

Estudio de la Tiaminasa en peces marinos venezolanos, en especial la sardina

MANFREDO GROSS DAUM Y WERNER G. JAFFÉ
Instituto Nacional de Nutrición

En el curso de un trabajo analítico en los peces venezolanos se encontró un contenido muy bajo de tiamina en sardinas frescas, que contrastaba marcadamente con valores altos en sardinas enlatadas. Tratamos de explicar este hecho por la presencia de una tiaminasa, fermento descrito en carpa y mariscos y el cual destruye específicamente la tiamina.

Aunque la literatura sobre tiaminasa es bastante abundante (1, 2, 3, 4) y ese factor ha sido encontrado en muchos peces de agua dulce, mariscos, helechos y bacterias, en muy pocos casos ha sido observada en peces marinos.

En vista del interés nutricional e industrial de algunas de estas especies, se ha efectuado un estudio más detallado del problema.

MATERIAL Y METODOS

Las muestras a analizarse fueron adquiridas en uno de los mercados públicos de Caracas. Para la determinación de la tiaminasa se usó el método fluorométrico (5); las lecturas se realizaron en un fluorómetro Coleman N^o 14, y las determinaciones de pH en un potenciómetro Beckman modelo H-2, usando electrodos de Calomel y vidrio.

Para la preparación de las muestras se desecharon la cabeza, cola, aletas y espinas del pescado. En la mayoría de los casos se separaron los órganos para un análisis aparte; las muestras de musculatura eran homogeneizadas con agua destilada en la proporción 1 a 1 en un homogeneizador tipo Warring, y los órganos con la misma cantidad de agua en un homogeneizador tipo Elvehjem Potter.

Se tomaron 3 alícuotas del homogeneizado, con las cuales se realizaron los siguientes experimentos:

- 1º Determinación del contenido de tiamina en la muestra.
- 2º Adición de 1 mg. de tiamina por 100 cc., autoclavización inmediata y determinación de esta vitamina.
- 3º Adición de la misma cantidad de tiamina, incubación a 37°C. por 24 horas, autoclavización y determinación de la vitamina.

Los valores obtenidos se presentan en la Tabla 1.

Camiguana y sardina eran las únicas muestras con una actividad apreciable de tiaminasa. En los experimentos siguientes se ha trabajado siempre con homogeneizados o extractos de musculatura de sardinas.

Se han descrito factores destructores de la tiamina termolabiles (6). Por esta razón se estudió el efecto de la acción del calor del autoclave a 15 lb. de presión por 15 minutos sobre la destrucción de la tiamina por un homogeneizado de musculatura de sardinas. Con el resultado presentado en la tabla Nº 2 se ve que el fermento no resiste a esta temperatura.

Igualmente han sido descritos factores dializables con acción de tiaminasa (6). Para investigar este punto se dializaron 100 cc. de un homogeneizado de musculatura de sardinas frente a la misma cantidad de una solución de cloruro de sodio al 0,85% durante 48 horas a la temperatura de 37°, agregando tolueno como preservativo. Se notará de los datos de la tabla Nº 3 que la actividad no pasó a la solución dializadora, sino quedó íntegramente en el contenido del tubo de diálisis.

Se hicieron unos ensayos para encontrar el mejor método para la extracción del fermento en estudio y su obtención en solución. Se obtuvieron los mejores resultados homogeneizando a temperatura del laboratorio musculatura de sardinas en un aparato Elvehjem Potter por media hora con agua destilada, siendo el pH final de 6,5. Filtrando se obtuvo una solución clara con una actividad parecida a la del homogeneizado.

Con esta solución se determinó la influencia del pH sobre la actividad del fermento usando soluciones amortiguadoras según McIlvaine (7), incubando por 2 horas a 55°. Los resultados están representados en la gráfica Nº 1 y demuestran que el pH óptimo está entre 6 y 6,5.

En la tabla N° 4 están resumidos los resultados de ensayos sobre la influencia de algunas sustancias señaladas como activadores de la tiaminasa. Todas se usaron en la concentración de 0,001 molar a un pH de 6,3. Se observa que la anilina tenía el efecto más pronunciado de activar la acción del fermento.

En un último experimento se ha estudiado la velocidad de la reacción enzimática. Este ensayo se hizo con un homogeneizado de musculatura de sardinas que fué incubado a 37° por varios lapsos en presencia de tiamina. En la tabla N° 5 se observa que al cabo de una hora la destrucción era cerca del 34%, y a las 24 horas un 71% de tiamina había desaparecido.

DISCUSION

Entre las especies de pescados marinos estudiados por nosotros la sardina y la camiguana han resultado contener un factor destructor de la tiamina, que se considera como otro ejemplo de una tiaminasa ya descrita en otros pescados.

Los autores que se han ocupado de este factor lo han encontrado primeramente en carpas y otros pescados de agua dulce, mientras que raras veces su presencia ha sido confirmada en especies de pescados de agua del mar (1). Los estudios que se han realizado sobre el fermento se efectuaron en su gran mayoría con extractos de carpas o de almejas, mientras que no existen datos sobre los factores correspondientes provenientes de sardinas. Nuestros resultados demuestran que también en este caso se trata de un factor termolábil que puede ser extraído con solución de NaCl, que no es dializable y cuya acción tiene un máximo no muy pronunciado a un pH de alrededor de 6. En estas características se asemeja bastante a la tiaminasa descrita por Somogy (8). En otros aspectos, sin embargo, acusa diferencias marcadas. En todos los pescados estudiados al respecto, la mayor actividad se encontraba en las vísceras (corazón, hígado, intestinos, bazo), mientras que, según nuestras observaciones, en las sardinas la musculatura es tan activa como los órganos estudiados. Otra diferencia se encontró en la velocidad de la reacción enzimática. Somogy encuentra que la acción de tiaminasa del intestino de carpas cesa en menos de 1 minuto (8). Según los datos presentados en la tabla N° 5, esto no es el caso con la tiaminasa de sardinas. Después de 3 horas la reacción no

había terminado todavía bajo las condiciones experimentales usadas.

Varios autores han estudiado la influencia de activadores sobre la acción de la tiaminasa. En la tabla Nº 4 se presentan algunos resultados sobre el mismo problema. Se notará que la anilina tiene mayor efecto como activador, aunque es muy inferior en nuestro caso al que le atribuye Fujita, quien encuentra un índice de 120 con el extracto de almejas por él usado (9).

Es probable que los valores muy bajos de tiamina encontrados en algunas muestras de pescados (10), como también de harinas de pescado (11), se deben a la presencia de una tiaminasa. En los casos de una utilización industrial de pescados que contienen dicho fermento sería aconsejable su destrucción previa mediante un calentamiento corto para así evitar pérdidas de la vitamina B₁.

RESUMEN

1) Se analiza el contenido de tiaminasa en 15 especies de peces marinos venezolanos, uno de calamar y uno de langostino; solamente dos de ellos presentan actividad enzimática:

Clupanodon pseudohispanicus y *Anchoa lyolepis*.

2) El fermento es termolábil, no dializable.

3) Su pH óptimo está entre los límites de 6 y 6,5. Su acción es relativamente lenta.

4) Extractos de musculatura de sardinas eran tan activos como extractos de intestino, de hígado o de estómago.

5) La anilina activa la acción del fermento.

SUMMARY

Fifteen species of marine fishes, 1 squid and 1 crab were analyzed for factors which destroy thiamine. Only two samples: *Clupanodon pseudohispanicus* and *Anchoa lyolepis* were active.

The factor was thermolabile and non dializable. The pH optimum of its action was 6 - 6,5. The activity is rather slow, in 24 hours not all the thiamine had been destroyed. Extracts from muscle, liver, stomach, and intestine were equally active. Aniline enhanced the activity considerably.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden 15 Muster von Meeresfischen, eines Polypen und eines einer Krabbenart auf Thiamin-zerstörende Faktoren untersucht. Nur 2 Fischmuster, nämlich *Clupanodon pseudo-hispanicus* und *Anchoa lyolepis* waren aktiv. Der Faktor ist hitzeunbeständig und nicht dialisierbar. Sein pH Optimum liegt zwischen 6 und 6.5, seine Wirkungsweise ist langsam. Muskelfleisch, Leber, Magen und Eingeweide der Sardinene waren gleich wirksam. Anilin aktiviert seine Wirkung.

TABLA N° 1

Nombre vulgar	Nombre científico *	Organos	Tiamina 0 h. mgs./100 g.	Tiamina 24 h. mgs./100 g.	% de destrucción
Carite	<i>Scomberomorus maculatus</i>	Músculo	1,150	1,140	0,87
Pargo	<i>Lutjanus</i> sp.	Músculo	1,074	1,074	0,00
Mero	<i>Epinephelus</i> sp.	Músculo	1,135	1,120	1,11
Cazón, tiburón	<i>Mustelus canis</i> (?)	Músculo	1,060	1,050	0,94
Lenguado	<i>Citharichthys</i> sp.	Músculo	1,080	1,070	0,93
Lenguado	"	Intestino	1,124	1,078	4,09
Mojara	<i>Diapterus evermanni</i>	Músculo	1,100	1,100	0,00
Mojara	"	Intestino	1,078	1,050	2,59
Loro	<i>Sparisoma squalidum</i>	Músculo	1,038	1,000	3,80
Perla de mar	<i>Lepophidium brevibarbe</i>	Músculo	1,187	1,150	2,27
Perla de mar	"	Intestino	1,074	1,074	0,00
Cachicato	<i>Haemulon sciurus</i>	Músculo	1,060	1,087	0,00
Pámpano	<i>Chaetodipterus faber</i>	Músculo	1,148	1,125	2,00
Pámpano	"	Intestino	1,074	1,054	1,86
Pámpano	"	Hígado	1,050	1,050	0,00
Calamar	<i>Loligo</i> sp.	Todo el animal	1,050	1,087	0,00
Langostino	<i>Penaeus schmitti</i>	Todo el animal	1,073	1,025	4,47
Merluza	<i>Macrodon ancylodon</i>	Músculo	1,175	1,150	2,13
Merluza	"	Intestino	1,000	0,950	5,00
Trucha del mar	<i>Diplectrum radiale</i>	Músculo	0,996	1,012	0,00
Trucha del mar	"	Intestino	0,950	0,900	5,27
Lamparozza	<i>Selene vomer</i>	Músculo	1,225	1,100	11,36
Lamparozza	"	Intestino	1,000	0,975	2,50
Camiguana	<i>Anchoa lyolepis</i>	Músculo	0,975	0,200	79,49
Sardina	<i>Clupanodon pseudohispanicus</i>	Músculo	1,050	0,200	80,95
Sardina	"	Corazón	1,000	0,200	80,00
Sardina	"	Estómago	1,050	0,350	66,66
Sardina	"	Hígado	1,000	0,200	80,00
Sardina	"	Intestino	0,950	0,200	78,95

* Se agradece al Lic. F. Wribezahn, Escuela de Biología de la Universidad Central de Caracas, por la clasificación de los especímenes.

TABLA N° 2

EFECTO DE LA AUTOCLAVIZACION SOBRE LA DESTRUCCION DE LA TIAMINA POR EXTRACTOS DE SARDINAS

	mgs. de tiamina /100 gr. 0 h.	mgs. de tiamina /100 gr. 24 h.	% de destrucción
Extracto de sardina, más 1 mg. de tiamina/100 gr. autoclavizado e incubado	1,187	1,187	0,00
Extracto de sardina, más 1 mg. de tiamina/100 gr. incubado y autoclavizado	1,187	0,200	83,2

TABLA N° 3

EFECTO DE LA DIALISIS SOBRE LA DESTRUCCION DE LA TIAMINA POR EXTRACTO DE SARDINA

	mgs. de tiamina por 100 gr. encontrado	% de destrucción
Contenido del tubo dializador, autoclavizado e incubado.	1,050	0,00
Contenido del tubo dializador, incubado y autoclavizado.	0,225	77,5
Solución dializada, autoclaviza- da e incubada.	0,975	0,00
Solución dializada, incubada y autoclavizada.	0,975	0,00

Siempre se agregó 1 mg. de tiamina/100 gr. después de la diálisis.

GRAFICO N° 1

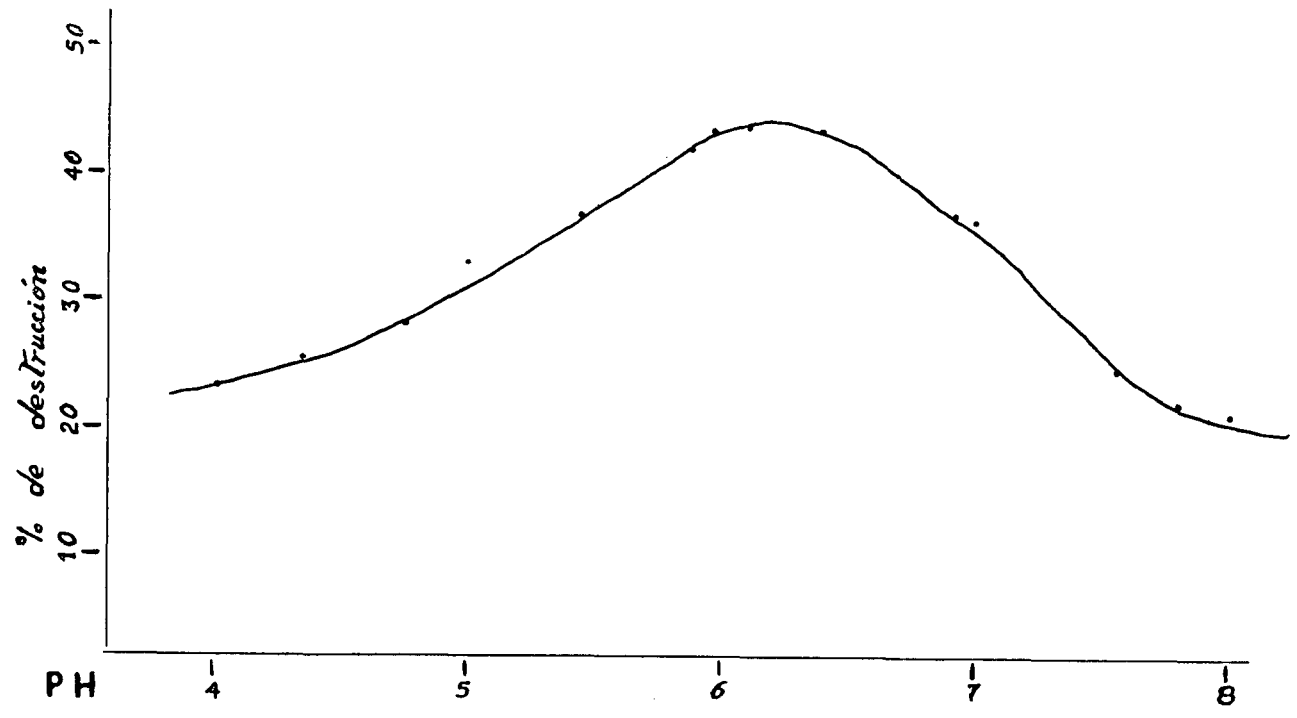


TABLA N° 4

EFECTO DE LOS ACTIVADORES EN LA ACCION ENZIMATICA

Nombre del activador	Indice de activación
Anilina	4,5
B-naftilamina	1,7
Tirosina	2,0
L-cisteína HCl	1,4
Glutation	1,4
Sin activador	1,0

TABLA N° 5

VELOCIDAD DE LA REACCION ENZIMATICA

Horas	mgs. de tiamina	% de destrucción
0	1,060	0
1	0,715	34
24	0,300	71

BIBLIOGRAFIA

- (1) R. S. Harris en *The Enzymes*, ed. por J. B. Sumner y K. Myrback. Academic Press, Inc. New York, 1951.
- (2) A. Fujita. — *Advances in Enzymology*, XV, 397, ed. por F. F. Nord. Interscience Publishers Inc. New York (1954).
- (3) J. C. Somogyi en *Ergebnisse der medizinischen Grundlagenforschung* ed. por K. Fr. Baner, Georg Thieme, Stuttgart, 1956.
- (4) A. Fujita en *Methods of Enzymology* ed. por S. P. Colowick y N. O. Kaplan. Academic Press Inc. New York, 1956.
- (5) *Method of Vitamin Assay* 2ª ed. pág. 111, ed. por The Association of Vitamin Chemist. Interscience Publishers Inc. New York (1951).
- (6) J. C. Somogyi y A. von Muralt. *Helvet. physiol. pharmacol. acta* 8 C, 56 (1949).
- (7) *Handboock of Chemistry and Physics* 32ª Ed. ed. por Charles D. Hodgman. Chemical Rubber Publishing Co. Cleveland (1950-1951).
- (8) J. C. Somogyi. *Internat. Zschr. Vitaminforsch.* 21, 341 (1949).
- (9) A. Fujita, Y. Nose, S. Kozuka, T. Tashiro, K. Weda, S. Sakamoto. *J. Biol. Chem.* 196, 289 (1952).
- (10) W. G. Jaffé y otros. — *Arch. Ven. Nutr.* Vol. VI, N° 2 (1955).
- (11) H. García M. y Digna Ballester C. — *Arch. Ven. Nutr.* 6, 17 (1956).