



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA



EXTRACCIÓN DE CAROTENOPROTEÍNAS DE CEFALOTÓRAX DE CAMARÓN EMPLEANDO UNA PROTEASA COMERCIAL

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUÍMICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

QUÍMICO DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

ROLANDO SALVADOR GARCÍA GÓMEZ



MÉXICO, D.F.,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1997

18
21



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado según el tema:

Presidente	Profra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa
Vocal	Profra. Víctor Manuel Luna Pabello
Secretario	Profra. Hilda Elizabeth Calderón Villagómez
1er suplente	Profra. Rut Villaseñor Gutiérrez
2do suplente	Profra. Amanda Gálvez Mariscal

Sitio donde se realizó el tema:

**FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM
CIUDAD UNIVERSITARIA, 04510 MÉXICO D.F.**

- (1) Laboratorio del grupo de investigación de tecnologías más limpias
Laboratorio B-201**
- (2) Laboratorios del Programa de Ingeniería Química Ambiental y Química Ambiental**
- (3) Laboratorio del Departamento de Alimentos y Biotecnología E-312 y 4A del edificio B de la
Facultad de Química de la UNAM**

Asesor del tema

Dra-Ing. CARMEN DURÁN DE BAZÚA _____

Supervisión técnica

Dra. AMANDA GÁLVEZ MARISCAL _____

Sustentante:

ROLANDO SALVADOR GARCÍA GÓMEZ _____



DEDICATORIAS

A Dios: Por dejarme concluir exitosamente una de las etapas mas importantes de mi vida, por no alejarse de mi vida en los momentos difíciles y por darme la bendición de contar aún con mis padres.

A mis padres quienes me dieron la vida:

María de los Angeles Jimoy Mercado, quien me enseñó a dar mis primeros pasos y ha estado conmigo en todas las adversidades y momentos importantes y *Honorable García Pérez*, ya que gracias a su apoyo pude terminar mis estudios.

A mis hermanos: *Estrella, Jorge, Marco y Ana Lucía*, porque a pesar de las diferencias tan grandes de edades y caracteres, siempre fueron un ejemplo a seguir y gracias a ellos pude comprender mejor mi espacio-tiempo en la vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora *María del Carmen Durán Domínguez de Bazás* por la dirección y apoyo recibido para la realización de esta tesis experimental, y por brindarme la oportunidad de formar parte del grupo de investigación de Tecnologías Limpias y del PIQAYQA.

A la Doctora *Amanda Galvez Mariscal* y la M. C. *Idalia Flores Argüello* por la asesoría técnica y facilidades recibidas durante la realización de la parte experimental, así como también, por sus acertados comentarios y recomendaciones durante la elaboración de esta tesis.

Al jurado revisor por la colaboración, tiempo y esmero dedicado para la rápida revisión de la tesis.

A la Secretaría de Actualización y Superación Académica (S. A. S. A) por la ayuda recibida en los subprograma 121 "*Iniciación a la Docencia*" y 127 "*Iniciación a la Investigación*".

Al Doctor *Karl Eitram Nagel* por el apoyo otorgado durante la culminación de este proyecto y por la formación técnica recibida con la ayuda del convenio UNAM-GTZ.

A la Maestra *Lidia Virna García*, por su amistad y apoyo durante mi formación docente.

A la maestra *Lucía Consejo Barrera* por su ayuda incondicional y ejemplo de calidad humana.

A la Q. F. B. *Rosalinda Velizquez Salgado* responsable de la sección de Bioquímica aplicada, por la constante ayuda recibida

A la maestra *Adriana Mejia Charoy* por el apoyo y consejos incondicionales que siempre me ha brindado.

A los Laboratoristas del 4A "*Don Arturo*" y del 4B "*Don Juanito*" por estar siempre al servicio de los alumnos durante y fuera de la realización de las prácticas.

A la secretaria del PIQAYQA la *Sra. Irene González Palacios* por su dedicación, ayuda y amistad.

A mis amigos de la Secundaria y Preparatoria: *Marcos, Angel, Eddy, Tere, Manu, Rocky, Gabriel*, ya que gracia a su amistad muchas veces fueron un aliciente para continuar en este camino.

A mis amigos de carrera: *Aida de Aida, Aida Melanio, Dulce, Marisol, Rocío, Rosalena, Lulu, Anthoni, M+, Elena, Karla, y Eider* por formar parte de los gratos recuerdos de esta Facultad y por su invaluable amistad.

A mis amigas del laboratorio 201 "Tecnologías Limpias": *Gaby "Vida mia" y Anel*, Ya que gracias a las experiencias compartidas y su comprensión superé momentos difíciles. ¡Gracias por ser mis amigas!

A mis amigos(as) de los laboratorios B-201 y del E-301: *Frida, Pety, Pandiyan, Martha, Pety W, Pety S, Ma, Elena, Vera, Tania, Maricela, Rosy y Sandy* por su compañerismo y comprensión.

Con un reconocimiento especial, quiero agradecer, a *Luis Gerardo Sánchez Pacheco*, ya que gracias a su valiosa cooperación, pude terminar mi mas valioso objetivo.. Así mismo, quiero agradecer la amistad incondicional que siempre me ha brindado y que gracias a ella, he aprendido a superar obstáculos y he tomado decisiones importantes en mi vida ¡*Gracias!*

A mis padrinos *Tomy y Federico* por confiar en mi, y ser un ejemplo de lucha

A *todos los maestros* que estuvieron involucrados a lo largo de mi vida y que gracias a ellos pude terminar esta meta.

A la *Universidad Nacional Autónoma De México* por formarme como profesionista y por brindarme la oportunidad de trabajar en ella.

A las personas que han compartido momentos importantes en mi vida y que por no estar aquí no son menos importantes. ¡*Gracias!*

ÍNDICE

	página
RESUMEN	1
1. ANTECEDENTES	2
1.1 Problemática	2
1.2 Objetivos	7
1.2.1 <i>Objetivo general</i>	8
1.2.2 <i>Objetivos particulares</i>	8
2. FUNDAMENTO TEÓRICO	9
2.1 Colorantes naturales	9
2.1.1 <i>Pigmentos carotenoides</i>	9
2.1.2 <i>Estructura</i>	10
2.1.3 <i>Reacciones químicas</i>	12
2.1.4 <i>Usos y funciones de la astaxantina</i>	13
2.2 Proteínas	14
2.2.1 <i>Definición y funciones de las proteínas</i>	14
2.2.2 <i>Organización estructural</i>	16
2.2.3 <i>Clasificación</i>	17
2.2.4 <i>Cuantificación</i>	18
2.3 Enzimas	18
2.3.1 <i>Definición</i>	18
2.3.2 <i>Clasificación de enzimas</i>	19

2.4	Hidrólisis de proteínas empleando proteasas	20
2.4.1	<i>Empleo de la proteasa alcalina PA-3000 para la obtención de carotenoproteínas</i>	22
3.-	MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1	Equipo empleado	24
3.2	Desarrollo experimental	24
3.2.1	<i>Preparación de la muestra</i>	24
3.2.2	<i>Lavado</i>	24
3.2.3	<i>Secado</i>	25
3.2.4	<i>Molienda y tamizado</i>	25
3.2.5	<i>Desmineralización de la harina</i>	25
3.2.6	<i>Secado</i>	26
3.2.7	<i>Almacenamiento</i>	26
3.3	Caracterización de la muestra	27
3.4	Proteólisis enzimática	27
3.4.1	<i>Proteólisis enzimática en caseína</i>	27
3.4.2	<i>Proteólisis enzimática con harina de cefalotórax de camarón como sustrato</i>	29
3.5	Cuantificación de carotenoproteínas	30
3.6	Determinación de pigmentos	31
3.6.1	<i>Purificación y cuantificación de pigmentos</i>	31
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
4.1	Caracterización de la harina de cefalotórax de camarón	34

4.2	Desmineralización de la harina empleando diferentes concentraciones de EDTA	35
4.3	Comparación de la cantidad de aminoácidos tanto de la harina entera y desmineralizada como de las carotenoproteínas	35
4.4	Experimentos de hidrólisis con Proteasa alcalina 3000 en caseína	37
4.5	Experimentos de hidrólisis con Proteasa alcalina 3000 en harina de cefalotórax de camarón	37
4.6	Análisis de varianza entre las concentraciones de E/S probadas	40
4.7	Determinación de pigmentos carotenoides totales en harinas de cefalotórax de camarón (entera y desmineralizada) y en carotenoproteínas	41
4.8	Identificación de pigmentos en harina y en carotenoproteínas	44
4.9	Estimación de la vida media de las carotenoproteínas	44
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	46
	BIBLIOGRAFÍA	48
	ANEXO 1 FUNDAMENTO DE LOS MÉTODOS EMPLEADOS	52
	Determinación de proteína soluble por el método de Lowry-SDS	52
	Determinación del % de nitrógeno por el método Macro-Kjeldahl	53
	Determinación de humedad	54
	Determinación de cenizas	54
	Determinación de grasa cruda	55
	Determinación de fibra cruda	55

Técnica de hidrólisis para la determinación de aminoácidos	56
Calificación química o "score" químico	58
ANEXO 2 DATOS EXPERIMENTALES	59
ANEXO 3 DATOS PRELIMINARES COMPARATIVOS DE EFICIENCIA DE SEPARACIÓN	69
Rendimiento de complejo carotenoproteína con respecto a harina de cefalotórax de camarón	69
Aproximación del tiempo de proceso y gasto energético a nivel laboratorio	71

RESUMEN

El cefalotórax de camarón ó "cabeza de camarón" representa actualmente un subproducto aprovechable por su alto contenido de proteína, quitina y pigmentos. El empleo del cefalotórax evita la contaminación ocasionada al arrojar este "desperdicio" a tiraderos municipales y lechos marinos, ya que anualmente son generadas 43,000 toneladas que pueden ser reaprovechadas. Un ejemplo lo representan los pigmentos rosados del camarón. El costo de la astaxantina comercial, vendida por la compañía Hoffman -La Roche (Suiza), se encuentra entre 2,000 y 2,500 dólares/kg dependiendo de su calidad y contenido de astaxantina (p.ej., 8% es astaxantina y el resto, 92%, lo constituyen los vehículos de dispersión), es decir, 80 gramos de astaxantina se comercializan desde aproximadamente \$20,000 hasta \$200,000 pesos mexicanos, dependiendo del contenido de pigmento. Entre los usos que se les pueden dar a las carotenoproteínas se encuentran los de pigmentar la piel y tejidos de especies acuícolas como salmones y truchas arcoiris aumentando de esta forma su valor comercial. En el presente trabajo se utilizó el cefalotórax de camarón para obtener pigmentos asociados a proteínas (carotenoproteínas) empleando una enzima proteolítica de actividad probada que permitiera hidrolizar al cefalotórax y obtener pigmentos con mayor estabilidad, para lo cual se caracterizó tanto la harina de camarón (análisis proximal), como la enzima (actividad enzimática y % de solubilidad en TCA) sobre un sustrato conocido (caseína al 99%) para posteriormente emplearla sobre la harina de cefalotórax de camarón. La harina de cefalotórax fue sometida a diferentes tiempos de hidrólisis (10, 20, 40, 60, 120, 180 minutos) utilizando una proteasa alcalina (PA-3000 ENMEX S. A. de C. V.) con una relación de E/S de 0.33 % (6.69 U/g proteína), de 1% (20.33 U/g proteína) y de 3% (61.017 U/g proteína) en valores de pH de 9.5 y temperatura de 50°C. Con la ayuda del análisis de varianza con un 99% de confiabilidad se determinó la relación óptima, resultando ser del 1%, ya que al cabo de 2 horas de reacción, se obtiene la máxima cantidad de proteína soluble, P.S. (33.06 mg P.S./mL.), en tanto que la máxima cantidad de pigmentos carotenoides se obtienen al cabo de 60 minutos de hidrólisis (17.57mg de carotenoides/g de carotenoproteínas), determinados espectrofotométricamente. Esto se obtuvo a partir de 2.5g de harina desmineralizada de cabezas de camarón (51g de cabezas frescas de camarón). Se comprobó la estabilidad del pigmento en las carotenoproteínas al ser comparadas durante tres semanas con los pigmentos aislados con disolventes orgánicos. Si se considera este rendimiento y el precio de venta más bajo para el pigmento contenido en el complejo carotenoproteínico, es posible pagar no solamente los precios de obtención del complejo, sino obtener ganancias a partir de su venta.

I. ANTECEDENTES

1.1 Problemática

La industria acuícola en México ha tenido un notable crecimiento en los últimos 5 años, siendo el camarón uno de los principales productos acuícolas de mayor demanda en el mercado mundial. Durante 1995 fueron capturados alrededor de 86 mil toneladas de camarón en los litorales del Golfo de México y del Pacífico, siendo el estado de Sinaloa la entidad federativa que obtuvo en ese año la mayor producción de camarón (29,983 T). Este volumen representó para nuestro país un importante aporte de divisas debido a los altos volúmenes de exportación (34,716 T, con una generación aproximada de 5 442,974.0 USD) (SEMARNAP, 1995).

El consumo de pescados provenientes de granjas acuícolas constituye del 10 -15 % del total de la producción acuícola a nivel mundial, destacando entre estas especies el salmón y la trucha arcoiris. Se calcula que tres de cada 10 salmones consumidos en el mundo son criados en granjas acuícolas y se espera que para el año 2000 se cultiven 460,000 T de salmones. En 1990, mas de 200,000 T de salmón fueron producidos, principalmente en Noruega, abarcando prácticamente todo el mercado del Atlántico y se espera que para el año 2000, países como Chile, Canadá y Japón comprendan el mercado del Pacífico (Johnson, 1991).

La porción comestible del camarón constituye solo el 50%, siendo la parte restante el cefalotórax ó "cabeza" de camarón, fracción no comestible que representa un volumen aproximadamente de 43,000 T de desechos que son generados anualmente. En nuestro país, solo una mínima parte de la cabeza de camarón es utilizada con fines estrictamente culinarios, ya que son secadas y molidas para preparar platillos típicos y caldos o también

este producto puede ser utilizado en la elaboración de alimentos para animales cuando se desean altas concentraciones de proteína (Desrosier, 1986). Por otra parte, la gran mayoría de estos desechos son arrojados a tiraderos municipales o a lechos marinos, causando problemas de contaminación por la gran cantidad de sólidos en suspensión (materia orgánica) y presentar una demanda bioquímica de oxígeno (DBO) muy elevada, limitando la cantidad de oxígeno disuelto en el medio (No y Meyers, 1989). La riqueza del cefalotórax de camarón en lo que respecta a quitina, proteína y pigmentos, lo convierte en una fuente susceptible de ser procesada para obtener subproductos útiles en las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica (Huei-Mei-Chen, y Meyers, 1983; Knorr, 1991).

La quitina es el más abundante de los aminopolisacáridos, se encuentra formando la pared celular de vegetales y microorganismos y constituye aproximadamente el 30% del exoesqueleto de crustáceos e insectos (Knorr, 1984; Pine y col., 1986). En algunos biopolímeros permanece asociada a proteínas por medio de enlaces peptídicos, lo cual le da a la molécula cierta estabilidad (Gabriel y col., 1984).

La quitosana es el derivado más importante de la quitina, su obtención comercial se realiza mediante una desacetilación alcalina de la quitina con NaOH al 50% a temperatura de ebullición durante 3 horas (Muzzarelli, 1978; Knorr, 1984). Tanto la quitina como la quitosana poseen numerosas aplicaciones en los ramos alimentario, médico, farmacéutico, cosmetológico y biotecnológico (Knorr, 1984; Nawal y Narang, 1990).

La secuencia de aminoácidos que conforman a las proteínas del cefalotórax de camarón incluyen a todos los aminoácidos esenciales y constituyen aproximadamente el 50% del peso seco del cefalotórax (I. I. B. B., 1995). Estas proteínas son empleadas como una fuente alimenticia y como formulación para preparar medios de cultivo (Bough y col., 1978).

Las sales minerales, principalmente fosfatos y carbonatos de calcio, constituyen el segundo componente más abundante en el cefalotórax (27% aproximadamente), se encuentran asociadas a la quitina y proteínas, otorgándole una dureza característica al exoesqueleto del crustáceo. Sin embargo, se ha observado que un exceso de sales de calcio pueden causar deficiencias de manganeso en peces al emplear el cefalotórax directamente en la formulación de las dietas para especies acuícolas. Por ello es recomendable realizar una desmineralización previa (Spinelli y col., 1974). De acuerdo con Velázquez (1995), los pigmentos que se encuentran conformando a las carotenoproteínas forman parte del grupo de las xantófilas (forma oxidada de los carotenos), de los cuales son pigmentos representativos de este grupo los siguientes pigmentos: la luteína, que en la flor de compasúchil (*Tagetes erecta*) se emplea para proporcionar una coloración deseada en la yema de huevo de especies avícolas, así como también al plumaje y piel de las mismas; la capsantina, la cual es causante del color rojo característico del pimiento rojo (*Capiscum annum*); la zeaxantina, que junto con la luteína representa la mayor proporción de las xantófilas encontradas en el maíz amarillo; la criptoxantina, que es una de las xantófilas más conocidas, encontrándose principalmente en la naranja, el maíz y la papaya; la cantaxantina y astaxantina se encuentran formando los pigmentos responsables de plumajes, piel y tejidos de aves, crustáceos, algas y microorganismos, entre otras (Counsell, 1981; Badui, 1990; Velázquez, 1995).

De los pigmentos antes mencionados, la astaxantina es el colorante empleado comúnmente para teñir plumajes y tejidos de especies avícolas y acuícolas como son flamencos, salmones, trucha salmonada y arcoiris, ya que estos grupos no pueden sintetizar "de novo"

estos pigmentos y es necesario adicionarlos en su dieta para que adquieran la coloración rosa-anaranjada característica en estas especies (Johnson, 1991).

El grado de fijación y asimilación del pigmento en piel y tejidos a través de la pared intestinal depende de factores como son: edad, sexo, época del año, madurez sexual, estructura química del caroteno que se ingiera, proporción cis en que se encuentre, esterificación y de la asociación con lípidos, proteínas u otros compuestos que promuevan la absorción. Cabe mencionar que los mamíferos presentan una mejor absorción de β -carotenos, mientras que peces y aves absorben mejor las xantófilas (Schiedt y col., 1985; Johnson, 1991).

Los productores de salmones y trucha arcoiris están interesados en brindar al consumidor especies con coloraciones idénticas a las que adquieren en su hábitat natural, ya que dependiendo de la pigmentación que presenten tendrán una mayor aceptación por parte de los consumidores, incrementándose consecuentemente su valor comercial. El pigmento preferido por los productores de estas especies es la astaxantina natural, debido a que se obtiene una mejor fijación en piel y tejidos de este pigmento en las especies antes mencionadas, sin embargo, como su fuente de obtención se encuentra muy limitada, utilizan alternativamente la astaxantina sintética, la cual fue aprobada en mayo de 1995 por la United States Food and Drug Administration (FDA) en dosis que van de 4-10 mg de astaxantina/kg de alimento y la cual es producida por la compañía Hoffman-La Roche (Suiza) con un costo que fluctúa entre los 2,000 y 2,500 U.S. dólares. El costo del pigmento eleva de un 10-15% el costo total de la formulación para las dietas de estas especies, por lo que muchas veces no es accesible la compra del pigmento sintético y es necesario recurrir a otra fuente de obtención del pigmento más viable, por lo que es necesario proponer

procesos mas accesibles para los productores y de esta forma poder disminuir los costos al consumidor (Johnson, 1991; Fang y Chiou, 1996).

La importancia de los carotenoides, en general, no solo radica en la importancia atribuida a la coloración que proveen en la naturaleza, sino porque poseen diversas funciones metabólicas en animales y en el hombre incluyendo su conversión a vitamina A y la de actuar como agentes anticancerígenos debido a su capacidad de capturar radicales libres (Badui, 1990). Actualmente se conocen tres vías principales para la obtención de astaxantina

1) *Síntesis química* -En la actualidad la compañía Hoffman-La Roche (Suiza) es la empresa que produce la trans-astaxantina con el nombre comercial de "Roxanthin" ó "Carophyll red". El contenido del principio activo es de 8% de astaxantina, no excediendo el 2% del isómero cis y en cuyo excipiente contiene grenetina, sacarosa, almidón, ascorbipalmitato, y etoxiquín como antioxidante, sin embargo los altos costo de su comercialización impiden muchas veces el acceso de este colorante limitando consecuentemente su uso (Johnson, 1991).

2) *Fuentes microbianas*.-La astaxantina puede obtenerse por medio de levaduras del género *Phaffia* (aislada durante los años 70's de exudados de residuos de árboles en Japón, Alaska y lo que antiguamente era la URSS), las cuales se caracterizan por presentar colonias rojo-anaranjadas debido a la síntesis de pigmentos carotenoides. El contenido de astaxantina en la cepa silvestre es de 500 µg del total de carotenoides, de los cuales el 40-90% corresponde a astaxantina (pudiendo variar el contenido de carotenoides dependiendo de la cepa que se maneje); sin embargo, se pueden presentar algunos problemas técnicos en el momento de extracción del pigmento (ruptura de la pared celular por medio de enzimas digestivas), así

como una baja absorción de astaxantina por parte de algunas especies, como son las truchas arcoiris y una posible inestabilidad del pigmento al extraerse con solventes orgánicos (Johnson, 1991).

*J)Crustáceos.-*Caparazones de crustáceos como lo es el cefalotórax de camarón poseen entre otros pigmentos, carotenoides (astaxantinas), los cuales son utilizados para pigmentar salmones y truchas arcoiris y salmonada; sin embargo, debido al alto contenido de sales y cenizas que presentan los exoesqueletos de estos crustáceos, se obstaculiza la absorción del pigmento en los tejidos de estas especies y por consiguiente se obtiene una baja absorción de astaxantina, repercutiendo en la coloración final de las especies y en los costos de venta del producto (Johnson, 1991). Dado lo anterior se propone una metodología para la extracción de pigmentos asociados a proteínas empleando una enzima proteolítica de actividad probada por Escobedo (1994), para que de esta forma se puedan obtener proteínas unidas a pigmentos (carotenoproteínas) que no se encuentren muy hidrolizadas para evitar inestabilidad del pigmento y procurando tener la mayor cantidad posible del pigmento asociado a la proteína.

1.2 Objetivos

A continuación se presentan los objetivos particulares de este trabajo en el marco de un objetivo general.

1.2.1 *Objetivo general*

*Obtener pigmentos asociados a proteínas (carotenoproteínas) presentes en el cefalotórax de camarón por medio de una proteasa comercial de actividad probada (Proteasa alcalina PA-3000, ENMEX S. A de C. V).

1.2.2 *Objetivos particulares*

*Separar del cefalotórax de camarón la mayor cantidad posible de proteínas empleando una proteasa alcalina comercial de actividad probada.

*Determinar las condiciones de extracción en las cuales se obtiene la máxima cantidad de pigmento asociado a proteína.

*Determinar la cantidad de pigmentos carotenoides presentes en las carotenoproteínas.

*Evaluar la presencia de astaxantina en las carotenoproteínas empleando cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés).

*Evaluar el perfil de aminoácidos, tanto en las harinas de camarón (entera y desmineralizada) como en las carotenoproteínas.

*Evaluar el efecto protector de las carotenoproteínas hacia los pigmentos carotenoides realizando una comparación con los pigmentos obtenidos por extracción química.

2. FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1 Colorantes naturales

Actualmente hay un considerable interés mundial en el desarrollo de los colorantes naturales. Esto se debe, por un lado, a la necesidad de expansión de la variedad de colorantes y, por otro, a la idea de que al ser naturales son por ello seguros. Un indicativo de esto es el número y distribución de las patentes reportadas a nivel mundial en los periodos de 1969-1978 y de 1979 - 1984 (Tabla 1). En esta tabla se puede observar que el incremento en patentes fue mayor en los últimos cinco años que en los anteriores 10 años. Además, los colorantes naturales son objeto de más desarrollo que los sintéticos ya que 356 patentes fueron de colorantes naturales, mientras que 71 fueron de colorantes sintéticos (García y López, 1993).

Tabla 1. Distribución de las patentes mundiales de colorantes (García y López, 1993)

PATENTES	PERIODOS		
	1969-1978	1979-1984	TOTAL
Fuentes de colorantes	210	217	427
Aplicaciones de los colorantes	134	136	270
Total	344	353	697

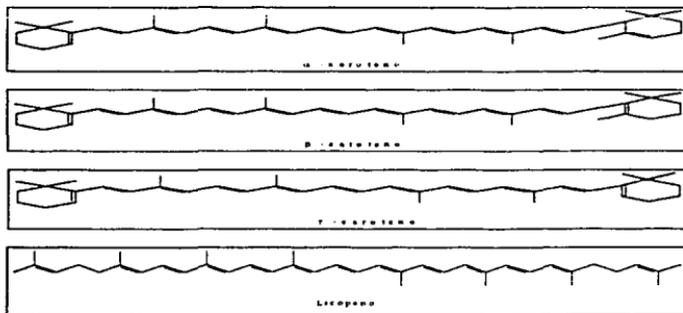
2.1.1 Pigmentos carotenoides

Los carotenoides son un grupo de compuestos principalmente liposolubles responsables de muchos de los colores rojos y amarillos de los productos vegetales y animales. Se encuentran distribuidos en la naturaleza en grandes cantidades, además de encontrarse formando complejos con proteínas, carbohidratos y ácidos grasos (Walford, 1980; Fennema, 1993).

2.1.2 Estructura

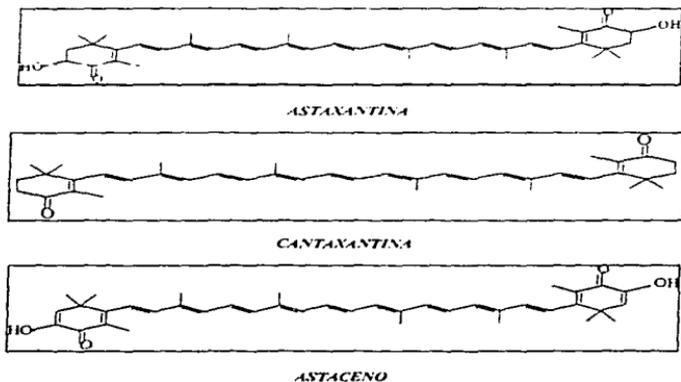
Los carotenos son hidrocarburos en los que la molécula de isopreno es la unidad repetitiva (ocho unidades normalmente), encontrándose en la naturaleza tres isómeros fundamentalmente: α , β y γ -caroteno (fig 1) El segundo es el mas común, el cual presenta dos anillos de ionona unidos a través de una cadena intermedia isoprenoide con diez dobles ligaduras conjugadas las cuales contribuyen a la estabilidad y al color de los mismos. La abertura de los anillos ó el aumento de la conjugación de los enlaces produce un cambio de color hacia el rojo, mientras que la epoxidación o la pérdida de la conjugación produce tendencias hacia los amarillos. De acuerdo con su estructura química, se dividen en dos grandes grupos: carotenos y xantófilas (forma oxidada de los mismos). Los primeros tienen características de hidrocarburos, son solubles en éter de petróleo y poco en etanol; destacando entre este grupo el α , β , γ -caroteno y el licopeno (Badui, 1986)

Figura 1. Estructuras químicas de los carotenos (Badui, 1986)



Las xantófilas se encuentran asociadas con los carotenos y sus estructuras son muy parecidas a la del β -caroteno, con la única diferencia de que tienen un hidroxilo en el segundo anillo que puede esterificarse con varios ácidos grasos. En términos generales, en la naturaleza la cantidad de xantofilas (fig. 2) sobrepasa a la de carotenos. Ambos grupos le deben su color a la conjugación de los dobles enlaces, así como a la presencia de anillos extremos. En estado natural, sus insaturaciones tienen una configuración *trans* y en algunos casos se presentan isomerizaciones *cis*. Los carotenos con actividad biológica son aquellos que tienen todas sus dobles ligaduras en forma *trans* que se transforman en la forma *cis* durante tratamientos en ausencia de oxígeno. Esta reacción de isomerización se puede efectuar durante el proceso de esterilización de productos enlatados con lo que se pierde el poder vitamínico de los carotenos (Badui, 1986).

Figura 2. Estructura química de la astaxantina, cantaxantina y del astaceno (Badui, 1986)



2.1.3 Reacciones químicas

Debido a su estructura insaturada, los carotenoides y xantófilas se encuentran sujetos a muchos cambios químicos inducidos por las diferentes condiciones de procesamiento como son altas temperaturas, radiaciones electromagnéticas y la presencia de oxígeno. Su transformación, además de provocar cambios de color, reduce el valor nutritivo de los alimentos ya que destruye la actividad de provitamina A (Badur, 1986).

Oxidación

La causa principal de la degradación de los carotenoides en los alimentos es la oxidación. La intensidad de la oxidación depende de si el pigmento se encuentra *in vivo* ó *in vitro* y de las condiciones ambientales. Los pigmentos se pueden autooxidar por reacción con oxígeno atmosférico a velocidades que dependen de la luz, el calor, metales y disponibilidad de oxígeno. Las reacciones se cree que son debidas a la formación de radicales libres. Debido a esto, la presencia de agentes físicos ó químicos que favorezcan la producción de radicales libres y que afectan a los pigmentos deben limitarse lo más posible. Los carotenoides ordinariamente son más estables en sistemas con alto grado de insaturación, posiblemente porque el sistema lipídico por sí mismo acepta los radicales libres más fácilmente que el propio caroteno (Fennema, 1993).

Provitamina A

Los carotenoides, en general, han recibido gran atención debido a que el β -caroteno es un precursor de la vitamina A. Esta vitamina solo presenta actividad biológica cuando su estructura química se encuentra totalmente en configuración trans pudiendo adquirir diversas formas químicas como son de alcohol (retinol), de aldehído (retinal), de ácido (ácido retinoico) y esterificada, principalmente con el ácido palmítico (Scheider, 1985;

Badui, 1986). La conversión del caroteno a vitamina A sucede primero por una reacción de oxidación que transforma el caroteno en retinal que, a su vez, por una reacción de oxidación se transforma en retinol, el cual es finalmente almacenado en el hígado en forma de palmitato. La función biológica más conocida de la vitamina A es la formación del pigmento visual llamado rodopsina (11-cis-retinal-opsina) el cual es esencial para que el proceso de la visión pueda efectuarse. Otra función es la de protección contra la acción y formación de radicales libres, los que a su vez llegan a dañar las células; se considera que algunos de los problemas que causan son las enfermedades crónicas del corazón y de los pulmones, así como por ejemplo artritis y cáncer (Badui, 1986).

2.1.4 Usos y función de la astaxantina

Dada la importancia comercial del color en la industria avícola y piscícola se han realizado diversas investigaciones en el uso de carotenoides sintéticos y naturales como fuente de pigmento. Las xantófilas de mayor relevancia como aditivo en general son: la capsantina que se encuentra como principal pigmento del pimiento rojo, la zeaxantina y luteína se encuentra generalmente en el compasuchil (*Tzompa xochitl*) y la astaxantina es utilizada en la industria acuícola como colorante para pigmentar especies como salmones y trucha arcoiris, ya que éstas no pueden sintetizar este pigmento *de novo* y es necesario incluirlo en la dieta. Su importancia como aditivo radica en proporcionar la pigmentación característica a la carne y piel de la especies antes mencionadas e intervenir en procesos reproductivos, además de participar como agente protector de factores físicoquímicos, durante el desarrollo embrionario (Hudon, 1994).

La astaxantina al igual que otros carotenoides tienen un uso potencial como colorantes en cosmetología, pero su inestabilidad frente a factores físicos como la luz y la presencia de oxígeno limitan su aplicación en esta área (Katsumaya y col, 1993).

2.2 Proteínas

2.2.1 Definición y funciones de las proteínas

El nombre de *proteína* proviene de la palabra griega *proteicos*, que significa lo primero (Morrison y Boyd, 1990). Son polímeros formados por unidades de aminoácidos ligados unos a otros por uniones amídicas (Schuetz y Hart, 1980). Estas macromoléculas desempeñan papeles cruciales en prácticamente todos los procesos biológicos, tales como

- 1) **Catalisis enzimática**, en donde la mayoría de las reacciones químicas llevadas a cabo en los sistemas biológicos están catalizadas por enzimas, aumentando las velocidades de reacción. El hecho sorprendente es que todas las enzimas conocidas, son proteínas. Así, pues las proteínas juegan un papel importantísimo en la determinación de las características de las transformaciones químicas en sistemas biológicos.
- 2) **Transporte y almacenamiento**, muchos iones y moléculas pequeños son transportados por proteínas específicas, como por ejemplo la hemoglobina transporta el oxígeno en los eritrocitos, mientras que la mioglobina transporta el oxígeno en el músculo.
- 3) **Movimiento coordinado**, las proteínas son el componente principal del músculo. La contracción muscular se lleva a cabo por el movimiento deslizante de dos clases de filamentos proteicos.
- 4) **Soporte mecánico**, la enorme fuerza de tensión en la piel y el hueso se debe a la presencia de colágeno.
- 5) **Protección inmune**, los anticuerpos son proteínas altamente específicas que reconocen y se combinan con virus, bacterias y las células de otros organismos.
- 6) **Generación y transmisión de impulsos nerviosos**, la respuesta de las células nerviosas a estímulos

específicos depende de la presencia de receptores proteicos, como por ejemplo la rodopsina es el receptor proteico en los bastoncitos de la retina. Las moléculas receptoras, que pueden ser disparadas por moléculas específicas pequeñas como la acetilcolina, son las responsables de la transmisión de los impulsos nerviosos en las sinapsis. 7) Control de crecimiento y la diferenciación, El control secuencial de la expresión de la información genética es imprescindible para el crecimiento y la diferenciación de las células. Solo una pequeña fracción del genoma de una célula se expresa en cualquier momento. En las bacterias, las proteínas represoras son elementos importantes de control que silencian segmentos específicos del DNA de la célula (Stryer, 1988). Los aminoácidos son las unidades estructurales básicas de las proteínas. Un aminoácido consta de un grupo amino, un grupo carboxílico, un átomo de hidrógeno y un grupo distintivo "R" enlazado al átomo de carbono- α . La mayoría de las proteínas están constituidas por 20 aminoácidos de los cuales 11 de ellos son considerados esenciales para el hombre debido a que el organismo no puede sintetizarlos y es necesario que sean consumidos en su alimentación diaria (tabla 2) (Scheider, 1985).

Tabla 2. Necesidades estimadas de aminoácidos esenciales (Scheider, 1985)

AMINOÁCIDO	Necesidad, mg/kg. de peso corporal/día		
	LACTANTES (3-6 MESES)	NIÑOS (10-12 AÑOS)	ADULTOS
ISOLEUCINA	80	28	12
LEUCINA	128	42	16
LISINA	97	44	12
TOTAL DE LOS QUE CONTIENEN AZÚCAR (MILITROSINA + CISTEINA)	45	22	10
TOTAL DE LOS AROMÁTICOS (FENILALANINA + TIROSINA)	132	22	16
TRIPTOPANA	63	28	8
TRIPTOPANO	19	4	3
VALINA	89	25	14
HISTIDINA*	33	7	2

* En un principio se pensaba que era esencial únicamente para los lactantes, pero en la actualidad se considera también para el adulto. Fuente: Food and Nutrition board, Recommended dietary allowances, 9th ed. National Academy of Science, Washington, 1980, p. 43.

2.2.2 Organización estructural

La secuencia de los aminoácidos es importante porque determina la conformación de la proteína (Stryer, 1988). Al estudiar la arquitectura de las proteínas se citan frecuentemente cuatro niveles de estructuración las cuales se encuentran estabilizadas por diferentes tipos de uniones químicas como lo son las uniones de tipo covalente, de tipo iónico, puentes de hidrógeno y fuerzas atractivas de van der Waals (Badui, 1986)

Estructura primaria.- La estructura primaria se encuentra determinada por la forma secuencial y ordenada en que se encuentran distribuidos los aminoácidos a lo largo de la cadena de proteína. Así pues, la estructura primaria comprende las uniones covalentes de la proteína (Badui, 1986; Stryer, 1988).

Estructura secundaria - Se refiere a la ordenación regular y periódica en el espacio de las cadenas polipeptídicas a lo largo de una dirección, lo que es más evidente en las proteínas fibrosas, en donde los polímeros poseen una conformación extendida o enroscada longitudinalmente. Se incluyen en la estructura secundaria la α -hélice, la lámina plegada β y la hélice de colágeno, pero todas están estabilizadas por diferentes fuerzas, siendo las más importantes las electrostáticas, los puentes de hidrógeno, las interacciones hidrófobas y las interacciones dipolo-dipolo.

La gran mayoría de las proteínas tienden a formar α -hélices. Algunos ejemplos de estas conformaciones se pueden observar en la miosina y tropomiosina del músculo, en la epidermis, etc. La estructura β se presenta en la familia de las proteínas llamadas queratinas en donde, como ejemplo, se puede mencionar a la fibrina de la seda. El tercer tipo de estructura secundaria se presenta en las hélices de colágeno que se encuentra en abundancia en los tejidos conectivos de los vertebrados superiores (Badui, 1986; Stryer, 1988).

Estructura terciaria - Esta estructura se refiere al modo en que la cadena polipeptídica se curva ó se pliega para formar una estructura estrechamente plegada y compacta, característica de las proteínas globulares. La línea divisoria entre estructura secundaria y terciaria es asunto de preferencias personales, ya que no hay una definición para ello. Las proteínas que poseen más de una cadena polipeptídica pueden presentar un nuevo nivel de organización estructural. A cada cadena polipeptídica de una proteína así se le denomina subunidad (Badui, 1986; Stryer, 1988).

Estructura cuaternaria - No necesariamente existe en todos los polipeptidos y se refiere al ordenamiento espacial de tales subunidades y a la naturaleza de sus contactos mutuos, Como ejemplos de esta estructura se tiene a la hemoglobina que es un tetrámero formado por dos tipos de proteína similares a la mioglobina (Badui, 1986).

Estructura supersecundaria - Estudios recientes han hecho patente la importancia de dos nuevos niveles de organización. La estructura supersecundaria hace referencia a los agrupamientos de estructuras secundarias. Así por ejemplo, en muchas proteínas se encuentra un segmento de hoja plegada β separado de otro segmento de hoja β por medio de un segmento α -helicoidal; este grupo se denomina unidad $\beta \alpha \beta$. Resulta muy útil considerar las estructuras supersecundarias como ordenamientos intermedios entre las estructuras secundarias y terciarias. (Badui, 1986; Stryer, 1988).

2.2.3 Clasificación

La clasificación de las proteínas se basa en su composición, forma, solubilidad y función biológica como se muestra en la tabla 3.

TABLA 3. Clasificación de las proteínas de acuerdo con su composición, forma, solubilidad y función (Badui, 1986)

CLASIFICACIÓN	PROPIEDADES	EJEMPLO
POR SU COMPOSICIÓN		
Simple	contiene sólo aminoácidos	Insulina
Conjugada	contiene una fracción no proteica	
Metaloproteínas	Pigmentos	Hemoglobina
Glucoproteínas	Contienen carbohidratos	Mucina, caseína k
Fosfoproteínas	Contienen fósforo	Pepsina, flavoproteínas
Lipoproteínas	Contienen lípidos	Lipoproteína (en yema de huevo)
Nucleoproteínas	Contienen ácidos nucleicos	Virus, genes
POR SU FORMA		
Globular	Esféricas u ovoides	Albumina de huevo
Fibrosa	Forman fibras de tejidos	Fibrina, colágeno, miosina
POR SU SOLUBILIDAD		
Albumina	Soluble en agua y solución salina	Ovoalbumina, α -lactalbumina
Globulinas	Poco solubles en agua, solubles en sol. salina	Miosina, globulina del plasma
Histonas	Alto contenido de aminoácidos básicos	Proteínas unidas a ác. nucleicos
Glielinas	Insolubles en agua y alcohol	Gluten de trigo
Prolaminas	Solubles en 70% de alcohol	Zeína del maíz
Escleroproteínas	Insolubles en la mayoría de los disolventes	Todas las proteínas fibrosas
POR SU FUNCIÓN		
Estructural	Parte estructural del cuerpo	Todas las proteínas fibrosas
Enzimas	catalizan reacciones biológicas	Lipasas, proteasas
Hormonas	Mensajeros químicos	Insulina, glucagón
Toxinas	Proteínas dañinas generadas por Mo	Toxina tetánica
Anticuerpos	Proteínas protectoras	α -Globulina de la sangre

2.2.4 Cuantificación

Existen varios métodos para la cuantificación de proteínas, pero la mayoría tiene como principio alguna reacción química característica de los grupos R de los diferentes aminoácidos. Los aminoácidos aromáticos contienen dobles ligaduras y absorben energía radiante en el intervalo del ultravioleta, 220-400 nm. Entre los métodos más utilizados se encuentran los de Biuret, Lowry, turbidimétrico y Kjeldahl (Badui, 1990).

2.3 Enzimas

2.3.1 Definición

Una enzima es una proteína que se comporta como un catalizador acelerando la velocidad de las reacciones que se llevan en los seres vivos sin alterar el equilibrio (García y López, 1993).

La definición anterior es aceptable bioquímicamente hablando, pero en la tecnología enzimática se dice que una enzima es un sinónimo de "preparación enzimática". Se dice que una preparación enzimática puede contener varias enzimas individuales, además de contener otros compuestos que son adicionados para estabilizar y estandarizar la preparación enzimática. Desde el punto de vista comercial puede resultar menos costoso el empleo de una preparación enzimática que la misma enzima purificada. Generalmente las preparaciones enzimáticas son estandarizadas utilizando ensayos de actividad enzimática. La Unidad Internacional estándar (U. I., por sus siglas en inglés) es la unidad empleada comúnmente en las preparaciones enzimáticas y es definida como la cantidad de enzima que bajo condiciones definidas catalizara la transformación de un micromol (μmol) ó un $\mu\text{equivalente}$ de sustrato por minuto. En el caso de las proteasas una U. I. sería 1 μmol de enlace peptídico hidrolizado por minuto (Conn y Stumpf, 1977; Adler-Nissen, 1986)

2.3.2 Clasificación de enzimas

Las proteasas son clasificadas en diferentes formas: a) De acuerdo a su fuente de obtención (animales, plantas, cepas microbianas), b) De acuerdo a su acción catalítica (endopeptidasas.- Las cuales catalizan la hidrólisis específica de enlaces peptídicos internos en la cadena polipeptídica y exopeptidasas.- que catalizan la extracción de residuos de aminoácidos existentes entre el nitrógeno y el carbono terminal de una proteína) y c) De acuerdo a la naturaleza de su sitio catalítico (Tabla 4). Dependiendo de su acción catalítica existen cuatro clases de proteasas de interés para la hidrólisis de proteínas en alimentos. Las proteasas serínicas, que presentan su máxima actividad a valores de pH alcalinos. Las proteasas cisteínicas son parecidas a las serínicas lo único que cambia es que presentan un grupo $-\text{SH}$ en vez del $-\text{OH}$ que presentan las serínicas en el sitio catalítico; la actividad

máxima de estas enzimas se presenta a valores de pH neutros. Las metaloproteasas contienen un metal, usualmente el Zn y que al igual que las cisteínicas tienen valores de pH cercanos a la neutralidad, aumentando su estabilidad en presencia de Ca^{2+} . Las proteasas aspárticas presentan el grupo carboxilo del ácido aspártico en su centro activo y presentan actividad ante valores de pH ácidos. (Adler-Nissen, 1986). Desde el punto de vista fisicoquímico y como consecuencia de su estructura proteica, la actividad catalítica de las enzimas depende de los valores de pH y de la temperatura de reacción (García y López, 1993).

Tabla-4. Lista de algunas proteasas utilizadas en alimentos proteicos hidrolizados
(Adler- Nissen 1986)

Fuente	Tipo de proteasa	Nombre común	pH típico	Especificidad preferencial
Animales	Proteasa aspártica	Pepsina	1-4	Aromático-COOH-NH ₂ , Leu-, Asp-, Glu-COOH
Termera	Proteasa serínica	Tripsina	7-9	Lys-, Arg-COOH
Plantas	Proteasa cisteínica	Papaína pura	5-7	Lys-, Arg-, phe- α -COOH
Bacterias	Proteasa serínica	Subtilisin novo	6-10	solo hidrofóbico-COOH
B.subtilis B.licheniformis	Proteasa cisteínica	subtilisin carlsberg alcalasa, maltasa	6-10	solo hidrofóbico-COOH

2.4. Hidrólisis de proteínas empleando proteasas

Existen cuatro parámetros experimentales de hidrólisis que se deben definir al trabajar con enzimas y que son determinantes para la velocidad con que se llevará a cabo la reacción.

- 1) **Concentración del sustrato [S].-** Generalmente es expresado como el porcentaje en peso del sustrato respecto a la masa total de la mezcla de reacción. En el caso del proceso de hidrólisis de proteínas el sustrato es el porciento en peso de proteína.
- 2) **Relación enzima/sustrato.-** Es la cantidad de enzima relativa a la concentración de sustrato al inicio de la reacción. El % de enzima se refiere más a la velocidad de reacción

que a la concentración enzimática, debido a que en la industria, el proceso enzimático se prefiere llevar a cabo a concentraciones altas del sustrato para trabajar en saturación. Esta relación puede estar dada en % en peso o en unidades de actividad por unidad de masa (g o kg) de sustrato.

3) **Valor de pH.**- La actividad enzimática depende de la concentración de iones hidrógeno del medio, ya que afecta a la carga eléctrica de la enzima, y por lo tanto, determina que la estructura sea funcional o no. Cerca de valores de pH óptimos se tiene una mayor afinidad hacia el sustrato y la reacción se da con mayor eficiencia.

4) **Temperatura.**- Tal como ocurre con muchas proteínas, las enzimas pueden ser fácilmente desnaturalizadas por el calor. La mayoría de las enzimas son, por lo tanto, muy termolábiles y, generalmente, basta con aplicar una temperatura de 70 a 80°C durante dos a cinco minutos para destruir su actividad, ya que una continuación de la actividad enzimática podría ocasionar cambios en el color de los carotenoides. Cabe señalar que, en muchos casos, se ha observado un efecto de "regeneración" enzimática al paso del tiempo, debido a un proceso de reorganización parcial de la molécula de proteína lo cual conduce a la restauración de los sitios activos (Braverman, 1980).

Cuando una enzima es incubada con su sustrato, conforme avanza el tiempo de reacción, la concentración de sustrato disminuye, mientras que la del producto aumenta. Si la enzima empleada es proteolítica, es común evaluar su actividad empleando métodos de cuantificación de proteínas como son los métodos colorimétricos de Lowry y de Biuret entre otros, los cuales permiten la cuantificación de aminoácidos libres y péptidos de bajo peso molecular (Adler-Nissen, 1986; Escobedo, 1994).

2. 4. 1 Empleo de la "Proteasa alcalina 3000" para la obtención de carotenoproteínas

La enzima "proteasa alcalina PA-3000" es una proteasa alcalina bacteriana producida por la fermentación controlada de *Bacillus licheniformis*. Esta enzima es empleada en la industria como uno de los principales componentes en la formulación de detergentes para lavanderías industriales. El nombre comercial del producto es Deterzyme M[®] teniendo un costo en el mercado aproximado de \$ 271.00/kg (enero de 1996) (ENMEX, 1996).

La PA-3000 es una endopeptidasa capaz de hidrolizar los enlaces peptídicos internos de las moléculas de proteína, cuya amplia especificidad sobre el sustrato permite hidrolizar en forma efectiva a la mayoría de las proteínas, tales como hemoglobina, caseína, proteína de pescado, y de soya entre otras, convirtiéndolas en péptidos de bajo peso molecular (ENMEX, 1996).

En estudios previos, Escobedo (1994) realizó un experimento donde logró aislar quitina de la harina de cefalotórax de camarón (partículas comprendidas entre 2.0 y 0.417 mm). Lo anterior se llevó a cabo sometiendo al cefalotórax de camarón a la acción independiente de cinco proteasas (alcalasa, "HT proteolytic 200", neutrasa, papaína y "proteasa alcalina PA-3000) e igualando las unidades de actividad que las enzimas mostraron frente a caseína. Se encontró que, de todas las anteriores, la enzima que hidrolizó la máxima cantidad de proteína soluble (mL (92.76%) en un lapso de 180 minutos de reacción fue la PA-3000. Además, no se observaron diferencias significativas entre las hidrólisis efectuadas a las harinas de cefalotórax de camarón con los tamaños señalados, concluyendo que la importancia de la especificidad que posee la proteasa hacia el enlace peptídico radica en la hidrólisis de las proteínas del complejo (caroteno-proteína-quitina) dando por un lado, pigmentos carotenoides asociados con proteínas y por el otro, quitina asociada a proteínas.

Los carotenoides no participan en procesos biológicos en "estados libres" o aislados, sino conjugados. Por lo general, son compuestos que se encuentran unidos a través de grupos prostéticos a proteínas, confiriéndoles un "efecto protector". Generalmente, se encuentran en proporciones estequiométricas, con lo cual se muestra la importancia de presentarse sitios específicos para la adhesión de carotenoides. Los carotenoides también pueden asociarse o disolverse en lípidos en las llamadas "lipoproteínas". En este caso, el caroteno es parte de la cadena lipídica del grupo prostético, pero no ejerce una interacción específica con la proteína y no se encuentra en proporciones estequiométricas (Isler, 1971). Las astaxantinas presentes en el cefalotórax de camarón se encuentran asociadas a proteínas, quitina y sales minerales formando complejos estables (Hudon, 1994). Simpson y Haard (1985), demostraron que reduciendo los niveles de sales minerales a un 7% y empleando enzimas proteolíticas como la tripsina, se logran obtener pigmentos unidos a proteínas llamados carotenoproteínas hasta en un 80%; sin embargo, sugieren la continuidad del experimento empleando diferentes proteasas para observar si se obtiene un aumento en el rendimiento. Es por ello que en este trabajo se pensó en reducir lo más posible la concentración de sales del resto del cefalotórax para, de esta forma, favorecer el ataque proteolítico de la enzima, obteniéndose por un lado pigmentos asociados a proteína con un valor comercial elevado (carotenoproteínas) y, por el otro, quitina asociada a proteínas, susceptible de ser procesada para la obtención de quitosanas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Equipo empleado

El equipo empleado durante el desarrollo experimental fue el siguiente:

EQUIPO	ESPECIFICACIONES
Cuanto de secado	Marca: Kinet, mod.53874
Molino de cereales	Serie: 4021, modelo: 1245, armazón: 2D56
Tamizador mecánico	Marca: Steve-Shaker portable, N° 6958, Patent N° 2026208
Baño agitador	Marca: New Brunswick Scientific, Patent USA 3430926.0
Balanza analítica	Marca: Sartorius 1207 MP2
Vortex	Marca: Scientific Industries, Inc. modelo G-560
Centrífuga	Marca: Beckman J2-MC
Horno de microondas	Marca: Samsung, Classic collection
Liofilizadora	PP2v, tipo RP 2v, N 890925-4
Espectrofotómetro	Marca: Perkin Elmer, Modelo C 618-033
Horno	Marca: Felsa
Parrilla de agitación	Marca: Thermolyne II

3.2 Desarrollo experimental

3.2.1 Preparación de la muestra

Los cefalotórax de camarón fueron adquiridos en la zona de pescados y mariscos, ubicada dentro de la central de abastos en la ciudad de México. Las muestras fueron transportadas al laboratorio B-201 de la Facultad de Química de la UNAM en cubetas dentro de bolsas oscuras, y cubiertas con hielos para de esta forma evitar la degradación de proteínas y pigmentos. Allí se efectuó el pre-tratamiento de las muestras como se describe a continuación.

3.2.2 Lavado

Dada las características de fácil descomposición microbiológica que presentan los crustáceos, deben procesarse rápidamente para evitar la descomposición causada principalmente por microorganismos proteolíticos, para lo cual se lavaron con abundante

agua eliminando las impurezas superficiales, así como visceras y remanentes que pudieran quedarse durante el descabezado que se realiza normalmente en forma artesanal.

3.2.3 Secado

Una vez lavadas, las muestras se colocan en charolas de metal para proceder al secado, el cual se realiza a 60± 2°C, durante 24 horas. Con este tratamiento se consigue disminuir la actividad del agua para controlar la descomposición enzimática y microbiológica.

3.2.4 Molienda y tamizado

El cefalotórax de camarón es molido en un molino de cereales, hasta obtener partículas homogéneas y, posteriormente, es tamizado empleando un tamiz de malla Núm. 40 (tamaño de partícula de 0.042 mm) dado que, en experimentos previos, Cañipa (1994) y Escobedo (1994) determinaron que no existía diferencias significativas entre los tamaños de partículas comprendidos entre las mallas Núm. 20 y 40. Además, a un tamaño de malla mayor (tamaño de partícula menor) implica tener polvos muy finos y de difícil manipulación en el momento de llevarse a cabo el desarrollo experimental.

3.2.5 Desmineralización de la harina

La desmineralización se realiza empleando una solución de EDTA disódico 0.5 M con agitación constante (200 rpm) durante una hora. Posteriormente, la harina se somete a varios lavados con agua destilada a temperatura ambiente hasta que el agua del filtrado sea lo más clara posible. Tras filtrar la muestra en papel filtro de poro abierto (Whatman Núm. 1), se seca a una temperatura de 50°C durante 2 horas y se almacena, para la realización de los ensayos posteriores.

3.2.6 Secado

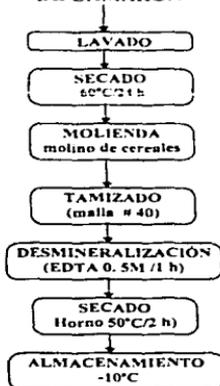
Una vez que se desmineraliza a la harina se procede a secarla en un horno convencional a $50 \pm 3^\circ\text{C}$ por dos horas para los ensayos posteriores.

3.2.7 Almacenamiento

Una vez tamizada, secada y desmineralizada la harina se almacena en varios frascos, color ámbar, etiquetados y cerrados herméticamente y cubiertos con papel parafilm para de esta forma evitar en lo más posible el paso de la luz y del O_2 , evitando así la degradación prematura de los pigmentos. Posteriormente, se mantienen en congelación a -10°C con la finalidad de conservar mejor la muestra (Diagrama 1).

Diagrama 1. Preparación de la muestra de cefalotórax de camarón

OBTENCIÓN DE CEFALOTÓRAX DE CAMARÓN



3.3 Caracterización de la muestra

Una vez que es sometida la muestra de cefalotórax a todos los pasos anteriores, es caracterizada realizando un análisis proximal (determinación de humedad, cenizas, proteína total, grasa cruda, fibra cruda y carbohidratos por diferencia) (Anexo 1).

3.4 Proteólisis enzimática

3.4.1 Proteólisis enzimática en caseína

La hidrólisis enzimática de caseína se realizó empleando caseína *Sigma* al 99% de pureza. Los propósitos fueron los de evaluar los parámetros de la actividad enzimática sobre un sustrato estándar y familiarizarse con la técnica. Los parámetros de hidrólisis que se fijaron para la caseína fueron los siguientes:

[S]=caseína en solución al 2%

[E/S]=1% equivalentes a 43.74 U/g enzima, 87.47 U/g de proteína

pH óptimo=9.5, valor reportado por Escobedo (1994) y corroborado experimentalmente
temperatura óptima =50°C, reportada por Escobedo (1994) y en las especificaciones técnicas del producto brindadas por la compañía ENMEX (1996).

La metodología de hidrólisis empleada para caseína es la siguiente:

Se disuelven 2.24 g de caseína⁽¹⁾ en 70 mL de la solución amortiguadora de carbonatos, se ajusta el valor de pH a 9.5 y se afora a 100 mL con la misma solución amortiguadora.

Para efectuar la hidrólisis se requieren 25 mL de solución de caseína y 3 mL de la solución enzimática con lo cual se tiene la relación E/S de 1.0%

¹ Se pesa esa cantidad debido a que el porcentaje de caseína de 2% debe mantenerse después de añadir el volumen de enzima

La solución se coloca en un baño con agitación constante a una temperatura de 50°C.

Cuando el sustrato y la enzima han alcanzado la temperatura propuesta se mezclan inmediatamente y se toma una muestra de 2.5 ml., correspondientes al tiempo cero de reacción, la enzima se inactiva por calentamiento en horno de microondas a 82°C durante 3 minutos con la ayuda de un termopar

Para calcular la actividad de la enzima es necesario tomar alícuotas cada minuto desde el tiempo cero hasta pasados cinco minutos, (1, 2, 3, 4 y 5 min) ya que para los estudios cinéticos, es necesario situarse en las condiciones que correspondan al principio de la curva, donde es lineal, es decir, a concentraciones bajas de enzima.

Cada 20 minutos durante 2 horas, se toma una alícuota del mismo volumen y se somete al procedimiento previamente mencionado para inactivar la enzima. Debido a que en las alícuotas se toman, tanto péptidos solubles como caseína, es necesario acidificar las muestras a un valor de pH=4.6 el cual corresponde al punto isoeléctrico (pI) de esa proteína para, posteriormente, precipitarla y quedan suspendidos únicamente los péptidos solubles, para su posterior cuantificación.

Una vez precipitada la caseína, es centrifugada a 10,000 rpm durante 30 minutos para facilitar la separación de los péptidos solubles y proceder a realizar la dilución correspondiente para su cuantificación por el método de Lowry (Anexo I).

Con los datos obtenidos se construyó la curva de hidrólisis de la Pa-3000 frente a caseína para posteriormente calcular la actividad que dicha enzima presentaba ante el sustrato antes mencionado.

3.4.2 *Proteólisis enzimática con harina de cefalotórax de camarón como sustrato*

La hidrólisis del cefalotórax se llevó a cabo de manera similar variando únicamente algunos factores:

1.-Se empleó como sustrato la harina de cefalotórax de camarón, a la cual se le determinó por el método Macro-Kjeldahl (Anexo 1) la cantidad de proteína total que contenía, además de ser corroborada con el aminograma realizado en la Unidad de aminoácidos y HPLC del Instituto de Investigación Biomedicas (Anexo 1).

2.-Durante el experimento se mantuvieron constantes los valores óptimos de temperatura y pH (mismas condiciones que se emplearon al hidrolizar la caseína) y la concentración de sustrato se aumento del 2%, con el que se había trabajado anteriormente en caseína al 5%, (1.60 gramos de harina 16 ml. de suspensión), ya que en la industria se manejan porcentajes mayores de sustrato que los utilizados experimentalmente.

3.-Se redujo el volumen de la suspensión de 25 a 15 mL para fines prácticos, guardando siempre el % de sustrato al 5%.

4.-Debido a que el complejo de carotenoproteínas es un sustrato insoluble en la solución amortiguadora, fué necesario mantenerlo en agitación constante (125 rpm) durante todo el tiempo de reacción, de manera que se facilitara el contacto entre la enzima y el complejo de carotenoproteínas.

5.-Una vez transcurridos los tiempos de reacción (1, 2, 3, 4, y 5 min) para calcular las actividades enzimáticas, y (0, 5, 10, 20, 40, 60, 120 y 180 min.) para conocer el tiempo en donde se obtenía la máxima cantidad de proteína soluble liberada, el hidrolizado se somete a la inactivación de la enzima poniendo 2.5 mL del extracto en 5 mL de una solución de TCA al 5% en agua para su inactivación por reducción del valor de pH, se dejan reposar las

muestras por un tiempo mínimo de 30 minutos y se centrifugan los 7.5 mL a 10,000 rpm durante 30 minutos. Pasado este tiempo se colecta el sobrenadante y se le determina proteína soluble por el método de Lowry-SDS (Anexo 1).

3.5 Cuantificación de carotenoproteínas

1.- Una vez cuantificada la cantidad de proteína soluble, se procedió a determinar la cantidad de pigmentos unidos a proteínas, para lo cual se procedió como en el paso anterior (proteólisis de cefalotórax de camarón como sustrato), variándose algunos puntos:

1.- Se omitió la inactivación de la enzima con TCA, debido al daño que ocasiona el ácido a los pigmentos y se procedió a una inactivación por calentamiento rápido en microondas (60°C / 3 minutos), ya que se ha observado que la desnaturalización por efecto de calor es muy rápida, a temperaturas por encima de 55°C, sobre las subtilisinas (Huirón, 1983).

2.-Una vez transcurrido el tiempo de inactivación fue separado el residuo del sobrenadante, sometiéndose este último a una centrifugación de 10,000 rpm durante 20 minutos para, posteriormente, agregarle al filtrado sulfato de amonio (NH_4SO_4) al 75 % de saturación para precipitar la proteína.

3.-La proteína precipitada es separada con la ayuda de una espátula y dializada con una membrana de tamaño de poro de 13,000.00 Daltones, efectuándose posteriormente varios cambios de agua destilada, para eliminar al sulfato de amonio agregado y algunas impurezas que pudiera contener la muestra.

4.- Una vez que se comprueba que ya no hay sulfato de amonio en el dializado (mediante la adición de 0.3 g de BaCl_2 en un tubo con 10 mL de solución del dializado), se procede a la liofilizar las carotenoproteínas para su posterior cuantificación.

3.6 Determinación de pigmentos

La extracción del pigmento tanto en carotenoproteínas como en harinas de cefalotórax (entera y desmineralizada) se determina de acuerdo a la metodología propuesta por Britton (1985), en Velázquez (1995), realizando las siguientes adaptaciones:

Se pesan 0.2 gramos de muestra (carotenoproteínas) en un tubo de ensaye de 50 mL y se agregan perlas de vidrio de 0.45-0.50 mm, 20 mL de una mezcla de solventes Hexano:Etanol:Acetona (50:25:25), agitando durante 5 minutos en vortex a velocidad moderada para evitar el derrame de la muestra, adicionar otros 20 mL de la mezcla de disolventes y seguir la agitación durante 5 minutos.

La separación de las fases se efectuó por centrifugación durante 5 minutos a 5000 rpm; quedando en la epifase de hexano los pigmentos disueltos, los cuales se recuperaron con una pipeta Pasteur.

Una vez recuperada la muestra se concentra hasta aproximadamente 6 mL, empleando N₂ gaseoso para evaporar el disolvente.

El volumen total del extracto fué medido y se procedió a su cuantificación como se menciona en el texto más adelante.

Durante el proceso de extracción, las muestras se protegieron lo más posible de la acción de la luz y del oxígeno.

3.6.1 Purificación y cuantificación de pigmentos

Purificación

Cromatografía en capa fina (Thin-Layer-Chromatography, TLC)

Se realizó para la separación de astaxantina, sobre placas de sílica gel (Kiesel DC-alufolien sin indicador fluorescente) de 20 x 20 cm x 0.2 mm.

Se aplicaron 20 μ l. de extracto en hexano de las muestras a evaluar.

La elución de las muestras fue realizada en una fase móvil conteniendo éter de petróleo:acetona (80:20), en una cámara sobresaturada.

La identificación se llevó a cabo mediante la contrastación del Rf de los pigmentos obtenidos de las carotenoproteínas y del pigmento reportado en la literatura por el laboratorio La Roche (1994).

Cuantificación

La cuantificación de carotenoides totales se realizó con un espectrofotómetro, utilizando el coeficiente de extinción de 2100, el cual es específico para la astaxantina en hexano según lo reportado por los laboratorios La Roche. La longitud de onda a la cual se leyeron las muestras fue de 472nm, por considerarse a ésta el principal componente.

El cálculo se determinó realizando una curva estándar con un patrón de astaxantina donado por el Instituto de Investigaciones Biológicas y corroborado con la siguiente relación matemática propuesta por Britton (1985), en Velázquez (1995):

$$\mu\text{g de carotenoides} = (A) (10^6) / (1^{25} E_{1\text{cm}}) (100)$$

donde:

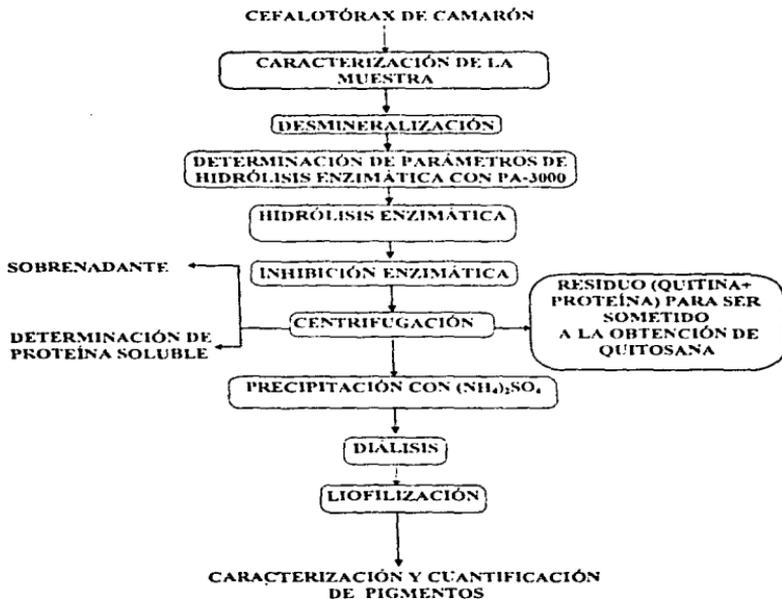
A= absorbancia de la muestra

10^6 Factor para expresar los carotenoides en μ g

$1^{25} E_{1\text{cm}}$ = coeficiente de extinción específico para astaxantina

100= constante para eliminar el factor de porcentaje

Diagrama 2.- Obtención de carotenoproteínas



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización de la harina de cefalotórax de camarón

Análisis proximal

Una vez procesadas las cabezas de cefalotórax de camarón, se caracterizaron con la finalidad de comparar los valores obtenidos experimentalmente contra los reportados en la literatura, ya que se ha visto que estos pueden variar entre lotes y especies

Tabla 5. Composición de la harina de cefalotórax de camarón % en peso (b.s.)

CARACTERÍSTICA	DATOS BIBLIOGRÁFICOS <i>Agricultural Handbook (1975)</i>	RESULTADOS EXPERIMENTALES ⁽²⁾
Proteína cruda	47.70	45.10 ^{(3) 0.2 2.118}
Cenizas	26.86	28.11 ^{0.2 0.050}
Fibra cruda	19.35	20.43 ^{0.2 0.104}
Grasa cruda	4.63	4.65 ^{0.2 0.02}
Carbohidratos asimilables por diferencia	1.46	1.69 ^{0.2 1.43}
TOTAL	100	100

(2) Promedio de tres determinaciones

(3) Factor de conversión = 0.4

En la tabla 5 se presentan los componentes de harina entera de cefalotórax de camarón en base seca (eliminación del contenido de agua en el alimento, determinada por el porcentaje de humedad de la muestra) y su comparación con los reportados por el *Agricultural Handbook (1975)*. Al realizar la confrontación entre ambas harinas se observa que la composición principal en el cefalotórax de camarón es de proteínas, le siguen los valores de cenizas y por último, los de fibra cruda que incluye la quitina. Las variaciones observadas entre los valores de las columnas se atribuyen principalmente a las diferencias existentes entre las especies empleadas.

4.2 Desmineralización de la harina empleando diferentes concentraciones de EDTA

Con la finalidad de disminuir la cantidad de sales (principalmente carbonatos y fosfatos) y con ello favorecer la hidrólisis enzimática del complejo carotenoproteico, se decidió desmineralizar la harina bajo diferentes concentraciones de EDTA disódico (Tabla 6), ya que en un estudio similar de Cano-López y col (1987) fue demostrado que al desmineralizar la harina con EDTA disódico los rendimientos de proteína y astaxantina aumentaban más del 80%, en tanto que al no emplear este agente quelante se presentaron impedimentos de tipo estérico que evitaron la interacción enzimática con el sustrato (proteína de camarón).

TABLA 6. Desmineralización de la harina de cefalotórax de camarón empleando EDTA disódico bajo diferentes concentraciones molares

MOLARIDAD (M)	% DE CENIZAS (D)
CONTROL	25.98 ± 0.04
0.1	23.17 ± 0.42
0.25	21.11 ± 0.02
0.50	2.51 ± 0.035
0.75	2.50 ± 0.036
1.0	2.12 ± 0.03

(D) Promedio de tres determinaciones

En la tabla 6 se puede constatar que las menores cantidades de cenizas son obtenidas en las concentraciones de 1.0 y 0.75 M; sin embargo, se decidió trabajar con la concentración de 0.5M, al no observarse una disminución importante a niveles mayores de 0.50 M y debido a que a concentraciones superiores a esta se llega a la sobresaturación de EDTA en agua, originándose la precipitación de la sal, creándose complicaciones técnicas.

4.3 Comparación de la cantidad de aminoácidos tanto de la harina entera y desmineralizada como de las carotenoproteínas

En la tabla 7 se presenta el contenido de aminoácidos de la harina entera, harina desmineralizada previamente con EDTA 0.5M, carotenoproteínas y el Patrón FAO'73 como factor comparativo. En todas las muestras se observa que la harina de camarón y las

carotenoproteínas poseen un buen perfil de aminoácidos esenciales, comparados con el patrón, lo cual concuerda con lo reportado por Simpson y Haard (1985). En todos los casos el aminoácido que se observa en menor proporción es el triptofano. Esto se debe a la alta sensibilidad del mismo ante la hidrólisis ácida empleada al ser sometidas las muestras para su determinación por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). Cabe mencionar que como no se determinó cisteína y el triptofano se pierde en la hidrólisis ácida de las muestras, no es posible determinar la calificación química real de las muestras; sin embargo, se puede realizar una comparación con los aminoácidos esenciales observando que en ambas harinas se encuentran todos y algunos de ellos en una mayor proporción que el patrón de la FAO.

Tabla 7 Aminograma de harinas de cefalotórax de camarón (entera y desmineralizada) y carotenoproteínas

AMINOACIDO	HARINA ENTERA	HARINA DESMINERALIZADA	CAROTENOPROTEÍNAS	PATRÓN FAO '73
Ac. aspártico	9.79	10.63	18.08	
Ac. glutámico	15.55	12.76	18.87	
Serina	8.71	13.67	6.14	
Histidina	2.55	2.84	2.51	
Glicina	6.73	1.62	6.72	
Arginina	7.28	6.66	6.98	
Alanina	5.65	5.54	5.80	
Treonina	5.05	9.17	5.54	4.00
Total de Azufrados ⁽¹⁾	3.35	0.59	0.86	3.52
Valina	5.33	3.24	6.70	4.96
Total de Aromáticos	9.79	12.25	6.18	6.08
Isoleucina	4.55	5.06	4.88	4.00
Leucina	8.24	9.76	5.39	7.04
Lisina	6.96	5.80	5.07	5.44
Triptofano	0.45	0.29	0.38	0.96

Unidad de análisis de aminoácidos y HPLC Instituto de Investigaciones Biomédicas
valores reportados g aa/100 g de proteína

Aminoácidos indispensables en negritas

Aminoácidos Aromáticos (Trosina-Fenilalanina) Aminoácidos Azufrados Metionina-Cisteína

⁽¹⁾ Harina desmineralizada previamente utilizando EDTA 0.3 M

⁽²⁾ Carotenoproteínas previa liofilización

⁽³⁾ No se determinó Cisteína

4.4 Experimentos de hidrólisis con Proteasa alcalina 3000 en caseína

La hidrólisis de la caseína se llevó a cabo como estándar para determinar el comportamiento enzimático de la proteasa alcalina PA-3000 sobre un sustrato conocido, caseína *Sigma* (99% de pureza), además de ser ensayos que permitieron la familiarización con la técnica. Durante la hidrólisis que se efectuó en caseína se mantuvieron constantes los valores de pH= 9.5, Temperatura = 50°C, ambos valores reportados en literatura por Escobedo (1994) y corroborados en las especificaciones del fabricante. La concentración del sustrato que se manejó fue de 2%. La actividad detectada en caseína fue de 87.47 U/g de proteína.

4.5 Experimentos de hidrólisis con Proteasa alcalina 3000 en harina de cefalotórax de camarón

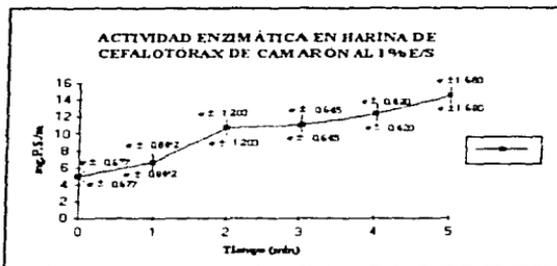
Una vez conociendo la actividad enzimática que la enzima presenta con la caseína, se procedió a emplear la harina de cefalotórax de camarón, previa desmineralización, como sustrato. Para ello se determinó, en primer término, la actividad enzimática que presentaba la proteasa PA-3000 frente a la harina desmineralizada en una relación E/S 1%. Esta fue de 20.33 U/g de proteína (Tabla 8, Gráfico 1). Durante la hidrólisis se mantuvieron constantes los valores de pH= 9.5, Temperatura = 50°C, y la concentración de sustrato se aumentó del 2% al 5% con respecto a la hidrólisis de caseína.

Tabla 8 Determinación de la actividad de la enzima PA-3000 con la harina de cefalotórax de camarón (E/S=1%)

Actividad	mg P.S./mL (1)	D.S
0	4.980	n = 0.0001
1	6.574	n = 0.0002
2	10.742	n = 0.0001
3	11.027	n = 0.0005
4	12.356	n = 0.0020
5	14.467	n = 0.0001

(1) Los valores son el promedio de cuatro determinaciones experimentales
P. S. = Proteína soluble

Gráfico 1. Determinación de la actividad enzimática en harina desmineralizada de cefalotórax de camarón con una relación E/S= 1%, (20.33 U/g de proteína)



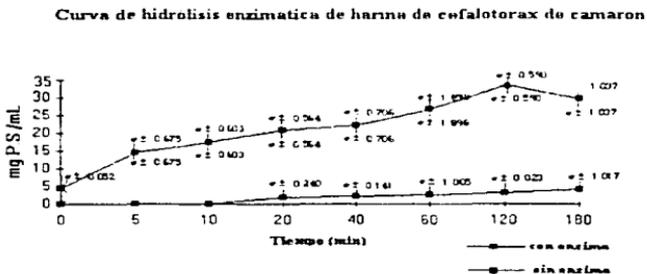
Una vez conocida la actividad que la proteasa presentó en la harina de cefalotórax de camarón (20.33 U/g proteína), se procedió a realizar la proteólisis durante tres horas de reacción para conocer el tiempo en que la enzima libera la máxima cantidad de proteína soluble por mililitro. En la tabla 9 (Gráfico 2) se puede apreciar que la máxima cantidad de proteína soluble se obtiene a los 120 minutos de reacción.

Tabla 9. Hidrólisis de harina de cefalotórax de camarón con una relación E/S del 1 % (20.33 U/g proteína)

TIEMPO (min)	Adicionando Enzima		Sin Adicionar	
	mg P. S.	D.S	mg P. S.	D.S
0	1.53	$\sigma \pm 0.528$	0.0	0.0
5	14.467	$\sigma \pm 1.944$	0.0	0.0
10	17.24	$\sigma \pm 1.760$	0.0	0.0
20	20.91	$\sigma \pm 0.098$	1.865	$\sigma \pm 0.240$
40	22.095	$\sigma \pm 0.964$	2.023	$\sigma \pm 0.141$
60	26.471	$\sigma \pm 2.35$	2.624	$\sigma \pm 0.005$
120	33.068	$\sigma \pm 0.683$	3.066	$\sigma \pm 0.023$
180	32.629	$\sigma \pm 0.865$	4.080	$\sigma \pm 0.017$

(1) Los valores son el promedio de cuatro determinaciones experimentales
P. S = Proteína soluble

Gráfico 2. Curva de hidrólisis enzimática de harina de cefalotórax de camarón con una relación del 1% E/S, (20.33 U/g prot.)



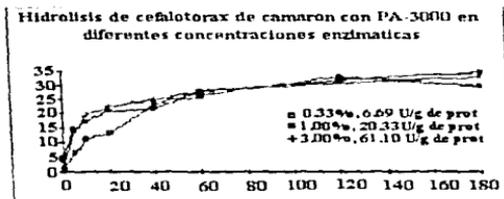
Para conocer los resultados que se obtendrían con la hidrólisis al aumentar ó disminuir la concentración de enzima y de esta forma evitar una proteólisis ineficiente, se propusieron los siguientes intervalos de relación E/S sobre la cantidad del 1%, 20.33U/g de proteína manejada anteriormente (0.33% y 3% correspondientes a 6.69 U/g de proteína, y 61.017 U/g de proteína respectivamente). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 10 y en el gráfico 3.

Tabla 10. Comparación entre el grado de hidrólisis de la proteasa PA-3000 frente a la harina de cefalotórax de camarón empleando diferentes unidades de actividad enzimática (6.69, 20.33, y 61.01 U/g prot); los valores están reportados en mg de proteína soluble / mL al cabo de 3 h de reacción.

UNIDADES de enzima TIEMPO (min.)	6.69		20.33		61.01	
	mg P. S/ml	σ^2	mg P. S./ml	σ^2	mg P. S./ml	σ^2
0	0.148	0.052	4.51	0.278	3.059	0.167
5	5.085	0.675	14.467	1.943	13.886	0.194
10	8.932	0.603	17.240	1.760	19.78	0.621
20	10.870	0.564	20.517	0.998	27.817	0.167
40	19.462	0.706	22.094	0.964	25.167	0.204
60	23.220	1.898	26.471	2.350	28.315	0.516
120	26.705	0.590	33.068	0.683	31.248	0.069
180	28.390	1.037	29.670	0.865	32.973	0.318

Nota: Los datos reportados son el promedio de cuatro determinaciones experimentales para el análisis de varianza se manejaron el total de los valores (Anexo 2)

Gráfico 3. Curvas de hidrólisis de la harina de cefalotórax de camarón con la enzima PA-3000 empleando diferentes unidades de actividad enzimática (6.69, 20.33, y 61.01 U/g proteína) los valores se reportan en mg de proteína soluble / mL al cabo de 3 h de reacción



4.6 Análisis de varianza entre las concentraciones de E/S probadas

Una vez conocida la concentración de proteína soluble liberada en las tres condiciones antes mencionadas se llevó a cabo un análisis de varianza (Tabla 11) entre las tres relaciones enzimáticas con grados de significancia $\alpha = 0.05$ y $\alpha = 0.01$.

Tabla 11. Análisis de varianza entre 0.33, 1.0, y 3.0% E/S

TRATAMIENTOS	G.L	S. C.	C. M.	F _{exp}	$\alpha = 0.05$	$\alpha = 0.01$
A-B	2	804.06	402.03	4.497	3.094	4.84
ERROR	93	8313.91	89.39			
TOTAL	95	9117.97				

Donde: A = Relación E/S (0.33, 1.0, 3.0%)
 B = Concentración de proteína soluble liberada

Además se llevó a cabo la prueba de Duncan con $\alpha = 0.05$ y $\alpha = 0.01$ de donde se observa:

$\alpha = 0.05$

A = 15.506

B = 20.93 C = 22.14

$\alpha = 0.01$

A = 15.506

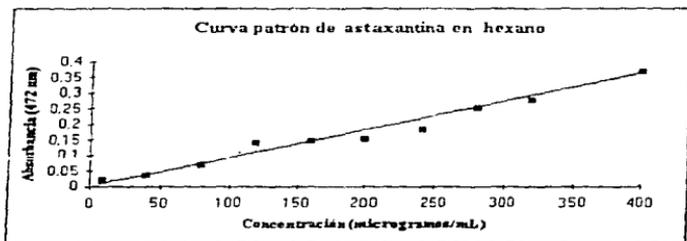
B = 20.93 C = 22.14

Lo que significa que es indistinto trabajar con una relación E/S del 1.0 ó 3.0% para obtener la máxima cantidad de proteína soluble, por lo cual se decide fijar la relación E/S= 1.0% para todos los ensayos posteriores, descartándose la relación 0.33% por presentar valores relativamente bajos de proteína soluble liberada.

4.7 Determinación de pigmentos carotenoides totales en harinas de cefalotórax de camarón (entera y desmineralizada) y en carotenoproteínas

La cantidad de carotenoides totales se determinaron tanto en las harinas de cefalotórax de camarón (harina entera y previamente desmineralizada con EDTA 0.5 M) como en las carotenoproteínas obtenidas durante cuatro intervalos de tiempo (10, 60, 120 y 180 minutos).

Gráfico 4. Curva patrón de astaxantina en hexano



Donde: pendiente= 0.008575, ordenada al origen = 0.0044, coeficiente de correlación= 0.9958
La curva patrón fue elaborada de acuerdo con lo establecido en la sección de materiales y métodos

La determinación de los pigmentos se llevó a cabo por medio de dos métodos; en el primero se interpolaron los valores de absorbancia obtenidos de las muestras en la curva patrón de astaxantina y en el segundo de acuerdo a la ecuación propuesta por Britton, en Velázquez (1995). Es posible observar en la tabla 12 un aumento notable entre los valores de concentración obtenidos por el método propuesto por Britton con respecto al método de interpolación en la curva patrón de astaxantina. Cabe señalar que el método propuesto por Britton es una ecuación semiempírica establecida para determinar astaxantina de origen

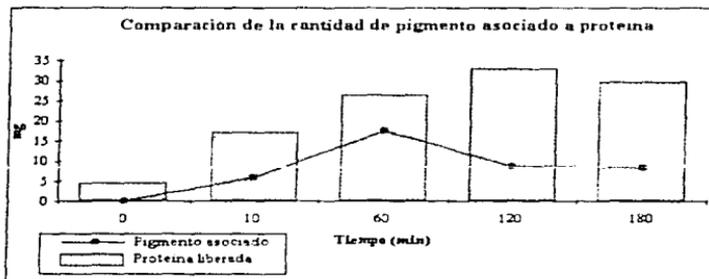
microbiano (levaduras), dando una aproximación sobrestimada de la cantidad de pigmentos totales referidos como astaxantina. Sin embargo, no se quiso omitir el resultado de esta aproximación para poder realizar una comparación entre ambas técnicas. El contenido de pigmentos totales calculados por interpolación de la curva patron de astaxantina brinda un valor mas real del contenido de pigmentos. Puede observarse también un incremento del 11.39% en el valor de los pigmentos carotenoides obtenidos a partir de la harina desmineralizada con respecto al valor de la harina entera. Esto se debe a que en el momento de eliminar algunos componentes del cefalotórax como son minerales y carbohidratos, aumenta proporcionalmente el contenido de pigmentos. Asimismo, se observa que la concentración máxima de pigmentos carotenoides es obtenida en 60 minutos de hidrólisis, mientras que la mayor cantidad de proteína soluble liberada se obtiene al cabo de 120 minutos de reacción (Gráfico 5). Lo anterior demuestra la asociación de carotenos con proteínas en el cefalotórax de camarón, aunque no en relaciones estequiométricas como se pensaba. Esto puede deberse a que al inicio de la hidrólisis enzimática hay liberación de proteína soluble con pigmentos y péptidos asociados a pigmentos que pueden ser hidrolizados nuevamente por la enzima hasta que ya no sea posible su ruptura, lo que determina que con un mayor tiempo de exposición de la enzima ante el sustrato, se obtenga una mayor cantidad de proteína y péptidos solubles. Sin embargo, se desfavorece el "efecto protector" que dichas biomoléculas presentan ante los pigmentos, disminuyendo estos al paso del tiempo. De ahí que en los tiempos de 120 y 180 minutos, la cantidad de pigmentos disminuya con respecto a 60 minutos. Ésta es una de las desventajas que se pueden observar en el proceso con PA-3000 y se debe principalmente a la amplia especificidad que la enzima presenta para hidrolizar el enlace peptídico de muchos residuos de aminoácidos. Lo anterior concuerda con lo reportado por Simpson y Haard (1995).

Tabla 12. Determinación de carotenoides, expresados en mg de carotenoides totales/g de muestra

Muestra	Método matemático		Interpolación en la curva	
	mg pigmento/ g muestra	σ :	mg pigmento/ g muestra	σ :
Harina entera	62.52	0.03	15.78	0.43
Harina desmineralizada	70.99	0.05	17.81	0.54
Carotenoproteínas				
10 min	11.85	0.21	5.88	0.55
60 min	22.52	0.34	17.57	0.30
120 min	41.36	0.62	8.85	0.55
180 min	34.75	0.34	8.41	0.70

Datos obtenidos del promedio de tres determinaciones experimentales

Gráfico 5. Comparación de la cantidad de proteína liberada contra la cantidad de pigmentos carotenoides totales asociados, en diferentes tiempos de hidrólisis



En el gráfico 5 se observa que, a medida que avanza el ataque enzimático hacia la proteína, la cantidad de pigmentos disminuye hasta que se obtiene una cantidad baja de pigmento. Esto puede originarse debido a la ruptura entre fuerzas intermoleculares como son las fuerzas del tipo de van der Waals y las interacciones dipolo-dipolo, lo cual ocasiona una desestabilización en el efecto protector ejercido entre proteína-pigmento.

4.8 Identificación de pigmentos en harina y en carotenoproteínas

Como ya se mencionó en la sección de materiales y métodos, se contó con estándares de astaxantina y β -caroteno. A continuación se reportan los valores de Rf, tanto del patrón como de los obtenidos de las muestras de carotenoproteínas. Los valores de Rf reportados se obtuvieron de correr la cromatografía en capa fina, tanto de los patrones como de las muestras (Tabla 13).

Tabla 13 Identificación de pigmentos carotenoides por medio de cromatografía en capa fina

Patrón	Rf patrón	Rf muestra	Identificación tentativa
β -caroteno	0.34	0.34	β -caroteno
		0.37	Astaceno
Astaxantina	0.41	0.41	Astaxantina
		0.63	Éster de astaxantina

Al correr la cromatografía de las muestras fue posible observar la presencia de dos manchas referentes a los pigmentos, dos de ellos corrieron paralelamente con los patrones, en tanto que los otros dos se sospecha que pueden ser astaceno (forma oxidada de la astaxantina) o algunas) de las formas isómeras de la astaxantina.

4.9 Estimación de la vida media de las carotenoproteínas

Para corroborar la mayor estabilidad del pigmento asociado a proteína con respecto a pigmentos aislados sin proteína, se comparó la vida media de ambos extrayendo el pigmento como se menciona en la sección de materiales y métodos, de acuerdo a la metodología propuesta por Britton (1985), en Velázquez (1995). Una vez extraídos éstos, se determinó la concentración de carotenoides totales en las muestras y se almacenaron a $4 \pm 1.0^\circ\text{C}$ para, de esta forma, al transcurrir cuatro semanas (tres semanas más el inicio), se observaran las pérdidas ocasionadas por tener al pigmento aislado (tabla 14).

En la Tabla 15 se nota que los pigmentos carotenoides resisten más los procesos de oxidación cuando se encuentran asociados a proteína, aumentando su estabilidad hasta en 88% con respecto al pigmento aislado, como es posible observar en las carotenoproteínas aisladas al cabo de 60 minutos de hidrólisis enzimática con P.A-3000, lo que habla de pigmentos carotenoides altamente estabilizados, sin la necesidad de emplear compuestos antioxidantes de origen sintético

Tabla 14. Vida media de los pigmentos encontrados tanto en las carotenoproteínas como en los pigmentos aislados al cabo de tres semanas

Condición Tiempo (min)	Carotenoproteínas				Pigmentos aislados de carotenoproteína					
	Inicio		3 semanas		1ª semana		2ª semana		3ª semana	
	mg C.T.	$\sigma\pm$	mg C.T.	$\sigma\pm$	mg C.T.	$\sigma\pm$	mg C.T.	$\sigma\pm$	mg C.T.	$\sigma\pm$
10'	5.882	0.558	5.100	0.024	2.260	0.021	0.937	0.020	0.730	0.010
60'	17.575	0.307	16.250	0.630	8.330	0.035	1.692	0.080	0.692	0.012
120'	8.559	0.557	8.310	0.720	3.420	0.049	0.896	0.024	0.687	0.007
180'	8.411	0.078	7.990	0.400	2.980	0.021	0.979	0.004	0.797	0.003

Donde C.T. = Pigmentos carotenoides totales, Condición = Carotenoproteínas obtenidas en diferentes tiempos de hidrólisis

Tabla 15. Porcentaje de degradación de pigmentos carotenoides totales después de tres semanas en 4°C, protegidos de la luz y expuestos a la atmósfera

Muestra	% Degradación
Carotenoproteína 10'	13.27
Pigmento aislado	87.59
Carotenoproteína 60'	8
Pigmento aislado	96.06
Carotenoproteína 120'	2.81
Pigmento aislado	92.05
Carotenoproteína 180'	8.27
Pigmento aislado	90.61

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Dentro de las conclusiones derivadas de este trabajo destacan las siguientes:

•Es factible la obtención de carotenoproteínas a partir de harinas de cefalotórax de camarón previa desmineralización empleando EDTA disódico 0.5 M en agitación constante y durante dos horas.

•Las condiciones con las que se logra la máxima extracción de proteína asociada a la máxima cantidad de pigmento con una confiabilidad del 95% son: 1% (20.33 U/g prot.) de "Proteasa alcalina PA-3000", durante 60 minutos a 50 °C y con un pH=9.5. A estas condiciones se obtiene un máximo de 26.47 mg de P S /ml. y 17.57 mg de pigmentos carotenoides totales /g de carotenoproteína.

•Fue posible la identificación de por lo menos 2 pigmentos carotenoides entre los cuales se encuentra la astaxantina y el β -caroteno; sin embargo, quedan por determinarse las proporciones en que se encuentran presentes en las carotenoproteínas.

•La hidrólisis de cefalotórax de camarón con 2 o más enzimas proteolíticas podría generar un mayor rendimiento de carotenoproteínas, sin embargo, se corre el riesgo de obtener concentraciones menores de pigmentos asociados a una mayor cantidad de proteína.

•En el proceso de hidrólisis enzimática se genera un subproducto (quitina) susceptible de ser procesada para la obtención de quitosanas.

•La degradación de los pigmentos carotenoides al cabo de tres semanas fue mínimo (11% aproximadamente) al compararse con aquellas que no tuvieron efecto protector (96.09%) por lo que se comprueba el efecto protector que biomoléculas como las proteínas ejercen en los pigmentos obtenidos.

*Se observó el efecto "protector" que establecen las proteínas hacia los pigmentos; sin embargo, se propone efectuar la prueba de estabilidad de los pigmentos por un período más prolongado y, en su caso, determinar la factibilidad de agregar agentes antioxidantes.

*Se sugiere un estudio detallado de asimilación de carotenoproteínas en especies acuáticas como truchas arcoiris o salmónes, empleando diferentes concentraciones de carotenoproteínas para observar su efecto asimilatorio y comprobar la efectividad de las mismas en cuestión de la coloración impartida en los tejidos de las especies anteriores.

*Dentro de las recomendaciones destaca la necesidad de estudios *in vivo* de la asimilación de este pigmento asociada con la proteína versus el pigmento puro.

*Asimismo, una vez corroborada su bondad se deberá hacer un estudio de factibilidad técnico-económica que permita establecer las condiciones más adecuadas de extracción al más bajo costo y con la mayor calidad del producto, considerando la protección ambiental como punto prioritario.

BIBLIOGRAFÍA

- Agricultural Handbook.** 1975. *Composition of foods*. U.S. Dept. of Agriculture, P. 8. Washington, D. C., EEUUA.
- Adler-Nissen, J.** 1986. *Enzymic hydrolysis of food proteins*. Elsevier Applied Science Pub. Pp. 17-19, 22-23. Londres, Inglaterra.
- AOAC.** 1980. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Assoc. Offic. Anal. Chem. Horwitz, W. Ed. 13a Ed. Washington, D.C., EEUUA.
- Baduí, D. S.** 1986. *Química de los alimentos*. Editorial Alhambra-Universidad. Pp. 108-265. México D.F., México.
- Baduí, D. S.** 1990. *Química de los alimentos*. Editorial Alhambra-Universidad. Pp. 272-380. México D.F., México.
- Braverman, J. B. S.** 1980. *Bioquímica de los alimentos*. Editorial El manual moderno. Pp. 43-44. México D. F., México.
- Bough, W. A.; Salter, W. I.; Wu, C. M. y Perkins, B. E.** 1978. Influence of manufacturing variables on the characteristics and effectiveness of chitosan products. I. Chemical composition, viscosity, and molecular weight distribution of chitosan products. *Biotechnol. Bioeng.*, 20: 1931-1943.
- Cano-López, A., Simpson, B. K. y Haard, N. F.** 1987. Extraction of Carotenoprotein from Shrimp Process Wastes with the Aid of Trypsin from Atlantic Cod. *J. Food Sci.*, 52:503-506.
- Cañipa, A. J.** 1994. *Estudio químico sobre el aprovechamiento integral del cefalotórax de camarón*. Tesis de Maestría. UNAM. Facultad de Química. México D.F., México.
- Conn, E. y Stumpf, P. K.** 1977. *Bioquímica Fundamental*. Tercera edición. Editorial Limusa. Pp. 205-232 México D.F., México.

- Counsell, J. N.** 1981. *Natural colours for food and other uses*. Applied Science Pub. Ltd. England; Cap. 6 Pp. 91-118. Londres, Inglaterra.
- Charley, H.** 1987 *Tecnología de alimentos*. Editorial Limusa. Pp. 603. México D.F., México.
- Desrosier, N.** 1986. *Elementos de tecnología de alimentos*. CECSA. Pp. 412-414. México D.F., México.
- Escobedo, G.** 1994. *Obtención de quitina por métodos enzimáticos a partir de cefalópodos de camarón*. Tesis de licenciatura. UNAM, Facultad de Química. México D.F., México.
- ENMEX S. A. de C. V.** 1996. Comunicación personal. Departamento de Ventas. Tlalnepantla, Edo. de México, México.
- Fang, J.T. y Chiou, Y-T.** 1996. *Batch cultivation and astaxanthin production by a mutant of the red yeast, Phaffia rhodozyma NCHU-FS501* J. Ind. Microbiol., 16: 179-181.
- Fennema, R.** 1993. *Química de los alimentos* Editorial Acribia. Pp. 643-654. Zaragoza, España.
- Gabriel, J. H.; Lindsay, M. J. y Walton, J. W.** 1984. *The growth of rainbow trout at given diets containing chitin and its relationship to chitinolytic enzymes and chitin digestibility*. Aquaculture, 37: 315-334.
- García, M. y López, A.** 1993. *Biotechnología alimentaria*. Editorial Limusa. Pp. 479-515. México D. F., México.
- Huítón, C.** 1983. *Biotechnología de enzimas*. Editorial Universidad. Pp. 89-100. México D.F., México.
- Huei-Mei-Chen y Meyers, P. S.** 1983. *Ensilage treatment of crawfish waste for improvement of astaxanthin pigment extraction*. J. Food Sci., 48:1516-1518.

- Hudon, J.** 1994. *Biotechnological Applications of Research on Animal Pigmentation*. Biotech. Adv., 12:49-69.
- Isler, O.** 1971. *Carotenoids*. Chemische Reite 23. Birkhäuser Verlag Basel. Pp.656-663
- I. I. B. B.** 1995. Comunicación personal. Instituto de Investigaciones Biomédicas Básicas. Unidad de aminoácidos y HPLC. UNAM, IIBM. México D.F., México.
- Johnson, E.** 1991. *Astaxanthin from microbial source*. Crit. Rev. Biotechnol., 11(4):297-326
- Katsumaya, M.; Hagi, M. y Yamamoto, K.** 1993. *Cosmetic Application of Astaxanthin*. En 10th International Symposium on Carotenoids. Oslo, Noruega
- Knorr, D.** 1984. *Use of chitinous polymers in food*. Food Technol., 85-97.
- Knorr, D.** 1991. *Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management*. Food Technol., 45 (1):114-120.
- Laboratorios La Roche.** 1994. Comunicación personal. Depto. de Ventas. Laboratorios La Roche S.A. de C.V., México D.F., México.
- Morrison, T. R. y Boyd, N. R.** 1990. Química orgánica. Quinta edición, Editorial Iberoamericana. Pp. 1323-1354. México D.F., México.
- Muzzarelli, R.** 1978. *Chitin*. Pergamon Press. P. 183. Londres, Inglaterra.
- Nawal, K. M. y Narang, K. Ch.** 1990. *Chitin and Chitosan. Versatile Polysaccharides from Marine Animals*. J. Chem. Educ., 67 (11):938-942.
- No, H. K. y Meyers, S. P.** 1989. *Crawfish chitosan as a coagulant in recovery of organic compounds from seafood processing stream*. J. Agric. Food Chem., 37: 580-583.
- Peterson, G. L.** 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et. al., which is more generally applicable. Anal. Biochem., 83:346-350.

- Pine, H.; Hendrickson, B.; Cram, J. y Hammond, S.** 1986. *Química Orgánica* 4ª edición, Mc Graw -Hill. Pp. 574-615. México D.F., México.
- Scheider, L.** 1985. *Nutrición. conceptos básicos y aplicaciones*. Mc Graw-Hill. Pp.104-127. México D.F., México.
- Schiedt, K.; Levenberg, F.J.; Vecchi, M. y Glinz, E.** 1985. *Absorption, retention and metabolic transformations of carotenoids in rainbow trout, salmon, and chicken*. Pure & App. Chem., 57, (5):685-692.
- Shuetz, D. R. y Hart, H.** 1980. *Química orgánica*. Primera edición. Publicaciones culturales, A. C. Pp. 540-548. México D.F., México.
- Simpson, B. K. y Haurd, N. F.** 1985. *The use of proteolytic enzymes to extract carotenoproteins from shrimp wastes*. J. Appl. Biochem , 7:212-222.
- Spinelli, J.; Lawrence, L. y Dave, W.** 1974. *Composition, Processing, and Utilization of Red Crab (Pleuroncodes planipes) as an Aquacultural Feed Ingredient*. J. Fisheries Res., 31(6):1025-1029.
- Stryer, L.** 1988. *Bioquímica* Tercera Edición, Tomo 1. Editorial Reverté, S. A. Pp.183-239. Barcelona, España.
- SEMARNAP.** 1995. Presentado en el 1º Informe de Gobierno. Poder Ejecutivo Federal, Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. México D.F., México
- Velázquez, M. E.** 1995. *Producción de astaxantina por fermentación sumergida por Phaffia rhodozyma* Tesis de maestría , UNAM, Facultad de Química, México D.F., México.
- Walford, J.** 1980. *Developments in Food Colours-1*. Applied Science Publishers Ltd. Cap. 6. Pp. 152-183. Londres, Inglaterra.

ANEXO 1
FUNDAMENTO DE LOS MÉTODOS EMPLEADOS

Determinación de proteína soluble por el método de Lowry-SDS
Método de Peterson (1977)

Preparación de reactivos

1. Solución de CTC (Carbonato de sodio, tartrato de potasio, sulfato de cobre.5H₂O)

10 g Na₂CO₃ 50 ml H₂O destilada

0.1 g CuSO₄ · 5H₂O y 0.2g tartrato de potasio 50mL H₂O destilada.

Se mezclan ambas soluciones para tener un volumen final de 100 mL.

2. NaOH (Hidróxido de sodio). Solución 0.8 N.

3. SDS (Sulfato dodecil de sodio). Solución al 10%

A) Solución CTC-NaOH-SDS

Se mezclan volúmenes iguales de las siguientes soluciones y en el mismo orden: CTC, NaOH y SDS. Mezclar volúmenes iguales de cada reactivo momentos antes de realizar la determinación. La solución A se prepara antes de empezar la técnica.

B) Reactivo FOLIN-CIOCALTEU-FENOL (marca Sigma)

Preparar una solución (1:6)

1 volumen de reactivo + 5 volúmenes de H₂O destilada.

Desarrollo:

Preparar una curva estándar con caseína sin vitaminas de 0-100 microgramos por mililitro.

Preparar las muestras problema en un intervalo de 5-100 microgramos de proteína soluble por mililitro.

Tomar 1 mililitro de la solución problema y agregar con agitación continua (vortex) 1 mL de la solución A:

Dejar reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Al término de los diez minutos, agregar a c: tubo 0.5 mL de la solución B, con agitación continua y se deja desarrollar la reacción durante 30 minutos.

Dejar reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Una vez pasado este tiempo se lee a 750 nanómetros. La reacción es estable hasta los 120 minutos de iniciada ésta, la concentración de proteína se calcula por interpolación en la curva estándar.

Fundamento:

El color final es resultado de : 1) Reacción de la proteína con el ión cobre en medio alcalino y 2) Reducción del reactivo fosfomolibdenofosfotungsteno (Folin-Ciocalteu-Fenol) por la tirosina y el triptófano presentes en la proteína tratada.

Determinación de % de nitrógeno por el método macro-kjeldahl. (A O A C, 1980)

Reactivos:

- | | | |
|--|-----------------------|----------------------|
| 1. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 4. HCl 0.1N | Zn en polvo. |
| 2. K_2SO_4 | 5. NaOH 0.1N | Rojos de metilo 0.1% |
| 3. H_2SO_4 conc. | 6. NaOH 50% | |

Método:

Introducir al matraz Kjeldahl de 800 mL, 0.5g de muestra envuelta en un papel blanco delgado, más 0.3 g de sulfato de cobre y 5 g de sulfato de potasio. Agregar 15 mL de ácido sulfúrico concentrado y realizar la digestión en el aparato Kjeldahl hasta la total destrucción de la materia orgánica.

Dejar enfriar y diluir la muestra con 350 mL de agua destilada.

Añadir 40 mL de solución de hidróxido de sodio al 50% enhiada en hielo y 0.2 g de zinc en polvo.

Conectar el matraz a la trampa de Kjeldahl que va unida al refrigerante.

Destilar sobre 50 mL de ácido clorhídrico 0.1N adicionados de 5 gotas de indicador rojo de metilo al 0.1% en alcohol. Cuando se alcance un volumen de 250 mL, suspender la destilación.

Titular el exceso de ácido con una solución valorada de hidróxido de sodio 0.1N hasta vire amarillo del indicador.

Es necesario preparar un blanco que contenga un papel como en el que se envolvió la muestra problema, siguiendo el procedimiento mencionado, de manera que se pueda descontar en los cálculos el nitrógeno presente en él.

Fundamento:

La proteína, junto con toda la demás materia orgánica se oxida por el ácido sulfúrico; el nitrógeno que se encuentra en forma orgánica se fija como sulfato de amonio.

Al reaccionar esta sal con una base fuerte se desprende amoníaco, que es recibido en un volumen conocido de ácido valorado.

Titulando el ácido no neutralizado se calcula la cantidad de amoníaco desprendido y así, la cantidad de nitrógeno en la muestra.

El % de nitrógeno se multiplica por el factor correspondiente a la muestra analizada y de esa manera se conoce su % de proteína.

Determinación de humedad (A O A C, 1980)**Método de secado en la estufa**

Pesar 2 g de harina en pesafiltro de aluminio con tapa, el cual ha sido previamente pesado después de secarlo 2 horas a 130°C. Secar la muestra una hora a 130°C con la ventilación abierta. Retirar de la estufa, dejar enfriar en desecador y pesar tan pronto como se equilibre con la temperatura ambiente.

Calcular el porcentaje de humedad reportándolo como pérdida de peso por secado a 130°C.

$$\% \text{ de humedad} = \frac{(A-B) \cdot 100}{m}$$

Donde:

A=peso del pesafiltro + muestra húmeda

B=peso del pesafiltro + muestra secada en estufa

m=peso de la muestra en gramos

Determinación de cenizas (A O A C, 1980)

Pesar con precisión 3g de harina en una cápsula de porcelana previamente pesada después de haber sido calcinada 2 horas a 600, °C. Calcinar la muestra carbonizándola primero con mechero en una campana de extracción, hasta que ya no salga humo. Meter a la mufla, cuidando que la temperatura no pase de 550°C para evitar la volatilización de los cloruros. Suspender el calentamiento cuando las cenizas estén blancas o grises (si se observan puntos

negros, humedecerlas con unas gotas de agua destilada, secar en la estufa a 130 °C y volver a calcinar) Enfriar en desecador y pesar. El porcentaje de cenizas se calcula con la fórmula:

$$\% \text{ de cenizas} = \frac{(A-B) \times 100}{m}$$

Donde:

A= peso de la cápsula + cenizas

B= peso de la cápsula vacía

m= peso de la muestra en gramos

Determinación de grasa cruda (A O A C, 1980)

Método de Goldfish

Poner a peso constante un vaso del aparato de extracción Goldfish con 2 o 3 perlas de vidrio. En un cartucho del aparato de extracción Goldfish, colocar 2 g de muestra seca, ya que aunque el éter penetra lentamente en los tejidos cuando están secos, lo hacen aún más lentamente cuando están húmedos. Colocar el cartucho en el aparato de extracción y aproximadamente 60 a 80 mL de éter etílico en el vaso. Realizar la extracción durante 4 a 6 horas hasta que por medio de una prueba con papel filtro se conozca el final de la extracción. Retirar el cartucho y reemplazarlo por un tubo para recuperar la mayor parte de éter hasta que el contenido del vaso esté casi vacío. Terminar de llevar a sequedad en una estufa con vacío a 70-80°C, hasta que el peso del vaso con la grasa no varíe más de 5 mg. La concentración de lípidos se calcula por diferencia de pesos y los resultados se expresan en lípidos por 100 g de material.

Determinación de fibra cruda (A O A C, 1980)

Se pesan 2 g de harina desengrasada, se colocan en un vaso de 600 mL. Añadir 1 g de asbesto preparado y 200 mL de solución de ácido sulfúrico al 1.25 % (0.255N) hirviendo. Calentar de inmediato (debe empezar a ebullición antes de un minuto), durante 30 min rotando el vaso de vez en cuando para incorporar las partículas que se adhieren a las paredes. Filtrar a través de papel seda especial utilizando vacío y lavar con agua destilada caliente hasta que

no se dé reacción ácida con rojo de metilo, pasar el residuo que quede en el filtro al vaso digestor ya limpio, usando una espátula y repetir la operación con una solución hirviendo de sosa al 1.25 % (0.313N). Después de refluxar 30 minutos se filtra sobre el mismo papel seda, se lava con 25 ml. de ácido sulfúrico al 1.25 % hirviendo y con agua destilada caliente hasta que el filtrado no dé reacción alcalina al rojo de metilo.

Pasar cuantitativamente el residuo a un vaso de precipitados lavando con agua destilada y filtrar sobre un crisol Gooch que lleva una delgada capa de asbesto y que ha sido calcinado durante y hora a 600°C. Llevar a la mufla y calcinar a 600°C durante 30 minutos. Enfriar y pesar. Determinar el blanco, tratando 1 g de asbesto preparado, con ácido y con alcali en la misma forma en que se procedió para la muestra. El contenido de fibra se calcula con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de fibra cruda} = \frac{(A-B) \times 100}{m}$$

Donde:

A= peso del crisol Gooch después de 2 h a 30 °C m – peso del crisol después de calcinar 30 minutos a 600°C

B= peso perdido en la determinación del blanco

m= peso de la muestra en gramos

TÉCNICA DE HIDRÓLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS

a) Preparación de la muestra

La muestra para el análisis de aminoácidos debe estar completamente seca, homogénea y con el menor contenido posible de grasa, sales pigmentos y carbohidratos.

b) Aminoácidos totales

Se pesan de 2 a 3 mg de muestra, se adicionan 200 mL de HCL 6N por cada mg de muestra. Se burbujea nitrógeno.

Se sellan los tubos a una presión menor de 25 millitorr.

Se dejan los tubos (ampolletas), a 110°C durante 20 h.

Después de este tiempo, se abren las ampolletas y se evapora el HCL en un condensador de vacío.

Una vez secas las muestras, se guardan en congelación a -4°C, selladas con parafina hasta el momento del análisis.

c) Triptofano

Se pesan de 2 a 3 mg de muestra; se adicionan 100 mL de HCL 4N de ácido metanosulfónico, conteniendo 0.2% de 3-(2 aminoetil)indol HCL.

Se sellan los tubos a una presión menor de 25 militorr

Se dejan los tubos a 110°C durante 22 h.

Transcurrido este tiempo se dejan enfriar los tubos y se guardan en congelador a -4°C hasta el análisis.

d) Análisis de aminoácidos

Las muestras preparadas que se encuentran en congelación se secan, se disuelven en agua y se hace una dilución 1:10 (en caso de triptofano se abren las ampolletas y se mide el volumen total en que están disueltas y se hace la dilución).

Se filtran por membrana de 0.22µm de porosidad para eliminar partículas.

Se toman 50 mL de la muestras, se adicionan 500 mL de reactivo de OPA y después de 120 s se inyecta.

Para aminoácidos totales

Solución A: Solución de acetato de sodio 50 mM, pH 6.8

Solución B: Metanol 100%

Flujo: 1.5 mL-min.

Columna: Ultrasphere XI. ODS. 7 cm de longitud, 4.5 mm de diámetro, 3µm tamaño de partícula.

Detector de fluorescencia: RFU, 0.05 filtro de emisión mayor de 418 nm, filtro de excitación 360 nm, loop 5 µL.

Gradiente de aminoácidos totales y triptofano

Tiempo	% B	Duración
0	15	5
5	22,5	3
15	35	10
35	70	15

El sistema se equilibra en 10 % de B.

Para triptofano el solvente B es metanol:acetonitrilo (75:25), con el mismo gradiente.

Calificación química o score químico (S.Q.)

$$S.Q. = \frac{\text{Relación del aminoácido esencial en la proteína de prueba}}{\text{Relación del aminoácido esencial en la proteína de referencia}} \times 100$$

Fundamento: Es un método químico que permite evaluar la calidad de una proteína y se basa en la relación del aminoácido indispensable que está en mayor deficiencia en la proteína de estudio, al compararla con la relación que establece la FAO.

ANEXO 2

DATOS EXPERIMENTALES

Con ayuda del paquete estadístico Statistics Social Program Science (S S P S) se determino la información del análisis de varianza expuesto en la tabla 15 (Sección de resultados) en donde se realizo la comparación entre la concentración óptima de enzima contra la cantidad de proteína liberada (Ver hojas anexas)

Análisis proximal (b. h.)

DETERMINACION	VALORES			PROMEDIO	D.S
PROTEINA	37.79	41.58	43.97	41.69	2.11
CENIZAS	25.98	26.10	25.91	25.98	0.096
FIBRA CRUDA	18.80	19.00	18.85	18.85	0.104
GRASA	4.28	4.30	4.32	4.32	0.02
CARBOHIDRATOS	3.75	3.72	3.79	3.76	1.43
HUMEDAD	7.43	7.70	7.69	7.60	0.10
TOTAL				100.00	

Valores de cenizas

CONCENTRACION	VALORES			PROMEDIO	D.S
0.1	24.82	22.35	22.36	23.17	1.42
0.25	22.08	21.20	20.10	21.11	0.99
0.50	20.47	20.40	20.40	20.42	0.023
0.75	2.47	2.49	2.54	2.50	0.036
1.0	1.96	2.10	2.30	2.12	0.17
CONTROL	25.34	26.01	26.60	25.98	0.64

Hidrólisis de caseína 1% (87.47 U/g de prot.)

TIEMPO (min)	mg P. S. /mL				PROMEDIO	D S
0	6.51	6.56	6.62	6.83	6.63	0.140
10	18.032	18.396	18.396	18.604	18.35	0.237
20	18.448	19.282	19.490	19.438	19.16	0.485
40	19.230	19.334	19.698	19.750	19.50	0.259
60	11.622	11.622	11.884	12.144	11.818	0.249
120	9.956	9.925	10.066	11.154	10.25	0.533
180	10.372	10.300	10.424	11.310	10.619	0.460

Actividad enzimática de la caseína E/S = 1% (87.47 U/g de prot.)

TIEMPO (min)	mg P. S. /mL				PROMEDIO	D S
0	6.688	6.636	6.584	6.260	6.709	0.135
1	6.267	7.123	6.203	6.980	13.283	0.035
2	15.214	14.956	14.696	15.210	15.004	0.018
3	15.839	15.318	15.425	15.528	15.529	0.014
4	17.332	18.00	18.12	18.14	17.089	0.020

Actividad enzimática del cefalotórax de camarón E/S = 1% (20.33U/g prot)

TIEMPO (min)	mg P. S. /mL				PROMEDIO	D S
0	4.916	4.072	5.324	5.636	4.985	0.677
1	5.840	5.848	7.306	7.302	6.574	0.842
2	9.700	11.780	11.788	9.700	10.742	1.203
3	10.740	10.636	11.992	10.740	11.027	6.645
4	12.718	12.722	11.988	11.996	12.356	0.420
5	15.848	11.784	14.284	15.952	14.467	1.680

Hidrólisis de cefalotórax de camarón E/S = 1% (20.33U/g prot)

TIEMPO (min)	mg P. S. /ml				PROMEDIO	D.S
0	4 072	4 488	4 488	5 324	4 535	0 528
5	15 848	11 784	14 284	15 952	14 467	1 944
10	15 220	14 908	18 048	18 452	17 240	1 760
20	20 800	20 952	20 984	-	20 912	0 0983
40	21 040	21 788	22 204	23 348	22 095	0 964
60	24 184	25 100	27 100	29 500	26 471	0 234
120	32 208	32 832	33 564	33 668	33 068	0 683
180	28 456	29 500	30 228	30 332	29 629	0 865

Hidrólisis de cefalotórax de camarón E/S = 0.33 % (6.69 U/g prot)

TIEMPO (min)	mg P. S. /ml				PROMEDIO	D.S
0	0 321	0 321	0 432	0 732	0 358	0 052
5	4 52	4 48	5 68	5 66	5 085	0 675
10	8 42	8 43	9 36	9 56	8 942	0 603
20	10 39	10 38	11 31	11 41	10 875	0 564
40	19 01	19 02	19 32	20 55	19 462	0 7064
60	21 066	23 025	23 120	25 692	23 228	0 892
120	25 881	26 720	27 025	27 22	26 705	0 590
180	28 045	28 896	30 105	30 20	29 3	1 037

Hidrólisis de cefalotórax de camarón E/S = 3.0% (61.017 U/g prot)

Tiempo (min)	Valores en mg P. S. /mL-				Promedio	D.S
0	2 908	3 060	3 135	3 136	3 059	0 107
5	13 616	13 923	13 925	14 080	13 886	0 194
10	18 624	18 937	22 168	13 396	19 78	1 623
20	22 400	22 632	22 608	22 808	22 612	0 167
40	25 096	25 328	25 484	25 560	25 367	0 204
60	27 564	28 412	28 564	28 720	28 315	0 516
120	31 200	31 352	31 222	31 218	31 248	0 069
180	32 940	33 344	33 036	32 572	32 973	0 318

**Determinación de pigmentos para diferentes tiempos de
hidrólisis enzimática E/S= 1% (20.33 U/g prot)**

TIEMPO (min)	mg de pigmentos carotenoides/ g carotenoproteínas			PROMEDIO ⁽¹⁾	D S
10	6.546	5.782	5.437	5.955	0.558
60	16.963	17.575	17.208	17.249	0.307
120	8.697	8.859	11.472	9.676	1.557
180	8.470	8.411	8.324	8.400	0.073

Carotenoides totales en harina entera y desmineralizada

MUESTRAS DE HARINAS	mg de pigmentos carotenoides/ gr de harina			TOTAL
Harina desmineralizada	17.908	17.687	17.845	17.813
Harina entera	15.798	15.923	15.640	15.787

TITLE PROTEINA SOLUBLE EN TCA TRES REL E/S
 SUBTITLE PROTEASA ALCALINA PA 3000
 DATA LIST FIXED V1 1 V2 3 V3 5 V4 7-11.
 FORMATS V4 (F5.2).
 DISPLAY

 Page 89 PROTEINA SOLUBLE EN TCA TRES REL E/S 11/19/96
 PROTEASA ALCALINA PA 3000

V1 - No label
 V2 - No label
 V3 - No label
 V4 - No label

VARIABLE LABELS V1 'RELACION E/S'

V4 'CONCENTRACION EN mg/ml DE PROTEINA SOLUBLE EN TCA'

VALUE LABELS V1 1 '0.33%' 2 '1%' 3 '3%'
 V2 1 'T0' 2 'T5' 3 'T10' 4 'T20' 5 'T40' 6 'T60' 7 'T120'
 8 'T180'

BEGIN DATA.
 98 cases are written to the uncompressed active file.

This procedure was completed at 13:48:49
 DISPLAY

 Page 90 PROTEINA SOLUBLE EN TCA TRES REL E/S 11/19/96
 PROTEASA ALCALINA PA 3000

V1 - RELACION E/S
 V2 - TIEMPO
 V3 - REPETICIONES
 V4 - CONCENTRACION EN mg/ml DE PROTEINA SOLUB

LIST

 Page 91 PROTEINA SOLUBLE EN TCA TRES REL E/S
 PROTEASA ALCALINA PA 3000

V1	V2	V3	V4
1	1	1	.33
1	1	2	.33
1	1	4	.33
1	1	4	.73
1	3	1	4.50
1	3	3	5.66
1	3	4	5.66
1	3	1	8.43
1	3	2	8.43
1	3	4	9.36
1	3	4	9.36
1	4	1	10.38
1	4	2	10.38
1	4	3	11.31
1	4	4	11.41
1	3	1	19.01
1	3	2	19.01
1	3	3	19.32

Page 92 PROTEINA SOLUBLE EN TCA TRES REL E/S
PROTEASA ALCALINA PA 3000

11/19/96

V1	V2	V3	V4
1	5	4	20.55
1	6	1	21.06
1	6	2	23.02
1	6	3	23.12
1	6	4	25.62
1	7	1	25.88
1	7	2	26.70
1	7	3	27.02
1	7	4	27.22
1	8	1	28.04
1	8	2	28.86
1	8	3	30.10
1	8	4	30.20
1	1	1	4.07
1	1	2	4.40
1	1	3	4.48
1	1	4	5.32
2	2	1	15.84
2	2	2	11.78

Page 93 PROTEINA SOLUBLE EN TCA TRES REL E/S
PROTEASA ALCALINA PA 3000

V1	V2	V3	V4
NNN	2	3	14.28
NNNN	4	15.95	
NNNN	1	15.22	
NNNN	3	14.90	
NNNN	3	18.04	
NNNN	3	4	18.45
NNNN	4	1	20.80
NNNN	4	2	20.95
NNNN	3	3	20.95
NNNN	4	4	20.98
NNNN	5	1	21.04
NNNN	5	2	21.78
NNNN	3	3	22.20
NNNN	5	4	23.34
NNNN	6	1	24.18
NNNN	6	2	25.10
NNNN	6	3	27.10
NNNN	4	4	29.50
NNNN	1	3	32.20

Page 94 PROTEINA SOLUBLE EN TCA TRES REL E/S
PROTEASA ALCALINA PA 3000

11/19/96

V1	V2	V3	V4
U	7	2	32.83
NNN	7	3	33.56
NNNN	7	4	33.66
NNNN	8	1	28.45
NNNN	8	2	28.90
NNNN	8	3	30.22
NNNN	8	4	30.33
UUU	1	1	2.90
UUU	1	2	3.06
UU	1	3	3.13
U	1	4	3.13

J	1	13	61
J	1	13	93
J	1	13	92
J	4	14	08
J	1	18	62
J	2	18	93
J	2	22	16
J	1	13	39

Page 95 PROTEINA SOLUBLE EN TCA TRES REL E/S
 PROTEASA ALCALINA PA 3000

11/19/96

V1	V2	V3	V4
J	4	1	22.40
J	4	2	22.40
J	4	3	22.63
J	4	4	22.70
J	5	1	25.09
J	5	2	25.32
J	5	3	25.48
J	5	4	25.56
J	6	1	27.56
J	6	2	28.41
J	6	3	28.56
J	6	4	28.72
J	7	1	31.20
J	7	2	31.35
J	7	3	31.22
J	7	4	31.22
J	8	1	32.94
J	8	2	33.34
J	8	3	33.03

Page 96 PROTEINA SOLUBLE EN TCA TRES REL E/S
 PROTEASA ALCALINA PA 3000

11/19/96

V1	V2	V3	V4
3	8	4	32.57

Number of cases read = 96 Number of cases listed = 96

Page 97 PROTEINA SOLUBLE EN TCA TRES REL E/S
 PROTEASA ALCALINA PA 3000

This procedure was completed at 13:44:17
 ONEWAY/ VARIABLES V4 BY V1 (1.3)/RANGES DUNCAN (0.05)/RANGES
 DUNCAN (0.01)/STATISTICS ALL

Page 98 PROTEINA SOLUBLE EN TCA TRES REL E/S
 PROTEASA ALCALINA PA 3000

11/19/96

----- O N E W A Y -----

Variable	V4	CONCENTRACION EN mg/mL DE PROTEINA SOLUB
By Variable	V1	RELACION E/S

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F _{0.05} Ratio
--------	------	----------------	--------------	-------------------------

Between Groups	2	394.0503	402.9301	4.4971
Within Groups	33	8313.9194	89.3970	
Total	95	9117.9797		

Page 99 PROTEINA SOLUBLE EN TCA TRES REL E/S 11/19/96
 PROTEASA ALCALINA PA 3000

----- O N E W A Y -----

Group	Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	95 Pct Conf Int	for Mean
Grp 1	32	15.5063	10.1335	1.7914	11.8527	To 19.1598
Grp 2	32	20.9838	8.7504	1.5469	17.8289	To 24.1386
Grp 3	32	22.1422	9.4304	1.6671	18.7422	To 25.5422
Total	96	19.5441	9.7969	.9999	17.5590	To 21.5292
Fixed Effects Model			9.4550	.9650	17.6278	To 21.4604
Random Effects Model				2.0464	10.7390	To 28.3492

Random Effects Model - Estimate of Between Component Variance 9.7698

Page 100 PROTEINA SOLUBLE EN TCA TRES REL E/S 11/19/96
 PROTEASA ALCALINA PA 3000

Group	Minimum	Maximum
Grp 1	.3200	30.2000
Grp 2	4.0700	33.6600
Grp 3	2.9000	33.3400
Total	.3200	33.6600

Tests for Homogeneity of Variances

Cochrans C = Max. Variance/Sum(Variances) = .3829, P = .696 (Approx.)
 Bartlett-Box F = .328, P = .720
 Maximum Variance / Minimum Variance 1.341

Page 101 PROTEINA SOLUBLE EN TCA TRES REL E/S 11/19,
 PROTEASA ALCALINA PA 3000

----- O N E W A Y -----

Variable V4	CONCENTRACION EN mg/ml DE PROTEINA SOLUB
By Variable V1	RELACION E/S

Multiple Range Test

Duncan Procedure
 Ranges for the .050 level -
 2.81 2.96

The ranges above are table ranges.
 The value actually compared with Mean(J)-Mean(I) is .
 6.6857 * Range * Sqrt(1/N(I) + 1/N(J))

PROTEASA ALCALINA PA 3000

G G G
r r r
D D D

Mean	Group	1	2	3
15.5063	Grp 1			
20.9838	Grp 2			
22.1422	Grp 3			

Homogeneous Subsets (Subsets of groups, whose highest and lowest means do not differ by more than the shortest significant range for a subset of that size)

SUBSET 1

Group	Grp 1	Grp 2
Mean	15.5063	20.9838

Page 106 PROTEINA SOLUBLE EN TCA TRES REL E/S
PROTEASA ALCALINA PA 3000

11/19.

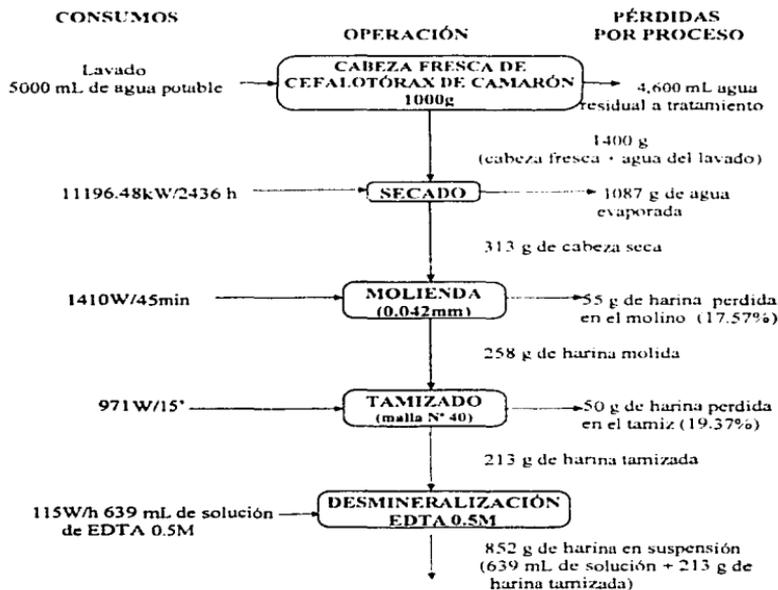
SUBSET 2

Group	Grp 2	Grp 3
Mean	20.9838	22.1422

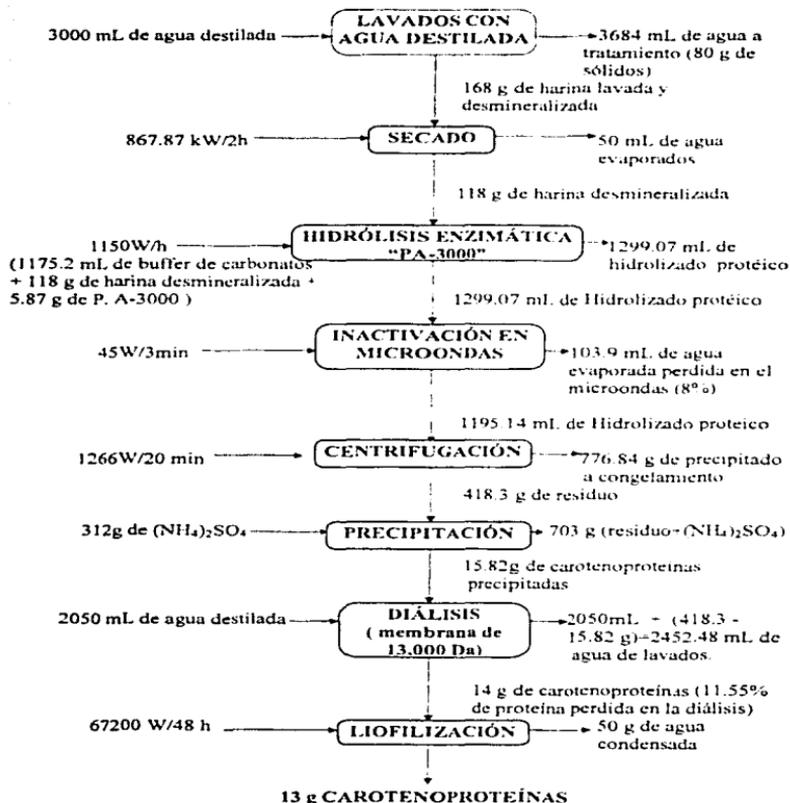
ANEXO 3

DATOS PRELIMINARES COMPARATIVOS DE EFICIENCIA DE SEPARACIÓN (RENDIMIENTO DE COMPLEJO CAROTENOPROTEÍNA CON RESPECTO A HARINA DE CEFALOTÓRAX DE CAMARÓN)

Rendimiento a partir de 1 kg de cefalotórax fresco de camarón. (Los equipos utilizados se describen en la sección de materiales y métodos, Sec. 3)



ESTA TESTIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA



El rendimiento global es de 1.2% con base en cabeza fresca de camarón (78.7 % de humedad).

Aproximación del tiempo de proceso y gasto energético a nivel laboratorio.

Operación	Gasto energético de los equipos	Tiempo (horas)
Recolección de muestreo		2
Lavado manual		1
Secado	11,196.48W	24
Molienda	1410W	0.45
Tamizado	971W	0.15
Desmineralizado	115W	1
Lavados con agua destilada		0.5
Secado	867.86W	2
Hidrólisis enzimática	1150W	1
Inactivación en microondas	75W	0.05
Centrifugación	1266W	0.20
Precipitación y Reposo		6
Dialísis	690W	6
Liofilización	67,200W	48
TOTAL	84,941.34W	92.35

De la tabla anterior se puede mencionar que los costos a nivel laboratorio siempre son más elevados que a nivel industrial. Sin embargo ya en el proceso se pueden realizar modificaciones y sustituciones de equipo, como por ejemplo, el proceso de liofilización, es un proceso energéticamente muy elevado, que podría ser sustituido con otro tipo de secado más económico, como lo es el de aspersión a temperaturas moderadas para no dañar las características del producto.