00528
77

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EMPLEO DE UNA ENZIMA QUITINOLÍTICA DE *Serratia marcescens* PARA LA OBTENCIÓN DE CAROTENOPROTEÍNAS A PARTIR DEL CEFALOTÓRAX DE CAMARÓN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA :

MIGUEL ÁNGEL RAMÍREZ CRUZ

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

MÉXICO, D.F. 2003

A

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

...ral de Bibliotecas de la
... electrónico e impreso el
...bajo recepcional.
...Miguel Angel Ramírez Cruz
...CHA: 29/abril/03
...IRMA:

Jurado asignado

Presidente	Dra. Amanda Gálvez Mariscal
Vocal	M. en C. Lucía Cornejo Barrera
Secretario	M. en C. Rolando Salvador García Gómez
Primer suplente	M. en C. Hilda Elizabeth Calderón Villagómez
Segundo suplente	Dra. María del Carmen Durán Domínguez

Lugar donde se realizó la investigación

(I) Laboratorios E-301 al 303 del Programa de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental (PIQAyQA)

(II) Laboratorio E-312 del Departamento de Alimentos y Biotecnología

(III) Laboratorio 4-A de la Facultad de Química de la UNAM

Asesor del Tema

M. en C. Rolando Salvador García Gómez _____

Supervisión Técnica

Dra. María del Carmen Durán Domínguez _____

Sustentante

Miguel Ángel Ramírez Cruz _____

B

Reconocimientos

El autor y asesores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y, en particular al Sistema de Investigación Golfo de México (SIGOLFO), por el apoyo financiero para el proyecto "Depuración de aguas domésticas usando humedales artificiales", Clave 00-06-016-V, a través de una beca-tesis.

Cabe mencionar que uno de los objetivos del proyecto contempla la utilización de humedales artificiales para depurar aguas residuales y promover la acuicultura de crustáceos y, en especial, de camarones de agua dulce (acociles), para mejorar la dieta de los habitantes de zonas rurales, con varias ventajas: por un lado, promover la depuración del agua residual y, por el otro, promover también la producción de carpas y tilapias que mejorarían la textura y color de su carne al adicionarles dietas en microcápsulas de alimentos con complejos caroteno-proteínicos basados en astaxantinas y otros pigmentos carotenoides derivados del cefalotótax de los acociles.

Agradecimientos

- *A la Dra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa, por su apoyo, orientación y gran calidez humana recibidos durante la realización de esta tesis.*

- *Al M. en C. Rolando Salvador García, que más que un asesor fue un gran amigo, por su paciencia, tiempo y dirección en la presente tesis y por haberme enseñado a resolver con diligencia los problemas que se me presentaron.*

- *A la M. en C. Idalia Flores Argüello, por la asesoría técnica recibida en la parte enzimática de esta tesis y por sus atinadas observaciones durante la realización de la misma.*

- *A las Maestras Julieta Sandoval y Lucia Cornejo, por sus consejos, recomendaciones y por su amistad.*

- *Al personal que labora en el PIQAyQA; a la M. en C. Marisela Bernal González, a la M. en C. Landy Ramírez Burgos, a la Srita. Lorena Núñez Alarcón, a la Sra. Irene González Palacios, a la Sra. Julia Colín Salazar y al Sr. Servando Bardales Sánchez, por su gran apoyo, disposición y amistad.*

- *A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química, porque además de brindarme el equipo e infraestructura para llevar a cabo esta investigación, dejo en ellas una parte muy especial de mi vida, de sueños e incidentes; de retos, logros y satisfacciones; de desvelos y trabajo; de amistad y de amor.*

- *A todos mis profesores que, desde la primaria, han ido formando al profesional y humano que ahora soy y a los que ahora me han enseñado a sentir el orgullo de ser "Universitario".*

A mis amigos

- *Isaac Barrios, Oscar Barrón, América Carranza, José Chávez, Rubén Flores, Reyna Gaona, Saúl García, Ernesto Laguna, Diana Nieves, Anel Olvera, Felipe Suárez y Eduardo Velázquez. Porque todos ellos, en tiempos distintos, han llenado mi vida. Por estar siempre conmigo en esta rápida vida de estudiante y por su invaluable amistad; gracias camaradas.*

- *A Lorena Álvarez, quien me ha dado su amistad, su familia y muchas lecciones de vida.*

- *A Patricia Rodríguez Razo, a Marco Antonio Rico Ponce y a su familia, que es como la mía, por compartir conmigo un gran cariño y una verdadera amistad.*

- *Especialmente agradezco a mi mejor amigo; Raúl Ramírez Cruz, por su gran apoyo y compresión, por sus desvelos y preocupaciones y por todo lo que sólo un hermano puede ofrecer. Gracias "Negrito"; gracias hermano.*

- *Y a todas aquellas personas que de una u otra manera han estado conmigo y me han enseñado su camino y que por no mencionarlas no dejan de ser importantes para mí.*

Miguel Ángel Ramírez Cruz

E

Dedicatorias

A Dios, por darme el maravilloso privilegio de ser.

A mis padres:

Virginia Cruz Cruz, quien incansable, siempre procuró mi bienestar y el de mis hermanos, por haberme dado todo su cariño, confianza y aliento. Y por haberme enseñado que el mayor tesoro de un ser humano son sus valores.

Pánfilo Ramírez González, porque día con día se esforzó para darme la mejor de las herencias; mi formación profesional y humana. Y porque sus consejos, llenos de sabiduría, me han sido de gran ayuda para salir de las adversidades.

A mis hermanos:

Isela, Raúl y David, por enseñarme a disfrutar de su compañía, por cuidarme y por haberme apoyado.

A mi familia, en especial a mi tío Luis Raygoza González, por ser ejemplo y estar con nosotros.

Al Doctor Miguel Ángel Rodríguez, cuya calidad humana y profesional me inspiró en todo momento.

f

Nota semántica

Para la realización de esta investigación se emplearon métodos espectroscópicos propios de la química analítica. Al revisar el Diccionario usual de la Real Academia Española, se observó que las palabras derivadas del estudio de bandas espectrales como *espectrofotometría*, procedimiento analítico fundado en el uso del espectrofotómetro; *espectrometría*, técnica del empleo de los espectrómetros y *espectrografía*, imagen obtenida por un espectrógrafo, y a la cual hacen sinónimo de *espectroscopia*, son palabras en las que se rompe el diptongo de la última sílaba acentuándola ortográficamente en la letra i. Curiosamente, la palabra *espectroscopia*, sinónimo de *espectrografía*, según el diccionario es grave, teniendo el acento prosódico en la sílaba co. Para nosotros, químicos, sería más razonable que la palabra se pronunciara y escribiera *espectroscopía* (con acento ortográfico en la letra i), en su acepción 1, conjunto de conocimientos referentes al análisis espectroscópico y dejar la palabra *espectroscopia* (con acento prosódico), con la acepción 2, que dice que es la imagen obtenida por un espectroscopio.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN	1
1.0 INTRODUCCIÓN	2
2.0 OBJETIVOS	5
2.1 Objetivo general	5
2.2 Objetivos particulares	5
3.0 MARCO TEÓRICO	6
3.1 Características del camarón	6
3.2 Composición del cefalotórax de camarón	7
3.3 Colorantes	9
3.4 Carotenoides	9
3.4.1 Astaxantina	11
3.4.2 Fuentes de astaxantina	11
3.5 Carotenoproteínas	12
3.6 Quitina	13
3.7 Proteínas	15
3.7.1 Conformación de las proteínas	16
3.7.2 Desnaturalización	17
3.7.3 Enzimas	18
3.8 Quitinasas	19
3.9 Empleo de la enzima quitinolítica de *Serratia marcescens* para la obtención de carotenoproteínas	21
4.0 MATERIALES Y MÉTODOS	22
4.1 Equipo empleado durante la parte experimental	22
4.2 Obtención y preparación de la muestra	23
4.2.1 Lavado	24
4.2.2 Secado	24
4.2.3 Molienda y tamizado	24
4.2.4 Desmineralización de la harina	24
4.2.5 Secado	24
4.2.6 Almacenamiento	25
4.3 Caracterización de la muestra (entera y desmineralizada)	25
4.4 Hidrólisis enzimática	27
4.4.1 Determinación de la actividad enzimática utilizando quitina comercial	28
4.4.2 Hidrólisis enzimática empleando harina de camarón como sustrato	29
4.5 Recuperación de los pigmentos y determinación de proteína	29
4.6 Cuantificación de los pigmentos	30
4.7 Purificación y caracterización de los pigmentos	31
5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
5.1 Caracterización de la harina de cefalotórax de camarón	33

H

Pág.

5.2 Hidrólisis con quitinasa sobre quitina estándar (SIGMA®) 35
5.3 Hidrólisis con quitinasa en harina de cefalotórax de camarón 38
5.4 Cuantificación de los pigmentos y del % de proteína soluble 43
5.5 Identificación de los pigmentos carotenoides 45
5.5.1 Cromatografía en capa fina y espectroscopia de UV-Vis, IR 45
6.0 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 50
BIBLIOGRAFÍA 52
ANEXOS 55
Anexo 1 Métodos establecidos para realizar el análisis proximal 55
Anexo 2 Datos experimentales y curvas patrón 64
Anexo 3 Gráficas de los barridos en UV-Vis para la determinación de las longitudes de onda máxima en glucosa y quitobiosa 71
Anexo 4 Análisis estadístico (SPSS) 73
Anexo 5 Datos comparativos de la eficiencia del proceso 83
Anexo 6 Tratamiento y disposición de los residuos generados 85

ÍNDICE DE FIGURAS Y DIAGRAMAS

Figura 1 Partes esquemáticas del camarón 6
Figura 2 Estructura química de la astaxantina, cantaxantina y astaceno 10
Figura 3 La quitina, un homopolímero de N-acetil-D-glucosamina 14
Figura 4 Espectros de IR de la quitina obtenida (quitina 80) y de la quitina SIGMA® 36
Figura 5 Espectro de UV-Vis para la astaxantina comercial SIGMA® 47
Figura 6 Espectro de UV-Vis para la astaxantina obtenida en esta investigación 48
Figura 7 Espectros de IR para la astaxantina comercial SIGMA® 49
Figura 8 Espectros de IR para la astaxantina obtenida en esta investigación 49
Diagrama 1 Obtención y preparación de la muestra 26
Diagrama 2 Obtención de las carotenoproteínas 32

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1 Hidrólisis enzimática de la quitina comercial SIGMA® 37
Gráfica 2 Hidrólisis de la harina de camarón con quitinasa durante 7 horas 40
Gráfica 3 Hidrólisis de la harina de camarón con quitinasa durante 30 horas 41
Gráfica 4 Cantidades de pigmento y proteína soluble obtenidas 45

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1	Comparación entre el análisis proximal del cefalotórax y el abdomen de camarón	7
Tabla 2	Equipo empleado durante la preparación y caracterización de la muestra	23
Tabla 3	Equipo y material empleado en la hidrólisis enzimática	27
Tabla 4	Análisis proximal de la harina de cefalotórax de camarón	33
Tabla 5	Cantidad de hidratos de carbono reductores y totales en la harina desmineralizada	34
Tabla 6	Comparación de los valores de la quitina obtenida con la quitina SIGMA®	35
Tabla 7	Determinación de la actividad enzimática de la quitinasa sobre quitina comercial a las 7 horas de hidrólisis	37
Tabla 8	Análisis estadístico entre 3.5% y 7.0% E/S	39
Tabla 9	Actividad enzimática de la quitinasa sobre harina de cefalotórax de camarón a las 7 horas de hidrólisis	40
Tabla 10	Actividad enzimática de la quitinasa sobre harina de cefalotórax de camarón a las 30 horas de hidrólisis	41
Tabla 11	Análisis estadístico entre 21 y 42% E/S	43
Tabla 12	Cuantificación de carotenoides expresados en µg de carotenoides totales/g muestra y porcentaje de proteína soluble	44
Tabla 13	Comparación entre la astaxantina obtenida y la astaxantina estándar	46

PALABRAS CLAVE

mg Qb/mL	Miligramos de quitobiosa/mililitro
Quitina 80	Quitina obtenida a partir de la harina con número de malla 80
Quitina SIGMA®	Quitina comercial de la marca Sigma-Aldrich®

J

RESUMEN

México cuenta con una gran extensión de litorales en donde se desarrollan diferentes actividades pecuarias, sobresale, de todas ellas, la captura del camarón. La fracción comestible del camarón abarca el 50%, la fracción restante, el cefalotórax o cabeza de camarón, constituye la parte no comestible y representa en la actualidad un grave problema de contaminación que se tiene que abatir. El cefalotórax es considerado como un subproducto rico en proteína (45%), quitina (16%) y pigmentos (2%) (astaxantinas). Estos últimos son considerados de mucho interés comercial debido, por un lado, a la coloración que imparten en la piel y tejidos de especies acuícolas y avícolas, aumentando de esta forma su valor comercial y, por el otro, a los costos elevados de producción. Anteriormente al desarrollo de este trabajo, se propuso el empleo de una enzima proteolítica comercial (PA-3000) para separar a la quitina del complejo quitina-proteína-pigmento, quedando unidos los pigmentos (astaxantinas) a las proteínas; sin embargo, los valores de los rendimientos obtenidos de las carotenoproteínas fueron bajos (33.0 µg/g de harina desmineralizada). Por lo anterior, en la presente investigación se propuso emplear una quitinasa de *Serratia marcescens* (Sigma-Aldrich®) para la obtención de carotenoproteínas empleando harina de cefalotórax de camarón con un tamaño de partícula de 0.177 mm (malla 80) obtenida a partir de cabezas frescas de camarón. Los resultados del análisis proximal fueron muy semejantes a los reportados en la literatura, así mismo, se estimó el porcentaje de hidratos de carbono totales y reductores, siendo de 1.147% y de 1.103%, respectivamente. Por otra parte, la cantidad obtenida de quitina a partir de la harina de cefalotórax de camarón fue alrededor del 17%. La hidrólisis enzimática se llevó a cabo, en primer lugar, determinando la actividad de la quitinasa sobre un sustrato estándar (quitina comercial Sigma-Aldrich®), la cual fue de 0.023 U.I. Posteriormente, se procedió a emplear a la harina de camarón como sustrato. Las condiciones con las que se obtuvo la máxima cantidad de pigmento asociado a las proteínas fueron: hidrólisis sobre harina de camarón con relación E/S = 42% (0.120 U.I.) durante 24 horas de reacción a 25 °C y con un pH de 6.0. Bajo estas condiciones, fue posible la obtención de 2.953 mg quitobiosa/mL, 19.733% de proteína soluble y 99.570 µg de carotenoides totales/g harina hidrolizada. Este valor fue comparado con datos de la literatura indicando una recuperación 3 veces mayor en esta investigación. La astaxantina obtenida fue purificada por cromatografía en capa fina para, posteriormente, realizarle un análisis por espectroscopia de IR, en donde se obtuvieron bandas características para estos compuestos en la región de 3483 cm^{-1}, 1125-1277 cm^{-1} y de 1650cm^{-1}, correspondientes a los grupos funcionales alcohol, cetona y carbonilo, respectivamente. Así mismo, se realizó un estudio por espectroscopia de UV-Vis en donde se obtuvo la λ máxima de absorción para la astaxantina obtenida en esta investigación la cual fue de 471 nm y de 470 nm para la astaxantina comercial Sigma-Aldrich®. Basándose en lo anterior, es recomendable realizar análisis confirmatorios de la presencia de este pigmento por medio de técnicas analíticas alternas que presenten una mayor sensibilidad.

1.0 INTRODUCCIÓN

En México, la explotación del camarón ocupa el cuarto lugar dentro de las industrias pesqueras de mayor producción y representa en la actualidad una importante fuente de divisas para el país. Las fracciones no comestibles del camarón (cabeza) generalmente son desechadas en alta mar o en puertos y tiraderos municipales, generando una fuente de contaminación grave (esto es si se toman en cuenta los altos volúmenes de captura e industrialización) ya que la SEMARNAT, durante el año 2002, reportó una captura alrededor de 73,000 Ton.

Por otra parte, los residuos generados durante el descabezado pueden ser una fuente de recursos muy importantes, ya que la cabeza o cefalotórax de camarón contiene una gran cantidad de nutrimentos, destacando las proteínas, que contienen todos los aminoácidos indispensables, así como los lípidos. Adicionalmente, también se encuentran los pigmentos (los cuales son el estudio de esta investigación), la quitina y su derivado la quitosana, que proveen un gran número de aplicaciones en la industria alimentaria, cosmetológica y farmacéutica (Escobedo y col., 1999). Los pigmentos que se encuentran conformando a las carotenoproteínas forman parte del grupo de las xantofilas (forma oxidada de los carotenos) de los cuales son pigmentos representativos los siguientes: luteína, capsantina, zeaxantina, criptoxantina, cantaxantina y astaxantina (Baduí, 1986). De los pigmentos anteriormente mencionados, la astaxantina es el colorante empleado comúnmente en las dietas de animales para teñir los tejidos de especies

acuícolas como son los salmones, la trucha "salmonada" y arco iris, así como de algunas especies avícolas como los flamencos; ya que estos grupos no pueden sintetizar "de novo" estos pigmentos y es necesario adicionarlos en su alimentación, brindando la típica coloración rosa-anaranjada de estas especies. Cabe mencionar, que los mamíferos presentan una mejor absorción de β-carotenos, mientras que los peces y las aves absorben mejor las xantofilas (Velázquez, 1995).

Los productores de salmones y trucha arco iris se encuentran 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 la piel y tejidos; sin embargo, debido a la difícil extracción de la misma, recurren a la astaxantina sintética fabricada por los laboratorios Roche (Suiza), con el inconveniente de los altos costos que tienen que pagar por este producto. Alternativamente a esta problemática, se realizó un estudio (García, 1997) en donde se propuso el empleo de una enzima proteolítica comercial (PA-3000) para separar a la quitina del complejo quitina-proteína-pigmento, quedando unidos los pigmentos (astaxantinas) a las proteínas y contribuyendo por un lado, a la nutrición de dichas especies y, por el otro, a su coloración, sin embargo, los rendimientos que se reportaron en la recuperación de las carotenoproteínas fueron

bajos. Por ello en este estudio se propuso el empleo de una quitinasa de *Serratia marcescens* (Sigma-Aldrich®) para comprobar si los porcentajes de recuperación se incrementan al romperse el enlace entre la quitina y la proteína, dejando el enlace proteína-pigmento prácticamente inalterado.

A continuación se expondrán los objetivos de este trabajo enmarcados dentro de un objetivo general.

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

- **Extraer la máxima cantidad de carotenoproteínas del complejo quitina-caroteno-proteína del cefalotórax de camarón mediante el empleo de una enzima quitinolítica de *Serratia marcescens***

2.2 Objetivos particulares

- **Caracterizar la harina del cefalotórax de camarón empleando un análisis proximal**

- **Cuantificar y corroborar la presencia de quitina en el cefalotórax de camarón**

- **Determinar las mejores condiciones de extracción en las cuales se obtiene la máxima cantidad de pigmento asociado al complejo quitina-caroteno-proteína**

- **Determinar la cantidad de pigmentos y proteína extraídos**

- **Evaluar la presencia de astaxantina en las carotenoproteínas obtenidas empleando cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés), así como espectroscopia de IR y UV-Vis**

3.0 MARCO TEÓRICO

3.1 Características del camarón

El camarón es un crustáceo de la familia de los decápodos que habita, de acuerdo al talud continental, en la región pelágica a los 200 m. Su cuerpo se divide en dos partes principales: cabeza y cola. La primera es la combinación de cabeza y tronco en una sola unidad (cefalotórax) que lleva los órganos de los sentidos: ojos, dos pares de antenas que le sirven para orientarse, boca, tres pares de patas prensadoras, dos pares de patas caminadoras y, por último, las branquias. La segunda, consta de seis segmentos abdominales, cinco pares de pleópodos y la cola que le sirve para nadar a contracorriente (Calderón y col., 1992).

En la **Figura 1** es posible apreciar las partes que componen a un camarón.

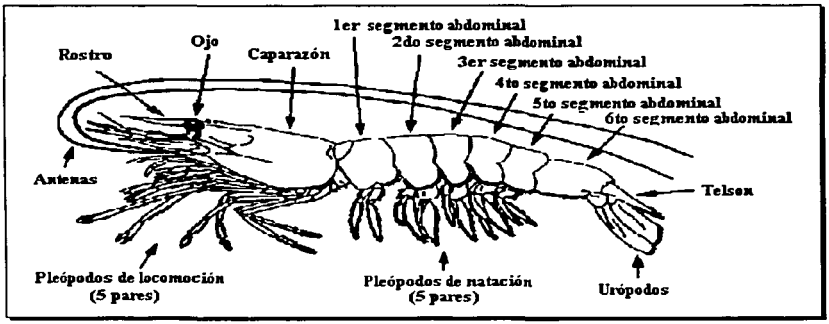


Figura 1. Partes esquemáticas del camarón (Anónimo, 2002)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.2 Composición del cefalotórax de camarón

La región del cefalotórax posee un contenido mayor de nitrógeno, a diferencia del abdomen, además de contener gran variedad de minerales como calcio, hierro, potasio y sodio, como se muestra en la **Tabla 1.**

Tabla 1. Comparación entre el análisis proximal del cefalotórax y del abdomen de camarón (Cañipa, 1994)

Análisis Proximal del camarón		
Determinación	**Abdomen de camarón**	**Cefalotórax de camarón (b.s)**
Humedad (%)	78.2	--
Grasa cruda (%)	0.8	4.63
Proteína cruda* (%)	18.1	47.70
Cenizas (%)	1.71	26.86
Fibra cruda (%)	--	19.35
Calcio (mg/100 g)	63.0	10.47
Hierro (mg/100 g)	1.60	75
Sodio (mg/100 g)	--	9.15
Potasio (mg/100 g)	--	2.76

* Nitrógeno multiplicado por un factor de 5.4

En esta tabla se observa que el componente más abundante en el cefalotórax de camarón es la fracción nitrogenada, sin embargo, se cuenta con una cantidad significativa de fibra cruda y cenizas. En la fracción lipófila se encuentran, además de las sustancias liposolubles responsables del aroma y del sabor típicos del camarón, los pigmentos liposolubles de tipo carotenoides, los cuales son los responsables de la coloración característica del camarón. Los pigmentos carotenoides que se encuentran en el cefalotórax de camarón comprenden

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

estructuras muy parecidas que globalmente se conocen como astaxantinas. En la **Figura 2** se pueden observar algunas de ellas. Dentro de este grupo, los pigmentos predominantes son la astaxantina, la cantaxantina y el astaceno (Chen y Meyers, 1982a) siendo la astaxantina el pigmento encontrado en una concentración mayor, seguido del astaceno (Meyers y Bligh, 1981).

Adicionalmente, el cefalotórax de camarón es especialmente rico en los ácidos glutámico y aspártico. Todos los aminoácidos indispensables se encuentran presentes en los siguientes porcentajes con relación al contenido de proteína: treonina, 5.38, metionina, 2.62; valina, 5.42; fenilalanina, 4.83; isoleleucina, 4.68; leucina, 7.05; lisina, 6.71 y triptófano, 1.17. Después de las proteínas, el segundo componente más abundante lo constituyen las sales minerales, principalmente carbonatos de calcio y magnesio. Estas sustancias se encuentran asociadas a la quitina y a las proteínas, confiriéndole al cefalotórax la rigidez que lo caracteriza. Por su parte, la quitina (la palabra quitina se deriva del griego y significa túnica o envoltura) representa un componente de gran importancia en el cefalotórax de camarón y, en general, forma parte de la estructura de algunos insectos, así mismo se le encuentra en organismos como levaduras, hongos, bacilos, y algunos crustáceos. La quitina esta compuesta por unidades de glucosamina y ácido acético, como se aprecia en la **Figura 3** (Muzzarelli, 1978).

3.3 *Colorantes*

Un colorante es un pigmento u otra sustancia obtenida por la síntesis o artificio similar, extraída, aislada o derivada a partir de un vegetal, animal o mineral y que cuando es añadida o aplicada a los alimentos, medicamentos, cosméticos, o al cuerpo humano, es capaz por sí misma (sola o a través de una reacción con otra sustancia) de impartir coloración. En México, la Secretaría de Salud enfoca su definición sobre el origen de la sustancia, caracterizándola como aquélla obtenida de los vegetales, animales, minerales o por síntesis y que es empleada para impartir o acentuar el color, sin especificar su uso o aplicación. De acuerdo con su origen o procedencia, los colorantes son obtenidos por fuentes naturales, ya sean microorganismos, vegetales, animales o minerales y aquellos producidos por síntesis química (sintéticos) incluyendo a los idénticos a los naturales (Quintero y col., 1993).

3.4 *Carotenoides*

Los carotenoides forman un grupo de compuestos liposolubles de color amarillo, naranja y rojo, ampliamente distribuidos en la naturaleza y constituyen uno de los pigmentos más importantes. Estos compuestos se pueden dividir en dos grandes grupos de acuerdo con su estructura química: en carotenos y xantofilas (forma oxigenada de los carotenos). En la naturaleza existen en forma libre, en los tejidos vegetales, disueltos en lípidos, formando complejos con las proteínas,

carbohidratos y ácidos grasos, los cuales forman diferentes coloraciones según la manera en que interaccionen. La interacción entre las proteínas y los carotenoides aumenta la estabilidad de estos pigmentos y modifica el color que originalmente tienen en forma individual. La industria de los alimentos emplea diferentes carotenoides como colorantes, principalmente los sintéticos encontrándose en diferentes presentaciones: líquidos, en suspensiones, en geles, en emulsiones y, finalmente, en forma de deshidratados. Entre los componentes del cefalotórax de camarón se encuentran los pigmentos carotenoides, con estructuras químicas muy similares a los compuestos que globalmente se conocen como astaxantinas. En la **Figura 2.** se muestran las estructuras de algunos de ellos (Baduí, 1896).

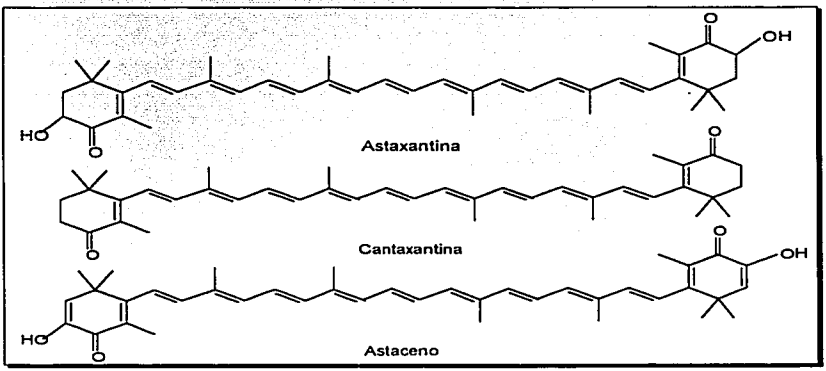


Figura 2. Estructura química de la astaxantina, cantaxantina y del astaceno (Baduí, 1986)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La relevancia de los carotenoides, en general, no sólo 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 en vitamina A y la de actuar como agentes anticancerígenos debido a su capacidad de capturar radicales libres (Badui, 1986; Velázquez, 1995).

3.4.1 Astaxantina

La astaxantina, 3,3–dihidroxi-β,β-caroteno-4,4-diona, se encuentra formada por ocho unidades de isopreno (Figura 2), presenta formas de cristales color violeta. Su punto de fusión es de 224 °C. Su espectro de absorción presenta las siguientes longitudes de onda máxima: 489 nm en cloroformo, 480 nm en acetona, 478 nm en etanol y 470 nm en hexano; al igual que otros carotenoides es sensible a la luz, a la temperatura, a los ácidos, al oxígeno y a la presencia de álcalis (Velázquez, 1995).

3.4.2 Fuentes de astaxantina

Crustáceos: Los crustáceos y en especial su caparazón significan una fuente natural muy importante de astaxantina que ha sido empleada como alternativa para la pigmentación de la piel y los tejidos del salmón en granjas acuícolas (Johnson y col., 1980). También contiene altos niveles de quitina que puede ser aprovechable en la industria cosmetológica y alimentaria, además de poseer un alto contenido de proteínas lo cual hace a los crustáceos una buena opción a explotar.

Síntesis química: La astaxantina sintética es la fuente principal empleada para pigmentar la piel y los tejidos del salmón, es preferida por los productores de salmón sobre la cantaxantina debido a que se absorbe con una mayor eficiencia y brinda una coloración más natural y homogénea a los alimentos procesados. El procedimiento comercial empleado para la síntesis química de astaxantina no es del dominio público y por ello no es factible estimar los costos de manufactura (Velázquez, 1995).

Fuentes microbianas: La astaxantina también se puede obtener por medio de levaduras del género *Phaffia* que se caracterizan por presentar colonias de color rojo-naranja debido a la presencia de pigmentos carotenoides. El contenido de astaxantinas en la cepa silvestre es de 500 µg del total de carotenoides, de los cuales del 40-90% corresponde a astaxantina; 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 absorción baja de astaxantina por parte de algunas especies, como lo es la trucha arcoiris y una inestabilidad del pigmento al extraerse con disolventes orgánicos (Johnson y An, 1991).

3.5 Carotenoproteínas

A los complejos formados por pigmentos carotenoides y proteínas se les denominan carotenoproteínas y se encuentran principalmente en organismos

invertebrados. Cuando suceden estas asociaciones en los crustáceos hay efectos importantes que se mencionan a continuación: por una parte, el pigmento se torna más soluble, existe un cambio ligero en la coloración del mismo, aumentando su estabilidad. Por otra parte, la quitina que se encuentra asociada a las proteínas de manera covalente, le confiere una estabilidad mayor y una dureza y rigidez a la estructura. Las carotenoproteínas son productos estables en las cuales la molécula carotenoide se liga con las proteínas, esto se observa en los crustáceos mostrando coloraciones violetas, azules, púrpuras, verdes y cafés. En las carotenoproteínas se encuentran complejos como la crustacianina, en la cual el carotenoide, casi siempre astaxantina, se encuentra ligado a sitios específicos con una glicoproteína. Su espectro de absorción, por tener a la astaxantina como su principal carotenoide, presenta las siguientes longitudes de onda máxima en los siguientes disolventes: 492 nm en cloroformo; 479 nm en etanol, 482 nm en butanol y 470 nm en hexano. Las carotenoproteínas comúnmente se presentan en los caparazones de crustáceos determinando su coloración (Muzzarelli, 1978).

3.6 Quitina

La quitina es el componente estructural principal de los exoesqueletos de invertebrados tales como los crustáceos, los insectos y las arañas, se encuentra presente también en las paredes celulares de la mayor parte de los hongos y de las algas. Es, por tanto, casi tan abundante como la celulosa. La quitina es un

homopolímero constituido por restos de N-acetil-D-glucosamina unidos por enlace β(1-4) (Figura 3). Sólo se diferencia químicamente de la celulosa en que cada grupo OH-C (2) se halla constituido por una función acetamida (Voet y Voet, 1992).

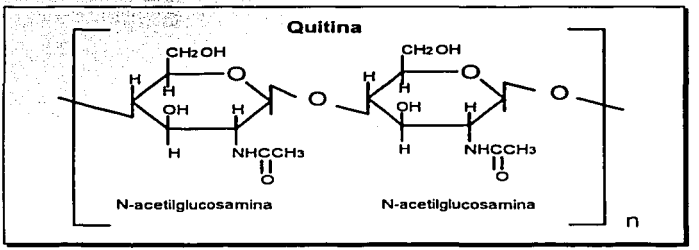


Figura 3. La quitina, un homopolímero de N-acetil-D-glucosamina con enlace β (1-4)

La quitina puede emplearse como sustrato para la producción de proteína unicelular de muy buena calidad, la cual puede incorporarse en alimentos balanceados para animales. La propiedad quelatante de la quitina dada por su naturaleza policatiónica hace de este polímero un producto ideal para la separación de coloides y partículas suspendidas que se generan durante la elaboración de ciertos tipos de alimentos, permitiendo la recuperación de materiales como proteínas, grasas e hidratos de carbono de buena calidad, que pueden ser reciclados como alimento o forraje para animales (Voet y Voet, 1992).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.7 Proteínas

Las proteínas son las moléculas orgánicas más abundantes en las células, ya que constituyen el 50 por ciento o más del peso seco. Se encuentran en todas las partes de cada célula, ya que son fundamentales en todos los aspectos de la estructura y función celulares. Existen muchas clases de proteínas diferentes, cada una de ellas especializada en una función biológica diferente. Además, la información genética es expresada en su mayor parte por estructuras proteínicas. Desempeñan gran diversidad de funciones, entre las que se citan las siguientes: actúan como catalizadores, elementos estructurales, sistemas contráctiles, reservas de elementos nutritivos, vehículos de transporte, hormonas y como elementos de protección. Todas ellas contienen carbono, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno y algunas otras azufre. Por lo común, solamente se encuentran 20 α-aminoácidos distintos como unidades conformacionales de las proteínas. Estos se encuentran unidos covalentemente entre sí formando largos polímeros ramificados mediante uniones amida sustituidas llamadas enlaces peptídicos. Estas macromoléculas, que reciben el nombre de polipéptidos, pueden contener centenares de unidades de aminoácidos. Las proteínas se dividen en dos clases principales basándose en su composición: las proteínas *simples* y las proteínas *conjugadas*. Las proteínas simples son aquellas que, por hidrólisis, producen solamente aminoácidos, sin ningún otro producto principal, orgánico o inorgánico. Las proteínas conjugadas son aquellas que, por hidrólisis producen, no solamente aminoácidos, sino también otros

componentes orgánicos o inorgánicos. Las proteínas conjugadas pueden clasificarse de acuerdo con la naturaleza química de sus grupos prostéticos, como nucleoproteínas y lipoproteínas, las cuales contienen ácidos nucleicos y lípidos respectivamente, así como fosfoproteínas, metaloproteínas y glucoproteínas (Voet y Voet, 1992). Además de iones, metales y lípidos, las proteínas pueden contener otros numerosos compuestos a través de interacciones débiles o de enlaces covalentes, entre los ejemplos que cabe destacar se encuentran pigmentos así como sustancias con actividades biológicas diversas (Fennema, 1993).

3.7.1 *Conformación de las proteínas*

El término conformación, se emplea para referirse a la estructura combinada primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria de una proteína.

La *estructura primaria* se refiere al esqueleto covalente de la cadena polipeptídica y establece de modo específico la secuencia de sus restos de aminoácidos. La *estructura secundaria* se refiere a la ordenación regular y periódica en el espacio de las cadenas polipeptídicas a lo largo de una dirección. La estructura secundaria es sobre todo evidente en las proteínas fibrosas, en las que las cadenas polipeptídicas poseen una conformación extendida o enrollada longitudinalmente. Lo mismo ocurre en los segmentos de cadenas polipeptídicas de las proteínas globulares. El término *estructura terciaria* se refiere a la forma en que la cadena polipeptídica se curva o se pliega para formar la estructura estrechamente plegada y compacta de

las proteínas globulares. El término *estructura cuaternaria* pone de manifiesto el cómo se disponen en el espacio las cadenas individuales polipeptídicas de una proteína que posee más de una cadena. La mayor parte de las grandes proteínas, ya sean fibrosas o globulares, contienen dos o más cadenas polipeptídicas, entre las cuales pueden o no existir enlaces covalentes (Voet y Voet, 1992).

3.7.2 Desnaturalización

Muchas moléculas proteínicas sólo retienen su actividad biológica dentro de un intervalo muy limitado de temperatura y pH. La exposición de proteínas solubles o globulares a pH extremos o temperaturas elevadas, les hace experimentar un cambio conocido como *desnaturalización*. Ésta consiste en el desplegamiento de la estructura nativa plegada de la cadena polipeptídica de las moléculas de las proteínas globulares. Cuando la agitación térmica provoca que la estructura plegada se desdoble, originando una cadena libremente ondulada, la proteína pierde su función biológica o actividad. Se han observado muchos casos en que una molécula desplegada recupera su forma nativa en un proceso que recibe el nombre de *renaturalización*. La renaturalización de una proteína no desarrolla ninguna actividad biológica que no se hallase ya presente en la proteína original. Si la proteína desnaturalizada fuera una enzima, también puede recuperar su actividad catalítica por renaturalización, sin ningún cambio en la especificidad de la reacción catalizada (Voet y Voet, 1992).

3.7.3 Enzimas

Las enzimas son proteínas que se comportan como catalizadores acelerando la velocidad de las reacciones que se llevan a cabo en los seres vivos sin alterar el equilibrio (Quintero y col., 1993).

Desde el punto de vista comercial resulta menos costoso el empleo de una preparación enzimática que la misma enzima purificada. Generalmente, las preparaciones enzimáticas son estandarizadas empleando ensayos de actividad enzimática. La unidad internacional estándar (U.I.) es la unidad empleada generalmente en las preparaciones enzimáticas, y se define como la cantidad de enzima que, bajo condiciones definidas, cataliza la transformación de un micromol o un microequivalente de sustrato por unidad de tiempo dado. 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 (Adler-Nissen, 1986).

1) *Concentración de sustrato [S]*: Se expresa como el porcentaje en masa del sustrato respecto a la masa del total de la mezcla de reacción.
2) *Relación enzima / sustrato [E/S]*: Es la cantidad de enzima relativa a la concentración de sustrato al inicio de la reacción
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 tanto, determina su estructura funcional. Los sitios activos de la enzimas se

componen a menudo de grupos ionizables que deben encontrarse en la forma ionica adecuada con el fin de mantener la conformación del sitio activo, unir los sustratos y catalizar la reacción. A valores de pH óptimos, se cuenta con una mayor afinidad hacia el sustrato y la reacción se da con una eficiencia mayor (Segel, 1976).

4) *Temperatura*: Las enzimas pueden fácilmente desnaturalizarse 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 eliminar su actividad. Una molécula de una enzima es una estructura frágil y muy delicada, si la molécula absorbe demasiada energía, la estructura terciaria se rompe y la enzima se desnaturaliza, es decir, se pierde la actividad catalítica (Segel, 1976). Cabe mencionar que, en muchos casos, se ha observado un efecto de "regeneración" enzimática al paso del tiempo, debido a un proceso de recuperación parcial de la estructura tridimensional de la proteína lo cual conduce a la restauración de los sitios activos (García, 1997).

3.8 Quitinasas

La hidrólisis enzimática de la quitina, es realizada por un sistema quitinolítico, el cual consiste de una hidrolasa o quitinasa la cual rompe a la quitina para producir quitobiosa (Sigma-Aldrich®, 2001).

La producción de quitinasas se encuentra muy distribuida entre las bacterias

Chromobacterium, Klebsella, Pseudomonas, Serratia, Clostridium, Bacillus y *Vibrio*. La quitinasa también es sintetizada por algunos protozoarios y por diferentes tejidos glandulares del sistema digestivo de muchos nematodos, policatos y oligocatos, moluscos y artrópodos. En organismos vertebrados, la quitinasa es secretada por el páncreas y la mucosa gástrica de los peces, insectos, anfibios y reptiles. La fuente de obtención de quitinasa purificada es a partir de cultivos filtrados de *Streptomyces griseus, Aspergillus niger, Bacillus thuringiensis* y *Serratia marcescens*. La quitinasa es específica para el polímero N-acetil-D-glucosamina, posee un pH óptimo de acción de 6, cuando el sustrato es quitina. La enzima cruda o purificada es estable en condiciones de refrigeración hasta por dos años y puede ser inactivada por la acción de los iones cobre, mercurio, magnesio, calcio, entre otros. Dentro de sus usos se encuentra su aplicación como ingrediente activo de bioinsecticidas; estudios llevados a cabo indican que el uso de este tipo de enzimas en el control de hongos que infectan plantas podría ser útil (Escudero y col, 1998). De la hidrólisis de la quitina, se obtiene el disacárido quitobiosa (N,N-diacetil-D-glucosamina o NDG) que, de manera natural, se encuentra en el calostro y la leche materna y sus derivados alquilados poseen un efecto promotor de crecimiento (factor bifidus) para la bacteria *Lactobacillus bifidus* que, al igual que otros microorganismos como *L. acidophilus*, son parte importante de la flora intestinal normal. Dichos microorganismos intervienen en procesos de asimilación de productos lácteos, particularmente ayudando a desdoblar la lactosa. Otra

aplicación importante de la NDG es que, junto con el suero de leche, puede emplearse como complemento en dietas para la alimentación animal proporcionando un alimento rico en hidratos de carbono y proteínas de alta calidad (Patil y col., 2000).

3.9 Empleo de la enzima quitinolítica de Serratia marcescens para la obtención de carotenoproteínas

La enzima quitinolítica de *Serratia marcescens* es una hidrolasa cuyo nombre comercial es Chitinase-Sigma® y su nombre sistemático es 1,4-β-poli-N-acetilglucosamidasa, tiene un costo en el mercado de $1,850 pesos por cada 10 unidades enzimáticas y un gramo de dicha enzima equivale a 570 U. Así mismo, la quitinasa es una exoglucanasa capaz de hidrolizar el enlace β-1,4-N-acetilglucosamina (Quitina) para producir quitobiosa bajo la siguiente reacción:

$$\text{Quitina} + H_2O \xrightarrow{\text{Quitinase}} \text{Quitobiosa}$$

La reacción anterior se lleva a cabo a un valor de pH = 6, una temperatura de 25 °C y un tiempo de reacción de 7 horas (Sigma-Aldrich®, 2001).

Con base en estos conceptos, a continuación se presenta la metodología empleada en esta investigación

4.0 MATERIALES Y MÉTODOS

En general, la metodología de esta investigación consta de dos partes; la primera consiste en la obtención y preparación de la muestra como se describe más adelante. La segunda se refiere a la hidrólisis enzimática tanto de la quitina comercial de la marca Sigma-Aldrich® como de la harina de cefalotórax de camarón. La actividad enzimática se obtuvo en función de la cantidad de quitobiosa liberada por la hidrólisis de quitina (la cual fue llevada a cabo a un valor de pH = 6 y una temperatura de 25 °C) a través del tiempo. La quitobiosa liberada fue cuantificada por el método del ácido 3,5 dinitro salicílico (DNS) para la determinación de carbohidratos reductores. Los datos obtenidos fueron interpolados en una curva estándar de quitobiosa, la cual se presenta en el anexo 2, inciso H. Las muestras fueron leídas a 490 nm, ya que esta es la longitud de onda máxima (λ máxima de absorción) alcanzada por el complejo formado por la quitobiosa y el reactivo de DNS, dicha λ máxima se determinó realizando un barrido en UV-Vis a un estándar de quitobiosa, que se presenta en el anexo 3, inciso B. De esta forma se determinó la actividad enzimática de la quitinasa sobre quitina comercial y sobre la harina de camarón.

4.1 Equipo empleado durante la parte experimental

En la **Tabla 2** se presenta el equipo empleado durante la preparación y caracterización de la muestra.

Tabla 2. Equipo empleado durante la preparación y caracterización de la muestra

Equipo	Especificaciones
Cuarto de secado	Marca: Kinet; modelo: 53874
Molino de cereales	CeCoCo tipo S. Serie: 4021; modelo: 1245; Armazón: 2D56
Tamizador mecánico	Marca: Steve-Shaker portable; N° 6958; Patente No. 3002895
Balanza analítica	Marca: Sartorius; modelo: 1207 MP2
Agitador orbital ("Vórtex")	Marca: Scientific Industries, Inc; modelo: G-560
Espectrofotómetro	Marca: Perkin Elmer; modelo: C 618-0337
Horno de conducción	Marca: Felisa; modelo: FE-293
Parrilla de agitación	Marca: Thermolyne II; modelo: Type 1000

4.2 Obtención y preparación de la muestra

Las muestras de cefalotórax de camarón fueron adquiridas dentro del área de pescados y mariscos de la Central de Abastos de la Ciudad de México, D.F. conocida también como "La nueva Viga". Las cabezas fueron proporcionadas gratuitamente por los comerciantes. No se seleccionaron especies, pero predominaron las cabezas de camarón café (*Penaeus aztecus*) y blanco (*Penaeus vannamei*), ambas del Golfo de México. Una vez adquiridas se transportaron al Laboratorio E-301 del Programa de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental (PIQAyQA) de la Facultad de Química de la UNAM, en bolsas de plástico de color negro y en hielo para evitar su descomposición.

4.2.1 Lavado

Las muestras de cefalotórax de camarón se lavaron al chorro de agua para eliminar restos de materia no deseada, ya que debido a las características de fácil descomposición microbiológica que presentan los crustáceos, el lavado representa un punto crítico para evitar la degradación principalmente por microorganismos proteolíticos.

4.2.2 Secado

Una vez lavada, la muestra se coloca en charolas de metal para proceder al secado. Este procedimiento es realizado a 60±2 °C, durante 24 horas en un cuarto de secado a temperatura controlada.

4.2.3 Molienda y tamizado

La muestra seca es molida en un molino de cereales, y tamizada en tamices del número 80 para obtener un tamaño de partícula de 0.177 mm.

4.2.4 Desmineralización de la harina

La harina obtenida es desmineralizada empleando EDTA disódico 0.5 M con agitación constante durante una hora, en una proporción de 1:3 (p/v) y lavada con agua destilada, finalmente la muestra es filtrada en papel filtro de poro abierto (Watman, Núm. 1).

4.2.5 *Secado*

La harina desmineralizada es secada a una temperatura de 50 °C durante 2 horas empleando un horno convencional.

4.2.6 Almacenamiento

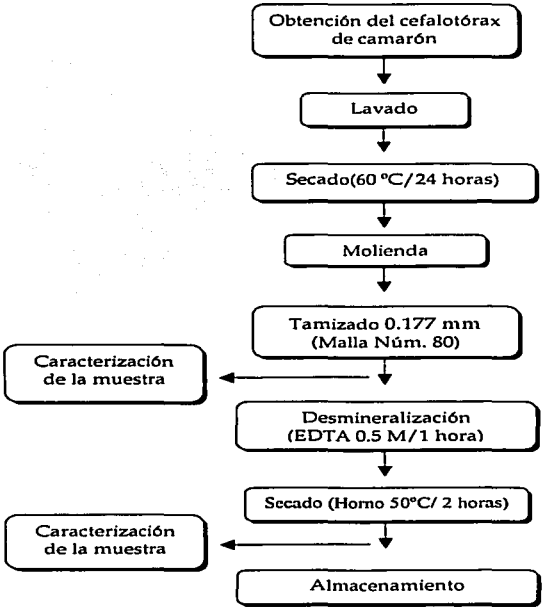
La harina seca se almacena en frascos color ámbar debidamente etiquetados, herméticamente cerrados y cubiertos con papel encerado, para de esta manera evitar lo más posible el paso de la luz y del O_2.

4.3 Caracterización de la muestra (Harina entera y desmineralizada)

Una vez obtenida la harina, se caracterizó realizando un análisis proximal antes y después de la desmineralización (determinación de humedad, cenizas, proteína, grasa cruda, fibra cruda e hidratos de carbono) (AOAC, 1995). Así mismo, se determinó la cantidad de quitina en la muestra por el método propuesto por Spinelli, en Simpson y Haard, 1985, el cual involucra una doble hidrólisis básica de la harina de camarón a reflujo y a temperatura de ebullición, seguida de una hidrólisis ácida del material restante a 25 °C durante 12 horas (Inciso I, Anexo 1). La quitina obtenida (quitina 80, debido a que se obtuvo de la harina de cefalotórax de camarón con número de malla 80) se caracterizó mediante espectroscopia de IR, así mismo se le determinó el porcentaje de humedad y nitrógeno por las técnicas de secado y Kjeldahl respectivamente y los resultados se compararon con los reportados por el proveedor para la quitina comercia Sigma-Aldrich®

En el **Diagrama 1** se puede observar el resumen de cada uno de los pasos mencionados.

Diagrama 1. Obtención y preparación de la muestra



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.4 Hidrólisis enzimática

En la **Tabla 3** se presenta el material empleado durante la parte enzimática de este estudio.

Tabla 3. Equipo y material empleado en la hidrólisis enzimática

Material	Especificaciones
Parrilla de agitación magnética	Marca: Termoline II
Equipo de agitación con termostato	Marca: Exacal
Agitador orbital ("Vórtex")	Marca: Scientific Industries, modelo: G-560
Espectofotómetro de UV-Vis	Marca: Becman; modelo DU-65
Espectofotómetro de IR	Marca: Perkin Elmer; modelo: C 618-0337
Centrífuga	Marca: Ependorf; modelo: 544
Quitinasa de Serratia marcescens	Marca: Sigma-Aldrich® (EC 3.2.1.14)
Quitina (99 % de pureza)	Marca: Sigma-Aldrich®
Quitobiosa estándar (99.9 % pureza)	Marca: Sigma-Aldrich®
Astaxantina estándar(99.9 % pureza)	Marca: Sigma-Aldrich®

Dentro de las especificaciones de la quitinasa de *Serratia marcescens* figuran la siguientes (Sigma Aldrich, 2001):

- Número de catálogo: EC 3.2.1.14
- Hidroliza el enlace β-1,4-N-acetilglucosamina (Quitina) para producir quitobiosa bajo la siguiente reacción: Quitina + $H_2O \xrightarrow{\text{Quitinasa}}$ Quitobiosa
- 570 unidades /gramo sólido
- Una unidad libera 1 mg de quitobiosa a partir de quitina durante 1 hora de hidrólisis a 25 °C y un valor de pH = 6

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.4.1 Determinación de la actividad de la enzima utilizando quitina comercial

La hidrólisis enzimática se llevó a cabo empleando quitina (Sigma-Aldrich® al 99% de pureza) y quitinasa (EC 3.2.1.14, Sigma-Aldrich®) con la finalidad de evaluar los parámetros de la actividad enzimática sobre un sustrato conocido.

Los parámetros estudiados fueron los siguientes:

a) Cantidad de quitina en solución (sustrato) [S]

b) Relación de la cantidad de enzima con respecto a la cantidad de sustrato [E] /[S]

La metodología empleada durante la parte enzimática, fue la propuesta por el fabricante (SCCHITO1.001, Sigma-Aldrich®, 2001):

Se suspenden 25 mg de quitina en 2 mL de una solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M a pH 6.0, el sistema se mantiene en agitación constante, de tal manera que la quitina siempre se encuentre en suspensión. Posteriormente, se adicionan 0.5 unidades de quitinasa, incubándose un blanco de reactivos a 25 °C y se toman alícuotas de 100 µL a los tiempos 0, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330, 360, 390 y 420 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo, se procede a inactivar la enzima con 100 µL de el reactivo de ácido 3,5 dinitro salicílico (DNS) el cual también es empleado para llevar a cabo la determinación de hidratos de carbono reductores, que se describe en el inciso G del anexo 1. De esta manera se cuantificó la quitobiosa obtenida por la hidrólisis enzimática. Los datos obtenidos de la hidrólisis son interpolados en una curva estándar de quitobiosa (Anexo 2 inciso H) y se construye una curva que relaciona la hidrólisis de la quitina con la

cantidad de quitobiosa (carbohidrato reductor) liberada a través del tiempo. De esta manera, se calcula la actividad enzimática de la quitinasa sobre la quitina comercial.

4.4.2 Hidrólisis enzimática empleando harina de camarón como sustrato

La hidrólisis del cefalotórax de camarón se realiza de la misma manera variando únicamente algunos factores

- Se emplea como sustrato harina de cefalotórax de camarón.
- Se determinan los volúmenes de suspensión adecuados para optimar la técnica en cuanto a fines prácticos se refiere.
- Se determinan los tiempos de hidrólisis para visualizar la cantidad de quitobiosa liberada (determinada por la reacción de DNS) en el tiempo, tomando alícuotas de 100 μL del hidrolizado a los tiempos 0, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360 y 420 minutos para las E/S de 3.5 y 10.5 % y se tomaron alícuotas de 100 μL del hidrolizado a los tiempos 0, 14, 21, 24, 26, 28, y 30 horas de reacción para las R/S de 21 y 42%

4.5 Recuperación de pigmentos y determinación de proteína soluble

Sobre las muestras hidrolizadas (7 horas y 30 horas) se procede a inactivar la enzima por reducción del pH, agregando al extracto 500 μL de solución al 50% de ácido-tricloro-acético (TCA), las muestras se centrifugan a 10,000 rpm. durante 20

minutos, al final se obtiene un sobrenadante y un sedimento, al primero se le determinó el porcentaje de proteína soluble por el método de Lowry SDS (Anexo 1, inciso H) ya que se sabe que las proteínas están asociadas con los pigmentos carotenoides y, al segundo (sedimento) se le determinó la cantidad de pigmentos por la metodología de Britton (1985) como se describe a continuación:

El sedimento, se coloca en un tubo de ensaye que contiene 20 mL de una mezcla de disolventes (hexano:etanol:acetona (50:25:25), se agregan perlas de vidrio de 0.45 a 0.50 mm y se agita durante 5 minutos en "vórtex" a velocidad moderada. Trascurrido este tiempo se agregan nuevamente 20 mL de la mezcla de disolventes y se continúa la agitación durante 5 minutos más. La separación de las fases se efectúa centrifugando 5 minutos a 5000 rpm.; los pigmentos disueltos quedan en la parte superior (de hexano), los cuales se recuperan con una pipeta Pasteur. Una vez recuperados, se concentran evaporando el disolvente con N_2 gaseoso. Por último se adiciona un volumen conocido de hexano y se procede a cuantificar y caracterizar el pigmento como se describe posteriormente.

4.6 Cuantificación de pigmentos

La cuantificación de carotenoides totales se realiza por medio de un espectrofotómetro de UV-Vis, utilizando el coeficiente de extinción de 2100 cm^{-1}, el cual es específico para la astaxantina en hexano, la longitud de onda a la cual se leen las muestras es de 472 nm, por considerarse a la astaxantina como el principal

componente. Para la cuantificación directa de los pigmentos se utiliza la relación matemática propuesta por Britton (1985).

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

donde:

A = Absorbancia de la muestra

10^6 = Factor para expresar a los carotenoides en μg

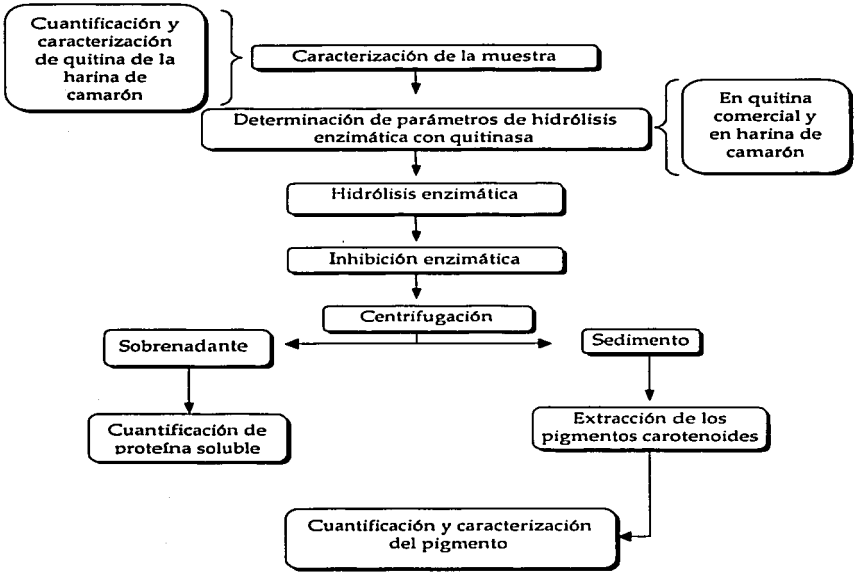
${}^{1\%}E_{1cm}$ = Coeficiente de extinción específico para la astaxantina (2100 cm^{-1})

100 = Constante para eliminar el factor de porcentaje.

4.7 Purificación y caracterización de los pigmentos

La purificación de astaxantina se realiza sobre placas de sílice de gel, aplicando 20 μL del extracto en hexano. La elución de las muestras se realiza en una fase móvil que contiene éter de petróleo:acetona (80:20) en una cámara sobresaturada. La identificación de los pigmentos se lleva a cabo mediante la comparación del Rf de los pigmentos obtenidos después de la hidrólisis enzimática con quitinasa y del pigmento estándar (astaxantina Sigma- Aldrich®) cuyo Rf se encuentra documentado en la literatura. Una vez obtenido el Rf característico de la astaxantina se procede a recuperarla disolviéndose en una pequeña cantidad de hexano para su posterior caracterización. Por último, la caracterización de la astaxantina obtenida se realiza por medio de espectroscopia de IR, UV-Vis y por cromatografía en capa fina, comparando los resultados obtenidos con la muestra de astaxantina estándar Sigma- Aldrich®. En el **Diagrama 2**, se aprecian los pasos seguidos para la obtención de las carotenoproteínas del cefalotórax de camarón.

Diagrama 2. Obtención de carotenoproteínas a partir del cefalotórax de camarón



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Caracterización de la harina de cefalotórax de camarón

Del análisis proximal realizado a la harina de cefalotórax de camarón, se obtuvieron los datos que se presentan en la **Tabla 4.**

Tabla 4. Análisis proximal de la harina de cefalotórax de camarón (base seca)

Determinación (%)	Harina entera	Harina desmineralizada
% Proteína cruda (*)	48.757 $\delta \pm 0.430$	55.343 $\delta \pm 0.268$
% Cenizas	25.310 $\delta \pm 0.406$	1.755 $\delta \pm 0.043$
% Grasa cruda	4.784 $\delta \pm 0.117$	4.867 $\delta \pm 0.110$
% Fibra cruda	15.312 $\delta \pm 0.713$	18.754 $\delta \pm 0.290$
% Hidratos de carbono (por diferencia)	5.837 $\delta \pm 0.697$	19.281 $\delta \pm 0.481$

Los resultados son el promedio de tres determinaciones
(*) Factor de conversión 5.4

En la harina entera, el componente mayoritario fue la proteína cruda, seguida del porcentaje de cenizas, fibra, grasa e hidratos de carbono. Posteriormente, la harina fue sometida a una desmineralización empleando EDTA 0.5 M durante una hora, evaluándose al cuantificar el porcentaje de cenizas en la muestra al final del tratamiento. Los resultados que se muestran en la **Tabla 4**, permiten observar que la cantidad de cenizas disminuyó hasta en un 93% de su valor inicial, el porcentaje de proteínas se vio favorecido ligeramente. Lo anterior fue de gran relevancia para el desarrollo de la investigación, ya que era de esperarse que el porcentaje de proteínas se mantuviese alto después que la harina fue desmineralizada, con la consiguiente reducción en el porcentaje de cenizas, ya que al concentrar la muestra,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

se ven aumentados los rendimientos en la extracción de carotenoproteínas por gramo de harina. De la misma forma, fue posible visualizar que el porcentaje de grasa y de fibra sólo se vio incrementado en una pequeña proporción con respecto al valor inicial (harina sin desmineralizar). Por su parte, los hidratos de carbono incrementaron su porcentaje en gran medida, debido a que fueron calculados por diferencia; sin embargo, en la **Tabla 5** se observa que el contenido de hidratos de carbono totales y reductores, estimado por las técnicas de Fenol-sulfúrico (F-S) y del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), respectivamente, es insignificante, lo que hace suponer la presencia de materia insoluble como la quitina, la cual es característica intrínseca de la muestra. Las curvas patrón para dichas técnicas se presentan en el Anexo 2, incisos E y F, respectivamente.

Tabla 5. Cantidad de hidratos de carbono reductores y totales en la harina desmineralizada

Harina desmineralizada	
Tipo/ Técnica	% Hidratos de carbono*
Reductores/DNS	1.103 ± 0.003
Totales/F-S	1.147 ± 0.001

Los resultados son el promedio de tres determinaciones

Referente a los valores de quitina estimados por la técnica de Spinelli, en Simpson y Haard (1985), en la **Tabla 6** se presentan los datos comparativos entre la quitina comercial (Sigma-Aldrich®) y la obtenida en esta investigación, así como el porcentaje de humedad y nitrógeno estimados por los métodos de secado y Kjeldahl, respectivamente (Anexo 1).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 6. Comparación de los valores de la quitina obtenida con la quitina SIGMA®

Análisis de quitina		
Valor	Quitina 80	Quitina SIGMA®
% Obtenido	17.465	--
% Humedad	5.0	6
% Nitrógeno	7.8	7

El porcentaje de quitina obtenido en esta investigación, fue similar al reportado en trabajos previos como el de Cañipa y col. (1998). Adicionalmente, se presentó un porcentaje de nitrógeno ligeramente por encima del reportado, esto se justifica debido al hecho de que, probablemente, también se cuantificó el nitrógeno de algunos aminoácidos, ya que la muestra no fue purificada. Por otro lado, con la finalidad de corroborar a la quitina obtenida en esta investigación, se realizó un estudio por espectroscopia de infrarrojo tanto para la quitina obtenida de la harina de camarón, como para la quitina estándar. En la **Figura 4** se muestran los espectros de dichas muestras, en donde se puede observar, un patrón similar de intensidades, sobresaliendo bandas características de grupos amino en la región de 3350-3550 cm^{-1} y del carbonilo de amida en la región de 1600-1650 cm^{-1}.

5.2 Hidrólisis empleando quitinasa sobre la quitina estándar (Quitina Sigma-Aldrich®).

Para determinar el comportamiento enzimático que presenta la quitinasa sobre un sustrato conocido (quitina Sigma®), se realizaron ensayos para conocer los factores que intervienen en la reacción enzimática con la que se trabajaría y para observar el comportamiento de la enzima a emplearse.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

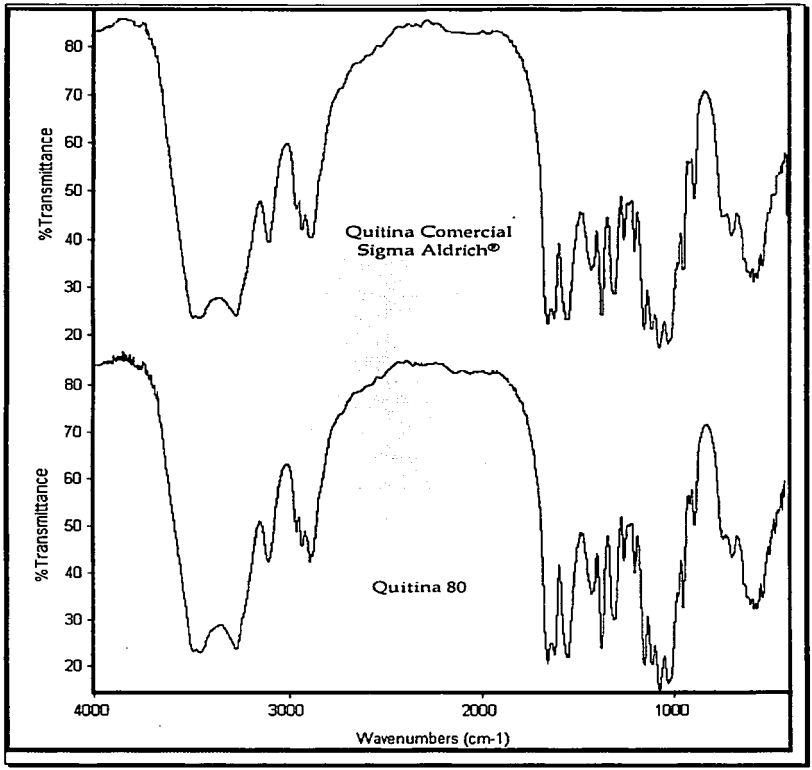


Figura 4. Espectros de IR de la quitina obtenida (quitina 80) y de la quitina comercial SIGMA®

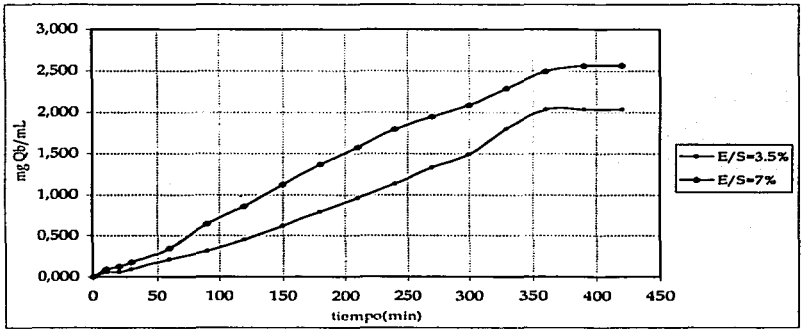
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Para tal finalidad, se mantuvieron constantes los valores de pH = 6, y de temperatura a 25 °C (valores especificados por el fabricante). Por otra parte, los valores de enzima/sustrato (E/S) que se manejaron fueron del 3.5% y del 7%. La actividad enzimática observada para estas relaciones fue de 0.023 U.I. y de 0.027 U.I. respectivamente, como se aprecia en la **Tabla 7** y en la **Gráfica 1.**

Tabla 7. Determinación de la actividad enzimática de la quitinasa sobre quitina comercial a las 7 horas de hidrólisis

Relación E/S	Dosis (U/g quitina)	Actividad(U.I.)	mg Qb/mL
3.5%	0.465	0.023	2.035 ± 0.004
7%	0.544	0.027	2.564 ± 0.002

Gráfica 1. Hidrólisis enzimática de la quitina comercial Sigma-Aldrich® con quitinasa durante 7 horas



mgQb/mL= miligramos de quitobiosa/mL

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Una vez conocida la cantidad de quitobiosa liberada en las dos condiciones anteriores, se llevó a cabo el análisis estadístico correspondiente empleando el programa estadístico Statistic Program Social Science (SPSS), con la finalidad de observar la diferencia significativa entre ambas condiciones. En la **Tabla 8** se aprecian los resultados del análisis de varianza (Anova) realizado para observar las diferencias significativas al aplicar una relación E/S del 3.5% contra una relación E/S del 7.0%. Con los resultados obtenidos de este estudio, se decidió trabajar a una relación E/S del 3.5% (0.023 U.I.), es decir una dosis de 0.465 U/g quitina la cual fue empleada en todos los ensayos posteriores. Por otra parte, también se aprecia que la hidrólisis máxima de la quitina se obtuvo a los 360 minutos (6 horas) de reacción enzimática.

5.3 Hidrólisis empleando quitinasa sobre la harina del cefalotórax de camarón.

Una vez conocida la actividad enzimática que la quitinasa presentó sobre la quitina estándar, se empleó a la harina desmineralizada. En primer lugar, se llevó a cabo la hidrólisis con la quitinasa sobre la harina de cefalotórax de camarón en una relación E/S del 3.5%, del 10.5% y del 21% durante 7 horas, con respecto a la hidrólisis de quitina. En la **Tabla 9** se muestran los valores de actividad enzimática que presentó la quitinasa con respecto a las diferentes relaciones E/S manejadas.

Tabla 8. Análisis estadístico para la hidrólisis enzimática de la quitina comercial en una relación del 3.5 % y 7.0 % E/S

Tratamientos			
E/S	Tiempo	mg Qb/mL	Duncan
3.5%	10 (A)	0,059 ± 0,001	
	20 (B)	0,062 ± 0,004	
	30 (C)	0,094 ± 0,004	
	60 (D)	0,214 ± 0,004	
	90 (E)	0,313 ± 0,004	
	120 (F)	0,452 ± 0,005	
	150 (G)	0,617 ± 0,006	
	180 (H)	0,792 ± 0,006	
	210 (I)	0,961 ± 0,004	
	240 (J)	1,131 ± 0,002	
	270 (K)	1,334 ± 0,000	α 0.05
	300 (L)	1,490 ± 0,004	
	330 (M)	1,798 ± 0.006	
	360 (N)	2,035 ± 0,004	A, B, C, D
	390 (Ñ)	2,035 ± 0,004	D, E
	420 (O)	2,035 ± 0,004	E, F
7.0 %	10 (A)	0,090 ± 0,002	F, G
	20 (B)	0,125 ± 0,002	G, H
	30 (C)	0,176 ± 0,002	H, I
	60 (D)	0,347 ± 0,004	I, J
	90 (E)	0,641 ± 0,005	J, K
	120 (F)	0,859 ± 0,004	K, L, M
	150 (G)	1,125 ± 0,006	N, Ñ, O
	180 (H)	1,369 ± 0,002	
	210 (I)	1,575 ± 0,002	
	240 (J)	1,793 ± 0,004	
	270 (K)	1,947 ± 0,002	
	300 (L)	2,085 ± 0,000	
	330 (M)	2,288 ± 0,002	
	360 (N)	2,493 ± 0,005	
	390 (Ñ)	2,562 ± 0,000	
	420 (O)	2,564 ± 0,002	
Estadísticas Anova (SPSS) Fisher α 0.05 N.S			

Análisis de significancia de Fisher, N.S. No hay diferencia significativa, * diferencia significativa al 95.0 % de exigencia. Duncan prueba de rango múltiple, hace una comparación entre la media y las agrupa o no, de acuerdo al nivel de significancia.

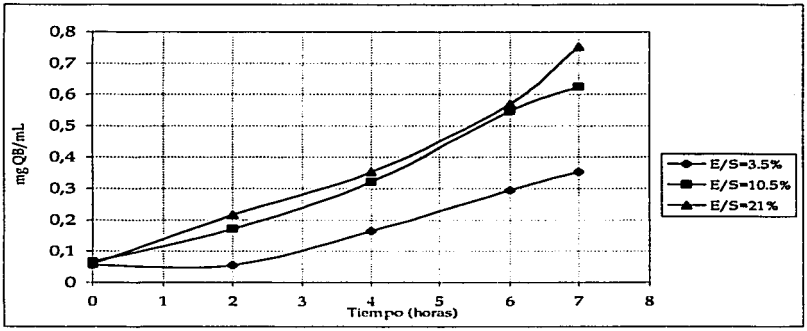
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Así mismo, en la **Gráfica 2** se aprecia que la máxima cantidad de quitobiosa se obtuvo manejando una relación E/S del 21% durante 7 horas de hidrólisis, obteniéndose 0.753 mg de quitobiosa/mL.

Tabla 9. Actividad enzimática de la quitinasa sobre harina de cefalotórax de camarón a las 7 horas de hidrólisis

Relación E/S	Dosis (U/g quitina)	Actividad(U.I.)	(mg Qb/mL)
3.5%	0.465	0.0017	0.352 $^{\delta \pm 0.003}$
10.5%	1.395	0.0020	0.623 $^{\delta \pm 0.007}$
21%	2.790	0.0022	0.753 $^{0.012}$

Gráfica 2. Hidrólisis de la harina de camarón con quitinasa durante 7 horas



mgQb/mL= miligramos de quitobiosa/mL

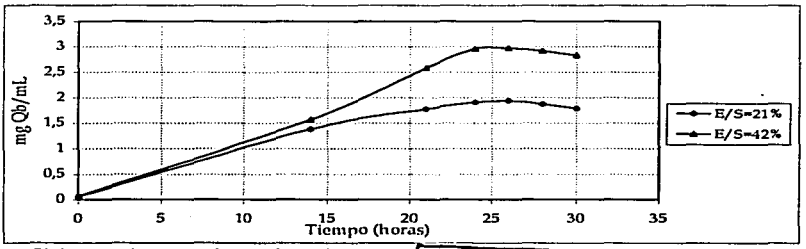
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Posteriormente, y con la finalidad de conocer el tiempo en el cual se libera la mayor cantidad de quitobiosa a partir de la hidrólisis del cefalotórax de camarón con la quitinasa, se realizó una hidrólisis de la harina desmineralizada bajo dos relaciones diferentes de enzima/sustrato, al 21% y al 42%. La temperatura que se manejó fue de 25°C y el pH = 6, con la variante de aumentar el tiempo de hidrólisis de 7 horas establecidas al inicio, a 30 horas. Los resultados obtenidos muestran que la liberación máxima de quitobiosa se alcanzó después de las 24 horas de hidrólisis de la harina de cefalotórax de camarón. En la **Tabla 10** y en la **Gráfica 3** se observa el comportamiento de la hidrólisis (liberación de quitobiosa) a las 30 horas.

Tabla 10. Actividad enzimática de la quitinasa sobre harina de cefalotórax de camarón a las 30 horas de hidrólisis

Relación E/S	Dosis (U/g quitina)	Actividad (U.I.)	mg Qb/mL
21%	2.790	0.078	1.788 ∂ ± 0.003
42%	5.580	0.120	2.824 ∂ ± 0.017

Gráfica 3. Hidrólisis de la harina de camarón con quitinasa durante 30 horas



mgQb/mL= miligramos de quitobiosa/mL

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Con la finalidad de conocer la relación E/S a la cual se obtiene la máxima hidrólisis de la quitina contenida en la harina de cefalotórax de camarón, se realizó un análisis de varianza a las dos últimas hidrólisis, en donde preliminarmente se aprecia que la máxima hidrólisis se obtuvo con una relación E/S del 42%. Al apreciar el análisis estadístico en la **Tabla 11**, se observa una diferencia altamente significativa entre las dos relaciones E/S, es decir que no da lo mismo utilizar una relación enzima sustrato que la otra. Por ese motivo se concluyó que la hidrólisis máxima de quitina fue obtenida al utilizar una relación E/S del 42%. En lo que respecta al tiempo de hidrólisis, para la relación E/S del 42% se aprecia que la prueba de Duncan agrupa los tiempos de hidrólisis de 24 hasta 30 horas (C, D, E y F) lo cual significa que la hidrólisis máxima de quitina es obtenida bajo este tiempo de reacción. Tomando como base el resultado de este análisis se observó que la hidrólisis máxima de la quitina sucede a las 24 horas de reacción ya que a las 26, 28 y 30 horas, la diferencia en la hidrólisis, en términos estadísticos y prácticos, no es significativa.

Tabla 11. Análisis estadístico de la hidrólisis de quitina del cefalotórax de camarón al comparar la relación E/S del 21% y 42 %

Tratamientos		mg Qb/mL	Duncan
E/S	Tiempo (horas)		
21%	14 A	1.380 ± 0.002	α 0.05
	21 B	1.788 ± 0.001	
	24 C	1,906 ± 0.001	A
	26 D	1.939 ± 0.003	B
	28 E	1.871 ± 0.003	C D E F
	30 F	1.788 ± 0.003	
42 %	14 A	1.569 ± 0.018	α 0.05
	21 B	2.581 ± 0.009	
	24 C	2,953 ± 0.001	A
	26 D	2,966 ± 0.001	B
	28 E	2,912 ± 0.001	C D E F
	30 F	2,824 ± 0.003	
Fisher α= 0.05 **			

Análisis de significancia de Fisher, ** Diferencia altamente significativa al 99 % de exigencia, * diferencia significativa al 95.0 % de exigencia. Duncan prueba de rango múltiple, hace una comparación entre la media y las agrupa o no, de acuerdo al nivel de significancia.

5.4 Cuantificación de los pigmentos y del porcentaje de proteína soluble

La cuantificación de los pigmentos se llevó a cabo mediante la ecuación de Britton, propuesta en Velázquez (1995). En la **Tabla 12** y en la **Gráfica 4** se observa que el aumento de la cantidad de carotenoides totales fue proporcional al aumento en la relación E/S, así mismo se observa que, en la relación E/S manejada al 21% (7 horas), la cantidad de carotenoides totales aumentó al doble del valor original de la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

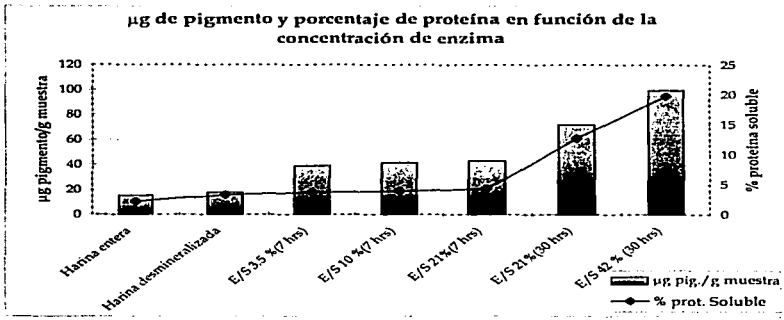
harina desmineralizada sin hidrolizar, es decir, que a medida que avanzó el ataque enzimático hacia la quitina, la cantidad de pigmentos aumentó. Por otro lado, en el porcentaje de proteína soluble se observó un aumento 6 veces mayor al de la harina sin hidrolizar. Lo anterior demuestra que, al eliminar los componentes del cefalotórax de camarón tales como la quitina y los minerales, se aumenta el contenido de carotenoproteínas.

Tabla 12. Cuantificación de los carotenoides expresados en μg carotenoides totales por gramo de muestra y porcentaje de proteína soluble

Muestra	μg pigmento/g muestra	% Proteína soluble en la muestra
Harina Entera	15.214	2.223
Harina desmineralizada	17.710	3.312
Harina Hidrolizada		
E/S 3.5%(7 horas)	39.00	3.685
E/S 10.5%(7 horas)	41.57	3.906
E/S 21% (7 horas)	43.00	4.317
E/S 21% (30 horas)	71.857	12.707
E/S 42%(30 horas)	99.57	19.733

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Gráfica 4. Cantidades de pigmento y proteína soluble obtenidas



5.5 Identificación de los pigmentos carotenoides

5.5.1 Cromatografía en capa fina y espectroscopia de UV-Vis y de IR

En la **Tabla 13** se reportan los valores de Rf, tanto para la astaxantina comercial Sigma-Aldrich® como para la muestra obtenida, previa hidrólisis enzimática. En esta misma tabla se aprecia, adicionalmente, que las longitudes de ondas (λ) máximas obtenidas por medio de espectroscopia UV-Vis para la astaxantina estándar y la obtenida en esta investigación fueron muy similares (**Figuras 5** y **6**, respectivamente).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 13. Comparación entre la astaxantina obtenida y la astaxantina estándar

Patrón	Rf patrón	Rf muestra	λmáx. patrón	λmáx. Muestra	Identificación tentativa
Astaxantina	0.41	0.41	470	471	Astaxantina

Al revelar la cromatoplaca fue posible apreciar la banda correspondiente a la astaxantina cuyo Rf según la literatura es de 0.411.

Así mismo, al obtener los espectros de IR, tanto para la muestra patrón como para la muestra obtenida en esta investigación, se observaron las mismas bandas características para la astaxantina en ambos casos, teniendo intensidades máximas en las regiones cercanas a 3480 cm^{-1}, 2850cm^{-1}, 1650 cm^{-1} y 1300 cm^{-1}, correspondientes a los grupos hidroxilo, metilos y metilenos, carbonilo y cetonas, respectivamente. En las **Figuras** 7 y 8 se aprecian los espectros de IR para la astaxantina estándar Sigma-Aldrich® (patrón) y para la astaxantina obtenida en esta investigación, consecutivamente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

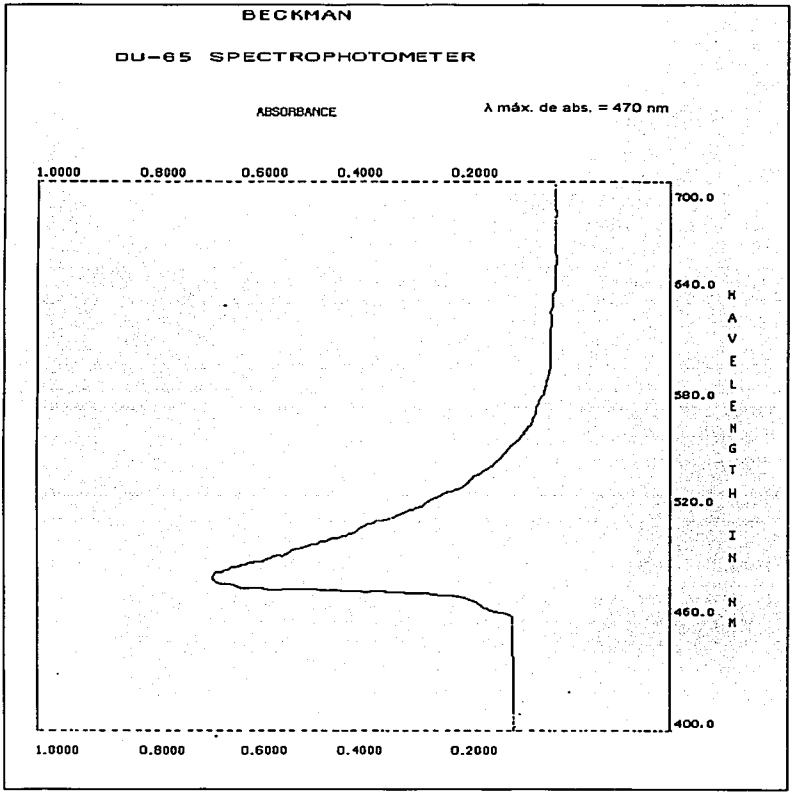


Figura 5. Espectro de UV-Vis para la astaxantina comercial Sigma-Aldrich®

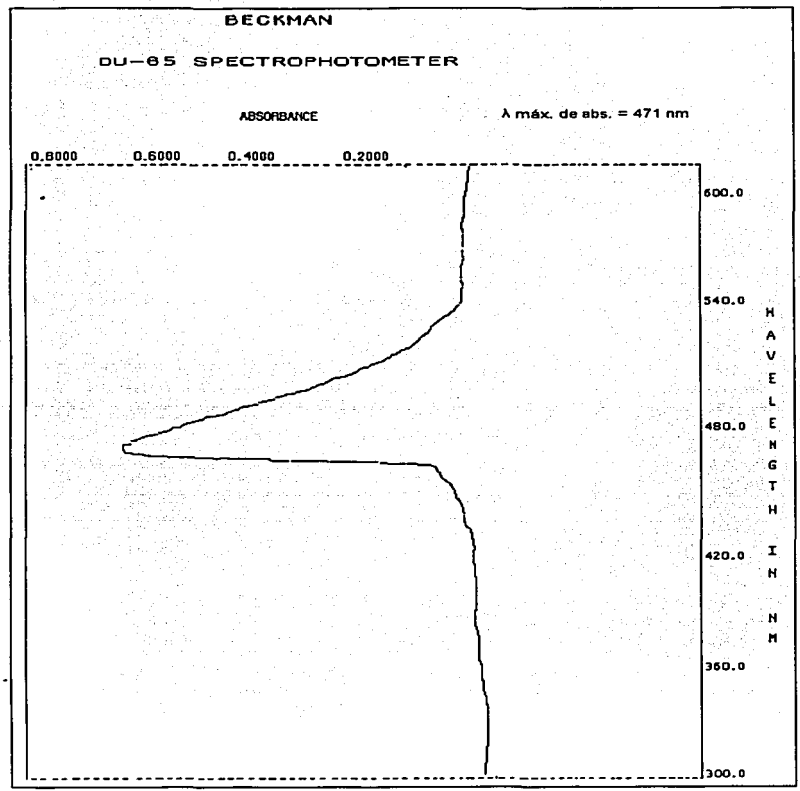


Figura 6. Espectro de UV-Vis para la astaxantina obtenida en esta investigación

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

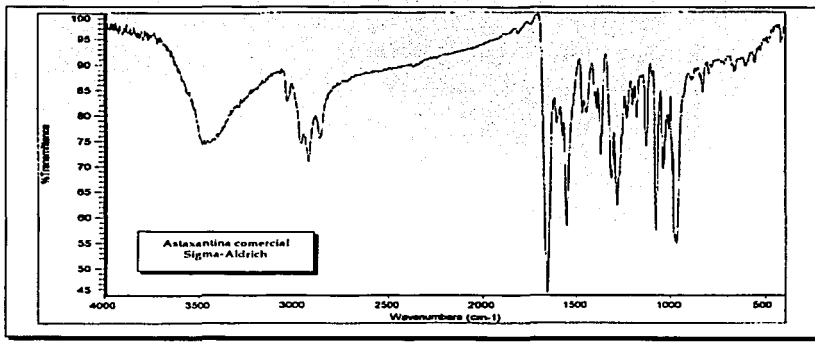


Figura 7. Espectros de IR para la astaxantina comercial Sigma-Aldrich®

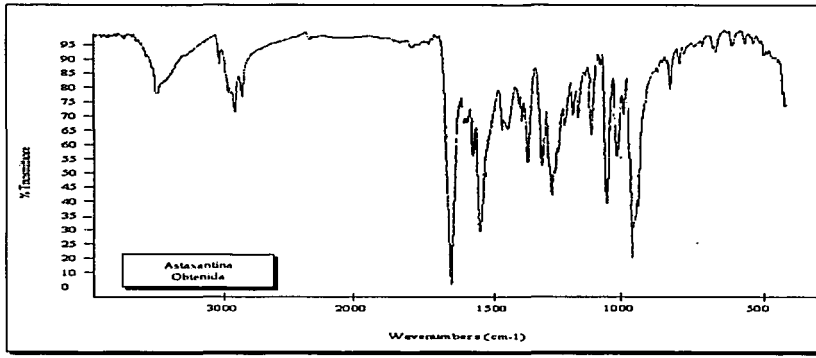


Figura 8. Espectros de IR para la astaxantina obtenida en esta investigación

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.0 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Con base en los resultados de esta investigación se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- Fue posible la obtención de carotenoproteínas a partir de harinas desmineralizadas de cefalotórax de camarón mediante la hidrólisis con la quitinasa de *Serratia marcescens*.

- Fue posible la cuantificación y caracterización de la quitina por el método de Spinelli y espectrofotometría de IR, respectivamente.

- Las condiciones con las que se obtuvo la máxima cantidad de pigmento asociado a las proteínas fueron: hidrólisis con quitinasa de *Serratia marcescens* a una relación E/S = 42 % (0.120 U.I.) durante 24 horas a 25 °C y a un pH de 6. Bajo estas condiciones se obtuvieron un máximo de 2.953 mg quitobiosa/mL, 19.733 % de proteína soluble y 99.570 µg de carotenoides totales/g harina hidrolizada.

- Fue posible la identificación de la astaxantina en las carotenoproteínas obtenidas a partir de la harina del cefalotórax de camarón empleando cromatografía en capa fina (TLC) así como espectroscopia de UV-Vis e IR, sin embargo, es recomendable caracterizar el pigmento mediante técnicas alternas para identificar su grado de pureza.

- En el proceso de hidrólisis enzimática se generó un subproducto (quitobiosa) el cual puede ser utilizado en la industria alimentaria.

Estas conclusiones permiten recomendar lo siguiente:

- Se sugiere un estudio de asimilación de las carotenoproteínas por especies acuícolas tales como la trucha arcoiris, trucha salmonada, entre otros.

- Los resultados presentados muestran el potencial biotecnológico de la quitinasa de *Serratia marcescens* en la obtención de carotenoproteínas. La evaluación de su factibilidad técnico económica a nivel piloto permitirá ofrecer la tecnología desarrollada al sector público o privado, así, por un lado, reaprovechar el cefalotórax de camarón como materia prima para la obtención de pigmentos, proteínas y quitobiosa, obteniendo grandes ganancias económicas y, por otro lado, evitar el problema de contaminación que este subproducto ocasiona cuando es desechado irresponsablemente, tanto en altamar como en tierra. Esta es una manera abrir nuevas perspectivas para la biotecnología en México.

- Chen, H.M.; Meyers, S.P. 1982a. Extraction of astaxanthin pigment from crawfish waste using a soy oil process. J. Food Sci., 47: 892-96
- Escobedo, G.; García, R.S.; Rosas, J.; Cañipa A.J.; Gálvez, A.; Durán-de-Bazúa, C. 1999. Producción de pigmentos, quitina y quitosana a partir de residuos de la industria camaronera. Parte 2. Separación enzimática de quitina y producción de quitosana. Industria alimentaria. 21(2):14-25. México, D. F, México.
- Escudero, de la Cruz, B.; Ramírez, M. 1998. Biocontrol of phytopathogenic fungy in bean seeds by crude extracts of chitinase. IFT Annual Meeting, Atlanta, p. 156
- Fennema Owen R. 1993. Química de los alimentos. Ed. Acribia, S.A. 2da edición. Zaragoza, España. Pp . 349-351
- García, R.S. 1997. Extracción de carotenoproteínas de cefalotórax de camarón empleando una proteasa comercial. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México, D. F. México.
- Jonson E.A.; Villa T.; Lewis J.. 1980. *Phaffia rhodozyma* as an astaxanthin source in solmon diets. Aquaculture, 20:123-124.
- Jonson, A.E; An, G.H. 1991. Astaxanthin from microbial sources. Critical Reviews in Biotechnology. 11(4):247-326
- Meyers, S.P.; Bligh, D. 1981. characterization of astaxanthin pigments from heat-processed crawfish waste. J. Agric. Food Chem., 29:505-508

BIBLIOGRAFÍA

- Anónimo. 2002. Tomado de las redes internacionales: http://www.altavista.com
- Adler-Nissen, J. 1986. Enzymatic hydrolysis of proteins. Elsevier Applied Science Pub. Londres (Inglaterra). Pp 17-19 y 22-23.
- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. Horwitz, W. Editor. 13a edición. Washington, D.C., EEUUA.
- Baduí, S. 1986. Química de los alimentos. Ed. Alhambra Mexicana, 3ª edición. México, D.F., México. Pp. 108-265.
- Britton, G. 1985. General Carotenoids Methods. Methods in Enzymology, 111:115-149.
- Calderón, H.; González, G.; Pérez, V.M.; Jáber, C.; Durán-de-Bazúa, C. 1992. Reaprovechamiento de cabezas de camarón, un proyecto con futuro. Rev. IMIQ (Instituto Mexicano de Ingenieros Químicos). 28(5-6):44-56. México, D.F., México.
- Cañipa, A. 1994. Estudio químico sobre el aprovechamiento integral del cefalotórax de camarón. Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM, México, DF. México.
- Cañipa, A.; Escobedo, G; García, R.S.; Gálvez, A.; Durán-de-Bazúa, C. 1998. Producción de pigmentos, quitina y quitosana a partir de residuos de la industria camaronera. Parte 1. Separación química de pigmentos, quitina y producción de quitosana. Industria alimentaria. 20(1):28-38. México, D.F., México.

- Chen, H.M.; Meyers, S.P. 1982a. Extraction of astaxanthin pigment from crawfish waste using a soy oil process. J. Food Sci., 47: 892-96
- Escobedo, G.; García, R.S.; Rosas, J.; Cañipa A.J.; Gálvez, A.; Durán-de-Bazúa, C. 1999. Producción de pigmentos, quitina y quitosana a partir de residuos de la industria camaronera. Parte 2. Separación enzimática de quitina y producción de quitosana. Industria alimentaria. 21(2):14-25. México, D. F, México.
- Escudero, de la Cruz, B.; Ramírez, M. 1998. Biocontrol of phytopathogenic fungy in bean seeds by crude extracts of chitinase. IFT Annual Meeting, Atlanta, p. 156
- Fennema Owen R. 1993. Química de los alimentos. Ed. Acribia, S.A. 2da edición. Zaragoza, España. Pp . 349-351
- García, R.S. 1997. Extracción de carotenoproteínas de cefalotórax de camarón empleando una proteasa comercial. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México, D. F. México.
- Jonson E.A.; Villa T.; Lewis J., 1980. *Phaffia rhodozyma* as an astaxanthin source in solmon diets. Aquaculture, 20:123-124.
- Jonson, A.E; An, G.H. 1991. Astaxanthin from microbial sources. Critical Reviews in Biotechnology. 11(4):247-326
- Meyers, S.P.; Bligh, D. 1981. characterization of astaxanthin pigments from heat-processed crawfish waste. J. Agric. Food Chem., 29:505-508

- Muzzarelli, R.A.A., 1978. Chitin. Pergamon Press, Londres, Reino Unido. Pp. 24, 29, 45, 47, 103-105.
- Patil, R. S.; Ghormade V.; Deshpande, M. V. 2000. Chitinolytic enzymes: an exploration. Enzyme and Microbial Technology 26:473-483. Mexico, D. F., Mexico.
- Quintero, R; López, A.; García, M. 1993. Biotecnología Alimentaria. Ed. Limusa. México, D. F. México. Pp. 479- 496.
- Segel, Irwin H. 1976. Biochemical Calculations. Ed. John Wiley & Sons, Inc. , EEUUA. Pp. 273-278.
- SEMARNAT. 2002. Comunicación personal. Dirección de Estadística y Registros Pesqueros. México D.F. México
- Sigma-Aldrich®, 2001. Enzymatic assay of Chitinase No. SCCHIT01.001, servicio al cliente. México D.F. México
- Simpson, B. K.; Haard, N.F. 1985. The use of proteolytic enzymes to extract carotenoproteins from shrimp wastes. J. Appl. Biochem., 7:212-222.
- Velázquez, E. 1995. Producción de astaxantina por fermentación sumergida por *Phaffia rhodozyma*. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. México, D. F. México. Pp. 23-30.
- Voet, D.; Voet, J. 1992. Bioquímica. Editorial Omega. Barcelona, España. Pp. 275-276.

ANEXOS

ANEXO 1

Métodos establecidos para realizar el análisis proximal (AOAC, 1995)

A) Determinación de humedad

Método por secado

Pesar de 2 a 3 g de la muestra en un pesafiltro con tapa, que ha sido previamente pesado después de ponerlo a peso constante 2 horas aproximadamente a 130 °C. Secar la muestra 2 horas en la estufa a 100 - 110 °C. Retirar de la estufa, tapar, dejar enfriar en desecador y pesar tan pronto se equilibre con la temperatura ambiente. Calcular el porcentaje de humedad.

$$\%H = \frac{\text{Peso del pesafiltro con muestra húmeda} - \text{Peso del pesafiltro con muestra seca}}{\text{gramos de muestra}} \times 100$$

B) Determinación de cenizas

Pesar de 3 a 5 g de muestra en un crisol (la muestra no debe sobrepasar la mitad del crisol) previamente pesado, después de ponerlo a peso constante 2 horas en la mufla a 600 °C, calcinar la muestra, primero con un mechero en la campana hasta que no se desprendan humos y después meter a la mufla 2 horas cuidando de que la temperatura no sobrepase los 550 °C. Repetir la operación anterior, si es necesario, hasta conseguir unas cenizas blancas o ligeramente grises, homogéneas. Enfriar en desecador y pesar. Calcular el porcentaje de cenizas.

$$\%\ \text{Cenizas} = \frac{\text{Pesos del crisol con cenizas} - \text{peso del crisol}}{\text{gramos de muestra}} \times 100$$

C) Determinación de fibra cruda

La fibra cruda es la fracción orgánica de la muestra que resiste un tratamiento alternado de ácido sulfúrico y sosa hirvientes al 1.25%. El compuesto más abundante de este residuo es la celulosa y, en menores cantidades, hemicelulosas, ligninas, pentosanas, gomas, pectinas y mucílagos.

Procedimiento:

Pesar 2 gramos de muestra desengrasada y seca (se utiliza la muestra que quedó en el cartucho de la determinación de grasa cruda). Colocar la muestra en el vaso digestor, añadir 1 g de asbesto preparado, 200 mL de solución de H_2SO_4 al 1.25% (0.255 N) hirviente y antiespumante. Calentar de inmediato (debe empezar a hervir antes de 1 minuto), llevar a reflujo durante 30 minutos, rotando el vaso de vez en cuando para incorporar las partículas que se pegan en la pared del mismo. Filtrar a través de papel filtro usando vacío y lavar con cuatro porciones de 50 mL de agua de la llave caliente hasta que no se dé reacción ácida con rojo de metilo. El residuo que quedó en el filtro se pasa por medio de una espátula al vaso digestor ya limpio y se repite la operación con 200 mL de NaOH al 1.25 % (0.313 N) hirviente. Después de realizar el reflujo durante 30 minutos, se filtra sobre el mismo papel seda, se lava con 25 mL de H_2SO_4 al 1.25 % y con tres porciones de 25 mL de agua caliente de la llave y, finalmente, con 25 mL de alcohol. Pasar cuantitativamente el residuo a un vaso de precipitados lavando con agua y filtrar sobre un crisol Gooch que lleva una delgada capa de asbesto y que ha sido calcinado durante una hora a

600 °C. El crisol Gooch con el residuo se lleva a la estufa durante 2 horas a 130 °C, se deja enfriar y se pesa. Llevar a la mufla y calcinar a 600 °C durante 30 minutos, enfriar y pesar.

El cálculo para conocer el porcentaje de fibra cruda se realiza aplicando la siguiente ecuación:

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

donde:

A = Peso del Gooch después de 2 horas a 130 °C
B = Peso del Gooch después de calcinar 30 minutos a 600 °C
m = Peso de la muestra en gramos

D) Determinación de proteína cruda

Método de Macro-Kjeldahl

Se pesan de 0.5 a 1 g de muestra en un papel delgado, con todo y papel se introduce en un matraz Kjeldahl de 800 mL, se agrega 0.3 g de sulfato de cobre pentahidratado, 5 g de sulfato de potasio o sulfato de sodio, 15 mL de ácido sulfúrico concentrado y un pedazo de plato poroso o perlas de vidrio. El matraz es colocado en el digestor del equipo Kjeldahl y se calienta hasta la descomposición total de la materia orgánica, es decir, hasta que el líquido quede transparente, con una coloración azul-verdosa. La muestra se deja enfriar hasta temperatura ambiente, y se diluye con 350 mL de agua destilada fría, por último se enfría sobre hielo. En un matraz Erlenmeyer de 500 mL se adicionan 50 mL de HCl 0.1 N y unas

gotas del indicador de rojo de metilo o bien 50 mL de ácido bórico al 4% (40 g de ácido bórico, 35 mL de fenolftaleína al 0.1 % en etanol, 10 mL de la mezcla de verde de bromocresol 0.33% y rojo de metilo 0.66 % aforar a 1 L). El matraz es colocado en el aparato de destilación asegurándose de introducir la alargadera hasta el fondo de la solución. Se añaden, lentamente y resbalando por la pared del matraz Kjeldahl, 40 mL de una solución concentrada de hidróxido de sodio (1:1), que también ha sido enfriada sobre hielo y se adiciona polvo de zinc. Se conecta inmediatamente el matraz en la trampa Kjeldahl y se agita hasta mezclar las dos capas. Destilar aproximadamente hasta un volumen de 150 mL, retirando posteriormente el matraz Erlenmeyer, lavar la alargadera con especial cuidado de recoger sobre el destilado las aguas de lavado. Se titula el exceso de ácido (en el caso de recibir el destilado en HCl) con una disolución de NaOH 0.1 N y en el caso de recibir con ácido bórico, se emplea una solución de HCl 0.1 N

Efectuar una prueba en blanco empleando la misma cantidad de papel y el % de proteína es calculado empleando la ecuación siguiente:

$$\% \text{ Proteína Cruda} = \frac{(Vb-Vm) * m\,eq. * N * 100 * F}{m}$$

Donde:

Vb= Volumen gastado en el blanco

Vm= Volumen gastado en la muestra

Meq= miliequivalentes de nitrógeno (PM/1000 = 0.014)

N= Normalidad dela solución de NaOH (exactamente valorada)

m= gramos de muestra

F= factor de conversión (5.4 *)

* Con este factor se excluye el nitrógeno quitínico

E) Determinación de grasa cruda o extracto etéreo

Método de Goldfisch

Poner un vaso para Goldfisch en la estufa a 100 °C hasta peso constante (aproximadamente 2 horas).

Pesar de 4 a 5 gramos de muestra sobre un papel, enrollarlo y colocarlo en un cartucho de celulosa, tapar con un algodón. Posteriormente, se coloca el cartucho en un sostén o recipiente con el fondo perforado y se coloca en el equipo. Se adicionan, en el vaso para Goldfisch, 40 mL de éter etílico y se colocan en el equipo mediante un anillo metálico con empaque. Posteriormente, se sube la parrilla girando hacia un lado y posteriormente hacia el otro. Calentar hasta la extracción completa de la grasa. Para verificar que se ha extraído toda la grasa, se deja caer una gota de la descarga sobre papel filtro, teniendo en cuenta que al evaporarse el éter no debe haber residuo de grasa. Al finalizar la extracción, cambiar el sostén del cartucho por un recipiente sin perforación y calentar de nuevo para recuperar el éter del vaso. Quitar el vaso del equipo y secar el extracto a 100 °C por 30 minutos, enfriar y pesar. Calcular el porcentaje de grasa.

F) Determinación de hidratos de carbono totales (método del fenol-sulfúrico)

Se diluye la muestra en agua , en tubos de ensaye perfectamente etiquetados se coloca 1 mL de la solución , enseguida se adicionan 0.6 mL de una solución acuosa de fenol al 5% y se mezcla perfectamente. Inmediatamente se adicionan 3.6 mL de H_2SO_4 concentrado y de nuevo se mezcla perfectamente. La mezcla se deja enfriar a temperatura ambiente (30 minutos) y se determina la intensidad de color naranja obtenido en un colorímetro a 480 nm frente a un blanco preparado de la misma manera pero utilizando agua como muestra.

G) Hidratos de carbono reductores (Método del ácido 3,5 dinitrosalicílico, DNS)

Se toma 1 mL de la solución problema, posteriormente se adiciona 1 mL del reactivo de DNS y se calienta 5 minutos en un baño de agua hirviendo, una vez trascurridos los 5 minutos, se deja enfriar la reacción y se diluye con 10 mL de agua destilada. Se debe ajustar el espectrofotómetro a 490 nm con un blanco de reactivos y agua igualmente tratados que la muestra (de acuerdo al barrido en UV-Vis, Anexo 3, que se le realizó a la solución de quitobiosa 2 mg/mL, en donde se puede observar que la λ máx. de absorción es de 490nm y no de 540 nm como en el caso de la glucosa). Por último se cuantifican los azúcares reductores interpolando los valores de la absorbancia obtenidos en una curva de estándar de quitobiosa (Anexo 2, inciso H). Para ello se requiere preparar una solución de quitobiosa de 2.0 mg/mL y hacer las diluciones como se muestran en la siguiente Tabla:

# Tubo	(mg quitobiosa/mL)	mL solución quitobiosa	mL agua
Blanco	0	0	1.0
1	0.4	0.2	0.8
2	0.8	0.4	0.6
3	1.2	0.6	0.4
4	1.6	0.8	0.2
5	2.0	1.0	0.0

El reactivo de DNS se prepara disolviendo 1.0 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico en 50 mL de agua a los que se les ha adicionado 20 mL de solución de hidróxido de sodio 2 N. Después de que todo el material se ha disuelto, se adicionan 30 g de tartrato doble de sodio y potasio y, una vez disueltos, toda la mezcla se afora a 100 mL con agua desioniozada. Esta solución debe ser almacenada en un frasco ámbar protegida del CO_2.

H) Cuantificación de proteína soluble (Método Lowry-SDS)

En primer término, se debe preparar una curva patrón con albúmina sérica bovina (ASB) cada vez que se termine el reactivo CTC, descrito en la página siguiente. Se deben tener las muestras problema a un volumen de 1 mL, en caso de que los valores de absorbancia sean muy elevados por tener alta concentración de proteína y ya no entren en la curva patrón, se tendrá que realizar una dilución hasta que se logre la determinación, entonces se tendrá 1 mL de la solución de proteína, tanto en la curva patrón como en las muestras problema.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Con agitación continua (en vórtex de preferencia) se le agrega a un tubo 1 mL de la solución A, descrita abajo, y se deja reaccionar 10 minutos a temperatura ambiente; al termino de éstos se agregan, con agitación continua, 0.5 mL de la solución B, también descrita abajo, y se deja desarrollar la reacción durante 30 minutos más. Al cabo de este tiempo se lee la absorbancia a 750 nm. La reacción es estable hasta los 120 minutos de iniciada ésta.

1) Solución de carbonato de sodio, tartrato de potasio, sulfato de cobre penta-hidratado (CTC)

Concentraciones finales para 1 L de agua:

Na_2CO_3 10 %	100 g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	1 g
Tartrato de potasio	2 g

2) Solución de NaOH 0.8 N

3) Solución SDS al 10%

Solución A: Se mezclan volúmenes iguales de las siguientes soluciones y en el siguiente orden; CTC, NaOH y SDS. Se preparan antes de empezar la técnica.

Solución B: se prepara una mezcla 1:6 de reactivo de Folin (Sigma-Aldrich®), agua. Se prepara antes de desarrollar la determinación.

I) Determinación de quitina (Método de Spinelli, en Simpson y Haard, 1985)

Se coloca 1 g de la muestra seca en un matraz bola de 500 mL, se agregan 100 mL de NaOH al 2% y la mezcla se lleva a reflujo durante 1 hora. El material digerido se filtra en papel filtro ayudándose del vacío, a continuación se lava con 4 porciones de 50 mL de agua destilada y el residuo se pasa cuantitativamente al matraz bola limpio, con este residuo se repite la operación de reflujo con NaOH al 2% por 1 hora más para que, posteriormente, se filtre de nuevo, lavando con cuatro porciones de 50 mL agua destilada. Por último, se lava con 25 mL de HCl al 10%. El residuo se pasa cuantitativamente a un matraz Erlenmeyer de 250 mL, el cual tiene 100 mL de HCl al 5%, se agita la mezcla durante 12 horas a 25 °C, posteriormente se filtra y se lava con agua destilada hasta que las aguas de lavado sean neutras. Por último el residuo se seca en crisol a 110 °C durante 16 horas. El residuo se pesa para obtener la cantidad de quitina por diferencia de peso con la muestra original.

ANEXO 2

Datos experimentales y curvas patrón

A) Análisis proximal (b. s.)

A.1) Análisis proximal de la harina de camarón entera

Determinación (%)	Análisis proximal harina entera				
	Malla 80			Prom.	Desv. est.
Proteína cruda	48.955	49.052	48.264	48.757	0.430
Cenizas	25.011	25.147	25.772	25.310	0.406
Grasa cruda	4.711	4.919	4.722	4.784	0.117
Fibra cruda	15.603	15.834	14.499	15.312	0.713
Hidratos de carbono	5.720	5.048	6.743	5.837	0.697

A.2) Análisis proximal de la harina de camarón desmineralizada

Determinación (%)	Análisis proximal harina desmineralizada				
	Malla 80			Prom.	Desv. est.
Proteína cruda	55.045	55.563	55.421	55.343	0.268
Cenizas	1.778	1.705	1.782	1.755	0.043
Grasa cruda	4.801	4.806	4.994	4.867	0.110
Fibra cruda	18.445	18.798	19.019	18.754	0.290
Hidratos de carbono	19.931	19.128	18.784	19.281	0.481

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

B) Hidrólisis enzimática de la quitina comercial Sigma-Aldrich®

Relación E/S = 3.5% (0.023 U.I.)

Hidrólisis enzimática (Qasa E/S=3.5%)					
tiempo(min.)	Abs (490 nm)				D.E
	A	B	C	Promedio	
0	0.001	0.000	0.000	0.000	0.001
10	0.003	0.001	0.000	0.001	0.002
20	0.001	0.002	0.003	0.002	0,001
30	0.010	0.012	0.012	0.011	0.001
60	0.045	0.047	0.047	0.046	0.001
90	0.077	0.075	0.075	0.076	0.001
120	0.115	0.118	0.116	0.116	0.002
150	0.165	0.163	0.166	0.165	0.002
180	0.215	0.218	0.215	0.216	0.002
210	0.267	0.265	0.265	0.266	0.001
240	0.316	0.315	0.315	0.315	0.001
270	0.375	0.375	0.375	0.375	0.000
300	0.420	0.422	0.420	0.421	0.001
330	0.510	0.510	0.513	0.511	0.002
360	0.579	0.581	0.581	0.580	0.001
390	0.580	0.582	0.580	0.581	0.001
420	0.582	0.580	0.580	0.581	0.001

Hidrólisis enzimática (Qasa E/S=3.5%)					
Tiempo(min.)	mg Qb/mL				D.E.
	A	B	C	Promedio	
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.060	0.059	0.058	0.059	0.001
20	0.059	0.062	0.066	0.062	0.004
30	0.089	0.096	0.096	0.094	0.004
60	0.209	0.216	0.216	0.214	0.004
90	0.318	0.311	0.311	0.313	0.004
120	0.448	0.458	0.451	0.452	0.005
150	0.618	0.611	0.622	0.617	0.006
180	0.789	0.799	0.789	0.792	0.006
210	0.966	0.959	0.959	0.961	0.004
240	1.133	1.130	1.130	1.131	0.002
270	1.334	1.334	1.334	1.334	0.000
300	1.488	1.495	1.488	1.490	0.004
330	1.795	1.795	1.805	1.798	0.006
360	2.030	2.037	2.037	2.035	0.004
390	2.033	2.040	2.033	2.035	0.004
420	2.040	2.033	2.033	2.035	0.004

Qasa: Quitinasa de *Serratia marcescens* (Sigma Aldrich®; Núm Cat. EC 3.2.1.14)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Relación E/S = 7% (0.027U.I.)

Hidrólisis enzimática(Qasa E/S=7%)					
tiempo(min.)	Abs. (490 nm)				D.E.
	A	B	C	Promedio	
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.010	0.010	0.011	0.010	0.001
20	0.020	0.020	0.021	0.020	0.001
30	0.035	0.035	0.036	0.035	0.001
60	0.085	0.087	0.085	0.086	0.001
90	0.170	0.172	0.173	0.172	0.002
120	0.235	0.235	0.237	0.236	0.001
150	0.312	0.315	0.314	0.314	0.002
180	0.385	0.385	0.386	0.385	0.001
210	0.445	0.446	0.446	0.446	0.001
240	0.510	0.508	0.510	0.509	0.001
270	0.555	0.555	0.554	0.555	0.001
300	0.595	0.595	0.595	0.595	0.000
330	0.655	0.654	0.655	0.655	0.001
360	0.713	0.715	0.716	0.715	0.002
390	0.735	0.735	0.735	0.735	0.000
420	0.736	0.735	0.736	0.736	0.001

Hidrólisis enzimática(Qasa E/S=7%)					
tiempo(min.)	mg Qb/mL				
	A	B	C	Promedio	D.E.
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.089	0.089	0.093	0.090	0.002
20	0.124	0.124	0.127	0.125	0.002
30	0.175	0.175	0.178	0.176	0.002
60	0.345	0.352	0.345	0.347	0.004
90	0.635	0.642	0.645	0.641	0.005
120	0.857	0.857	0.864	0.859	0.004
150	1.119	1.130	1.126	1.125	0.006
180	1.368	1.368	1.372	1.369	0.002
210	1.573	1.576	1.576	1.575	0.002
240	1.795	1.788	1.795	1.793	0.004
270	1.948	1.948	1.945	1.947	0.002
300	2.085	2.085	2.085	2.085	0.000
330	2.289	2.286	2.289	2.288	0.002
360	2.487	2.494	2.497	2.493	0.005
390	2.562	2.562	2.562	2.562	0.000
420	2.565	2.562	2.565	2.564	0.002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

C) Hidrólisis enzimática de la harina de cefalotórax de camarón

Relación E/S = 3.5% (0.0017 U.I.) durante 7 horas de hidrólisis

Hidrólisis enzimática en harina de camarón (E/S=3.5%)						
Tiempo (min.)	Abs. 490 nm				D.E.	mg Qb/mL
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Promedio		
0	0	0	0	0	0.000	0.055
30	0	0	0	0	0.000	0.055
60	0	0	0	0	0.000	0.055
120	0	0	0	0	0.000	0.055
180	0	0	0	0	0.000	0.055
240	0.032	0.030	0.035	0.032	0.003	0.165
300	0.060	0.060	0.062	0.061	0.001	0.263
360	0.070	0.070	0.071	0.070	0.001	0.294
420	0.090	0.085	0.087	0.087	0.003	0.352

Relación E/S = 10.5% (0.0020 U.I.) durante 7 horas de hidrólisis

Hidrólisis enzimática en harina de camarón (E/S = 10.5%)					
Tiempo(min.)	Abs. 490 nm			D.E	mg Qb /mL
	A	B	Promedio		
0	0.003	0.003	0.003	0.000	0.066
30	0.013	0.011	0.012	0.001	0.097
60	0.023	0.021	0.022	0.001	0.131
120	0.033	0.035	0.034	0.001	0.172
180	0.043	0.048	0.046	0.004	0.211
240	0.078	0.078	0.078	0.000	0.321
300	0.118	0.117	0.118	0.001	0.465
360	0.143	0.145	0.144	0.001	0.547
420	0.168	0.165	0.167	0.002	0.623

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Relación E/S = 21% (0.078 U.I.) durante 30 horas de hidrólisis

Hidrólisis enzimática en harina de camarón (E/S = 21%*30 horas)						
Tiempo (h)	mg Qb/mL				D.E	mg Qb/mL
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Promedio		
0	0.062	0,062	0,059	0.061	0.001	0,061
14	1.380	1.370	1.390	1.380	0.002	1.380
21	1.778	1.795	1.781	1.788	0.001	1.788
24	1.904	1.907	1.907	1.906	0.001	1,906
26	1.931	1.938	1.948	1.939	0.003	1.939
28	1.863	1.873	1.877	1.871	0.003	1.871
30	1.788	1.795	1.781	1.788	0.003	1.788

Relación E/S= 42% (0.120 U.I.) durante 30 horas de hidrólisis

Hidrólisis enzimática en harina de camarón (E/S = 42%)						
Tiempo (h)	mg Qb/mL				D.E.	mg Qb/mL
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Promedio		
0	0.069	0.069	0.062	0.067	0.001	0.067
14	1.558	1.559	1.589	1.569	0.018	1.569
21	2.591	2.578	2.575	2.581	0.009	2.581
24	2.949	2.949	2.962	2.953	0.001	2.953
26	2.962	2.962	2.976	2.966	0.001	2.966
28	2.908	2.908	2.921	2.912	0.001	2.912
30	2.826	2.806	2.840	2.824	0.003	2.824

D) Carotenoides totales y proteína soluble en harina entera y desmineralizada

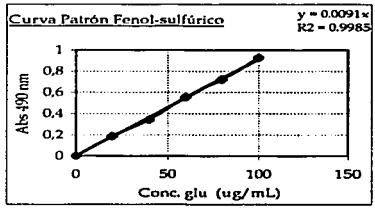
Muestra	µg pigmento/g muestra	% Proteína soluble en la muestra
Harina entera	15.214	2.223
Harina desmineralizada	17.710	3.312
Harina hidrolizada		
E/S 3.5%	39.00	3.685
E/S 10.5%	41.57	3.906
E/S 21%	43.00	4.317
E/S 21% (24 h)	71.857	12.707
E/S 42%(24 h)	99.57	19.733

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

E) Curva patrón de la técnica de fenol-sulfúrico para la determinación de hidratos de carbono totales

Curva Patrón de Fenol-Sulfúrico

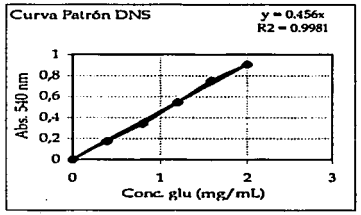
Curva patrón F/S					
Conc.(µg glu/mL)	Abs 490 nm				D.E.
	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs. Prom.	
0.0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
20.0	0.180	0.196	0.189	0.188	0.008
40.0	0.343	0.347	0.340	0.343	0.004
60.0	0.556	0.557	0.554	0.556	0.002
80.0	0.720	0.716	0.724	0.720	0.004
100.0	0.927	0.930	0.928	0.928	0.002



F) Curva patrón de la técnica de DNS para la determinación de hidratos de carbono reductores

Curva Patrón de DNS (Glucosa)

Curva patrón DNS					
Conc.(mg glu/mL)	Abs 540 nm				D.E.
	Abs1	Abs 2	Abs 3	Abs. Prom.	
0.0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
0.4	0.173	0.174	0.176	0.174	0.002
0.8	0.344	0.334	0.346	0.341	0.006
1.2	0.545	0.547	0.548	0.547	0.002
1.6	0.750	0.752	0.753	0.752	0.002
2.0	0.906	0.905	0.905	0.906	0.001

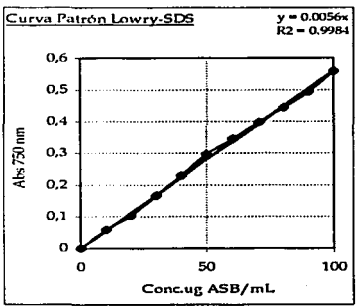


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

G) Curva patrón de Lowry-SDS para la determinación de proteína soluble

Curva patrón de Lowry-SDS

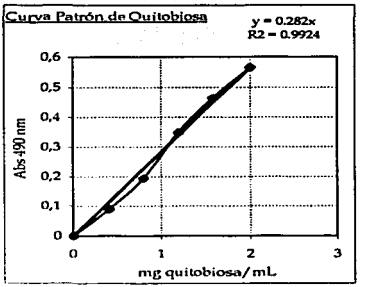
Curva Patrón Lowry-SDS				
Conc. (µg ASB/mL)	Abs 750 nm			D.E.
	Abs1	Abs2	Abs Prom	
0	0	0	0.000	0.000
10	0.057	0.060	0.059	0.002
20	0.103	0.105	0.104	0.001
30	0.168	0.166	0.167	0.001
40	0.229	0.228	0.229	0.001
50	0.296	0.295	0.296	0.001
60	0.346	0.345	0.346	0.001
70	0.398	0.397	0.398	0.001
80	0.445	0.443	0.444	0.001
90	0.493	0.496	0.495	0.002
100	0.559	0.56	0.560	0.001



H) Curva patrón para la determinación de quitobiosa mediante la técnica de DNS

Curva Patrón de DNS (Quitobiosa)

Curva patrón de Quitobiosa					
mg/mL de Quitobiosa	Abs 490 nm				D.E.
	Abs1	Abs2	Abs3	Promedio	
0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
0.400	0.088	0.090	0.090	0.089	0.001
0.800	0.193	0.195	0.193	0.194	0.001
1.200	0.350	0.347	0.350	0.349	0.002
1.600	0.465	0.465	0.462	0.464	0.002
2.000	0.564	0.565	0.565	0.565	0.001

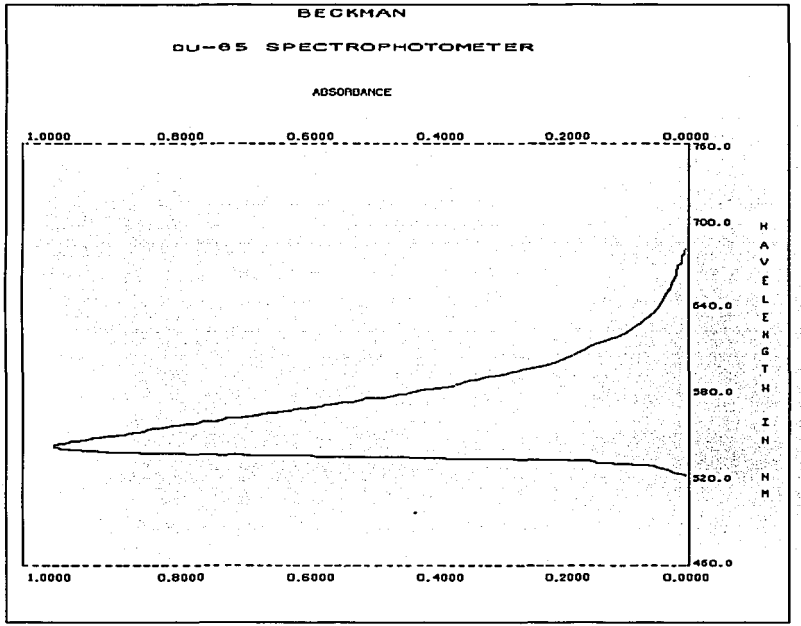


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO 3

Gráficas de los barridos en UV-Vis para la determinación de las longitudes de onda máxima

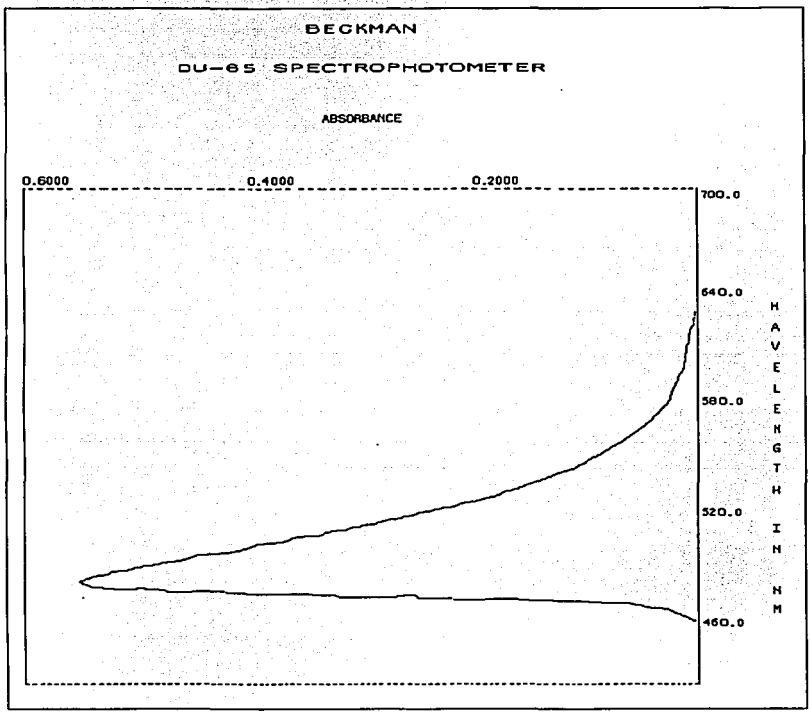
A) Gráfica que representa el barrido en UV-Vis para glucosa



λ máx. de abs. = 540 nm

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

B) Gráfica que representa el barrido en UV-Vis para quitobiosa



λ máx. de abs. = 490 nm

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO 4

Análisis estadístico utilizando el programa Statistic Program Social Science (SPSS)

A) Análisis estadístico para la hidrólisis enzimática de la quitina comercial en una relación E/S del 3.5% y 7.0%

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

```
SET/PRINTER ON.
TITLE 'QUITOBIOSA'.
SUBTITLE 'QUITINASA '.
DATA LIST FIXED /V1 1 V2 3-4 V3 6 V4 8-12.
FORMAT V4 (F5.3).

VARIABLE LABELS V1 'RELACIÓN ENZIMA SUSTRATO '
        V2 'TIEMPO MINUTOS'
        V3 'REPETICIONES '
        V4 'MG QUITOBIOSA/mL'.

VALUE LABELS V1 1 '3.5' 2 '7.0'/
      V2 1 '10' 2 '20' 3 '30' 4 '60' 5 '90' 6 '120'7 '150' 8 '180'
        9 '210' 10 '240' 11 '270' 12 '300' 13 '330' 14 '360' 15 '390'
        16 '420' /
      V3 1 'R1' 2 'R2' 3 'R3'.
BEGIN DATA.
1 01 1 0.060        1 09 1 0.966        2 01 1 0.089        2 09 1 1.573
1 01 2 0.059        1 09 2 0.959        2 01 2 0.089        2 09 2 1.576
1 01 3 0.058        1 09 3 0.959        2 01 3 0.093        2 09 3 1.576
1 02 1 0.059        1 10 1 1.133        2 02 1 0.124        2 10 1 1.795
1 02 2 0.062        1 10 2 1.130        2 02 2 0.124        2 10 2 1.788
1 02 3 0.066        1 10 3 1.130        2 02 3 0.127        2 10 3 1.795
1 03 1 0.089        1 11 1 1.334        2 03 1 0.175        2 11 1 1.948
1 03 2 0.096        1 11 2 1.334        2 03 2 0.175        2 11 2 1.948
1 03 3 0.096        1 11 3 1.334        2 03 3 0.178        2 11 3 1.945
1 04 1 0.209        1 12 1 1.488        2 04 1 0.345        2 12 1 2.085
1 04 2 0.216        1 12 2 1.495        2 04 2 0.352        2 12 2 2.085
1 04 3 0.216        1 12 3 1.488        2 04 3 0.345        2 12 3 2.085
1 05 1 0.318        1 13 1 1.795        2 05 1 0.635        2 13 1 2.289
1 05 2 0.311        1 13 2 1.795        2 05 2 0.642        2 13 2 2.286
1 05 3 0.311        1 13 3 1.805        2 05 3 0.645        2 13 3 2.289
1 06 1 0.448        1 14 1 2.030        2 06 1 0.857        2 14 1 2.487
1 06 2 0.458        1 14 2 2.037        2 06 2 0.857        2 14 2 2.494
1 06 3 0.451        1 14 3 2.037        2 06 3 0.864        2 14 3 2.497
1 07 1 0.618        1 15 1 2.033        2 07 1 1.119        2 15 1 2.562
1 07 2 0.611        1 15 2 2.040        2 07 2 1.130        2 15 2 2.562
1 07 3 0.622        1 15 3 2.033        2 07 3 1.126        2 15 3 2.562
1 08 1 0.789        1 16 1 2.040        2 08 1 1.368        2 16 1 2.565
1 08 2 0.799        1 16 2 2.033        2 08 2 1.368        2 16 2 2.565
1 08 3 0.789        1 16 3 2.033        2 08 3 1.372        2 16 3 2.565
```

```
END DATA.
LIST.
ONEWAY V4 BY V1 (1,2) /STATISTICS ALL /.
ONEWAY V4 BY V2 (1,16)/STATISTICS ALL/ RANGES DUNCAN (0.01)/
RANGES DUNCAN (0.05).
ONEWAY V4 BY V3 (1,3).
ANOVA V4 BY V1 (1,2), V2 (1,16) V3 (1,3)/OPTIONS 3 /.
SET PRINTER OFF.
```

ONEWAY

DESCRIPTIVES
mg QUITOBIOSA / mL

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
						Lower Bound	Upper Bound			
3.5		48	.96400	.73082	.10548	.75179	1.17621	.058	2.040	
7.0		48	1.37752	.89423	.12907	1.11786	1.63718	.089	2.565	
Total		96	1.17076	.83848	8.5577E-02	1.00087	1.34065	.058	2.565	
Model	Fixed Effects			.81662	8.3346E-02	1.00527	1.33625			
	Random Effects				.20676	-1.45638	3.79790			7.1607E-02

Test of Homogeneity of Variances

ANOVA
mg QUITOBIOSA / mL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.104	1	4.104	6.154	.015
Within Groups	62.686	94	.667		
Total	66.790	95			

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DESCRIPTIVES
mg QUITOBIOSA / mL

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
						Lower Bound	Upper Bound			
10		6	7.4667E-02	1.7236E-02	7.0364E-03	5.6579E-02	9.2754E-02	.058	.093	
20		6	9.3667E-02	3.4413E-02	1.4049E-02	5.7552E-02	.12978	.059	.127	
30		6	.13483	4.5181E-02	1.8445E-02	8.7418E-02	.18225	.089	.178	
60		6	.28050	7.3301E-02	2.9925E-02	.20357	.35743	.209	.352	
90		6	.47700	.17934	7.3213E-02	.28880	.66520	.311	.645	
120		6	.65583	.22296	9.1024E-02	.42185	.88982	.448	.864	
150		6	.87100	.27829	.11361	.57896	1.16304	.611	1.130	
180		6	1.08083	.31606	.12903	.74915	1.41252	.789	1.372	
210		6	1.26817	.33613	.13722	.91542	1.62091	.959	1.576	
240		6	1.46183	.36242	.14796	1.08150	1.84217	1.130	1.795	
270		6	1.64050	.33576	.13707	1.28815	1.99285	1.334	1.948	
300		6	1.78767	.32572	.13298	1.44584	2.12949	1.488	2.085	
330		6	2.04317	.26823	.10950	1.76168	2.32466	1.795	2.289	
360		6	2.26367	.25089	.10243	2.00037	2.52696	2.030	2.497	
390		6	2.29867	.28848	.11777	1.99593	2.60141	2.033	2.562	
420		6	2.30017	.29012	.11844	1.99570	2.60463	2.033	2.565	
Total		96	1.17076	.83848	8.5577E-02	1.00087	1.34065	.058	2.565	
Model	Fixed Effects			.25416	2.5940E-02	1.11914	1.22238			
	Random Effects				.20687	.72984	1.61168			.67392

ANOVA
mg QUITOBIOSA / mL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	61.622	15	4.108	63.597	.000
Within Groups	5.168	80	6.460E-02		
Total	66.790	95			

DUNCAN[a]

	N	Subset for alpha = 0.05										
TIEMPO MINUTOS		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
10	6	7.4667E-02										
20	6	9.3667E-02										
30	6	.13483										
60	6	.28050	.28050									
90	6		.47700	.47700								
120	6			.65583	.65583							
150	6				.87100	.87100						
180	6					1.08083	1.08083					
210	6						1.26817	1.26817				
240	6							1.46183	1.46183			
270	6								1.64050	1.64050		
300	6									1.78767	1.78767	
330	6										2.04317	2.04317
360	6											2.26367
390	6											2.29867
420	6											2.30017
Sig.		.207	.184	.227	.146	.157	.205	.191	.227	.319	.085	.114

Means for groups in homogeneous subsets are displayed
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000

ANOVA
mg QUITOBIOSA / mL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7.652E-05	2	3.826E-05	.000	1.000
Within Groups	66.790	93	.718		
Total	66.790	95			

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

B) Análisis estadístico de la hidrólisis de quitina del cefalotórax de camarón para la relación E/S 21% (30 horas de hidrólisis)

```
SET /PRINTER ON.
TITLE 'HARINA RELACIÓN ENZIMA SUSTRATO 21%'.
SUBTITLE 'QUITINASA '.
DATA LIST FIXED /V1 1 V2 3 V3 5 V4 7-11.
FORMAT V4 (F5.3).

VARIABLE LABELS V1 'RELACIÓN ENZIMA SUSTRATO '
        V2 'TIEMPO HORAS'
        V3 'REPETICIONES '
        V4 'mg QUITOBIOSA/mL'.
VALUE LABELS V1 1 '21' 2 '42'/
      V2 1 '14' 2 '21' 3 '24' 4 '26' 5 '28' 6 '30'/
      V3 1 'R1' 2 'R2' 3 'R3'.
BEGIN DATA.
1 1 1 1.380
1 1 2 1.370
1 1 3 1.390
1 2 1 1.778
1 2 2 1.774
1 2 3 1.781
1 3 1 1.904
1 3 2 1.907
1 3 3 1.907
1 4 1 1.931
1 4 2 1.938
1 4 3 1.948
1 5 1 1.863
1 5 2 1.873
1 5 3 1.877
1 4 1 1.788
1 6 2 1.795
1 6 3 1.781
END DATA.
LIST.
ONEWAY V4 BY V2 (1,4)/STATISTICS ALL/ RANGES DUNCAN (0.01)/
RANGES DUNCAN (0.05).
ONEWAY V4 BY V3 (1,3).
ANOVA V4 BY V2 (1,6) V3 (1,3)/OPTIONS 3 /.
SET PRINTER OFF.
```

Number of cases read: 18 Number of cases listed: 18

ONEWAY
DESCRIPTIVES
mg QUITOBIOSA / mL

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
						Lower Bound	Upper Bound			
14		3	1.3800	2.00245E-3	1.0880E-03	1.38454	1.3987	1.370	1.390	
21		3	1.77800	1.00058E-3	1.0450E-03	1.78254	1.79658	1.774	1.781	
24		3	1.90600	1.7321E-03	1.0000E-03	1.90170	1.91030	1.904	1.907	
26		3	1.93900	8.5440E-03	4.9329E-03	1.91778	1.96022	1.931	1.948	
28		3	1.87100	7.2111E-03	4.1633E-03	1.85309	1.88891	1.863	1.877	
30		3	1.78800	7.0000E-03	4.0415E-03	1.77061	1.80539	1.781	1.795	
Total		18	1.87600	5.8982E-02	1.7027E-02	1.83852	1.91348	1.781	1.948	
Model	Fixed Effects			6.6521E-03	1.9203E-03	1.87157	1.88043			
	Random Effects				3.2453E-02	1.77272	1.97928			4.1979E-03

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANOVA
mg QUITOBIOSA / mL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.791E-02	5	1.264E-02	285.605	.000
Within Groups	3.540E-04	12	4.425E-05		
Total	3.827E-02	17			

DUNCAN[a]

	N	Subset for alpha = 0.05		
TIEMPO HORAS		1	2	3
14	3	1.38000		
21	3		1.78000	
24	3			1.78800
26	3			1.87100
28	3			1.90600
30	3			1.93900
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ANOVA
mg QUITOBIOSA/mL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.215E-04	2	6.075E-05	.014	.986
Within Groups	3.815E-02	15	4.239E-03		
Total	3.827E-02	17			

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

C) Análisis estadístico de la hidrólisis de quitina del cefalotórax de camarón para la relación E/S 42% (30 horas de hidrólisis)

```
SET /PRINTER ON.
TITLE 'HARINA, RELACIÓN ENZIMA SUSTRATO 42%'.
SUBTITLE 'QUITINASA '.
DATA LIST FIXED /V1 1 V2 3 V3 5 V4 7-11.
FORMAT V4 (F5.3).
VARIABLE LABELS V1 'RELACIÓN ENZIMA SUSTRATO '
        V2 'TIEMPO HORAS'
        V3 'REPETICIONES '
        V4 'mg QUITOBIOSA/mL'.
VALUE LABELS V1 1 '21' 2 '42'/
        V2 1 '14' 2 '21' 3 '24' 4 '26' 5 '28' 6 '30'/
        V3 1 'R1' 2 'R2' 3 'R3'.
BEGIN DATA.
2 1 1 1.558
2 1 2 1.559
2 1 3 1.589
2 2 1 2.591
2 2 2 2.578
2 2 3 2.575
2 3 1 2.949
2 3 2 2.949
2 3 3 2.962
2 4 1 2.962
2 4 2 2.962
2 4 3 2.976
2 5 1 2.908
2 5 2 2.908
2 5 3 2.921
2 6 1 2.826
2 6 2 2.806
2 6 3 2.840
END DATA.
LIST.
ONEWAY V4 BY V2 (1,6)/STATISTICS ALL/ RANGES DUNCAN (0.01)/
RANGES DUNCAN (0.05).
ONEWAY V4 BY V3 (1,3).
ANOVA V4 BY V2 (1,6) V3 (1,3)/OPTIONS 3 /.
SET PRINTER OFF.
```

Number of cases read: 18 Number of cases listed: 18

ONEWAY
DESCRIPTIVES
mg QUITOBIOSA/mL

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
						Lower Bound	Upper Bound			
14		3	1.56900	1.82546E-02	4.1423E-03	1.52256	1.57895	1.558	1.589	
21		3	2.58100	9.00255E-03	4.4567E-03	2.56952	1.5987	2.575	2.591	
24		3	2.95333	7.5056E-03	4.3333E-03	2.93469	2.97198	2.949	2.962	
26		3	2.96667	8.0829E-03	4.6667E-03	2.94659	2.98675	2.962	2.976	
28		3	2.91233	7.5056E-03	4.3333E-03	2.89369	2.93098	2.908	2.921	
30		3	2.82400	1.7088E-02	9.8658E-03	2.78155	2.86645	2.806	2.840	
Total		18	2.91408	5.8938E-02	1.7014E-02	2.87664	2.95153	2.806	2.976	
Model	Fixed Effects			1.0840E-02	3.1292E-03	2.90687	2.92130			
	Random Effects				3.2176E-02	2.81169	3.01648			4.1020E-03

ANOVA
mg QUITOBIOSA/mL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.727E-02	5	1.242E-02	105.733	.000
Within Groups	9.400E-04	12	1.175E-04		
Total	3.821E-02	17			

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DUNCAN[a]

	N	Subset for alpha = 0.05		
TIEMPO HORAS		1	2	3
14	3	1.56900		
21	3		2.58100	
24	3			2.95333
26	3			2.96667
28	3			2.91233
30	3			2.82400
Sig.		1.000	1.000	.170

Means for groups in homogeneous subsets are displayed
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7.327E-04	2	3.663E-04	.088	.917
Within Groups	3.748E-02	15	4.164E-03		
Total	3.821E-02	17			

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO 5

Datos comparativos de la eficiencia del proceso

A) Cuadro comparativo del rendimiento de la harina a partir de 1 Kg de cefalotórax de camarón fresco (obtención de la muestra)

Consumos	Operación	Pérdidas	Obtención
5000 mL agua	Lavado	4500 mL de agua	Cabeza + agua (1450 g)
11190 W/24 h	Secado	1100 mL agua	350 g cabeza seca
930 W/30 min.	Molienda	70 g harina	280 g harina
970W /15 min.	Tamizado	80 g harina	200 g harina tamizada
115 W/ h	Desmineralización	30 g harina	600 mL de solución de EDTA 0.5 M +170 g harina
3000 mL agua	Lavado (agua destilada)	50 g harina	120 g harina desmineralizada
870 W / 2 h	Secado	55 mL agua	65 g harina desmineralizada seca

B) Cuadro comparativo del rendimiento de los pigmentos carotenoides con respecto a la harina de cefalotórax de camarón (Hidrólisis enzimática)

Consumos	Operación	Obtención
27600 W/24 h	Hidrólisis enzimática	Harina hidrolizada + 2.953 mg de quitobiosa/mL
1260 W/20 min.	Centrifugación	Pigmento, proteínas, quitobiosa
40 ml Hexano	Extracción del pigmento	Hexano + Pigmento
315W/5 min.	Centrifugación	Pigmento (astaxantina)
99.570 µg de carotenoides totales + 19.733 % de proteína soluble		

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

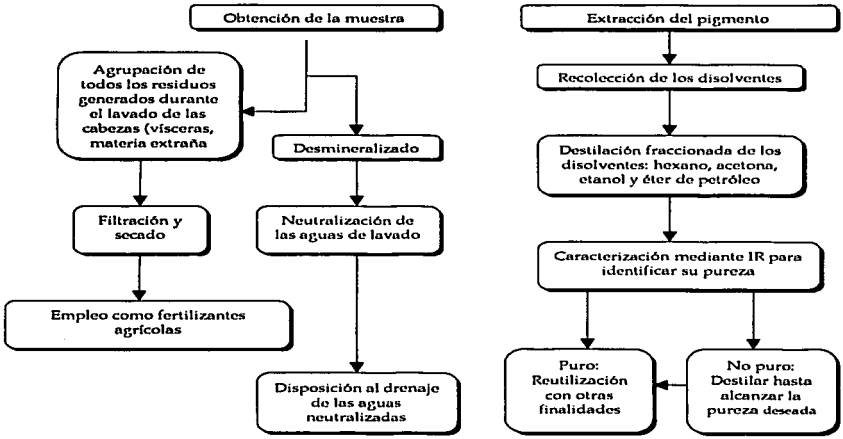
C) Estimación del tiempo de proceso y gasto energético a nivel de laboratorio

Operación	Gasto energético (W)	Tiempo (horas)
Muestreo	-	4
Lavado manual	-	2
Secado	11,190 W	24
Molienda	930 W	0.5
Tamizado	970W	0.75
Desmineralizado	115 W	1
Lavados con agua destilada	-	1
Secado	870 W	2
Hidrólisis enzimática	27600 W	24
Centrifugación	1260 W	0.33
Extracción del pigmento	-	0.5
Centrifugación	315W	0.083
Total	**43250 W**	**60.163**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO 6

A) Tratamiento y disposición de los residuos generados



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN