

INFORME DE D. ANTONIO CRUZADO ALORDA SOBRE LA VISITA EFECTUADA A VARIOS CENTROS DE INVESTIGACION PESQUERA EN EL REINO UNIDO, CANADA Y ESTADOS UNIDOS EFECTUADA ENTRE LOS DIAS 19 DE OCTUBRE DE 1.967 Y 15 DE MAYO DE 1.968.

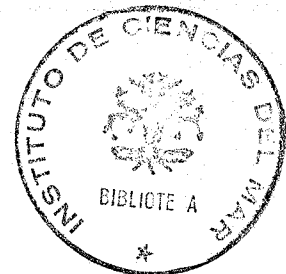
En un informe anterior de fecha 18 de septiembre de 1.967 se justificaba el gran interés de realizar una visita a los principales centros de investigación pesquera del Reino Unido y del Canadá ya que, a pesar del fabuloso incremento experimentado por la flota pesquera española en los últimos quince años, la investigación, sobre todo en el aspecto bioquímico del tratamiento del pescado para su conservación, ha sido prácticamente inexistente, a diferencia de lo ocurrido en otros países donde el estudio científico de las pesquerías y de los métodos de conservación ha corrido paralelo al incremento de los desembarques de pescado.

También en dicho informe se citaba la oportunidad que brindó la Conferencia Técnica de la F.A.O. sobre la Congelación y la Irradiación del Pescado llevada a cabo en Madrid en septiembre de 1.967, de efectuar contactos con algunas de las más destacadas personalidades, posibilitando la elaboración de un programa que, en lo posible, ha sido seguido y que incluía no solamente la visita a varios centros de investigación sino también la realización de trabajo práctico que me permitiría adquirir un mejor conocimiento de los problemas generales que concurren en el proceso de conservación del pescado, sobre todo por congelación.

Visita a TORRY RESEARCH STATION en Aberdeen (Escocia)

Tal como se había previsto, la primera parte del periplo tuvo como lugar de trabajo la TORRY RESEARCH STATION en Aberdeen. Este centro, dependiente del MINISTRY OF TECHNOLOGY, abarca todos los campos de la investigación del pescado como materia prima de la industria alimentaria, centralizando prácticamente el trabajo que se realiza en todo el Reino Unido. Está dirigido por el Dr. J.A. Lovern y comprende los siguientes departamentos:

Biofísica
Ingeniería
Bacteriología
Asesoramiento de calidad
Bioquímica de la congelación
Oxidación de grasas
Bioquímica de las proteínas
Bioquímica de los lípidos y Subproductos
Enzimas y sabores



En el grupo encargado de estudiar la bioquímica de las proteínas, y bajo la dirección del Dr. J.J. Connell realicé un trabajo sobre el efecto que produce la adición de compuestos orgánicos con radicales sulfhidrilo al músculo de pescado sobre la evolución de las proteínas extractables, actividad adenosin-trifosfatasa y composición de dichas proteínas controlada por ultracentrifugación. Los resultados hallados, sumamente interesantes, serán probablemente publicados como parte de un trabajo más extenso en fecha próxima.

Aparte de la ejecución del citado trabajo práctico, mantuve conversaciones altamente aleccionadoras con los encargados de las distintas secciones, realicé un viaje a bordo del arrastrero congelador "Sir William Hardy" y visité otros centros dedicados a estudios bioquímicos entre los que se encuentran el MARINE BIOLOGICAL LABORATORY, donde es estudiada la Biología Marina y Oceanografía en general, el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Aberdeen, donde llevan a cabo estudios de la fisiología de peces y algas, el ROWETT INSTITUTE OF FOOD SCIENCE, interesado en la alimentación del ganado y el UNILEVER RESEARCH LABORATORY, de análogas características a la TORRY RESEARCH STATION pero de carácter privado.

A mi llegada a Aberdeen fué programada mi asistencia a un GRUPO DE DISCUSION DE LA CONGELACION EN EL MAR, compuesto de los principales investigadores de TORRY RESEARCH STATION y de la industria pesquera, que debía desarrollarse los días 22 a 26 de enero de 1.968 pero, dada la falta de interés mostrada por los representantes de la industria, a pesar del prestigio internacional y sólida tradición de ayuda a la industria privada de la TORRY RESEARCH STATION hubo de ser cancelado.

Visita a varios centros de investigación oceanográfica y limnológica

Del 26 de enero al 12 de febrero y aprovechando ciertos retrasos administrativos que me impidieron abandonar el país rumbo a Canadá, visité varios laboratorios de las costas occidental y meridional de Gran Bretaña, entre los que cabe destacar los pertenecientes a la BIOLOGICAL ASSOCIATION en Millport (Clydesdale), Windermere (Lake District) y Plymouth (Dartmoor), así como el Departamento de Oceanografía de la Universidad de Liverpool y el Departamento de Botánica del WESTFIELD COLLEGE en London. Ni qué decir tiene que todos estos contactos fueron sumamente interesantes por tratarse de instituciones cuyo valor científico es sustentado por largos años de experiencia y en todos fuí admitido con hospitalidad digna de mención.

Visita a varios laboratorios del FISHERIES RESEARCH BOARD OF CANADA

Con fecha 13 de febrero inicié la visita al FISHERIES RESEARCH BOARD OF CANADA. Esta institución, sin duda alguna la más importante del mundo en investigación pesquera, posee tres estaciones tecnológicas: una en el Atlántico (Halifax), otra en el centro (Winnipeg) que cubre todas las zonas de pesca continental y una tercera en el Pacífico (Vancouver).

Halifax.- En Halifax y por un período de tres meses al lado del Dr. W.J. Dyer y de Mrs. D. Hiltz investigué el efecto de la descongelación y recongelación sobre la velocidad de formación de ácidos grasos libres y la de disminución del nitrógeno proteico extractable, así como la influencia de distintas temperaturas de almacenamiento y la relación con otras variables químicas.

Al mismo tiempo mantuve conversaciones con otros miembros de la estación, asistí a varios centros de investigaciones biológicas y oceanográficas entre los que se deben incluir el Departamento de Biología de ST. MARY'S UNIVERSITY, el Departamento de Oceanografía de DALHOUSIE UNIVERSITY, el BEDFORD INSTITUTE OF OCEANOGRAPHY y el ATLANTIC OCEANOGRAPHIC GROUP del FISHERIES RESEARCH BOARD donde están realizando interesantes estudios sobre la producción secundaria. También y gracias a la gentileza del Dr. J.R. Dingle y al personal técnico de NATIONAL SEA PRODUCTS, me fué dado visitar las factorías que dicha firma posee en Halifax y en Lunenburg, modelo esta última en su género.

Ottawa.- Al término de mi estancia en Halifax y camino de Winnipeg, aproveché mi paso por la capital federal para visitar al Dr. C.T. Bishop del NATIONAL RESEARCH COUNCIL, autor de numerosos trabajos sobre los polisacáridos de algas y bacterias.

Toronto.- En esta ciudad visité el Departamento de Botánica del SCAR BOROUGH COLLEGE, cuyo Dr. C. Sparling realiza interesantes investigaciones relacionadas con la producción primaria en los Grandes Lagos.

Winnipeg.- En Winnipeg pasé ocho días de intenso intercambio de ideas con los miembros de los tres grupos que trabajan en el FRESHWATER INSTITUTE del FISHERIES RESEARCH BOARD: Eutrophication Section, interesados en el estudio de los numerosos lagos del norte de Ontario así como en la realización de modificaciones en su estructura y en su nivel de troficación con el fin de aumentar la producción piscícola que ya se estima en más de 20 millones de dólares anuales. Fish Population Dynamics Section, interesados en la correlación entre los estudios de campo y las investigaciones en el laboratorio sobre fisiología y ecología de peces de agua dulce. La Technological Section incluye en su programa estudios de bioquímica.

ca básica y aplicada, microbiología e ingeniería para proveer a la industria con la información técnica necesaria para hacer más efectivos los métodos de procesamiento del pescado.

Merece destacar el hecho de que este centro es de reciente instalación por lo que me tomé interés por los problemas que presenta el diseño, construcción y puesta a punto de las cámaras frigoríficas, sobre todo en lo que respecta a la estabilidad de las temperaturas, factor éste fundamental en la conservación de la calidad del pescado congelado.

Vancouver.- En la costa occidental de Canadá tuve ocasión de permanecer algún tiempo en la TECHNOLOGICAL STATION del FISHERIES RESEARCH BOARD, en Vancouver. Lo mismo que sus homónimas de Halifax y Winnipeg, en este laboratorio se realizan estudios sobre los cambios fisiológicos que tienen lugar en el pescado a partir del momento en que llega a cubierta hasta que es consumido por el público. Sin embargo uno de los puntos de mayor interés en esta visita era el estudio que sobre los cambios inmediatamente posteriores a la muerte del pez están efectuando los Dres. H.L.A. Tarr y N. Tomlinson. También en dicha estación tuve el placer de entrar en contacto con los Dres. N.J. Antia y E. Bilinsky autoridad el primero en el estudio de la fisiología de las algas y el segundo en los sistemas enzimáticos de peces y algas.

Nanaimo.- También en la costa occidental tuve ocasión de visitar el PACIFIC OCEANOGRAPHIC GROUP del FISHERIES RESEARCH BOARD en Nanaimo (B.C.) que, como su homólogo del Atlántico centra su interés en las cadenas tróficas.

Visita a varios centros oceanográficos de Estados Unidos

En el camino de regreso empleé algunos días visitando el Departamento de Oceanografía de la Universidad de Washington en Seattle donde mantuve muy interesantes conversaciones con varios de sus miembros entre los que merecen ser destacados los Dres. R.C. Dugdale y J.C. Lewin. Asimismo visité la WOODS HOLE OCEANOGRAPHIC INSTITUTION en Woods Hole (Mass) donde tuve ocasión, no sólo de conversar con algunos de sus miembros entre los que merecen ser destacados los Dres. Ketchum y Guillard, sino que además me ofrecieron la visita al barco de investigación Chain y al sumergible Alvin dos de los puntales de dicha institución. Por último y antes de emprender viaje de regreso a Barcelona, mantuve una interesante charla con el Dr. L. Provasoli del Haskins Institute en New York, autoridad mundialmente reconocida en el campo de la algología.

C O N C L U S I O N E S

Es imposible poner en un informe de longitud necesariamente limitada todas las impresiones y conocimientos adquiridos en un viaje de la longitud e intensidad del que nos ocupa, sin embargo sí es posible sacar algunas conclusiones que pueden ser aleccionadoras cuando, en el futuro, se piense elaborar un programa de investigaciones tecnológicas, bien dentro del marco del Instituto de Investigaciones Pesqueras o de otro cualquier organismo.

A) Un programa de investigación tecnológica debe cubrir, no solamente todas aquellas especialidades relacionadas con el procesamiento del pescado, sino también todo el campo de la fisiología del pez vivo y muerto, por lo que se hace necesaria una estrecha colaboración con otros centros de investigación no pesquera pues, únicamente del estrecho contacto con personas interesadas en los más variados problemas, pueden ampliarse los objetivos y mejorarse las técnicas de trabajo.

Esto condiciona en cierto modo la elección del lugar en que un tal laboratorio debería ser emplazado si se quiere obtener la máxima eficiencia a largo plazo.

B) La preparación del personal investigador es un proceso que requiere tiempo y, dada la escasez de personal existente en nuestro país con experiencia suficiente para formar nuevos científicos y técnicos en esta especialidad es obvio que no quedan sino dos alternativas: contratar personal con experiencia suficiente aunque sea extranjero o enviar, por períodos de tiempo suficientemente largos, jóvenes graduados a centros de reconocida solvencia aun a pesar de la posibilidad de que, dadas las enormes diferencias existentes entre los sueldos en nuestro país y en los países visitados, se incremente el flujo de cerebros que constantemente abandonan España.

C) No cabe esperar que un centro de investigación tecnológica de productos de la pesca dé frutos inmediatos ya que, por la misma naturaleza de los problemas tratados, se requieren períodos de tiempo muy largos para llegar a obtener resultados coherentes en las experiencias sobre conservación.

D) Es imprescindible tener acceso a los medios de pesca ya que los cambios fisiológicos que tienen lugar en el pescado se inician cuando el arte de pesca empieza a actuar sobre el animal y no se interrumpen aunque se lo mantenga a temperaturas inferiores a -20°C . Por otro lado se requiere un instrumental de la mejor calidad para poder realizar comparaciones con los métodos industriales generalmente deficientes.

E) La experiencia de todos los centros visitados en lo que respecta a colaboración con la industria es muy variada pero no parece muy eficaz, limitándose a establecer modelos que puedan servir de pauta a las empresas privadas para mejorar la calidad de sus productos. En qué grado estos modelos son aceptados depende de varios factores difícilmente determinables, sin embargo, la experiencia de TORRY RESEARCH STATION con su intento de formar un GRUPO DE DISCUSION con miembros de la industria británica es aleccionadora.

F) La tendencia de todas las instituciones que he visitado es una evolución hacia la investigación básica, preocupándose menos por problemas tecnológicos que unicamente son examinados cuando son requeridos por algún organismo privado o público en particular.

Barcelona, 20 de mayo de 1.968

A. Cruzado

El siguiente informe es copia de uno presentado a TORRY RESEARCH STATION y por lo tanto de difusión restringida.

Not for publication

T.R.S. Record Paper No 68/30

EFFECT OF SOME THIOCOMPOUNDS ON EXTRACTABILITY OF PROTEINS

IN FISH MUSCLE

by A. Cruzado

Introduction

Previous work carried out by Connell (unpublished) at Torry Research Station on the action of some organic SH-containing compounds in reducing the rate of development of inextractability of myofibrillar proteins during frozen storage of cod was considered to be worth repeating and extending to other similar compounds, studying at the same time changes in other properties such as ATP-ase activity and sedimentation pattern of the proteins in the ultracentrifuge.

Materials and methods

The fish used was cod (*Gadus morhua*) landed in Aberdeen by local trawlers; it had been kept in ice for not more than 3 or 4 days.

The thiocompounds assayed are listed below (Table I) together with the concentrations employed.

Table I

<u>Compound</u>	<u>Conc.&</u>	<u>Compound</u>	<u>Conc.&</u>
Monothioglycol	10 ⁻¹ M	Sodium thioglycollate	10 ⁻¹ M
"	10 ⁻² M	Thioglycollic acid	10 ⁻² M
"	10 ⁻³ M	" "	10 ⁻³ M
Dithioglycol	10 ⁻¹ M	L-Cysteine	10 ⁻¹ M
"	10 ⁻² M	"	10 ⁻² M
"	10 ⁻³ M	"	10 ⁻³ M
Monothioglycerol	10 ⁻¹ M	Glutathione	10 ⁻¹ M
"	10 ⁻² M	"	10 ⁻² M
"	10 ⁻³ M	"	10 ⁻³ M
Dithioglycerol	10 ⁻¹ M	Dithidreitol	10 ⁻¹ M
"	10 ⁻² M	"	10 ⁻² M
"	10 ⁻³ M	"	10 ⁻³ M

& These concentrations are in moles/1000 g muscle, the compounds being dissolved in or mixed with water in the proportion 1 ml of water to 15 g of muscle.

The fish were filleted and minced in a Moulinez mincer and small samples mixed with the thiocompounds solutions, wrapped in aluminium foil, frozen in a horizontal plate freezer and stored at three different temperatures: -7°C, -14°C and -22°C. Samples of approximately 1 g were removed at intervals and thawed during the few minutes necessary to prepare them for the determinations.

The protein extractability was determined on these samples by following the method of Cowie and Mackie (in press) using an Ultra-Turrax blender for 30 seconds, a ratio of muscle to extractant 1:90&& and centrifuging at 18.000 x g for 30 minutes. The extracting solution was 5% sodium chloride in 0.05 μ phosphate buffer

&& In some cases this ratio was increased to 1:10 when preparing extracts for examination in the ultracentrifuge.

at pH 7.5. All the material and solutions employed were precooled at 0°C and kept at this temperature both during extraction and centrifugation. Extractable protein in the supernatant was determined by precipitating 10 ml aliquots with 10 ml of trichloroacetic acid solution (20%) and centrifuging at 3,000 rpm. The nitrogen content of the precipitated protein as well as that from the residue were then determined by digestion and microkjeldahl distillation. Duplicate extractability determinations on each sample in the early stages of the experiment were carried out but these agreed so closely and so many samples had to be analysed that in the majority of cases only single extractability determinations were done.

An ultracentrifuge Spinco model E with Schlieren optics was used at 59,780 rpm in order to obtain detailed sedimentation patterns of the soluble proteins, and at 42,040 rpm in order to measure accurately the area under the peaks in the sedimentation pattern. For the latter purpose the solutions were run in a double sector cell, with solvent in one sector to provide a base-line; photographs were taken usually 5 minutes after reaching full speed.

An MSE-40 preparative ultracentrifuge was used to fractionate the proteins in "true solution" from those in "gel-like" form at 80,000 x g.

The ATP-ase activity was determined by following the method of Perry as modified by Connell (J. Sci. Fd. Agric. 11, 245, 1960).

Results

(a) Protein extractability

As shown in Fig 1, for the control sample containing water but no sulphydryl reagent, the decline in extractability follows a roughly exponential course (the results at 21 days appear to be aberrant). This behaviour was obtained with all the samples, treated with sulphydryl reagents or not. However, in order to compare the different treatments more easily it was decided to consider only the behaviour over the first 30 days or so, in which case the decline in extractability values with time is nearly linear, thus allowing linear regressions to be calculated. The effect of concentration, temperature and time of storage for both treated and untreated samples is given in Table II in the form of linear regression coefficients together with the coefficient of multiple correlation (R²) explained by the equation:

$$\% EP = A - B \cdot t \text{ (Days)}$$

Table II

<u>Compound</u>	<u>Conc.</u>	<u>N^o</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>R²</u>
Control	-	6	73.04	-1.871	75.14
Monothioglycol	10 ⁻¹	4	85.0 ^o	-0.56 ^o	
"	10 ⁻²	5	83.52	-0.200	82.22
"	10 ⁻³	5	83.89	-1.152	90.40
Monothioglycerol	10 ⁻¹	4	82.58	-0.065	15.25
"	10 ⁻²	4	85.46	-0.395	92.74
"	10 ⁻³	4	86.86	-1.393	99.88
Dithioglycol	10 ⁻¹	3	82.02	-0.977	82.04
"	10 ⁻²	5	88.25	-0.539	97.53
"	10 ⁻³	3	75.0 ^o	-1.50 ^o	
Dithioglycerol	10 ⁻¹	5	70.17	-1.745	68.00
"	10 ⁻²	5	87.19	-0.559	98.87
"	10 ⁻³	5	74.73	-1.538	81.27
Sodium thioglycollate	10 ⁻¹	3	86.49	-0.742	98.23
Thioglycollic acid	10 ⁻²	4	78.38	-1.635	91.18
"	10 ⁻³	4	80.11	-1.458	94.32
l-Cysteine	10 ⁻¹	4	86.08	-0.295	98.57
"	10 ⁻²	3	87.78	-1.244	97.72
"	10 ⁻³	5	76.36	-2.435	77.70

Table II (cont'd)

<u>Compound</u>	<u>Conc.</u>	<u>N</u> &	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>R²</u>
Glutathione	5×10^{-2}	3	79.39	-1.605	85.62
"	10^{-2}	3	86.35	-2.893	99.57
"	10^{-3}	5	74.55	-2.702	83.65

& N is the number of determinations
 c estimated

The delay in getting the Dithiothreitol did not allow determinations going beyond 21 days of storage. Different concentrations of this compound gave very similar results, pooling which explains nearly 100% of the variation, B being -1.262.

The values given in Table II are for -7°C. The results at -14°C are similar except that the rates of decline in extractability are smaller, i.e. the values of B in the above equation are less negative.

Except for the Monothioglycerol 10^{-1} M all the lines explain quite well the variation of protein extractability. As can be seen by the B's the compounds having the greatest positive effect are Monothioglycerol, Monothioglycol and l-Cysteine with values of -0.065, -0.200 and -0.295 versus a value of B = -1.871 for the control. Glutathione has the greatest negative effect with B = -2.893 at 10^{-2} M.

The influence of concentration varies with each compound: with Monothioglycol, Dithioglycol and Dithioglycerol 10^{-2} M has maximum effect, whereas with Monothioglycerol and l-Cysteine 10^{-1} M protects most of the proteins against inextractability development. As noted above no influence of concentration appears in the case of Dithiothreitol at least in the concentration range employed.

(b) ATP-ase activity

Table III shows the results obtained after 3 months storage compared with freshly frozen fish.

Table III

<u>Compound</u>	<u>Temp. of storage</u>	<u>ATP-ase activity (mM P/g muscle/min)</u>
Control (freshly frozen)		15.8
Control	-14	8.5
Control	-22	15.0 (14.8-15.2)
Monothioglycol 10^{-2} M	-14	14.9
Monothioglycerol 10^{-1} M	-14	10.5
Dithioglycol 10^{-2} M	-14	8.9
Dithioglycerol 10^{-2} M	-14	17.3 (17.9-16.8)
Sodium thioglycollate 10^{-1} M	-14	8.3
l-Cysteine 10^{-1} M	-14	20.0 (20.8-19.2)

Samples prepared with Monothioglycol, Dithioglycerol and l-Cysteine retain high activities whereas the activity of the sample prepared with Monothioglycerol shows a fall on storage though this fall is less than shown by the control under the same conditions; there is no significant difference between samples prepared with Dithioglycol, Sodium thioglycollate and the control.

(c) Ultracentrifuge

Several of the extracts prepared by centrifuging at $18,000 \times g$ were examined in the ultracentrifuge, and the concentration of protein forming visible components was calculated from area measurements. At the same time the concentra-

tion of total protein in the same extracts was determined by means of the Kjeldahl method. A comparison between the concentrations of protein in the extracts determined by the two methods, together with the percentage of protein extracted (from Kjeldahl measurements) calculated in usual way, is shown in Table IV.

Table IV

<u>Days stored</u>	<u>Temp. of storage</u>	<u>Compound added</u>	<u>Conc. (M)</u>	<u>Protein conc. (g/100 ml)</u>		<u>Difference</u>		<u>% Extractability</u>
				<u>Kjeldahl</u>	<u>Area</u>	<u>g/100 ml</u>	<u>%</u>	
22	-7	Control	-	0.160	0.135	0.025	15.6	29
22	-7	Dithioglycerol	10 ⁻¹	0.269	0.217	0.052	19.3	31
22	-7	l-Cysteine	10 ⁻³	0.160	0.182	-0.022	-13.8	16
22	-7	Glutathione	10 ⁻³	0.126	0.141	-0.015	-11.9	13
31	-7	Control	-	0.249	0.272	-0.023	-9.2	16
31	-14	Control	-	0.612	0.512	0.100	16.3	42
39	-7	Thioglycollic acid	10 ⁻²	0.176	0.289	-0.113	-64.2	21
39	-7	Dithioglycerol	10 ⁻³	0.210	0.198	0.012	5.7	22
48	-7	Monothioglycol	10 ⁻³	0.047	0.048	-0.001	-2.1	29
48	-7	Monothioglycol	10 ⁻²	0.106	0.079	0.027	25.5	66
48	-14	Monothioglycol	10 ⁻¹	0.810	0.466	0.344	42.5	74
59	-7	Control	-	0.023	0.031	-0.008	-34.8	14
59	-7	l-Cysteine	10 ⁻¹	0.114	0.061	0.053	46.5	69
76	-7	Monothioglycol	10 ⁻²	0.103	0.048	0.055	53.4	59
76	-7	Monothioglycerol	10 ⁻¹	0.091	0.034	0.057	62.7	53
76	-7	Dithioglycol	10 ⁻²	0.061	0.034	0.027	44.3	45
76	-7	Dithioglycerol	10 ⁻²	0.071	0.062	0.009	12.7	44

As the ratios of muscle to extractant were not the same for different samples, these results for protein concentration cannot be directly compared. Plotting the percentage difference between Kjeldahl and area against percentage extractability shows a positive correlation coefficient $r = 0.791$ (Fig 2). That is to say, samples with higher extractability have higher amounts of "gel-like" protein not sedimented at $18.000 \times g$ but readily removed in the ultracentrifuge without forming a discrete measurable peak.

After three months at $-14^{\circ}C$ the control, with an extractability below 20% showed at 59.780 rpm one single slowly moving peak which was identified with sarcoplasmic proteins. No change appeared in treating this sample with ATP in presence of Mg^{++} .

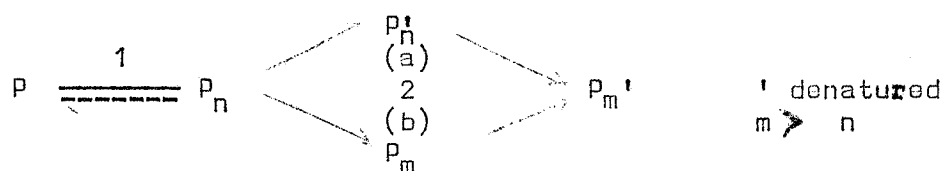
Extracts of samples containing sulphhydryl compounds showed two slow peaks identified with sarcoplasmic proteins and "myosin" respectively. When ATP was added to these extracts an increase occurred in the "myosin" peak together with the appearance at least in some instances of a small, fast moving peak.

The samples referred to in the two previous paragraphs had been previously centrifuged at $80.000 \times g$ so that most of the "gel like" material had sedimented out.

Discussion

It is obvious that some of the thiocompounds essayed prevent to some extent the insolubilization of the myofibrillar proteins. Whether or not denaturation is prevented is not so clear but ATP-ase activity measurements, though not altogether conclusive, suggest this to be the case.

A simple scheme for the processes taking place in the muscle myofibrils during frozen storage is



in which P symbolizes the soluble monomeric myofibrillar proteins, P_n an early stage of polymerised (gel-like), but still extractable (i.e. dispersed and not sedimentable at $18.000 \times g$) proteins and P_m' the inextractable, denatured proteins.

Process 1 involving the change from soluble myofibrillar protein to insoluble but dispersible protein does not seem to be affected by the thiocompounds since the "gel-like" material appears in the treated samples in the same way as in the control with high extractabilities. (This process could be partially reversed by lowering the concentration of protein or by adding ATP).

Process 2 can follow two different pathways: one involving denaturation prior to aggregation (a), and in the other aggregation would precede denaturation (b). There is no evidence to distinguish between these two pathways but the fact that some completely inextractable muscle retains some ATP-ase activity suggests 2b is important. In either case the thiocompounds appear to partially inhibit one of the two processes: $P_n \rightarrow P_m$ or $P_n' \rightarrow P_m'$, the first one being that most likely affected.

However, the present work does not fully explain the role of the "gel-like" material although it has been shown to be of fundamental interest and worthy of further investigation. For example, if the polydisperse particles making up the "gel-like" fraction are substantially different in extracts of

frozen fish after long storage from those found in extracts of fresh fish a revision of the methods for measurement of extractable protein is indicated, high speed centrifugation and low ratio of muscle to extractant being necessary to reduce variability caused by the formation of "gel-like" material.

Extracts made with cod fillets after 2 months of storage at -22°C or after 5 years at -29°C showed a difference of 20% in the protein concentration in the supernatant when centrifuged at $1.000 \times g$ or $30.000 \times g$. Further work should be done on this subject to ascertain whether process 1 is reversible or not, what is the ATP-ase activity of the gel and what is the nature of the material released by treating the gel with ATP.

It is suggested that if the thio compounds suppress to some extent crosslinking of the myosin molecules through the ATP-ase active sites but do not prevent the aggregation of the myofibrillar protein via Process 1, then treatment of the gel with ATP should give myosin or G-actomyosin (depending on which type of bonds are split by ATP: actin-myosin or actin-actin) plus paucimers of myosin or G-actomyosin. The occurrence of these paucimers would account for the small, fast moving peak found in the ultracentrifuge pictures when the samples were treated with ATP.

= = = = =

El siguiente informe sobre el trabajo realizado en el FISHERIES RESEARCH BOARD OF CANADA, TECHNOLOGICAL STATION (Halifax, Nova Scotia) conteniendo datos y conclusiones no definitivos debe ser de difusión limitada al INSTITUTO DE INVESTIGACIONES PESQUERAS.

EFFECTO DE LA RECONGELACION SOBRE LA FORMACION DE ACIDOS

GRASOS LIBRES

por A. Cruzado

Introducción

Trabajos previos realizados en el F.R.B. sobre el efecto de descongelar y recongelar bacalao procedente de las pescas de cerco de Terranova en la calidad y en la capacidad de conservación muestran un aumento en la velocidad de formación de ácidos grasos libres (AGL) en los dos meses posteriores al tratamiento con respecto a muestras de control conservadas constantemente a -18°C y lo mismo ocurre a la velocidad con que disminuye el nitrógeno proteico extractable (NPE).

Material y métodos

Con objeto de examinar con más detalle estos cambios se planeó un experimento en el que muestras de bacalao congelado en forma de filetes, procedentes de una firma comercial y que no tenían más de dos meses de almacenamiento a -22°C se dividieron en cuatro lotes según el esquema:

- a) Muestras control almacenadas a -10°C
- b) Muestras control almacenadas a -18°C
- c) Muestras descongeladas y recongeladas almacenadas a -10°C
- d) Muestras descongeladas y recongeladas almacenadas a -18°C

La descongelación se realizó en agua corriente cuya temperatura se mantuvo a 10°C y la recongelación de los filetes en un congelador de placas horizontales a -35°C .

Periodicamente se tomaron muestras y se realizaron determinaciones de NPE, AGL, lípidos totales (LT), pH, líquido liberado en la cocción (LLC) y pH de este líquido. El NPE fué medido siguiendo el método de Dyer et al, los

LT se determinaron de acuerdo con Bligh y Dyer y los AGL según el método descrito por Bligh et al asumiendo un peso molecular medio de 300.

Resultados y conclusiones

Los datos obtenidos son inciertos y no muestran diferencias significativas en la variación de NPE y de AGL con el tiempo de almacenamiento entre las muestras recongeladas y los controles, sin embargo, sí existe, independientemente del tratamiento recibido, una correlación bastante significativa entre el NPE y el pH del músculo y también entre el NPE y los AGL de las muestras mantenidas a -10°C aunque no de las que se mantuvieron a -18°C, como indican los respectivos coeficientes de correlación dados en la Tabla I junto con los coeficientes de regresión entre NPE y pH.

Tabla I

NPE/pH	-10°C	r = 0,566	N = 26	a = -5,915	b = 1,098
NPE/pH	-18°C	r = 0,497	N = 16	a = -4,652	b = 0,924
NPE/AGL	-10°C	r = -0,616	N = 26		
NPE/AGL	-18°C	r = -0,013	N = 16		

Aunque pocas conclusiones pueden entresacarse de estos resultados, algo parece evidente y es la influencia del pH del músculo sobre la extractabilidad de las proteínas, lo que no hace sino confirmar resultados hallados anteriormente por otros investigadores. Asimismo parece que el haber estado almacenado a distintas temperaturas no ha afectado para nada la dependencia del NPE con el pH como muestran las pequeñas diferencias en los coeficientes de regresión.

En cuanto a la correlación entre NPE y AGL tan significativa en las muestras conservadas a -10°C y prácticamente inexistente en las que se mantuvieron a -18°C indica una estrecha dependencia entre estas dos variables, así como una fuerte influencia de la temperatura de almacenamiento en su evolución a lo largo del tiempo. Por otro lado la variabilidad presentada por las muestras conservadas a -18°C da idea de la dispersión de valores presentada por todo el lote de pescado y que ha enmascarado las diferencias debidas al tratamiento.

En lo que respecta a las otras variables determinadas, no ha sido posible encontrar ninguna clase de relación con el pH, NPE, AGL o entre sí.

=====

Barcelona, mayo de 1.968

A. Cruzado