

Aislamiento de proteínas de residuos de exoesqueletos de cangrejos como materia prima para uso nutricional

Isolation of proteins from crabs exoskeletons residues as raw material of nutritional use for balanced food

Irán E. Parra Castillo^{1,2*}, Gerson E. Chávez Narváez²,
Milangel de J. Luzardo Morillo², Lissette Ch. Montilla
Cantillo¹, Alexandra L. Vera Bonilla¹, Bélgica B.
Bravo Tovar², Nacarid del V. Delgado Parra² y Nelson
Márquez Salas²

¹Departamento de Química, Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia.

²Laboratorio de Petroquímica y Surfactantes, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia.

Resumen

Los residuos agroindustriales representan una nueva alternativa para la obtención de proteínas que puedan ser empleados en la formulación de alimentos. En este trabajo se realizó el aislamiento de las proteínas por tratamiento de los exoesqueletos del cangrejo azul *Callinectes sapidus* usando seis (6) métodos termoquímicos. En los extractos obtenidos las proteínas se aislaron, purificaron y analizaron con la finalidad de conocer su valor nutricional, presentando adecuados niveles de proteínas asociadas ($65,0$ a $197,8$ g.kg⁻¹). La recuperación de las proteínas se realizó aplicando tres métodos químicos obteniendo un alto rendimiento ($94,90 \pm 3,37\%$) al combinar el efecto de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (65 %m/v) y etanol (30 %v/v) a pH 6,5 en un tiempo de 30 minutos. La alta solubilidad de las proteínas recuperadas ($87,96 \pm 2,18\%$) y su perfil de aminoácidos esenciales y no esenciales indican que este biopolímero tiene potencial para la preparación de productos alimenticios.

Palabras clave: recuperación, proteínas, cangrejos, alimentos, aminoácidos.

Recibido el 06-02-2017 • Aceptado el 01-06-2020

*Autor de correspondencia. Correo electrónico: iranparra@fa.luz.edu.ve

Abstract

Agroindustrial waste represent an alternative for the production of proteins that can be used in food formulation. In this work, isolation of the proteins from *Callinectes sapidus* blue crab exoskeletons by the treatment using six (6) thermochemical methods was performed. In the obtained extracts the proteins were isolated, purified and analyzed in order to know the nutritional value of these, achieving good levels of associated proteins (65.0 a 197.8 g.kg). Protein recovery was performed by applying three chemical methods obtaining a high yield ($94.90 \pm 3.37\%$) combining the effect of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (65% m/v) y ethanol (30% v/v) in 30 minutes. The high solubility of the recovered proteins ($87.96 \pm 2.18\%$) and their amino acid profile of essential and non-essential indicate that this biopolymer has potential in the preparation of food products.

Keywords: recovery, protein, crabs, food, amino acids.

Introducción

En Venezuela a través de los procesos agroindustriales y la industria acuícola se capturan una importante cantidad de crustáceos de la familia *Callinectes sapidus* (Agulló *et al.*, 2004), cuyos exoesqueletos, pese a constituir una excelente materia prima, son un residuo de las empresas procesadoras de crustáceos, representando un grave impacto ambiental en la región. La matriz de los exoesqueletos de crustáceos está formada por proteínas que pueden estar asociadas a los pigmentos en la epicutícula, y a la quitina en la endocutícula, en la cual la capa con mayor asociación quitina-proteína es la capa conocida como pro-cutícula (Agulló *et al.*, 2004). Las proteínas están ligadas a la quitina por interacciones de enlace de hidrógeno e interacciones electrostáticas y de enlaces covalentes (Giraud-Guille, 1984; Chen *et al.*, 2008). El proceso de desproteinización consiste en

una reacción donde el ión oxhidrilo de una base inorgánica rompe las interacciones electrostáticas (de tipo bases de Schiff) y enlaces covalentes (N-glicosídicas y O-glicosídicas) que unen a la quitina con las proteínas a través de los grupos amino o ácidos carboxílicos.

En la actualidad, la calidad de los productos alimenticios ha cobrado gran importancia, por lo que es fundamental, de cara al futuro, pensar en un mercado cada día más exigente en lo relativo a la seguridad alimentaria, utilizando productos de origen natural sobre todo cuando tales productos van dirigidos a la alimentación animal, para posterior consumo humano, lo que hace fundamental la utilización de materias primas de alta calidad nutritiva en las dietas. Con base en esto, en esta investigación se realizó un estudio para la extracción de proteínas empleando residuos de exoesqueletos del cangrejo *C. sapidus*, aplicando métodos químicos que permitan la obtención de un material

de adecuada calidad nutricional que pueda ser empleado en la formulación de alimentos balanceados para animales o humanos.

Materiales y métodos

Muestras, estándares y reactivos

Las proteínas se aislaron de los exoesqueletos del cangrejo azul (*Callinectes sapidus*) suministrados por una empresa del municipio San Francisco del estado Zulia. Como estándares se utilizó la proteína de albúmina de bovino (Aldrich, 98%) y una mezcla de aminoácidos (Sigma® AA-S-18) de concentración 2,5 $\mu\text{mol mL}^{-1}$.

Todos los solventes y reactivos fueron grado análisis y se emplearon sin purificación previa. El tratamiento de las muestras se inició con la limpieza, secado y molienda de los exoesqueletos para la obtención de una harina que se tamizó para seleccionar

los sólidos con tamaño de partícula de 180-250 μm . La despigmentación de la harina se realizó usando acetona y éter de petróleo en un sistema de extracción Soxhlet (Pyrex). Luego se realizó la desproteización (DP) empleando seis (6) métodos diferentes denominados M1 a M6, variando las condiciones de cada proceso, como se indica en el cuadro 1.

La determinación de proteínas en los extractos se realizó por el método de Biuret (Chutipongtanate *et al.*, 2012). La precipitación, recuperación y purificación de las proteínas presentes en los extractos de la desproteización se realizó basado en los métodos de precipitación (Rosenberg, 2005) mediante el proceso isoelectrico (variación del pH), hidrófobo (adición de etanol), y el iónico (adición de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). El perfil de aminoácidos se determinó por cromatografía HPLC (marca Waters modelo 600) aplicando previamente una hidrólisis ácida y derivatización precolumna

Cuadro 1. Condiciones experimentales de los procesos de desproteización aplicados a los exoesqueletos de cangrejos.

Procesos DP	Reactivos	H/B	t (h)	T (°C)
		(g.mL ⁻¹)		
M1	NaOH 4,5%	1:10	3	65
M2	NaOH 1,0%	1:11	24	28
M3	NaOH 1,0% + Na ₂ SO ₃ 0,10%	1:2,5	0,5	70
	NaOH 10% + Na ₂ SO ₃ 1%		1,0	
M4	NaOH 5% (1,25 M)	1:10	3	100
M5	NaOH 4% (1,0 M)	1:20	24	70
M6	NaOH 5% (1,25 M)	1:20	3	70

con fenilisotiocianato (Vilasoa *et al.*, 2007).

Análisis estadísticos

Se asumió una varianza homogénea y los datos obtenidos se procesaron por comparación entre medias mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA - efecto fijo), para tres réplicas de mediciones, comprobando los resultados con otros métodos estadísticos de significancia como la prueba Tukey y Kruskal-Wallis empleando el programa Statgraphics Centurion XVI, versión 16.1.15.

Resultados y discusión

Luego de aplicar los tratamientos según las condiciones mostradas en el Cuadro 1, se determinó gravimétricamente el rendimiento de los exoesqueletos de cangrejos para evaluar la pérdida del material después de la desproteínización. Los rendimientos estuvieron entre $77,31 \pm 3,10$ % (M4) y $83,80 \pm 0,53$ % (M3), siendo significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) los procesos M4 y M5 de los otros. El contenido de proteínas también presentó variaciones significativas ($p \leq 0,05$) encontrando valores de %m/m entre $3,30 \pm 0,15$ (M4) y $19,27 \pm 0,87$ % (M3), sin encontrar diferencias significativas entre los métodos M3 y M6. La eficiencia de la desproteínización (%E_{DP}), se determinó por comparación entre el contenido nitrógeno de la harina inicial ($14,275,53 \pm 472,21$ mg.kg⁻¹) y del extracto final después de la DP obteniendo valores de %E_{DP} entre $12,81$ mg.kg⁻¹ (M4) y $68,84$ mg.kg⁻¹ (M6), con diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Los procesos M3 y M6 resultaron ser los más eficientes, siendo éstas las condiciones termoquímicas adecuadas para la extracción de las proteínas.

Las proteínas disueltas en los extractos de los procesos de DP se aislaron aplicando tres métodos de precipitación. La eficiencia de recuperación de proteínas (%EPP) de los métodos se determinó comparando la concentración de proteína soluble en el extracto inicial antes y después del tratamiento. En la Figura 1 se muestran los resultados obtenidos para cada tratamiento. La precipitación isoeléctrica de las proteínas por efecto del pH, tiempo y temperatura se presenta en la Figura 1A. El pH y la temperatura tuvieron una influencia significativa ($p \leq 0,05$) en el %EPP obteniéndose, la máxima precipitación a pH 3,5 (entre $54,06 \pm 1,35$ y $66,30 \pm 0,95$ %), valor que coincide con los reportados para proteínas de desechos acuosos del procesamiento de pescado (Bourtoom *et al.*, 2009).

Por otro lado, el tiempo de tratamiento a un pH específico no originó cambios significativos en la precipitación ($p \geq 0,05$). El efecto del tratamiento sobre las proteínas recuperadas se evaluó a través de la solubilidad (%SP), debido a que la pérdida de ésta es considerada como un criterio de desnaturalización (Wu e Inglett, 1974). Los valores de %SP variaron entre $10,50 \pm 1,46$ y $35,40 \pm 1,25$ %, con diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre las variables aplicadas (pH, tiempo y temperatura), lo que demuestra un efecto importante en la desnaturalización de las proteínas recuperadas.

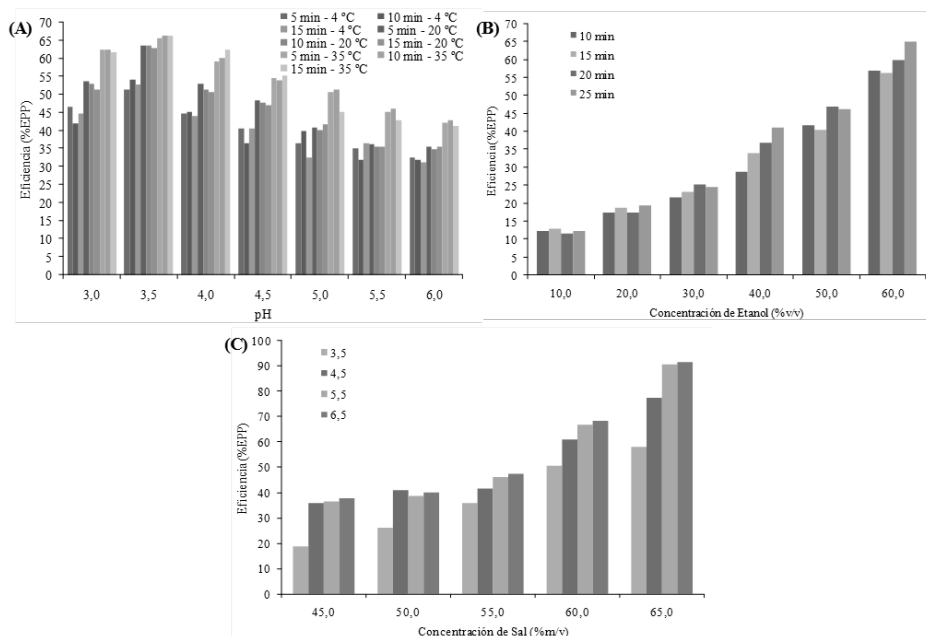


Figura 1. Eficiencia de recuperación de proteínas (%EPP) a diferentes condiciones del tratamiento (A) isoeléctrico, (B) hidrófobo, y (C) iónico.

La eficiencia de la precipitación hidrófoba (%EPP) con etanol se presenta en la Figura 1B. La adición del solvente desde 10 a 60 %v/v originó un %EPP entre $12,27 \pm 0,59\%$ y $64,98 \pm 1,93\%$ con resultados significativamente diferentes ($p \leq 0,05$), como se ha observado con otras proteínas (Ian, 2005). El tiempo de exposición no tuvo un efecto significativo importante ($p \geq 0,05$). El %SP con este método varió entre $12,27 \pm 1,39$ y $64,98 \pm 0,99\%$, sin diferencias estadísticamente significativas ($p \geq 0,05$) entre los tiempos de 10 a 25 min. Mayor solubilidad de las proteínas se obtuvo cuando el etanol estaba a una concentración $< 30\%$ v/v. Efecto similar fue reportado en la recuperación de

proteínas de desechos de pescado (Nishioka y Shimizu, 1983).

Los resultados de la precipitación iónica de las proteínas se presentan en la Figura 1C. La principal ventaja de este método es que fácilmente se provoca la precipitación reversible de la proteína y es poco desnaturizante de la estructura nativa (Rosenberg, 2005). A medida que aumentó la concentración de la sal se obtuvo una mayor precipitación de la proteína, encontrando un máximo %EPP = $91,00 \pm 0,53$ con 65 % m/v de sal a pH 6,5, observando diferencias significativas entre las condiciones ($p \leq 0,05$). La solubilidad de las proteínas se incrementó proporcionalmente con la concentración de la sal, hasta un

máximo de $83,20 \pm 2,10\%$, resultado que difiere de los otros dos métodos.

Se realizó un análisis del perfil de aminoácidos (AA) por HPLC, logrando la separación e identificación de diecisiete AA esenciales (E) y no esenciales (NE), como treonina, tirosina, valina, metionina, isoleucina, leucina, fenilalanina, lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, glicina, histidina, arginina, alanina, prolina e hidroxiprolina. Entre los métodos la concentración individual de los aminoácidos varió significativamente ($p \leq 0,05$) encontrando concentraciones de AAE entre $38,7 \text{ mg.g}^{-1}$ (M5) y $109,5 \text{ mg.g}^{-1}$ (M6) y de AANE entre $51,7 \text{ mg.g}^{-1}$ (M5) y $139,8 \text{ mg.g}^{-1}$ (M6), lo que puede ser una consecuencia del rendimiento de extracción o la posible desnaturalización de la proteína. La mayor concentración de AA se obtuvo con el método M6 ($254,5 \pm 5,0 \text{ mg.g}^{-1}$).

Conclusiones

Se estudió la recuperación de las proteínas extraídas de residuos de exoesqueletos del cangrejo azul aplicando tres métodos de precipitación químicos, obteniendo un alto rendimiento al combinar el efecto de la precipitación iónica con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y la desolvatación con etanol.

La alta solubilidad de las proteínas recuperadas y su perfil de aminoácidos indican que este biopolímero posee un valor nutricional adecuado para su aplicación en la formulación de productos alimenticios.

El estudio permitió demostrar la ventaja de la revalorización de

residuos agroindustriales como materia prima de compuestos o biomoléculas importantes.

Agradecimientos

A las instituciones como el MPPEUCT a través del FONACIT y al CDCH (CONDES) de LUZ por el financiamiento otorgado a través de los diferentes proyectos para la realización de la investigación.

Literatura citada

- Agulló E., M. S. Rodríguez, R. Matos. 2004. Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. Pontificia Universidad Católica del Perú, Fondo Editorial, Perú. 2004. 312 p.
- Bourtoom, T., M.S. Chinnan, P. Jantawat, R. Sanguandeeikul. 2009. Recovery and characterization of proteins precipitated from surimi wash-water. *LWT Food Science Technol.* 42: 599-605.
- Chen, P., A. Yu-Min, J. McKittrick, M. Meyers. 2008. Structure and mechanical properties of crab exoskeletons. *Acta Biomater.* 4(3): 587-596.
- Chutipongtanate, S., K. Watcharatanyatip, T. Homvises, K. Jaturongkakul, V. Thongboonkerd. 2012. Systematic comparisons of various spectrophotometric and colorimetric methods to measure concentrations of protein, peptide and aminoacid: Detectable limits, linear dynamic ranges, interferences, practicality and unit costs. *Talanta.* 98: 123-129.
- Giraud-Guille, M. 1984. Fine structure of the chitin-protein system in the crab cuticle. *Tissue Cell.* 16(1): 75-92.
- Ian, M. Rosenberg. 2005. Protein Analysis and Purification. 2^o ed. Birkhauser, Boston, USA.
- Nishioka, F., Shimizu, Y. 1983. Recovery of proteins from washing of minced fish

meat by pH-shifting method. Bulletin Japanese Soc. Sci. Fisheries. 49: 795-800.

Rosenberg I. M. 2005. "Protein Analysis and Purification: Benchtop Techniques". 2^o ed. Birkhauser, Boston, USA. 520 p.

Vilasoia, M., J. López, M. Lage. 2007. Protein and amino acid contents in the crab, *Chionoecetes opilio*. Food. Chem. 103: 1330-1336.

Wu, Y. V., G. E. Inglett. 1974. Denaturation of plant proteins related to functionality and food applications: A review. J. Food Science. 39: 218-223.