

INHIBICIÓN DE LA PROTEOLISIS MUSCULAR DEL FILETE DE MERLUZA (*Merluccius gayi peruanus*) MEDIANTE EL EMPLEO DE EXTRACTOS DE LEGUMINOSAS

INHIBITION OF HAKE (*Merluccius gayi peruanus*) FILLET MUSCLE PROTEOLYSIS BY MEANS OF LEGUME EXTRACTS

¹Danithza Díaz Díaz, ²Miguel Albrecht-Ruiz

¹Tesis UNALM. ²DGITTP. Instituto Tecnológico de la Producción. Carretera a Ventanilla km 5,2 Callao.

RESUMEN

DÍAZ D, ALBRECHT-RUIZ M. 2013. Inhibición de la proteólisis muscular del filete de merluza (*Merluccius gayi peruanus*) mediante el empleo de extractos de leguminosas. Bol. invest. Inst. tecnol. Prod. Perú 11: 29-34.- Se evaluó el efecto inhibitorio de extractos acuosos de 10 leguminosas sobre tripsina, quimiotripsina y papaína para luego usarlos como inhibidores de proteólisis en merluza. En general, casi todos los extractos mostraron efecto inhibitorio sobre las proteasas estudiadas, destacando el extracto de tarwi amargo *Lupinus mutabilis* como inhibidor de quimiotripsina, los de garbanzo comercial (*Cicer arietinum*), frijol Castilla (*Vigna unguiculata*) y frijol de palo (*Cajanus cajan*) como inhibidores de tripsina y el de garbanzo comercial para la papaína. El garbanzo comercial tuvo el mejor efecto inhibitorio sobre las proteasas en la merluza aunque ésta es menor cuando se encuentra parasitada con mixosporidios.

PALABRAS CLAVE: inhibidores, proteólisis, leguminosas, merluza, parasito, Mixosporidium

ABSTRACT

DÍAZ D, ALBRECHT-RUIZ M. 2013. Inhibition of hake (*Merluccius gayi peruanus*) fillet muscle proteolysis by means of legume extracts. Bol. invest. Inst. tecnol. Prod. Perú 11: 29-34.- We evaluated the inhibitory effect of aqueous extracts of 10 legumes on trypsin, chymotrypsin and papain and were tested as inhibitors of proteolysis in hake. In general, almost all the extracts showed inhibitory effect on proteases studied, highlighting the *Lupinus mutabilis* extract as a chymotrypsin inhibitor, the *Cicer arietinum*, *Vigna unguiculata* and *Cajanus cajan* extracts as trypsin inhibitor and *Cicer arietinum* as papain inhibitor. The *Cicer arietinum* had the best inhibitory effect on proteases in hake although this is lower when hake is parasitized with mixosporidia.

KEYWORDS: inhibitors, proteolysis, legumes, hake, parasite, Mixosporidium.

INTRODUCCIÓN

La merluza (*Merluccius gayi peruanus*) constituye un recurso hidrobiológico importante por su valor nutritivo y económico. Este recurso se encuentra en proceso de recuperación, alcanzando el 2011 un volumen de captura de 33359 t y a junio del 2012 aproximadamente 11011 t (IMARPE 2011) destinándose principalmente para su exportación en forma congelada.

Uno de los principales problemas que afecta el precio de éste recurso es la

presencia de parásitos del género *Kudoa* de la clase Mixosporidea que segrega enzimas proteolíticas capaces de afectar la estructura del músculo. Estudios iniciales sobre la carne parasitada han determinado que temperaturas alrededor de 50 °C afectan la textura de la carne, convirtiéndose en productos con menor firmeza (MATEO 1972), teniendo reportado diversos índices de infestación y condiciones que propician una mayor proteólisis (HUIMAN 1976, SARDELLA et al. 1987). El parásito *Kudoa peruviana*, se localiza principalmente en el músculo de

la merluza y segrega proteasas de elevada actividad; la inadecuada manipulación y conservación postcaptura inadecuados, así como deficiencias en el proceso de congelación facilitan el rompimiento de las bolsas químicas, lo que ocasiona el esparcimiento del líquido proteolítico.

La acción proteolítica sobre el músculo también puede ser endógena, principalmente por las catepsinas presentes en los lisosomas que son responsables de la degradación proteica en las áreas de rompimiento celular (FAO 1998), aunque son poco activas dentro del tejido vivo, entran en actividad al ser liberadas. La catepsina L manifiesta su actividad a 55 °C afectando la textura y consecuentemente la fuerza de gel en *Merluccius argentiniensis* (AN et al. 1992, KUHN 2001). Asimismo, otras proteasas como la catepsina D que digiere principalmente proteínas del tejido conectivo y las calpains (proteasas no lisosomales) son activas a pH fisiológico y están implicadas en el ablandamiento del pescado durante su almacenamiento en refrigeración (SHANN-TZONG 1999).

En las semillas de leguminosas existen proteínas con acción inhibitoria de la actividad proteolítica (PORTER 1992, GARCIA-CARREÑO 1992, GUILLAMÓN et al. 2008). En Perú se tiene una variedad de leguminosas que además de cumplir un rol nutritivo pueden ser utilizadas como fuente de inhibidores de proteasas para ser aplicadas a los filetes de merluza fresca, congelada o en productos derivados del tipo surimi para preservar la integridad de su estructura (SÁNCHEZ et al. 1998, GARCIA-CARREÑO et al. 1996).

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto inhibitorio de algunos extractos acuosos de leguminosas sobre tripsina, quimiotripsina y papaína, a fin de utilizarlos como fuente de inhibidores de proteólisis en filetes de merluzas sanas y parasitadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las leguminosas estudiadas fueron proporcionadas por el Programa de Leguminosas de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), estas fueron: arveja remate (*Pisum sativum*), pallar bebe (*Phaseolus lunatus*), tarwi amargo lircay (*Lupinus mutabilis*), garbanzo comercial (*Cicer arietinum*), frijol castilla Lm 1 (*Vigna*

unquiculata), frijol petaco G35531 (*Phaseolus polyanthus*), frijol híbrido Unagem 2 (*Phaseolus vulgaris*), frijol de palo Perú 2 (*Cajanus cajan*), frijol híbrido Unagem 1 (*Phaseolus vulgaris*), tarwi dulce brasileño (*Lupinus mutabilis*). Las leguminosas fueron molidas hasta ser pulverizadas, se les determinó la humedad y el contenido proteico (Tabla 3) y fueron conservadas hasta por 6 meses en bolsas selladas en ambiente seco a 4 °C hasta su uso. Los ensayos de inhibición proteolítica se realizaron en el Laboratorio Físicoquímico del ITP.

La merluza conservada en hielo, con 4 días de captura, proveniente de Paita fue adquirida en el terminal pesquero de Ventanilla - Callao. Los quince especímenes presentaron una longitud total entre 23 y 28 cm y un peso entre 102 y 181 g, doce de éstos presentaron mixosporidios confirmados por microscopía.

Los extractos de leguminosas que contenían los inhibidores de proteólisis fueron obtenidos con 1 g de leguminosas pulverizadas y 3 mL de TRIS-HCl 50 mM a pH 7,5 (tampón), agitados por 24 horas y centrifugados a 2500 g por 10 min a 4 °C; se recuperaron los sobrenadantes que fueron conservados a -20 °C.

Las soluciones proteolíticas fueron preparadas el día de uso utilizando proteasas comerciales diluidas en tampón: tripsina (TS) y quimiotripsina (QT) 2 UI/ mL y papaína (PA) en concentraciones de 3,5 U mAnson/ mL de tampón; agregándose CaCl₂ 40mM y EDTA 2mM para TS y QT y L-cisteína 4mM para PA.

Los extractos de merluza fueron preparados a temperaturas de refrigeración (< 4 °C), utilizando aproximadamente 5 g de la región dorsal anterior, homogeneizado en mortero con 2 mL de tampón y centrifugado a 5000 g por 30 min; se recuperó el sobrenadante y se mantuvo en congelación hasta por 30 días en alícuotas de 100 uL (AN et al. 1994).

La capacidad de inhibición de las leguminosas fue medida enfrentando las soluciones proteolíticas con los extractos de leguminosas en un tubo de ensayo para medir su reacción frente a azocaseína (GARCÍA-OLMEDO et al. 1987 y 1996), realizándose un barrido de todas las leguminosas a fin de encontrar las de mayor capacidad inhibitoria, y fue trabajada a 25 °C. En la Tabla 1 se detallan las secuencias y volúmenes utilizados para determinar la inhibición.

Tabla 1.- Secuencias y volúmenes requeridos para determinar las absorbancias sobre tripsina, quimiotripsina, papaína y extracto de merluza.

	Sin Inhibidor (si)	Blanco (bl)	Con Inhibidor (ci)
Tampón (uL)	480	480	460
Sol. proteolítica (uL)	20	20	20
Extracto leguminosa (uL)	-	-	20
Incubación por 60 minutos a 25 °C			
TCA (20%) (uL)	-	500	-
Azocaseína 1% (uL)	500	500	500
Incubación por 60 minutos a 25 °C			
TCA (20%) (uL)	500		500
Centrifugar 2000 rpm, 10 min, T° ambiente			
Lectura de absorbancia a 366 nm			

Tabla 2.- Secuencias y volúmenes requeridos para determinar las absorbancias sobre extracto de merluza a 55 °C.

	Sin Inhibidor (si)	Blanco (bl)	Con Inhibidor (ci)
Extracto de Merluza (uL)	50	50	50
Tampón Tris (uL)	50	-	-
Extracto leguminosa (uL)	-	50	50
Incubar a 55° C por 60 min			
sobrenadante	50	50	50
TCA (50%) (uL)	-	200	-
Azocaseína 0,45% en tampón (uL)	1150	1150	1150
Incubar a 55 °C por 30 min			
TCA 50%	200	-	200
Dejar en frío por 10 min, centrifugar a 12300 rpm por 5 min			
Leer absorbancia a 366 nm			

Para hallar el porcentaje de inhibición se empleó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = [(A_{si} - A_{bl}) - (A_{ci} - A_{bl})] / (A_{si} - A_{bl})$$

Donde:

A_{si} = Absorbancia sin inhibidor,

A_{bl} = Abs. blanco, A_{ci} = Abs. con inhibidor

Una vez seleccionados los extractos con mayor porcentaje de inhibición, éstos fueron evaluados en los extractos de merluza incubados a 55 °C a fin de potenciar la acción proteolítica de la merluza (PORTER 1992). La Tabla 2 detalla las secuencias y volúmenes empleados:

Para identificar a los inhibidores de proteasas, aproximándonos a su peso molecular, se realizaron corridas electroforéticas en paralelo; una en condiciones desnaturizantes SDS-PAGE (LAEMMLI 1970) y otra en condiciones no desnaturizantes; en esta segunda condición los geles fueron sumergidos en una solución que contenía caseína al 2% por 30 mi-

nutos a 4 °C y luego en la solución de proteasas (TS, QT o PA en concentración similar antes mencionada) por 90 minutos al ambiente a fin de hidrolizar toda la proteína embebida en el gel, salvo en los sitios donde el inhibidor estuviese presente, para luego colorear con Comassie las zonas donde la inhibición proteolítica fuese efectiva (GARCÍA-CARREÑO et al. 1993).

Para la comparación de la capacidad inhibitoria de los extractos de leguminosas se aplicó un diseño de Bloque Completo al Azar (DBCA) con diez tratamientos y tres bloques con tres repeticiones. Se aplicó un análisis de variancia (ANOVA) a los resultados y una prueba de comparaciones de Tukey con un nivel de confianza de 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 2 se presentaron los contenidos proteicos de los extractos de leguminosas se mantuvieron entre los 4,88 y 13,17 mg/mL

en el frijol híbrido y el garbanzo comercial respectivamente, resultados que difieren a lo reportado por RAMÍREZ et al. (2002) quienes encontraron para estas especies valores de 10,1 y 4,3 mg/mL; las diferencias podrían deberse a las condiciones de cultivo, clima, suelo, nutrición, variedad, etc.

Efecto de los extractos de leguminosas sobre la inhibición de quimi tripsina (QT), tripsina (TS), papaína (PA) y extractos de merluza parasitada.

Todos los extractos mostraron efecto inhibitorio sobre QT, TS y PA, excepto el tarwi dulce brasileño sobre QT y los frijoles petaco e híbrido Unagem 1 sobre PA. Cabe resaltar que la variedad amarga del tarwi tuvo un mayor efecto inhibitorio que su variedad dulce sobre QT, indicándonos que el contenido de inhibidores proteolíticos varía dentro de una misma especie. Los extractos de las leguminosas mostraron diferentes porcentajes de inhibición sobre QT y TS ambas serin-proteinasas; siendo en la mayoría de los casos más efectiva sobre la TS.

La papaína (cisteín-proteína) también mostró inhibición pero en menor grado, observándose variaciones en una misma especie.

Los porcentajes de inhibición del presente trabajo y los reportados por diversos autores (SÁNCHEZ et al. 1998, GARCÍA-CARREÑO 1996, LEÓN et al. 1993, HOVE & KING 1979) presentan grandes variaciones, llevando a pensar que la presencia de los diversos inhibidores proteo-

líticos en las leguminosas estaría relacionada a diferencias en ecotipos, nutrición, grado de desarrollo de la planta, etc.

El porcentaje de inhibición en el extracto de merluza parasitada a 25 °C, fue menor observándose que muchas leguminosas no presentaron efecto inhibitorio. El garbanzo y el frijol de palo mostraron porcentajes considerables de inhibición (50% y 37,5% respectivamente) y en menor grado el frijol castilla y el pallar (25% y 12,5%).

Identificación de las proteínas de leguminosas con capacidad inhibitoria de proteólisis (Fig. 1, 2, 3 y 4).

La Figura 1 muestra el patrón electroforético en SDS-PAGE de pallar bebe (*P. lunatus*), frijol castilla (*V. unguiculata*) y frijol de palo (*C. cajan*); las bandas corresponden a proteínas con pesos moleculares entre 26 y 84 KDa aproximadamente, mostrando un perfil diferenciado de bandas para cada leguminosa escogida.

Las Figuras 2, 3 y 4 corresponden a los geles trabajados en condiciones no desnaturalizantes y posteriormente sometidos a la acción de QT, TS y PA respectivamente a 25 °C. Los geles muestran la presencia de inhibidores de diferente PM para cada proteasa.

Siendo QT y TS serin-proteinasas, los inhibidores proteicos obtenidos de la misma especie no presentaron las mismas bandas (Figuras 2 y 3), al parecer las diferentes

Tabla 3.- Porcentaje de inhibición proteolítica de extractos de semillas de leguminosas.

Extracto de semilla	Proteína mg/ml	Humedad %	% Inhibición			
			Quimi tripsina	Tripsina	Papaína	Merluza
Arveja remate (<i>Pisum sativum</i>)	6,58	10,2	12,25 ^f	51,85 ^f	46,41 ^b	0,0 ^e
Pallar bebe (<i>Phaseolus lunatus</i>)	11,95	11,5	65,49 ^b	71,87 ^c	24,96 ^d	12,5 ^d
Tarwi amargo lircay (<i>Lupinus mutabilis</i>)	10,00	8,7	80,74 ^a	36,36 ^g	17,77 ^e	0,0 ^e
Garbanzo comercial (<i>Cicer arietinum</i>)	13,17	10,3	46,96 ^c	83,4 ^b	65,83 ^a	50,0 ^a
Frijol castilla Lm 1 (<i>Vigna unguiculata</i>)	5,85	10,3	65,18 ^b	90,92 ^a	45,00 ^b	25,0 ^c
Frijol petaco G35531 (<i>Phaseolus polyanthus</i>)	4,88	8,8	35,86 ^e	71,49 ^c	0,00 ^g	0,0 ^e
Frijol híbrido Unagem 2 (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	5,36	9,0	67,00 ^b	62,12 ^d	31,80 ^c	0,0 ^e
Frijol de palo Perú 2 (<i>Cajanus cajan</i>)	9,02	9,1	42,44 ^d	89,68 ^a	32,83 ^c	37,5 ^b
Frijol híbrido Unagem 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	4,88	9,1	67,67 ^b	60,38 ^d	0,00 ^g	0,0 ^e
Tarwi dulce brasileño (<i>Lupinus mutabilis</i>)	5,85	6,0	0,00 ^g	54,59 ^e	11,78 ^f	0,0 ^e

* En cada columna las medias con letras iguales no son significativamente diferentes ($p > 0,05$); Tukey ($\alpha = 0,05$)

proteínas inhibidoras de proteólisis actúan sobre sitios diferentes.

El extracto del garbanzo presentó la mayor capacidad de inhibición en todos los extractos enzimáticos evaluados, asimismo el mayor porcentaje de proteína en el extracto soluble (Tabla 3). La electroforesis para esta leguminosa no permitió una separación eficiente de las bandas proteicas, no lográndose una identificación de pesos moleculares (gel con muchas bandas juntas) y que indicarían la presencia de una gran cantidad de proteínas con diversas capacidades de inhibición proteolítica.

Actividad proteolítica en merluza y su inhibición a 55 °C (Tabla 4).

De la experiencia de barrido inicial con merluza parasitada solo mostraron capacidad inhibitoria: pallar bebe, garbanzo comercial, frijol castilla y frijol de palo (Tabla 3). Se escogieron estos extractos para luego ser enfrentados a extractos de merluzas no parasitadas y parasitadas a 55 °C (temperatura de exacerbación de la proteólisis). El pallar bebe cuya inhibición fue bastante pobre a 25 °C, a esta nueva temperatura no mostró capacidad inhibitoria; mientras que los extractos del garbanzo y frijoles castilla y palo mostraron capacidad inhibitoria considerable a 25 °C pudiendo ser de interés potencial para la inhibición de la proteólisis de la merluza.

La inhibición en la merluza parasitada fue menor que en la sana; posiblemente los inhibidores de las leguminosas escogidas son menos activos en las proteasas de los mixosporidios.

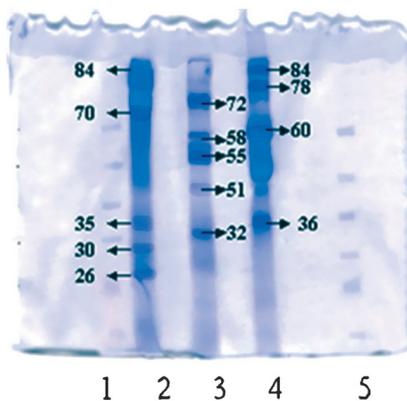


Fig. 1: Patrón electroforético de extractos de *P. unguiculata* (carril 2), *V. unguiculata* (carril 3) y *C. cajan* (carril 4). Carril 1 y 4 marcador de PM

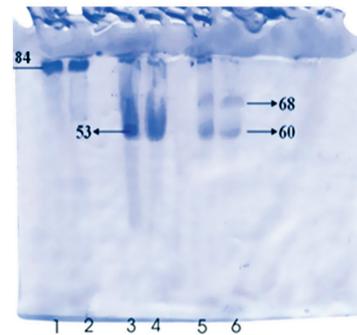


Fig. 2: Patrón electroforético de la inhibición de la quimi tripsina en gels no denaturantes. Extractos de *P. unguiculata* (carriles 1 y 2), *V. unguiculata* (carriles 3 y 4) y *C. cajan* (carriles 5 y 6).

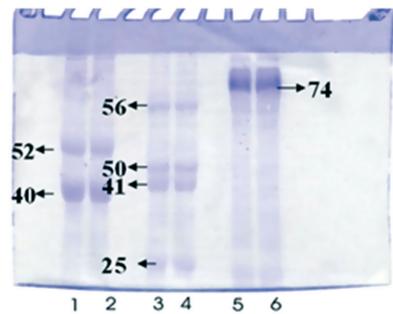


Fig. 3: Patrón electroforético de la inhibición de la tripsina en gels no denaturantes. Extractos de *P. unguiculata* (carriles 1 y 2), *V. unguiculata* (carriles 3 y 4) y *C. cajan* (carriles 5 y 6).

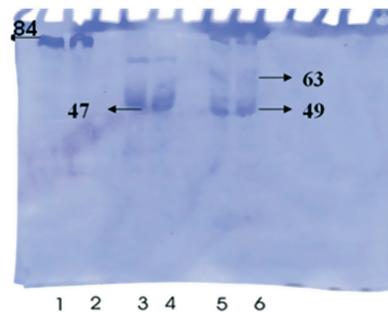


Fig. 4: Patrón electroforético de la inhibición de la papaína en gels no denaturantes. Extractos de *P. unguiculata* (carriles 1 y 2), *V. unguiculata* (carriles 3 y 4) y *C. cajan* (carriles 5 y 6).

Tabla 4.- Efecto inhibitorio expresado en porcentaje sobre la actividad proteolítica en merluzas parasitadas y no parasitadas

Leguminosa	Merluza no parasitada	Merluza parasitada
Garbanzo (<i>C. arietinum</i>)	75,0 ^a	29,7 ^a
Frijol de palo (<i>C. cajan</i>)	41,6 ^b	25,4 ^a
Frijol castilla (<i>V. unguiculata</i>)	35,4 ^c	34,0 ^a
Pallar bebe (<i>P. lunatus</i>)	0 ^d	0 ^b

En cada columna, medias con letras iguales no presentan diferencia significativa ($p > 0,05$)

CONCLUSIONES

1. Los extractos de leguminosas cultivadas en Perú presentan proteínas que inhiben la actividad de la tripsina, quimiotripsina y papaína; sin embargo esta capacidad de inhibición es menor en las proteasas presentes de la merluza tanto sana como parasitada.
2. El garbanzo comercial fue quien presentó mayor capacidad de inhibición sobre las proteasas de la merluza, aunque esta inhibición es menor cuando se encuentra parasitada con mixosporidios.

AGRADECIMIENTO

La autora principal agradece al ITP por el financiamiento, facilidades en el uso de las instalaciones, equipos y el apoyo de los profesionales en la ejecución de este trabajo de investigación, el cual fue desarrollado como tesis para la obtención del Grado de Magister en la UNALM.

REFERENCIAS

1. AN H, CHUN Y, MORRISSEY M. 1992. Proteolysis of Pacific Whiting and Its Inhibition. Pacific Whiting Harvesting, Processing, Marketing, and Quality Assurance. Oregón. 60(6):36-37.
2. FAO. 1988. El pescado fresco su Calidad y Cambios de su Calidad. Cap. 5. Cambios post mórtem en el pescado. Ed. Huss, H. FAO. Documento Técnico de Pesca. pp 348.
3. GENOVESE M, LAJOLO F. 2001. Trypsin inhibitory activity of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) critical evaluation of methods for determination. Arch. Lat. Nutr. 51 (4): 386-394.
4. GARCIA-OLMEDO, SALCEDO F, MONGE R, GOMEZ I, ROYO J, CARBONERO P. 1987. Plant Proteinaceous

- inhibitors or proteinases and amylases. Oxford Surveys Plant Molecular Cell. Biol. (373): 477-482.
5. GARCIA-CARREÑO F. 1992. Protease inhibition in theory and practice. Biotech. Education (3): 145-150.
6. GARCÍA-CARREÑO F, DIMES L, HAARD N. 1993. Substrate gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or porteinaceous proteinase inhibitors. Analytical biochemistry 214: 65-69
7. GARCIA-CARREÑO F, NAVARRETE M, DIAZ-LOPEZ M, HERNÁNDEZ-CORTEZ M, EZQUERRA J. 1996. Proteinase Inhibition of Fish muscle Enzymes Using Legume Seed Extracts. J. Food Protection (59): 312-318.
8. GUILLAMÓN E, PEDROSA M, BURBANO C, CUADRADO C, CORTES-SÁNCHEZ M, MUZQUIZ M. 2008. The trypsin inhibitors present in seed of different grain legume species and cultivar. Food Chem. 107, (1): 68-74.
9. HOVE H, KING S. 1979. Trypsin Inhibitor contents of lupin seeds and other grain legumes. J. Agric. Research (22): 41-42
10. HUIMAN J. 1976. Estudio de los factores que aceleran la Mixosporidiosis en la merluza peruana (*Merluccius gayi peruanus*) y su relación con la textura muscular. Tesis para optar el grado de Ingeniero en Pesquero. Universidad Nacional Federico Villarreal. Facultad de Oceanografía y Pesquería. 70 p.
11. LAEMMLI U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
12. MATEO E. 1972. Investigación parasitológica en Merluza (*Merluccius gayi peruanus*). IMARPE, informe N 40.
13. PORTER R. 1992. Use of Potato Inhibitor in Pacific Whiting surimi., M. Pacific Whiting Harvesting, Processing, Marketing, and Quality Assurance. Editor Morrissey M. Oregón: 33-35.
14. RAMÍTEZ J, GARCÍA O, SÁNCHEZ A. 2002. Inhibition of modori associated proteinases by legume seed extracts in surimi production. J. Food Sci. 67 (2):
15. SÁNCHEZ A, RAMÍREZ J, MORALES O, MONTEJANO J. 1998. Detección de Inhibidores de Proteasas en Extractos de Leguminosas y su efecto sobre Proteasas endógenas del músculo de pescado. Ciencia y Tecnología Alimentaria. 2 (1): 12-19.
16. SARDELLA S, TRINCHERO J, MANCA E. 1987. Efectos del deterioro producido por Mixosporidio de la especie *Kudoa rosenbuschi* en la musculatura de *Merluccius hubbsi*. Res. Inves. Dest. Pesq. (7): 105-112
17. SHANN-TZONG J, GEN-HUNG C. 1999. Effect of cathepsins B, L, L-like and calpain on the protein degradation of surimi. Quality attributes of Muscle Foods. Edited by Xiong et al. Kluwer Academic/ Plenum Publisher. New York.