



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**ESTUDIOS SOBRE CAROTENOPROTEÍNAS
EXTRAÍDAS DE RESIDUOS DE CAMARÓN
FERMENTADOS Y NO-FERMENTADOS**

Comité tutorial:

Dra. Ma. Isabel Guerrero Legarreta, Dr. Sergio Huerta Ochoa y M. en B. Keiko Shirai Matsumoto

Asesor: Dra. Ma. Isabel Guerrero Legarreta

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA



COORDINACIÓN DE SERVICIOS
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA
PRESENTA

ROBERTO EMETERIO ARMENTA LÓPEZ

H. JURADO

Dra. Ma. Isabel Guerrero Legarreta

Dr. Sergio Huerta Ochoa

Dr. José Luis Arredondo Figueroa

Dr. Sergio Revah Moiseev

M.en B. Keiko Shirai Matsumoto

México, D.F., a 25 de Septiembre de 1998

A Dios, que siempre ha estado conmigo acompañándome en todas las situaciones, en cada momento, en cada instante, y porque mi fe en ti es más que infinita.

Dedicatorias

*Para aquel que comprende que la vida deja de ser tenebrosa cuando hay actividad,
que toda actividad es ciega si no la acompaña el conocimiento,
y todo conocimiento es vano, salvo cuando hay trabajo,
y todo trabajo es infructuoso, si no lo acompaña el amor;
y cuando se trabaja con amor, te unes al otro y a Dios.*

GIBRÁN

*Para aquel que sabe que la única puerta para conseguir
lo anhelado es la lucha por lo que se quiere, el trabajo,
el empeño, el amor, y aunque menciono muchas cosas,
cuando se realiza lo que se quiere, basta la dedicación y el amor
por lo que se hace. A todo aquel que ha comprendido
que la dedicación es el pasaporte para conseguir las metas
que jamás otros imaginarán, a ti te brindo tributo y una prueba
de una frase tan empleada pero tan poco probada:
"cuando se quiere se puede", hoy te presento un humilde
ejemplo de ello, y al final sólo te digo que
siempre brindes tu mejor esfuerzo.*

REAL



¡Oh mar!, ¡viejo mar!, ¿quién conociera tan sólo la mitad de tus maravillas y secretos... Gosse: Aquarium 226-227.

Al mar, por esa inmensidad, por ese gigantismo, por ser una de las más grandes creaciones de nuestro Señor Dios, por tu belleza y por todo lo que nos aportas, no solo las delicias a nuestros sentidos conocidos, si no también a la sensibilidad del alma...REAL



A mis antiguos y compañeros de la 6ta. generación de la Maestría en Biotecnología, de izquierda a derecha y abajo hacia arriba: Verónica, Cristina, Angélica, Margarita, Araceli, Zenia, Mónica, Alejandro Medina, Hugo, Juan, José Manuel, Yuri, Alejandro, Félix, Javier, César, Gabriel y Roberto (un servidor).

¿Y qué es trabajar con amor?

Es tejer la tela con fibras extraídas de nuestro corazón, es como si nuestro ser más amado tuviera que vestirse con esa tela.

Es construir una morada con cariño y embellecerla como si fuese para albergar al ser más amado.

Es como poner una semilla con ternura y cosechar con regocijo, como si el fruto fuese para alimentar al ser más amado.

Es infundir a todas las cosas que creamos un soplo de nuestro propio espíritu.

Y saber que todos los muertos sagrados, nos rodean y vigilan.

Gibrán Jalil Gibrán

*Espero,
si, espero,
pero te digo que desde ahora eres el ambiente
que los pulmones de mi alma respiran,
y me impregnaré de ti
como el cielo de luces en una noche
hermosa llena de estrellas.*

REAL

DEDICATORIAS

- ✍ *A mis amados padres, Roberto y María, dos seres que siempre han creído en mi brindándome su apoyo incondicional y por la oportunidad que me dieron junto con Dios, de vivir.*
 - ✍ *A mis queridos hermanos Maricela, Heriberto (Güero), Héctor Osvaldo (Chichi) y Yudit, por formar parte de la familia de la cual me siento orgulloso, si se pudiera asignar una medida al cariño podría decirles que rebasa lo grande y de igual manera para todos.*
 - ✍ *A mi hermana Yudit por sobradas razones, pero la más importante, por compartir tantos momentos juntos, por esa magia que siempre ha rodeado el privilegio de ser hermanos.*
 - ✍ *A mi hermano Jesús, que aunque la mayor parte de mi vida hemos estado separados físicamente, espiritualmente estamos unidos por la fuerza de la sangre que nutre nuestro cariño de hermanos.*
 - ✍ *Muy especialmente a mi adorada abuela Carlota (Mamanina), porque sin saberlo ha sido una fuente de motivación para mí día tras día, por su ejemplo de lucha incansable para conseguir lo que se propone, y por esas oraciones a Dios, donde se que le pide por mi bienestar.*
 - ✍ *A mis queridos sobrinos con los cuales disfruto tanto los momentos de juego, porque me han permitido convivir con la sinceridad que les confiere su niñez traducida en un amor desinteresado y realmente valioso, a todos los tengo presentes en mi corazón: Irancito, Roany, Ledia, Robertito, Heriberto, Jesús (Chuy), Héctor (Torín), Maricelita, Heber y Eduardito.*
 - ✍ *A mis cuñado(a)s: Irán (mi compadre), Lolis, Luz María y Lalo, porque también forman parte del cuadro familiar, aportando gran parte de su ser al enriquecimiento de valores que nos unen y nos hacen más fuertes.*
 - ✍ *A mis entrañables amigos desde la infancia y por siempre de mi hermoso pueblo natal, La Bebelama, Guasave, Sinaloa, por esa amistad tan desinteresada y bien cimentada.*
 - ✍ *A mis dos grandes e incondicionales amigos Lulú y Alfonso (Toto) por compartir tantos momentos y darme los más claros ejemplos de una verdadera, valiosa y desinteresada amistad.*
-

- ✍ *A mis sinceros y valiosos amigos: Pedro Tores , José Manuel (Pepe), Cristina, Araceli, Mónica Contreras, Marisol, Isabel Estrada, Ernesto, Silvia, Edith, Arely, y a ti también Tamara que aunque estas tan lejos espiritualmente estamos cerca uno del otro.*
- ✍ *A mis amigos del Instituto Tecnológico de Sonora, en especial a René, Tere, Ana Ma., Noé, Polo, Diana Patrón, Laura Gassós, Iram Mondaca, Dalia Sánchez, Jaime López, Guadalupe Aguilar y Luciano.*
- ✍ *A todos mis tíos, en especial a tío Zenón y tía Alejandrina por el valioso apoyo que siempre me ofrecieron como familiares en la Cd. de México, D.F., cuando estoy con ustedes me siento como en casa.*
- ✍ *A los errores por aprender con creces de ellos, aunque ello implique una dosis de dolor.*
- ✍ *A una estrella que brilló ante mis ojos y que impregnó mi ser con su fulgor, cultivando mi esencia, y aunque su brillo ya se extinguió aprendí cosas valiosas, estrella, nadie esta capacitado para dirigir el curso del amor; porque el amor si te cree digno de el, dirigirá tus pasos.*
- ✍ *Al cielo lleno de estrellas que tengo en mis noches.*
- ✍ *A mi corazón y mi mente que siempre estan abiertos para manifestar su sentir y su pensar, respectivamente.*

REAL

AGRADECIMIENTOS

- ✍ A la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa por la formación que recibí en ella, he aprendido a quererte por todo lo que me has brindado académica y humanamente.*
 - ✍ Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el valioso apoyo otorgado para lograr este grado.*
 - ✍ Un especial agradecimiento a la Dra. Isabel Guerrero por todo su apoyo y por cumplir con creces el papel de tutor de este trabajo, gracias por su ayuda en todos los aspectos y su valiosa amistad, de verdad que este pequeño texto no es suficiente para agradecerle lo suficiente.*
 - ✍ A la Dra. Edith Ponce por el apoyo incondicional que siempre me ofreció, porque además ejerció una especie de mi asesor en algunas técnicas instrumentales del desarrollo experimental, además de la amistad desinteresada que ha perdurado entre los dos, y que valoro tanto.*
 - ✍ Al Dr. Sergio Huerta por ser simple y sencillamente un excelente asesor, traducido esto en atinados comentarios y sugerencias para este trabajo.*
 - ✍ Al Dr. Sergio Revah por la buena revisión realizada a este trabajo y sus interesantes e importantes comentarios, resultando una mejor presentación del mismo*
 - ✍ Al Dr. José Luis Arredondo por interpretar, captar y destacar la importancia de este trabajo, gracias por su revisión y sus sugerencias.*
 - ✍ A la M. en B. Keiko Shirai.*
 - ✍ Al Dr. George M. Hall de la Universidad de Loughborough, Inglaterra, quien me ayudó bastante en aspectos relacionados a sistemas de ultrafiltración, haciéndome además valiosas sugerencias encaminadas a la continuidad de este trabajo.*
 - ✍ A la granja camarónica "Ahumada", en mi hermoso estado Sinaloense, donde me proporcionaron todas las facilidades para la recopilación de valioso material fotográfico para la presentación del examen de grado, además de la importante disposición ofrecida para el aprovechamiento de las cabezas de camarón.*
-

- ✍ *A todos mis amigos que trabajan en diversos campos pesqueros importantes en el estado de Sinaloa, por su siempre disposición para ayudarme en la recopilación de datos cotidianos muy valiosos del ambiente pesquero que ayudan a entender desde raíz el problema de la contaminación marina.*
- ✍ *Al Departamento de Biotecnología de la UAM-I por el apoyo brindado en varios aspectos importantes para lograr una mejor formación del estudiante de posgrado en Biotecnología.*
- ✍ *A mis profesores de la maestría en Biotecnología, no tienen idea de todo lo mucho que aprendí de cada uno de ustedes: Dr. Jorge Gómez, Dr. Gustavo Viniegra, M. en C. Rosa Obdulia González, Dr. Mariano García-Garibay, Dra. Isabel Guerrero, M. en C. Lorena Gómez, Dra. Edith Ponce, Dra. Arely Prado, Dra. Gabriela Gutiérrez y Dr. Jorge Soriano de quien aprendí bastante acerca de métodos de exposición y dinámicas de discusión de artículos, gracias a todos.*

REAL

ÍNDICE

	Pág.
LISTA DE TABLAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
RESUMEN.....	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. JUSTIFICACIÓN.....	5
3. OBJETIVOS.....	7
4. HIPÓTESIS.....	9
5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
5.1 Generalidades del camarón.....	10
5.1.1 Composición química.....	11
5.1.2 Producción.....	12
5.1.3 Subproductos.....	13
5.2 Pigmentos.....	14
5.2.1 Color.....	15
5.2.2 Carotenoides.....	15
5.2.2.1 Generalidades.....	15
5.2.2.2 Estabilidad.....	17
5.2.2.3 Función biológica.....	17
5.2.2.4 Fuentes.....	18
5.2.3 Astaxantina.....	18
5.2.3.1 Características generales.....	18
5.2.3.2 Residuos de crustáceos como fuente natural de pigmentos.....	20
5.2.3.3 Otras fuentes de astaxantina.....	23
5.2.4 Aplicaciones generales.....	24
5.2.5 Pigmentación de salmónidos.....	25
5.2.5.1 Propiedades químicas.....	26
5.2.5.2 Ventajas del uso de astaxantina.....	27
5.3 Ensilados.....	28
5.3.1 Ensilado químico.....	29
5.3.2 Fermentación láctica.....	31
5.3.2.1 Bacterias lácticas.....	33
5.3.2.2 Condiciones para la fermentación láctica.....	34
5.3.2.3 Ventajas.....	38
5.4 Extracción.....	38
5.4.1 Solventes.....	39
5.4.2 Aceite de soya.....	40
5.5 Carotenoproteínas.....	42
5.5.1 Lipoproteínas.....	42

5.5.2 Proteasas.....	43
5.5.2.1 Generalidades.....	43
5.5.2.2 Fuentes.....	44
5.5.2.3 Aplicación en extracción de carotenoproteínas.....	45
5.6 Técnicas de análisis.....	46
5.6.1 Columnas de cromatografía.....	46
5.6.2 Cromatografía de filtración en gel.....	47
5.6.3 Electroforesis.....	47
5.6.4 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	48
5.7 Ultrafiltración.....	49
5.7.1 Generalidades.....	49
5.7.2 Aplicaciones.....	52
5.8 Antioxidantes.....	53
5.8.1 Sintéticos.....	53
5.8.2 Naturales.....	54
5.8.3 Aplicaciones en conservación de astaxantina.....	55
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	56
6.1 Material.....	57
6.2 Fermentación.....	57
6.2.1 Microorganismos.....	57
6.2.2 Condiciones de la fermentación.....	58
6.2.3 Determinación del pH.....	59
6.3 Extracción de pigmentos.....	59
6.3.1 Determinación de xantofilas totales.....	62
6.3.2 Análisis por HPLC del contenido de astaxantina en residuos fermentados y no-fermentados.....	63
6.4 Concentración del extracto.....	64
6.5 Hidrólisis del complejo pigmento-proteína (carotenoproteína).....	65
6.5.1 Método enzimático.....	65
6.5.2 Determinación de actividades enzimáticas.....	65
6.5.3 Descripción del sistema enzimático.....	67
6.5.3.1 Análisis de proteína soluble.....	69
6.5.3.2 Análisis de xantofilas totales.....	70
6.6 Concentración de astaxantina por ultrafiltración.....	70
6.7 Estudio de la carotenoproteína y sus fracciones.....	71
6.7.1 Determinación del peso molecular de la carotenoproteína y sus fracciones por electroforesis.....	71
6.7.2 Determinación de pesos moleculares de péptidos por filtración en gel.....	72
6.8 Contenido de astaxantina en fracciones.....	73
6.9 Efecto de antioxidantes.....	74
6.10 Análisis estadístico.....	75
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	77
7.1 Fermentación.....	77
7.2 Extracción de pigmentos.....	79
7.3 Contenido de astaxantina en residuos fermentados y no-fermentados.....	81
7.4 Hidrólisis del complejo pigmento-proteína (carotenoproteína).....	84
7.5 Concentración de astaxantina por ultrafiltración.....	87
7.6 Estudio de la carotenoproteína y sus fracciones.....	89
7.6.1 Determinación del peso molecular de la carotenoproteína y sus fracciones por electroforesis.....	89

7.6.2 Determinación de pesos moleculares de péptidos por filtración en gel.....	90
7.7. Contenido de astaxantina en fracciones.....	91
7.8 Efecto de antioxidantes.....	93
8. CONCLUSIONES.....	97
9. BIBLIOGRAFÍA.....	100
APÉNDICE 1.....	108
APÉNDICE 2.....	110

LISTA DE TABLAS

Tabla		Pág.
1	Composición del camarón (100 g de porción comestible).....	11
2	Composición del cefalotórax de camarón.....	12
3	Concentración de astaxantina (mg/Kg en base húmeda) de residuo de camarón ensilado y no ensilado.....	31
4	Aplicaciones de los procesos de membrana.....	52
5	Microorganismos iniciadores de la fermentación.....	58
6	Sistemas utilizados para la extracción de pigmentos.....	60
7	Características de las enzimas proteolíticas empleadas en el sistema.....	66
8	Preparación de reactivos para la determinación de proteína soluble por el método de Peterson.....	70
9	Promedio de pH de 8 fermentaciones.....	77
10	Valores promedios de xantofilas totales ($\mu\text{g/g}$) de 6 extracciones.....	79
11	Balance general de materia en el proceso de ultrafiltración.....	88
12	Pesos moleculares aproximados de carotenoproteína y péptidos en retenido y permeado del hidrolizado enzimático.....	89
13	Pesos moleculares de los péptidos resultantes de la hidrólisis enzimática...	91
14	Análisis de varianza de las variables dependientes estudiadas en los distintos experimentos.....	111
15	Nivel de significancia ($P>$) de las fuentes de variación en los distintos experimentos.....	111
16	Prueba múltiple de Duncan para cultivos iniciadores.....	112
17	Prueba múltiple de Duncan para sistemas de extracción.....	112
18	Prueba múltiple de Duncan para tipos de residuos (fermentados y no-fermentados).....	112
19	Prueba múltiple de Duncan para sistemas enzimáticos.....	112
20	Prueba múltiple de Duncan para tipo de fracciones.....	113
21	Prueba múltiple de Duncan para tipos de antioxidantes.....	113

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Partes del camarón.....	11
2	Cifras estimadas de la producción de camarón en el intervalo 1952-1997.....	13
3	Estructura química de caroteno y xantofila.....	16
4	Estructura química de la astaxantina.....	19
5	Estructura de una lipoproteína.....	43
6	Cromatografía en columna.....	46
7	Esquema de ultrafiltración.....	50
8	Comparación de membranas convencionales (derecha) con anisotrópicas (izquierda).....	50
9	Ultrafiltración convencional y de flujo cruzado.....	51
10	Estructura química del BHA y BHT.....	53
11	Estructuras químicas del carnosol y rosmanol.....	54
12	Metodología empleada en la fermentación de los residuos de camarón.....	58
13	Recipiente empleado para las fermentaciones.....	59
14	Metodología empleada para la extracción de pigmentos.....	61
15	Análisis de astaxantina en residuos fermentados y no-fermentados.....	64
16	Procedimiento general para la determinación de actividades enzimáticas.....	67
17	Esquema de la hidrólisis del complejo pigmento-proteína.....	69
18	Estudio de las fracciones obtenidas por ultrafiltración del hidrolizado enzimático.....	71
19	Análisis del contenido de astaxantina en fracciones.....	74
20	Análisis del efecto de antioxidantes en la conservación de la astaxantina.....	75
21	pH después de 48 h de fermentación.....	78
22	Xantofilas totales en extractos.....	80
23	Cromatograma de señales obtenidas al inyectar los extractos.....	82
24	Contenido de astaxantina en residuo fermentado y no-fermentado.....	83
25	Cromatograma de residuos de camarón fermentados y no-fermentados.....	83
26	Proteína soluble en la hidrólisis del complejo pigmento-proteína.....	85
27	Xantofilas totales en la hidrólisis del complejo pigmento-proteína.....	86
28	Contenido de astaxantina antes y después de la hidrólisis enzimática con la mezcla de 4 enzimas comerciales.....	87
29	Cromatograma del hidrolizado enzimático de carotenoproteína.....	91
30	Cromatograma de distintas fracciones (hidrolizado, no-hidrolizado, retenido y permeado).....	92
31	Contenido de astaxantina en fracciones.....	93
32	Cromatograma del efecto de antioxidantes en la conservación de astaxantina en los extractos.....	94
33	Comparación del efecto antioxidante de BHA:BHT y aceite esencial de romero en la conservación de la astaxantina.....	94
34	Cromatograma del efecto antioxidante transcurridas 6 semanas.....	95
35	Efecto antioxidante a distintos tiempos (0, 1 y 6 semanas).....	95

RESUMEN

En la tesis presente se estudiaron algunos aspectos referentes a la extracción de pigmentos a partir de residuos fermentados y no-fermentados de camarón, además de establecer las condiciones enzimáticas para lograr la hidrólisis del complejo pigmento-proteína.

Se probaron tres iniciadores lácticos en la fermentación de los residuos logrando mayor y más rápida la disminución de pH utilizando *Lactobacillus sp.* ($P > 0.0001$), aislado de residuos de camarón. Se realizaron análisis por HPLC en columna de fase reversa para determinar el contenido de astaxantina en los dos tipos de residuos, encontrándose que los residuos fermentados tuvieron una mayor concentración del pigmento ($P > 0.0001$).

Para la extracción de pigmentos se probaron tres sistemas de solventes orgánicos, y aceite de soya, obteniendo la mayor cantidad de xantofilas totales con una mezcla de éter de petróleo:acetona:agua (15:75:10) ($P > 0.0001$).

Para realizar la hidrólisis del complejo carotenoproteína se probaron cuatro distintos tratamientos enzimáticos a 40°C, pH 7, 5 U.A. y carotenoproteína solubilizada en

amortiguador de fosfatos, lográndose la mayor hidrólisis proteica en un tiempo de 24 horas con una mezcla de 4 enzimas comerciales formada por savinasa^{MR}, esperasa^{MR}, neutrasa^{MR} y alcalasa^{MR} (1.25 U.A. de cada una) ($P>0.0001$), seguido de un tratamiento con savinasa^{MR} (5 U.A.) (24 h). El grado de hidrólisis se evaluó en base a la cantidad de proteína soluble y xantofilas totales en el hidrolizado.

Posteriormente se realizaron hidrolizados con la mezcla de 4 enzimas, y estos fueron sometidos a ultrafiltración (corte de membrana = 50 kDa) para separar físicamente la proteína del pigmento y concentrar a cada uno de ellos en las distintas fracciones (retenido y permeado), obteniéndose 94% de proteína en el retenido y cerca del 100 % de pigmento en el permeado.

Para conocer el peso molecular de la carotenoproteína, esta se sometió a electroforesis, obteniendo un peso de 265 kDa. Los péptidos resultantes de la hidrólisis enzimática se analizaron tanto por electroforesis como por filtración en gel obteniendo pesos moleculares de 62.6 kDa, 52.3 kDa, 18.6 kDa, 7.8 kDa y 3.03 KDa, localizándose la mayor concentración de proteína en la fracción con peso molecular >50 kDa.

Se comparó el efecto antioxidante de una mezcla BHA:BHT y aceite esencial de romero en la conservación de astaxantina en los extractos, encontrándose que el aceite esencial de romero evita la oxidación en la misma proporción que la mezcla de BHA:BHT, pero su efecto decrece con respecto al tiempo de almacenamiento de los extractos (1-6 semanas), mientras que la mezcla de antioxidantes sintéticos mantiene su efecto por mayor tiempo ($P>0.0001$).

1. INTRODUCCIÓN

Los productos marinos constituyen uno de los rubros económicos de mayor importancia para países como México que poseen un amplio litoral. Entre estos, el camarón destaca por ser uno de los productos de mayor demanda en el mercado nacional e internacional, debido principalmente a su excelente valor nutricional y a sus propiedades sensoriales.

La producción camaronera, miles de toneladas al año capturadas en mar y en cautiverio en granjas camaronícolas, esta conformada en un 40-45% por la cabeza que constituye un desperdicio en la mayoría de las ocasiones no aprovechado. Esto ocasiona un problema de contaminación importante, que se acrecienta aún más en los meses de septiembre a diciembre, la temporada de pesca de camarón de bahía en las costas de nuestro país.

Sumando todas estas cantidades de desperdicio provenientes de altamar, bahía y granjas camaronícolas se tiene una cantidad de toneladas considerables de residuo a lo largo de las costas del territorio nacional. Este subproducto aumenta en aquellos estados que tienen los primeros lugares de producción camaronícola en granjas y que están produciendo desperdicio prácticamente durante todo el año.

La composición química de estos desperdicios incluye compuestos con un alto valor agregado que pueden ser aprovechados y obtener una ganancia a partir de ellos. Dentro de esos compuestos se pueden mencionar a la quitina, proteína, proteasas y pigmentos.

Estos últimos tienen una gran importancia en la industria mundial de pigmentación de la carne de especies salmónidas (salmones, truchas, etc.), ya que son un ingrediente fundamental en la dieta de estos peces para lograr el grado de coloración en su carne y poder colocarlos a un buen precio en el mercado, además del efecto probiótico que tienen en estos organismos al mejorar su circulación sanguínea y su reproducción, entre otros procesos metabólicos.

La astaxantina, el principal pigmento presente en residuos de camarón, es un precursor de la vitamina A, clasificándose dentro del nuevo término conocido como nutraceuticos, las cuales se consideran sustancias de incidencia natural que contribuyen a la salud.

El empleo de los pigmentos sintéticos que producen esta coloración (rojo-anaranjado) cada vez es más cuestionado, siendo prohibidos en algunos países como los de la Unión Europea. Esta prohibición no sólo afecta a la industria de la acuicultura, sino también a otras industrias alimentarias como la de granjas avícolas, y la de embutidos.

Por otra parte, estos pigmentos han adquirido un gran auge a nivel mundial en la industria de cosméticos elaborados a base de colorantes naturales, el cual al igual que la pigmentación de salmónidos es un mercado de millones de dólares anuales.

De hecho, se estima que el tamaño de mercado de la astaxantina en particular, es de aproximadamente 125 millones de dólares por año, con un crecimiento histórico del 15% por año.

Al ser la astaxantina el pigmento carotenóide más abundante en el camarón, el desperdicio de este se convierte en una excelente fuente natural del colorante, debido a que es un subproducto al cual generalmente no se le destina para ningún uso.

La astaxantina es un pigmento muy fácil de oxidarse y convertirse en otros compuestos que no producen la coloración deseada, perdiendo su valor. Es por eso que en el proceso de extracción deben de buscarse los pasos más adecuados para conservar el pigmento en estado reducido, como un sistema de solventes adecuado y el empleo de antioxidantes.

Debido a que la astaxantina es estable en ambientes ácidos, el ensilado con bacterias lácticas o ácidos fuertes (tratamiento químico) son opciones para asegurar su protección y obtener mayores rendimientos. Sin embargo hay que considerar que utilizando ácidos fuertes se producen efluentes contaminantes, lo que redundaría en un problema de contaminación ambiental. Por su parte, la fermentación láctica es más benigna y se logran resultados similares al tratamiento químico.

En estado natural las astaxantinas se encuentran unidas a proteínas, unión que las hace más estables. Al llevarse a cabo el tratamiento ácido por medio de fermentación láctica de los residuos, y la subsecuente extracción de los pigmentos, estos se separan

de la fracción proteica, reduciendo su estabilidad. Sin embargo, el ambiente reductor que existe en la fermentación y el empleo de antioxidantes en el proceso de extracción pueden resguardar la unión proteína-pigmento.

El empleo de antioxidantes en el proceso de extracción de pigmentos es muy importante, dado que la adición de estas sustancias permiten que los rendimientos sean mucho mayores comparados con aquellos donde no se utilizan.

Después de la extracción, la mayor parte de los pigmentos se encuentran unidos a las proteínas formando el complejo pigmento-proteína, conocido como carotenoproteína, el cual puede ser hidrolizado mediante el empleo de proteasas y de esta forma liberar la mayor parte del pigmento, aumentando su concentración disponible al separarla de la fracción proteica, la cual ha sido poco estudiada.

El grado de liberación de la parte proteica por parte del pigmento determinará el grado de absorción del pigmento en el músculo estriado del pez, es decir, la astaxantina se absorbe mejor al estar libre de proteína porque aumenta su probabilidad de unión con las proteínas del músculo del salmónido, además, la astaxantina se absorbe en mayor proporción debido a que tiene un mayor grado de hidroxilación comparado con otros pigmentos que producen la misma coloración. Por otra parte la astaxantina empleada con fines industriales, sólo produce el color rojo-anaranjado característico cuando se encuentra en forma libre.

2. JUSTIFICACIÓN

Los pigmentos carotenoides son utilizados para fines diversos e importantes, en particular los que producen la coloración rojo-anaranjado, conocidos como astaxantinas.

Una de sus aplicaciones más importantes es la pigmentación de la carne de salmónidos (rosada a roja), debido a que el principal criterio por parte del público consumidor para adquirir las especies salmónidas es el impacto visual del color, el que le da exclusividad a su imagen a diferencia de otros productos que sólo son juzgados por otras características organolépticas como el sabor, olor, textura, o frescura. Por tal motivo el grado de pigmentación es el factor fundamental en la determinación del precio en el mercado de los salmónidos (salmones, truchas, etc.).

La acuicultura ha tenido una fuerte expansión en años recientes y por consecuencia se ha incrementado a nivel mundial la demanda por fuentes pigmentantes. Hasta el momento los productos sintéticos son la fuente de pigmentos más utilizada en acuicultura debido a que son productos estandarizados, con una alta concentración de carotenoides y de fácil manejo, aunque son altos en precio, representan del 15 al 20% del costo de la dieta. Por otra parte estos pigmentos sintéticos son importados representando un costo extra para el acuicultor y una continua salida de divisas del país.

La autorización como aditivo alimentario de los pigmentos sintéticos aún esta pendiente en algunos países y en otros ya son prohibidos, como en la Unión Europea, siendo estos los países compradores de peces pigmentados y de otros alimentos donde se emplean estos colorantes. Por estas razones es necesario cubrir la demanda de pigmentos con aquellos extraídos de fuentes naturales.

Dentro de los productos que se han empleado como fuentes naturales de carotenoides están los desechos de procesamiento de crustáceos. Mediante la realización del presente trabajo, se estudió la utilización de residuos de camarón fermentados y no fermentados como fuente natural de carotenoides que generan el color rojo-anaranjado (astaxantinas).

Se realizaron estudios de extracción, asociación y ruptura del complejo pigmento-proteína, para la liberación de la astaxantina.

3. OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar aspectos de la extracción, asociación y ruptura del complejo pigmento-proteína de carotenoproteínas en residuos de camarón fermentados y no fermentados.

Objetivos específicos

- ☞ Estudiar la fermentación láctica de los residuos de camarón empleando como cultivos iniciadores, a *Lactobacillus sp.*, *Pediococcus pentosaceus* y *Staphylococcus carnosus* para determinar la disminución máxima de pH.
-

-
- ☞ Definir las condiciones óptimas de la extracción de pigmentos a partir de residuos fermentados y no fermentados.
 - ☞ Evaluar la eficiencia de extracción de pigmentos con los sistemas cloroformo:metanol:agua (1:2:4), éter de petróleo:acetona:agua (15:75:10), etanol:agua (40:60) y aceite de soya.
 - ☞ Analizar el contenido de astaxantina en residuos de camarón fermentados y no-fermentados.
 - ☞ Establecer las condiciones adecuadas para llevar a cabo la hidrólisis enzimática del complejo pigmento-proteína.
 - ☞ Analizar el contenido de astaxantina en las fracciones resultantes de la hidrólisis enzimática, y las obtenidas por ultrafiltración del hidrolizado del complejo pigmento-proteína.
 - ☞ Estudiar el peso molecular de la carotenoproteína y los péptidos resultantes de la hidrólisis.
 - ☞ Realizar una evaluación del poder antioxidante de la mezcla BHA:BHT y aceite esencial de romero, expresado en la conservación de astaxantina en los extractos.

4. HIPÓTESIS

- ✧ La fermentación láctica de residuos de camarón estabiliza la estructura de la astaxantina y solubiliza lipoproteínas que atrapan a los pigmentos, provocando un aumento en la cantidad de astaxantina recuperada en la extracción.
 - ✧ El sistema de solventes más adecuado para la extracción de pigmentos es el que tiene la mayor naturaleza no-polar.
 - ✧ El pigmento astaxantina está asociado a una proteína de alta densidad (HDL), las cuales generalmente son de alto peso molecular. El conocimiento del tipo de asociación y características de la proteína permitirá encontrar el tratamiento más eficaz en la liberación y concentración del pigmento. La hidrólisis del complejo pigmento-proteína puede lograrse mediante el empleo de proteasas.
 - ✧ El aceite esencial de romero protege a la astaxantina de la oxidación.
-

5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

5.1 Generalidades del camarón

El camarón (*Penaeus sp.*) es un organismo artrópodo mandibulado con dos pares de antenas, branquias, caparazón, cinco pares de piernas "caminadoras" y cinco pares de piernas "nadadoras" (figura 1). Presenta como característica principal un exoesqueleto de origen quitinoso, secretado por la epidermis como calcificación posterior. En su exoesqueleto se evidencia más la segmentación del cuerpo, el cual se divide en tres regiones principales: cefalotórax, abdomen y telson (Ruello, 1976).

Dentro de las especies de camarones más comunes e importantes en las costas y mares de nuestro país se encuentran: *P. stylirostris*, *P. vanammei*, *P. californiensis* y *P. aztecus*; el primero de ellos mejor conocido como camarón azul, las tres primeras especies se encuentran a lo largo del Océano Pacífico, principalmente en Sinaloa,

Sonora, Baja California Sur y Nayarit; y en el Golfo de México, en estados como Veracruz, Tabasco, Campeche y Tamaulipas) se localiza el *Penaeus aztecus* o camarón café (SEMARNAP, 1994).

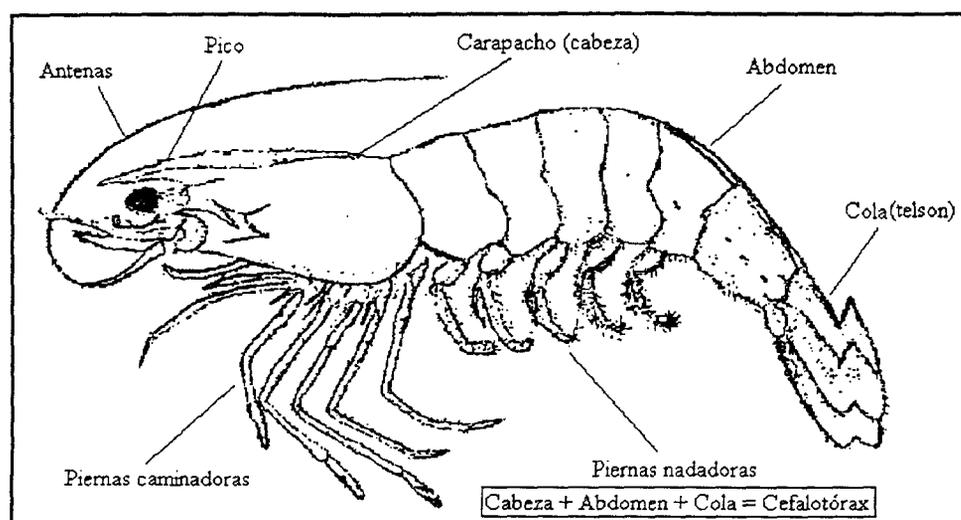


Figura 1. Partes del camarón.

Fuente: Ruello, 1976.

5.1.1 Composición química

El camarón es altamente nutritivo, en general su valor calórico es de alrededor de 4.5 kJ/g, contiene entre 75 y 80% de agua, 18-20% de proteína y cerca de 1% de grasa (tabla 1).

Tabla 1. Composición del camarón (100 g de porción comestible).

Componente	Cantidad
Agua (g)	78.2
Proteína (g)	18.1
Grasa (g)	0.8
Carbohidratos (g)	1.5
Calorías (cal)	91.0
Calcio (mg)	63.0
Fósforo (mg)	166.0
Hierro (mg)	1.60
Tiamina (mg)	0.02
Niacina (mg)	3.20
Riboflavina (mg)	0.03

Fuente: Charley, 1987.

En la tabla 2 se presenta la composición química del cefalotórax del camarón.

Tabla 2. Composición del cefalotórax de camarón.

Componente	% base seca
Proteína cruda	47.70
Cenizas	26.86
Fibra cruda	19.35
Grasa	4.63
Carbohidratos asimilables	2.47

Fuente: Agricultural Handbook, 1975.

Entre la fracción de lípidos se encuentran, además de las sustancias liposolubles responsables del aroma y sabor típicos del camarón, unos pigmentos liposolubles de tipo carotenoide, responsables en parte del color que presenta el camarón o presentará luego de su cocción (Mathur y Narang, 1990).

Las conchas y caparazones de muchos crustáceos, entre ellos el camarón, contienen proteínas, lípidos, pigmentos y un biopolisacárido llamado quitina, ampliamente utilizado en la industria, especialmente alimentaria y farmacéutica (Mathur y Narang, 1990).

5.1.2 Producción

Actualmente, la producción nacional de camarón rebasa las 80,000 toneladas métricas (TM), de las que un 40% se distribuye para consumo nacional y el restante 60% es exportado. De 1992 a 1993, la producción de camarón pasó de 66,210 a 73,417 TM, cantidad que representó un incremento del 11% aproximadamente y que en ese año le permitió a México obtener ingresos por cerca de 240 millones de dólares por exportaciones (SEMARNAP, 1993).

Las grandes cantidades de camarón producidos en México en los últimos años (en 1994 se produjeron 59,483 TM en peso desembarcado y 13,138 TM en peso vivo por acuicultura) (SEMARNAP, 1995) y en función de que solamente se utilizan para el consumo humano las colas, el desperdicio representa un grave problema de contaminación debido a su degradación lenta (figura 2).

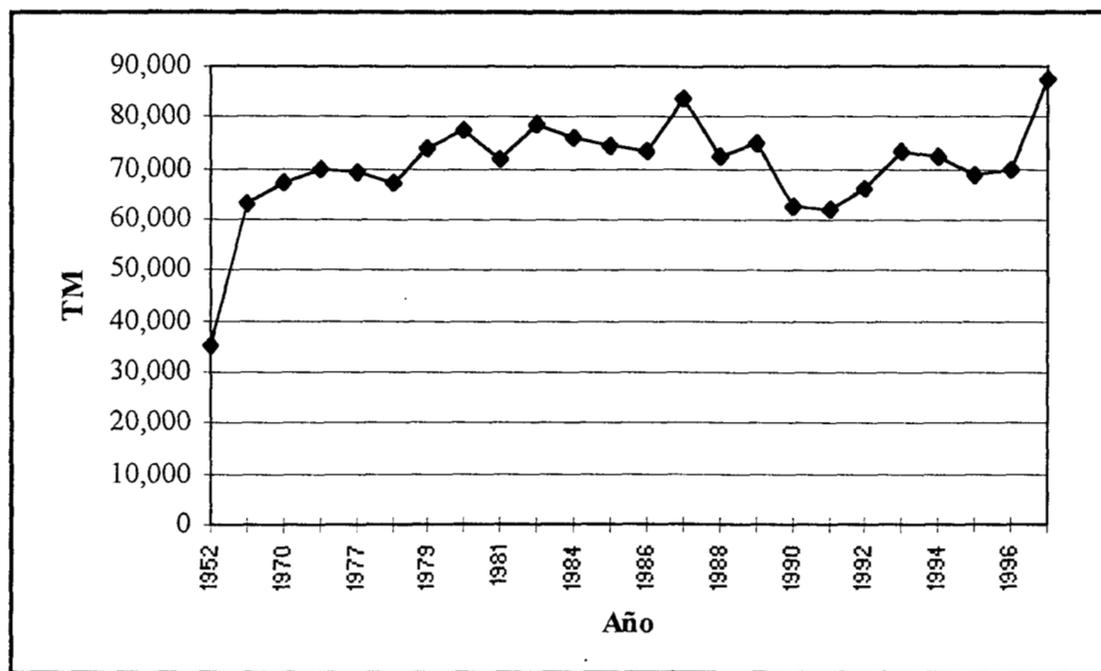


Figura 2. Cifras estimadas de la producción de camarón en el intervalo 1952-1997.
Fuente: SEMARNAP, 1997.

5.1.3 Subproductos

Debe mencionarse que sólo el 55% del animal es comestible y que el porcentaje restante está constituido por el cefalotórax, mejor conocido como la cabeza, que no es comestible y representa cerca de 35,000 TM anuales de desperdicios, que no son aprovechados y representan una fuente de contaminación, tanto en las zonas de su captura, como en tierra en las granjas camaronícolas (SEMARNAP, 1997).

1.2. Pigmentos

Los colores de los alimentos se deben a distintos compuestos, principalmente orgánicos, algunos producidos durante su manejo y procesamiento, y otros de origen natural o sintéticos que son añadidos. En términos generales, los pigmentos relacionados con los alimentos se dividen en ocho tipos: 1. Carotenoides; 2. Clorofilas; 3. Antocianinas; 4. Flavonoides; 5. Betalaínas; 6. Taninos; 7. Hemopigmentos y; 8. Otros

Los seis primeros se encuentran fundamentalmente en productos vegetales, aun cuando llegan a estar presentes en derivados de origen animal; esto ocurre cuando en la dieta de los animales se incluyen vegetales ricos en dichos pigmentos. Los carotenoides también se encuentran en crustáceos y algunos microorganismos como levaduras y algas (Badui, 1993; Simpson, 1983).

Los animales no pueden sintetizar carotenoides, sin embargo, en los años setentas se descubrió que los camarones *Penaeus* son capaces de convertir los carotenoides ingeridos en su dieta en uno muy específico conocido como astaxantina (Schiedt y col., 1993). D'Abramo y col. (1983) realizaron estudios con la pigmentación de langosta, observando que a partir de ciertos carotenoides que se encontraban en la dieta, como el β -caroteno, el crustáceo era capaz de sintetizar astaxantina y depositarla en su exoesqueleto.

Hay un gran interés alrededor del mundo por el desarrollo de colorantes a partir de fuentes naturales. El aumento de patentes expedidas ha aumentado considerablemente entre los años de 1969 y 1984. Los colorantes naturales tienen un mayor interés comparándolos con los sintéticos, esto puede observarse en el número de patentes, 356 de los primeros por tan sólo 71 de los sintéticos. Japón tiene la mitad de estas cifras y en un distante segundo lugar se encuentra Estados Unidos de Norteamérica (Francis, 1987).

5.2.1 Color

El mundo que nos rodea tiene color y con base en éste se identifican muchas de las propiedades de los alimentos; de hecho el color es el primer contacto que tiene el consumidor con los productos y posteriormente los juzga por su textura, sabor, etc. (Badui, 1993).

El color es una propiedad de la materia directamente relacionada con el espectro de la luz y que, por tanto, se puede medir físicamente en términos de su energía radiante o intensidad, y por su longitud de onda. El ojo humano sólo puede percibirlo cuando su energía corresponde a una longitud de onda que oscila entre 380 y 780 nm; de ahí que una definición de color sea: la parte de la energía radiante que el humano percibe mediante las sensaciones visuales que se generan por la estimulación de la retina del ojo (Kanner, 1978).

5.2.2 Carotenoides

5.2.2.1 Generalidades

La estructura química básica de la mayoría de estos compuestos es poliénica de 40 átomos de carbono, formada por ocho unidades de isopreno, cuyo arreglo se hace inverso en el centro, y pueden ser de cadena lineal o tener ciclizaciones en los extremos. El nombre genérico deriva de la zanahoria, *Daucus carota*, ya que fue de esta hortaliza de donde se aislaron por primera vez (Anónimo, 1986).

Los carotenoides ofrecen generalmente colores rojos, anaranjados, o amarillos, e incluyen al caroteno, el cual es abundante en las zanahorias. Estos compuestos se componen de dos anillos de seis átomos de carbono conectados por una cadena hidrocarbonada. Como resultado de su naturaleza química, son insolubles en agua y

la mayoría se encuentran unidos a las membranas de las células. Los carotenoides no pueden transferir directamente la energía del sol a la ruta fotosintética, pero pueden pasar la energía absorbida a la clorofila. Por esta razón, estos compuestos son llamados pigmentos de complemento. Un ejemplo de este tipo de carotenoides es la fucoxantina que se encuentra en algas (Internet A y B, 1996).

Se han dividido en dos grandes grupos de acuerdo con su estructura química: carotenos y xantofilas (figura 3). Los primeros tienen características de hidrocarburos, son muy solubles en éter de petróleo y poco solubles en etanol; destacan entre estos los α , β y γ -carotenos y el licopeno. Por su parte, las xantofilas son la forma oxidada de las anteriores, se presentan como ácidos, aldehídos o alcoholes y son solubles en etanol, metanol y éter de petróleo; ejemplo de estos compuestos son la fucoxantina, la luteína y la violaxantina. Ambos grupos le deben su color a la conjugación de los dobles enlaces, así como a los anillos extremos si están presentes. En estado natural, las insaturaciones tienen una configuración *trans* y en algunos casos se presentan isomerizaciones *cis*. Las modificaciones de estas estructuras provocan cambios muy notorios en el color (Badui, 1993).

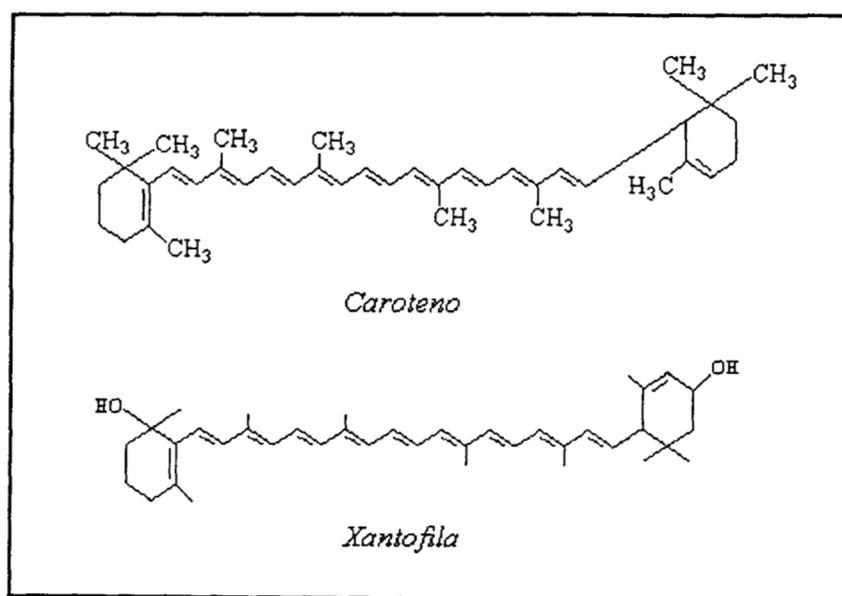


Figura 3. Estructura química de caroteno y xantofila.

Fuente: Badui, 1993.

5.2.2.2 Estabilidad

Debido a su estructura insaturada, los carotenoides están sujetos a muchos cambios químicos inducidos por las diferentes condiciones de procesamiento (principalmente por las altas temperaturas, las radiaciones electromagnéticas y el oxígeno). Su oxidación se acelera con el calor mediante un mecanismo semejante al de la autooxidación de las grasas insaturadas; la reacción se cataliza con la presencia de los metales de transición, hierro y cobre, por la luz y la disponibilidad del oxígeno. De igual manera, las enzimas, principalmente las lipoxigenasas, llevan a cabo esta transformación (Ishiwara, 1980).

Estas reacciones de deterioro se pueden controlar con la adición de antioxidantes como butilhidroxianisol y butilhidroxitolueno, o de secuestradores como los ácidos ascórbico, cítrico y etilendiaminotetracético (Badui, 1993).

5.2.2.3 Función biológica

Existe una gran similitud entre las estructuras químicas de la vitamina A y la de algunos carotenoides; los que tienen un anillo de β -ionona presentan actividad biológica de provitamina A, ya que la mucosa intestinal de los animales superiores los oxida y los transforma en retinal (Ganguly y Sastry, 1985). Entre los compuestos que tienen esta característica está el β -caroteno en primer término. Los carotenoides biológicamente activos son los que tienen todas sus insaturaciones en posición *trans*, ya que la isomerización a *cis* reduce la disponibilidad como precursor de la vitamina A (Sweeney y Marsh, 1971).

Cabe indicar que los carotenos, además de servir como precursores de la vitamina A en el organismo humano, también cumplen una función biológica protectora contra

la formación y la acción de los radicales libres. Los rayos ultravioleta, el humo de cigarro, el aire contaminado, etc., producen diversas moléculas altamente reactivas que son capaces de generar distintos radicales libres, los que a su vez llegan a dañar las células; se considera que algunos de los problemas que causan son las enfermedades crónicas del corazón y de los pulmones, así como artritis y cáncer; incluso algunos autores relacionan el proceso de envejecimiento con la producción de radicales libres (Badui, 1993).

5.2.2.4 Fuentes

Los pigmentos carotenoides existen en forma libre disueltos en la fracción lipídica del tejido vegetal, formando complejos con proteínas, unidos a hidratos de carbono por medio de un enlace glucosídico, o como ésteres de ácidos grasos; la asociación con proteínas los hace más estables e incluso provoca un cambio de color de manera individual (Simpson, 1983).

Los crustáceos muestran bellos y variados colores (azul, verde, púrpura, rojo y anaranjado) junto con un sombrío color negro y café, esto debido a los pigmentos carotenoides, los cuales se pueden encontrar en forma libre, pero más comúnmente como carotenoproteínas (Kennedy, 1979).

5.2.3 Astaxantina

5.2.3.1 Características generales

La astaxantina es un compuesto intensamente colorido perteneciente al grupo de los carotenoides, se encuentra de forma natural en la dieta de varias especies acuáticas, incluyendo salmón, trucha, camarón, peces ornamentales y varios crustáceos. Este

compuesto es el responsable del color de la carne del salmón rosado. En la naturaleza, la astaxantina junto con otros pigmentos, es sintetizada sólo por microalgas y levaduras y después pasa a ser parte de la cadena alimenticia. Los salmones y otros animales acuáticos no pueden sintetizar estos compuestos y tienen que adquirirlos a través de su alimento (Internet C, 1998).

La deficiencia de pigmentos carotenoides en camarón cultivado en granjas camaronícolas se refleja en la enfermedad conocida como "síndrome del color azul" que se observa en camarón tigre. La inclusión de astaxantina en niveles de 50 ppm puede solucionar este problema después de un mes de alimentación (Menasveta y col., 1993).

La astaxantina (figura 4) produce un color rojo-anaranjado; basándose en métodos analíticos, son tres sus estereoisómeros los que forman una mezcla racémica, nombrados como (3R, 3'R), (3R, 3'S; *meso*), y (3S, 3'S) en aproximadamente una relación de 1:2:1. Estos compuestos fueron observados en varias especies de camarón así como en otros crustáceos. Cuando la cantidad de astaxantina es menor comparada con otros pigmentos que tienen un mayor grado de oxidación se observa una tendencia al color amarillo (Schiedt, 1993).

La degradación del éster de astaxantina es un proceso de autooxidación que empieza lenta y se propaga rápidamente (Chen y Meyers, 1982b).

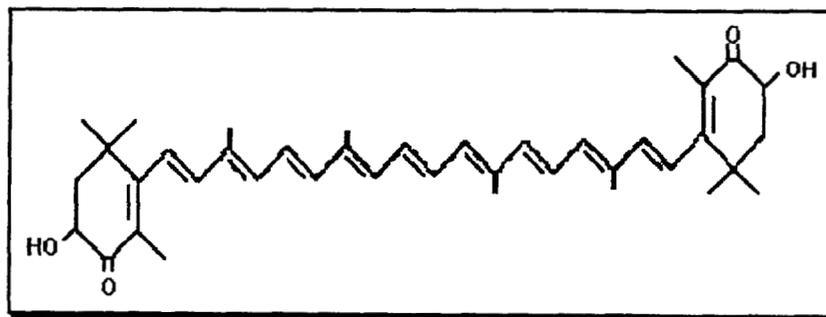


Fig. 4. Estructura química de la astaxantina.

Fuente: Schiedt, 1993.

5.2.3.2 Residuos de crustáceos como fuente natural de pigmentos

La astaxantina es el mayor carotenoide en muchos crustáceos, y esta presente en forma libre, esterificada o formando complejos con proteínas. Se han desarrollado métodos de extracción de carotenoproteínas a partir de residuos de camarón (*Pandalus borealis*), estos residuos se han incluido en raciones en la dieta de peces para su pigmentación. Los niveles de astaxantina en el alimento formulado a partir de residuo de camarón se encuentran entre 0-200 mg/Kg, dependiendo de la calidad del residuo, la especie, el método de secado empleado y de los antioxidantes agregados. Debido a los contenidos variables de carotenoides y los altos costos del proceso de secado, el alimento a base residuo de camarón se ve limitado (Torrissen y col., 1989).

En crustáceos, los carotenoides se acumulan en el carapacho como carotenoproteínas, variando la apariencia de un color azul tenue a un rojo suave, este fenómeno en su medio natural sirve como medio de protección de algunas especies (Schiedt, 1987).

El camarón del género *Penaeus* perteneciente al grupo de los decápodos es el crustáceo más abundante, el carotenoide más abundante acumulado en su caparazón es la astaxantina; se encuentra unido a una proteína, formando el complejo conocido como carotenoproteína, el cual es soluble en agua y puede variar en color, desde el azul hasta el verde o café. Sólo después del cocinado o la extracción con solventes, la astaxantina liberada en gran parte adquiere un color típicamente rojo-anaranjado (Schiedt y col., 1993).

Entre los componentes del cefalotórax de camarón se encuentran otros pigmentos carotenoides con estructuras muy similares que globalmente se conocen como astaxantinas (Foss y col., 1984). Otro carotenoide presente es el astaceno, considerado

como el producto oxidado de la astaxantina (Meyers y Bligh, 1981; Chen y Meyers, 1982a). Todas estas astaxantinas pueden estar esterificadas o unidas a una proteína (Torrissen y col., 1989).

La unidad proteica con el grupo cromóforo, se encuentra principalmente en decápodos. La desnaturalización del complejo caroteno-proteína por calentamiento resulta en un cambio marcado de color que va del verde-oscuro a un rojo brillante, el cual se observa en el cocinado de cangrejos (Menasveta y col., 1993).

Por otra parte, los carotenoides presentes en el camarón están combinados con los grupos amino de la quitina mediante enlaces de tipo base de Schiff (Torrissen y col., 1989).

Los desperdicios de crustáceos consisten en el caparazón y la carne adherida a este, las vísceras y la cabeza. Los principales componentes del exoesqueleto son la quitina, la proteína residual, y las astaxantinas, siendo estas la fuente natural de los pigmentos para los salmónidos en estado salvaje. Estos pigmentos se utilizan principalmente para conferir color a muchas especies acuícolas como truchas arcoiris y salmones, aumentando así su valor comercial. El origen natural de este pigmento, ha llamado poderosamente la atención, siendo actualmente sujeto de numerosas investigaciones con el fin de elevar su aprovechamiento (Meyers, 1977; Simpson y Haard, 1985).

Cuando se emplea residuo de camarón como alimento de especies acuícolas para su coloración, el nivel de pigmentos presentes puede ser el factor limitante, los precios de los alimentos empleados dependen de su concentración de carotenoides (Anónimo, 1992).

Otro problema para la utilización de residuos de camarón en alimentos comerciales para pigmentar lo constituye la variación en el contenido de astaxantina, esto depende de muchos factores como la temperatura antes de la captura, el grado de maduración sexual del crustáceo, etc. Son necesarias investigaciones en períodos mayores de seis meses para establecer la mejor estrategia para obtener la mayor uniformidad posible en las cantidades de astaxantina recuperada (Guillou y col., 1995).

Se han realizado numerosos estudios para evaluar la utilización de los desechos de la industria conservera como fuentes pigmentantes para las empresas salmoneras. Estos esfuerzos han resultado infructuosos porque los desechos presentan un alto contenido de humedad, cenizas y quitina, bajo contenido de proteínas y una concentración variable de pigmento (0 a 200 ppm de astaxantina), lo cual hace imposible su incorporación en dietas balanceadas peletizadas. Por lo tanto, estos desechos de crustáceos no pueden ser empleados directamente en el cultivo comercial de salmónidos (Torrissen y col., 1989).

Harinas y extractos de aceites de crustáceos que contienen carotenoides también han sido investigados con resultados variables, que ha dependido del contenido de pigmento en los desechos y del método con el cual estos pigmentos han sido extraídos. El uso de estas fuentes pigmentantes depende de los costos de producción implicados, y del nivel y la disponibilidad de la astaxantina presente en ellos. Hay procesos de extracción que producen isómeros y derivados de astaxantina, que no pueden ser absorbidos por los salmónidos. El aprovechamiento de estos productos como fuentes de pigmentos para la industria salmonera de cultivo no ha sido posible (Torrissen y col., 1989).

Existe un problema de absorción de las astaxantinas en el aparato digestivo del pez. El grado de fijación del pigmento determina la preferencia de los consumidores por el pigmento natural sobre el sintético (Choubert y Luquet, 1983).

5.2.3.3 Otras fuentes de astaxantina

La levadura *Phaffia rhodozyma* tiene un valor comercial potencial como fuente natural de astaxantina en las dietas en acuicultura porque tiene un alto contenido de este pigmento (Johnson y col., 1978).

Meyer y col. (1994) realizaron estudios sobre la producción de astaxantina por *Phaffia rhodozyma*, encontrando concentraciones entre 1554-1883 $\mu\text{g/g}$, esta cantidad sólo se logra agregando un monoterpeno, α -pinene, como precursor en el medio de cultivo (500 $\mu\text{l/l}$).

Se ha obtenido astaxantina fermentando jugo de uva con *Phaffia rhodozyma* alcanzándose entre 1350-2120 $\mu\text{g/g}$ del pigmento dependiendo de la fase de crecimiento en que se encuentre la levadura (Meyer y Preez, 1994).

El alga verde unicelular *Haematococcus pluvialis* puede también sintetizar astaxantina, la cual puede ser empleada como fuente de pigmentación de especies en acuicultura (Miki, 1991). Tjahjono y col. (1994) estudiaron la hiperacumulación de astaxantina en algas verdes a distintas temperaturas, observando que la mayor producción del pigmento (22.6 mg/l) se presentaba a los 33°C.

A pesar de las altas cantidades relativas de astaxantina producida por algas y levaduras, su empleo en acuicultura se ha visto limitado debido a que la fijación del pigmento en el músculo del salmónido no es muy buena, requiriéndose mayores cantidades de fuente pigmentante para lograr el mismo efecto que el alcanzado con pigmentos obtenidos de residuos de crustáceos (Johnson y col., 1980; Storebakken, 1992).

La mayor parte de la astaxantina producida por microorganismos, levaduras y algas, tiene la característica de estar diesterificada, lo que ocasiona que sea más fácilmente hidrolizada en el intestino del pez, no alcanzando a absorberse en el músculo del mismo. Esta es una diferencia fundamental con la astaxantina encontrada en crustáceos, ya que en esta fuente el pigmento se encuentra monoesterificado, lo que disminuye en gran proporción su grado de hidrólisis a nivel intestinal (Torrissen y col., 1989; Storebakken, 1992).

5.2.4 Aplicaciones generales

Entre otras aplicaciones de las astaxantinas, se puede mencionar su empleo como indicadores de las condiciones de procesamiento, almacenamiento y calidad de los camarones (Kelley y Harmon, 1972), debido a que el color se altera fácilmente en condiciones adversas.

La industria emplea diferentes materiales sintéticos y naturales para colorear los alimentos y así hacerlos más aceptables para el consumidor. Los pigmentos naturales generalmente son elementos constitutivos de la materia prima. En algunos casos se emplea un extracto de estos pigmentos, secado y molido, como agente colorante (Badui, 1993).

El uso de colorantes sintéticos en la industria alimentaria es cada vez más riguroso en lo referente a la forma de obtención del pigmento, el argumento principal es el relacionado a toxicidad. Esto plantea un cuestionamiento inminente a los colorantes sintéticos, ocasionando la reducción de lista de los permitidos, por lo tanto, la tendencia cada vez mayor es hacia el uso de pigmentos naturales (Givertz y Joseph, 1974).

La cantaxantina es un colorante natural perteneciente al grupo de los carotenoides y se usa ampliamente para la coloración de diferentes tipos de alimentos. Su color se

asemeja al de la mioglobina, el pigmento natural de la carne y se puede usar convenientemente para la coloración de los productos cárnicos (Anónimo, 1995), entre los productos que tradicionalmente se colorean se incluyen salchichas, especialmente de los tipos "Frankfurter" y "Strasbourg", y salami.

La cantaxantina es resistente al calor, por esta razón se puede usar en carnes curadas, como salchichas, así como en productos a base de carnes frescas (hamburguesas) (Anónimo, 1995).

La tendencia hacia el empleo de colorantes naturales, también están teniendo un creciente empleo en la industria mundial de cosméticos, en especial los que producen tonalidades rojas-anaranjadas, como la astaxantina (Pszczola, 1998).

La astaxantina mejora funciones biológicas importantes en salmónidos como la reproducción y circulación sanguínea; además, de una forma similar al β -caroteno, puede ser precursor de la vitamina A, y tiene propiedades antioxidantes. Por estas razones este pigmento se clasifica dentro del grupo de las sustancias conocidas como nutraceuticos, las cuales encuentran su aplicación principal en farmacia por su contribución al mejoramiento de la salud (Oshima, 1998; Molyneaux y Lee, 1998).

5.2.5 Pigmentación de salmónidos

Considerando que las astaxantinas son los principales carotenoides en muchas especies acuáticas y que no pueden ser sintetizadas por truchas, salmones y otros animales, es necesario incluirlos en su dieta (Chen y Meyers, 1982a; Foss y col., 1984).

La mayor parte de los pigmentos que producen un color amarillo/rojo y que se utilizan para la coloración del músculo de especies salmónidas son carotenoides. Estos carotenoides son absorbidos en la dieta y depositados en el cuerpo del pez

(Spinelli y Mahnken, 1978; Simpson, 1979; McCallum y col., 1987). Choubert y Luquet (1983) encontraron que la astaxantina esta libre en el tejido muscular de los peces, mientras que en la piel esta fija y en forma de diéster.

Numerosos trabajos han demostrado la viabilidad de la incorporación de cantaxantina sintética o de la astaxantina natural en el alimento o extracto de aceite dentro de varias formulaciones de dieta para la coloración efectiva de salmónidos y crustáceos (Chen y col., 1984)

5.2.5.1 Propiedades químicas

De acuerdo a Castro y Sepúlveda (1994), los pigmentos presentes en los salmónidos tienen las siguientes características:

- 1) Pertenecen al grupo de los carotenoides al igual que los carotenos. Sin embargo, se diferencian de estos por contener oxígeno en su molécula y consecuentemente presentar una mayor polaridad.
- 2) Corresponden a derivados terpénicos caracterizados por poseer una cadena alifática que presenta un sistema de dobles enlaces conjugados, grupos metílicos insertados y grupos hidroxílicos y cetónicos que les permiten diferenciarse de otros carotenoides.
- 3) La presencia de los dobles enlaces les confieren las siguientes propiedades:
 - Presentan una gran capacidad de absorbanca entre los 400 y 500 nm del espectro electromagnético y de absorber energía luminosa.
 - Tienen la posibilidad de formar estereoisómeros *cis* y *trans* y por lo tanto, de poder reorganizarse molecularmente formando innumerables derivados con diferentes valores pigmentantes.
- 4) Son solubles en aceites y presentan una solubilidad media en acetona, dimetil sulfóxido, metanol, etc.

5.2.5.2 Ventajas del uso de astaxantina

Ha sido demostrado que la adición de astaxantina en las dietas de salmónidos tiene una influencia en la apariencia visual y otros efectos biológicamente significativos, como el papel que tiene como probiótico, debido a que ayuda a la reproducción de especies acuícolas (Chen y Meyers, 1983).

La cantaxantina era frecuentemente usada para la pigmentación de salmónidos, ahora este pigmento es reemplazado en muchos casos por la astaxantina, con menor grado de oxidación, y que es el mayor pigmento en el salmón salvaje (Henmi y col., 1987).

La astaxantina en su forma libre, esterificada o formando complejos con proteínas es el carotenoide más abundante en los crustáceos, siendo estos la fuente natural de pigmentos para los salmónidos silvestres. Las determinaciones visuales, instrumentales y químicas revelan que los isómeros ópticos individuales de la astaxantina son más eficaces que la cantaxantina en la pigmentación del músculo de peces en acuicultura (*Salmo gairdneri*) (Foos y col., 1984; Schiedt y col., 1985; Skrede y Storebakken, 1986).

Skrede y col. (1989), estudiaron por separado el efecto de la astaxantina y de la cantaxantina en el color de la trucha arcoiris (*Onchorynchus mykiss*) usando análisis sensorial e instrumental. Observaron que con la astaxantina se obtenía un menor efecto de blancura, alta cromaticidad y mayor intensidad en el color rojo en la carne de la trucha, concluyendo que la astaxantina es la mejor opción para la pigmentación de esta especie de salmónido.

La estimación visual de los valores de pigmentación de la astaxantina evaluadas en la escala de color, han sido correlacionados con la determinación química. Foss y col.

(1984) encontraron la existencia de tres isómeros de astaxantina (3S, 3'S), (3R, 3'S) y (3R, 3R), en una mezcla 1:2:1. Las determinaciones visuales y químicas revelaron que los isómeros ópticos de la astaxantina son más eficaces que la cantaxantina en la pigmentación del músculo de la trucha arcoiris (*Salmo gairdneri*)

En el salmón y la trucha, la astaxantina protege los huevos de los daños por radiación ultravioleta ayudándolos a sobrevivir, aumentando la velocidad de crecimiento de los juveniles. La astaxantina también cumple un papel muy importante en la respiración, visión, y actúa como precursor de la vitamina A. También es posible que tenga un efecto benéfico en el sistema inmunológico (Internet A, 1998).

5.3 Ensilados

El ensilado es un proceso de conservación mediante el uso de ácidos que previenen el crecimiento de microorganismos patógenos. De acuerdo al tipo de acidificación existen dos tipos de ensilados, el que se realiza con una adición de ácidos minerales u orgánicos, o ensilado químico, y el que se conoce como ensilado fermentado o fermentación láctica (Hall y De Silva, 1994).

● *Ensilado de pescado*

El ensilado de pescado puede ser definido como el producto líquido formado por la acción natural de enzimas proteolíticas en todas las partes del pescado preservándolo en condiciones ácidas (Hall y col., 1985a). Varios aspectos de la producción de ensilados y su empleo en la alimentación animal son revisados por Raa y Gildberg (1982).

Los métodos orientales tradicionales para preservar el pescado y otras especies de animales acuáticos se usan con varias combinaciones salinas, de secado y

fermentación microbiana, que incluyen algunos períodos de almacenamiento anaerobio. Es importante distinguir los procesos microbianos de los no microbianos para evaluar las ventajas y desventajas que cada uno de ellos ofrece según sea el objetivo del ensilado (Adnan y Owens, 1984).

- **Ensilado de residuos de crustáceos**

El tratamiento de ensilado protege a la astaxantina extraída de los residuos de crustáceos de las temperaturas altas en procesos posteriores, aumentando considerablemente su rendimiento (Chen y Meyers, 1983). Esto puede demostrarse en la mayor acumulación de este pigmento en el músculo de la trucha al emplear como alimento residuos de camarón ensilados (Anónimo, 1992).

La razón por la cual el ensilado mejora la digestibilidad de la astaxantina no es conocida, pero la solubilización de la estructuras formadas por calcio en el carapacho, conocidas como vesículas, pueden aumentar la cantidad de astaxantina disponible para la extracción y su posterior captación en el sistema digestivo del pez (Torrissen y col., 1981).

5.3.1 Ensilado químico

El tratamiento del ensilado con ácido propiónico o ácido sulfúrico en estudios de planta piloto ha mostrado que se incrementa la eficiencia de extracción de pigmentos entre un 15-18% comparado con la extracción directa de los residuos de crustáceos frescos (Chen y Meyers, 1983).

Ha sido demostrado que la astaxantina es estable en el proceso de ensilado ácido de residuo de camarón, siendo más lenta su degradación a diéster o su correspondiente monoéster. La digestión de astaxantina, proveniente de residuos ensilados, en trucha arcoiris, es del 71% comparado con un 45 % de astaxantina de residuos frescos.

También la velocidad de acumulación del pigmento en el músculo del pez es significativamente más alta con el alimento ensilado en esta forma (Torrissen y col., 1981).

El tratamiento de ensilado ácido comprende el uso de cantidades predeterminadas de ácidos de grado industrial, como lo es el ácido propiónico o el ácido sulfúrico grado laboratorio. Estos son agregados al residuo de crustáceos hasta llegar a un pH de 5.0-5.5. Después de efectuada la hidrólisis se extrae el pigmento con aceite de soya puro (Omara-Alwala y col., 1985).

Dentro de los métodos químicos para la extracción de pigmentos se ha empleado una mezcla de ácidos propiónico y fórmico (1:1), o en otros casos sólo ácido propiónico (Chen y Meyers, 1983).

El ensilado ácido de pescado es preparado por autólisis completa del pescado o sus partes disminuyendo el valor de pH para producir un líquido que puede ser empleado para alimentación animal (Backhoff, 1976). Generalmente en este ensilado químico se emplea al ácido fórmico, en proporción del 3% (p/p), como agente para la disminución del pH hasta valores de 4 o menos aunque también se utiliza una mezcla de ácidos fórmico y propiónico. El inconveniente en el empleo de ácidos minerales para el ensilado es que al ser ácidos fuertes, posteriormente se presentan problemas de contaminación por el efluente o subproducto del propio ensilado (Owens y Mendoza, 1985).

Torrissen y col. (1981) reportan la preparación del ensilado mezclando el residuo de camarón con 4.8% (v/p) o 50 % (v/v) de ácido sulfúrico, 1.2% (v/p) de ácido propiónico y 100 mg/Kg del antioxidante BHT, hasta llegar a un pH de 4 en el líquido. Este ensilado fue congelado y almacenado a 4-5°C por 14 días, y las muestras fueron destinadas a la preparación de dietas experimentales.

Guillou y col. (1995), realizaron ensilados ácidos con 10 Kg de residuos de camarón (*Pandalus borealis*), 12% (v/p) ácido sulfúrico al 60%, 6% (v/p) ácido fosfórico concentrado y 1% (v/p) ácido propiónico, además una combinación 1:1 (p/p) de BHT/ethoxyquin^{MR} para prevenir la oxidación de los carotenoides; las mezclas fueron almacenadas en cubos de plástico por 14 semanas a 5-10°C y cada semana se realizó una buena homogenización. Se encontró que el pH llegaba a disminuir hasta valores de 1.7, con una mayor cantidad de astaxantina en los residuos de camarón que fueron ensilados (Tabla 3).

Tabla 3. Concentración de astaxantina (mg/Kg en base húmeda) de residuo de camarón ensilado y no ensilado.

Tratamiento	Astaxantina total	% Diésterificada	% Monoésterificada	% Libre
Residuo no Ensilado	30.9 ± 1.3	18.5 ± 1.0	75.9 ± 2.4	5.6 ± 2.2
Residuo ensilado	35.8 ± 0.6*	20.4 ± 1.1	76.1 ± 1.6	3.5 ± 0.4

*Diferencia significativa ($P < 0.05$)

Fuente: Guillou y col. (1995).

El tratamiento de ensilado ácido con la adición de los adecuados antioxidantes y una efectiva disminución del pH proveen de una protección muy eficiente contra la degradación de la astaxantina en residuos de camarón, aún después de 3 meses del almacenamiento-ensilado. Esta técnica puede emplearse económicamente para preservar el residuo de camarón durante el almacenamiento y transporte antes de ser incorporado en los alimentos de peces, o bien antes de la extracción de productos con alto valor agregado como astaxantina, lípidos, proteínas y quitina/quitosana (Guillou y col., 1995).

5.3.2 Fermentación láctica

Mackie y col. (1971) definen a la fermentación como la transformación de sustancias orgánicas en compuestos simples por la acción de enzimas o microorganismos.

La fermentación ácido láctica, es uno de los métodos ancestrales para preservar alimentos, por medio de esta también se logran mejoras de las propiedades sensoriales y nutricionales. Las fermentaciones lácticas son aquellas en que el ácido es producido *in situ* por bacterias lácticas a partir de una fuente de carbohidratos, los microorganismos responsables pueden pertenecer a la microflora natural o ser cultivos iniciadores (Frazier, 1993).

En el método de fermentación, el pescado o desperdicio de pescado es preservado y parcialmente digerido por el ácido láctico producido, un pH de 4-4.5 es suficiente. Es necesario para la fermentación agregar carbohidratos fermentables como las melazas. Se prefiere el ensilado biológico debido a que no se desarrolla un olor a rancidez en los productos (James y col., 1977).

La fermentación en pescado ha sido aplicada, en un principio de forma artesanal, sirviendo como antecedente para el desarrollo de tecnología en países tropicales. El hecho de que el suministro de cabezas de camarón sea temporal o limitado geográficamente constituye un problema, y la solución es la práctica del fermentado-ensilado de estas cabezas para preservarlas. Los cambios significativos que ocurren durante el almacenamiento son la autólisis de los tejidos y liberación de amoníaco.

Fagbenro (1997) estudió el efecto del almacenamiento prolongado sobre la calidad química y nutricional de las cabezas de camarón fermentadas. Hasta después de siete días de iniciada la fermentación de las cabezas de camarón, la aireación no tiene efecto en la disminución del pH, ya que los valores promedio de pH son de 4.2 y 4.1 en los tratamientos aerobio y anaerobio respectivamente.

Los buenos ensilados no tienen ningún signo de contaminación por hongos y otras bacterias, pero después de 180 días se presenta un incremento gradual del pH desde 4 hasta 5. La estabilidad en el pH puede deberse a la acción amortiguadora de los

aminoácidos y otras sales sobre el ensilado o probablemente a la neutralización parcial del ácido por el calcio que proviene de los sedimentos de quitina (Hall y De Silva, 1994).

Después de 180 días el contenido de nitrógeno no proteico se incrementa gradualmente hasta un 50.1% del total del nitrógeno. También se observa una variación ligera en la humedad, la proteína cruda y el contenido de ceniza, pero el contenido de lípidos aparentemente se incrementa significativamente (Fagbenro, 1997).

5.3.2.1 Bacterias lácticas

La fermentación láctica es un proceso microbiano muy complejo en el cual una población de bacterias lácticas llega a ser la microflora predominante. Las bacterias lácticas son un grupo de microorganismos Gram (+), no esporulados y que tienen la característica por producir ácido láctico como producto principal durante la fermentación de carbohidratos (Frazier, 1993).

Las bacterias ácido lácticas son ampliamente empleadas en la preservación de alimentos y pueden contribuir al desarrollo del sabor. Los requerimientos nutricionales que estas tienen son exigentes porque necesitan la adición de varias vitaminas y aminoácidos para fermentar los carbohidratos. Aunque el pez contiene una baja cantidad de carbohidratos, han aislado bacterias lácticas de este, las cuales presentan menos exigencias nutricionales para su desarrollo (Schroder y col., 1980; Okafor y Nzeako, 1985).

Las bacterias lácticas han sido aisladas de varias muestras de alimentos del mar como camarón, pescado, alimentos del mar empacados al vacío como el surimi, y pescado almacenado bajo 100% de CO₂ a 5°C. Mauguin y Novel (1994) aislaron 86 diferentes

cultivos y se agruparon de acuerdo a su morfología celular, presencia o ausencia de ácido diaminopimelico en la pared celular, y la configuración del lactato. Cincuenta y cuatro cultivos pertenecieron al género *Lactococcus* y algunos de ellos exhibieron DNA homólogo con *L. lactis* subsp. *lactis*. Cuatro cultivos fueron identificados como *Lactobacillus plantarum*, ocho del género *Leuconostoc* y 16 pertenecientes al género *Carnobacterium*. Una bacteria facultativa heterofermentativa (*Lactobacillus*) y tres cultivos más no fueron identificados. El 47% de los cultivos aislados presentaron patrones similares de fermentación de carbohidratos, especialmente entre cultivos del género *Lactococcus* y *Carnobacterium*.

Balogun y Akegbejo-Samsons (1992) mencionan que fueron aisladas de camarón de Sri Lanka, por la Dra. Zainoha Zakaria, bacterias lácticas que pueden ser empleadas en los ensilados biológicos de los residuos de camarón y pescado.

5.3.2.2 Condiciones para la fermentación láctica

Las condiciones para que se desarrolle con seguridad la fermentación láctica dependen sobre todo de la rapidez de crecimiento y producción de ácido por parte de la bacteria láctica y la supresión, por la disminución del pH u otros factores antimicrobianos, de microorganismos competitivos. La mayor influencia en el crecimiento de bacterias lácticas y la velocidad con la cual decrece el pH de la fermentación son debidos a: (i) disponibilidad de carbohidratos fermentables; (ii) disponibilidad de factores orgánicos de crecimiento; (iii) anaerobiosis; (iv) temperatura; (v) concentración de cloruro de sodio; (vi) concentración de ácidos orgánicos y valor de pH; (vii) concentración de bióxido de carbono; (viii) producción de otros compuestos inhibitorios; (ix) capacidad de amortiguamiento del sustrato; (x) cantidad inicial de bacterias lácticas; y (xi) cantidad inicial de microorganismos competidores (Owens y Mendoza, 1985).

Fuente de carbohidratos. En pescado y crustáceos frescos es muy baja la cantidad de carbohidratos libres, por lo tanto es necesario agregar alguna otra fuente de carbono para la buena producción de ácido en la fermentación (Owens y Mendoza, 1985). Normalmente las bacterias lácticas requieren de un tiempo, según sea el tipo de azúcar, para fermentarlo, algunas bacterias para generar energía emplean al aminoácido L-arginina en presencia de bajas concentraciones de glucosa (Bauchop y Elsdén, 1960). Jonsson y col. (1983) aislaron el cultivo *Lactobacillus plantarum* de pescado, observando que esta bacteria llegaba a ser el cultivo dominante en el pescado almacenado.

Factores orgánicos de crecimiento. Las vitaminas, aminoácidos y otros de factores orgánicos de crecimiento son requeridos para el crecimiento de las bacterias lácticas, estos factores son disponibles en cantidades adecuadas a partir de los músculos del pescado y crustáceos.

Condiciones anaerobias. La pronta exclusión del oxígeno durante las etapas iniciales de la fermentación es un factor importante en la reducción del crecimiento de las bacterias Gram negativas, las cuales son contaminantes antes de que se establezcan las condiciones acidificantes. Es necesario el mantenimiento de las condiciones anaeróbicas, especialmente en la superficie, para impedir el crecimiento de microorganismos aerobios obligados, como hongos y levaduras, los que pueden tolerar las condiciones de acidez y desarrollarse, propiciando otra dirección en la fermentación, ya que se presenta una disminución en la cantidad de ácido orgánico y en consecuencia sube el valor de pH de la fermentación del material con serias implicaciones que repercuten en la calidad y seguridad del producto (Owens y Mendoza, 1985).

Temperatura. La temperatura puede ser considerada como un factor de influencia en la composición de la población microbiana y del sabor final de las fermentaciones naturales. Ciertamente, las temperaturas altas promueven el rápido crecimiento de

microorganismos indeseables, incluyendo los contaminantes y peligrosos para la salud, así como promover el crecimiento de las bacterias lácticas (Owens y Mendoza, 1985).

Concentración de sal. La sal tiene una doble función en la fermentación, disminuyendo el agua libre, y ayudando a las bacterias lácticas en la competencia con bacterias contaminantes y peligrosas. El efecto del cloruro de sodio sobre la microflora depende de la concentración en que esta sal se encuentre en la fase líquida, valor que usualmente es desconocido. Al no tener esta información es difícil estimar los efectos de la sal en la competición de las bacterias lácticas y otros microorganismos. Sin embargo, la presencia de cloruro de sodio en diversos tipos de fermentaciones lácticas de diversos alimentos sugieren que las concentraciones son suficientes para ayudar al crecimiento de las bacterias lácticas (Owens y Mendoza, 1985). Arroyo y col. (1978), investigaron el efecto de distintas concentraciones de sal (3, 6, 9 y 12%) (p/p) en la fermentación de mezclas de arroz-camarón y observaron la mejor acidificación a la concentración más baja de sal, pero no examinaron directamente los efectos en la microflora.

Concentración de ácidos orgánicos y valor de pH. El crecimiento de las bacterias lácticas es necesariamente acompañado por la excreción de ácido láctico y, en algunas circunstancias, de ácido acético (Kandler, 1983), y en consecuencia se disminuye el valor de pH en el medio. Las bacterias lácticas son excepcionalmente tolerantes a medios con bajo pH provocado por la presencia de ácidos orgánicos débiles. La toxicidad de estos ácidos orgánicos débiles se relaciona con su no disociación, lo cual se relaciona con el pKa del ácido y el valor del pH del sistema. Por lo tanto, para que la inhibición en alimentos sea efectiva sobre los microorganismos contaminantes y peligrosos para la salud, es importante que el valor de pH en la fermentación pueda llegar rápidamente a los niveles a los cuales la proporción de la forma del ácido no disociado presente sea significativa. El pKa del ácido láctico es de 3.87 (Owens y Mendoza, 1985).

Concentración de bióxido de carbono. La tolerancia a altas concentraciones de bióxido de carbono es el factor ecológicamente decisivo para las bacterias lácticas. La mayoría de las otras bacterias son substancialmente poco tolerantes. Así, la producción temprana de bióxido de carbono en fermentaciones por bacterias lácticas heterofermentativas puede ser un factor en la supresión rápida de bacterias contaminantes y peligrosas (Owens y Mendoza, 1985).

Producción de otros compuestos inhibitorios. Algunas bacterias lácticas producen además de ácido láctico otros compuestos como ácido acético y bióxido de carbono que tienen un efecto antagonista en la competición con otros microorganismos. Otros compuestos, inhibidores de crecimiento de otras bacterias, producidos por algunas bacterias lácticas, son las conocidas como bacteriocinas, como la nisina (Hurst, 1981).

Capacidad de amortiguamiento del sustrato. La preservación de alimentos por la fermentación natural ácido láctica depende sobre todo del establecimiento rápido de las condiciones ácidas hasta el punto de inhibir el desarrollo de otros microorganismos. Es obvio que la mayor influencia lo tiene la velocidad con la cual declina el valor de pH, la cual depende de la capacidad de amortiguamiento del material a fermentar (Owens y Mendoza, 1985).

Cantidad inicial de bacterias lácticas. Las fermentaciones tradicionales dependen de la cantidad de microorganismos que se encuentran en forma natural en el sustrato o en su caso agregar un inóculo, seguido del suministro de las condiciones necesarias para la proliferación del tipo de bacterias deseadas. La inoculación de un número suficientemente alto de bacterias es apropiado en fermentaciones como la de la mezcla arroz-pescado porque se consigue una acidificación rápida, pero no ha sido posible identificar el cultivo más adecuado (Owens y Mendoza, 1985).

Cantidad inicial de microorganismos competidores. Antes de que los microorganismos contaminantes o peligrosos alcancen poblaciones peligrosas

ocasionando cambios indeseables o produciendo poblaciones infecciosas o toxigénicas, su multiplicación debe de ser suprimida por el crecimiento y actividad metabólica de las bacterias lácticas (Owens y Mendoza, 1985).

5.3.2.3 Ventajas

El ensilado fermentado es más económico, menos peligroso en su manejo y se producen agentes inhibidores de microorganismos patógenos como las bacteriocinas y el peróxido de hidrógeno, además no se necesita neutralización y el valor nutricional es mayor comparado con el ensilado ácido (Hall y De Silva, 1994; Han-Ching y col., 1992).

Un proceso alternativo para la extracción de astaxantina de residuos de crustáceos es el ensilado ácido, empleando cepas seleccionadas de bacterias lácticas, el cual plantea un método eficiente y ecológicamente limpio para recuperar materiales de alto valor (Hall y De Silva, 1994) y aumentando la estabilidad de los carotenoides presentes por promover un ambiente reductor (Guerrero y col., 1996; Torrissen y col., 1981; Chen y Meyers, 1983).

5.4 Extracción

La cantidad de la astaxantina extraída depende del sistema de extracción empleado y la calidad depende de la temperatura empleada, exposición al oxígeno atmosférico y a la luz, es decir, de las condiciones de procesamiento y almacenamiento (Chen y Meyers, 1982a).

Para extraer el pigmento, el principal obstáculo lo constituye la unión con las proteínas. En estado natural, hay una interacción mutua entre proteínas y carotenos

que aumenta la estabilidad de los últimos. Si esta unión se debilita o se rompe, por ejemplo en el secado, la estabilidad de los carotenos decrece. Por esta razón, el precalentamiento de las muestras favorece la extracción de pigmentos (Chen y Meyers, 1982a). Estos mismos autores probaron la aplicación de enzimas proteolíticas para remover la unión de proteínas y pigmentos, mejorando el rendimiento en un 58%. En otro estudio, también se utilizaron proteasas bacterianas para separar el complejo caroteno-proteína de la quitina, logrando con ello obtener pigmentos enriquecidos con proteínas (Simpson y Haard, 1985).

Un método para recuperar carotenoproteína con un rendimiento aproximado de 73% de astaxantina y un 90% de proteína consiste en el empleo de la tripsina para tratar a los residuos de crustáceos. Esta carotenoproteína, después de la acción enzimática, es separada del residuo sólido y puede ser usada como suplemento en la alimentación animal (Haard y Simpson, 1997).

Cano-López y col. (1987) también aplicaron tripsina para llevar a cabo la hidrólisis enzimática, y posteriormente solubilizaron el pigmento en una solución de sulfato de amonio.

5.4.1 Solventes

La extracción de la astaxantina por solventes, su posterior separación de proteínas libres en el licor y estandarización del contenido de pigmentos permitirían su incorporación a dietas comerciales en concentraciones precisas (Cano-López y col., 1987). Se han propuesto varios procesos para la desproteización y el fraccionamiento de residuos de crustáceos, la mayoría de estos incluyen extracción alcalina y solubilización ácida de los minerales. Sin embargo, en todos los casos los procesos resultan muy agresivos y producen efluentes altamente contaminantes (Shahidi y Synowiecki, 1991).

Meyers y Bligh (1981), en un estudio acerca del contenido de pigmentos en desechos de cangrejos, emplearon un sistema ternario de solventes: éter de petróleo:acetona:agua (15:75:10) (v/v/v) para la extracción de carotenoides, logrando extraer alrededor de 150 µg/g de pigmentos, que por estudio cromatográfico, fue separado en 49.4% de astaxantinas esterificadas, 40.3% de astaxantinas sin esterificar y 10.3% de astaceno.

D'Abramo y col. (1983) realizaron extracciones de pigmentos a partir de exoesqueleto de langosta y emplearon dos sistemas de solventes: (A) éter de petróleo/metanol (95/5) (v/v); y (B) benceno/acetato de etilo/metanol (75/20/5) (v/v/v) obteniendo mejores resultados con la mezcla A.

5.4.2 Aceite de soya

De las extracciones de astaxantina con aceite a partir de residuos de camarón han resultado concentraciones significativas al valorarse el contenido de pigmento en la fase orgánica (Anónimo, 1992).

Chen y Meyers (1982), realizaron estudios para conocer la proporción de aceite de soya/residuo de crustáceo (v/p) óptima en la extracción de los carotenoides conocidos como astaxantinas, y encontraron que con la proporción 1:1 (v/p) se logra su máxima recuperación.

Los mismos autores mencionan que generalmente antes de la extracción se lleva a cabo una hidrólisis enzimática o química de los residuos de crustáceos para romper la unión astaxantina/proteína.

La extracción de astaxantina con aceite de soya se inicia calentando la mezcla de residuo/aceite a una temperatura de 45-50°C con una agitación constante hasta llegar

a una temperatura de 90°C, seguido de este calentamiento se centrifuga a una temperatura de 10°C, esto es para evitar la posible degradación de la astaxantina por el calentamiento del aceite (Chen y Meyers, 1982).

Una de las formas por la cual es posible conocer la cantidad de pigmento liberado, es por la medición de la cantidad de astaxantina en el aceite de soya recuperado, lo anterior basándose en el valor del coeficiente de extinción del aceite para la astaxantina en el aceite de soya, $E^{1\%}_{1\text{cm}}=2155$ (Chen y Meyers, 1982).

La cantidad total de astaxantina en los residuos puede ser calculada por medio de la fórmula de Kelley y Harmon (1972):

$$\text{g de astaxantina/g de residuo de crustáceo} = \frac{AD}{100GdE^{1\%}_{1\text{cm}}}$$

donde A= absorbancia a una $\lambda = 405 \text{ nm}$; D= volumen (ml) de aceite de soya recuperado por la dilución empleada; G= peso (g) del residuo de crustáceo; d= ancho de la celda y; $E^{1\%}_{1\text{cm}}=2155$ en aceite de soya.

Hansen (1981), realizó extracciones de astaxantina a partir de residuos de camarón (*P. borealis*) con aceite de soya a una temperatura de 200°C, obteniendo 60-70 mg/Kg de astaxantina. Con este extracto no se obtuvo un depósito significativo de astaxantina en la carne del pez, ya que con la alta temperatura de calentamiento se produjeron isómeros y derivados que no son absorbidos por los salmónidos.

Shahidi y Synowiecki (1991), efectuaron extracciones de pigmentos carotenoides a partir de residuos de camarón (*Pandalus borealis*) empleando aceite de hígado de bacalao, la cantidad máxima extraída fue de 14.7 mg/100 g en base seca.

5.5 Carotenoproteínas

Las carotenoproteínas son compuestos formados por la unión de un pigmento carotenoide con una proteína, donde la entidad proteica es una lipoproteína de alta densidad (HDL, por sus siglas en inglés), siendo los crustáceos la mayor fuente de estos compuestos (Muriana y col., 1993).

Muriana y col. (1993), realizaron estudios sobre carotenoproteínas en camarón (*P. japonicus*), llamándole carotenoproteína azul, de la cual comprobaron por medio de HPLC que la astaxantina es el único grupo cromóforo unido a esta carotenoproteína. Este complejo fue extraído de la hipodermis del camarón, junto con la fracción de lípidos y ácidos grasos, y por medio de filtración en gel estimaron su peso molecular aproximado de 280,000 Da.

5.5.1 Lipoproteínas

Los lípidos forman complejos con fosfolípidos y proteínas anfipáticas que se denominan apoproteínas para formar partículas que se conocen como lipoproteínas (Gurr y James, 1971).

Las lipoproteínas son ensamblados macromoleculares con centros hidrofóbicos y superficies hidrofílicas. El centro contiene triacilgliceroles y ésteres de colesterilo; la superficie consiste en moléculas anfipáticas, colesterol, fosfolípidos y las apoproteínas (figura 5) (Horton y col., 1993).

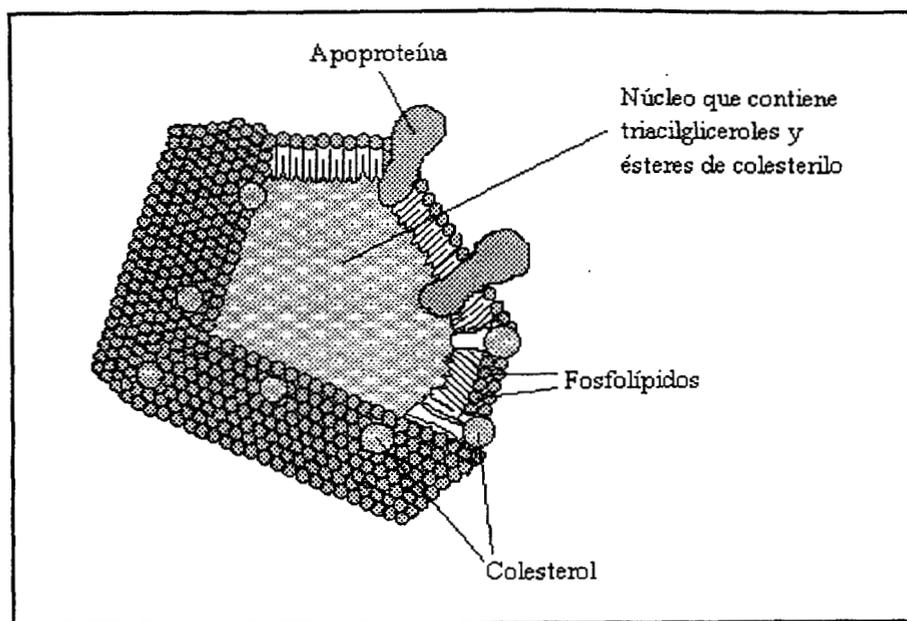


Figura 5. Estructura de una lipoproteína.

Fuente: Horton y col., 1993.

Las lipoproteínas se clasifican de acuerdo a sus densidades relativas. Los lípidos son menos densos que las proteínas, por consiguiente mientras mayor sea el contenido de lípidos en las lipoproteínas, menor será la densidad (Horton y col., 1993).

5.5.2 Proteasas

Las proteasas son enzimas proteolíticas que hidrolizan los enlaces peptídicos con diferentes grados de intensidad y selectividad; se usará la enzima más adecuada de acuerdo con la necesidad de la transformación requerida (Badui, 1993).

5.5.2.1 Generalidades

Las proteasas alcanzan alrededor de un 48% de todas las enzimas industriales producidas, y la mayoría de ellas son usadas en detergentes y en la industria de alimentos. En varios de los procesos que implican el rompimiento de proteínas,

pueden usarse medios químicos o físicos, por ejemplo el uso de químicos a pH y temperaturas extremas, sin embargo las ventajas que ofrece el uso de proteasas para lograr la modificación proteica en alimentos son las siguientes:

- Mayor especificidad, evitando reacciones indeseables.
- Activación bajo condiciones no severas de pH y temperatura.
- Efectividad a bajas concentraciones.
- Pueden ser activadas o inactivadas después de su acción en el alimento.

La actividad de las proteasas depende de varios factores, como la especificidad al sustrato, sensibilidad al pH y temperatura, presencia o ausencia de activadores o inhibidores, disponibilidad, soporte técnico de servicio y costo (Haard y Simpson, 1994).

5.5.2.2 Fuentes

Las proteasas pueden obtenerse de diversas fuentes: microbiano, vegetal y animal, teniendo cada una de estas enzimas proteolíticas diversas características como condiciones óptimas de temperatura y pH sitios específicos de hidrólisis, etc., las cuales se toman en consideración para la selección adecuada según la transformación que se requiera (Cano-López y col., 1987)

Otra fuente importante de proteasas son las de origen marino, enzimas hidrolíticas de especies acuáticas que catalizan la degradación de enlaces peptídicos en moléculas de proteínas. El ambiente marino contiene una gran diversidad de especies. Estos organismos comprenden alrededor de 7000 en aguas dulces y 13000 en aguas saladas que son conocidas hasta el momento. Con esta cantidad de organismos puede esperarse que en especies marinas se encuentre el equivalente de todas las proteasas encontradas en plantas y animales de origen terrestre (Haard y Simpson, 1994).

Algunas de las propiedades que poseen las proteasas de origen marino son la alta eficiencia catalítica a bajas temperaturas, baja estabilidad termal y actividad y estabilidad substancial en pHs neutros y alcalinos (Haard y Simpson, 1994).

El mundo microbiano ofrece una fuente diversa de proteasas, actualmente son pocas especies de microorganismos usados para la producción industrial de enzimas. Esto es porque los microorganismos que se prueban como fuentes de proteasas son sometidos por seguridad a rigurosas evaluaciones toxicológicas, y este proceso de selección es largo y con un alto costo. Además, las proteasas provenientes de animales y plantas son tradicionalmente preferidas en el procesamiento de alimentos ya que el empleo de las obtenidas de microorganismos ocasiona generalmente la percepción por parte del consumidor de productos de la propia actividad del microorganismo.

5.5.2.3 Aplicación en extracción de carotenoproteínas

Cano-López y col. (1987) compararon la acción proteolítica de la tripsina bovina y la tripsina de bacalao del Atlántico en la extracción de carotenoproteínas a partir de residuos de camarón, y observaron que bajo condiciones idénticas como la cantidad de enzima (25 mg%), quelantes (EDTA), temperatura de 4°C, etc., se logra una mayor recuperación del complejo con la enzima proveniente de bacalao del Atlántico. Lo anterior expresado en el % de astaxantina que fue de 49% y 64%, y 65% y 81% de proteína del residuo en tan sólo 24 horas, estos resultados con tripsina bovina y tripsina de bacalao del Atlántico respectivamente.

5.6 Técnicas de análisis

5.6.1 Columnas de cromatografía

Para fraccionar una mezcla de proteínas de una solución se emplea una columna de cromatografía. Se llena una columna cilíndrica con una matriz insoluble que a menudo consiste en fibras de celulosa sustituida o de esferas de resina sintética. Se aplica entonces a la columna una mezcla de proteínas y se lava a través de la matriz agregando algún disolvente. A medida que el disolvente fluye a través de la columna, el líquido que sale, o eluido, se recoge en fracciones (figura 6). La velocidad a la cual viajan las proteínas a través de la matriz depende de las interacciones entre la matriz y las proteínas. Para una columna particular, diferentes proteínas serán eluidas a velocidades diferentes. La concentración de proteína en cada fracción se puede determinar midiendo la absorbancia espectrofotométrica del eluido a 280 nm (Scopes, 1994).

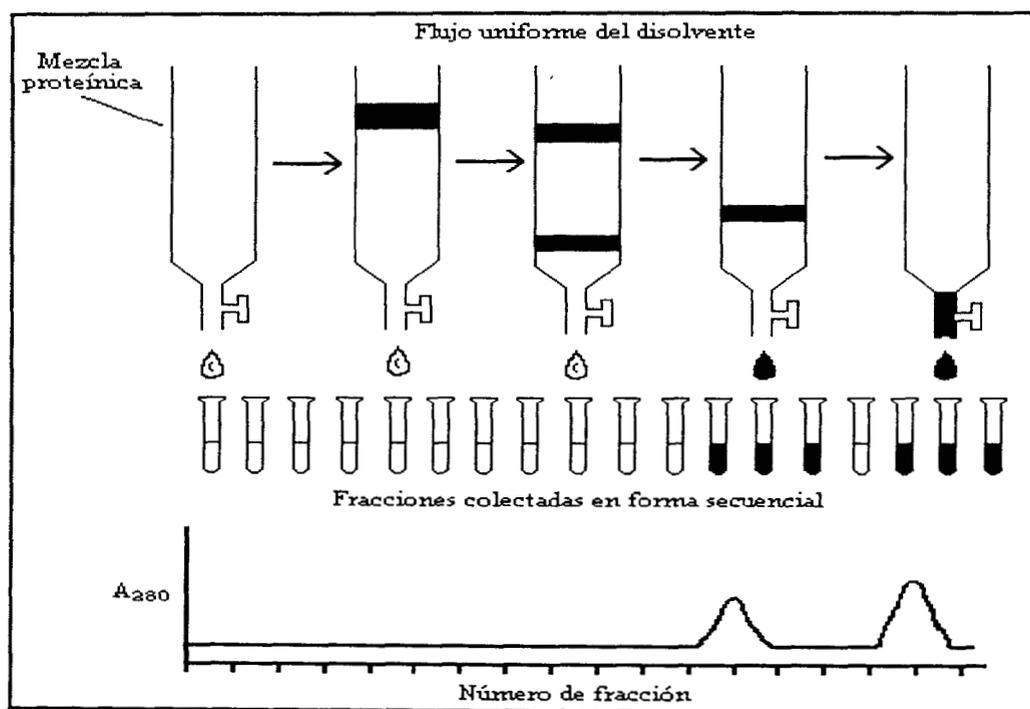


Figura 6. Cromatografía en columna.
Fuente: Horton y col., 1993.

5.6.2 Cromatografía de filtración en gel

Este tipo de cromatografía separa la proteína sobre la base de su tamaño molecular, utiliza una resina en gel que consiste en esferas porosas. Las proteínas que son más pequeñas que el tamaño promedio de los poros penetran gran parte del volumen interno de las esferas y en consecuencia son retardadas por la matriz. Cuando más pequeña sea la proteína, más tarda en ser eluida de la columna. Pocos poros son accesibles a las moléculas proteínicas más grandes. En consecuencia las proteínas más grandes fluyen a través de las esferas y son eluidas primero. Debido a esta separación de las proteínas sobre la base de su tamaño molecular, la cromatografía por filtración en gel se conoce también como cromatografía por exclusión molecular. La selección del tamaño del poro de la matriz de filtración en gel depende de la masa molecular de la proteína que se va a purificar (Scopes, 1994).

5.6.3 Electroforesis

La electroforesis separa las proteínas con base en su migración en un campo eléctrico. En la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), las muestras de proteína se colocan sobre una matriz de gel intrincada, y se aplica un campo eléctrico. La matriz se amortigua a un pH ligeramente alcalino de modo que las proteínas sean aniónicas y migren hacia el ánodo. Por lo común se corren a la vez varias muestras, junto con una muestra de referencia. La matriz de gel retarda la migración de las moléculas grandes a medida que se mueven en el campo eléctrico. Por esto, las proteínas son fraccionadas sobre la base tanto de carga como de masa (Horton y col., 1993).

En una modificación de la técnica estándar de electroforesis se emplea el detergente dodecil sulfato de sodio (SDS) cargado negativamente para sobrepasar la carga negativa en las proteínas, de modo que solo sean separadas sobre la base de su masa. La electroforesis en SDS gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) se emplea para evaluar la pureza y para estimar la masa molecular de una proteína. En SDS-PAGE, se adiciona

el detergente al gel de poliacrilamida. Antes de agregar las muestras de proteína sobre el gel se les adiciona 2-mercaptoetanol con calentamiento. La combinación de SDS, 2-mercaptoetanol, y calor rompe los enlaces disulfuro de las subunidades proteínicas y las desnaturaliza, esto permite la separación electroforética de las subunidades proteínicas. El anión dodecilsulfato, el cual tiene una larga cola hidrofóbica, se fija a las cadenas hidrofóbicas de los residuos de aminoácidos de la cadena polipeptídica en una proporción de aproximadamente una molécula de SDS por cada dos residuos de una proteína. Debido a que las proteínas más grandes fijan proporcionalmente más SDS, las proporciones de carga a masa de todas las proteínas tratadas son aproximadamente similares, por lo que todos los complejos SDS-proteína están muy cargados negativamente (Horton y col., 1993).

Después de cargar las muestras de proteína dentro del gel y de aplicar un campo eléctrico, todos los complejos SDS-proteína se mueven hacia el ánodo. la velocidad de migración a través del gel es inversamente proporcional al logaritmo de su masa molecular, es decir, cuanto mayores sean las proteínas mayor resistencia encuentran y por consiguiente migran con más lentitud que las proteínas más pequeñas. Las masas moleculares de las proteínas desconocidas se pueden estimar por comparación de su migración de una proteína de referencia sometida a electroforesis sobre el mismo gel (Horton y col., 1993).

5.6.4 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La resolución de métodos cromatográficos se incrementa en forma notoria por el uso de esta técnica. La matriz en HPLC consiste de esferas que son más pequeñas, de tamaño más uniforme, y empacadas más apretadamente que las esferas que se emplean en las columnas cromatográficas convencionales. Se aplica una presión elevada, a niveles de cientos de libras por pulgada cuadrada, para bombear la mezcla problema (proteínas o pigmentos) y eluyente a través de la columna. Si bien la velocidad, la resolución, y la sensibilidad aumentan de manera notoria al utilizar

HPLC, las separaciones aún se basan en los mismos principios que rigen el intercambio iónico, la filtración en gel y la cromatografía por afinidad (Scopes, 1994).

5.7 Ultrafiltración

La ultrafiltración es una operación que emplea membranas especiales en diferentes tipos de arreglos para separar macromoléculas en solución de contaminantes más pequeños, por medio de un gradiente de presión (Scriban, 1985).

5.7.1 Generalidades

La ultrafiltración es utilizada en la etapa de purificación de caldos biológicos. En esta etapa los caldos sujetos a purificación contienen el soluto de interés en forma más concentrada y pura que el caldo original, debido a esto los volúmenes a tratar son menores que los correspondientes a las primeras etapas del proceso (Belter y col., 1988).

Para describir un proceso de membrana es necesario establecer el movimiento relativo de los componentes de la mezcla a través de la membrana, debido a la fuerza originada por el gradiente de presión. La ultrafiltración forma parte de un conjunto de "operaciones de membrana" empleadas en diferentes etapas de los procesos de bioseparación (Cheryan, 1986).

La ultrafiltración utiliza membranas microporosas generalmente asimétricas o anisotrópicas para separar macromoléculas y partículas de moléculas pequeñas y solventes (figura 7).

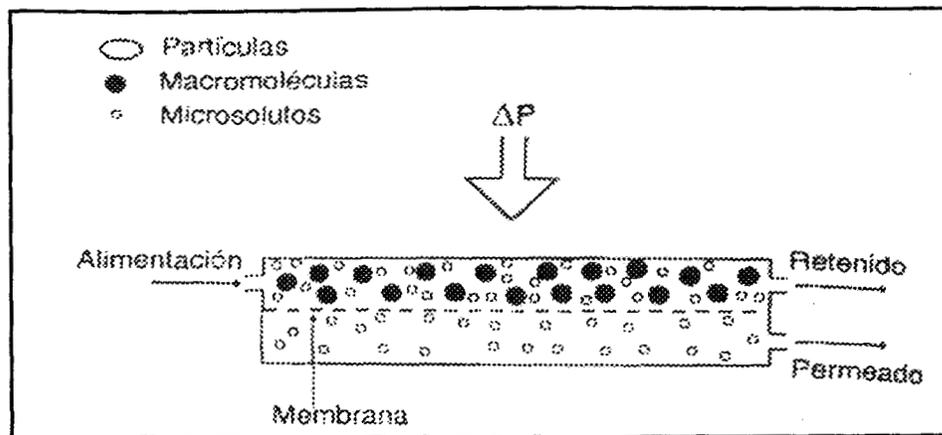


Figura 7. Esquema de ultrafiltración.

Fuente: Fane y Radovich, 1990.

Las membranas anisotrópicas son las más utilizadas en ultrafiltración debido a que las membranas microporosas convencionales poseen una estructura tortuosa que provoca retención irreversible de partículas dentro de la matriz lo que dificulta su limpieza y rehuso (Cheryan, 1986).

Las membranas anisotrópicas tienen dos capas características: una película delgada y densa de 0.1 a 1.5 μm de espesor y bajo la película una subestructura microporosa de 0.1-1 mm que presenta aberturas progresivamente mayores, que facilitan el paso del solvente y los solutos que logran pasar la película (figura 8).

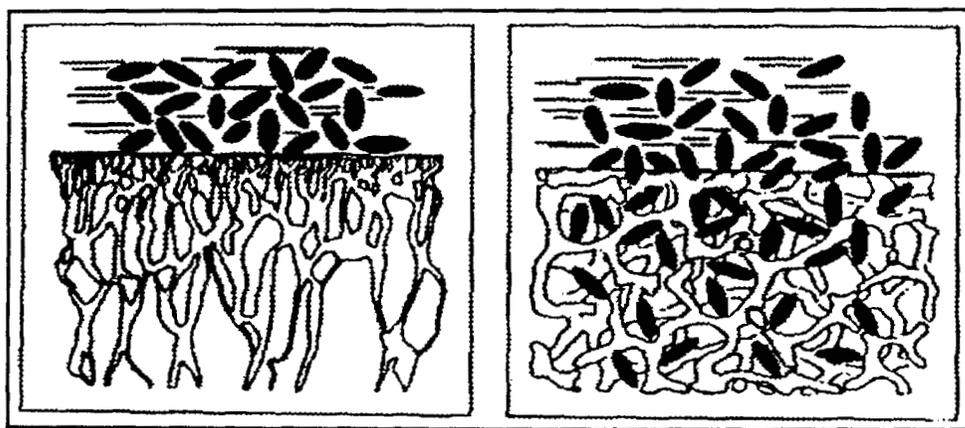


Figura 8. Comparación de membranas convencionales (derecha) con anisotrópicas (izquierda).

Fuente: Santos, y col, 1991.

Las membranas utilizadas en ultrafiltración se caracterizan por su peso molecular de corte, el cual es el peso molecular del soluto globular que es retenido en un 90% por la membrana. El peso molecular de corte varía entre 500 y 1,000,000 Da para la mayoría de las membranas de ultrafiltración, lo cual representa la retención de partículas de 1 a 10,000 nanómetros de tamaño. Las presiones características de la ultrafiltración son moderadas en el rango de 100 a 500 kPa. Las capacidades características son del orden de 10-200 l/m²-h (al flujo volumétrico por unidad de área de membrana se le conoce como flux y se utiliza para especificar equipos de ultrafiltración) (Fane y Radovich, 1990).

En los procesos de separación por membrana se producen gradientes de concentración de los solutos en la proximidad de la membrana, causados por las diferentes velocidades de transporte de cada uno de ellos. Este efecto es conocido como "polarización de la concentración" (Belter y col., 1988).

El flux de solvente a través de la membrana puede ser incrementado significativamente utilizando flujo cruzado o tangencial en lugar del flujo-cerrado convencional (figura 9). En los sistemas de flujo cruzado la alimentación fluye en forma paralela a la membrana minimizando el efecto de la polarización de la concentración, ya que el esfuerzo cortante del fluido estimula el desplazamiento de las partículas de la superficie de la membrana (Belter y col., 1988).

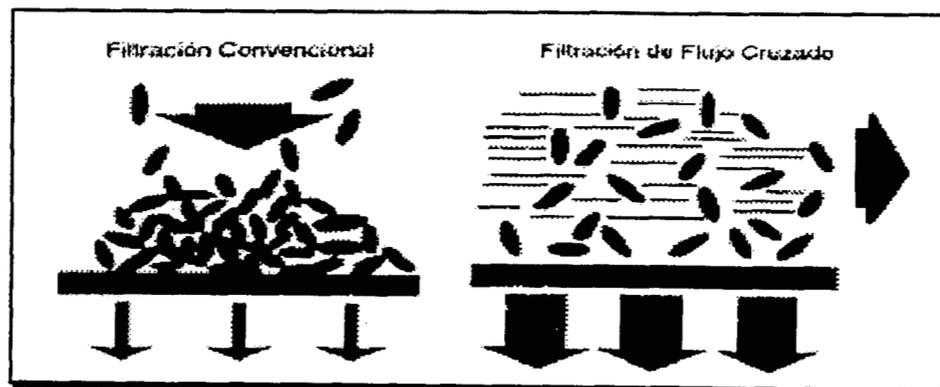


Figura 9. Ultrafiltración convencional y de flujo cruzado.
Fuente: Belter y col., 1988.

5.7.2 Aplicaciones

Se ha empleado la ultrafiltración adaptada a un sistema enzimático continuo, conocido como reactor de ultrafiltración. Las enzimas utilizadas son proteasas para la obtención de hidrolizados a partir de proteína de soya (Deeslie y Cheryan, 1981).

El desarrollo y aplicación de los reactores de ultrafiltración para la hidrólisis de proteína es reciente y ofrece la ventaja del uso de enzimas solubles en contacto con el sustrato, evitando problemas de baja actividad y resistencia difusional que son típicos de la inmovilización enzimática (Deeslie y Cheryan, 1981).

La ultrafiltración cada vez tiene un mayor uso en el área industrial (tabla 4), por ejemplo en la recuperación de proteína proveniente del cocinado de productos del mar, como el concentrado del caldo de pescado en la industria sardinera, y en la separación de compuestos responsables del sabor en moluscos y que posteriormente se emplean como condimentos (Jaouen y col., 1990).

Tabla 4. Aplicaciones de los procesos de membrana.

Área	Aplicaciones
Alimentos del mar (Pescado, mariscos, crustáceos, ...)	<ul style="list-style-type: none"> • Tratamiento-renovación de aguas de almacenamiento (salmueras, agua liberada por el deshielo). • Tratamiento-valorización de efluentes del proceso (cocinado, lavados con agua a presión). • Valorización de residuos sólidos o líquidos con reactores de membrana enzimática.
Agua de mar	<ul style="list-style-type: none"> • Purificación de aguas para su uso en acuicultura. • Desalado.
Algas marinas	<ul style="list-style-type: none"> • Estudios de contaminación de océanos. • Valorización de biomasa de micro- y macro-algas (células completas o componentes intra- o extra-celulares).

Fuente: Jaouen y col., 1990.

Swafford (1987), reporta el empleo de la ultrafiltración para el tratamiento de los efluentes que resultan de la elaboración del surimi, recuperando una importante cantidad de proteína.

5.8 Antioxidantes

Un antioxidante se define como aquel compuesto que tiene la capacidad de evitar o reducir la intensidad de las reacciones de oxidación (Badui, 1993).

5.8.1 Sintéticos

Existen dos categorías fundamentales de compuestos que se utilizan para evitar el deterioro oxidativo de los lípidos: los donadores de protones y los secuestradores. Entre los primeros están el hidroxianisol butilado (BHA), el hidroxitolueno butilado (BHT) (figura 10), la terbutilhidroxiquinona (TBHQ) y el galato de propilo; estos no detienen la formación de los radicales libres que se generan en la oxidación, sino que al reaccionar con ellos los estabiliza y se producen radicales del antioxidante que son menos activos. Es decir, se consumen en la reacción y por lo tanto la estabilidad del lípido siempre va a depender de la cantidad residual de aditivo que contenga (Badui, 1993).

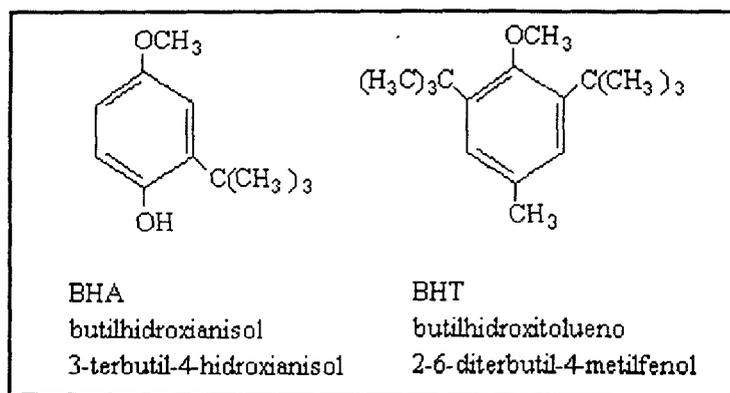


Figura 10. Estructura química del BHA y BHT.

Fuente: Badui, 1993

5.8.2 Naturales

Desde hace muchos años, algunas especies químicas han sido empleadas como antisépticos para preservar alimentos, especialmente de la familia *Labiatae*, por ejemplo el romero ha sido reportado que muestra una alta actividad antioxidante. Los constituyentes del romero (*Rosmarinus officinalis* L.) han sido ampliamente investigados e identificados, encontrando los principales principios activos como lo son el carnosol y el rosmanol (figura 11) (Inatani y col., 1982).

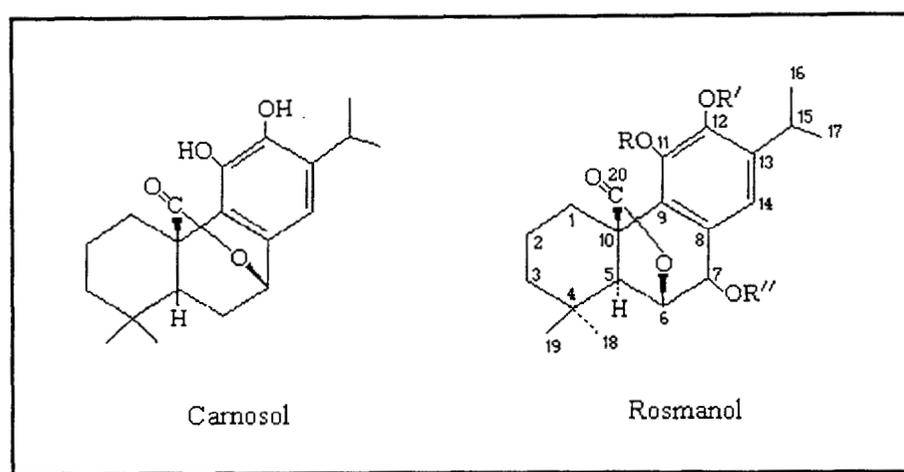


Figura 11. Estructuras químicas del carnosol y rosmanol.
Fuente: Inatani y col., 1982.

Se ha observado que estos compuestos tienen un poder similar al que presentan los antioxidantes sintéticos BHA y BHT (Inatani y col., 1982).

Collins y Charles (1987), realizaron estudios de actividad antimicrobiana del carnosol y ácido ursólico, dos antioxidantes constituyentes del romero, comparando los resultados con los antioxidantes comerciales BHA y BHT. Observaron que el carnosol ofrece un amplio poder antimicrobiano contra bacterias y levaduras, el BHA se ubicó en segundo término por arriba del ácido ursólico y en última instancia el BHT. Se encontró que con tan solo 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de carnosol, se logra un decremento significativo en el crecimiento de bacterias y levaduras.

Otro antioxidante natural muy efectivo es la vainillina, que se extrae de la vainilla. Se ha estudiado mucho su efecto antimicrobiano el cual se debe a su gran capacidad de evitar las reacciones de oxidación (Cerrutti y col., 1997).

5.8.3 Aplicaciones en conservación de astaxantina

Han sido empleados distintos antioxidantes comerciales para la protección de la estructura de la astaxantina en residuos de crustáceos, entre ellos el ethoxyquin^{MR}, endox^{MR} y la mezcla BHA:BHT, encontrándose que con el endox^{MR}, el cual es una mezcla de tocoferoles y BHA, se logra la mayor protección contra factores de temperatura de almacenamiento, molienda y exposición al oxígeno (Chen y Meyers, 1982).

Chen y Meyers (1982) probaron el antioxidante comercial llamado ethoxyquin^{MR} el cual impide la degradación rápida de la astaxantina ocasionada por el calentamiento en el proceso de extracción con aceite de soya. Durante la extracción se incrementa la concentración de astaxantina disuelta en la fase del aceite y la temperatura que se alcanzan son de alrededor de 90°C, el ethoxyquin^{MR} impide la degradación del pigmento aun a temperaturas por arriba de los 100°C (Chen y Meyers, 1982).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental comprendió de las siguientes etapas:

- ✍ Fermentación de los residuos de camarón.
 - ✍ Extracción de pigmentos.
 - ✍ Concentración del extracto.
 - ✍ Hidrólisis del complejo pigmento-proteína (carotenoproteína).
 - ✍ Concentración de astaxantina.
 - ✍ Estudio de la carotenoproteína y péptidos resultantes de la hidrólisis enzimática.
 - ✍ Contenido de astaxantina en fracciones.
 - ✍ Efecto de antioxidantes.
-

6.1 Material

Se utilizó exoesqueleto de camarón (*Penaeus sp.*) suministrado por la Administración de la Nueva Viga del D.F. Se molieron en un molino para carne marca Sanitary con un cedazo de 1/8" y almacenado bajo congelación a -10°C hasta su utilización.

6.2 Fermentación

Debido a que se ha reportado la posible estabilización de astaxantina cuando se promueve una fermentación láctica (ensilado) de los residuos de camarón (Torrissen y col., 1981; Chen y Meyers, 1983) se llevó a cabo la extracción de pigmentos a partir de material fermentado.

6.2.1 Microorganismos

Se probaron tres cultivos iniciadores (Tabla 5), *Pediococcus pentosaceus* P-1, *Staphylococcus carnosus* MC-1 y *Lactobacillus sp.* (IB2), para establecer cual era el más eficiente para la disminución en el valor de pH. *P. pentosaceus* y *S. carnosus* fueron suministrados en forma pura por la Dra. Lone Andersen de Ch. Hansen, *Lactobacillus sp.* fue aislado de residuos de camarón por la Dra. Zainoha Zakaria, de la Universidad de Loughborough y suministrado en cultivo en agar MRS. Para obtener el inóculo, estas bacterias lácticas se incubaron en caldo MRS a 30°C durante 24 horas, hasta alcanzar una densidad óptica igual a dos determinada a una $\lambda = 535$ nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A (Fullerton, CA).

Tabla 5. Microorganismos iniciadores de la fermentación.

Microorganismo iniciador	Condiciones de crecimiento (Rangos de temperatura y pH)
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Temperatura mínima=15°C Temperatura óptima=30°C Temperatura máxima=40°C pH de 3.7-7.0
<i>Streptococcus carnosus</i>	Temperatura mínima=16°C Temperatura óptima=30°C Temperatura máxima=40°C pH de 3.5-7.0
<i>Lactobacillus sp.</i>	Sin información

6.2.2 Condiciones de la fermentación

A los residuos de camarón descongelados se adicionó 10% de glucosa (p/p) y se inocularon con las cepas lácticas seleccionadas (5 % v/p). La fermentación en este sustrato semisólido se llevó a cabo por un tiempo total de dos días (48 horas) a 30°C en proporciones de 100 g, la metodología completa se muestra en la figura 12.

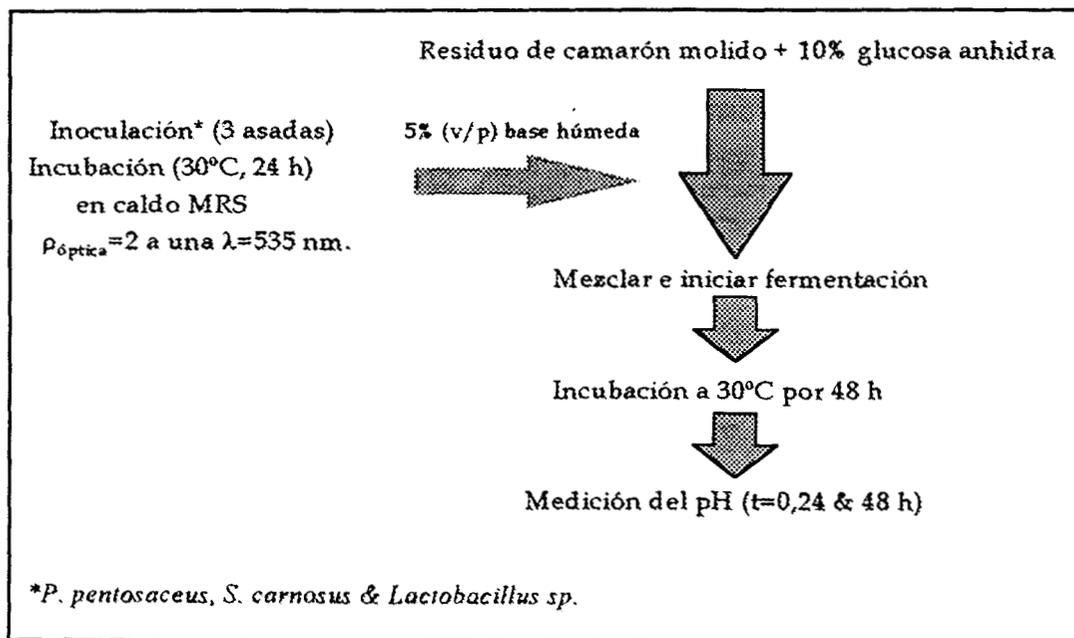


Figura 12. Metodología empleada en la fermentación de los residuos de camarón.

Las fermentaciones se realizaron en pequeños frascos de cristal con tapa de plástico (figura 13) de una capacidad máxima aproximada de 200 ml empleando 100 g de residuo de camarón. Para la incubación a 30°C se empleó un baño maría Felisa con control de temperatura Model-FE-371 (México, D.F).

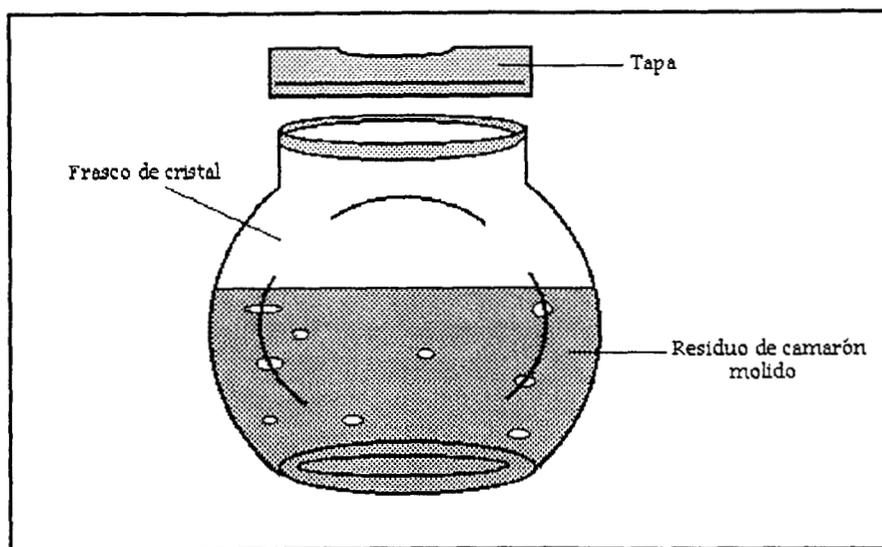


Figura 13. Recipiente empleado para las fermentaciones.

6.2.3 Determinación del pH

La variable a considerar en la fermentación fue el pH, el cual se midió en un potenciómetro Conductronic pH20 (Fisher, México) al inicio de la fermentación (cero horas), 24 y 48 horas.

6.3 Extracción de pigmentos

En esta etapa los pigmentos se encuentran unidos a proteínas formando los complejos conocidos como carotenoproteínas, los cuales se separaron tanto del residuo fermentado como del no-fermentado por extracción en etapas sucesivas, empleándose distintos sistemas de solventes y por otro lado el aceite de soya.

La tabla 6 muestra los sistemas de extracción empleados. Estos fueron cloroformo:metanol:agua (1:2:4), un sistema ternario reportado por Meyers y Bligh (1981) y que esta formado por éter de petróleo:acetona:agua (15:75:10); y etanol:agua (40:60). Las mezclas de solventes se agregaron en una relación de 1:10 (p/v) con respecto al residuo de camarón, es decir por cada 10 g de residuo se agregaron 100 ml de la mezcla de solventes correspondiente. En el caso del aceite de soya, este se empleó directamente en una relación de 1:2 (p/p) con respecto al residuo de camarón, es decir, por cada 10 g de residuo se agregaron 20 g de aceite de soya para llevar a cabo la extracción.

Tabla 6. Sistemas utilizados para la extracción de pigmentos.

Componentes del sistema	Proporciones de la mezcla	Proporción con respecto al residuo
Agua:cloroformo:metanol	1:2:4	1:10
Éter de petróleo:acetona:agua	15:75:10	1:10
Etanol:agua	40:60	1:10
Aceite de soya	1:1	1:2

Para la extracción de pigmentos se probaron diversas metodologías, de las cuales se adoptaron los pasos más convenientes bajo los cuales se realizaron las extracciones. Estos pasos se describen en la figura 14.

El tiempo total de extracción con solventes fue de tres horas, con una agitación constante de 300 rpm, temperatura ambiente y protegiendo de la luz, todo esto en una incubadora con agitación orbital (Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, Chicago, IL).

Para la extracción con aceite de soya, se empleó la metodología reportada por Chen y Meyers (1982), usando aceite de soya en una proporción de masa 1:2, por un tiempo total de tratamiento de tres horas, agitación de 300 rpm a temperatura ambiente y protegiendo de la luz.

Omara y col. (1985) reportan también un método para la extracción de pigmentos con aceite de soya bajo las mismas condiciones que el empleado en esta tesis pero efectuando calentamiento, iniciando con una temperatura 45-50°C y llegando finalmente a 90°C por 45 minutos.

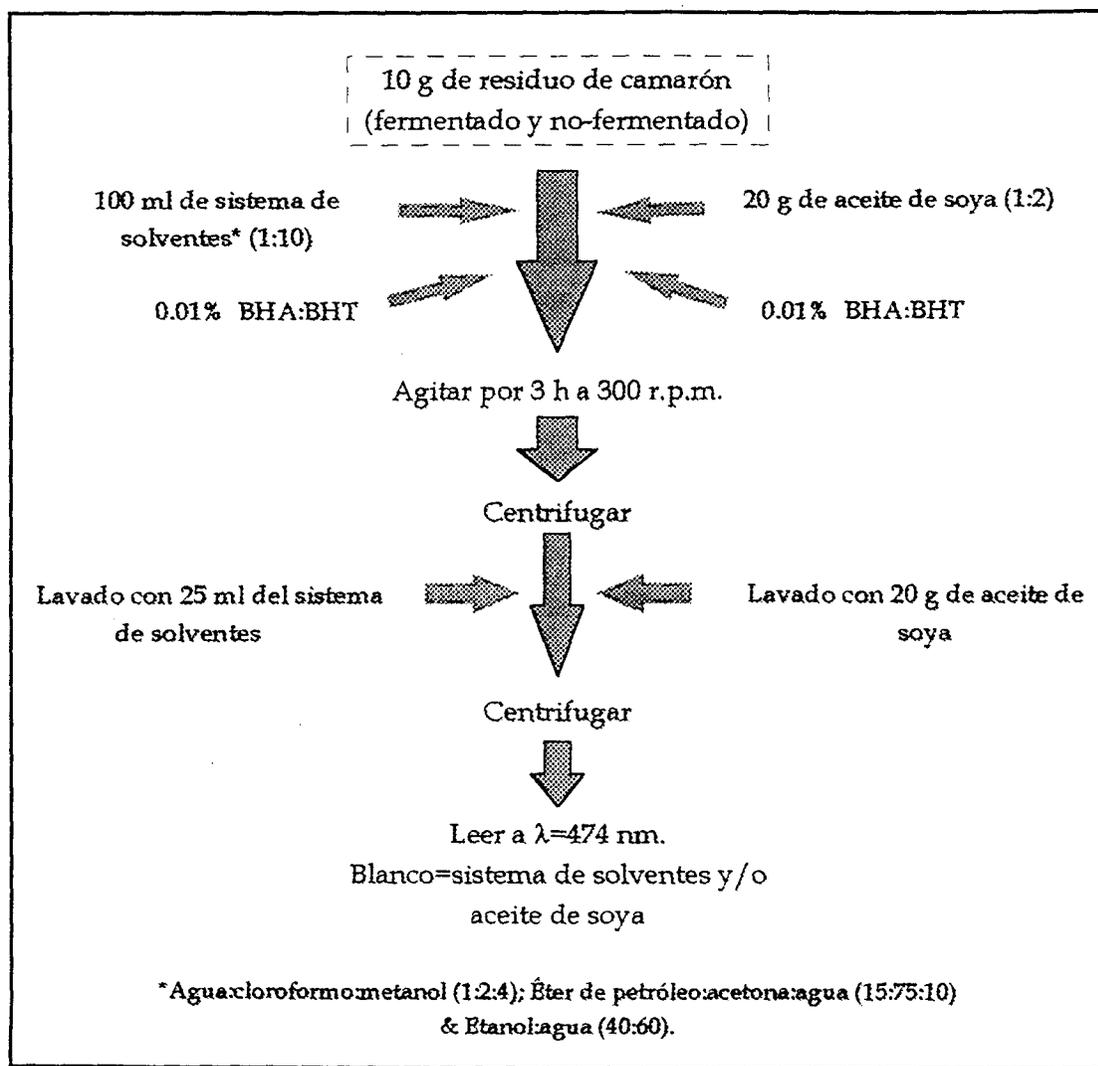


Figura 14. Metodología empleada para la extracción de pigmentos.

Después de transcurridas las 3 horas de agitación, la solución con un color rojo intenso debido a los carotenoides, es recobrada por centrifugación a 7000 rpm por 10 minutos a 4°C (centrifuga Beckman J2-MI con rotor # JA-14, Palo Alto, CA). Después de separar el sobrenadante se efectuó un lavado del residuo con 25% de la mezcla de

solventes (con respecto a la cantidad inicial empleada), se centrifugó de nuevo reuniéndose el sobrenadante resultante con el anteriormente recobrado y analizándose espectrofotométricamente para la determinación de xantofilas totales, como se indica en la sección 6.3.1.

En el caso del aceite de soya después de las tres horas de extracción y la centrifugación bajo las mismas condiciones, el sobrenadante que se obtuvo fue de dos fases, la fase de agua (hidrofase), que fue muy pequeña, fue eliminada ya que el pigmento se encuentra en la fase del aceite. La separación se llevó a cabo con un embudo de separación. Ya obtenida la fase de aceite-pigmento, esta se examinó espectrofotométricamente para la determinación de xantofilas totales (sección 6.3.1). El lavado se realizó con la misma cantidad de aceite empleada al principio del tratamiento, en una proporción 1:2 (p/p) con respecto al residuo de camarón (20 g de aceite de soya por cada 10 g de residuo de camarón), reuniéndose el nuevo aceite de lavado con el obtenido en un principio.

6.3.1 Determinación de xantofilas totales

Las determinaciones espectrofotométricas para conocer la cantidad de xantofilas totales en los extractos se realizaron en una celda de cuarzo, resistente al efecto corrosivo de la mezcla de solventes; se utilizó un espectrofotómetro Beckman DU-650 (Fullerton, CA).

La fórmula empleada para sustituir la absorbancia a una $\lambda=474$ nm y obtener la cantidad de xantofilas totales en $\mu\text{g/g}$ de residuo, se deriva de la reportada por la A.O.A.C. (1990), la cual quedó establecida de la forma siguiente:

$$\text{Xantofilas totales } (\mu\text{g/g}) = (A \times D / P \times 236) (1000)$$

Donde:

A=Absorbancia a $\lambda=474$ nm; D=Factor de dilución; P=Peso de la muestra en gramos; 236=Absortividad específica de la transluteína y; 1000=para convertir a $\mu\text{g/g}$.

Para las mezclas de solventes el factor de dilución fue de 125 ml de solvente (100 ml iniciales + 25 ml de lavado)/10 g de residuo de camarón (v/p) = 12.5; y para el aceite de soya de 40 g de aceite de soya (20 g iniciales + 20 g de lavado)/10 g de residuo de camarón (p/p) = 4.

6.3.2 Análisis por HPLC del contenido astaxantina en residuos fermentados y no-fermentados

Los extractos provenientes de residuos fermentados y no-fermentados se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con una columna de fase reversa Symmetry^{MR} C₁₈ para separar pigmentos carotenoides y sus ésteres, según el método reportado por Christophersen y col. (1989) y Mejía y col. (1988).

Se utilizó el acetato de etilo 80% / metanol:agua (9:1) como fase móvil del sistema, el cual antes de emplearlo fue filtrado en membrana de 0.45 μm para solventes y posteriormente degasificado con inyección de nitrógeno gaseoso.

El instrumento empleado consiste de los siguientes componentes: Inyector Rheodyne 7125 con loop de 50 μl ; columna Waters Symmetry^{MR} C₁₈ 4 μm , 150 mm (15 cm) de largo por 3.9 mm de diámetro interno (No. WAT054205); una precolumna Waters Symmetry^{MR} C₁₈ (No. WAT054225); sistema de bombeo Waters^{MR} 626; unidad de control Waters^{MR} 600S Controller Millipore^{MR}; detector de arreglo de diodos programable Waters^{MR} 994; y unidad de control y registro por PC DELL 486 con programa Millenium^{MR}.

Los extractos no fueron sometidos a ningún tratamiento previo a la inyección a la columna, la cual se hizo en volúmenes de 50 μ l, el tiempo total de análisis fue de 10 minutos por cada inyección y el intervalo de longitud de onda analizado fue entre 400-500 nm, el cromatograma específico a longitud de onda fija fue obtenido a $\lambda=474$ nm (longitud de onda a la cual se encontró que la astaxantina tiene su absorbancia máxima).

Para conocer las cantidades de astaxantina se elaboró una curva de calibración empleando pigmento sintético (Carophyl pink^{MR}), el cual contiene 8% de astaxantina, correlacionando diversas concentraciones del pigmento con las áreas correspondientes obtenidas en el cromatograma.

En la figura 15 se visualiza un esquema general del análisis del contenido de astaxantina en los extractos provenientes de los dos tipos de residuos.

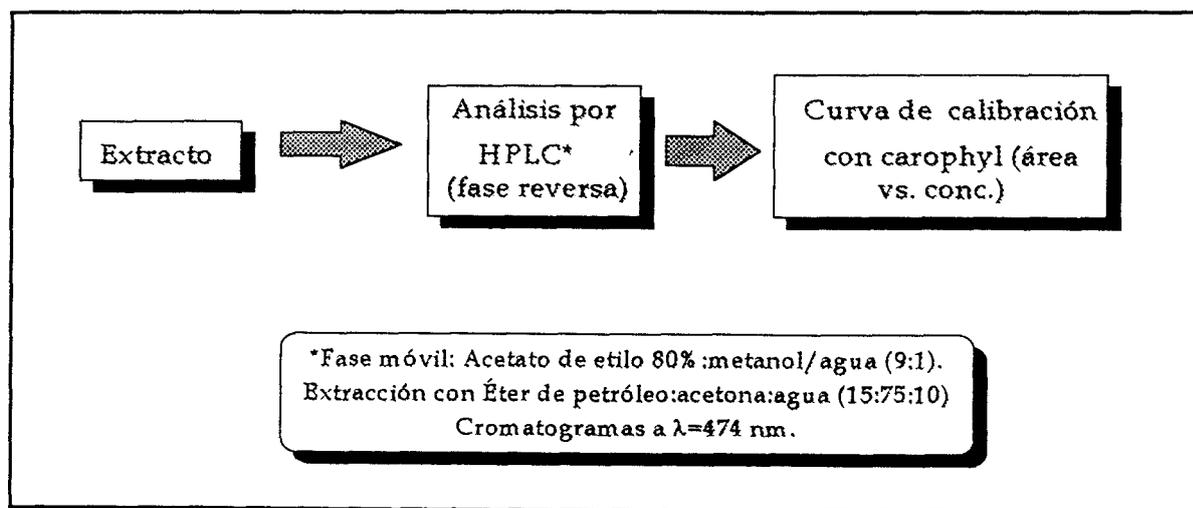


Figura 15. Análisis de astaxantina en residuos fermentados y no-fermentados.

6.4 Concentración del extracto

Cuando se encontró el sistema de solventes más eficiente y la metodología más adecuada para la extracción de pigmentos, los extractos fueron congelados con

nitrógeno líquido o en su caso mediante ultracongelación (ultracongelador Biofreezer Revco-Forma Scientific, Fullerton, CA) y posteriormente liofilizados (liofilizador LABCONCO-Freeze Dry System 4.5 Liter Model 77510, Chicago, IL), obteniéndose un concentrado de carotenoproteína en forma de polvo, estos liofilizados se logran partiendo de un volumen inicial de 150-200 ml en cada recipiente, en un tiempo aproximado de 12 horas a -45°C y $90-150 \times 10^{-3}$ mBar.

6.5 Hidrólisis del complejo pigmento-proteína (carotenoproteína)

6.5.1 Método enzimático

Se probaron cuatro tratamientos enzimáticos con diferentes proteasas, el primero con la enzima comercial savinasa, el segundo con una proteasa proveniente del retenido resultante del licor de fermentación de camarón sometido al proceso de ultrafiltración con un corte de membrana de 10,000 Da, suministrada amablemente por la M. en B. Keiko Shirai de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, el tercer tratamiento se realizó con tripsinā y el cuarto con una mezcla de cuatro enzimas comerciales (savinasa:neutrasa:alcalasa:esperasa). Las características de las enzimas proteolíticas comerciales se muestran en la tabla 7.

6.5.2 Determinación de actividades enzimáticas

Se determinaron las actividades enzimáticas de las enzimas, para conocer con que cantidad de cada una se lograrían las 5 unidades de actividad enzimática específica (U.A.) para el sistema.

Para determinar las actividades proteolíticas (Kunitz, 1947) se empleó caseína al 1% (Hammarsten, Merck) como sustrato (p/v), la cual fue disuelta en 50 ml de solución

amortiguadora de fosfatos de sodio 0.05 M, a esta solución se le aplicó agitación continua en baño María durante 20 minutos a temperatura de ebullición. Después de enfriar se ajustó el pH a 7.0, medido en un potenciómetro.

Tabla 7. Características de las enzimas proteolíticas empleadas en el sistema.

Origen	Tipo	Actividad	Aplicaciones
Neutra de <i>Bacillus subtilis</i> *	Preparación enzimática con dos tipos de proteinasas: neutra y alcalina	Condiciones estándar 25°C, pH 7.5. Condiciones óptimas de trabajo: 45-55°C y pH 5.5 a 7.5	Pueden ser utilizadas en aplicaciones alimentarias (FAO/WHO). Se utilizan en la industria cervecera como substitutos de proteinasas de malta; para modificar o mejorar proteínas de origen vegetal y animal; hidrólisis de materiales proteínicos para producción de péptidos y aminoácidos.
Alcalasa de <i>Bacillus licheniformis</i> *	Alcalinas moderadas	Condiciones estándar 50°C, pH 8.3. Condiciones óptimas de trabajo: 50-60°C y pH 8.5.	Es utilizada en formulaciones de detergentes, para ayudar a remover manchas de tipo proteico.
Esperasa especies alcalofílicas de <i>Bacillus</i> *	Remarcablemente activa bajo condiciones altamente alcalinas	Condiciones estándar 50°C, pH 8.3. Condiciones óptimas de trabajo: 50-60°C y pH 10.1	Es utilizada en formulaciones de detergentes alcalinos y que pueden contener hipocloritos, para ayudar a remover manchas de tipo proteico.
Savinata especies alcalofílicas de <i>Bacillus</i> *	Alcalinas moderadas	Condiciones estándar 50°C, pH 8.3. Condiciones óptimas de trabajo: 50-60°C y pH 10.1	Es utilizada en formulaciones de detergentes, para ayudar a remover manchas de tipo proteico.
Tripsina de páncreas de bovino**	Neutra	Condiciones 25°C, pH 8.0	Hidrólisis de proteínas, péptidos, amidas y ésteres especialmente en los enlaces éster y amida en posición carboxilo de L-arginina y L-lisina.

*Fuente: Novo Enzymes, 1997.

**Fuente: Merck, 1997.

A un ml de sustrato se le adicionó 0.15 ml de enzima o en su caso una solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M (blanco), se incubaron por 20 minutos a 40°C. La reacción se detuvo con la adición de 2 ml de solución al 5% (p/v) de ácido tricloroacético (TCA). A los tubos testigo se les adicionó 0.15 ml de enzima después de que se paró la reacción, para estandarizar a cero la proteína de la propia enzima. Posteriormente los tubos se agitaron y se tomaron 1.5 ml para depositarlos en viales,

los cuales fueron centrifugados por 15 minutos a 12,000 rpm en microcentrífuga para viales Sorvall^{MR} MC12C. A los sobrenadantes resultantes se les determinó absorbancia a 280 nm (figura 16).

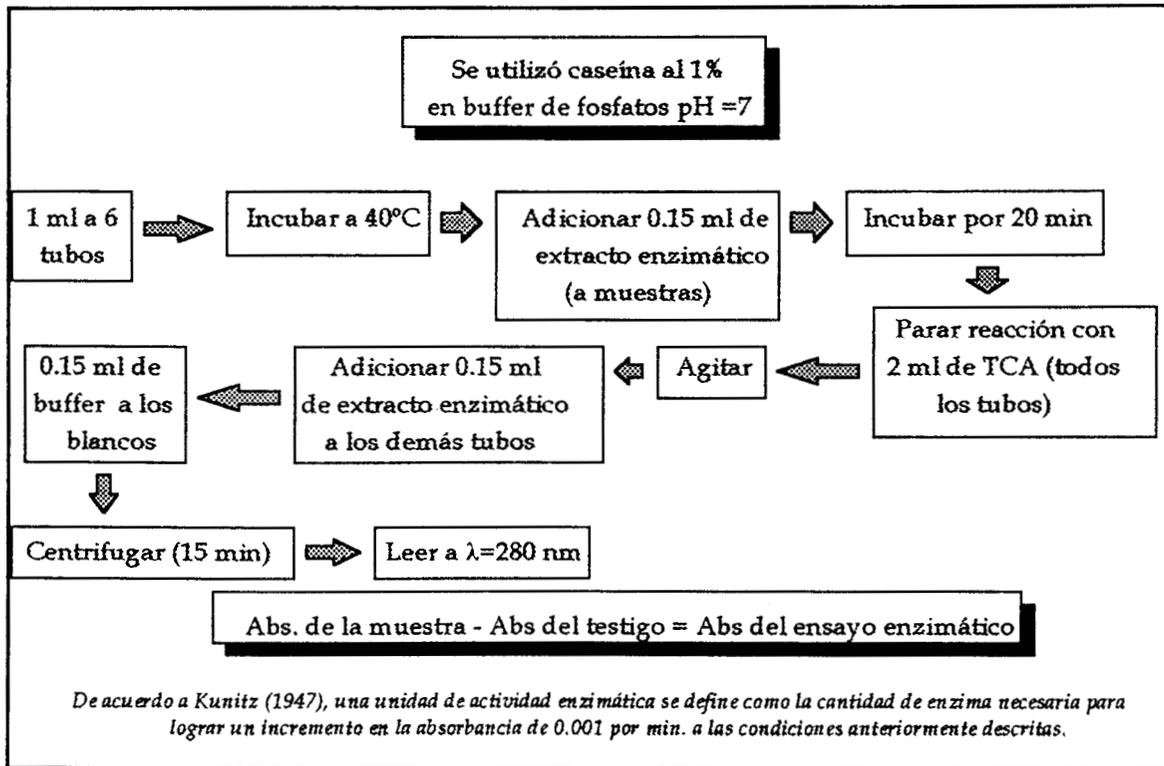


Figura 16. Procedimiento general para la determinación de actividades proteolíticas.

6.5.3 Descripción del sistema enzimático

Después de conocer las cantidades necesarias de cada una de las enzimas para lograr 5 U.A., se procedió al establecimiento de las mejores condiciones del sistema para la mayor hidrólisis del complejo pigmento-proteína.

Se probaron 5 distintos tratamientos enzimáticos (5 U.A. en cada uno):

- Savinasa.

- Proteasa de camarón (obtenida del retenido del procesado del licor de fermentación de camarón por ultrafiltración con un corte de membrana de 10,000 Da).
- Tripsina.
- Mezcla de savinasa:neutrasa:alcalasa:esperasa (1.25 U.A. de cada una).

El procedimiento general establecido se visualiza en la figura 17. Primeramente se emplearon tubos de ensaye de 20 ml, cubiertos con papel aluminio para proteger al pigmento de la luz, en los cuales se depositaban 10 ml de solución amortiguadora de fosfatos de sodio (0.05 M) con una concentración de 0.5 mg/ml de carotenoproteína liofilizada y las 5 U.A. enzimática, todo el sistema a un pH de 7.0, una temperatura de 40°C y una agitación moderada de 70-80 rpm. Transcurridas 0, 12 y 24 horas, en cada uno de estos lapsos se cuantificó la proteína soluble (ver sección 6.5.3.1) y xantofilas totales (ver sección 6.3.1).

Después de conocer el tratamiento más eficiente para la hidrólisis de la carotenoproteína, se establecieron algunos cambios en la metodología del sistema enzimático, siendo las condiciones empleadas posteriormente:

- La mezcla de savinasa:neutrasa:alcalasa:esperasa (1.25 U.A. de cada una).
- 1 mg/ml de liofilizado de carotenoproteína y cuantificación de proteína soluble y xantofilas totales sólo a las 24 horas.
- El volumen de trabajo pasó de 10 ml a 1 litro por cada hidrólisis llevada a cabo en frascos de vidrio con tapa de plástico con capacidad para 1 litro, cubiertos con papel aluminio para evitar la oxidación del pigmento.

Estos sistemas al igual que al principio se incubaron a 40°C con una agitación moderada de 70-80 rpm en una incubadora con agitación orbital (Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, Chicago, IL).

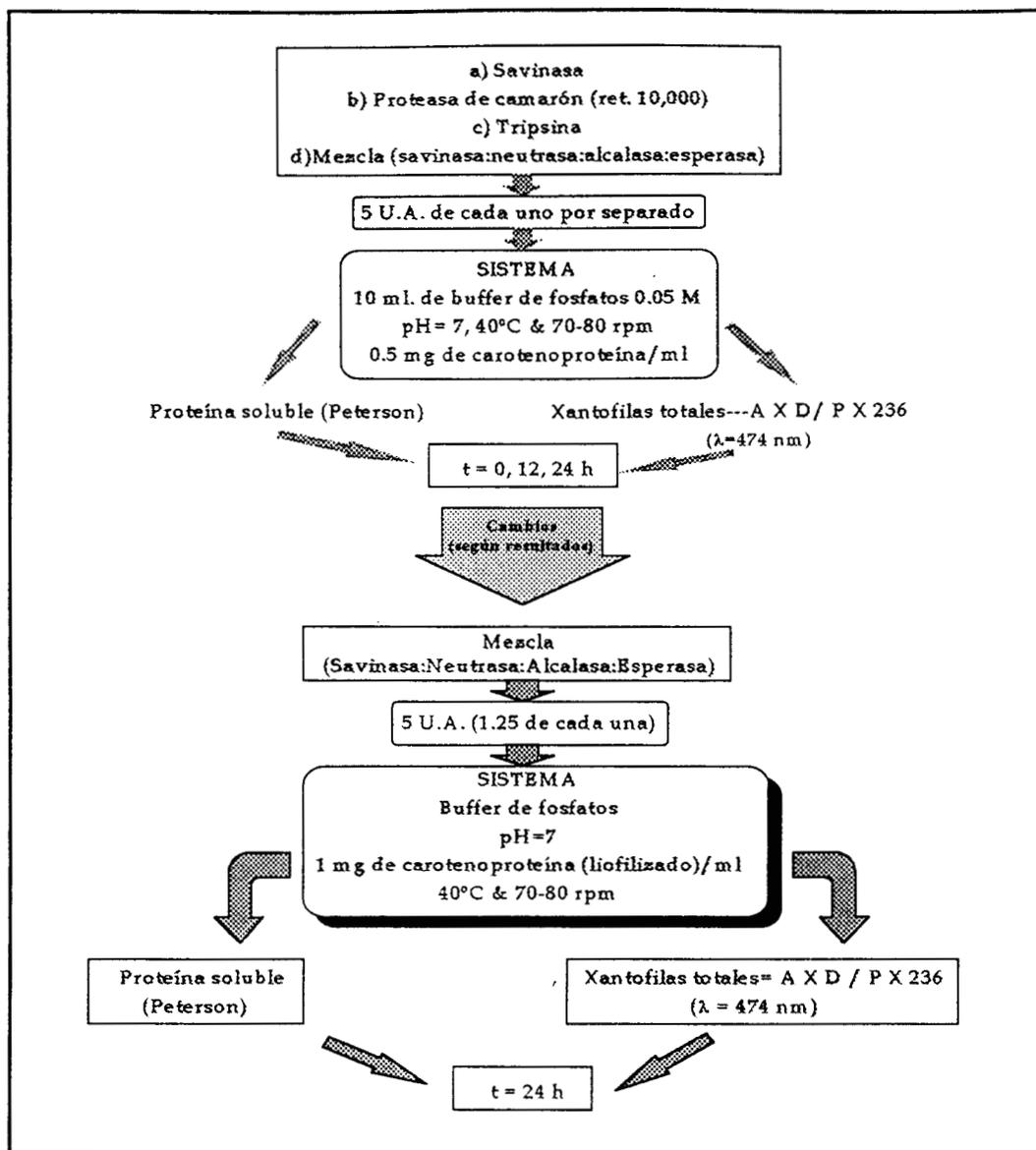


Figura 17. Esquema de la hidrólisis del complejo pigmento-proteína.

6.5.3.1 Análisis de proteína soluble

Para determinar la cantidad de proteína soluble en el sistema y en los hidrolizados resultantes se utilizó el método de Peterson (1977), para la eliminación de interferencia por lípidos mediante el empleo del detergente SDS. La seroalbúmina bovina (Sigma) fue empleada como solución patrón en un rango de concentración de 0 hasta 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Los reactivos empleados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Preparación de reactivos para la determinación de proteína soluble por el método de Peterson

Reactivo	Preparación
A	<p>Mezclar partes iguales de agua y las siguientes soluciones (25% de cada una):</p> <ul style="list-style-type: none"> • Solución de CTC (carbonato tartrato de cobre) el cual se preparó con una solución de Na_2CO_3 (100 g en 500 ml de agua destilada) y se adicionó a una solución de CuSO_4 y tartrato de potasio (1 y 2 g respectivamente en 500 ml de agua destilada). • Solución al 10% de SDS. • Solución 0.8 N de NaOH.
B	Reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma, U.S.A) (1:1).

Se adicionó 1 ml de reactivo A a las muestras o en su caso solución patrón, se mezcló y se dejó reposando por 10 minutos a 25°C. Después se agregó 0.5 ml del reactivo B y se mezcló agitando con la ayuda de un Vortex "Super Mix" modelo 1290 (Lab-Line, Fullerton, CA) dejándose en reposo por 30 min a 25°C y posteriormente se leyó absorbancia a $\lambda=750$ nm.

6.5.3.2 Análisis de xantofilas totales

Se tomaron unos cuantos mililitros después de agitar la muestra, tanto del sistema sin hidrolizar como del hidrolizado y se leyeron en el espectrofotómetro a una $\lambda=474$ nm, sustituyendo el valor de la absorbancia en la fórmula referida en la sección 6.3.1, con un factor de dilución de 1.

6.6 Concentración de astaxantina por ultrafiltración

Para separar la proteína hidrolizada del pigmento y así lograr concentrar la astaxantina, el hidrolizado resultante de la acción enzimática con el tratamiento de la

mezcla de enzimas, fue sometido al proceso de ultrafiltración (Equipo de ultrafiltración Millipore Cole-Parmer) con membranas anisotrópicas YM (Amicon-stirred cells) con un corte de 50,000 Da.

Los volúmenes de trabajo por cada proceso de ultrafiltración fueron de 500 ml y el flux manejado de 5 ml/min. Para efectuar el balance de materia se cuantificó proteína soluble por el método de Peterson y xantofilas totales en el hidrolizado antes de filtrar, retenido y permeado (figura 18).

6.7 Estudio de la carotenoproteína y sus fracciones

6.7.1 Determinación del peso molecular de la carotenoproteína y sus fracciones por electroforesis

Se empleó la electroforesis para calcular el peso molecular de la carotenoproteína, el retenido y el permeado con respecto a la curva patrón del log de peso molecular contra R_f , se utilizó un densitómetro Ultrascan XL Pharmacia LKB (Bromma, Suiza) (figura 18).

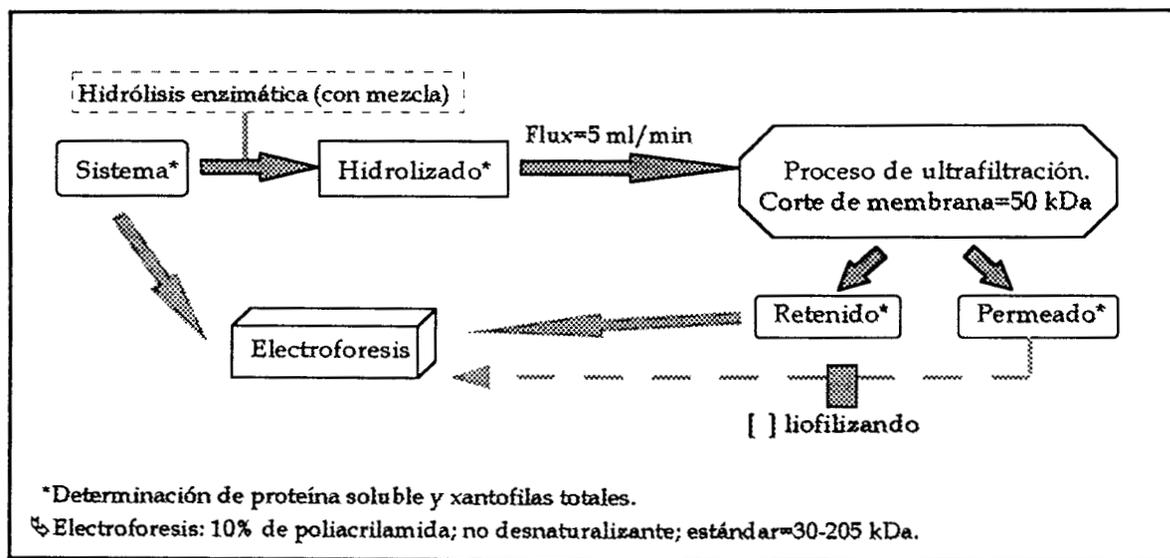


Figura 18. Estudio de las fracciones obtenidas por ultrafiltración del hidrolizado enzimático.

El equipo empleado para la electroforesis fue un Mini-Protean II Slab Cell de Bio-Rad (Reichmond, CA). Se utilizaron geles de poliacrilamida con un gel de separación del 10% y un gel de concentración de 4%, se aplicó un voltaje constante de 200 Volts durante una hora, posteriormente los geles se tiñeron y fijaron con una solución de azul de Comassie al 1% durante 30 minutos seguido de un revelado con una solución de alcohol etílico al 40% / ácido acético al 10% durante 4 horas efectuando cambios de la solución.

La concentración de proteína en las muestras era de 6-7 mg/ml y el estándar con marcadores de alto peso molecular (SIGMA) cubriendo un rango de peso molecular entre 30 y 205 kDa.

Debido a la baja concentración de proteína en el permeado, fue necesario liofilizarlo para concentrar y obtener la concentración requerida (5 mg/ml), y poder someter esta fracción proteica a electroforésis.

6.7.2 Determinación de pesos moleculares de péptidos por filtración en gel

Se utilizó la filtración en gel para conocer el peso molecular de los péptidos resultantes de la hidrólisis enzimática de la carotenoproteína con la mezcla de 4 proteasas comerciales (savinasa:neutrasa:alcalasa:esperasa). El equipo está constituido por una columna Sephacryl-100-R, un detector Bio-Rad Econo UV Monitor, un sistema de control Bio-Rad Econo-System Controller, un sistema de bombeo Bio-Rad Econo-Pump, un colector de fracciones Pharmacia Biotech Frac-100, y un graficador de cromatogramas Bio-Rad Model 1325 Econo-recorder.

La columna empleada, con un intervalo de separación entre 1000 y 100,000 Da, fue equilibrada y eluida con una solución amortiguadora de fosfatos de sodio 0.05 M con un pH=7.5 conteniendo 0.02 M de KCl reportado por Muriana y col. (1993).

Para la determinación del peso molecular se utilizó ribonucleasa A (13,700 Da), quimotripsinógeno A (25,000 Da), ovalbúmina (43,000 Da), y albúmina (67,000 Da) como marcadores (Pharmacia Biotech), obteniéndose una curva de calibración del log de peso molecular contra K_{av} (constante obtenida con los diferentes volúmenes manejados en la columna).

$$K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$$

Donde:

V_e = Volumen de elución (volumen al cual se obtiene la cresta del pico).

V_o = Volumen vacío de la columna = 166 ml

V_t = Volumen total de la columna = 466 ml.

Se inyectaron 10 ml de muestra con una concentración de 5 mg/ml de proteína, dicha muestra estaba constituida por un liofilizado del hidrolizado enzimático.

El tiempo total de corrimiento fue de 22 horas resultando un total de 132 fracciones de 3.5 ml cada 10 minutos (6 fracciones por hora), a partir de la fracción número 48 (término del volumen vacío) se empezaron a recolectar en tubos de policarbonato con 6 ml de capacidad, cuantificándose proteína soluble por el método de Peterson.

6.8 Contenido de astaxantina en fracciones

Todas las fracciones manejadas, solución con la carotenoproteína sin hidrolizar, hidrolizada, retenido y permeado, fueron sometidas al análisis por HPLC para determinar la concentración de astaxantina en cada una de ellas (figura 19).

Para este estudio se manejaron volúmenes de 50 μ l de cada fracción para inyectarlos en el HPLC. Las condiciones son las señaladas en la sección 6.3.2.

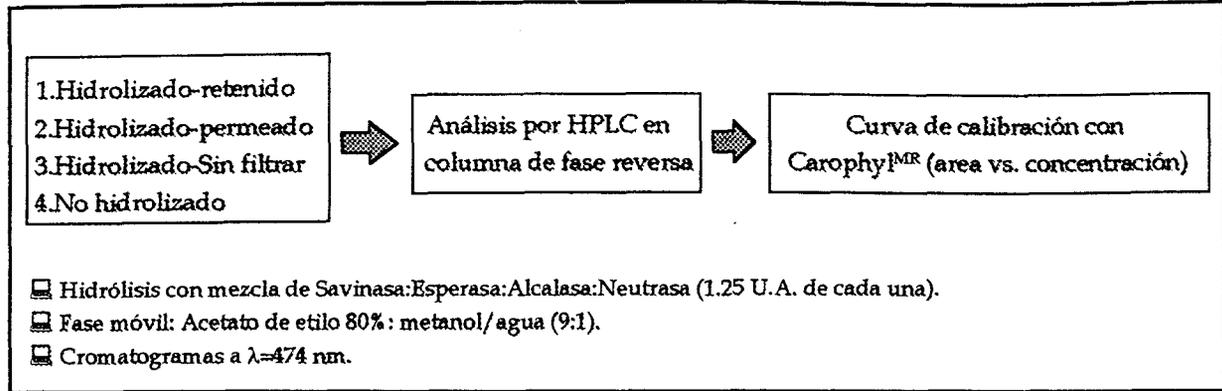


Figura 19. Análisis del contenido de astaxantina en fracciones.

6.9 Efecto de antioxidantes

Se analizó el efecto de antioxidantes en la estabilidad o grado de oxidación de la astaxantina, para esto se utilizaron dos tratamientos, uno empleando la mezcla sinergista de BHA:BHT (1:1) en una proporción del 0.01% con respecto a la cantidad de residuo de camarón (0.01 g de la mezcla de antioxidantes por cada 100 g de residuo), por otro lado se utilizó aceite esencial de romero en la misma cantidad con respecto al residuo (0.01%), y por último un testigo sin la adición de ninguna sustancia antioxidante.

Se llevaron a cabo las extracciones con el sistema de solventes éter de petróleo:acetona:agua (15:75:10) y después de las 3 horas de procedimiento extractivo los extractos resultantes con cada uno de los antioxidantes fueron sometidos a análisis por HPLC, los cuales fueron inyectados directamente en volúmenes de 50 μ l al HPLC bajo las condiciones descritas en la sección 6.3.2 (figura 20).

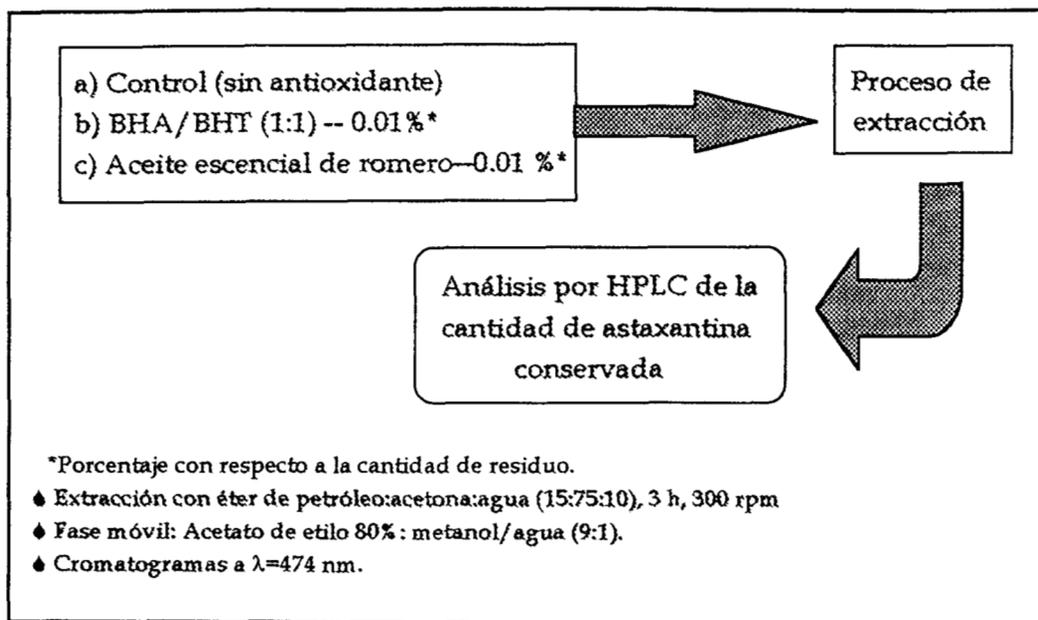


Figura 20. Análisis del efecto de antioxidantes en la conservación de la astaxantina.

Se realizó un análisis más con los extractos obtenidos, el cual consistió en almacenarlos a temperatura ambiente (25°C) por 6 semanas, y después someterlos de nuevo a la cuantificación de astaxantina en cada uno de ellos (a la semana 1 y 6), para conocer que antioxidante mantenía su acción a través del tiempo.

6.10 Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos a un procedimiento de análisis de varianza y de comparación (Steel y Torrie, 1988). De esta forma se dió validez estadística a la conclusión sobre:

- ☒ El microorganismo más eficiente en la reducción del pH.
- ☒ El sistema óptimo en la extracción de pigmentos.
- ☒ El tipo de residuo donde hay mayor concentración de pigmento en forma de astaxantina.
- ☒ El tratamiento enzimático óptimo para lograr la mayor hidrólisis del complejo pigmento-proteína.

-
- ☒ La fracción resultante de la hidrólisis enzimática y posterior separación por ultrafiltración con mayor concentración de astaxantina.
 - ☒ Cual de los antioxidantes ofreció una mayor protección de la estructura química de la astaxantina.

Para estos análisis se utilizó un paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System), adaptado a una computadora personal (SAS Institute, 1992).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Fermentación

En la tabla 9 se muestran los promedios de pH de un total de 8 fermentaciones llevadas a cabo con los distintos cultivos iniciadores, estos valores se emplearon para la elaboración de la gráfica de pH de las fermentaciones (figura 21), donde se visualiza que la cepa de *Lactobacillus sp.*, fue la que logró disminuir en mayor grado el pH al término de 48 horas que duró la fermentación ($P > 0.0001$), ya que con este cultivo iniciador se logró descender el pH a valores muy cercanos a 4.0.

Tabla 9. Promedio de pH de 8 fermentaciones.

Microorganismo	pH en tiempo = 0	pH en tiempo = 24 Hrs	pH en tiempo = 48 Hrs
<i>Lactobacillus sp.</i>	7.67	5.08	4.21
<i>P. pentosaceus</i>	7.67	5.52	4.93
<i>S. carnosus</i>	7.67	5.44	4.72

Entre *S. carnosus* y *P. pentosaceus* estadísticamente no se encontró diferencia significativa en el decremento del potencial de hidrógeno.

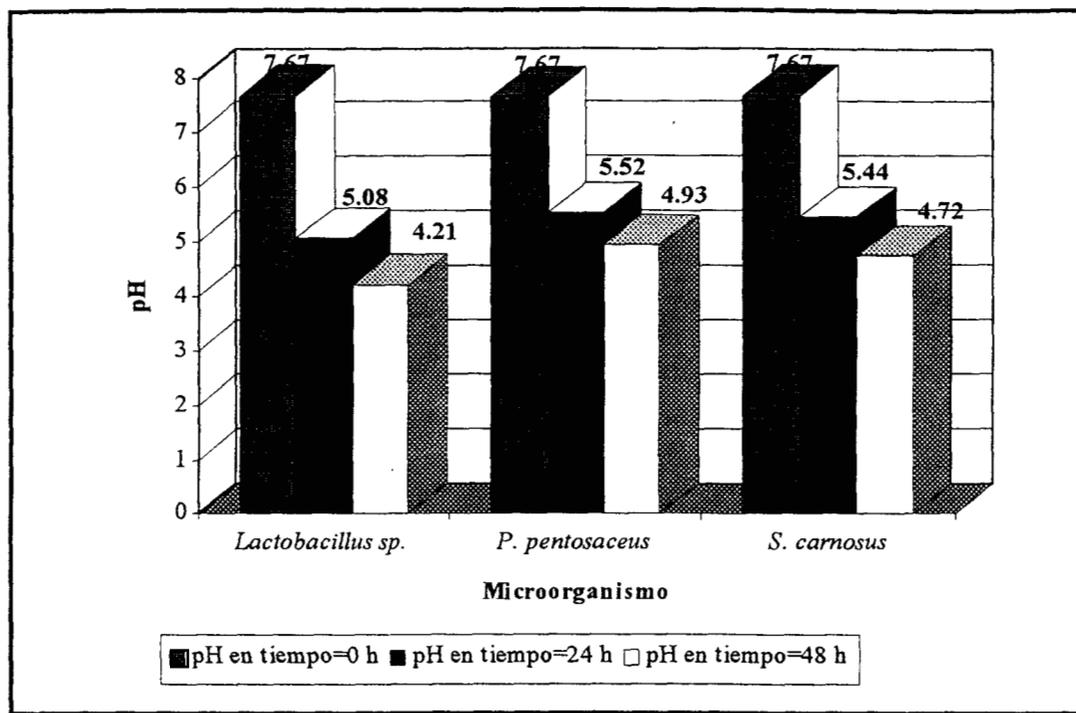


Figura 21. pH después de 48 h de fermentación.

El hecho de que la cepa *Lactobacillus sp.* resultara la más eficiente en la disminución del pH en la fermentación de los residuos de camarón puede explicarse de acuerdo a la naturaleza de esta bacteria, ya que esta fue aislada de camarón de Sri Lanka por la Dra. Zainoha Zakaria (Universidad de Loughborough), lo cual puede ser la causa de que en un subproducto marino como los residuos de camarón, esta logre producir en mayor grado ácido láctico y por consecuencia disminuir el pH; por parte de *P. pentosaceus* y *S. carnosus* que disminuyeron en menor proporción el potencial de hidrógeno, se ha observado que donde logran su mayor producción de ácido láctico es en carne de cerdo, siendo este efecto más marcado por parte de *S. carnosus*.

7.2 Extracción de pigmentos

En la tabla 10 se muestran los promedios de las xantofilas totales de las 6 extracciones realizadas con los distintos sistemas de solventes y el aceite de soya, estos valores se emplearon para la elaboración de la gráfica con los promedios de xantofilas totales de las extracciones (figura 22), donde se visualiza que el sistema de solventes más eficiente fue el referido por Meyers y Bligh (1981), el cual esta formado por éter de petróleo:acetona:agua (15:75:10) ($P>0.0001$).

Tabla 10. Valores promedios de xantofilas totales ($\mu\text{g/g}$) de 6 extracciones.

Sistema de solventes	Residuo fermentado con <i>Lactobacillus sp.</i>	Residuo no-fermentado
Agua:cloroformo:metanol (1:2:4)	20.710	21.012
Éter de petróleo:acetona:agua (15:75:10)	22.085	23.495
Etanol:agua (40:60)	14.271	15.419
Aceite de Soya	17.102	17.917

La segunda mezcla en eficiencia fue la de cloroformo:metanol:agua (1:2:4) ($P>0.0001$), en tercer término se ubicó el aceite de soya y el sistema con el que se obtuvo la menor cantidad de xantofilas totales fue con la mezcla etanol:agua (40:60).

Ante el hecho de que podría cuestionarse la comparación del aceite de soya con sistemas de solventes, indudablemente con mayores ventajas extractivas, es importante mencionar que el objetivo principal fue el conocer su rendimiento en la extracción de pigmentos bajo estas condiciones, debido a que el aceite de soya tiene una ventaja sobre los demás sistemas de solventes, porque si el pigmento tiene el fin de pigmentar especies salmónidas, el extracto puede ser empleado directamente (después de peletizarlo) en la dieta del pez. Al tener los resultados de la extracción se decidió realizar la comparación con los sistemas de solventes, alcanzando, como se mencionó anteriormente, rendimientos por encima del tratamiento con el sistema etanol:agua (40:60).

Es importante mencionar que se decidió emplear aceite de soya para la extracción debido a que después del proceso extractivo, este puede ser directamente aplicado en las dietas de los salmónidos después de peletizarlo

Las cantidades de xantofilas cuantificadas en primera instancia son aceptables, considerando que su cantidad en realidad es todavía mayor, debido a que gran parte de los pigmentos todavía se encuentran unidos a proteínas, las cuales provocan interferencia en el análisis espectrofotométrico, impidiendo la absorción de luz por parte del pigmento.

Aunque es difícil establecer una comparación en el rendimiento de pigmentos en la extracción, debido a que se emplean distintos tipos de residuos de crustáceos, diferentes especies de camarón y distintos sistemas de extracción, con el sistema empleado en este trabajo se lograron mayores cantidades, en cuanto a pigmentos totales, que las reportadas por varios autores como Shahidi y Synowiecki (1991) y Torrissen y col. (1989).

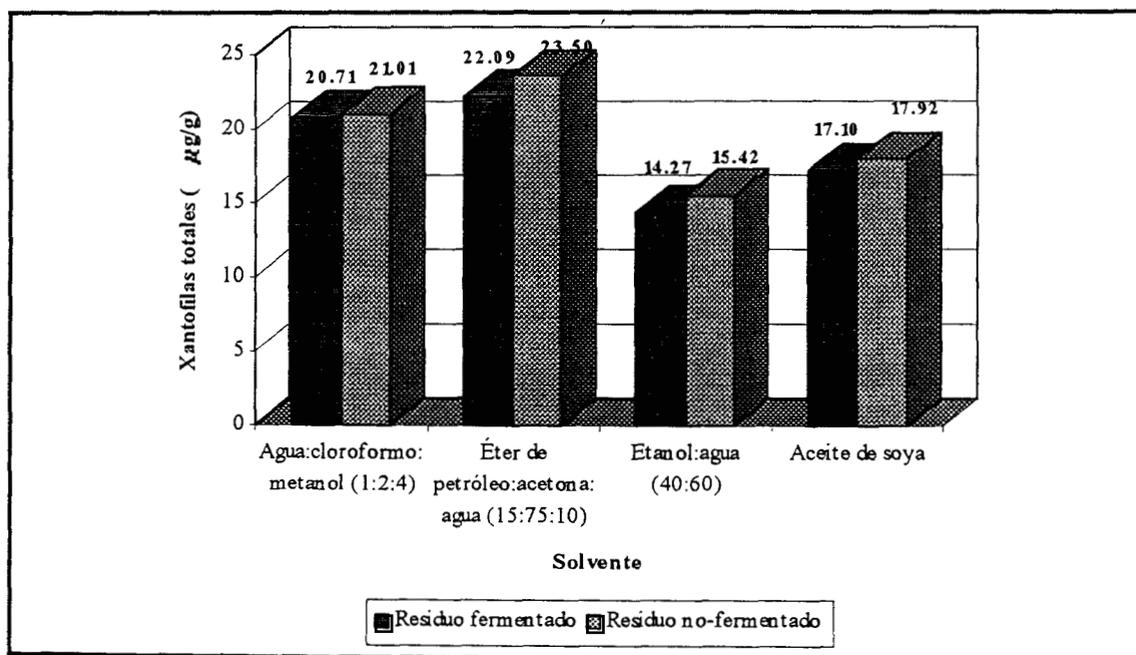


Figura 22. Xantofilas totales en extractos.

En la figura 22 puede observarse que con todos los sistemas de extracción (solventes y aceite de soya), las cantidades de xantofilas totales fueron ligeramente mayores partiendo de residuo de camarón no fermentado que las obtenidas partiendo de residuo fermentado, y aunque la diferencia no fue significativa ($P > 0.0001$), fue esta la razón por la cual se analizó por HPLC la cantidad específicamente de astaxantina en cada uno de los residuos, para conocer la proporción de este pigmento en la cantidad total de xantofilas totales.

Con la mezcla de éter de petróleo:acetona:agua (15:75:10) se logró una mayor extracción de pigmentos, debido a que este sistema tiene una naturaleza no polar, mayor que la que posee la mezcla de agua:cloroformo:metanol (1:2:4) y el sistema etanol:agua (40:60). Este carácter no polar influye directamente en la eficiencia de extracción de astaxantina, ya que este pigmento puede considerarse en mayor medida no polar a causa de la larga cadena hidrocarbonada de unidades de isopreno que contiene, y aunque también puede tener en su estructura 2 grupos hidroxilo y 2 grupos carbonilo en los anillos de β -ionona, en crustáceos, según Torrisen y col. (1989) y Storebakken (1992), la astaxantina se encuentra monoesterificada con algún ácido graso, lo cual indica que sólo tiene disponible un grupo hidroxilo libre, y en cuanto a los grupos carbonilo, estos pueden ser los sitios de unión con proteínas y algunas veces con la quitina por medio de enlaces imino; todo esto indica que la polaridad que pueda tener la astaxantina se ve reducida por su unión con otras biomoléculas, predominando su carácter no polar (apéndice 1).

7.3 Contenido de astaxantina en residuos fermentados y no-fermentados

Se realizó una curva de calibración con Carophyl pink^{MR} obteniendo una ecuación lineal que relaciona área contra concentración, con un factor de correlación $r = 0.9853$.

En la figura 23 se muestra la señal que ofreció la astaxantina en el cromatograma obtenido por medio de HPLC a $\lambda=474$ nm, un poco antes de los 2 minutos se observó una señal provocada por el solvente usado en la extracción de pigmentos (éter de petróleo:acetona:agua) esto se comprobó al momento de inyectar al HPLC las muestras con el carophyl sintético (para la curva de calibración) ya que este colorante se disolvió en agua, y el cromatograma obtenido no presentó la señal que se observa cuando se inyectan los extractos con la mezcla de solventes referida.

Aproximadamente a los 5 minutos de análisis se presentó el pico característico de la astaxantina, las señales detectadas después de los 6.5 minutos fueron otros pigmentos derivados de reacciones de oxidación.

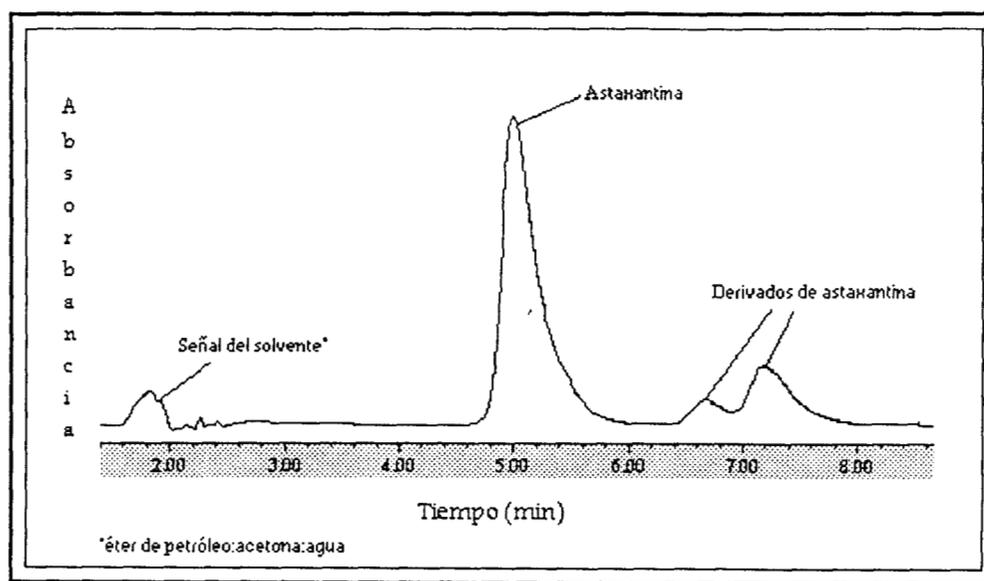


Figura 23. Cromatograma de señales obtenidas al inyectar los extractos.

Al analizar en 7 ocasiones los extractos de residuos fermentados y no fermentados se obtuvo el cromatograma que se muestra en la figura 25, haciéndose notoria la diferencia en las áreas de los picos, la más grande para los residuos fermentados, esto demostró que la fermentación promueve una cantidad mayor de astaxantina ($P>0.0001$) que los no-fermentados (figura 24).

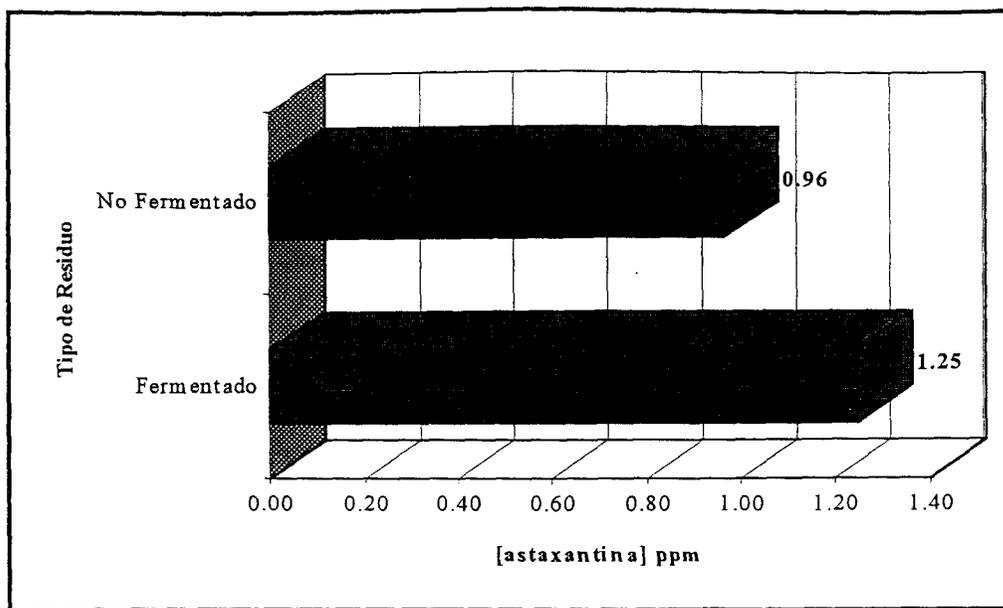


Figura 24. Contenido de astaxantina en residuo fermentado y no-fermentado.

La figura 25 muestra una mayor área en el pico de los pigmentos derivados de la oxidación en los residuos no-fermentados, indicando esto la mayor preservación de la estructura de astaxantina en aquellos residuos que fueron tratados con fermentación láctica.

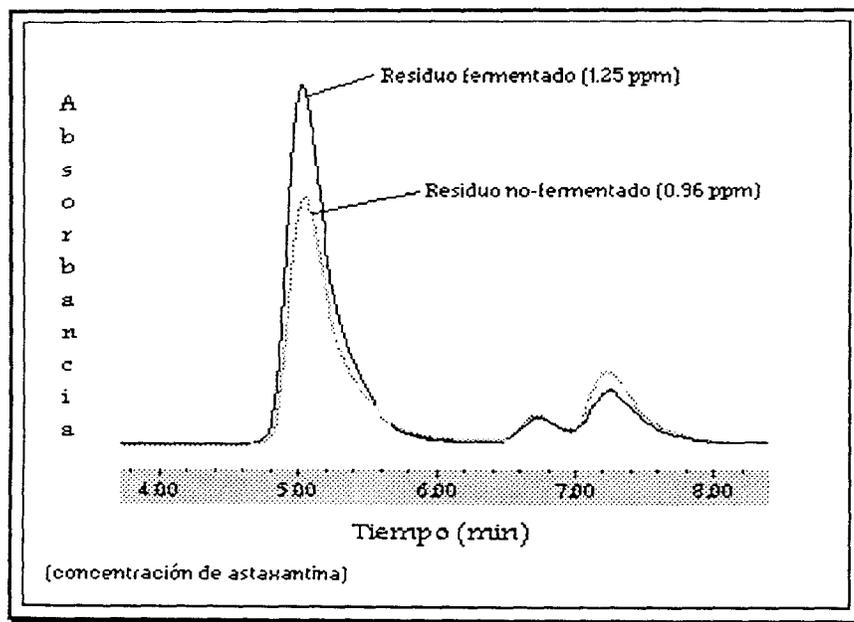


Figura 25. Cromatograma de residuos de camarón fermentados y no-fermentados

La razón por la cual se encuentra más astaxantina en los residuos fermentados puede deberse a dos causas, la primera referida por varios autores (Guerrero y col., 1996; Torrissen y col. 1982; Chen y Meyers, 1983) los cuales mencionan que el ensilado con bacterias lácticas de residuos de crustáceos aumenta la estabilidad de los carotenoides, en este caso la astaxantina, por promoverse un ambiente reductor. La otra razón es que el ensilado provoca la solubilización de las estructuras formadas por calcio en el carapacho del crustáceo, las cuales se conocen como vesículas, que tienen dentro de ellas considerables cantidades de astaxantina que se vuelven disponibles para su extracción (Torrissen y col., 1981).

7.4 Hidrólisis del complejo pigmento-proteína (carotenoproteína)

Para elegir el sistema enzimático más adecuado se utilizaron 0.5 mg/ml de carotenoproteína en sistemas de 10 ml de amortiguador (5 mg de carotenoproteína en total). Los resultados de proteína soluble y xantofilas totales después de 6 hidrólisis enzimáticas mostraron que la mezcla de enzimas comerciales (savinasa:neutrassa:alcalasa:esperasa) en un tiempo de 24 horas fue el tratamiento más eficiente en la hidrólisis del complejo pigmento-proteína ($P > 0.0001$), en segundo término se ubicó la misma mezcla de enzimas pero en tiempo de 12 horas con el mismo nivel de significancia (figuras 26 y 27).

Después de estos tratamientos el que siguió en eficiencia hidrolítica fue con la enzima savinasa en un tiempo de 24 horas ($P > 0.0001$), se decidió emplear esta proteasa individualmente porque de entre las demás enzimas comerciales probadas (esperasa, neutrassa y alcalasa), fue con la que se lograba mayor actividad sobre caseína requiriendo menor cantidad de enzima.

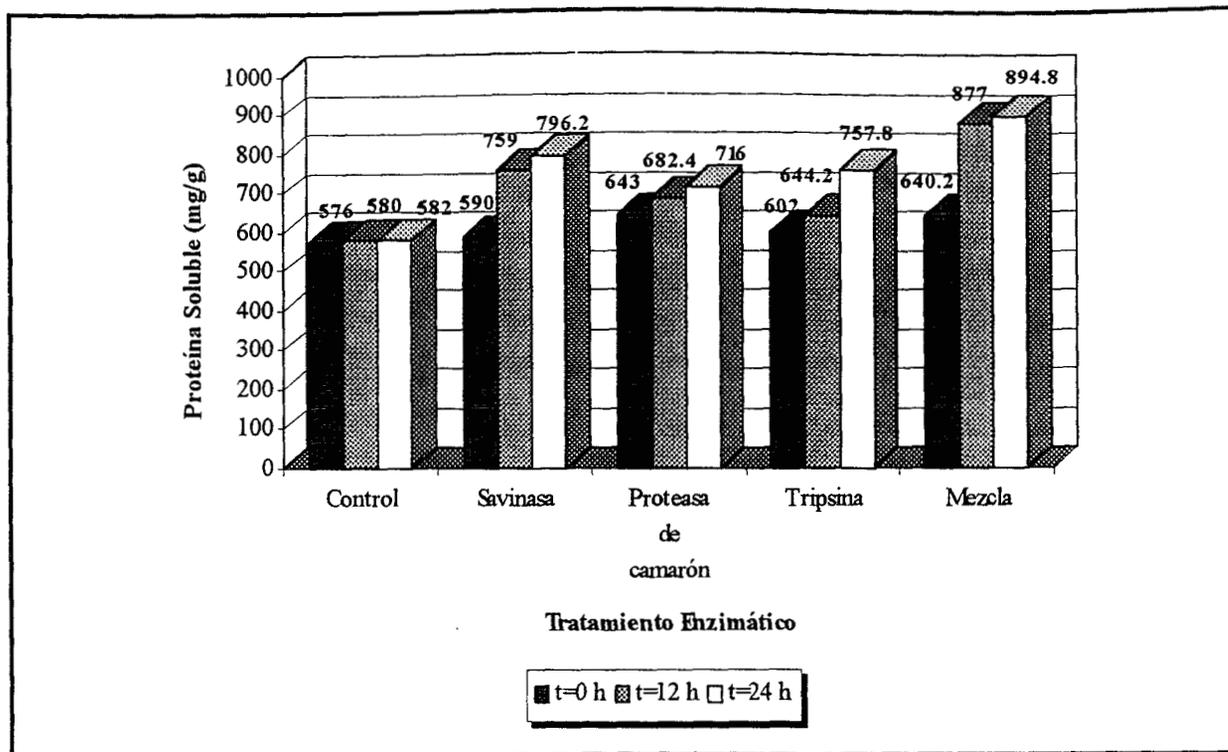


Figura 26. Proteína soluble en la hidrólisis del complejo pigmento-proteína.

Tanto la cantidad de proteína soluble como la de xantofilas totales aumentaron después de la hidrólisis, el mayor incremento se observó a las 12 horas de tratamiento, aunque también se observó efecto de hidrólisis y en consecuencia disgregación del complejo pigmento-proteína a las 24 horas de tratamiento enzimático.

Se decidió emplear tripsina para llevar a cabo la hidrólisis de carotenoproteínas, porque es una de las proteasas más reportadas para estos fines (Cano-López y col., 1987), pero los resultados obtenidos fueron mejores con las enzimas comerciales, inclusive no mostró diferencia significativa con el tratamiento en el que se utilizó proteasa de camarón. Lo que indicó que las proteasas del mismo crustáceo funcionan en la hidrólisis de sus propias carotenoproteínas alcanzándose resultados similares a los obtenidos con tripsina.

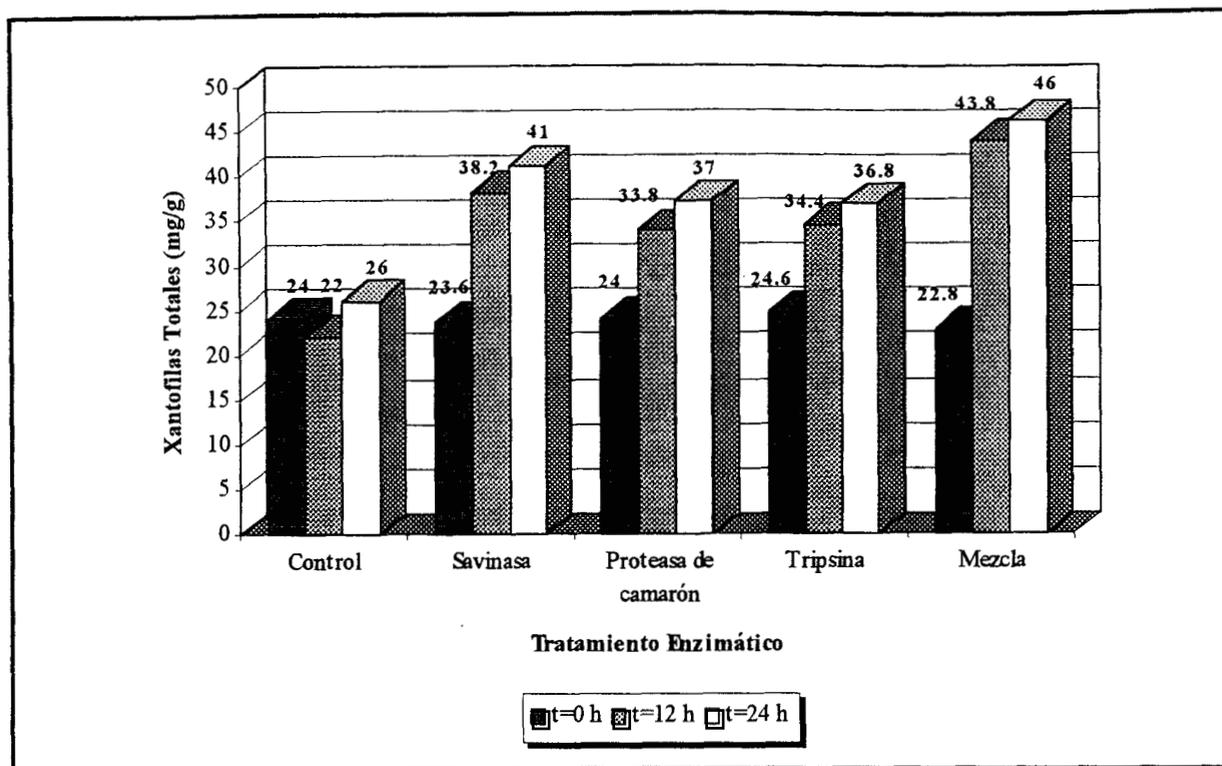


Figura 27. Xantofilas totales en la hidrólisis del complejo pigmento proteína.

Al conocer, según resultados, el tratamiento más eficiente para llevar a cabo la hidrólisis de la carotenoproteína, los hidrolizados posteriores, sometidos a ultrafiltración y análisis de astaxantina por HPLC, se realizaron con 1 mg/ml de carotenoproteína en sistemas de 1 litro de amortiguador (1 g de carotenoproteína) con la mezcla de enzimas comerciales en un tiempo de 24 horas.

Se encontró que la concentración de astaxantina aumenta después del proceso enzimático, esto debido a que al estar el pigmento en estado libre se aumenta la sensibilidad de detección espectrofotométrica ($P > 0.0001$). La figura 28 muestra la cantidad de astaxantina, analizada por HPLC, extraída de material hidrolizado con la mezcla de enzimas comerciales en comparación con residuos no hidrolizados.

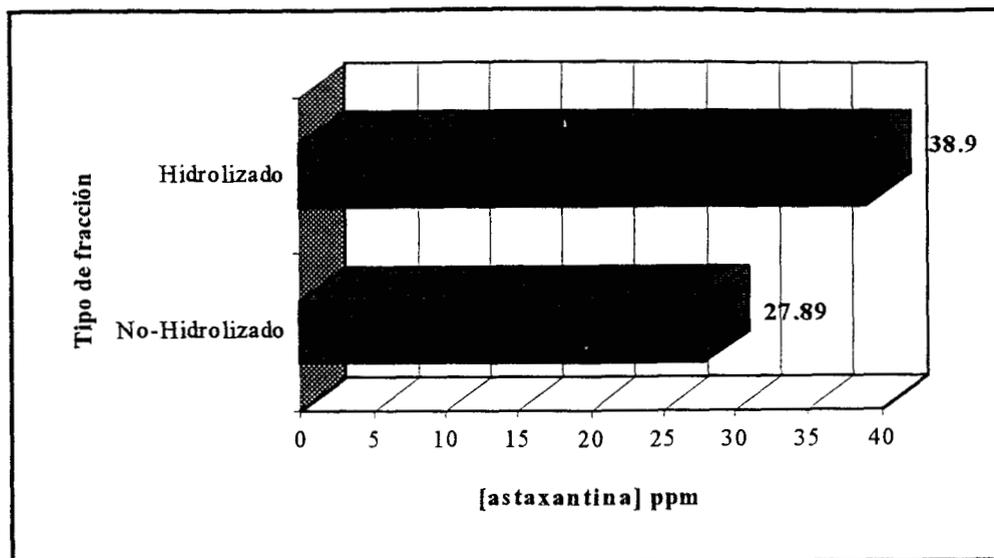


Figura 28. Contenido de astaxantina antes y después de la hidrólisis enzimática con la mezcla de 4 enzimas comerciales.

El motivo por el cual se logró el mayor grado de hidrólisis con las enzimas comerciales puede deberse a sus características de acción, ya que estas son empleadas principalmente en las formulaciones de detergentes para ayudar a remover manchas de tipo proteico, y en especial savinasa puede actuar disolviendo manchas proteicas aún combinadas con grasas (Novo Enzymes, 1997). Este puede ser el factor determinante, ya que en camarón existe una cantidad considerable de grasas, uno de los lugares donde se localizan es en la propia proteína que esta unida al pigmento, en forma de una lipoproteína de alta densidad (HDL).

7.5 Concentración de astaxantina por ultrafiltración

En términos de proteína soluble, mediante el proceso de ultrafiltración empleando una membrana con un corte de 50 kDa, se retuvo la proteína en un 94%, este retenido estaba constituido de péptidos resultantes de la hidrólisis enzimática con pesos moleculares >50 kDa (tamaño de corte de membrana), todos los datos de xantofilas totales y proteína soluble en las fracciones se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Balance general de materia en el proceso de ultrafiltración.

Variable	Hidrolizado (sin filtrar)	Retenido	Permeado
Xantofilas totales (mg)	41.542 + e (100 % + e)	1.01 (2.43%)	48.077 - e (115 %- e)
Proteína soluble (mg)	887.8 (100%)	827.512 (94%)	15.66 (1.77%)

1 g de carotenoproteína en el sistema.

Sólo se cuantificó 1.77% de proteína que atravesó la membrana. Al sumar los porcentajes del retenido y permeado puede observarse que se obtuvo cerca del 100 % inicial (97.77%), la cantidad faltante puede explicarse por la proteína que se perdió en el proceso al quedar en las tuberías del equipo de ultrafiltración.

En cuanto a xantofilas totales, la mayor parte de ellas se encontraron en el permeado, es importante mencionar que los porcentajes que se observaron en el hidrolizado sin filtrar y en el permeado tienen, ya sea sumando o restando, un error el cual se debe al método espectrofotométrico de cuantificación. El método es afectado con el hidrolizado sin filtrar porque no se alcanza a cuantificar la cantidad real de astaxantina debido a que la proteína está hidrolizada y aún solubilizada, provocando una cierta turbidez en el medio. Por otro lado, en el permeado existe muy poca proteína que pudiera influir en la absorción de luz por parte del pigmento, siendo en este caso más acertada la cuantificación.

Fue muy poca la cantidad de pigmentos que quedaron en el retenido (2.43%) lo cual pudo deberse a que la mayor porción de ellos fueron separados de las proteínas o unidos a pequeños péptidos que lograron atravesar la membrana; por otro lado los pigmentos que fueron retenidos se explican porque algunos de ellos quedaron unidos con péptidos de un peso molecular arriba de los 50 kDa.

7.6 Estudio de la carotenoproteína y sus fracciones

7.6.1 Determinación del peso molecular de la carotenoproteína y sus fracciones por electroforesis

Al someter a electroforesis la carotenoproteína, en el retenido y el permeado se obtuvieron valores de Rf que se interpolaron en la ecuación de calibración de Rf contra log de peso molecular ($r=0.9802$), obteniendo los pesos moleculares que se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Pesos moleculares aproximados de carotenoproteína y péptidos en retenido y permeado del hidrolizado enzimático.

Muestra	Rfs.	Peso molecular (kDa)
Carotenoproteína	0.166	265
Retenido	0.632 y 0.672	65 y 55
Permeado	0.906	20

El peso molecular obtenido de la carotenoproteína es parecido al de 280 kDa reportado por Muriana y col. (1993) en camarón *Penaeus japonicus*.

Efectivamente en el retenido se encontraron péptidos con pesos moleculares superiores a los 50 kDa lo cual explica el hecho de no haber podido atravesar la membrana empleada en el proceso de ultrafiltración, mientras que los péptidos de 20 kDa si lo pudieron hacer, pero esta fracción proteica fue muy pequeña, por lo que para poder obtener la concentración requerida para electroforesis fue necesario liofilizar el permeado.

Debido a la posibilidad de que se hubieran generado péptidos con menor peso molecular de los 20 kDa y no ser detectados por electroforesis, ya que saldrían muy rápido del gel, se procedió al análisis por filtración en gel.

7.6.2 Determinación de pesos moleculares de péptidos por filtración en gel

A través de este método se detectaron con mayor exactitud los péptidos producidos por la hidrólisis enzimática de la carotenoproteína.

Para esto fue necesario construir una curva de calibración con estándares de peso molecular conocido donde se relacionó log de peso molecular contra K_{av} con factor de correlación $r = 0.9852$.

Después de las 22 horas de análisis de la muestra se obtuvo el cromatograma que se muestra en la figura 29.

Asimismo se muestran los pesos moleculares obtenidos y la concentración de proteína en cada uno de ellos (tabla 13), observándose que se produjo una mayor cantidad de péptidos arriba de 50 kDa, los cuales en pesos moleculares son similares a los obtenidos por medio de electroforesis.

Otro péptido que también fue detectado por filtración en gel fue el de 18,638 Da que también corrobora el de 20 kDa analizado por electroforesis. También fueron detectados péptidos más pequeños (que no se detectaron por electroforesis) como los de 7748 Da y 3029 Da, pero en muy poca concentración comparado con los péptidos de mayor peso molecular.

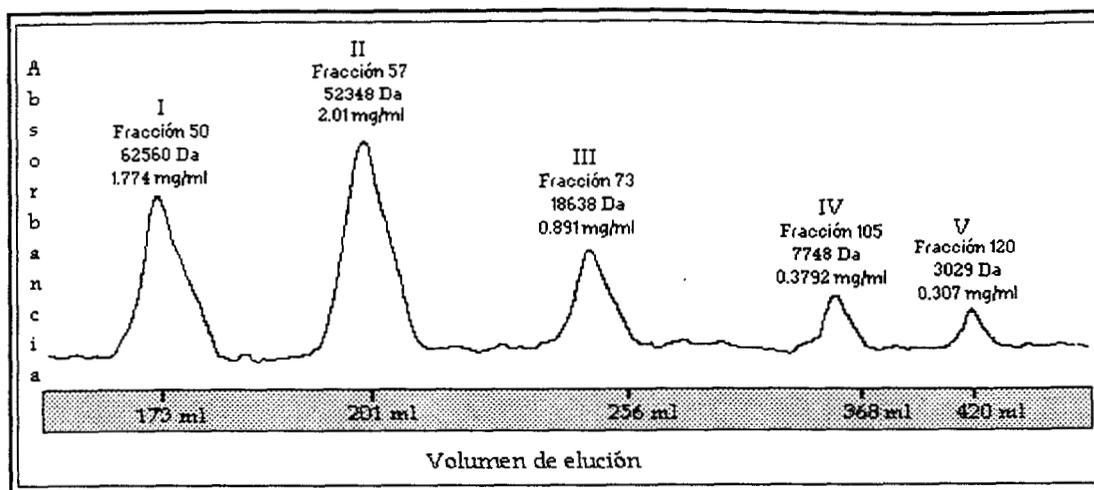


Figura 29. Cromatograma del hidrolizado enzimático de carotenoproteína.

Posiblemente en el hidrolizado hayan existido fracciones proteicas de menor peso molecular, pero el límite inferior de detección de la columna (1000 Da) no permitió detectarlos.

Tabla 13. Pesos moleculares de los péptidos resultantes de la hidrólisis enzimática.

# de pico	# de fracción (3.5 ml c/u)	Peso molecular (Da)	Cantidad de proteína (mg/ml)
I	50	62560	1.774
II	57	52348	2.01
III	73	18638	0.891
IV	105	7748	0.3792
V	120	3029	0.307

7.7 Contenido de astaxantina en fracciones

En la sección 7.4 se reportó el análisis por medio de HPLC del contenido de astaxantina en los sistemas hidrolizado y no-hidrolizado de carotenoproteína, en esta sección se comparan esos resultados con los de las fracciones obtenidas por la ultrafiltración de 7 hidrolizados (retenido y permeado) (figura 30).

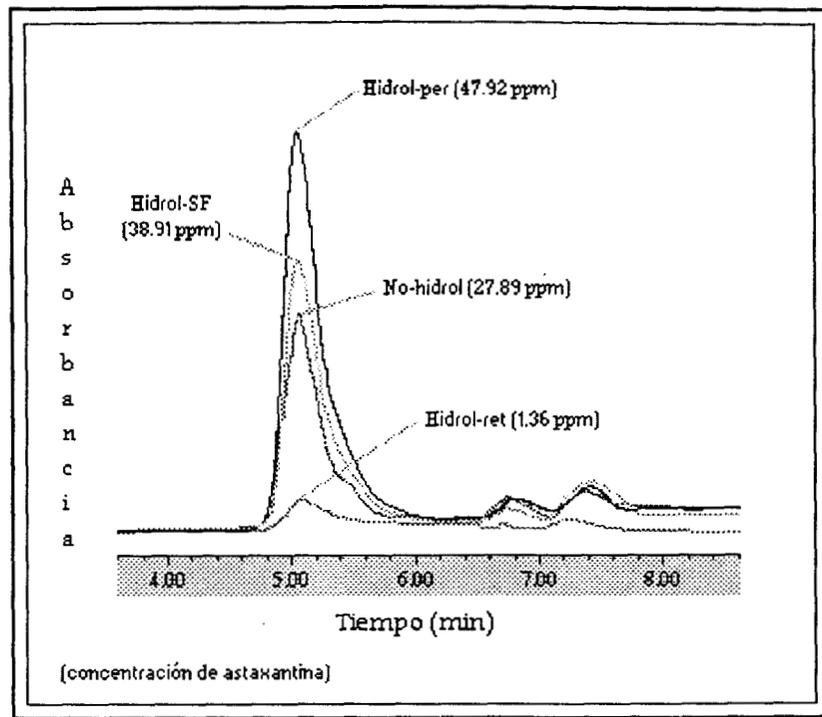


Figura 30. Cromatograma de distintas fracciones (hidrolizado, no-hidrolizado, retenido y permeado).

En estos resultados se observa un incremento en la concentración de astaxantina de la siguiente manera ($P > 0.0001$):

Hidrolizado-retenido < No-hidrolizado < Hidrolizado sin filtrar < Hidrolizado filtrado

Lo cual demuestra que la mayor parte del pigmento logró atravesar la membrana en el proceso de ultrafiltración. La razón por la cual se cuantifican distintas concentraciones de astaxantina en las tres fracciones distintas al hidrolizado-retenido es por el error espectrofotométrico de detección mencionado en la sección 7.4, ya que realmente la cantidad en esas tres fracciones debe de ser la misma, en este caso la cuantificada sin interferencias por la proteína solubilizada en el medio (47.92 ppm) (figura 31).

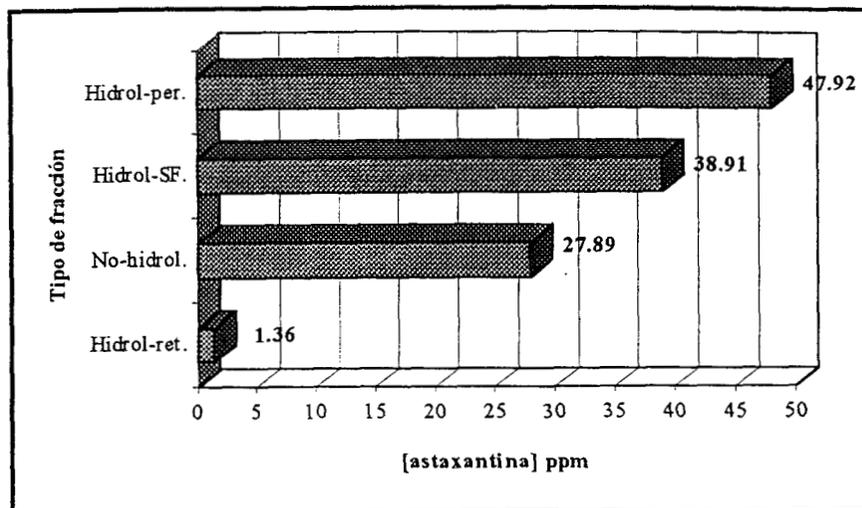


Figura 31. Contenido de astaxantina en fracciones.

7.8 Efecto de antioxidantes

El efecto antioxidante de la mezcla BHA:BHT y aceite esencial de romero, expresado en la conservación de la estructura de la astaxantina en los extractos obtenidos con el sistema éter de petróleo:acetona:agua.

Al cuantificar la astaxantina por HPLC al término de 6 procesos de extracción se encontró que el aceite esencial de romero tiene una alta capacidad de impedir la autooxidación del pigmento, no mostrando diferencia significativa ($P>0.0001$) con el tratamiento con BHA:BHT (figuras 32 y 33). Pero si se observa una diferencia marcable ($P>0.0001$) de estos dos tratamientos con respecto al control.

Sin embargo, los extractos se almacenaron a temperatura ambiente (25 °C) por 6 semanas, y de nuevo se analizó el contenido de astaxantina (en la semana 1 y 6). En los resultados es posible observar que el poder antioxidante del romero decrece considerablemente, especialmente de la semana 1 a la 6, y el que prácticamente logra mantener la misma cantidad de astaxantina es la mezcla sinergista de BHA:BHT, haciéndose notoria la diferencia entre los dos tratamientos ($P>0.0001$) (figura 34 y 35).

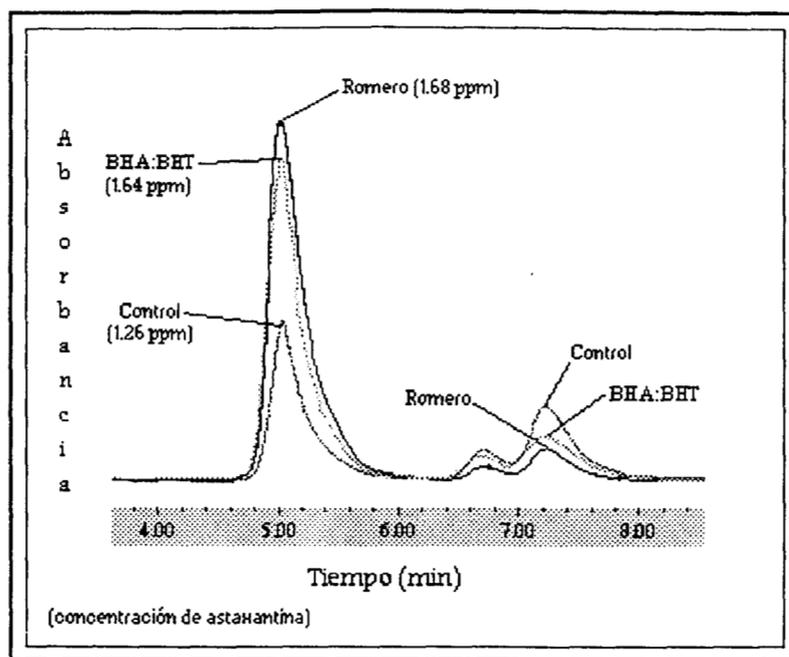


Figura 32. Cromatograma del efecto de antioxidantes en la conservación de astaxantina en los extractos.

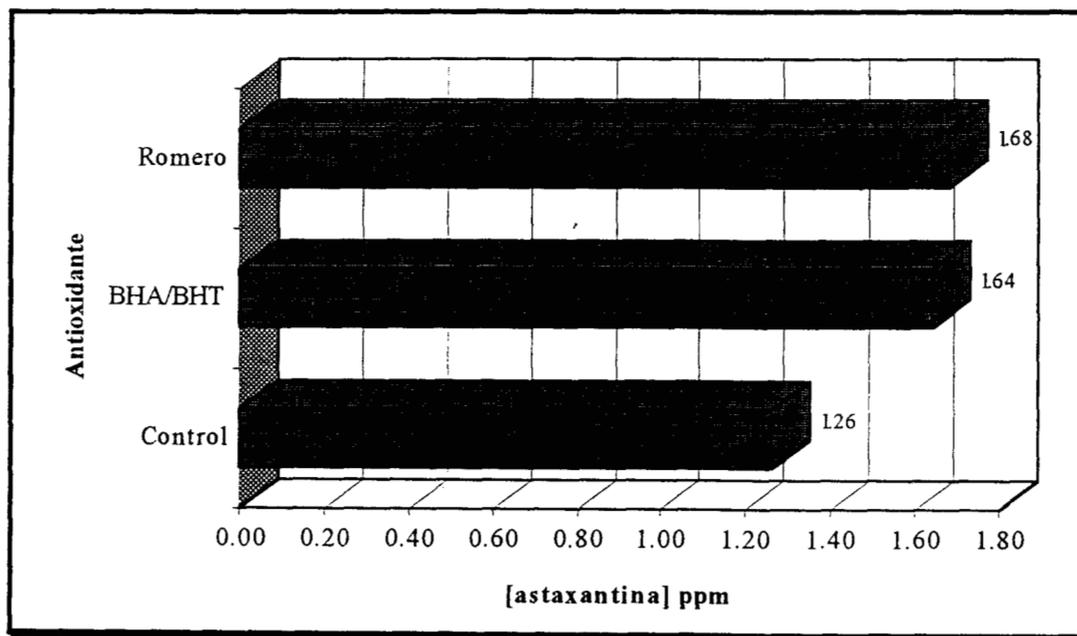


Figura 33. Comparación del efecto antioxidante de BHA:BHT y aceite esencial de romero en la conservación de la astaxantina.

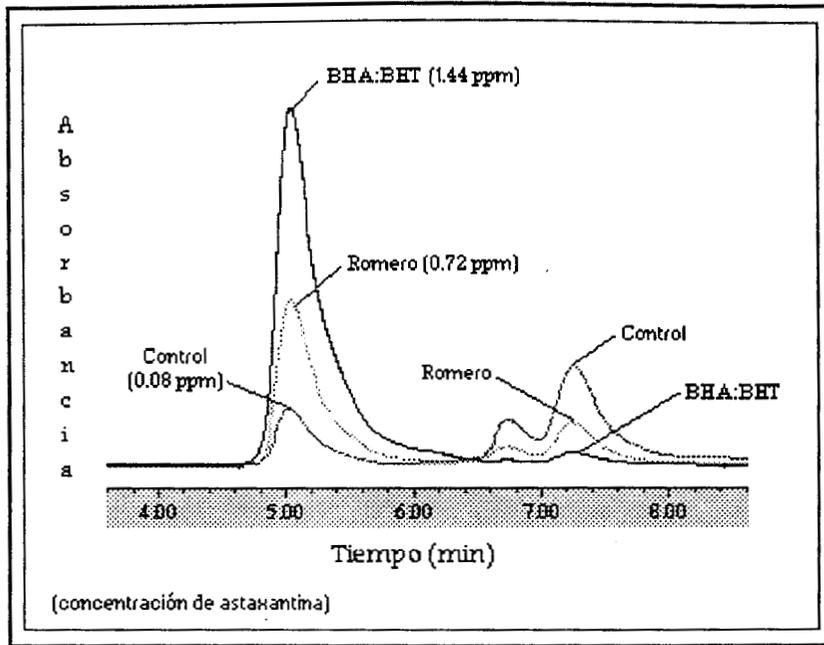


Figura 34. Cromatograma del efecto antioxidante transcurridas 6 semanas.

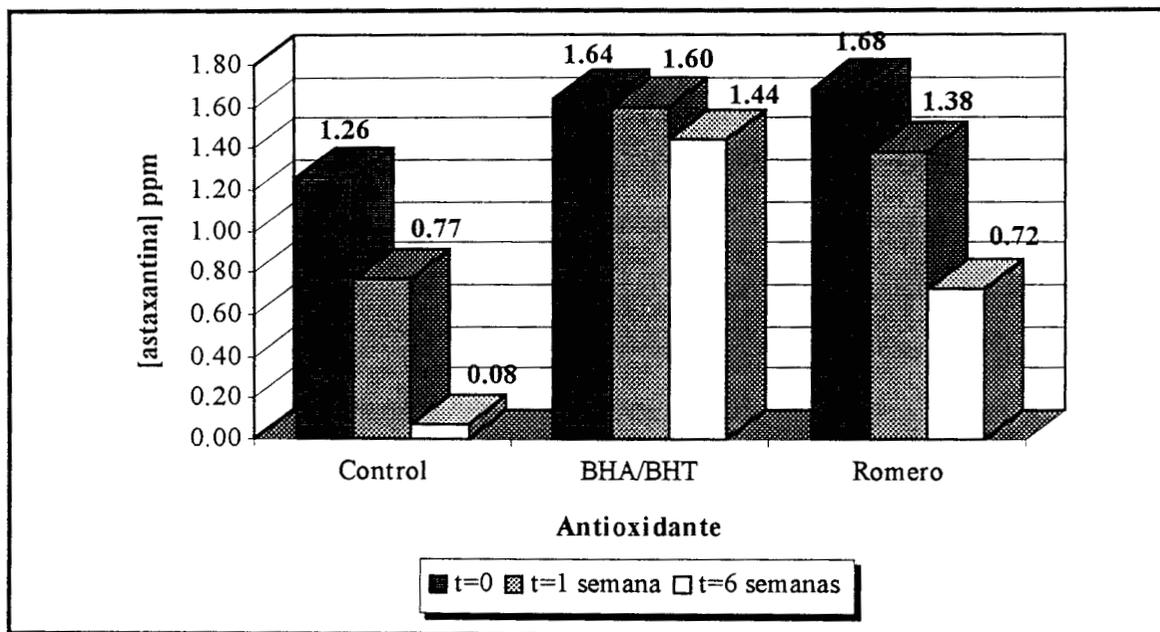


Figura 35. Efecto antioxidante a distintos tiempos (0, 1 y 6 semanas).

El empleo de antioxidantes en la conservación de la estructura de astaxantina es un paso imprescindible en el proceso de extracción, ya que de esto depende la cantidad de pigmento en forma de astaxantina extraída. Según Schiedt y col. (1993), la astaxantina cuando esta unida a la proteína de alta densidad no muestra su color

rojo-anaranjado característico, sino una tonalidad azul (carotenoproteína azul), y no es hasta que el pigmento se desprende de la proteína cuando este manifiesta su color referido anteriormente (rojo-anaranjado). Cuando se inicia la extracción con solvente, la astaxantina en cierto grado es liberada, y esto puede observarse en el color rojo-anaranjado que adquieren los extractos. Simpson (1983), menciona que cuando el pigmento se encuentra libre de proteína este pierde en gran parte su estabilidad, es por esta razón que se tiene que hacer uso de antioxidantes como la mezcla BHA:BHT para proteger a la astaxantina de la oxidación.

Tanto la mezcla de antioxidantes de BHA:BHT como el aceite esencial de romero pertenecen a los antioxidantes conocidos como donadores de protones; su modo de acción no es deteniendo la formación de radicales que se generan en la oxidación, sino que al reaccionar con ellos los estabiliza y se producen radicales del antioxidante que son menos activos. Es decir, se consumen en la reacción y por lo tanto la estabilidad en este caso de la astaxantina va a depender de la cantidad residual de antioxidante que contenga el extracto.

También es muy importante no agregar cantidades excesivas de antioxidante ya que pueden actuar como prooxidantes y entonces su efecto puede revertirse.

Posiblemente el aceite esencial de romero tendría un mayor efecto de impedir la oxidación de la astaxantina si se comparara con la acción de BHA y BHT individualmente. Inatani y col. (1982) y Badui (1993) mencionan que el efecto antioxidante de estas sustancias sintéticas aumenta en gran proporción cuando se emplean juntos en las mismas proporciones, obteniendo un evidente efecto sinergista expresado en un significativo aumento de su poder antioxidante.

8. CONCLUSIONES

- ✓ La cepa de *Lactobacillus sp.* aislada de residuos de camarón fue la más eficiente en la reducción del pH después de 48 horas de fermentación de residuos de camarón; *S. carnosus* y *P. pentosaceus* no mostraron una diferencia significativa en la disminución del mismo parámetro.
 - ✓ Los residuos de camarón que fueron sometidos a fermentación láctica (con *Lactobacillus sp.*) tienen mayor concentración de pigmento en forma de astaxantina que los residuos que no fueron fermentados, 1.25 y 0.96 ppm respectivamente, en los extractos.
 - ✓ Las condiciones óptimas para la extracción de pigmentos fueron empleando el sistema de solventes orgánico más eficiente, 0.015 de BHA:BHT con respecto al residuo y agitación por 3 h a 300 rpm.
-

-
- ✓ El mejor sistema de solventes para la extracción de pigmentos fue el de éter de petróleo:acetona:agua (15:75:10), seguido de la mezcla cloroformo:agua:metanol (1:2:4), en tercer término el aceite de soya y por último la mezcla de etanol:agua (40:60), todos en una proporción de 1:10 con respecto al residuo.
 - ✓ Las condiciones óptimas del sistema enzimático para hidrolizar el complejo pigmento-proteína fueron utilizando 5 U.A. enzimática en la hidrólisis de 1 mg de carotenoproteína solubilizada en 1 litro de buffer de fosfatos de sodio 0.05 M con pH=7 a una temperatura de 40°C y una agitación moderada de 70-80 rpm.
 - ✓ La mezcla de savinasa:neutrasa:alcalasa:esperasa, 1.25 U.A. de cada una, en un tiempo de 24 h fue el tratamiento enzimático más eficiente en la hidrólisis de la carotenoproteína, comprobándose que mediante el uso de proteasas es posible hidrolizar a la proteína que se encuentra unida al pigmento.
 - ✓ La respuesta que tiene la astaxantina al momento de analizarla espectrofotométricamente (en HPLC) aumenta considerablemente cuando el pigmento se encuentra parcial o totalmente libre de proteína.
 - ✓ Fue posible concentrar cerca del 100% del pigmento por medio del proceso de ultrafiltración, logrando separar en un 94% la proteína.
 - ✓ Se conocieron los pesos moleculares de la carotenoproteína y de los péptidos resultantes de su hidrólisis enzimática, los cuales fueron de 265 kDa para el complejo pigmento-proteína y de 62.56, 52.348, 18.638, 7.748 y 3.029 kDa para las fracciones de su hidrólisis.
 - ✓ La mezcla de antioxidantes BHA:BHT tiene un efecto antioxidante sobre la astaxantina en los extractos, el cual se mantiene a través del tiempo (6 semanas); por su parte el aceite esencial de romero, en períodos cortos, ofrece la misma protección que el BHA:BHT, pero esta protección decrece conforme transcurre el tiempo sobre el extracto.

La fermentación láctica estabiliza a los residuos de camarón, particularmente la estructura de la astaxantina, incrementándose su rendimiento cuando se emplea un sistema de solventes orgánicos para su extracción y la proporción de antioxidante adecuada. El separar las dos entidades bioquímicas, pigmento y proteína, hace posible el realizar estudios acerca del proceso de absorción de la astaxantina en el músculo de los salmónidos, de su estabilidad y su aplicación en otras áreas, y por otra parte la caracterización de la proteína.

9. BIBLIOGRAFÍA

- A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemist). 1990. Official Methods Analysis. 15^a edición. Washington, D.C. U.S.A.
- Adnan, N. A. y Owens, J. D. 1984. Technical note: Microbiology of oriental shrimp paste. *Journal of Food Technology*. 19: 499-502.
- Agricultural Handbook. 1975. Compositions of foods. U. S. Department of Agriculture. p 8.
- Anónimo. 1986. Food colors. *Food Technology*. 4(1):49.
- Anónimo. 1992. Infofish International. Astaxanthin-Technical Q & A. 6:55.
- Anónimo. 1995. Coloración de productos cárnicos con cantaxantina. *Industria Alimentaria*. 6:16-17.
- Arroyo, P. T., Ludovico-Pelayo, L. A., Solidum, H. T., Chiu, Y. N. , Lero, M. y Alcantara, E. E. 1978. Studies on rice-shrimp fermentation: balao-balao. *Journal of Food Science and Technology*. 2: 106-125.
- Backhoff, H. P. 1976. Some chemical changes in fish silage. *Journal of Food Technology*. 11:353-363.
-

- Badui, S. 1993. Química de los alimentos. 3ª edición. Editorial Alhambra, México, D.F.
- Balogun, A. M. y Akegbejo-Samsoms, Y. 1992. Waste yield, proximate mineral and microbiology composition of shrimp resources of Nigeria's coastal waters. *Tropical Science*. 40:157-161.
- Bauchop, J. y Elsdén, S. R. 1960. The growth of microorganisms in relation to their energy supply. *Journal of General Microbiology*. 23: 457-469.
- Belter, Paul A., Cussler, E. L and Hu, Wei-Shou. 1988. *Bioseparations: Downstream processing for Biotechnology*. John Wiley and Sons. pp 237-270. Minnesota.
- Cano-López, A., Simpson, B. K. and Haard, N. F. 1987. Extraction of carotenoprotein from shrimp process wastes with the aid of trypsin from atlantic cod. *Journal of Food Science*. 52(2):503-506.
- Castro, E. y Sepúlveda, C. 1994. Metodologías utilizadas en la determinación de la pigmentación y pigmentos en tejidos pellets. *Control de Calidad de Insumos y Dietas Acuícolas*. Aquila II. pp 229-234.
- Cerruti, P., Alzamora, S. M. y Vidales, S. L. 1997. Vanillin as an antimicrobial for producing shelf-stable strawberry puree. *Journal of Food Science*. 62 (3): 608-610.
- Charley, H. 1987. *Tecnología de alimentos*. Editorial Limusa. pp 183-185. México, D.F.
- Chen, H. M. and Meyers, S. P. 1982a. Extraction of astaxanthin pigment from crawfish using a soy oil process. *Journal of Food Science*. 47:892-896.
- Chen, H. M. y Meyers, S. P. 1982b. Effect of antioxidants on stability of astaxanthin pigment in crawfish waste and oil extract. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 30:469-473.
- Chen, H. M. y Meyers, S. P. 1983. Ensilage treatment of crawfish waste for improvement of astaxanthin pigment extraction. *Journal of Food Science*. 48:1516-1521.
- Chen, H. M., Meyers, S. P., Hardy, R. W. y Biede, S. L. 1984. Color stability of astaxanthin pigmented rainbow trout under various packaging conditions. *Journal of Food Science*. 49: 1337-1340.
- Cheryan, M. 1986. *Ultrafiltration Handbook*. Technomic Publishing Co., Inc. Lancaster, Pennsylvania.
- Choubert, G. y Luquet, P. 1983. Utilization of shrimp meal for rainbow trout (*Salmo gairdneri richi*) pigmentation. Influence of fat content of the diet. *Aquaculture*. 32:19-26.
- Christophersen, A. G., Knuthsen, P. y Skibsted, L. H. 1989. Determination of carotenoids in salmonids. *Lebensm Unters Forsch*. 188: 413-418.

- Collins, M. A. y Charles, H. P. 1987. Antimicrobial activity of carnosol and ursolic acid: two anti-oxidant constituents of *Rosmarinus officinalis* L. *Food Microbiology*. 4: 311-315.
- D'Abramo, L. R., Baum, N. A., Bordner, C. E. y Conklin, D. E. 1983. Carotenoids as a source of pigmentation in juvenile lobsters fed a purified diet. *Journal of Fishery Aquaculture Science*. 40: 699-704.
- Deeslie, W. D. y Cheryan, M. 1981. Continuous enzymatic modification of proteins in an ultrafiltration reactor. *Journal of Food Science*. 46: 1035-1041.
- Fagbenro, O. A. 1997. Preparation, properties and preservation of lactic acid fermented shrimp heads. *Food Research International*. 29 (7):595-599.
- Fane, A. G. y Radovich, J. M. 1990. Membrane Systems. En *Separation Processes in Biotechnology*. Asenjo, J. A. (ed.). Marcel Dekker. pp 209-262. Nueva York.
- Foss, P., Storebakken, T., Schiedt, K., Liaaen-Jensen, S., Austreng, E. and Streiff, K. 1984. Carotenoids in diets for salmonids. I. Pigmentation of rainbow trout with the individual optical isomers of astaxanthin in comparison with cantaxanthin. *Aquaculture*. 41:213-226.
- Francis, F.J. 1987. Lesser-Known food colorants. *Food Technology*. 4(87):62-63.
- Frazier, W. C. 1993. *Microbiología de los alimentos*. 4ª edición. Editorial Acribia. pp 215-223. Madrid, España.
- Ganguly, J. y Sastry, P.S. 1985. Mechanism of conversion of β -carotene into vitamin A. *Abstract of Word Review Nutrition and Dietary*. 45:198.
- Givertz, P. y Joseph, E. 1974. Food colours-An international view. *The flavour Industry*. September/October. pp 32:36.
- Guerrero, I., Zakaria, Z. y Hall, G. M. 1996. Lactic fermentation of prawn waste: comparison of commercial and isolated cultures. En: *Advances in chitin science*. A. Domard, C. Jeuniaux, R. Muzzarelli, G. Roberts (eds.) pp. 3999-4046. Ed. J. Andre. Francia.
- Guillou, A., Khalil, M. y Adambounou, L. 1995. Effects of silage preservation on astaxanthin forms and fatty acids profiles of processed shrimp (*Pandalus borealis*) waste. *Aquaculture*. 130:351-360.
- Gurr, M. y James, A. 1971. *Lipid Biochemistry*. Chapman and Hall. London. pp 113-119. Gran Bretaña.
- Haard, N. F. y Simpson, B. K. 1994. Proteases from aquatic organisms and their uses in the seafood industry-Chapter 6. *Fisheries Processing: Biotechnological applications*. A. M. Martin (ed.). Chapman & Hall. pp 133-154. Londres.

- Haard, N. F. y Simpson, B. K. 1997. Extraction of caroproteins from crustacean wastes. <http://www.uccs.mun.ca/stephens/caroteno.htm>.
- Hall, G. M. y De Silva, S. 1994. Shrimp waste ensilation. *Infotish International*. 2(94):27-30.
- Hall, G. M., Keeble, D., Ledward, D. A. y Lawrie, R. A. 1985a. Silage from tropical fish 1. Proteolysis. *Journal of Food Technology*. 20: 561-572.
- Hall, G. M., Ledward, D. A. y Lawrie, R. A. 1985b. Silage from tropical fish 2. Undigested fraction. *Journal of Food Technology*. 20: 573-580.
- Han-Ching, L., In, T., Mauguin, S. y Mescle, J. F. 1992. Application of lactic acid fermentations. En: *Fish Processing Technology*. Hall, G. M (ed.). Chapman & Hall pp 193-211. Reino Unido.
- Hansen, F. R. 1981. Extractions of carotenoids from shrimp wastes (*P. borealis*) with soybean oil at high temperatures. Thesis. University of Trondheim. p 75. Oslo.
- Hansen, M. E. y Llanes, A. 1994. Applications of crustacean wastes in biotechnology. En: *Fisheries Processing: Biotechnological applications*. A. M. Martin (ed.). Chapman y Hall. pp 174-205. Londres.
- Henmi, H., Iwata, T. and Hata, M. 1987. Studies on the carotenoids in the muscle of salmon. I. Intracellular distribution of carotenoids in the muscle. *Journal Agricultural Residual*. 37:101.
- Horton, H., Moran, L., Ochs, R., Rawn, J. y Scrimgeour, K. 1993. *Bioquímica*. Prentice-Hall Hispanoamericana, S. A. México.
- Hurst, A. 1981. Nisin. *Advances in Applied Microbiology*. 27: 85-123.
- Inatani, R., Nakatani, N., Fuwa, H. y Seto, H. 1982. Structure of a new antioxidative phenolic diterpene isolated from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Agricultural Biological Chemistry*. 46 (6): 1661-1666.
- Internet A. 1998. Astaxanthin. <http://www.aqse.com/asta.htm>.
- Internet B. 1996. Photosynthetic pigments. <http://www.geospace.com/pondkeeper/jan96/caroteno.htm>.
- Internet C. 1998. Technical Bulletin. <http://bigisland.com/nelha/aqua.htm>.
- Ishiharati, M. 1980. Thermal reaction of β -carotene, Part 1. *Journal of Analytical Applied Pyrolysis*. 2:153.
- James, M. A., Iyer, K. M. y Nair, M. R. 1977. Comparative study of fish ensilage prepared by microbial fermentation and formic acid ensilage. En: *Handling, Processing and Marketing of Tropical Fish*. Tropical Products Institute. pp 273-275. Londres.

- Jaouen, P., Bothorel, M. y Quéméneur, F. 1990. Membrane processes utilizations industries and aquacultural farming. Proceedings-Vth World Filtration Congress. San Nazario.
- Johnson, E. A., Villa, T. G. y Lewis, M. J. 1980. *Phaffia rhodozyma* as an astaxanthin source in salmonid diets. *Aquaculture*. 20: 123-134.
- Johnson, E. A., Villa, T. G., Lewis, M. J. y Phaff, H. J. 1978. Astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. *Applied Environment. Microbiology*. 35: 1155-1159.
- Jonsson, S., Claussen, E. y Raa, J. 1983. Amino acid degradation by *Lactobacillus plantarum* strain from fish. *Systematic and Applied Microbiology*. 4: 148-154.
- Kandler, O. 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antoine Van Leeuwenhoek*. 49: 209-224.
- Kanner, J. 1978. Carotene oxidizing factors in red pepper fruits (*Capsicum annum* L.); oleoresin-cellulose solid model. *Journal of Food Science*. 43:709.
- Kelley, C. E. y Harmon, A. W. 1972. Method of determining carotenoid contents of Alaska pink shrimp and representative values for several shrimps products. *Fishing Bulletin*. 70(1):111-113.
- Kennedy, G. Y. 1979. Pigments of marine invertebrates. *Advances in Marine Biology*. 16: 309-381.
- Kunitz, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. *Journal of General Physiology*. 30:201.
- Mackie, Y. M., Hardy, R. y Hobbs, G. 1971. *Fermented Fish Products*. FAO. Roma.
- Mathur, L. y Narang, R. 1990. Shrimp composition. *Aquaculture Digest*. Enero. p 28.
- Mauguin, S. y Novel, G. 1994. Characterization of lactic bacteria isolated from seafood. *Journal of Applied Bacteriology*. 76:616-625.
- McCallum, I. M., Cheng, K.M. y March, B.E. 1987. Carotenoid pigmentation of two strains of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and their crosses. *Aquaculture*. 67:291.
- Mejía, L. A., Hudson, E., De Mejía, E. G. y Vázquez, F. 1988. Carotenoid content and vitamin A activity of some common cultivars of mexican peppers (*Capsicum annum*) as determined by HPLC. *Journal of Food Science*. 53 (5): 1448-1451.
- Menasveta, P., Worawattanamateekul, W., Latscha, T. y Clark, J. S. 1993. Correction of black tiger prawn (*Penaeus monodon* Fabricius) coloration by astaxanthin. *Aquacultural Engineering*. 12:203-213.
- Merck. 1997. *Catalogo de enzimas*.

- Meyer, P. S. y Preez, J. C. 1994. Astaxanthin production of *Phaffia rhodozima* mutant on grape juice. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 10:178-183.
- Meyers, S. P. 1977. Using crustacean meals and carotenoids-fortified diets. *Feedtuffs*. 49(19): 26.
- Meyers, S. P. y Bligh, D. 1981. Characterization of astaxanthin pigments from heat processed crawfish waste. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 29:505-508.
- Miki, W. 1991. Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis*. *Pure Applied Chemistry*. 63: 141-146.
- Molyneaux, M. y Lee, Ch. 1998. The U.S. market for marine nutraceutical products. *Food Technology*. 52(6):56-57.
- Muriana, F. J., Ruiz-Gutierrez, V., Gallardo-Guerrero, L. y Mínguez-Mosquera, M. I. 1993. A study of the lipids and carotenoprotein in Prawn, *Penaeus japonicus*. *Journal of Biochemistry*. 114 (2): 223-229.
- Novo Enzymes. 1997. *Catalogo de proteasas*. Dinamarca.
- Ohshima, T. 1998. Recovery and use of nutraceutical products from marine resources. *Food Technology*. 52(6):50-54.
- Okafor, N. y Nzeako, B. C. 1985. Microbial flora of fresh and smoked fish from Nigerian fresh-water. *Food Microbiology*. 2: 71-75.
- Omara-Alwala, T., Chen, H. M., Ito, Y., Simpson, K. L. y Meyers, S. P. 1985. Carotenoid pigment and fatty acids analyses of crawfish oil extracts. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 33 (2): 260-263.
- Owens, J. D. y Mendoza, L. S. 1985. Enzymically hydrolysed and bacterially fermented fishery products. *Journal of Food Technology*. 20: 273-293.
- Peterson, G. L. 1977. A simplification of the protein assay of Lowry *et al.* wich is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*. 83: 346-356.
- Pszczola, D. 1998. Naturals colors: Pigments of imagination. *Food Technology*. 52(6):70-76.
- Raa, J. y Gildberg, A. 1982. Fish silage: a review. *C. R. C. Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 16 (4): 383-419.
- Ruello, N. 1976. Biological characteristics of Australian prawns. *Australian Fisheries*. Febrero. pp 4-9.
- Santos, J. A., Mateus, M. y Cabral, J. M. 1991. Pressure driven membrane processes. In *Chromatographic and Membrane Processes in Biotechnology*. Costa C. A. y Cabral, J. M. S. (eds.). Kluwer Academic Publishers. pp 177-205. Amsterdam.

- Schiedt, K. 1987. Absorption, retention and metabolic transformations of carotenoids in chicken, salmonids and crustacea. Thesis for the Doctor Technicae degree. Norwegian Institute of Technology. University of Trondheim, Noruega-Basilea (Suiza).
- Schiedt, K., Bischof, S. and Glinz, E. 1993. Metabolism of carotenoids and *in Vivo* racemization of (3S, 3'S)- Astaxanthin in the crustacean *Penaeus*. *Methods in Enzimology*. 214(215):148-168.
- Schiedt, K., Leuenberger, F. J., Vecchi, M. y Glinz, E. 1985. Absorption, retention and metabolic transformations of carotenoids in rainbow trout, salmon and chicken. *Pure Applied Chemistry*. 57:585-692.
- Schroder, K. E., Clausen, E., Sandberg, A. M. y Raa, J. 1980. Psychrotrophic *Lactobacillus plantarum* from fish and its ability to produce antibiotic substances. En *Advances in Fish Science and Technology*. Connell, J. J. Farnham (ed.). Fishing News Books Ltd. pp 480-483. Londres.
- Scopes, R. 1994. *Protein purification-principles and practice*. 3ª edition. Springer-Verlag. pp 285-294. Nueva York.
- Scriban, R. 1985. *Biología*. Editorial El Manual Moderno, S.A. de C. V. pp 361-373. México D.F.
- SEMARNAP (Secretaría del medio ambiente, recursos naturales y pesca). 1993. Anuario estadístico de pesca. México, D.F.
- SEMARNAP. 1994. Anuario estadístico de pesca. México, D.F.
- SEMARNAP. 1995. Anuario estadístico de pesca. México, D.F.
- SEMARNAP. 1997. Anuario estadístico de pesca. México, D.F.
- Shahidi, F. y Synowiecki, J. 1991. Isolation and characterization of nutrients and value added products from snow crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 39(8):1527-1532.
- Simpson, B. K. y Haard, N. F. 1985. The use of proteolytic enzymes to extract carotenoproteins from shrimp wastes. *Journal of Applied Biochemistry*. 7:212-222.
- Simpson, K.L. 1979. Carotenoid pigments in seafood. Abstracts of papers, American Chemistry Society. 178 (1), AGFD 19. Citado en *Food Science Technology Abstracts*, 1980, 12:9R552.
- Simpson, K.L. 1983. Relative value of carotenoids as precursors of vitamin A. *Annual Publication of Nutrition Society*. 42:7.
- Skrede, G. y Storebakken, T. 1986. Characteristics of color in raw, baked and smoked wild and pen-reared Atlantic salmon. *Journal of Food Science*. 51: 804.

-
- Skrede, G., Storebakken, T. y Naes, T. 1989. Color evaluation in raw and smoked flesh of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) fed astaxanthin or cantaxanthin. *Journal of Food Science*. 55 (6): 1574-1578.
- Spinelli, J. y Mahnken, C. 1978. Carotenoid deposition in pen-reared salmonids fed diets containing oil extracts of red crab (*Pleuroncodes planipes*). *Aquaculture*. 13:213.
- Steel, R. G. y Torrie, J. H. 1988. *Bioestadística: Principios y procedimientos*. 2ª edición. McGraw-Hill. Bogota, Colombia.
- Storebakken, T. 1992. Pigmentation of rainbow trout. *Aquaculture*. 100: 209-229.
- Swafford, T. C. 1987. Separation-recovery of soluble/insoluble proteins from surimi processing washwaters. *Pacific Fishery Technology Meeting*. p 13. Monterey, California.
- Sweeney, J.P. y Marsh, A.C. 1971. Effect of processing on provitamin A in vegetables. *Journal of American Dietary Association*. 59:238.
- Tjahjono, A., Hayama, Y., Kakizono, T., Terada, Y., Nishio, N. y Nagai, S. 1994. Hyperaccumulation of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* at elevated temperatures. *Biothechnology Letters*. 16(2):133-138.
- Torrissen, O., Hardy, R. y Shearer, K. 1989. Pigmentation of salmonids-carotenoid deposition and metabolism. *CRC Critical Reviews in Aquatic Sciences*. 1(2):209-276.
- Torrissen, O., Tidemann, E., Hansen, F. y Raa, J. 1981. Ensiling in acid-A method to stabilize astaxanthin in shrimp processing by products and improve uptake of this pigment by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*. 26:77-83.

APÉNDICE 1:

ASTAXANTINA Y SUS POSIBLES UNIONES CON OTRAS BIOMOLÉCULAS

En la figura 36 se muestran los tipos de enlaces mediante los cuales puede unirse la astaxantina a otras biomoléculas, aunque no todas pueden darse al mismo tiempo por impedimento estérico. El enlace que une al pigmento con la proteína se conoce como *imino* (aminación reductiva). Este tipo de unión también podría darse en la unión de la astaxantina con la quitina. En crustáceos, la mayor parte del pigmento esta unida a una lipoproteína y monoesterificada con un ácido graso.

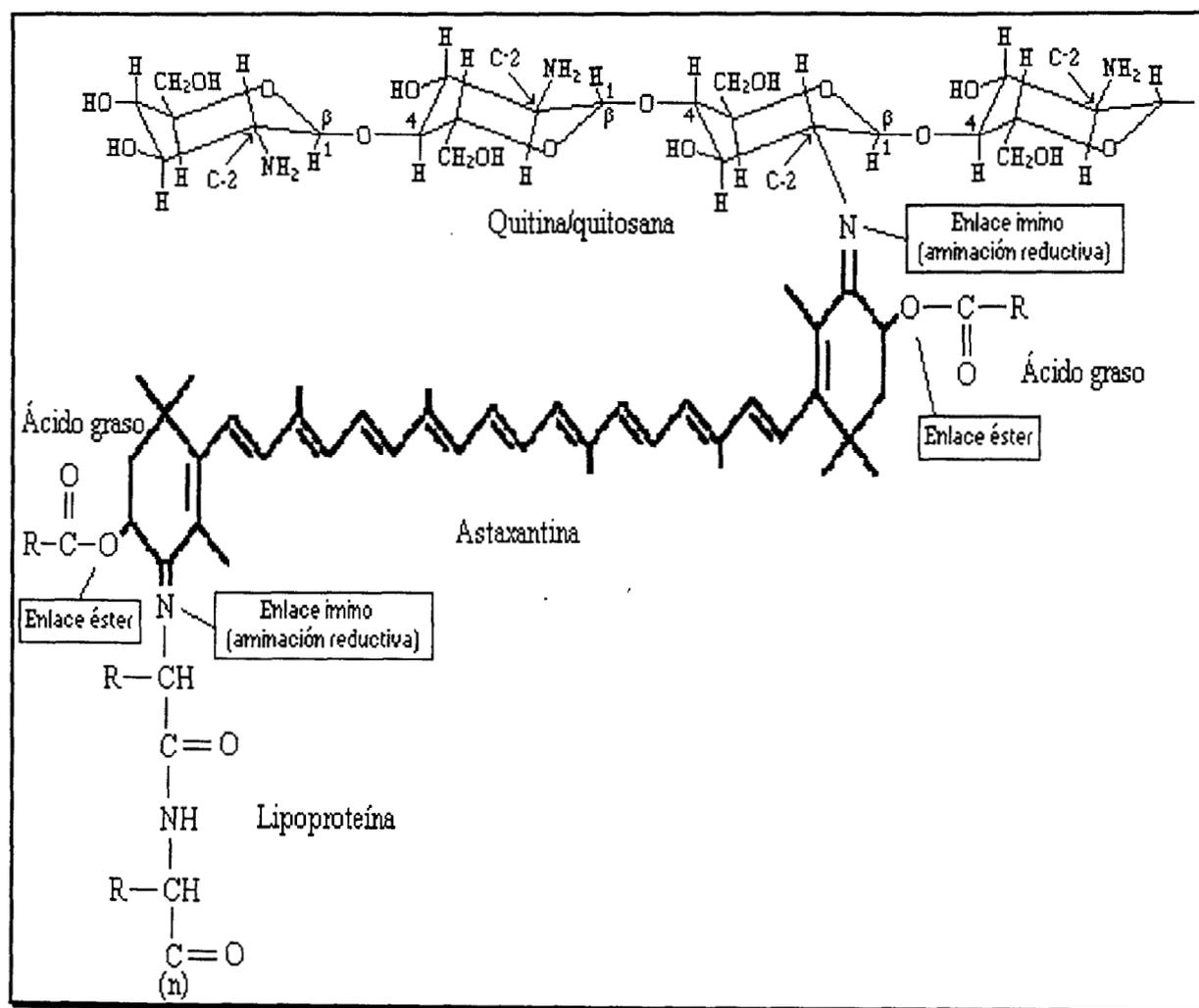


Figura 36. Posibles uniones de la astaxantina con otras biomoléculas.

APÉNDICE 2:

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE RESULTADOS

Tabla 14. Análisis de varianza de las variables dependientes estudiadas en los distintos experimentos.

Experimento	Variable dependiente	P>
Fermentación (selección de iniciadores)	pH	0.0001
Extracción	Xantofilas totales	0.0001
Astaxantina en residuos fermentados y no-fermentados	Astaxantina	0.0001
Hidrólisis enzimática de la carotenoproteína	Xantofilas totales Proteína soluble	0.0001
Astaxantina en fracciones	Astaxantina	0.0001
Efecto de antioxidantes	Astaxantina	0.0001

La P> es la mínima para rechazar el modelo.

Tabla 15. Nivel de significancia (P>) de las fuentes de variación en los distintos experimentos.

Experimento	Variable dependiente	Fuente de variación	P>
Fermentación (selección de iniciadores)	pH	Microorganismos: • <i>S. carnosus</i> • <i>P. pentosaceus</i> • <i>Lactobacillus sp.</i>	0.0001
Extracción	Xantofilas totales (µg/g)	Sistemas de extracción: • Etér de petróleo:acetona:agua (15:75:10) • Agua:cloroformo:metanol (1:2:4) • Etanol:agua (40:60) • Aceite de soya	0.0001
Astaxantina en residuos fermentados y no-fermentados	Astaxantina (ppm)	Tipo de residuo: • Fermentado • No fermentado	0.0001
Hidrólisis enzimática de la carotenoproteína	Xantofilas totales (mg/g) Proteína soluble (mg/g)	Sistema enzimático a t = 0, 12 y 24 H: • Savinasa • Mezcla (savinasa:esperasa:alcalasa:neutrasa) • Proteasa de camarón • Tripsina	0.0001
Astaxantina en fracciones	Astaxantina (ppm)	Tipo de fracción: • Carotenoproteína sin hidrolizar • Carotenoproteína hidrolizada • Permeado • Retenido	0.0001
Efecto de antioxidantes	Astaxantina (ppm)	Tipo de antioxidante: • BHA/BHT • Aceite esencial de romero	0.0001

Tabla 16. Prueba múltiple de Duncan para cultivos iniciadores.

Cultivo iniciador	Variable = pH
<i>S. carnosus</i>	4.715 ^b
<i>P. pentosaceus</i>	4.928 ^b
<i>Lactobacillus sp.</i>	4.211 ^a

Tabla 17. Prueba múltiple de Duncan para sistemas de extracción.

Sistema	Variable = Xantofilas totales (µg/g)
Éter de petróleo:acetona:agua (15:75:10):	
• No-fermentado	23.495 ^a
• Fermentado	22.085 ^a
Agua:cloroformo:metanol (1:2:4):	
• No-fermentado	21.012 ^b
• Fermentado	20.710 ^b
Etanol:agua (40:60):	
• No-fermentado	15.419 ^d
• Fermentado	14.271 ^d
Aceite de soya:	
• No-fermentado	17.917 ^c
• Fermentado	17.102 ^c

Tabla 18. Prueba múltiple de Duncan para tipos de residuos (fermentados y no fermentados).

Tipo de residuo	Variable = Astaxantina (ppm)
Fermentado	0.96 ^b
No-fermentado	1.25 ^a

Tabla 19. Prueba múltiple de Duncan para sistemas enzimáticos.

Sistema enzimático	Variables = Xantofilas totales (mg/g)	Variable = Proteína soluble (mg/g)
Savinasa-t= 0 h	23.6 ^s	590 ^f
Savinasa-t= 12 h	38.2 ^d	759 ^d
Savinasa-t= 24 h	41 ^c	796.2 ^c
Mezcla-t= 0 h	22.8 ^s	640.2 ^f
Mezcla-t= 12 h	43.8 ^b	877 ^b
Mezcla-t= 24 h	46 ^a	894.8 ^a
Proteasa de camarón-t= 0 h	24 ^s	643 ^f
Proteasa de camarón-t= 12 h	33.8 ^f	682.4 ^e
Proteasa de camarón-t= 24 h	37 ^e	716 ^d
Tripsina-t= 0 h	24.6 ^s	602 ^f
Tripsina-t= 12h	34.4 ^f	644.2 ^e
Tripsina-t= 24h	36.8 ^e	757.8 ^d

Tabla 20. Prueba múltiple de Duncan para tipo de fracciones.

Fraccion	Variable = Astaxantina (ppm)
Carotenoproteína sin hidrolizar	27.89 ^c
Carotenoproteína hidrolizada sin filtrar	38.91 ^b
Permeado	47.92 ^a
Retenido	1.36 ^d

Tabla 21 Prueba múltiple de Duncan para tipos de antioxidantes.

Antioxidante	Variable = Astaxantina (ppm)
BHA/BHT:	
• t = 0 semanas	1.64 ^a
• t = 1 semanas	1.60 ^a
• t = 6 semanas	1.44 ^a
Aceite esencial de romero	
• t = 0 semanas	1.68 ^a
• t = 1 semanas	1.38 ^b
• t = 6 semanas	0.72 ^c

En todas las pruebas múltiples de Duncan, las medias con la misma letra de superíndice no son significativamente diferentes.