

EFECTO DE LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO SOBRE LA DEGRADACIÓN DE ATP Y SUS CATABOLITOS EN LA CACHAMA (*Cachama sp.*) CULTIVADA

Effect of Storage Temperature on the Freshness Index (K value) in Cultured Cachama (*Colossoma sp.*)

Elisabetta Tomé¹, Manuel Pérez² y Make Kodaira¹

Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Escuela de Biología, ¹Universidad Central de Venezuela. Calle Suapure, Lomas de Bello Monte, Caracas 1040-A, ² Envirotec, C.A. Calle Maracay, El Marqués, Quinta Renata. Caracas, Venezuela.
E-mail: etome@strix.ciens.ucv.ve

RESUMEN

En el pescado, inmediatamente después de su muerte y durante su transporte a los puntos de comercialización, se suceden una serie de procesos autolíticos en el músculo, entre los que destacan la hidrólisis de los nucleótidos. Con el propósito de evaluar la influencia que ejerce la temperatura de almacenamiento sobre la concentración de nucleótidos para estimar la frescura del pescado, tres lotes de híbridos de cachama (*Colossoma sp*) se almacenaron en las siguientes condiciones: a) 0°C ± 3°C; b) 10°C ± 3°C y c) 27°C ± 3°C, por dos semanas. Las concentraciones de los nucleótidos individuales a lo largo del almacenamiento se determinaron por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) según el método de Iwamoto y col.[9]. Los resultados indican que durante las primeras 24 horas las muestras almacenadas a 10°C presentaron la mayor tasa de hidrólisis del Adenosín Trifosfato (ATP), seguidas por las muestras almacenadas a 27°C y luego aquellas almacenadas a 0°C. Las concentraciones de Inosina Monofosfato (IMP), Inosina (HxR) e Hipoxantina (HX) fueron independientes de la temperatura de almacenamiento. El incremento lineal en la concentración de HX observado en las tres temperaturas durante el período de almacenamiento, indica que éste puede ser usado como un buen índice de la pérdida de la frescura en estos híbridos.

Palabras clave: Nucleótidos, frescura, cachama.

ABSTRACT

As soon as the fish dies and during its transportation to the retail centers, there are a series of autolytic processes in their tissues being the hydrolysis of the nucleotides the most important of them. These *postmortem* changes modify some of the original characteristics of the fish and determine its acceptance or rejection by the consumer. With the purpose of evaluating the influence that storage temperature exerts on the nucleotides concentration for estimating the freshness of fish, three lots of cachama's hybrids (*Colossoma sp*) were kept under the following conditions: a) 0°C ± 3°C; b) 10°C ± 3°C and c) 27°C ± 3°C, for two weeks at different temperatures. The concentrations of individual nucleotides through out the storage were performed using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) by Iwamoto *et al.* [9] method. Results indicate that during the first 24 hours the samples stored at 10°C had the highest rate of Adenosin Monophosphate (ATP) hydrolysis followed by samples stored at 27°C and this in turn was higher than the one observed at 0°C. Inosine monophosphate (IMP), Inosine (HxR) and hypoxanthine (HX) concentrations were independent of storage temperature. The lineal increment of the HX concentration observed at all temperatures during the storage period indicates that it can be used as a good index of the loss of the freshness in these hybrids.

Key words: Nucleotids, freshness, cachama.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de las especies del género *Colossoma* (*Colossoma macropomum* y *Colossoma bidens*), carácidos nati-

vos del río Orinoco de Venezuela, así como de las cuencas del Amazonas, ha sido impulsado por representar una fuente alternativa de proteína animal, relativamente económica, así como también por el manifiesto descenso de las estadísticas de producción pesquera de los ríos del país [13].

Los híbridos de cachama, producto del cruce de las hembras de la cachama negra o cherna (*Colossoma macropomum*) y machos de la cachama blanca o morocoto (*Piaractus brachypomus*), presentan características favorables para su cultivo tales como: resistencia a la manipulación, poca exigencia en cuanto a la calidad de agua; rápido crecimiento, buen tamaño; alimentación omnívora y aceptación de dietas elaboradas; técnicas de reproducción inducida; buena calidad de carne, y bajo precio al nivel de consumidor, lo cual la hace asequible a los sectores de menores ingresos [6, 7].

Sin embargo, no todo el pescado que se cosecha o pesca llega al consumidor, muchas veces se pierde buena parte de la pesca por carecerse de vías de comercialización adecuadas o de cadenas de conservación eficientes que permitan mantener las condiciones de frescura y calidad demandadas por los consumidores [1].

En el pescado, inmediatamente después de la muerte y durante su traslado a los centros de expendio, se suceden una serie de reacciones autolíticas en el músculo, que determinan la acumulación o desaparición de compuestos que inciden sobre la calidad del pescado, por modificar las características organolépticas originales del pescado. Entre estos cambios se ven principalmente involucrados los nucleótidos.

Con relación a este dicho, se ha observado que los cambios autolíticos que modifican a los nucleótidos, se suceden con rapidez desde el mismo inicio del período *post mortem* o antes y continúan a lo largo del almacenamiento. La velocidad con que se presentan tales procesos autolíticos depende de la especie del pescado, así como también, de las condiciones fisiológicas y de vida dentro de una misma especie [14]. Es conocido que la temperatura es una de las variables que afecta de manera importante estos procesos durante el almacenamiento del pescado [4].

Entre las modificaciones que sufren los nucleótidos después que ocurre la muerte del pescado, se ha observado que la hidrólisis del Adenosín Trifosfato, ATP, al estado de Inosina Monofosfato, IMP ocurre rápidamente. La disminución en las concentraciones de ATP en el músculo de ciertas especies de pescado, trae como consecuencia el desarrollo del *rigor mortis* [8]. Por otra parte ha sido demostrado que la acumulación del IMP incide sobre el desarrollo de aromas y sabores agradables; este compuesto es ampliamente utilizado en Japón como un agente saborizante.

En cuanto al comportamiento de otros nucleótidos, se ha observado que la hidrólisis enzimática de IMP hasta ácido úrico, es lenta. La acumulación de algunos catabolitos intermedios de estas reacciones, como la hipoxantina, HX, e inosi-

na, HxR, son muy utilizados en pruebas que estiman la pérdida de frescura del pescado [12].

El objetivo del presente trabajo fue evaluar en híbridos de cachama cultivada, durante las dos primeras semanas de almacenamiento, el efecto de la temperatura sobre la tasa de degradación de nucleótidos, y con la finalidad de determinar la utilidad de la medición de las concentraciones de estos metabolitos como índice para establecer el tiempo de frescura de dicha especie. También es importante señalar que esta investigación obedece a la escasez de información que existe sobre los factores involucrados en el desarrollo de los cambios *post mortem* que ocurren en la cachama.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se evaluaron tres lotes de híbridos de cachama (*Colossoma sp.*), 36 ejemplares cada lote, con un peso corporal promedio de $398,31 \pm 64,85$ g y una longitud promedio $23,00 \pm 1,13$ cm, pescados con chinchorro y sacrificados mediante incisión cerebral, procedentes de la finca "Acuacampo" localizada en San Carlos, Edo. Cojedes, obtenidos en diferentes épocas del año. Cada lote se dividió en tres grupos de pescados, que se almacenaron en cavas a temperaturas reguladas de: $0 \pm 3^\circ\text{C}$, $10 \pm 3^\circ\text{C}$ y $27 \pm 3^\circ\text{C}$. Las temperaturas simulan condiciones de almacenamiento en hielo, refrigeración y ambiente a las que es sometido el pescado durante el transporte, almacenamiento y procesamiento, respectivamente. En esta forma los ejemplares fueron transportados al laboratorio de productos pesqueros del Instituto de Ciencias y Tecnología de Alimentos, Universidad Central de Venezuela.

A lo largo del período de almacenamiento (dos semanas), se tomaron muestras de músculo dorsal de tres individuos por cada temperatura de almacenamiento; cada dos horas durante el primer día y cada dos días por el período restante, para hacer determinaciones de concentración de ATP y compuestos relacionados.

Métodos

La concentración de Adenosín Trifosfato, ATP y los productos de su catabolización (Adenosín Difosfato, ADP; Adenosín Monofosfato, AMP; Inosina Monofosfato, IMP; Inosina, HxR; e Hipoxantina, HX), se determinaron de acuerdo al método propuesto por Iwamoto y col. [9] con las siguientes modificaciones: la extracción de los nucleótidos y compuestos relacionados, se realizó con 5 g de músculo dorsal, los cuales se homogeneizaron en frío con 15 mL de ácido perclórico al 10%, en un homogeneizador "Sorvall" OMNI-MIXER 17.105. El homogenato obtenido fue centrifugado a 4.000 r.p.m. durante 10 min., en una centrífuga Sorvall RCB-2 dotada de un rotor SS-34. Se separó el sobrenadante y se ajustó a un pH entre 6,0-7,0 con hidróxido de potasio al 50%. El precipitado formado por este procedimiento se separó centrifugando a 4.000

r.p.m. durante 10 min en una centrífuga con las características antes mencionadas. Por último, se tomó el sobrenadante y se aforó a 50 mL con agua destilada para determinar la concentración del ATP y sus compuestos relacionados.

La determinación de la concentración de nucleótidos, se realizó sobre una alícuota de 15 μ L, inyectada en un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) marca "Waters" compuesto por una bomba modelo 510, un detector UV-VIS (190-486 nm.) ajustado a 254 nm y 0,5 AUFS. La separación de las diferentes fracciones de los nucleótidos se realizó utilizando una columna Novapack C-18 (4 mm x 3.9 mm x 15 cm), empleándose como fase móvil buffer fosfato a una velocidad de flujo de 0,4 mL/min.

Como patrón se preparó un estándar múltiple a partir de ATP, ADP, AMP, IMP, HxR, HX de alta pureza (SIGMA Chem., Co) con concentraciones de 20 μ g/mL para ATP, ADP, AMP, IMP, HxR respectivamente y 8 μ g/mL para HX y, un volumen de inyección de 15 μ L. Para el cálculo de las concentraciones de los nucleótidos se procedió al análisis de las áreas de los cromatogramas de las muestras respecto a las áreas del patrón.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron tratados con el programa estadístico STATGRAPHICS 6,0 mediante el cual, se les realizó a los datos obtenidos para cada parámetro, análisis de varianza de uno y dos factores con repetición, con un nivel de significancia de 95 y 99%. Las gráficas utilizadas como figuras se trazaron y ajustaron con ayuda del programa MICROCALC ORIGIN 4,0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La hidrólisis del ATP es uno de los primeros signos de los cambios *postmortem*; su ausencia conduce a la rigidez e inextensibilidad de los músculos del pescado debido específicamente a la imposibilidad de los puentes cruzados de los filamentos de miosina de desunirse de los filamentos de actina.

En la FIG. 1 (A, B, C) se puede apreciar que en las tres temperaturas de almacenamiento estudiadas, la mayor tasa de hidrólisis ocurrió durante las primeras 24 h. En los ejemplares de híbridos de cachama almacenados a 0, 10 y 27°C, se observó a partir de las 4h, 2h y 8h de almacenamiento, respectivamente, una disminución en las concentraciones de ATP muscular. Luego de este período, el proceso autolítico se muestra acelerado a medida que disminuye la temperatura de almacenamiento donde a 10°C hay una rápida hidrólisis de ATP, FIG. 1B, mientras que a 27°C la tasa de hidrólisis es mas lenta, FIG. 1A. De acuerdo con Darmordaran y Gopakumar [3], al disminuir la temperatura de almacenamiento por debajo de 15°C, la actividad de la bomba de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático se encuentra disminuida, lo que ocasiona la presencia de altas concentraciones de Ca^{2+} en las miofibrillas que activan la ATPasa miofibrilar, motivando un acelerado consumo de ATP.

En las TABLAS I, II y III, se muestran la influencia de la temperatura de almacenamiento sobre la tasa de acumulación e hidrólisis de IMP, HxR e HX en el músculo dorsal de híbridos de cachama durante su almacenamiento a 0, 10 y 27°C, respectivamente. Se puede observar que, independientemente de la temperatura de almacenamiento, se lleva a cabo un comportamiento similar en cuanto a las variaciones de las concentraciones de IMP, HxR e Hx. No obstante, la velocidad con la que se presentan estos cambios mostró diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$), que dependen de la temperatura de almacenamiento.

Durante el inicio del almacenamiento se presenta una etapa caracterizada por el incremento en la concentración de IMP, este período es muy breve en los ejemplares almacenados a 27°C, durando alrededor de 4 h, mientras que en los ejemplares almacenados a 0°C y a 10°C este período se extiende hasta 24 h. Luego de esta fase se establece otra etapa, caracterizada por la disminución progresiva de la concentración del IMP muscular.

Ha sido bien establecido que en el músculo del pescado la hidrólisis de los nucleótidos de adenina hasta el estado de IMP ocurre rápidamente. Según Okuma y col. [10], los nucleótidos de adenina desaparecen del músculo del pescado luego de 24 h de almacenamiento. Esta desaparición es consecuencia de la desaminación y desfosforilación parcial del ATP [2]. De esta forma el IMP tiende a acumularse seguido por la HxR. Cuando los niveles de IMP e HxR comienzan a disminuir el contenido de HX aumenta [8].

Sin embargo, en los híbridos de cachama si bien se observa un incremento en los niveles de HX a expensas de la desaparición de IMP, no ocurre lo mismo con los niveles de HxR, los cuales, por el contrario, tienden a incrementarse a medida que aumenta la concentración de IMP.

Luego de cierto período característico para cada temperatura de almacenamiento se comienza a percibir la disminución en los valores de HxR, lo cual tiene un efecto aditivo sobre el incremento de la concentración de HX. Rayder y col. [11], observaron en el Hoki (*Macruronus noevazelandae*), un comportamiento similar al exhibido por los híbridos de cachama, la falta de correspondencia entre la disminución de concentración muscular de IMP y el aumento en la concentración de HxR se debe a que la velocidad de hidrólisis de HxR a HX es mayor que la velocidad de hidrólisis de IMP a HxR.

En cuanto a la influencia de la temperatura de almacenamiento sobre la tasa de hidrólisis y de acumulación de IMP, HxR e HX se puede deducir, que la velocidad con la que ocurren las variaciones de la concentración de estas moléculas en el músculo del híbrido de cachama se va incrementando con la temperatura de almacenamiento, es decir, tanto la acumulación de HxR e Hx, como la hidrólisis de IMP, ocurre más rápido a 27°C que a 10°C y, ésta a su vez ocurre mas rápido que a 0°C.

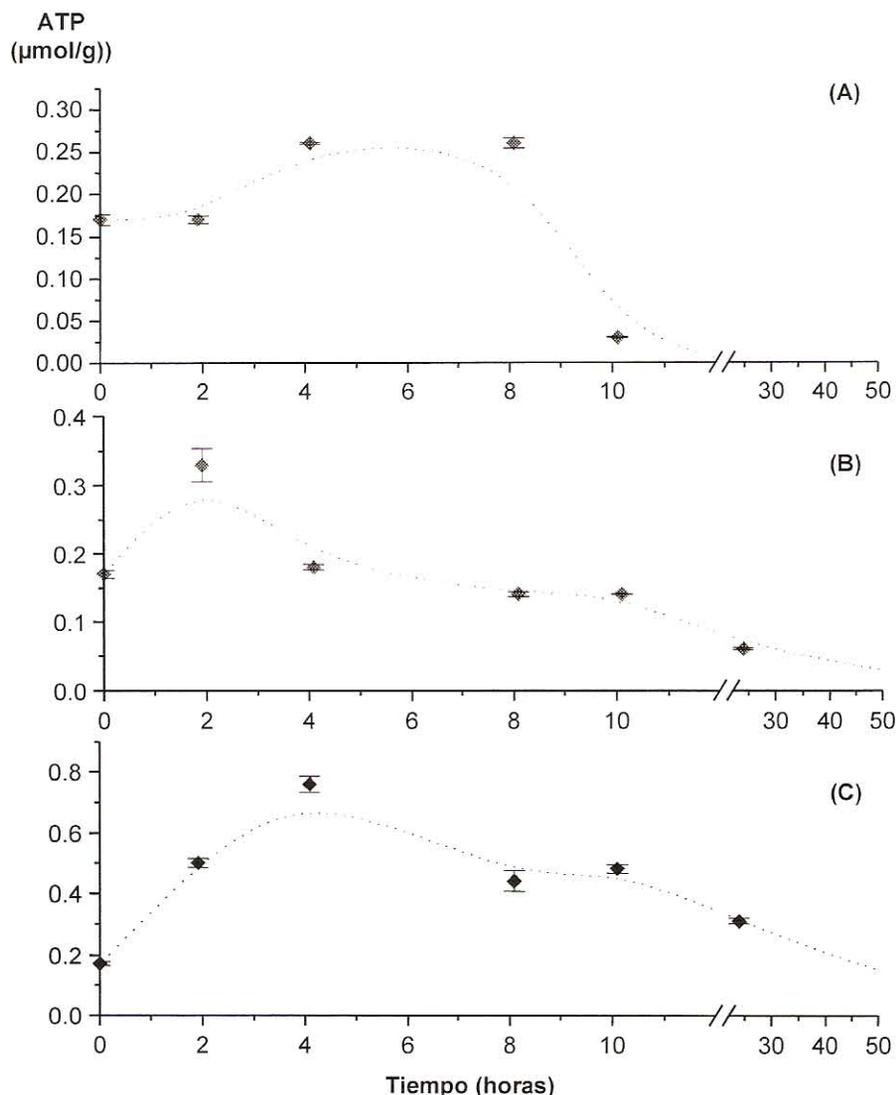


FIGURA 1. CONCENTRACIÓN DE ATP MUSCULAR EN HÍBRIDOS DE CACHAMA, DURANTE SU ALMACENAMIENTO A: (A) 27°C; (B) 10°C; (C) 0°C.

A pesar de que la velocidad de hidrólisis del ATP en el músculo de los híbridos de cachama aumenta a medida que disminuye la temperatura de almacenamiento a 10°C, encontrándose disminuida a 0°C, la tasa de hidrólisis del IMP disminuye continuamente a medida que disminuye la temperatura de almacenamiento. Según Tomioka y col. [15], disminución de la tasa de hidrólisis a bajas temperaturas, obedece a la disminución en la velocidad de desfosforilación del IMP, debido a la inhibición de la 5' nucleotidasa (una enzima que se encuentra unida a la membrana plasmática).

De igual manera ha sido observado que el crecimiento bacteriano es otro de los factores que provocan el incremento en la tasa de hidrólisis del IMP y la tasa de acumulación de la HX [5], por lo que sería razonable pensar que a 27°C, el rápido incremento en los niveles de HX en el músculo dorsal de híbridos de cachama y la rápida disminución en los niveles de IMP, pueden ser provocados en cierta medida por el activo creci-

miento de las bacterias mesófilas, que representan la flora bacteriana acompañante de esta especie de pescado.

Por otro lado, en la cachama híbrida, se observa que en las tres temperaturas de almacenamiento, los incrementos en las concentraciones de HX, son prácticamente lineales con respecto al período de almacenamiento ($r_{0^{\circ}\text{C}}=0,93$; $r_{10^{\circ}\text{C}}=0,977$; $r_{27^{\circ}\text{C}}=0,917$), lo que permite proponer la concentración de HX, como un estimador objetivo de la pérdida de frescura en esta especie.

CONCLUSIONES

El incremento en la concentración de HX a las tres temperaturas de almacenamiento, es una función lineal que depende del tiempo de almacenamiento, por lo que su determinación, en la cachama híbrida resultaría ser un estimador objetivo de la pérdida de la frescura.

TABLA I
CAMBIOS EN LA CONCENTRACIÓN DEL IMP EN
MÚSCULO DORSAL DE HÍBRIDOS DE CACHAMA,
DURANTE SU ALMACENAMIENTO A DIFERENTES
TEMPERATURAS (0°C, 10°C Y 27°C)

Tiempo (h)	[IMP] $\mu\text{mol/g}$ 0°C	[IMP] $\mu\text{mol/g}$ 10°C	[IMP] $\mu\text{mol/g}$ 27°C
0	3,57 ^a \pm 0,13	3,57 ^a \pm 0,13	3,57 ^a \pm 0,13
2	5,21 ^a \pm 0,60	3,66 ^b \pm 0,39	4,44 ^c \pm 0,44
4	4,88 ^a \pm 0,35	5,28 ^a \pm 0,55	3,51 ^b \pm 0,24
10	5,48 ^a \pm 0,48		2,95 ^b \pm 0,02
24	5,08 ^a \pm 0,35	5,50 ^b \pm 0,10	1,02 ^c \pm 0,48
48			0,23 \pm 0,05
72		0,96 ^b \pm 0,08	
120		0,29 ^b \pm 0,03	
144	3,05 ^a \pm 0,01	0,24 ^b \pm 0,01	
168		0,36 \pm 0,02	
288	2,97 ^a \pm 0,56	0,27 ^b \pm 0,02	
336	1,46 ^a \pm 0,06	0,25 ^b \pm 0,03	

TABLA II
CAMBIOS EN LA CONCENTRACIÓN DEL HxR EN
MÚSCULO DORSAL DE HÍBRIDOS DE CACHAMA,
DURANTE SU ALMACENAMIENTO A DIFERENTES
TEMPERATURAS (0°C, 10°C Y 27°C)

Tiempo (h)	[HxR] $\mu\text{mol/g}$ 0°C	[HxR] $\mu\text{mol/g}$ 10°C	[HxR] $\mu\text{mol/g}$ 27°C
0	2,63 ^a \pm 0,06	2,63 ^a \pm 0,06	2,63 ^a \pm 0,06
2	2,65 ^a \pm 0,05	3,08 ^b \pm 0,05	2,80 ^c \pm 0,04
4	2,63 ^a \pm 0,08	2,01 ^a \pm 0,07	3,61 ^b \pm 0,03
8	2,69 ^a \pm 0,08	2,34 ^{ab} \pm 0,30	1,78 ^b \pm 0,06
24	1,67 ^a \pm 0,04	2,19 ^b \pm 0,01	1,59 ^a \pm 0,08
48			0,36 \pm 0,01
72	0,46 ^a \pm 0,09	1,65 ^b \pm 0,09	
120	1,38 ^a \pm 0,05	1,58 ^a \pm 0,08	
168	1,47 ^a \pm 0,05	0,96 ^b \pm 0,08	
240	1,00 ^a \pm 0,01	0,75 ^a \pm 0,01	
288		0,00 \pm 0,00	
336	0,00 ^a \pm 0,00	0,00 ^a \pm 0,00	

TABLA III
CAMBIOS EN LA CONCENTRACIÓN DEL HX EN
MÚSCULO DORSAL DE HÍBRIDOS DE CACHAMA,
DURANTE SU ALMACENAMIENTO A DIFERENTES
TEMPERATURAS (0°C, 10°C Y 27°C)

Tiempo (h)	[HX] $\mu\text{mol/g}$ 0°C	[HX] $\mu\text{mol/g}$ 10°C	[HX] $\mu\text{mol/g}$ 27°C
0	0,15 ^a \pm 0,01	0,15 ^a \pm 0,01	0,15 ^a \pm 0,01
2	0,30 ^a \pm 0,03	1,21 ^b \pm 0,01	1,50 ^b \pm 0,05
4	0,89 ^a \pm 0,02	1,31 ^a \pm 0,12	4,19 ^b \pm 0,01
8	0,76 ^a \pm 0,03	1,42 ^b \pm 0,01	4,28 ^c \pm 0,03
10	0,71 \pm 0,03		
24	1,13 ^a \pm 0,01	1,92 ^a \pm 0,01	5,34 ^c \pm 0,19
48			9,09 \pm 0,14
72	1,89 ^a \pm 0,07	2,47 ^b \pm 0,01	
120	2,07 ^a \pm 0,20	4,08 ^b \pm 0,01	
168	2,24 ^a \pm 0,04	3,63 ^b \pm 0,01	
240	2,21 ^a \pm 0,02	7,05 ^b \pm 0,01	
336	5,13 ^a \pm 0,04	10,16 ^b \pm 0,01	

AGRADECIMIENTO

Los autores desean agradecer a los propietarios de la finca Acuacampo por el suministro de las muestras, así como al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela (CDCH) por el financiamiento de esta investigación a través del proyecto N° 03.320032.93.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BERTULLO, E. El pescado en la nutrición. En: **Curso regional sobre Tecnología de productos pesqueros**. FAO/DANIDA. Caracas. 1990.
- [2] BEUCHAT, L.R. Hipoxantyne measurement in assessing freshness of chilled channel catfish. **J. Agric. Food Chem.** 21:453. 1973.
- [3] DARMODARAN, D.; GOPAKUMAR, K. Cold shock reactions in tropical fishes. **J. Food Sci. Technol.** 25:89. 1988.
- [4] FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. El Pescado Fresco: su calidad y cambios de su calidad. **FAO Fish. Tech. Pap.** 348. 202 pp. 1998.
- [5] FLETCHER, G.; STATHAM, J. Shelf-life of sterile yellow-eyed mullet (*Aldrichetta forsteri*) at 4°C. **J. Food Sci.** 53(4):1030. 1988.
- [6] HURTADO, N. Sugerencias para la comercialización de la cachama cultivada en la represa El Pao en las pola-

- ciones del estado Cojedes. **Informe** presentado ante Corpocentro. 1988.
- [7] HURTADO, N. **Documento preventivo N° 001**, Aquacampo. San Carlos. Edo. Cojedes. 1996.
- [8] HUSS, H. Cambios *post mortem* en el pescado. En: **El pescado fresco: su calidad y cambios de calidad**: 27-4. FAO. Roma. 1988.
- [9] IWAMOTO, M.; YAMANAKA, H.; WATABE, S.; HASHIMOTO, K. Effect of storage temperature on *rigor mortis* and ATP degradation in plaice (*Paralichthys olivaceus*) muscle. **J. Food Sci.** 52:1514. 1987.
- [10] OKUMA, H.; TAKAHASHI, H.; YASAWA, S.; SEKIMUKAI, S. Development of a system with double enzyme reactors for the determination of fish freshness. **Analytica Chimica Acta.** 260:93. 1992.
- [11] RAYDER, J.; FLETCHER, G.; STEC, M.; SEELYE, R. Sensory, microbiological and chemical changes in hoki stored in ice. **Int. J. Food. Sci. Technol.** 28:169. 1993.
- [12] SAITO, T.; ARAI, K.; MASUTYOSHI, M. A new method for estimating the freshness of fish. **Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.** 24:749. 1959.
- [13] Servicio Autónomo de los recursos Pesqueros y Acuícolas (SARPA). **La Actividad Pesquera-Acuícola en Venezuela.** SARPA. Caracas. 105 pp. 1996.
- [14] TOMÉ, E.; IGLESIAS, M.; KODAIRA, M.; GONZÁLEZ, A. Efecto de la temperatura de almacenamiento en el *Rigor mortis* y en la estabilidad de la tilapia (*Oreochromis spp.*) cultivada. **Rev. Cient.** Vol. X (4): 328-338. 2000.
- [15] TOMIOKA, K.; KURAGANO, T.; YAMAMOTO, H.; ENDO, K. Effect of storage temperature on the dephosphorylation of nucleotides in fish muscle. **Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.** 53:503. 1987.