

Caracterización bioquímica de las proteínas de jaiba mora (*Homalaspis plana*)

Lilian Abugoch J.¹, Abel Guarda M.¹, y Mario Chiong L.²

Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.
Universidad de Chile.

RESUMEN. La jaiba mora (*Homalaspis plana*) es un crustáceo que se da desde la costa de Guayaquil en Ecuador hasta la costa chilena incluyendo el Archipiélago de Juan Fernández. Este recurso es de importancia para Chile porque provee de trabajo a los pescadores artesanales. En Chile no existe diversificación de productos a partir de este crustáceo y ha sido escasamente estudiado desde un punto de vista científico, es por ello que se ha considerado necesario iniciar la investigación de este recurso con la caracterización bioquímica de sus proteínas para posteriormente desarrollar productos a partir de él. En este trabajo se determinó la actividad proteolítica en la carne de jaiba recién extraída y se realizó la caracterización electroforética de sus proteínas.

Respecto a la actividad enzimática, en la carne de pinzas y patas de jaiba recién extraída no se pudo detectar actividad proteolítica, bajo las diferentes condiciones de ensayo usadas en este trabajo.

La caracterización de proteínas se realizó mediante el uso de técnicas electroforéticas, en extracto de carne de pinzas y patas de jaiba, utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en condiciones nativas y en presencia de SDS. Se diferenciaron electroforéticamente (PAGE-SDS) las proteínas miofibrilares de las sarcoplasmáticas, obteniendo diferentes perfiles electroforéticos de los extractos a dos fuerzas iónicas diferentes (0,05 y 0,5).

SUMMARY. Biochemical characterization of crab (*Homalaspis plana*) proteins. *Homalaspis plana* is a crab found in the Pacific Ocean coasts from Guayaquil (Ecuador) all the way down to the Strait of Magellan, including all of the Chilean coast. This crustacean is an important resource because it provides jobs for artisanal fishermen. In Chile there is no product diversification from this crab and it has been poorly studied from the scientific point of view. The biochemical characterization of its proteins was initiated to be able to develop several products from its meat. We report the proteolytic activity from freshly extracted crab meat and the electrophoretical characterization of its proteins.

No proteolytic activity was detected in freshly extracted crab meat, under any of the assay conditions used.

SDS Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and native PAGE were carried out with proteins extracted from crab meat. Using extraction solutions at two different ionic strength (0.05 and 0.5), myofibrillar and sarcoplasmic were separated, each showing different electrophoretical patterns in SDS-PAGE.

INTRODUCCION

En los diferentes países del mundo, se hace necesario lograr un uso racional de las proteínas, especialmente las de origen animal y asegurar un adecuado abastecimiento a la demanda industrial. Hoy no sólo son importantes las características físicas, químicas, bioquímicas de las proteínas, sino

que además las propiedades funcionales deben ser las adecuadas para satisfacer las exigencias de los distintos procesos industriales que dan origen a productos nutritivos, seguros y atractivos.

La importancia de las proteínas en la dieta del hombre, radica principalmente en su aspecto nutricional y las proteínas animales tienen un valor biológico superior que las proteínas de origen vegetal (1). La jaiba, especie de interés en este estudio, es un crustáceo cuya composición se destaca por el alto contenido proteico, alrededor de 16 % en base a la carne recién extraída, con un adecuado balance de aminoácidos esenciales y por contener un bajo porcentaje de grasa (2). La

1 Académicas del Dpto. de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química. Universidad de Chile.

2 Bioquímico

jaiba mora (*Homalaspis plana*) perteneciente a la familia *Xanthidae* se cuenta entre los recursos poco estudiados en Chile y actualmente se clasifica como recurso subexplotado en nuestro país (3,4). Es una de las especies más representativa en las capturas de la V Región de Chile. Este recurso se encuentran distribuido desde Guayaquil en Ecuador hasta el Estrecho de Magallanes e Isla Robinson Crusoe en Chile y desde la orilla de la playa hasta los 272 metros de profundidad (3). El Servicio Nacional de Pesca en 1992, registró un desembarque total artesanal de 3.616 Ton. de jaiba de las cuales 487 Ton. correspondían a jaiba mora (5). El recurso jaiba posee una gran importancia socio-económica, por ser extraído principalmente por el subsector artesanal, constituyendo una fuente de trabajo interesante para un gran número de personas (6).

Existen ciertas especies animales que aún no han sido muy estudiadas y merecen especial atención, como lo son los crustáceos y más especialmente la jaiba. Las formas actuales de procesamiento aplicado a la jaiba consisten básicamente en congelado o en conserva, siendo el congelado la principal forma de comercialización (7,8,9).

En la literatura existen pocos antecedentes acerca de las características y propiedades de las proteínas de estos crustáceos y mucho menos sobre su comportamiento con los diferentes procesos tecnológicos, por lo que constituyen un tema interesante para ser desarrollado. En base a todo lo planteado anteriormente se consideró en una primera etapa la caracterización bioquímica del recurso jaiba. Se ha desarrollado la caracterización bioquímica de la carne de jaiba recién extraída, determinando la actividad proteolítica y la caracterización de los perfiles electroforéticos de proteínas sarcoplasmáticas y miofibrilares de carne de pinzas y patas de jaiba.

MATERIALES Y METODOS

Materia prima: Se trabajó con jaibas «mora» hembras y machos (*Homalaspis plana*), adquiridas en el Mercado Central de Santiago, provenientes de la V Región. Para este estudio fue necesario la adquisición de jaibas vivas, de peso entre 500 y 700g aproximadamente y ancho cefalotorácico entre 10 y 15 cm.

Extracción de la carne: La extracción de carne de jaiba se realizó manualmente en jaiba recién muertas, utilizando cuchillos, martillo y tijeras. Todo el proceso se realizó en frío manteniendo la carne recién extraída en hielo. Se extrajo carne de dos secciones anatómicas diferentes de la jaiba: pinzas y patas.

Caracterización bioquímica de la carne de jaiba recién extraída

Determinación de actividad proteolítica

Preparación de la muestra: la carne de jaiba (pinzas y patas

delanteras) recién extraída, se homogeneizó con un equipo tipo «waring blender» con volúmenes iguales de solución de NaCl 0,15 N a 13.000 rpm por 3 minutos. Luego se centrifugó a 10.000 x g por 10 minutos a 4 °C y se recuperó el sobrenadante, en el que se realizaron los ensayos enzimáticos que se describen a continuación.

Medición espectrofotométrica a 280 nm con seroalbúmina de bovino (BSA) como sustrato: La actividad proteolítica se determinó midiendo la absorbancia de los aminoácidos y/o péptidos liberados en el medio, a 280 nm. La incubación se realizó a 25 y 37 °C durante 10, 30, 60, 90, 120, 180 minutos, en el siguiente medio de ensayo: 0,25 ml de BSA al 1% (p/v), 0,2 ml de amortiguador 0,1 M (ver Tabla 1), 0,02 ml de muestra de concentración aproximada de proteínas de 8,9 mg/ml, 0,53 ml de agua destilada. La reacción se detuvo con 0,1 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 100% (p/v). Posteriormente la mezcla se centrifugó por 3 minutos a 12.500 x g y se determinó la absorbancia del sobrenadante a 280 nm (10).

TABLA 1
SOLUCIONES AMORTIGUADORAS UTILIZADAS
PARA LA MEDICION DE ACTIVIDAD
PROTEOLÍTICA, CON BSA COMO SUSTRATO

Amortiguador	pH
KCl/HCl	1,0
KCl/HCl	1,5
KCl/HCl	2,0
Glicina/HCl	2,5
HCl/Glicina y	
ác. Cítrico/Citrato Sodio	3,0
HCl/glicina y	
ác. Cítrico/Citrato Sodio	3,5
ác. Cítrico/Citrato Sodio	4,0
ác. cítrico/Citrato Sodio	4,5
ác. Cítrico/Citrato Sodio	5,0
ác. Cítrico/Citrato Sodio	5,5
Na ₂ HP0 ₃ /NaH ₂ P0 ₄	6,0
Na ₂ HP0 ₃ /NaH ₂ P0 ₄	6,5
Na ₂ HP0 ₃ /NaH ₂ P0 ₄	7,0
Na ₂ HP0 ₃ /NaH ₂ P0 ₄ y HCl/Trizma base	7,5
Na ₂ HP0 ₃ /NaH ₂ P0 ₄ y HCl/Trizma base	8,0
HCl/Trizma base	8,5
HCl/Trizma base	9,0
Na ₂ C0 ₃ /NaHC0 ₃	9,5
Na ₂ C0 ₃ /NaHC0 ₃	10,0
Na ₂ C0 ₃ /NaHC0 ₃	10,5

RESULTADOS Y DISCUSION

Actividad proteolítica: La jaiba es un recurso marino que normalmente es comercializada viva o como producto congelado, por ser altamente perecible; es por ello que se consideró necesaria la investigación de actividad proteolítica presente en el músculo de las pinzas y patas de jaiba, que es donde se concentra el mayor porcentaje de la porción comestible de este crustáceo.

Para detectar la actividad proteolítica, se realizó inicialmente una incubación de extractos de jaiba con BSA como sustrato usando un barrido de pH entre 1,0 y 10,5 con incrementos de 0,5 unidades. Los experimentos cinéticos realizados hasta los 180 minutos tanto a 25 °C como a 37 °C no permitieron detectar actividad proteolítica.

Con el objeto de aumentar la sensibilidad del ensayo se reemplazó BSA por hemoglobina y se usó el método de Lowry para detectar los aminoácidos aromáticos liberados. Sin embargo, usando este método tampoco fue posible detectar actividad proteolítica. La imposibilidad de detectar esta actividad enzimática a través de las metodías usadas, no significa que ésta no esté presente en el tejido. En la literatura no existen estudios realizados de actividad proteolítica en carne de pinzas de jaiba recién extraída. Sin embargo, existen estudios en determinación de actividad proteolítica en músculo de pescado, en los que se ha detectado una baja actividad enzimática en las condiciones usadas para las proteínas de jaiba (12).

Estudios realizados en krill señalan que este crustáceo posee un alto contenido de proteasas provenientes del estómago, hígado y abdomen, con actividad óptima a pH débilmente alcalino (17, 18) y se ha encontrado que más del 95 % de la actividad proteolítica total está localizada en el cefalotórax (19).

Durante el almacenamiento de la carne, el visible deterioro posterior de la carne de jaiba, detectable por el olor y el cambio de color, podría deberse probablemente al ataque microbiano, o bien, a la generación de aminas típicas de los procesos de putrefacción (20).

Para descartar la posibilidad de que la incapacidad de detectar actividad proteolítica, se debía a que el sustrato no era el adecuado, se ensayó el uso de la proteína de jaiba como sustrato endógeno. Del ensayo realizado, usando como sustrato endógeno la carne de jaiba, tampoco se pudo detectar actividad proteolítica.

Por lo tanto, si la carne de jaiba tuviera proteasas éstas estarían presentes en niveles tan bajos, que los métodos utilizados no pudieron detectarlos. Estos resultados permiten afirmar que las proteínas de la carne de jaiba no sufrirán proteólisis a tiempos cortos, a diferencia de lo descrito para otras especies (21, 22, 23).

Perfiles proteicos de carne de pinzas y patas delanteras de jaiba.

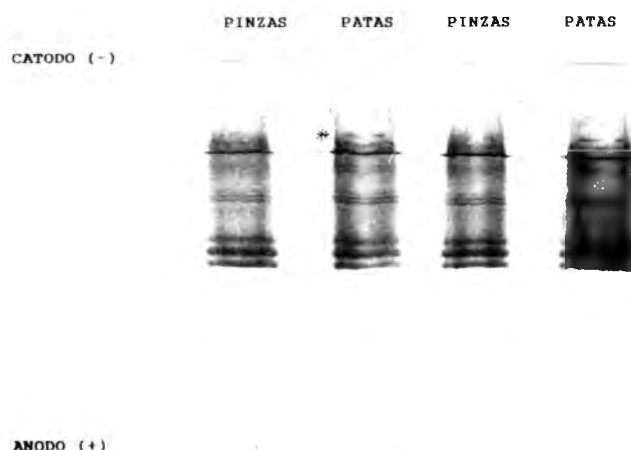
Se obtuvieron perfiles electroforéticos de las proteínas

solubles de carne de jaiba, extraídas a una fuerza iónica 0,15 N NaCl, en condiciones nativas y desnaturalizantes. Se trabajó con tejido de pinzas y de patas delanteras con el fin de comparar cualitativamente si los perfiles proteicos de ambos tejidos tenían diferencias apreciables.

a. Electroforesis en condiciones nativas: La Fig. 1, muestra el gel PAGE nativo, en la que se puede observar, que los patrones proteicos para los extractos de carne de patas y pinzas de jaiba son muy parecidos. En ambos perfiles se puede visualizar al menos 7 bandas mayoritarias. Las diferencias percibidas son mínimas y se pueden detectar a través de bandas muy débiles, marcadas con «*» en la Fig. 1, que aparecen en patas y no en pinzas.

FIGURA 1

PAGE-Nativo de extracto soluble al 0,15N de NaCl de carne de pinzas y patas de jaiba. Cada carril fue cargado con 5µl de cada extracto. Solución amortiguadora trizma base-glicina pH=8,2

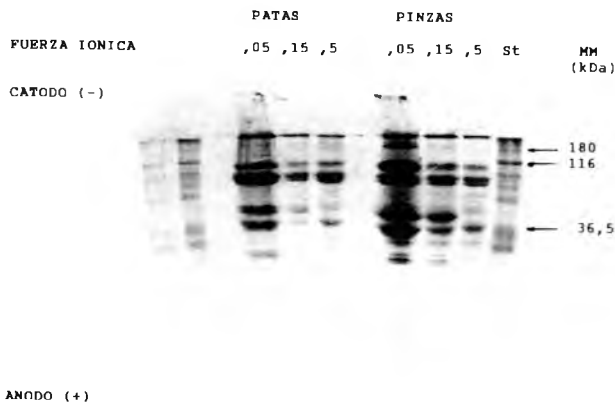


De lo anterior se puede deducir que entre estos dos tejidos de diferentes lugares anatómicos de la jaiba las diferencias encontradas en los perfiles proteicos obtenidos por electroforesis PAGE nativa son leves.

b. Electroforesis PAGE-SDS: La Fig. 2, presenta el análisis pro PAGE-SDS de extractos solubles de carne de pinzas y patas realizadas a tres fuerzas iónicas (I) diferentes. Es posible apreciar que existen diferencias entre los extractos a distintas I, tanto en el caso de la carne de patas como la de pinzas de jaiba; estas diferencias son especialmente notorias cuando se compara las proteínas extractables I 0,05 y las de I 0,5. Cuando se extrae con fuerza iónica equivalente a 0,15 y 0,5, las diferencias observadas son menos notorias. Este estudio permitió diseñar el experimento que se presenta a continuación para diferenciar proteínas miofibrilares de sarcoplasmáticas.

FIGURA 2

PAGE-SDS de extractos solubles, a distintas fuerzas iónicas, de carne de patas y pinzas de jaiba. En cada bolsillo se cargó alrededor de 7 µg de proteínas



Caracterización de las proteínas sarcoplasmáticas y miofibrilares de la carne de jaiba recién extraída.

Se fraccionaron las proteínas de jaiba a dos fuerzas iónicas (0,05 y 0,5). Se obtuvieron 4 sobrenadantes, como resultado del fraccionamiento de las proteínas de jaiba, a distinta fuerza iónica. Los sobrenadantes S₁ y S₂ corresponden a las proteínas extraídas cuantitativamente a una fuerza iónica de 0,5 de NaCl.

La Fig. 3 muestra un gel PAGE-SDS, cuyos carriles S₁ y S₂ correspondientes a proteínas extraídas a la fuerza iónica más baja, permite observar la presencia de bandas proteicas comunes, que se asociarían a proteínas sarcoplasmáticas, a diferencia de las bandas observadas en el carril S₄, corresponderían principalmente a proteínas miofibrilares; las bandas observadas en el carril S₃ corresponderían a una transición entre la fuerza iónica baja y la alta.

Rehbein y Kundiger (24), compararon perfiles electroforéticos de proteínas sarcoplasmáticas de diferentes especies de pescado, con el fin de identificar especies y encontraron que existían grandes diferencias en los patrones proteicos a nivel de proteínas sarcoplasmáticas. En este caso se puede decir que los patrones proteicos obtenidos para la jaiba en los carriles S₁ y S₂ en la Fig. 3 serían específicos para la jaiba mora. Para comparar patrones de proteínas sarcoplasmáticas de diferentes especies es necesario hacerlo bajo las mismas condiciones de trabajo (24).

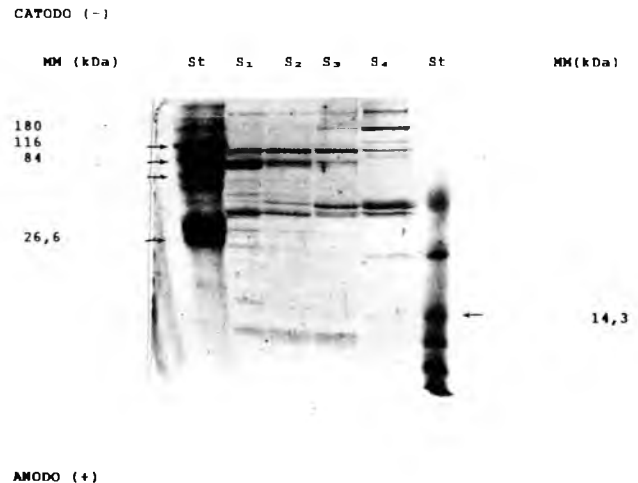
Respecto a los perfiles proteicos observados en el carril S₄, del gel representado en la Fig. 3 se puede destacar que la primera banda se podría asociar a la cadena pesada de la miosina, ya que está alrededor de 200 kDa, al igual que lo descrito para la miosina de otras especies como conejo, bovino, krill y pescado que se sitúan alrededor de la misma MM (25, 26, 19, 27, 28). La banda de menor MM observada alrededor de 40 kDa correspondería a actina; la banda proteica ubicada alrededor de 30 kDa estaría relacionada con

tropomiosina; en el carril S₄ aparecen dos bandas proteicas muy suaves en la zona de MM 20 kDa, que podrían corresponder a las subunidades ligeras de la miosina. Para poder afirmar lo anteriormente discutido se requerirían más estudios los que podrían incluir el uso de anticuerpos específicos contra cada una de estas proteínas. La información que se puede extraer de la Fig. 3 es un perfil característico de las proteínas extractables a fuerzas iónicas equivalentes a 0,05 y 0,5 N de NaCl.

FIGURA 3

PAGE-SDS de los extractos de carne de pinzas de jaiba, extraídos a fuerzas iónicas de 0,05 y 0,5. Cada bolsillo fue cargado con 7 µg de proteína aproximadamente.

Amortiguador usado fue trizma base-glicina pH 8,2. S₁ y S₂ corresponden a extractos obtenidos de los primeros dos lavados a I= 0,05 y S₃ y S₄ a los extractos obtenidos con I= 0,5



Finalmente de este estudio se puede concluir lo siguiente:

- En las condiciones estudiadas en este trabajo, no se detectó actividad proteolítica en carne de pinzas de jaiba recién extraída.
- Al analizar los perfiles proteicos, en PAGE-SDS, de los extractos solubles de carne de pinzas y patas, se encontraron pequeñas diferencias, en bandas que aparentemente no estarían asociadas a proteínas estructurales. En PAGE-nativo también se encontraron diferencias leves en los patrones proteicos electroforéticos.
- Se determinaron al menos 12 bandas proteicas en PAGE-SDS de extractos solubles de carne de pinzas de jaiba a una fuerza iónica de 0,05, que se asimilarían a proteínas sarcoplasmáticas.
- Se determinaron al menos 11 bandas proteicas en PAGE-SDS de extractos solubles de carne de pinzas de jaiba que estarían asociadas a las proteínas miofibrilares. Para confirmar definitivamente esta primera caracterización se sugieren estudios adicionales.

REFERENCIAS

1. Robinson D. Bioquímica de alimentos y valor nutritivo de los alimentos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza España. 1991.
2. Handbook US Dpt. Agriculture. Composition of food finfish and shellfish products. N° 8-15. 1987.
3. IFOP. Desarrollo de la pesquería de jaiba (*Cancer sp.*). V Región 1982.
4. IFOP. Recursos indicativos del sector pesquero nacional. Recursos, tecnología, producción y mercado. Jaiba 1985.
5. SERNAP. Anuario Estadístico de Pesca. Ministerio de Economía y Reconstrucción. 1993.
6. IFOP. Diagnóstico de las principales pesquerías nacionales demersales (crustáceos). Zona Central. pp. 1-6, 52-58. 1986.
7. García C. Revisión de las tecnologías de procesamiento de crustáceos de importancia comercial. Tesis Ingeniero en Alimentos, U. Católica de Valparaíso. 1989.
8. Zamora S. Elaboración de jaibas en conserva. Información técnicas, IFOP. Circular N° 78. 1972.
9. Pizardi C. y A. Sánchez. Elaboración de conservas de carne de cangrejo peludo (*Cancer polydon*) en salmuera y en aceite. Simposio Internacional de los Recursos Vivos y las Pesquerías en el Pacífico Sudeste. Viña del Mar 9-13 de Mayo 1988.
10. Laskowski M. Chymotrypsinogens and chymotrypsin. Methods in Enzimology. Vol II Academic Press Inc. Publishers. Edited by Sidney P. Colowick and Nathan Kaplan. New York pp19. 1955.
11. Laskowski M. Trypsinogen and trypsin. Methods in Enzimology. Vol II Academic Press Inc. Publishers. Edited by Sidney P. Colowick and Nathan Kaplan. New York pp.33-34. 1955.
12. Makinodan Y., Hirotsuka e Ikeda. Neutral proteinase of carp muscle. J. Food Sci. 44:1110-1117. 1979.
13. Laemmli U. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685. 1970.
14. Weber K. y M. Osborn. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-poliacrilamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244:4406-4412. 1969.
15. Kawashima T., K. Arai y T. Saito. Studies on muscular proteins of fish-IX An attempt on quantitative determination of actomyosin in frozen «surimi» from Alaska-Pollak. Bulletin of the Japanese Society of Sc. Fisheries. 39 (2):207-214. 1973.
16. Lowry O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275. 1951.
17. Borrás F. y D. Romo. Actividad enzimática y separación por cromatografía de las enzimas proteolíticas del krill. Programa Investigaciones del recurso krill. CORFO. 1978.
18. Romo D. Separación-Inhibición de las enzimas proteolíticas del krill. Programa Investigaciones del recurso krill. CORFO. 1978.
19. Suzuki T. Tecnología de las proteínas de pescado y krill. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. 1987.
20. Conn E., P. Stumpf y G. Bruening. Outlines of Biochemistry 5/ E. John Wiley & Sons, Inc. Estados Unidos de Norteamérica. pp 343-344. 1987.
21. Ikeda S. Other organic components and inorganic components. Advances in Fish Science and Technology, Edited by J.J. Connel Gran Bretaña pp. 111-123. 1980.
22. Gilbert A. y J. Raa. Tissue degradation and belly bursting in capelin. Advances in Fish Science and Technology, Edited by J.J. Connel Gran Bretaña pp255-258. 1980.
23. Hjelmeland K. y J. Raa. Fish tissue degradation by trypsin type enzymes. Advances in Fish Science and Technology, Edited by J.J. Connel Gran Bretaña pp. 456-459. 1980.
24. Rehbein H. y R. Kundiger. Comparison of the isoelectric focusing patterns of the sarcoplasmic proteins from red and white muscle of various fish species. Arch Fischwiss 35:12 pp 7-16. 1984.
25. Porzio M. y A. Pearson. Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. Biochemica et Biophysica Acta. 490:27-34. 1977.
26. Whitaker J. y S. Tannenbaum. Food proteins. AVI Publishing Company USA. Capítulos 6 y 16. 1977.
27. Cheftel J., Cuq J. y D. Lorient. Proteínas alimentarias, Editorial Acribia S.A. Zaragoza pp32-35, 49-61, 63-70, 78-85, 143, 153, 155, 161. 1989.
28. LeBlanc E. y R. LeBlanc. Separation of cod (*Gadus morhua*) fillet proteins by electrophoresis and HPLC after various frozen storage treatments. J Food Sci. 54(4): 827-834. 1989.

Recibido: 29-08-1994

Aceptado: 21-04-1995