

SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS SARCOPLÁSMICAS POR ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA COMO MÉTODO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ALGUNAS ESPECIES DE PESCADO

Sarcoplasmic Protein Separation by Agarose Gel Electrophoresis as a Method for Some Fish Species Identification

Gabriel Torres Ferrari¹, Pedro Izquierdo Corser¹, Enrique Márquez Salas² y Yasmina Barboza²

¹Cátedra de Bioquímica. ²Unidad de Investigación en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (UDICTA).
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia, Apartado 15252. Maracaibo 4005-A, estado Zulia, Venezuela.

RESUMEN

Para la identificación de las especies de pescado se han desarrollado métodos bioquímicos que van desde la determinación de isoenzimas hasta las técnicas de reacción en cadena de polimerasa (PCR) y electroforesis de ácidos nucleicos. Se ha reportado el uso de la electroforesis en gel de almidón y la electroforesis en gel de poliacrilamida en la separación de proteínas sarcoplásmicas del pescado. La electroforesis en gel de agarosa se presenta como alternativa a los dos métodos anteriores, por su buena resolución y por ser despreciablemente tóxica. Para probar el método de electroforesis en gel de agarosa, se homogeneizaron en agua bidestilada y desionizada, músculos de Corvina (*Cynoscion virescens*), Lisa (*Mugil curema*), Mero (*Epinephelus striatus*) y Robalo (*Centropomus undecimalis*). Previa centrifugación y filtrado, los extractos fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa en un campo eléctrico de 95 V, por 35 min utilizando un buffer barbital pH 8,6. Posteriormente los electroforegramas fueron analizados por densitometría a 520 nm. Se encontraron diferencias, tanto en los patrones electroforéticos, como en los densitogramas de las especies estudiadas, con una efectividad medida como aciertos de 95% en las pruebas de identificación. Los electroforegramas obtenidos de las especies estudiadas fueron comparados entre sí y se observaron bandas de diferente movilidad relativa así como distintas intensidades de coloración para cada especie. Debido a la eficiencia del método, se recomienda el uso de la electroforesis de las proteínas sarcoplásmicas de pescado en gel de agarosa para la diferenciación e identificación de las especies estudiadas.

Palabras clave: Electroforesis, pescado, identificación.

ABSTRACT

Fish species identification has not been exclusively of taxonomists interest, but also for people in charge of sea food industry quality control. For that purpose, some biochemical methods have been developed, and they go from isoenzymes determination to polymerase chain reaction (PCR) techniques and nucleic acids electrophoresis. Economical reasons and complexity level of some of these techniques, made necessary the utilization of simpler biochemical methods. Starch gel electrophoresis and polyacrylamide gel electrophoresis of sarcoplasmic proteins for fish species identification have been reported. Agarose gel electrophoresis presents itself as an alternative to previous methods, because of its good resolution and poor toxicity. For method testing, muscles of Corvina (*Cynoscion virescens*), Lisa (*Mugil curema*), Mero (*Epinephelus striatus*) and Robalo (*Centropomus undecimalis*) were homogenized. Extracts were centrifuged and filtered before electrophoretic analysis. Electrophoresis was performed at 95 Volts, for 35 min using barbital buffer pH 8,6. All samples were analyzed in a densitometer using a wavelength of 520 nm. Differences were found in electrophoretic patterns and densitograms for all studied species; and identification test had a 95% of accuracy. Completely different patterns were observed for each species in all samples. Due to method efficiency, agarose gel electrophoresis of fish sarcoplasmic proteins for species identification is recommended.

Key word: Electrophoresis, fish, identification.

INTRODUCCIÓN

En años recientes ha tomado interés la búsqueda de métodos bioquímicos que sean alternativa a los métodos con-

vencionales para la identificación de especies de pescados. Existen dos razones importantes al respecto: la primera, es muy difícil la identificación sensorial precisa de un pescado desprovisto de sus características externas, en estos casos la electroforesis ha sido de gran utilidad en la detección de adulteraciones en productos pesqueros, y la segunda, que actualmente el hombre tiene la posibilidad de usar técnicas bioquímicas que dan mayor precisión a la taxonomía, lo que permite la clasificación más precisa de géneros y especies. Una de estas técnicas es la electroforesis, la cual ha sido utilizada como una técnica indispensable en el análisis taxonómico por su precisión, economía y sencillez en su realización [2].

Los primeros trabajos reportados sobre electroforesis de proteínas sarcoplásmicas de pescado fueron realizados sobre acetato de celulosa [8,9] y geles de almidón [1,3,12]. La pobre resolución de los métodos anteriores, y la aparición del gel de poliacrilamida a principios de los años sesenta, dirigió la atención de los investigadores a este nuevo método [4,5,6,7,9,10,11,13]. El furor causado por el gel de acrilamida, además de su gran resolución, influyeron negativamente sobre la técnica del uso de la agarosa como soporte electroforético en la identificación de especies de pescado. Esta técnica tiene ventajas evidentes frente a la poliacrilamida, y es que posee buena resolución aunado a una muy baja toxicidad y gran economía.

Es propósito de este trabajo ofrecer una alternativa económica de baja toxicidad y suficiente resolución que permita la utilidad del método propuesto en la identificación de especies de pescado desprovistos de sus características externas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras consistieron en 15 ejemplares de Corvina (*Cynoscion verescens*), Lisa (*Mugil curema*), Mero (*Epinephelus striatus*) y Robalo (*Centropomus undecimalis*). Estos

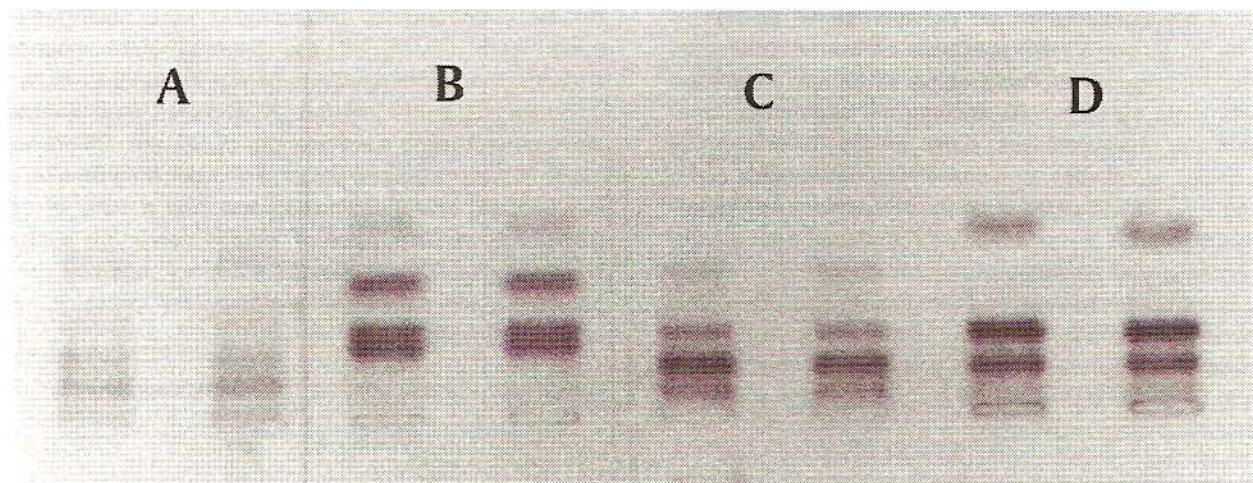
fueron fileteados para la preparación de los extractos siguiendo la metodología propuesta por Thompson [12]. 30 g de músculo fueron pesados en una balanza Methler modelo AJ150, y fueron homogeneizados en una licuadora común marca oster a velocidad máxima por 2 min en 60 ml de agua desionizada a 4°C. El extracto fue filtrado a través de papel de Filtro Whatman #1 e inmediatamente utilizado en la electroforesis.

Para la corrida electroforética se utilizó un sistema de electroforesis Corning compuesto por una celda para electroforesis de Agarosa (Nº de catálogo Corning 470130), una fuente de poder marca Corning # 470134, Geles de Agarosa Universal # 470100 obtenidos de los laboratorios Ciba Corning y una Micropipeta marca Hamilton de 10 µL de capacidad.

Las condiciones para la electroforesis fueron las descritas por Wieme [14]. Un µL de extracto fue sometido a un campo eléctrico de 90V por 35 min, utilizando para ello buffer barbital pH 8,6 Corning (Nº de catálogo 470180). Los geles fueron teñidos por 15 min en AmidoBlack 10B al 0,2% en ácido acético al 5% en agua desionizada. Tras ser secados en un horno a 60°C se decoloraron en 3 soluciones de Acido Acético al 5% y se secaron nuevamente a 60°C. Los electroforegramas fueron analizados en un densitómetro Corning 710 utilizando una longitud de onda de 520 nm. El análisis electroforético de cada muestra se realizó por duplicado. Se calculó la desviación estándar y el coeficiente de variación a cada banda de proteínas en los electroforegramas. Las corridas hechas con muestras frescas, conocidas e identificadas previamente se compararon con las muestras ante un panel de identificación para medir la efectividad del método.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura anexa se pueden apreciar los electroforegramas de los extractos de proteína muscular de las especies de



ELECTROFOREGRAMAS DE PROTEÍNAS SARCOPLÁSMICAS DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS. (A) CORVINA (*Cynoscion virescens*). (B) LISA (*Mugil curema*). (C) MERO (*Epinephelus striatus*). (D) ROBALO (*Centropomus undecimalis*).

TABLA I

Especie	Banda	*Coloración/MR	DE	CV
<i>Cysnacion virescens</i>	1	c/0,005	0,0000012	0,0024
	2	b/0,10	0,0000029	0,0029
	3	b/o,16	0,0000025	0,00156
	4	c/0,30	0,0000039	0,0013
	5	c/0,48	0,0000028	0,0058
<i>Mugil curema</i>	1	a/0,21	0,0000029	0,00138
	2	a/0,26	0,0000033	0,00126
	3	a/0,43	0,0000058	0,00134
	4	b/0,60	0,0000072	0,0012
<i>Epinephelus striatus</i>	1	b/0,08	0,0000017	0,0021
	2	a/0,16	0,0000028	0,00175
	3	b/0,26	0,0000029	0,00111
	4	c/0,46	0,0000052	0,00113
<i>Centropomus undecimalis</i>	1	c/0,08	0,0000015	0,00187
	2	a/0,13	0,0000018	0,00138
	3	a/0,25	0,0000032	0,00128
	4	b/0,40	0,0000049	0,00122

*Bandas enumeradas desde el origen. (a) Bandas de coloración intensa. (b) Bandas de coloración tenue. (c) Bandas apenas visibles. MR: Movilidad Relativa. DE: Desviación Estándar. CV: Coeficiente de Variación.

TABLA II
RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS FRENTE A PATRONES CONOCIDOS

Especie	Panel Identificador (10 personas)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Cysnacion virescens</i>	c	c	c	x	c	c	c	c	c	c
<i>Mugil curema</i>	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c
<i>Epinephelus striatus</i>	c	c	c	c	c	c	c	x	c	c
<i>Centropomus undecimalis</i>	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c

C= Acertado. x= Respuesta incorrecta. C/Nº de muestras = 38/40 = 0,95.

pescado estudiadas en el presente trabajo. Como se observa en la imagen, existen patrones electroforéticos perfectamente diferenciados para cada especie, no sólo en la intensidad que presentan las distintas bandas de proteínas sino también en la movilidad relativa de las mismas. El mayor número de bandas para cada especie fue de 5 en la Corvina (*Cysnacion virescens*), mientras el resto de las especies analizadas presentaron cuatro bandas de proteína. Este número de bandas es el reportado en algunos trabajos realizados en geles de poliacrilamida [9,13], lo que indica que la agarosa presentó una resolución aceptable en la separación de las proteínas sarcoplásmicas de las distintas especies estudiadas tras un tiempo total de análisis de 2 horas, mucho menor que el registrado para la electroforesis de poliacrilamida [14].

La TABLA I muestra una descripción de las bandas en cuanto a coloración y movilidad reportadas de acuerdo a la metodología de Lemos y Moraes [9]. Puede observarse de manera clara, que las bandas no coinciden simultáneamente en cuanto a coloración y movilidad para ninguna de las especies estudiadas, presentándose muy poca variabilidad, lo cual indica que los electroforegramas fueron altamente reproducibles.

La eficiencia del método para la identificación de las especies de pescado fue evaluada con un panel de identificación entrenado en la interpretación de los electroforegramas. La identificación de las muestras se realizó por comparación del patrón electroforético de las muestras con patrones debidamente identificados. La TABLA II muestra los resultados de la prueba de identificación donde se observa que la efectividad, medida como aciertos, fue del 95%. Estos valores son compa-

rables a los obtenidos con métodos electroforéticos de mayor resolución [9,13].

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las especies *Cynoscion virescens* (Corvina), *Mugil Curema* (Lisa), *Epinephelus striatus* (Mero) y *Centropomus undecimalis* (Robalo), pueden ser fácilmente identificadas por electroforesis en gel de agarosa aún desprovistos de sus características externas.

Es necesario establecer en trabajos futuros, cómo es afectado el patrón electroforético de las proteínas musculares debido a los procesos de autólisis que ocurren en la carne de pescado luego de su captura, para conocer si el método electroforético propuesto en el presente trabajo, pudiera perder aplicabilidad transcurrido un tiempo de captura prolongado.

Para estudiar la reproductibilidad del método, se recomienda un estudio colaborativo entre varios laboratorios o investigadores del área de la tecnología de alimentos y la taxonomía de peces.

AGRADECIMIENTO

Los autores desean expresar su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES), por el soporte institucional y económico del proyecto (Proyecto CONDES N° 2113-96).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ANDERSON, R.C. Electrophoretic analysis of Antarctic fish from South Georgia. **Animal Blood Groups and Genetics** 13: 11-18.1982.
- [2] AYALA, F.J. **Evolución Molecular**. Editorial Omega. Barcelona, España: 19-87.1980.
- [3] CEQUEA, H. ; PÉREZ, J. Especies Sibilianas del Género Anchoa confirmadas por Electroforesis en Gel de Almidón. **Bol. Inst. Oceanogr. Univ. Oriente**, 13 (1-2): 3-10. 1974.
- [4] GALLARDO, J.M.; SOTELO, C.G.; PIÑEIRO, C.; PÉREZ R. Use of Capillary Zone Electrophoresis for Fish

- Species Identification. Differentiation of Flatfish Species. **J. Agric. Food Chem**, 43: 1238-1244.1995.
- [5] HUANG, T.S.; CHEN, J.S.; MARSHALL, M.R.; WEI C.I. Quantification of Shrimp-Surimi Mixtures using Urea Gel Isoelectric Focusing. **Journal of Food Science** 55 (5): 1206-1209. 1990.
- [6] HUANG, T.S.; MARSHALL, M.R.; WEI, C.I. Identification of Red Snapper (*Lutjanus campechanus*) using Electrophoretic Techniques. **Journal of Food Science** 60 (2): 279-283. 1995.
- [7] LEARSON, R.J. Collaborative Study of a Rapid Electrophoretic Method for Fish Species Identification. **Journal of the Assoc. Off. Anal. Chem.** 52 (4): 703-707.1969.
- [8] LEARSON, R.J. Collaborative Study of a Rapid Electrophoretic Method for Fish Species Identification. II. Authentic Flesh Standards. **Journal of the Assoc. Off. Anal. Chem.** 53 (1): 7-9. 1970.
- [9] LEMOS, A.L.; MORAES, M.A. Identificacao Electroforética de Peixes de Água Doce (Familia Pimelodidae) de Valor Comercial. **Alimentacao e Nutricao** 4: 57-63.1992.
- [10] LUNDSTROM, R.C. Fish Species Identification by Thin Layer Polyacrilamide Gel Isoelectric Focusing: Collaborative Study. **Journal of the Assoc. Off. Anal Chem.** 63 (1): 69-73. 1980.
- [11] MACKIE, I.M.; JONES, B.W. The use of Electrophoresis of the Water-Soluble (Sarcoplasmic) Proteins of Fish Muscle to Differentiate the Closely Related Species of Hake (*Merluccius sp.*). **Comp. Biochem. Physiol.**, 59B: 95-98. 1970.
- [12] THOMPSON, R. Identification of Fish Species by Starch Gel Zone Electrophoresis of Protein Extracts. **Journal of the Assoc. Off. Anal. Chem.** 52 (2): 275-276. 1962.
- [13] THOMPSON, R. Disk Electrophoresis Method for the Identification of Fish Species. **Journal of the Assoc. Off. Anal. Chem.** 50 (2): 282-285. 1967.
- [14] WIEME, R.J. **Agar Electrophoresis**. Elsevier. Amsterdam: 89-110. 1965.