

**Azúcares libres del eglefino (*Gadus aeglefinus*)
conservado en hielo y en hielo con antibióticos
(clortetraciclina y oxitetraciclina)**

Por el Dr. D. Bernabé Sanz Pérez

Hasta hace relativamente pocos años ha sido muy pequeña la atención dedicada a los azúcares libres del músculo de pescado; en parte debido a la escasa proporción en que allí se encuentran, pero, sobre todo, por la falta de métodos específicos suficientemente seguros para obtener resultados consistentes y reproductibles.

TARR (1954), estudió el contenido azucarado de ciertos peces de la costa canadiense del Pacífico, preparando extractos alcohólicos musculares que, después de concentrados, se sometían al análisis cromatográfico sobre papel, seguido de la elución y fotocolorimetría de las manchas. Tal proceder, según JONES (1958), cuando se aplica a los arenques (*Cuplea harengus*) y al bacalao (*Gadus callarias*), da un contenido en ribosa menor que el real debido a interferencias con los contenidos salino y graso del pescado. Sostiene que la ribosa de los extractos alcohólicos musculares de estas dos especies marinas reaccionan rápidamente con los compuestos nitrogenados, cuando se aplican a la línea de partida del papel cromatográfico, ocasionando una reacción de Maillard típica. Por el contrario, esto no ocurría eliminando las sales y el nitrógeno amínico de los extractos, por medio de una mezcla de resinas cambiadoras de iones, seguido de la liofilización y cromatografía cuantitativa.

La escasez de datos sobre el contenido en azúcares libres de las diferentes especies de pescado, la importancia que tiene su reacción con los grupos aminicos (ración de Maillard) en ciertas fases de la industria de la pesca (NAGASAWA, 1959), y su posible utilidad en la determinación de la frescura del pescado, son motivos que justifican un conocimiento más profundo de los cambios que sufren dichos azúcares.

La gran casuística existente sobre el efecto conservador que los antibióticos ejercen sobre el pescado (TARR, 1944; LERKE y FARBER, 1957; STERN, et al., 1957, 1958; SHEWAN y STEWART, 1958; TAKATSURA, 1958-59; etc.), nos movió a estudiar el efecto —si es que tenían alguno— que sobre los azúcares libres del pescado ejercen la clortetraciclina (C. T. C.) y la oxitetraciclina (O. T. C.), los dos antibióticos más ampliamente usados por las industrias conservadoras de alimentos.

En este trabajo se investigan, por lo tanto, los cambios que sufren los azúcares libres de los extractos musculares de tres lotes de eglefinos almacenados en condiciones comerciales con:

- a) Hielo.
- b) Hielo con 5 p. p. m. de O. T. C.
- c) Hielo con 5 p. p. m. de C. T. C.

Se estudió también el efecto que la C. T. C., adicionada al hielo de cobertura, ejerce sobre la carga bacteriana total del pescado, durante su almacenamiento y las variaciones que la trimetilamina (T. M. A.) experimenta durante la conservación de aquél en hielo adicionado o no de antibióticos.

PARTE EXPERIMENTAL

I. MATERIAL.

Eglefinos: Procedían del pesquero "Avondee" y fueron obtenidos a unas 50 millas de la Bahía de Aberdeen (Escocia). Inmediatamente de pescados se sacrifican y evisceraron conservándose en CO₂ sólido hasta su llegada a puerto, al día siguiente. Allí se dividieron en tres lotes que se conservaron en cajas de aluminio como sigue:

1. Recubiertos de hielo "normal" (sin antibiótico).
2. Recubiertos de hielo con 5 p. p. m. de O. T. C.
3. Recubiertos de hielo con 5 p. p. m. de C. T. C

Las cajas que contenían el pescado se mantuvieron en cámara frigorífica a 2,5° C. El mismo día de su llegada a puerto se realizaron las pruebas, a que más adelante nos referimos, con seis pescados que sirvieron de control.

Resinas: Amberitas IR-120 e IR-4B (Rhohm y Haas Co., Philadelphia, Pa., EE. UU.), que se emplearon como más tarde se indica.

II. METODOS

Se siguió la metódica de JONES (*loc. cit.*) ligeramente modificada.

a) Preparación de las Muestras: Inmediatamente de sacado el pescado del hielo y a la misma temperatura a que se almacenaron las cajas que lo contenían, 2,5° C, se tomaron de cada pescado paralelamente a la espina dorsal, los dos filetes laterales, procurando no incluir en ellos ni piel ni espinas. Se trató de que la operación fuera lo más rápida posible y nunca se mantuvo el pescado a temperatura ambiente.

b) Extractos Alcohólicos en Etanol: 20 grs. de músculo se homogenizaron con 64 ml. de alcohol absoluto, durante tres minutos. Se centrifugó el homogenizado y se recogió el líquido sobrenadante, reextrayéndose y centrifugándose cuatro veces con etanol al 80 por 100 (en volumen) hasta alcanzar un volumen de un litro. La extracción con etanol al 80 por 100 se basa en el contenido acuoso medio del eglefino, 80 por 100 (en peso), que además se determinó experimentalmente. Los extractos se almacenaron a —30° C.

A continuación se trataron con cloroformo p. a. (1 : 3 en volumen). La porción superior acuosa, que se separa, contiene los azúcares libres.

c) Tratamiento con Resinas: La fracción acuosa, que se separa del extracto alcohólico al tratarlo con cloroformo, se agitó continuamente durante 20 minutos con una mezcla de resinas (1 : 1 en peso) formada por Amberita IR-120 (H⁺, 100-120 mallas) e IR-4B (OH⁻, 60-200 mallas), para eliminar los compuestos aminicos y las sales que interferirían con los resultados de la cromatografía cuantitativa. Por cada ml. de la fracción acuosa, se añadieron 0,1 grs. de la mezcla de resinas.

A continuación se filtró la mezcla por papel Whatman núm. 42 y una alícuota de 3 ml. fue liofilizada.

d) Cromatografía: El residuo de los extractos, tratados con resinas y liofilizados, se redissolvió en 0,3 ml. de agua destilada de los que se aplicaron inmediatamente a la línea de partida del papel chromatográfico Whatman núm. 1, 40 μ ls. con ayuda de una microjeringa "Agla". Del mismo modo se aplicaron sobre la misma línea de partida, a distancia de 3,5 cms., alícuotas de 10, 20, 30 y 40 μ s. de soluciones standard, de concentración conocida, de glucosa y ribosa.

Como disolvente se empleó una mezcla de alcohol *n*-butílico-ácido acético glacial-agua destilada (15 : 2 : 5). Los chromatogramas se dejaron correr durante 30 horas en una habitación a 30° C, secándose a 60° C y fueron revelados a 105° C durante cinco minutos con el reactivo de PARTRIDGE (1949) compuesto de:

Ácido ftálico	1,6 grs.
Alcohol <i>n</i> -butílico saturado de agua	100 ml.
Anilina	1 ml.

Al aplicar el revelador se procuró que la pulverización fuese lo más uniforme posible en ambas caras del papel.

e) Determinación de los Azúcares del Cromatograma: Identificadas las manchas originadas tanto por las soluciones standard como por los extractos, se cortaron y eluyeron con 2 ml. de ácido acético glacial p. a.

Inmediatamente, y lo más cerca posible de las manchas, se cortaron de la porción de chromatograma sin teñir, superficies de la misma extensión que aquéllas que recibieron el mismo tratamiento.

Los tubos que contenían el papel y el ácido acético se agitaron durante dos minutos. El producto de la elución se trasvasó a cubetas de un cm., de espesor (3 ml. de capacidad) y se determinó su absorbancia con un fotocolorímetro "Unicam DU" a una longitud de onda $\lambda = 480 \text{ } \mu\text{ms}$. Como blanco para las lecturas se utilizó, en un principio, ácido acético y luego agua, dado que sus lecturas eran prácticamente idénticas.

La concentración de azúcares libres en las manchas problema se determinó refiriendo sus lecturas a curvas obtenidas con las absorbancias de la elución de las manchas producidas por las soluciones standard de glucosa y ribosa. Y de aquí, por simple proporcionalidad se obtuvo el contenido azucarado por 100 grs. de pescado.

f) Contajes Bacterianos: Se siguió en todas sus partes la técnica descrita por LUIJPEN (1958).

g) Determinación de la Trimetilamina (T. M. A.): Se usó la técnica colorimétrica de DYER (1945), aunque empleando para la solución de formaldehído, en vez de formalina comercial, aldehído fórmico p. a. El tolueno se destiló antes de recibir el tratamiento original de DYER.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las tablas I, II y III se señalan los contenidos en trimetilamina, glucosa y ribosa del eglefino durante los días mantenido en observación. En las figuras I, II y IV se representan gráficamente los resultados obtenidos y en la III pueden verse las diferencias en la carga bacteriana del pescado conservado en hielo y en el hielo al que se adicionó C. T. C. (5 p. p. m.)

Las cifras indicadas, tanto en las tablas como en los gráficos, son la media de los análisis practicados con seis pescados.

Como era de esperar, al envejecer el pescado aumenta su contenido en T. M. A., tanto en el eglefino mantenido en hielo, como en el que lo es en hielo con antibióticos, más el ritmo y cantidad de producción es mucho menor en el segundo caso, como se aprecia al comparar los resultados de las tablas y al observar la figura IV. Estas diferencias son fácilmente explicables si se tiene en cuenta el menor contejo bacteriano en el pescado contenido en hielo con antibióticos (véase fig. III) y el papel que los microorganismos, sobre todo *Micrococcus* y *Achromobacter*, juegan en la reducción del óxido de trimetilamina (TARR, 1940; WATSON, 1939; etc.)

En nuestros estudios con el eglefino hemos hallado los mismos azúcares libres que TARR y JONES (*loc. cit.*) encontraron en los pescados objeto de sus experimentos, es decir, glucosa y ribosa. Aunque se observaron excepcionalmente algunas diferencias manifiestas en el contenido en glucosa de algunos peces de un mismo lote, aquél, en general, era bastante constante dentro de los seis que constituyan el mismo lote.

Contrariamente a lo que ocurre en el bacalao, especie muy afín, en el eglefino la tasa de glucosa comienza a descender desde el segundo día, al principio lentamente para hacerlo después bruscamente, alcan-

zando valores próximos a cero en unos 20 días en los pescados conservados en hielo "normal" y ligeramente superiores en los que se mantienen en hielo con C. T. C.

En oposición a lo que sucede con la glucosa el contenido en ribosa aumenta durante los primeros días tanto en el eglefino conservado en hielo "normal" como en el que lo ha sido en hielo con antibióticos (véase fig. II), más mientras en el primero el nivel máximo de azúcar se alcanza a los 6-8 días, en el mantenido en hielo con antibióticos se tarda a alcanzar tal concentración de nueve a once días. Posiblemente esto se deba, en parte, a que en los primeros días de almacenamiento la ribosa se origina a partir de la inosina —que procede de los nucleótidos musculares, como han sugerido JONES y MURRAY (1956, 1958)— al actuar sobre ella las ribósido-hidrolasas musculares (TARR, 1955).

Cuando más tarde aumenta la carga bacteriana, los enzimas microbianos colaboran con los musculares en la producción de ribosa. En favor de este hecho pueden aducirse los resultados de la fig. II en la que se aprecia claramente, cómo el pescado conservado en hielo al que se adicionaron tetraciclinas tarda más en alcanzar, según hemos señalado, el valor máximo de ribosa, precisamente por la acción inhibidora que sobre el desarrollo bacteriano y, en consecuencia, sobre la producción de enzimas microbianos ejercen los antibióticos.

En el pescado conservado en hielo "normal", después del octavo día de almacenamiento, y en el que lo ha sido en hielo con antibióticos, pasados los 10-11 primeros días, el contenido en ribosa del músculo cae rapidísimamente hasta valores vestigiales en sólo 17 días.

La causa del descenso del contenido azucarado libre muscular (glucosa, ribosa) no ha sido suficientemente esclarecida a pesar de los esfuerzos de los autores citados. JONES, ya mencionado, concede gran importancia al lavado y arrastre mecánico del agua durante la licuación del hielo, mas posiblemente la razón principal la constituya el consumo azucarado por una población bacteriana en continuo crecimiento.

La acción inhibidora de la C. T. C. sobre la carga bacteriana del eglefino, puesta de manifiesto en la fig. III, confirma una vez más que los antibióticos de la tetraciclina adicionados al hielo extienden "la vida comercial" del pescado.

Dado que se conocen las variaciones de las tasas de azúcares libres, de trimetilamina y de la carga bacteriana total, a lo largo de

todo el período de almacenamiento, y puesto que el contenido de T. M. A. y carga bacteriana total se emplean como criterio para dictaminar el grado de frescura del pescado, tales criterios podrían ampliarse con la determinación de uno de los dos azúcares libres encontrados. Desgraciadamente el proceder de JONES (*loc. cit.*), que hemos seguido en este trabajo, es demasiado complicado para poder ser utilizado como método de trabajo ordinario en la industria.

T A B L A I

*Contenido en trimetilamina, glucosa y ribosa del eglefino (*G. aeglefinus*) conservado con hielo en cajas de aluminio mantenidas a 2,5° C.*

Días	Trimetilamina mgs/100 grs.	Glucosa mgs/100 grs	Ribosa mgs/100 grs
1	2,50	27,63	—
4	3,20	24,75	2,55
7	6,70	18,17	3,05
10	69,00	2,40	1,20
13	196,00	1,83	0,93
17	217,00	1,82	Vestigios
20	(1)	0,37	—

(1) Muestra no analizada.

Los resultados son la media aritmética de los obtenidos con seis pescados. Lo mismo ocurre en las tablas siguientes.

T A B L A II

Contenido en trimetilamina, glucosa y ribosa del eglefino (*G. aeglefinus*) conservado con hielo con 5 p. p. m. de O. T. C. en cajas de aluminio mantenidas a 2,5° C.

Días	Trimetilamina mgs/100 grs	Glucosa mgr/100 grs	Ribosa mgrs/100 grs
1	2,50	27,63	—
4	3,10	21,46	0,91
7	6,80	16,95	2,42
10	32,00	10,00	3,32
13	87,00	5,63	2,70
17	151,00	2,82	Vestigios
20	(1)	2,38	—

(1) Muestra no analizada.

Contenido en trimetilamina, glucosa y ribosa del eglefino (*G. aeglefinus*) conservado con hielo con 5 p. p. m. de C. T. C. en cajas de aluminio mantenidas a 2,5° C.

T A B L A III

Días	Trimitilamina mgs/100 grs	Glucosa mgs/100 grs	Ribosa mgr/100 grs
1	2,50	27,63	—
3	2,50	25,90	Vestigios
7	6,70	15,28	0,51
10	27,00	2,52	3,70
13	71,00	2,05	3,13
17	157,00	1,55	Vestigios
20	(1)	1,50	—

(1) Muestra no analizada.

F I G U R A I

Contenido en glucosa libre del músculo de EGLEFINO (*Gadus aeglefinus*) conservado con hielo en cajas de aluminio a 2,5° C.

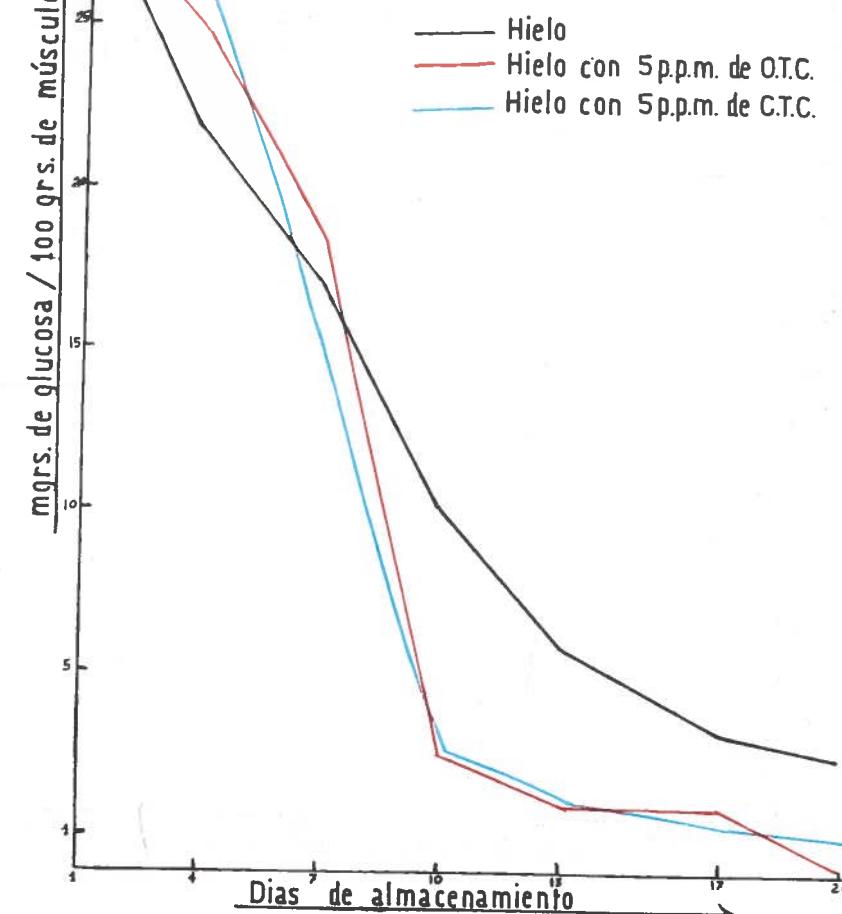


FIGURA II

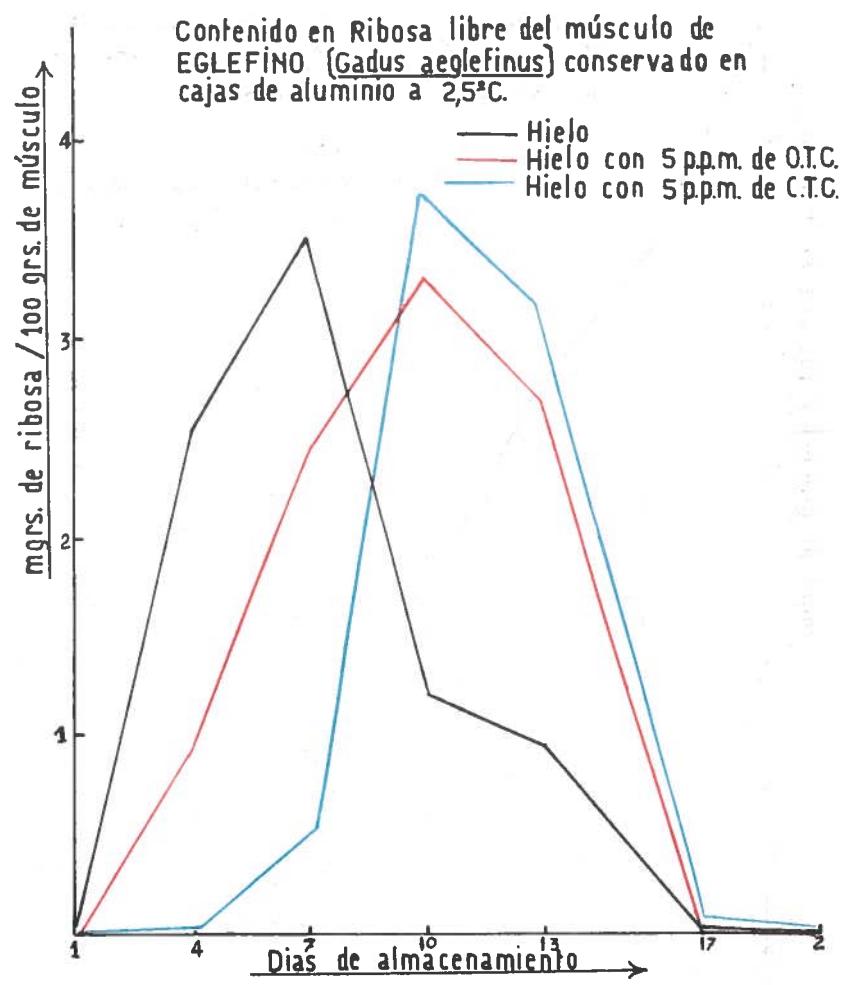


FIGURA III

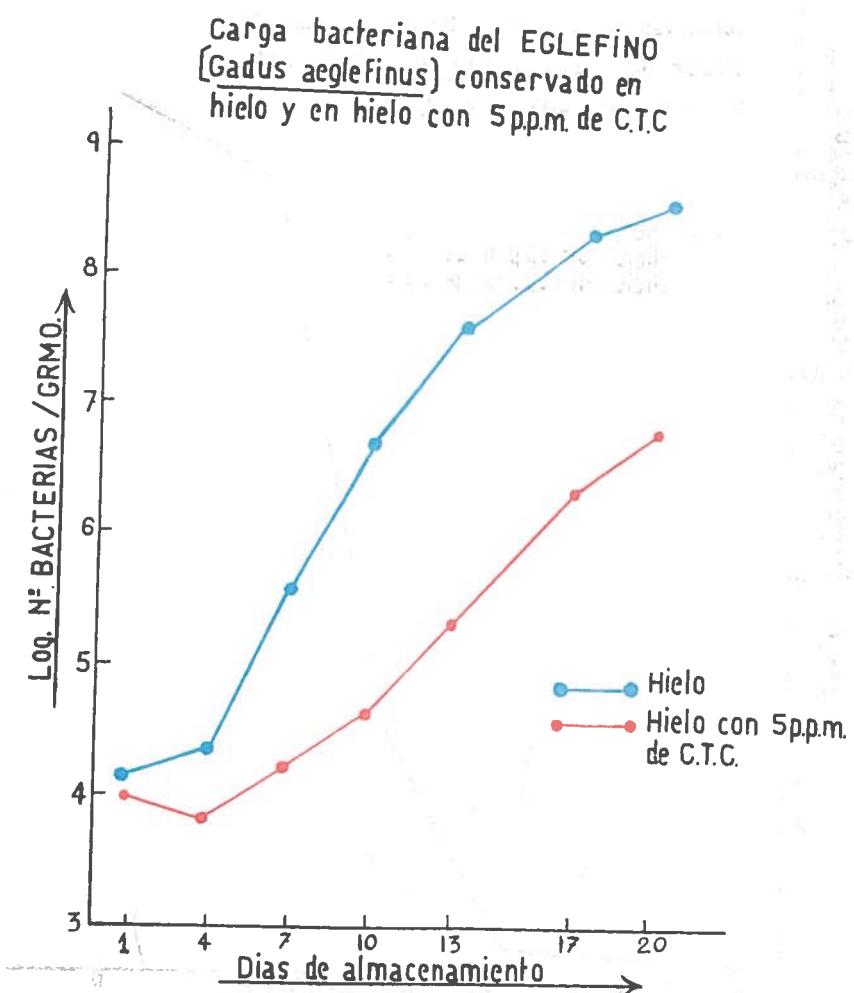
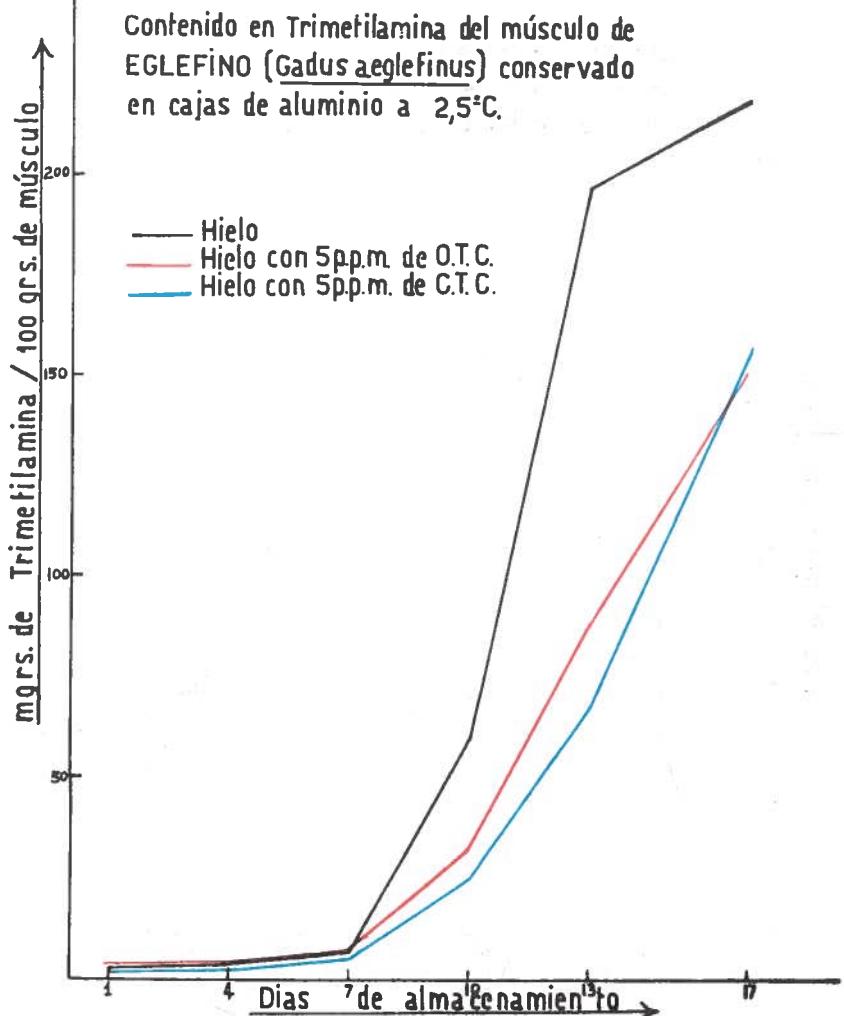


FIGURA IV



RESUMEN

El contenido en trimetilamina del eglefino (*Gadus aeglefinus*) conservado en hielo aumenta al envejecer. Tal aumento es menor y más lento cuando al hielo se le adicionan antibióticos (C. T. C. ú O. T. C., 5 p. p. m.)

En el músculo de eglefino existen dos azúcares libres: glucosa y ribosa.

La tasa de glucosa permanece casi constante los dos primeros días, para caer después bruscamente hasta valores próximos a cero, en unos 20 días. Por el contrario, la ribosa, aumenta durante los primeros días, alcanzando la concentración máxima entre los 7-8 días, descendiendo después rápidamente hasta valores vestigiales, alrededor de los 17 días de almacenamiento.

Cuando el eglefino se conserva en hielo con antibióticos (C. T. C. ú O. T. C.) la tasa de ribosa es máxima a los 9-11 días de almacenamiento.

Los antibióticos precipitados prolongan la vida comercial del pescado.

RESUME

Le contenu en triméthylamine de l'églefin (*Gadus aeglefinus*) gardé dans de la glace augmente en vieillissant. Cette augmentation est plus petite et plus lente lorsqu'on ajoute des antibiotiques (5 parties par million de Chlorotetracycline ou d'Oxytétracycline) à la glace.

Dans le muscle de l'églefin il existe deux sucres libres: la glucose et la ribose.

La quantité de glucose reste presque constante les deux premiers jours et elle tombe ensuite de manière brusque jusqu'à des valeurs proches à zéro en 20 jours environ.

La ribose, au contraire, augmente pendant les premiers jours, atteint la concentration maximum entre 7-8 jours et tombe ensuite rapidement jusqu'à des valeurs vestigiales 17 jours environ après son emmagasinage.

Quan l'églefin est gardé dans de la glace contenant des antibiotiques (Chlorotetracycline ou Oxytétracycline) la quantité de ribose est à son maximum 9-11 jours après son emmagasinage.

Les antibiotiques ci-dessus indiqués prolongent la vie commerciale du poisson.

SUMMARY

The trimethylamine content of haddock (*Gadus aeglefinus*) muscle stored with ice increases as it becomes old. The inclusion of Chlorotetracycline (C. T. C.) or Oxytetracycline (O. T. C.) in ice preserving haddock decreases its T. M. A. content and slows the rate of its production.

In haddock muscle there have been found two free carbohydrates, glucose and ribose.

While the glucose's concentration is almost constant the first two days, then it suddenly drops till values near zero in about 20 days. On the contrary the ribose concentration increases from the first days, reaches its maximum at 7-8 days and then it quickly drops to trace values in about 17 days.

When C. T. C. or O. T. C. are included in ice preserving haddock the greatest ribose concentration occurs after 9-11 days of storage.

The above cited antibiotics extend the keeping quality of fish.

BIBLIOGRAFIA

- DYER, W. J., 1945.—*J. Fish. Res. Bd. Can.*, 6, 351.
JONES, N. R., 1958.—*Biochem. J.*, 68, 704.
_____, 1958.—*J. Sci. Food Agric.*, 9, 672.
JONES, N. R. y MURRAY, J., 1956.—*Biochem. J.*, 66, 5 p.
LERKE, P. A. y FARBER, L., 1957.—*Antibiotics Ann.*, 966. Med. Encyclopedia, Ins., New York.
LUIJPEN, A. F. M. G., 1958.—*J. Sci. Food Agric.*, 9, 410.
NAGASAWA, Y., 1959.—*Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 24, 900.

- PARTRIDGE, S. M., 1949.—*Nature*, Lond., 164, 443.
SHEWAN, J. M. y STEWART, J., 1958.—“Experiments in the Use of Antibiotics in Fish Preservation”. Institut International du Froid, Comm. 4, Moscú. Sept., 1958.
STERN, J. A., LIEBMAN, H. L., MUNKELT, R. E. y HATHERELL, B., 1957.—*Antibiotics Ann.*, 975. Med. Encyclopedia, Inc. New York.
STERN, J. A., LIEBMAN, H. L., KUO, G., CHAPEL, J.; OLSEN, R. A., FARBER, L. L. y GRENNAN, M., 1958.—*Food Technol.*, 12, 132.
TAKATSURA, N., 1958.—*Nippon Suisangaku Kaishi*, 24, 221.
TARR, H. L. A., 1940.—*J. Fish. Res. Bd. Can.*, 5, 187.
_____, 1944.—*Ibidem*, 6, 119.
_____, 1954.—*Food Technol.*, 8, 15.
_____, 1955.—*Biochem. J.*, 59, 386.
WATSON, D. W., 1939.—*J. Fish. Res. Bd. Can.*, 4, 267.