandas proteicas con pI 's en el rango de pH entre 4.33 a 9.01. De forma similar al patrón de cabrilla, las bandas

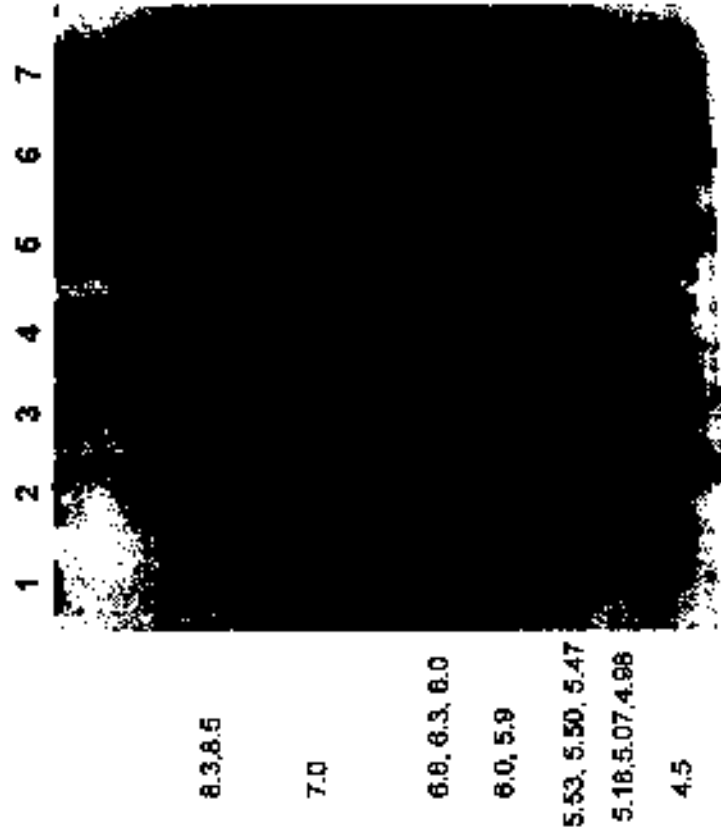


Figura 17. Patrones de pI de las especies cabrilla (C), lenguado (L) y baya (B). Estándar incluido. La separación es sobre geles de urea desnaturalizante con gradiente de pH de 3.5-10.0. Cada carril contiene 100 µg de proteína. (1) Marcador de pI, (2 y 3) C, (4 y 5) B, (6 y 7) L. El marcador de pI contiene: Gliceraldehído 3-fosfato (pI 8.3, 8.5), Mioglobina (pI 7.0), Conalbúmina de huevo (pI 6.6, 6.3, 6.0), Anhidrasa carbónica (pI 6.0, 5.9), Actina bovina (pI 5.53, 5.50, 5.47), Seroalbúmina (pI 5.18, 5.07, 4.98), Inhibidor de tripsina (pI 4.5).

Cuadro 15. Valores de pl determinados para las especies de lenguado, cabrilla y baya (promedio e intervalos de confianza al 95 %).

Línea	LENGUADO		BAYA		CABRILLA	
	Promedio	Intervalo	Promedio	Intervalo	Promedio	Intervalo
1	9.17	9.13-9.19				
2	9.0	8.96-9.03	9.01	8.98-9.04		
3	8.74	8.71-8.77				
4					8.67	8.63-8.71
5	8.57	8.54-8.60	8.58	8.55-8.61		
6	8.43	8.41-8.46			8.48	8.44-8.52
7			8.35	8.30-8.39		
8					8.20	8.15-8.24
9	8.01	7.98-8.03				
10			7.84	7.80-7.87		
11	7.74	7.71-7.76			7.73	7.69-7.77
12			7.60	7.57-7.62		
13	7.54	7.51-7.57				
14			7.48	7.41-7.51	7.48	7.44-7.52
15	7.36	7.35-7.39				
16			7.24	7.20-7.27	7.30	7.24-7.35
17	7.15	7.12-7.18				
18	7.0	6.97-7.02	7.02	6.99-7.05	7.03	6.99-7.07
19	6.90	6.88-6.93	6.82	6.79-6.85	6.85	6.81-6.89
20	6.73	6.70-6.76	6.70	6.66-6.73	6.70	6.65-6.74
21	6.60	6.56-6.63	6.60	6.56-6.63		
22	6.50	6.48-6.53			6.45	6.39-6.50
23	6.40	6.37-6.42	6.41	6.38-6.44		
24	6.31	6.28-6.33	6.33	6.30-6.36	6.30	6.26-6.33
25	6.20	6.17-6.22	6.20	6.16-6.23	6.18	6.14-6.22
26	6.10	6.07-6.12	6.10	6.06-6.13	6.04	6.00-6.08
27	6.03	6.00-6.06	6.0	5.96-6.03	6.05	5.99-6.10
28	6.00	6.00-6.03				
29	5.90	5.86-5.93	5.91	5.88-5.94	5.92	5.88-5.96
30	5.81	5.78-5.83	5.81	5.78-5.84	5.81	5.76-5.84
31	5.80	5.76-5.83	5.80	5.76-5.83	5.80	5.74-5.85
32	5.70	5.66-5.73	5.71	5.68-5.74	5.68	5.63-5.72
33			5.70	5.68-5.73		
34	5.61	5.58-5.64	5.60	5.56-5.63	5.60	5.55-5.64
35	5.50	5.47-5.52	5.50	5.47-5.52	5.50	5.44-5.56
36	5.40	5.37-5.42	5.40	5.36-5.43	5.40	5.38-5.44
37	5.30	5.27-5.32	5.30	5.27-5.32	5.30	5.25-5.34
38	5.24	5.20-5.27				
39	5.10	5.07-5.12	5.11	5.08-5.14	5.16	5.11-5.20
40					5.11	5.07-5.16
41	5.01	4.98-5.04	5.00	4.96-5.03		
42	4.90	4.87-4.92			4.92	4.87-4.93
43	4.81	4.78-4.84	4.85	4.82-4.87	4.80	4.75-4.84
44	4.63	4.60-4.65			4.62	4.57-4.67
45			4.58	4.54-4.61		
46	4.47	4.43-4.49				
47			4.33	4.28-4.38		

Los valores son promedio de seis repeticiones. Los datos ubicados en misma línea indican valores iguales ($p > 0.05$) tomando en cuenta el intervalo de confianza. Los valores en negritas presentan trasape de sus intervalos de confianza por columnas.

con pI promedio de 5.81, 5.8, 5.71 y 5.70 (líneas 30,31,32,33), presentaron traslape de su intervalos de confianza.

Cabrilla fue la especie que presentó el menor número de bandas en el patrón de bandeo. En esta se detectaron 27 bandas proteicas; sus pI 's promedio estuvieron comprendidos en el rango de pH de 4.62 a 8.67. Se detectó traslape de intervalos de confianza entre las bandas con pI promedio de 5.81 y 5.80 (líneas 30, 31), 5.68 y 5.60 (líneas 32, 34); 5.50 y 5.40 (líneas 35, 36) y entre las bandas con pI de 5.16, y 5.11 (líneas 39 y 40).

Laird (1982), menciona que proteínas que difieren en uno o dos residuos de aminoácidos, logran crear bandas distintivas que se pueden detectar por medio de técnicas de isoelectroenfoque. Por otra parte, O'Farrell (1975), utilizando isoelectroenfoque sobre geles de urea 9.2 M en la primera dimensión de la corrida, logró separar un lisado de *E. coli* en 1000 componentes, después de la segunda dimensión.

En este estudio, es probable que la obtención de bandas que presentan traslape de sus intervalos de confianza, pueda deberse a dos factores: a) La existencia de proteínas sarcoplásmicas con una diferencia mínima en su pI debido a su composición de aminoácidos, lo cual es independiente del número de aminoácidos que la conforman. Por lo anterior, es recomendable realizar corridas electroforéticas en 2-Dimensiones, lo cual permite obtener información de punto isoeléctrico combinado con peso molecular. Proteínas y péptidos con pI cercanos, pueden tener PM diferentes. Esta metodología nos permitiría obtener una mayor información sobre los patrones proteicos de las especies y lograr una identificación más eficiente y certera. b) La técnica manual de medición empleada no fue lo suficientemente precisa para establecer con mayor exactitud la diferencia en la distancia de migración de las bandas, para su traducción posterior a valores de pI . Si este es el caso, el uso de un densitómetro u otra técnica de medición más sensible es recomendable.

No obstante que el patrón de pl para cada especie es mucho más complejo que su correspondiente patrón de PM, se observaron bandas con pl similares al compararse los patrones de las tres especies entre sí (Cuadro 15). Sin embargo, también existen bandas proteico-específicas dentro de los patrones de cada especie que hacen posible establecer diferencias entre ellas.

Es factible lograr la diferenciación de lenguado (género *Paralichthys*) de las especies de cabrilla y baya (género *Mycteroperca*) utilizando 7 bandas proteico-específicas con pl promedio de 9.17, 8.74, 8.01, 7.36, 7.15, y 4.47, ubicadas en la línea 1, 3, 9, 15, 17 y 46, para cuyos valores no se detectaron bandas en los patrones de cabrilla y baya.

Por otra parte, baya posee 5 bandas proteico-específicas con pl promedio de 8.35, 7.84, 7.60, 4.58, 4.33 (líneas 7, 10, 12, 45, 47), para las cuales no se detectan bandas similares en los patrones de cabrilla y lenguado. Similarmente, cabrilla posee 2 bandas proteico-específicas con pl promedio de 8.67 y 8.20 (líneas 4 y 8) las cuales no fueron detectadas en baya y lenguado.

Es posible lograr establecer diferencias entre las especies de cabrilla y baya (género *Mycteroperca*), utilizando las bandas con pl promedio de 9.01, 8.58, 6.60 y 5.00 (líneas 2, 5, 21, y 41) pertenecientes al patrón de baya, para las cuales no se detectaron bandas correspondientes en el patrón de cabrilla, y/o las bandas con pl promedio de 8.48, 7.73, 4.92 y 4.62 (líneas 6, 11, 42, 44) pertenecientes al patrón de cabrilla, no detectadas en baya.

CONCLUSIONES

La utilización de inhibidores de crecimiento bacteriano y actividad enzimática durante la obtención del extracto, mostró un efecto protector sobre la estabilidad de su contenido proteico. El extracto sarcoplásmico obtenido para cada especie fue estable al menos durante las primeras 48 hrs mantenido a 0°C.

El uso de electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes permitió lograr la diferenciación entre las especies del género *Mycteropecta* (cabrilla y baya) y *Paralichthys* (lenguado). Aunque se observaron diferencias en los patrones de bandeo entre cabrilla y baya, los resultados sugieren que éstas no pueden ser tomadas como concluyentes, por lo que no se recomienda el uso único de esta metodología como instrumento discriminativo para especies del mismo género.

No se detectaron efectos por muestreo y procesos de congelación-descongelación en los patrones de bandeo de electroforesis en condiciones desnaturalizantes. Por otro lado, los resultados indican que las condiciones de manejo, distribución y almacenamiento a las cuales es sometido el músculo de pescado, afectan la composición del extracto de proteínas sarcoplásmicas y por lo tanto el patrón de bandeo obtenido.

El gradiente de pH utilizado durante el análisis de isoelectroenfoque en condiciones desnaturalizantes, afecta marcadamente el patrón de bandeo obtenido. Se detectó un efecto ligero del muestro sobre algunos de los patrones de isoelectroenfoque de las especies bajo estudio.

Para las especies utilizadas en el presente estudio, el uso de isoelectroenfoque en condiciones desnaturalizantes permitió lograr la diferenciación entre especies pertenecientes a diferentes géneros, como entre especies cercanas pertenecientes al mismo género.

El programa computacional desarrollado permitió la utilización y análisis de la información generada por los patrones de bandeo de electroforesis e

isoelectroenfoque desnaturalizantes, en la identificación de las especies bajo las condiciones experimentales del estudio.

BIBLIOGRAFIA

- An, H., Marshall, M.R., Otwell, W.S. and Wei, C.I. 1988. Electrophoretic Identification of Raw and Cooked Shrimp using Various Protein Extraction Systems. *J. of Food Sci.* 53(2):313-318.
- An, H., Marshall, M.R., Otwell, W.S. and Wei, C.I. 1989a. Species Identification of Raw and Boiled Shrimp by Urea gel Isoelectric Focusing Technique. *J. of Food Sci.* 54(2):233-236.
- An, H., Wei, C.I., Zhao, J., Marshall, M.R. and Lee, C.M. 1989b. Electrophoretic Identification of Fish Species Used in Surimi Products. *J. of Food Sci.* 54(2):253-257.
- An, H., Klein, P.A., Kao, K.J., Marshall, M.R., Otwell, W.S. and Wei, C.I. 1990. Development of Monoclonal Antibody for Rock Shrimp Identification Using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *American Chemical Society* 38:2094-2100.
- Anónimo. 1988. Fisheries of the United States. Current Fisheries Statistics. No. 8700. N.M.F.S. N.O.A.A. Department of Commerce. Washington, D.C.
- Battkus, H. y Tomlinson, N. 1966. Some Aspects of Postmortem Changes in Fish Muscle. En: "The Physiology and Biochemistry of Muscle as Food". Eds. Briskey, E.J.; Cassens, R.J. y Trautman, J.C. Univ. of Wisconsin Press. Madison. p. 157
- Bayle, B.E. 1950. "Chalky" Halibut. En: "Fish as Food". Vol. 1. Ed. Borgstrom G.A. p.184. Academic Press Inc. London, England.
- Bertullo, V. 1975. Tecnología de los Productos y Subproductos de Pescado, Molusco y Crustáceos. Editorial Hemisferio Sur, S.R.L. Buenos Aires, Argentina.
- Bollag, D.M. y Edelstein, J.S. 1991. Protein Methods. John Wiley and Sons. Publishers. N. York, N. York.
- Borgstrom, G.A. 1961. Fish as Food: Production, Biochemistry and Microbiology. Vol. 1. Academic Press. N. York.

- Bourges, H. y Morales, J. 1986. El Pescado y su Aporte a la Dieta. Cuadernos de Nutrición, 9(5):3.
- Boyer, F R. 1986. Modern Experimental Biochemistry. Adisson-Wesley Publishing Company. N. York.
- Braekkan, O.R. y Boge, G. 1962. A Comparative Study of Aminoacids in the Muscle of Different Species of Fish. Reports on Technological Research Concerning Norwegian. Fish Industry Vol 4 Norway.
- Briskey, E. y Fuzakawa, T. 1971. Myofibrillar Proteins of Skeletal Muscle. Adv. Food Res. Vol. 19. Ed. Board Academic Press, N. York.
- Causeret, J. 1962. Fish as Source of Mineral Nutrition. En: "Fish as Food". Vol. 2. Ed. Borgstrom, G.A. p. 205. Academic Press Inc. London, England.
- Causeret, J. 1950. Les Eléments Minéraux des Poissons. En: "Fish as Food". Vol. 1. Ed. Borgstrom, G.A. p. 184. Academic Press Inc. London, England.
- Chaffel, J.-C. y Chaffel, H. 1976. Introducción a la Bioquímica y Tecnología de los Alimentos. Vol 1. Editorial Acriba. España.
- Chambach, A. y Baumann, G. 1976. Isoelectric Focusing in Polyacrylamide Gel. p. 79-91. En: "Isoelectric Focusing". Ed. Catsimpoilas, N. Academic Press. New York.
- Da Costa, A. y Stern, J.A. 1956. The Calcium and Phosphorus Contents of Some Foreign and Domestic Canned Sardines. Food Research 21:242-249.
- Doberstein, K.H. y Greuel, E. 1985. Identification of Meat of African Antelope Species and Kangaroo by the Agar Gel Precipitation Test. En: "Biochemical Identification of Meat Species". De. Patterson, R.L.S. p. 65. Elsevier Applied Science Publishers. London, England.
- Dubuisson, M. 1954. Muscular Contraction. En: "Food Proteins". Ed. Whitaker, J. Y Tannenbaum, S.R. p. 122. AVI Publishing Company Inc., Wesport, CT.
- Dunbar, B.S. 1987. The Use of Two-Dimensional Electrophoresis Combined with Immunological Techniques. Biotechniques 5(3):218-226.
- Dyer, W.J. y Dingle, J. 1961. Fish Proteins with Special Reference to Freezing. En Fish as Food. Vol. 1. Ed. Borgstrom G.A. Academic Press, N. York.

- El Imparcial 8 de Julio de 1995. Supera Producción Pesquera en un 31%. Sección Dinero p. 4/C. Hermosillo, México.
- FAO Species Catalogue. 1985. Snappers of the World. FAO Fisheries Synopsis, Vol. 6(125):3. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome
- Fennema, O.R. 1985. Introducción a la Ciencia de los Alimentos. Primera Edición. Ed. Reverté, S.A. España.
- Flarjak, J. 1982. Inorganic and Organic Arsenic in Some Commercial East Australian Crustacean. J. Sci. Food Agric. 33:579 En: "Seafood: Resources. Nutritional Composition and Preservation". Ed. Sirkoski, Z.E. Ft. U.S.A.
- Forrest, J.F., Aberle, E., Hedrick, H., Judge, M. y Merkel, R. 1975. Fundamentos de la Ciencia de la Carne Primera edición en Español. Zaragoza, España.
- Gabriel, O. 1971. Locating Enzymes on Gel. Meth. of Enzimol. 22:578-604.
- Gallardo, J.M., Sotelo, C.G., Piñeiro, C. y Perez-Martin, R.I. 1995. Use of Capillary Zone Electrophoresis for Fish Species. Identification Differentiation of Flatfish Species. J. Agric. Food. Chem. 43:1238-1244.
- Garcifaso, J. R. 1983. Introducción a la Tecnología Enzimática. Folleto del Departamento de Ciencias Químico Biológicas. Universidad de Sonora.
- Gergely, J. 1970. Interaction of Major Myofibrillar Proteins. In: The Physiology and Biochemistry of Muscle as a Food, Vol. 2. E.J. Briskey, R.G. Cassens y B.B. Marsh Ed. The University of Wisconsin Press. London, England.
- Goll, D.E., Akawa, N., Stromer, M.H., Busch, W.A. y Robson, R.M. 1970. Chemistry of Muscle Proteins as Food. En: " The Physiology and Biochemistry of the Muscle as Food". Ed. E.J. Briskey, R.G. Cassens, and B.B. Marsh. The University of Wisconsin Press, Madison.
- Goll, D.E., Stromer, M.H., Robson, R.M. y Parrish, F.C. Jr. 1977. Molecular Architecture and Biochemical Properties as Bases of Quality. En: "Muscle Food". J. Food Sci.
- Goll, D.E., Stromer, M.H., Robson, R.M. 1977a. Muscle Proteins. En: "Food Proteins ". Ed. Whitaker, J.R. y Tannenbaum, S.R. p 122-123. AVI Publishing Co. Westport C.T.

- Gordon, W.G. 1985. U.S. Fisheries 1983. N.O.A.A., N.M.F.S. Department of Commerce. Washintong, D.C.
- Gray, W.R. y McKenzie, J.A. 1970. Muscle Protein Electrophoresis in the Genus *Salmo* of Eastern Canada. *J. Fish. Res. Bolt Canada*. 27:2109-2112.
- Hames, B.D. 1981. Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach. B.D. Hames and Rickwood D. Ed. IRL Press. London, England.
- Hashimoto, K., Watabe, S., Kono, M. y Shiro, K. 1979. Muscle Protein Composition of Sardine and Mackerel. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 45(11):1435
- Hedrick, J.L. and Smith, A.J. 1968. Size and Charge Isomer Separation and Estimation of Molecular Weights of Proteins by Disc Gel Electrophoresis. *Arch. Biochem. Biophys.* 126:155-164.
- Hennigar, C.J., Buck, E.M., Hultin, H.O., Peleg, M., Varelziz, K. 1988. The Effect of Washing and Sodium Chloride on Mechanical Properties of Fish Muscle Gels. *J. Food Sci.* 53:963-964.
- Herbard, C.E., Flick, G.J. y Martin, R.E. 1982. Occurrence and Significance of Trimethylamine Oxide and its derivatives in Fish and Shellfish. En "Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products". ED. Martin, R.E. Flick, G.E., Herbard, C.E. and Ward. D.R. AVI Publishing Wesport, CT. p. 149.
- Heywood, S.M., Kennedy, D.S. y Bester, A.J. 1974. Separation of Specific Initiation Factors Involved in the Translation of Myosin and Myoglobin Messenger RNA and the Isolation of New RNA Involved in Translation. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 71:2428-2431. USA.
- Higashi, H. 1961. Vitamins in Fish. En: "Fish as Food". Vol. 1. Borgestrom, G. Academic Press, New York.
- Hitchcock, C.H.S. y Crimes, A.A. 1985. Methodology for Meat Species Identification. En: "Biochemical Identification of Meat Species" Ed. Patterson, R.L.S. p.1. ELSIEVER Applied Science Publishers. London, England.
- Hodge, A.J. and Petruska, J.A. 1963. Recent Studies with the Electron Microscope on Ordered Aggregates of the Tropocollagen Molecule. En: Aspects of Proteins Structure. G.N. Ramachandran Ed. Academic Press, New York.

- Hofer Scientific Instrument. 1992. **Electrophoretic Theory**. San Francisco California. U.S.A.
- Hsieh, Y.-H.P. Woodward, B.B. y Balco, A.W. 1995. Species Substitution of Retail Snapper Fillets. *Journal of Food Quality*. 18:131-140.
- Huang, T.-S., Marshall, M.R. y Wei, C.T. 1995. Identification of Red Snappers (*Lutjanus Campechanus*) Using Electrophoretic Techniques. *Journal of Sci.* 60(2):279-283.
- Hultin, H.O. 1974. Characteristics of Immobilized Multi-Enzymic Systems. *J. Food. Sci.* 39:647-652.
- Hvas, A. 1985. Species Differentiation in Mixed Meat Products by Immunodiffusion. En: "Biochemical Identification of Meat Species". Ed. Patterson, R.L.S. p. 54. ELSIEVER Applied Science Publishers. New York.
- Jacquot, R. 1961. Organic Constituents of Fish and Other Aquatic Animal Food. En: "Fish as Food: Production, Biochemistry and Microbiology". Vol. 1. Ed. Borgstrom, G.A. Academic Press, New York.
- Keung, M.W., Ditlow, C.C., y Vallee, B.L. 1985. Identification of Human Alcohol Dehydrogenases Isoenzymes by Disc Polyacrylamide Gel Electrophoresis in 7 M Urea. *Anal Bioch.* 151:92-96.
- Kilborn, L.G. y McLeod, J.J.R. 1920. Glycogen Content of Certain Invertebrates and Fishes. *Quart. J. Physiol.* 12:317-328.
- Kimura, S. 1972. Studies on Marine Invertebrates Collagens. V. The Neural Sugar Composition and Glycosylated Hydroxylysine Contents of Several Collagens. *Bull. Japan. Sci. Fish* 38:1153
- Krobrehel, K., Reymond, C. and Alary, R. 1988. Low Molecular Weight Durum Wheat Glutenin Fractions Rich in Sulfhydryl Plus Disulfide Groups. *American Association of Cereal Chemists*. 65(1):65.
- Krzynowek, J. y Wiggin, K. 1979. Identification of Species in Cooked Crab meat by Thin-layer Isoelectric Focusing. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 62:630-636.
- Krzynowek, J. y Wiggin, K. 1981. Generic Identification of Cooked Association of Frozen Crab meat by Thin-layer Polyacrylamide Gel Isoelectric Focusing: Collaborative Study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 64:670-673.

- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of The Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Laird, W.M., Mackie I.M. and Ritchie A.H. 1982. Differentiation of Species of Fish by Isoelectric Focusing on Agarose and Polyacrylamide Gels -A Comparison. *J. Asso. Publ. Anal* 20:125-135.
- Lawrie, R.A. 1979. Chemical and Biochemical Constitution of Muscle. En: "Meat Science", p. 75. Pergamon Press, New York.
- Le Coeur, A. y Lescoat, Y. 1986. Pulpas de Pescado y Crustáceos y su Transformación en Embutidos. Cap. 6. En: "Proteínas Animales". Ed. Bourgeois C.-M. y Le Roux, P. p. 112. El Manual Moderno, México.
- Lee, C.M. 1984. Surimi Processing Technology. *Food Technology* 38:69-80.
- Lee, C.M. 1986. Surimi Manufacturing and Fabrication of Surimi-based Products. *Food Technology*. 40:115-124.
- Lee, C. H. and Klein, B.P. 1990. Classification of Green Pea Peroxidases by Preparative Isoelectric Focusing. *J. Food Biochemistry*. 14:137-152.
- Lin, T.S. and Lanier, T.C. 1980. Characterization of Fish Muscle Proteases Using Radio-labeled Proteins Substrates. *J. Food Sci.* 45:1036.
- Lintzel, W., Pfeiffer, H., y Zippel, I. 1939. Untersuchungen über Trimethylammonium Basen. En: "Fish as Food" Vol. 1. De. Borgstrom, G.A., p. 155. Academic Press, New York.
- Love, R.M. 1980. Chemical Biology of Fishes. Academic Press, London England.
- Lundstrom, R.C. 1979. Fish Species Identification by Thin Layer Isoelectric focusing. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 62:624-629.
- Lundstrom, R.C. y Roderick, M. 1979. Fish Species Identification by Thin-layer Isoelectric Focusing of Sarcoplasmic Proteins. *Sci. Tools*. 40:38-43.
- Lundstrom, R.C. 1980. Fish Species Identification by Thing Layer Polyacrylamide Gel Isoelectric Focusing: Collaborative Study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 63:69.
- Lundstrom, R.C. 1980a. Fish Species Identification by Isoelectric Focusing: Sarcoplasmic Protein Polymorphism in Monkfish (*Lophius americanus*). *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 64:32-37

- Ludstrom, R.C. 1983a. Fish Species Identification by Agarose Gel Isoelectric Focusing: Collaborative Study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 66:123-127.
- Ludstrom, R.C. 1983b. Identification of Pacific Rockfish (*Sebastes*) Species by Isoelectric Focusing. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 66:974-980.
- Mackie, I.M. 1980. A Review of Some Recent Applications of Electrophoresis and Isoelectricfocusing in the Identification of Species of Fish in Fish and Fish Products. In *Advances in Science and Technology*. Ed Connell J.J. Fishing News Books. London, England p. 444-451
- Martin, D.M., Mayes, P.A. y Rodwell, V.M. 1983. *Harper's Review of Biochemistry*. 18th. Edition. Editorial Limusa. México.
- Matsura, F. y Hashimoto, K. 1954. Chemical Studies of the Red Muscle Fishes II. Determination of the Content of Hemoglobin, Myoglobin and Cytochrome C in the Muscles of Fishes. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 20:4
- McLellan, T. 1982. Electrophoresis Buffer for Polyacrylamide Gels at Various pH. *Anal. Biochem.* 126:94-99.
- Melvin, M. 1987. *Electrophoresis. Analytical Chemistry by Open Learning*. John Wiley & Sons Published. Great Britain.
- Mermelstein, M.H. 1993. A New Era in Food Labeling. *Food Tech.* 47:81-86.
- Mochizuki, A. y Matsuchiya, M. 1983. Lysozyme Activity in Shell Fishes. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 49:131.
- Morrissey, P.A., Mulvihill, D.M. y O'Neill, E.M. 1982. Functional Properties of Muscle Proteins. En: *Developments in Food Proteins*. Vol. 5. B.J.F Hudson Ed. ELSEVIER Applied Science. N. York.
- O'Farrell, P.H. 1975. High-resolution Two-dimensional Electrophoresis of Proteins. *J. Biol. Chem.* 250:4007-4021.
- Perez, L.A. 1985. *Higiene y Control de los Productos de la Pesca*. Primera Edición. Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V. México.
- Pontecovo, G. 1989. Canadian, Mexican and U.S. Fisheries. Recent Developments. *Mar. Fish. Rev.* 5(1):18.

- Pour-El, A. 1981. Protein Functionality: Classification, Definition and Methodology. En: "Protein Functionality in Foods" p.1. Ed. Cherry J.P. ACS Symposium Series 147. Am. Chem. Soc. Washintong, D.C.
- Raville, W.J., Goll, D.E., Stromer, M.H., Robson, R.M. y Dayton, W.R. 1976. A Ca^{2+} Activated Protease Possibly Involved in Myofibrillar Protein Turn Over Subcellular Localization of Protease in Porcine Skeletal Muscle. J. Cell Biol. 70:1-8.
- Rilbe, H. 1976. Theoretical Aspects of Steady-State Isoelectric Focusing. N. Catsimopoulos Ed. Academic Press, N. York. p 14-51.
- Rodger, W.G. and Wilding, P.1990. Muscle Proteins. En: Food gels. Edited by Peter Harris. Elsevier Applied Science, Great Britain. p. 361.
- Rodriguez, M. 1984. Tecnología de los Alimentos Marinos. Ed Pueblo y Educación. Habana, Cuba.
- Rodriguez, R.F., Garcia S.C. y Laguarda F.A. 1987. Electrophoretic Patterns Variation in Two Oyster Populations of *Crassostrea corteziensis* From the Mexican Coast. An. Cie. del Mar y Limmol. Univer. Nal. Auton. México. 15(1):177-184.
- Samejima, K., Ishioroshi, M. and Yasui, T. 1981. Relatives Roles of the Head and Tail Portions of the Muscle in the Heat-Induce Gelation of Myosin. J. Food Sci. 46:1412.
- Sauvaire, D.Y., Baccou, F.J. and Kobrehel, K. 1984. Solubilization and Characterization of Fenugreek Seed Proteins. J. Agric. Food Chem. 32:41-47.
- Scobbie, A.E. and Mackie, I.M. 1988. The Use of Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis in Fish Species Identification- A Procedure Suitable for Cooked and Raw Fish. J. Sci. Food Agri. 22:1-5.
- Schreiber, E. 1983. Mercury Content of Fishery Products: Data from last decade. Sci. Total Envirom. 31, 283. En: "Seafood: Resources, Nutritional Composition and Preservation". Ed. Sirkoski, Z.E. Fl. U.S.A.
- Schutt, J. 1986. Meat Emulsions. En: "Food Emulsions". Ed. S. Friber. Marcel Dekker, New York. p 157

- Scopes, R.K. 1970. Characterization and Study of Sarcoplasmatic Proteins. En: "The Physiology and Biochemistry of Muscle as Food", Ed. Briskey, E.J., Cassens, R.G. y Marsh, B.B. The University of Wisconsin Press, Madison.
- Secretaria del Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca (Smarnap) 1996. Agenda Estadística. Gobierno del Estado de Sonora.
- Seki, N. 1976. Identification of Fish Species by SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of the Myofibrillar Proteins. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. 42(10):1169-1176
- Shimizu, Y. 1985. Biochemical and Functional Properties of Material Fish. En: "Proceedings of the International Symposium on Engineering Seafood Including Surimi. Ed. Martin, R.E., Collete, R.L. National Fisheries Institute, Washington D.C. p. 148-167.
- Sidwell, V.D. Loomis, A.L., Foncannon, P.R. y Buzzell, D.H. 1978. Composition of the Edible Portion of Raw Fresh or Frozen Crustaceans, Finfish and Mollusks, IV. Vitamins. Mar. Fish. Rev. 40(12):1. En: "Seafood: Resources, Nutritional Composition and Preservation". Ed. Sirkoski, Z.E. Fl. U.S.A.
- Sirkoski, Z.E., Kolakowska, A. y Sun-Pan, B. 1990. The Nutritive Composition of the Major Groups of Marine Food Organisms. En: "Seafood: Resources, Nutritional Composition and Preservation". Ed. Sirkoski, Z.E. p. 31-52. Fl. U.S.A.
- Simmidu, w. 1961. Non Protein Nitrogen Components. Cap. 2 En "Fish as Food" Vol. 1. Ed Borgstrom, G.A., p. 353. Academic Press, New York.
- Spinelli, J. y Dassow, J.A. 1982. Fish Proteins: Their Modification and Potential Uses in the Food Industries. En: "Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products". Ed. R.E. Martin, G. Flick, C.E. Hebart and D.R. Ward. The AVI Publishing Co. U.S.A.
- Stansby, M. y Olcott, H.S. 1963. Composition of Fish. En: "Industrial Fishery Technology". Ed. Stansby, M. Reinhold Publishing Corp. London, England.
- Stefansson, G. y Hultin, H.O. 1994. On the Solubility of Cod Muscle Proteins in Water J. Agric. Food Chem. 42(12):2656-2664
- Stryer, L. 1990. Bioquímica. 3a. Ed. Editorial Reverté S.A. España. p.44-47.

- Suzuki, T. 1981. *Fish and Krill Proteins: Processing Technology*. Applied Science Publishers. Ltd. London.
- Thakker, K.D. y Grady L.T. 1984. Solubility. Cap. 2. En: *Food Analysis*. D.W. Gruenwedel and J.R. Whitaker Ed. Marcel Dekker Inc. N. York, N.Y.
- Thompson, W.C. y Heywood, S.M. 1974. Basic Aspects of Protein Synthesis in Muscle. *J. Anim. Sci.* 38:1050-1053.
- Tollaksen, S.L., Edwards J.L. y Anderson N. 1981. The Use of Carbamylated Charge Standards for Testing Batches of Ampholytes Used in Two Dimensional Electrophoresis. *Electrophoresis* 2:155-160.
- Tung-Shi, H. Chen, J.S., Marshall, R.M. y Wei, I. C. 1990. Quantification of Shrimp in Shrimp-Surimi Mixtures Using Urea Gel Isoelectric Focusing. *J. Food Science.* 55(5):1206-1209.
- Tuszynski, G.P., Baker, S.R., Fuhrer, J.P., Buck, C.A. y Warren, L. 1978. Glycopeptides Derived from Individual Membrane Glycoproteins from Control and Rous Sarcolemma Virus-Transformed Hamster Fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 253:6092.
- Ukishima, Y., Kino, M. y Kubda, H. 1991. Identification of Species by Thin-layer Isoelectric Focusing of Sarcoplasmic protein. *Assoc. Off. Anal. Chem.* 74:943-950.
- Vareltzis, K., Buck, E.M., Hultin, H.O., Laus, M.J. 1989. Fish Gel Formation without Added Salt: Improvement by Mixed Species. *J. Food Process. Preserv.* 13:107-121.
- Veis, M. 1970. Collagen. En: *The Physiology and Biochemistry of Muscle as a Food*. Vol. 2. E.J. Briskey, R.G. Cassens and B.B. Marsh Ed. The University of Wisconsin Press. London, England.
- Vestenberg, O. 1976. The Carrier Ampholytes. En: "Isoelectric Focusing". Ed. Catsimpoolas, N. p. 53-76. Academic Press, New York.
- Weber, K. y Osborn, M. 1969. The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 224:4406-4412.
- Weber, K. y Osborn, M. 1975. Proteins and Sodium Dodecyl Sulfate: Molecular Weigh Determination on Polyacrylamide Gels and Related Procedures. Cap. 3. En: "The Proteins". 3er Ed.

- Wei, C.L., An, H., Chen, J.S. y Marshall M.R. (1990). Use of a Modified Urea Gel Isoelectric Focusing Method for Species Identification of Raw or Boiled White, Pink and Rock Shrimp. *J. of Food Biochemistry*. 14:91-102.
- Whitaker, J.R. y Tannenbaum S.R. (1977). *Food Proteins*. The AVI Publishing Company, INC Westport Connecticut. U.S.A. p 106-119.
- Wijngaards, G. y van Biert, M. 1985. Quantitative Estimation of Meat Species by Immunological Methods: Problems and Improvement. En: *Biochemical Identification of Meat Species*. Ed. Patterson. R.L.S. p.90. ELSIEVER Applied Science Publishers. London, England.
- Wright, D.J. Leach, I.B. y Wilding, P. 1977. Differential Scanning Calorimetric Studies of Muscle and it's Constituent Proteins. *J. Sci. Food Agric*. 28:557
- Yates L.D. y Graser M.L. 1983. Myosin. *J. Mol. Biol*. 68:123.
- Yépez-Plascencia, G. 1995. Comunicación Personal.
- Ziegler, G.R. y Acton, J.C. 1984. Mechanisms of Gel Formation by Proteins of Muscle Tissue. *Food Technology*. 38(5): 77.

APÉNDICES.

I.

Pantalla de Presentación del Menú Principal.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y
DESARROLLO, A.C.

COMPARACIÓN DE BANDEO

1. ENTRADA DE ESPECIE DESCONOCIDA
2. PRUEBA DE PUNTO ISOELÉCTRICO
3. PRUEBA DE PESO MOLECULAR
4. AGREGAR OTRA ESPECIE
5. FINALIZAR

OPCIÓN:



II.

Pantalla de Presentación para la Opción: 1. Entrada de Especie Desconocida

ESCRIBE NOMBRE DE LA ESPECIE DESCONOCIDA:



Muestra:

1:	00000	21:	00000
2:	00000	22:	00000
3:	00000	23:	00000
4:	00000	24:	00000
5:	00000	25:	00000
6:	00000	26:	00000
7:	00000	27:	00000
8:	00000	28:	00000
9:	00000	29:	00000
10:	00000	30:	00000
11:	00000	31:	00000
12:	00000	32:	00000
13:	00000	33:	00000
14:	00000	34:	00000
15:	00000	35:	00000
16:	00000	36:	00000
17:	00000	37:	00000
18:	00000	38:	00000
19:	00000	39:	00000
20:	00000	40:	00000

Presione Esc para Terminar

III.

Resultados de la Comparación de una Muestra Hipotética con Lengüado por Prueba de Punto Isoeléctrico.

NOMBRE DEL ARCHIVO: **Hipotética**

RESULTADOS

Comparación de la muestra hipotética con LENGUADO					
# BANDAS		HIPOTÉTICA 24	LENGUADO 36	DIFERENCIA 12	
LIM. INF.	BANDA	LIM. SUP.	HIPOTÉT.	DIFERENCIA	% DIFERENCIA
*	*	*	9.2000	*	*
9.1351	9.1666	9.1982	*	*	*
8.9613	9.0000	9.0386	9.0000	0.0000	0.00
8.7136	8.7428	8.7720	*	*	*
*	*	*	8.7000	*	*
8.5422	8.5714	8.6006	*	*	*
*	*	*	8.5000	*	*
8.4101	8.4375	8.4648	*	*	*
7.9851	8.0125	8.0398	8.0000	0.0125	45.74
*	*	*	7.8000	*	*
7.7155	7.7400	7.7644	*	*	*
*	*	*	7.6000	*	*
7.5136	7.5428	7.5720	*	*	*
7.3254	7.3600	7.3945	*	*	*
*	*	*	7.2000	*	*
7.1297	7.1555	7.1813	*	*	*
6.9707	7.0000	7.0292	7.0000	0.0000	0.00
6.8613	6.9000	6.9386	*	*	*
6.7075	6.7333	6.7590	*	*	*
*	*	*	6.7000	*	*
6.5613	6.6000	6.6386	*	*	*
6.4654	6.5000	6.5345	*	*	*
6.3742	6.4000	6.4257	6.4000	0.0000	0.00
6.2853	6.3111	6.3368	6.3000	0.0111	43.12
6.1766	6.2000	6.2233	6.2000	0.0000	0.00

RESULTADOS (Continua)

LIM. INF.	BANDA	LIM. SUP.	HIPOTÉT.	DIFERENCIA	% DIFERENCIA
6.0707	6.1000	6.1292	6.1000	0.0000	0.00
6.0017	6.0333	6.0648	*	*	*
5.9654	6.0000	6.0345	*	*	*
5.8684	5.9000	5.9315	*	*	*
5.7851	5.8125	5.8398	5.8000	0.0125	45.74
5.7613	5.8000	5.8386	*	*	*
5.6613	5.7000	5.7386	5.7000	0.0000	0.00
5.5850	5.6142	5.6434	5.6000	0.0142	48.90
5.4755	5.5000	5.5244	5.5000	0.0000	0.00
5.3707	5.4000	5.4292	5.4000	0.0000	0.00
5.2726	5.3000	5.3273	*	*	*
5.2054	5.2400	5.2745	*	*	*
*	*	*	5.2000	*	*
5.0707	5.1000	5.1292	5.1000	0.0000	0.00
4.9851	5.0100	5.0348	*	*	*
4.8742	4.9000	4.9257	4.9000	0.0000	0.00
4.7850	4.8142	4.8434	4.8000	0.0142	48.90
4.6055	4.6300	4.6544	*	*	*
*	*	*	4.8000	*	*
*	*	*	4.6000	*	*

RESUMEN

Bandas totales de la muestra hipotética = 24


La muestra hipotética tiene 15 bandas similares a LENGUADO


total de bandas de la especie LENGUADO 36

La muestra hipotética tiene un 41.67 % de bandas similares a LENGUADO

IV.

Pantalla de Presentación para la Opción: 4. Agregar Otra Especie.

Nombre: 

Bandas: 

N1: 
N2: 
N3: 
N4: 
N5: 
N6: 
N7: 
N8: 
N9: 
N10: 
N11: 
N12: 
N13: 
N14: 
N15: 
N16: 
N17: 
N18: 
N19: 
N20: 
.
.
.
N70: 

V.

Resultados de la Comparación de la Muestra LMCI con LENGUADO por Prueba de Peso Molecular.

NOMBRE DEL ARCHIVO: XXXXXXXXXX

RESULTADOS

Comparación de la muestra LMCI con LENGUADO					
# BANDAS		LMCI 14	LENGUADO 14	DIFERENCIA 0	
LIM. INF.	BANDA	LIM. SUP.	LMCI	DIFERENCIA	% DIFERENCIA
137.100	138.400	139.700	138.040	0.360	27.68%
101.900	102.800	103.700	102.330	0.470	52.22%
*	*	*	72.440	*	*
71.000	71.600	72.200	*	*	*
68.600	69.200	69.800	69.180	0.020	3.33%
*	*	*	67.610	*	*
65.800	66.400	67.000	*	*	*
54.900	55.400	55.900	54.950	0.450	90.00%
48.300	48.700	49.100	49.000	0.300	75.00%
44.600	45.000	45.400	44.670	0.330	82.50%
42.400	42.800	43.200	42.660	0.140	35.00%
40.200	40.500	40.800	*	*	*
*	*	*	39.810	0.690	*
34.700	35.000	35.300	*	*	*
*	*	*	34.670	0.330	*
32.600	32.900	33.200	*	*	*
*	*	*	32.360	0.540	*
*	*	*	24.350	0.250	*
23.900	24.100	24.300	*	*	*
22.100	22.300	22.500	22.390	0.090	45.00%

RESUMEN

Bandas totales de la muestra LMCI = 14
 La muestra LMCI tiene 8 bandas similares a LENGUADO
 # total de bandas de la especie LENGUADO 14

La muestra LMCI tiene un 57.14 % de bandas similares a LENGUADO

VI.

Resultados de la Comparación de la Muestra LMCI con BAYA por Prueba de Peso Molecular.

RESULTADOS

Comparación de la muestra LMCI con BAYA					
# BANDAS		LMCI 14		BAYA 12	
LIM. INF.	BANDA	LIM. SUP.	LMCI	DIFERENCIA	% DIFERENCIA
*	*	*	138.040	*	*
103.000	104.700	106.400	*	*	*
*	*	*	102.330	*	*
71.300	72.400	73.500	72.440	0.040	3.63
68.500	69.600	70.700	69.180	0.420	38.18
*	*	*	67.610	*	*
63.900	64.900	65.900	*	*	*
53.800	54.600	55.400	54.950	0.350	43.75
*	*	*	49.000	*	*
46.600	47.300	48.000	*	*	*
*	*	*	44.670	*	*
41.700	42.400	43.100	42.660	0.260	37.14
*	*	*	39.810	*	*
38.300	38.900	39.500	*	*	*
33.900	34.500	35.100	34.670	0.170	28.33
31.700	32.200	32.700	32.360	0.160	32.00
*	*	*	24.350	*	*
23.500	23.900	24.300	*	*	*
21.900	22.300	22.700	22.390	0.090	22.50

RESUMEN

Bandas totales de la muestra LMCI = 14
 La muestra LMCI tiene 8 bandas similares a BAYA
 # total de bandas de la especie BAYA 12

La muestra LMCI tiene un 58.33 % de bandas similares a BAYA

VII.

Resultados de la Comparación de la Muestra LMCI con Cabrilla por Prueba de Peso Molecular.

RESULTADOS

Comparación de la muestra LMCI con CABRILLA					
# BANDAS		LMCI 14	CABRILLA 12	DIFERENCIA 2	
LIM. INF.	BANDA	LIM. SUP.	LMCI	DIFERENCIA	% DIFERENCIA
*	*	*	138.040	*	*
103.500	105.30	107.100	*	*	*
*	*	*	102.330	*	*
*	*	*	72.440	*	*
69.600	70.80	72.000	*	*	*
68.000	69.20	70.400	69.180	0.020	1.67%
*	*	*	67.610	*	*
62.000	63.00	64.000	*	*	*
54.300	55.30	56.300	54.950	0.350	35.00%
*	*	*	49.000	*	*
46.900	47.90	48.900	*	*	*
43.400	44.70	46.000	44.670	0.030	2.31%
*	*	*	42.660	*	*
40.000	40.70	41.400	*	*	*
*	*	*	39.810	*	*
34.700	35.30	35.900	*	*	*
*	*	*	34.670	*	*
32.500	33.10	33.700	*	*	*
*	*	*	32.360	*	*
24.000	24.40	24.800	24.350	0.050	12.50%
22.600	23.00	23.400	*	*	*
*	*	*	22.390	*	*

RESUMEN

Bandas totales de la muestra LMCI = 14
 La muestra LMCI tiene 8 bandas similares a CABRILLA
 # total de bandas de la especie CABRILLA 12

La muestra LMCI tiene un 33.33 % de bandas similares a CABRILLA

VIII.

Resultados de la Comparación de la Muestra LSSI con LENGUADO por Prueba de Peso Molecular.

NOMBRE DEL ARCHIVO: **LSSI**

RESULTADOS

Comparación de la muestra LSSI con LENGUADO					
# BANDAS		LSSI 7	LENGUADO 14	DIFERENCIA 7	
LIM. INF.	BANDA	LIM. SUP.	LSSI	DIFERENCIA	% DIFERENCIA
137.100	138.400	139.700	*	*	*
101.900	102.800	103.700	*	*	*
71.000	71.600	72.200	*	*	*
68.600	69.200	69.800	69.180	0.020	3.33
65.800	66.400	67.000	*	*	*
*	*	*	56.230	*	*
54.900	55.400	55.900	*	*	*
48.300	48.700	49.100	*	*	*
44.600	45.000	45.400	44.670	0.330	82.50
42.400	42.800	43.200	*	*	*
*	*	*	41.690	*	*
40.200	40.500	40.800	*	*	*
*	*	*	36.310	*	*
34.700	35.000	35.300	*	*	*
*	*	*	33.880	*	*
32.600	32.900	33.200	*	*	*
23.900	24.100	24.300	23.990	0.110	55.00

RESUMEN

Bandas totales de la muestra LSSI = 7
 La muestra LSSI tiene 3 bandas similares a LENGUADO
 # total de bandas de la especie LENGUADO 14

La muestra LSSI tiene un 21.43 % de bandas similares a LENGUADO

IX.

Resultados de la Comparación de la Muestra LSSI con Baya por Prueba de Peso Molecular.

RESULTADOS

Comparación de la muestra LSSI con BAYA						
# BANDAS		LSSI 7		BAYA 12		DIFERENCIA 5
LIM. INF.	BANDA	LIM. SUP.	LSSI	DIFERENCIA	% DIFERENCIA	
103.000	104.700	106.400	*	*	*	
71.300	72.400	73.500	*	*	*	
68.500	69.600	70.700	69.180	0.420	38.18	
63.900	64.900	65.900	*	*	*	
*	*	*	56.230	*	*	
53.800	54.800	55.400	*	*	*	
46.600	47.300	48.000	*	*	*	
*	*	*	44.870	*	*	
41.700	42.400	43.100	*	*	*	
*	*	*	41.690	*	*	
38.300	38.900	39.500	*	*	*	
*	*	*	36.310	*	*	
33.900	34.500	35.100	*	*	*	
*	*	*	33.880	*	*	
31.700	32.200	32.700	*	*	*	
23.500	23.900	24.300	23.990	0.090	22.50	

RESUMEN

Bandas totales de la muestra LSSI = 7
 La muestra LSSI tiene 2 bandas similares a BAYA
 # total de bandas de la especie BAYA 12

La muestra LSSI tiene un 16.67 % de bandas similares a BAYA

X.

Resultados de la Comparación de la Muestra LSSI con Cabrilla por Prueba de Peso Molecular.

RESULTADOS

Comparación de la muestra LSSI con CABRILLA					
# BANDAS		LSSI 7		CABRILLA 12	DIFERENCIA 5
LIM. INF.	BANDA	LIM. SUP.	LSSI	DIFERENCIA	% DIFERENCIA
103.500	105.300	107.100	*	*	*
69.600	70.800	72.000	*	*	*
68.000	69.200	70.400	69.180	0.020	1.66
62.000	63.000	64.000	*	*	*
54.300	55.300	56.300	56.230	0.030	93.00
48.900	47.900	48.900	*	*	*
43.400	44.700	46.000	44.670	0.030	2.30
*	*	*	41.690	*	*
40.000	40.700	41.400	*	*	*
*	*	*	36.310	*	*
34.700	35.300	35.900	*	*	*
*	*	*	33.880	*	*
32.500	33.100	33.700	*	*	*
24.000	24.400	24.800	*	*	*
*	*	*	23.990	*	*

RESUMEN

Bandas totales de la muestra LSSI = 7
 La muestra LSSI tiene 3 bandas similares a CABRILLA
 # total de bandas de la especie CABRILLA 12

La muestra LSSI tiene un 25.00 % de bandas similares a CABRILLA

XI.

Resultados de la Comparación de la Muestra LSCI con LENGUADO por Prueba de Peso Molecular.

NOMBRE DEL ARCHIVO: LSCI

RESULTADOS

Comparación de la muestra LSCI con LENGUADO					
# BANDAS		LSCI 12	LENGUADO 14	DIFERENCIA 2	
LIM. INF.	BANDA	LIM. SUP.	LSCI	DIFERENCIA	% DIFERENCIA
137.100	138.400	139.700	138.040	0.360	27.69
101.900	102.800	103.700	*	*	*
			100.000		
71.000	71.600	72.200	*	*	*
*	*	*	70.790	*	*
68.600	69.200	69.800	*	*	*
*	*	*	67.610	*	*
65.800	66.400	67.000	*	*	*
54.900	55.400	55.900	54.950	0.450	90.00
48.300	48.700	49.100	48.980	0.280	70.00
44.600	45.000	45.400	44.870	0.330	82.50
42.400	42.800	43.200	*	*	*
*	*	*	41.690	*	*
40.200	40.500	40.800	40.740	0.240	80.00
34.700	35.000	35.300	*	*	*
32.600	32.900	33.200	33.110	0.210	70.00
*	*	*	24.550	*	*
23.900	24.100	24.300			
22.100	22.300	22.500	22.390	0.090	45.00

RESUMEN

Bandas totales de la muestra LSCI = 12

La muestra LSCI tiene 7 bandas similares a LENGUADO

total de bandas de la especie LENGUADO 14

La muestra LSCI tiene un 50.00 % de bandas similares a LENGUADO

XII.

Resultados de la Comparación de la Muestra LSCI con Baya por Prueba de Peso Molecular.

RESULTADOS

Comparación de la muestra LSCI con BAYA					
# BANDAS		LSCI 12		BAYA 12	DIFERENCIA 0
LIM. INF.	BANDA	LIM. SUP.	LSCI	DIFERENCIA	% DIFERENCIA
*	*	*	138.040	*	*
103.000	104.700	106.400	*	*	*
*	*	*	100.000	*	*
71.300	72.400	73.500	*	*	*
*	*	*	70.790	*	*
68.500	69.800	70.700	*	*	*
*	*	*	67.610	*	*
83.900	84.900	85.900	*	*	*
53.800	54.600	55.400	54.950	0.350	43.75
*	*	*	48.980	*	*
46.600	47.300	48.000	*	*	*
*	*	*	44.670	*	*
41.700	42.400	43.100	*	*	*
*	*	*	41.690	*	*
*	*	*	40.740	*	*
38.300	38.900	39.500	*	*	*
33.900	34.500	35.100	*	*	*
*	*	*	33.110	*	*
31.700	32.200	32.700	*	*	*
*	*	*	24.550	*	*
23.500	23.900	24.300	*	*	*
21.900	22.300	22.700	22.390	0.090	22.50

RESUMEN

Bandas totales de la muestra LSCI = 12
 La muestra LSCI tiene 2 bandas similares a BAYA
 # total de bandas de la especie BAYA 12

La muestra LSCI tiene un 16.67 % de bandas similares a BAYA

XIII.

Resultados de la Comparación de la Muestra LSCI con Cabrilla por Prueba de Peso Molecular.

RESULTADOS

Comparación de la muestra LSCI con CABRILLA						
# BANDAS		LSCI 12		CABRILLA 12		DIFERENCIA 0
LIM. INF.	BANDA	LIM. SUP.	LSCI	DIFERENCIA	% DIFERENCIA	
*	*	*	138.040	*	*	
103.500	105.300	107.100	*	*	*	
*	*	*	100.000	*	*	
69.600	70.800	72.000	70.790	0.010	0.83	
68.000	69.200	70.400	*	*	*	
*	*	*	67.610	*	*	
62.000	63.000	64.000	*	*	*	
54.300	55.300	56.300	54.950	0.350	35.00	
*	*	*	48.980	*	*	
46.900	47.900	48.900	*	*	*	
43.400	44.700	46.000	44.670	0.030	2.30	
*	*	*	41.690	*	*	
40.000	40.700	41.400	40.740	0.040	5.71	
34.700	35.300	35.900	*	*	*	
32.500	33.100	33.700	33.110	0.010	1.66	
24.000	24.400	24.800	24.550	0.150	37.50	
22.600	23.000	23.400	*	*	*	
*	*	*	22.390	*	*	

RESUMEN

Bandas totales de la muestra LSCI = 12
 La muestra LSCI tiene 6 bandas similares a CABRILLA
 # total de bandas de la especie CABRILLA 12

La muestra LSCI tiene un 50.00 % de bandas similares a CABRILLA