

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



227416

Casa abierta al tiempo

CBS

**Obtención de astaxantina a partir de
residuos de camarón fermentados**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias Biológicas

P R E S E N T A

Roberto Emeterio Armenta López

Junio de 2002

“El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93”.

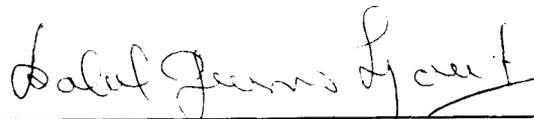
El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó

Roberto Emeterio Armenta López

El día 22 de Mayo del año de 2002

Comité Tutorial:

Tutor:



Dra. Isabel Guerrero Legarreta

Asesor:



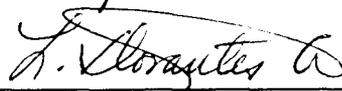
Dr. Sergio Huerta Octio

Asesor:



Dr. Gustavo Fidel Gutiérrez López

Sinodal:



Dra. Lidia Dorantes Álvarez

Sinodal:



Dra. Edith Ponce Alquicira

A Dios...

A mis padres: Roberto y María

DEDICATORIAS

- *A mis entrañables y queridos hermanos y hermanas: Marisela, Heriberto, Osvaldo, Yudit y Jesús.*
 - *A la calidez inigualable de la "nieve blanca del norte", quien me da ternura, amor y comprensión: mi preciosa novia Tasha.*
 - *A quien siempre llevo presente en donde quiera que estoy, sus oraciones me acompañan: abuela Carlota.*
 - *A mis sobrinos y sobrinas, quienes se desarrollan muy rápido, pero más crece el cariño.*
 - *A Isabel Guerrero, por toda su confianza y soporte incondicional.*
 - *A Lulú Pérez Chabela, por la invaluable e inquebrantable amistad que tenemos, gracias por todo tu apoyo.*
 - *A Alfonso Totosaus, por tu amistad y la ayuda que siempre me has proporcionado.*
 - *A mis amigos y compañeros del laboratorio de Bioquímica de Macromoléculas: Octavio, Edith, Baciliza, Ernesto, Raquel, Silvia, Marcelo, Julio y Cuauhtémoc.*
 - *A mis amigos de La Bebelama y Guasave (Sinaloa) y Cd. Obregón (Sonora).*
 - *A mi querido amigo Tijuanaense: Pedro; y a mi paisana: Daniela.*
 - *A quienes nos separa la distancia, pero la amistad estará ahí, perdurando a través del tiempo: Melanie, Marc, Araceli, Tamara, Celine, Cristina, Álvaro, Gisela, Juan Carlos y Tara.*
 - *A mi grupo de "abuelas chilenas", porque nunca nos hemos olvidado, especialmente a ti abuela Fresia.*
 - *Al bello mar, en especial al del Pacífico.*
-

AGRADECIMIENTOS

- *A la Universidad Autónoma Metropolitana, por todo lo que me diste y aprendí de ti.*
 - *Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por todo el apoyo otorgado.*
 - *A quien me brindó sus conocimientos a lo largo del posgrado, excelente asesora: Dra. Isabel Guerrero.*
 - *A mis asesores: Dr. Sergio Huerta, de quien siempre recibí sugerencias y planteamientos de trabajo acertados y buen trato personal, y Dr. Gustavo Gutiérrez: sus revisiones todo el tiempo muy meritorias.*
 - *A la Dra. Edith Ponce, quien revisó esta tesis y con la cual me une una sincera amistad, gracias por tu constante disposición a ayudarme.*
 - *A la Dra. Lidia Dorantes quien después de revisar la tesis proporcionó sugerencias acertadas para el mejoramiento de la misma.*
 - *A quienes me ayudaron a desarrollar la parte experimental de ingeniería en el laboratorio de membranas del Instituto Superior Técnico en Lisboa, Portugal, especialmente a la Dra. Maria de Pinho.*
 - *Al Consulado Internacional para Estudios Canadienses, en especial a Cristina Frias.*
 - *Al Dr. Jorge Soriano, siempre pendiente e interesado por escuchar los avances de este trabajo.*
 - *A la División de Ciencias Biológicas en la UAM-I y a la coordinación de este Doctorado en la UAM-X.*
 - *A todos los que contribuyeron de alguna u otra manera en toda la travesía Doctoral.*
-

RESUMEN

La presente tesis aborda estudios sobre carotenoproteínas extraídas de residuos de camarón fermentados, las cuales fueron sujetas a distintos tratamientos de hidrólisis para separar a la proteína y los pigmentos que la forman, purificando y concentrando estos componentes a través de procesos de membrana adaptados en un bioreactor enzimático.

Los residuos de camarón fueron sometidos a fermentación láctica como método de estabilización, para después extraer las carotenoproteínas por medio de un sistema de disolventes orgánicos compuesto de éter de petróleo:acetona:agua (15:75:10). El complejo pigmento-proteína se disolvió en búfer de fosfatos y se aplicaron diversos tratamientos enzimáticos con proteasa, proteasa:lipasa, celulasa y celulasa:lipasa, evaluándose el nivel de hidrólisis sobre la base de proteína soluble y xantofilas totales.

El primero de ellos, con una proteasa, se llevó a cabo con 15 y 20 UP, pH 7 y 8 a lo largo de 24 horas de experimento, obteniendo la mayor liberación de carotenos y proteína soluble con 20 UP, pH 8 por 24 horas. El tratamiento proteasa:lipasa más eficiente fue con 15:10 (UP:UL) por 12 horas, este proceso enzimático logró el mayor grado de separación de pigmentos y proteína. Con 20 BG de celulasa por 24 horas a pH 5 se consiguió disociar el complejo, logrando mejorar la separación sin hidrólisis proteica con el tratamiento 20:10 (BG:UL) por 24 horas.

Se desarrolló la hidrólisis con 15 y 20 UP de proteasa sobre carotenoproteínas disueltas en dos proporciones del sistema de disolventes, 15:75:10 y 15:65:25. Con 20 UP por 24 horas en la segunda proporción se alcanzó 83.1% en relación a los pigmentos liberados en búfer de fosfatos con proteasa:lipasa.

La hidrólisis de carotenoproteínas con la proteasa también se desarrolló en un bioreactor enzimático de membrana probando 15 y 20 UP durante 16 horas de proceso; con 20 UP por 14 horas se logró 83% de liberación de pigmentos sobre la base de lo alcanzado con 15 UP por 24 horas en sistema modelo; se obtuvo un factor de concentración volumétrico de 8.27 para la proteína soluble retenida por membrana de ultrafiltración y los pigmentos del permeado se concentraron 4.66 veces en volumen por medio ósmosis inversa.

Los rendimientos de extracción de carotenoides en mg por kilogramo de residuo de camarón fermentado fueron: 272.2 en el extracto con disolventes, 1100-1140 con tratamientos con proteasa, 1567 con proteasa:lipasa, 1302 con proteasa en

disolventes orgánicos, 769.7 con celulasa, 905.9 con celulasa:lipasa, y 911.9 con proteasa en el bioreactor enzimático de membrana.

El pigmento extraído de camarón, y un pigmento sintético comercial (Carophyll pink^{MR}), además de 11 estándares de pigmentos, fueron analizados en HPLC en columna de fase reversa obteniendo los tiempos de retención y curvas de calibración de la concentración, de las cuales se utilizaron las correspondientes a astaxantina y astaceno para el estudio de estabilidad de pigmentos. Este se llevó a cabo durante 8 semanas evaluando el efecto de la luz, temperatura y oxígeno sobre la degradación por oxidación de astaxantina y la consecuente formación de astaceno, resultando una mayor oxidación del pigmento natural en comparación con el pigmento sintético comercial; la luz y temperatura alta son las condiciones que mayor efecto de oxidación tienen en la astaxantina. Con respecto a la interacción de factores la mayor degradación se presentó con luz-oxígeno-temperaturas altas, observando una constante en mayor grado de oxidación con los tratamientos que combinaron el efecto de luz y oxígeno.

Se determinó la composición de aminoácidos en carotenoproteínas de residuos de camarón fermentados y no fermentados. Se encontró que las carotenoproteínas obtenidas por los dos métodos son ricas en aspartato, glutamato y los aminoácidos esenciales leucina y lisina. Las carotenoproteínas de residuos fermentados tuvieron mayor cantidad de fenilalanina, histidina, treonina y triptófano. Los niveles de arginina y valina fueron mayores en carotenoproteínas de residuos no fermentados.

Finalmente, por electroforesis se obtuvo un peso molecular de 260 kDa para la parte proteica resultante de la disociación de carotenoproteínas.

Por medio de la fermentación láctica e hidrólisis enzimática se pueden obtener altas concentraciones de astaxantina a partir de los grandes volúmenes de residuos de camarón producidos en México, proceso realizable en bioreactor enzimático de membrana, donde además de pigmentos se recuperan cantidades importantes de proteína. Se sugieren estudios a futuro sobre la hidrólisis enzimática de carotenoproteínas en el bioreactor mediante el tratamiento proteasa:lipasa y celulasa:lipasa, además de las consideraciones necesarias para aumentar la escala del proceso, y finalmente, mejorar la estabilidad del producto final con el uso de antioxidantes y vehículos o excipientes (polímeros) que den forma y protección a los pigmentos.

SUMMARY

The objective of this thesis was to study various aspects on carotenoprotein extraction from shrimp residues, treated by enzymatic means in order to split the protein and pigment moieties. Purification and concentration of these two components by a membrane process in an enzymatic bioreactor was also studied.

Shrimp residues were subjected to lactic fermentation as a stabilizing method. Carotenoproteins were then extracted using a petroleum ether:acetone:water (15:75:19) system. The protein-pigment complex was dissolved in phosphate buffer. Four enzymatic treatments were tested: protease, protease:lipase, cellulase and cellulase:lipase. The efficiency of each treatment was evaluated by the amount of soluble protein and total xanthophylls in the extract.

A treatment with a protease was carried out using 15 and 20 UP at pH 7 or 8 during 24 hours. The highest carotene and protein concentrations were obtained using 20 UP at pH 8 during 24 hours. The most efficient protease:lipase treatment, in terms of protein:pigment separation, was observed when a 15:10 (UP:UL) ratio was used during 12 hours. When 20 BG cellulase were applied for 24 hours at pH 5, the complex almost entirely dissociated; this splitting was improved when 20:10 (BG:UL) ratio was applied for 24 hours.

Fifteen and 20 UP were applied on carotenoproteins dissolved into two solvent proportions, 15:75:10 and 15:65:25; when 20 UP were used in the 15:65:25 solvent system during 24 hours, 83.1% of the pigments obtained as compared to the protease:lipase treatment on phosphate buffer.

The hydrolysis of carotenoproteins with a protease was also studied in a membrane enzymatic bioreactor. Fifteen and 20 UP were applied during 16 hours; 83% of pigments were obtained when 20 UP were used during 14 hours, as compared to a hydrolysis using 15 UP for 24 hours in a model system. The volume concentration factor, using an ultrafiltration membrane, was 8.27 for soluble protein in the retentate; the concentration in the permeate by reverse osmosis of the pigments was 4.66.

Carotenoprotein extraction yields were (mg / kg residue): 272.2 by solvent extraction; 1100-1140 by hydrolysis with a protease; 1567 with a protease:lipase system, 1302 with a protease in an organic solvent; 769.7 with a cellulase; and 911.9 with a protease in a membrane enzymatic bioreactor.

The pigment extracted from shrimp residues, a commercial synthetic pigment (Carophyll pink^{MR}) and 11 pigment standards were analyzed using an HPLC fitted with a reverse phase column; retention times and calibration curves were obtained. Values for astaxanthin and astacene were used as a reference for pigment stability; this was carried out during 8 weeks studying the effect of daylight, temperature and oxygen availability on astaxanthin degradation due to oxidation and subsequent astacene formation. Results showed that the natural pigment oxidized in a higher degree than the synthetic pigment. Daylight and high temperatures were the two most significant conditions in promoting astaxanthin oxidation. When factor interactions were considered, the most intense degradation occurred at daylight-high oxygen-high temperature conditions. Treatments including daylight and high oxygen were consistently the most oxidative ones.

Amino-acid composition of the carotenoprotein obtained from fermented and non-fermented residues was studied. Carotenoproteins obtained for these two methods were rich in aspartate, glutamate and the essential amino-acids leucine and lysine. Carotenoproteins from fermented residues had higher concentration of phenylalanine, histidine, threonine and tryptophane; arginine and valine levels were higher in non-fermented residues. The molecular weight of the protein moiety was 260 kDa and it was obtained by electrophoresis.

High concentrations of astaxanthin can be obtained by lactic fermentation followed by an enzymatic hydrolysis. This combined process is feasible to be applied to high shrimp residue volumes, such as those obtained in Mexico. The process can be carried out in a membrane enzymatic bioreactor recovering pigments and high protein concentrations.

It is suggested that future studies in this topic will envisage enzymatic hydrolysis of carotenoproteins in a bioreactor, using protease:lipase and cellulase:lipase systems. Finally, considerations on process scaling-up as well as on improving pigment stability by polymer (excipient) and antioxidant addition are recommended for future studies.

ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN.....	i
SUMMARY.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
ÍNDICE DE TABLAS.....	xii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1. Camarón.....	7
2.1.1. Anatomía.....	7
2.1.2. Composición.....	8
2.1.3. Explotación mundial del camarón.....	9
2.1.4. Explotación del camarón en México.....	12
2.2. Pigmentos.....	16
2.2.1. Implicaciones del color.....	17
2.2.2. Clasificación de pigmentos naturales.....	17
2.2.3. Fuentes de pigmentos.....	23
2.3. Carotenoides.....	26
2.3.1. Generalidades y estructura.....	26
2.3.2. Fuentes.....	29
2.3.3. Efecto antioxidante.....	31
2.3.4. Estabilidad.....	33
2.3.5. Funcionalidad.....	35
2.3.6. Requerimientos nutricionales.....	37
2.4. Astaxantina.....	39
2.4.1. Química y estabilidad.....	39
2.4.2. Fuentes.....	41
2.4.2.1. Crustáceos.....	41
2.4.2.2. Algas.....	44
2.4.2.3. Levaduras.....	45
2.4.2.4. Bacterias.....	46
2.4.2.5. Sintéticos.....	47
2.4.3. Importancia y aplicaciones.....	47
2.4.3.1. Cultivo de salmón y trucha.....	48
2.4.3.2. Peces ornamentales.....	49
2.4.3.3. Aves de corral.....	49
2.4.3.4. Cultivo de camarón.....	50
2.4.3.5. Cosméticos.....	51
2.4.3.6. Efectos metabólicos y de salud.....	51

	Página
2.5. Acuicultura de salmónidos.....	53
2.5.1. Los más comunes.....	53
2.5.1.1. Salmón del Pacífico (género <i>Oncorhynchus</i>).....	53
2.5.1.2. Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>).....	53
2.5.1.3. Trucha arcoiris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	54
2.5.2. Producción.....	55
2.5.3. Pigmentación del músculo de salmónidos.....	56
2.6. Obtención de astaxantina a partir de residuos de crustáceos.....	58
2.6.1. Extracción.....	58
2.6.2. Utilización de proteasas.....	59
2.6.3. Ensilados.....	60
2.6.3.1. Ensilado químico.....	61
2.6.3.2. Ensilado microbiano.....	62
2.7. Carotenoproteínas.....	65
2.8. Procesos de membrana.....	69
2.8.1. Las membranas en los procesos de separación.....	69
2.8.2. Definición y caracterización.....	71
2.8.3. Membranas.....	72
2.8.3.1. Membranas isotrópicas.....	73
2.8.3.2. Membranas anisotrópicas.....	74
2.8.4. Clasificación.....	74
2.8.4.1. Microfiltración.....	75
2.8.4.2. Ósmosis inversa.....	76
2.8.4.3. Diálisis.....	76
2.8.5. Ultrafiltración.....	77
2.8.5.1. Membranas.....	78
2.8.5.2. Flux y flujo tangencial.....	78
2.8.5.3. Polarización de la concentración.....	80
2.8.5.4. Incrustación de la membrana.....	80
2.9. Bioreactores enzimáticos de membrana (BEM).....	80
2.9.1. Membranas y módulos.....	82
2.9.2. Clasificación.....	83
2.9.2.1. Reactores de contacto directo.....	83
2.9.2.2. Reactores de difusión.....	84
2.9.2.3. Reactores de multifase.....	85
2.9.3. Ventajas y desventajas.....	85
2.9.4. Aplicaciones.....	86
3. JUSTIFICACIÓN.....	88
4. OBJETIVOS.....	91
5. HIPÓTESIS.....	93
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	95
6.1. Material.....	96
6.2. Fermentación.....	96

	Página
6.3. Extracción y concentración de carotenoproteínas.....	97
6.3.1. Xantofilas totales.....	98
6.3.2. Análisis de astaxantina por HPLC.....	99
6.4. Hidrólisis enzimática de carotenoproteínas.....	100
6.4.1. Proteasa.....	101
6.4.1.1. Actividad enzimática.....	101
6.4.1.2. Sistema.....	101
6.4.1.3. Proteína soluble.....	102
6.4.2. Proteasa:lipasa.....	102
6.4.2.1. Actividad enzimática de lipasa.....	102
6.4.2.2. Sistema.....	103
6.4.3. Celulasa.....	103
6.4.3.1. Actividad enzimática.....	103
6.4.3.2. Sistema.....	103
6.4.4. Celulasa:lipasa.....	104
6.5. Hidrólisis enzimática de carotenoproteínas en disolventes orgánicos.....	105
6.6. Separación de astaxantina en bioreactor enzimático de membrana.....	106
6.6.1. Características del bioreactor.....	106
6.6.2. Determinación del flux de permeado.....	107
6.6.2.1. Ultrafiltración.....	107
6.6.2.2. Ósmosis inversa.....	107
6.6.3. Determinación del peso molecular de corte.....	108
6.6.3.1. Ultrafiltración.....	108
6.6.3.2. Ósmosis inversa.....	108
6.6.4. Hidrólisis de carotenoproteína y separación por UF.....	108
6.6.4.1. Actividad enzimática.....	108
6.6.4.2. Hidrólisis de carotenoproteína en sistema modelo.....	108
6.6.4.3. Hidrólisis de carotenoproteína en BEM.....	109
6.6.4.4. Hidrólisis, factor de concentración y flux a distintas presiones de trabajo.....	110
6.6.5. Concentración del pigmento por OI.....	110
6.7. Análisis de estándares de pigmentos.....	111
6.8. Estabilidad de astaxantina.....	112
6.8.1. Diseño sin interacciones.....	112
6.8.2. Diseño con interacciones.....	113
6.9. Composición y peso molecular de la carotenoproteína.....	115
6.9.1. Análisis de aminoácidos.....	115
6.9.2. Electroforesis de carotenoproteína.....	115
6.10. Análisis estadístico.....	116
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	118
7.1. Fermentación.....	119
7.2. Pigmentos en el extracto.....	120
7.3. Hidrólisis enzimática de carotenoproteínas.....	123
7.3.1. Proteasa.....	123
7.3.1.1. Hidrólisis a diversas UP.....	123
7.3.1.2. Comparación de hidrólisis a pH 7 y 8.....	126
7.3.2. Proteasa:lipasa.....	127

	Página
7.3.3. Celulasa.....	130
7.3.4. Celulasa:lipasa.....	132
7.4. Hidrólisis de carotenoproteínas en disolventes orgánicos.....	134
7.5. Obtención de astaxantina en un bioreactor enzimático de membrana.....	138
7.5.1. Flux de permeado.....	138
7.5.1.1. Ultrafiltración.....	138
7.5.1.2. Ósmosis inversa.....	139
7.5.2. Peso molecular de corte.....	140
7.5.2.1. Ultrafiltración.....	140
7.5.2.2. Ósmosis inversa.....	141
7.5.3. Hidrólisis de carotenoproteína en BEM.....	142
7.5.3.1. Sistema modelo de referencia.....	142
7.5.3.2. Hidrólisis de carotenoproteína con 15 UP.....	143
7.5.3.3. Hidrólisis de carotenoproteína con 20 UP.....	146
7.5.3.4. Cinéticas de hidrólisis, factor de concentración y flux a varias presiones.....	150
7.5.4. Concentración de astaxantina por Ol.....	156
7.6. Rendimiento de pigmentos de los tratamientos empleados.....	160
7.7. Análisis de pigmentos presentes en residuos de camarón.....	162
7.8. Estabilidad de astaxantina.....	164
7.8.1. Diseño sin interacciones.....	165
7.8.2. Diseño con interacciones.....	173
7.9. Patrón de aminoácidos en carotenoproteínas de residuos de camarón fermentados y no fermentados.....	180
7.10. Peso molecular de carotenoproteína.....	183
8. CONCLUSIONES.....	185
9. RECOMENDACIONES.....	189
10. BIBLIOGRAFÍA.....	191
11. ANEXOS.....	206
Anexo 1: Actividad enzimática de proteasa.....	207
Anexo 2: Determinación de proteína soluble.....	208
Anexo 3: Actividad enzimática de lipasa.....	209
Anexo 4: Actividad enzimática de celulasa.....	211
Anexo 5: Determinación del PMC.....	214
Anexo 6: Hidrólisis de carotenoproteína en BEM.....	215
Anexo 7: Preparación de muestras para análisis de aminoácidos.....	216
Anexo 8: Curva de calibración para estándar de astaxantina y astaceno.....	218
Anexo 9: Electroforesis de carotenoproteína.....	219
Anexo 10: Análisis estadístico.....	220
Anexo 11: Copia de la publicación derivada de la tesis.....	232

LISTA DE ABREVIATURAS

UP	Unidad de actividad proteolítica
AGP	Ácidos grasos poliinsaturados
BEM	Bioreactor enzimático de membrana
BG	Unidad de β -glucanasa
C_a	Concentración del soluto en la solución de alimentación
COT	Carbono orgánico total
C_p	Concentración del soluto en el permeado
Da	Daltones
FC	Factor de concentración volumétrico
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
J	Flux de permeado o velocidad del permeado a través de la membrana
kDa	Kilodaltones
MDD	Millones de dólares
OI	Ósmosis inversa
PEG	Polietilenglicol
PM	Peso molecular
PMC	Peso molecular de corte
PMN	Peso molecular nominal
R	Selectividad o retención de la membrana
RE	Equivalentes de retinol
R_m	Resistencia de la membrana
R_{pc}	Resistencia de la capa de soluto de polarización
R_T	Resistencia total
TM	Toneladas métricas
UF	Ultrafiltración
UL	Unidad de actividad lipolítica
ΔP	Fuerza impulsora o diferencia de presión
$\alpha_{A/B}$	Factor de separación para mezclas de dos componentes (A y B)
σ	Coefficiente de rechazo instantáneo

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Composición del camarón (100 g de porción comestible).....	9
2	Composición del cefalotórax de camarón.....	9
3	Pigmentos naturales utilizados como colorantes en alimentos.....	24
4	Colorantes naturales exentos de certificación en Estados Unidos.....	26
5	Carotenoides en algunas fuentes (mg/kg).....	30
6	Consumo recomendado de vitamina A en México.....	38
7	Procesos de separación basados en propiedades fisicoquímicas.....	71
8	Características de los procesos de membrana.....	75
9	Ventajas y desventajas de los BEM.....	86
10	Aplicaciones de BEM.....	87
11	Condiciones constantes y variables en el estudio de la degradación de astaxantina.....	113
12	pH promedio de 10 fermentaciones.....	119
13	Cantidades de pigmentos en el extracto.....	121
14	Características de los mejores tratamientos en cada sistema enzimático.....	134
15	Hidrólisis con proteasa en distintas proporciones de disolventes.....	137
16	Valores de f y Log (f/1-f) para distintos pesos moleculares de PEG en UF.....	140
17	Valores de f y Log (f/1-f) para distintos pesos moleculares de PEG en OI.....	141
18	Análisis de regresión de proteína soluble en retenido y xantofilas totales en permeado.....	147
19	Resultados de hidrólisis con proteasa en BEM.....	149
20	Proteína y pigmentos liberados en 11 horas a cuatro presiones.....	154
21	Rendimientos de extracción de pigmentos.....	160
22	Tiempos de retención y λ de absorción máxima de los estándares.....	162
23	Porcentajes de degradación de astaxantina natural y sintética a las 8 semanas de almacenamiento (diseño sin interacciones).....	173
24	Efecto de la interacción de factores sobre la estabilidad de astaxantina natural y sintética a las 8 semanas de almacenamiento (diseño con interacciones).....	179
25	Composición de aminoácidos de carotenoproteína.....	181
26	Estándares de electroforesis.....	219
27	Análisis de varianza del pH de la fermentación.....	220
28	Comparación múltiple de medias de Duncan para pH de la fermentación ($\alpha=0.05$).....	220
29	Análisis de varianza de hidrólisis con proteasa.....	220
30	Comparación múltiple de medias de Duncan para hidrólisis con proteasa ($\alpha=0.05$).....	221
31	Análisis de varianza de hidrólisis con proteasa a pH 7 y 8.....	221
32	Comparación múltiple de medias de Duncan para hidrólisis con proteasa a pH 7 y 8 ($\alpha=0.05$).....	221
33	Análisis de varianza de hidrólisis con proteasa:lipasa.....	222
34	Comparación múltiple de medias de Duncan para hidrólisis con proteasa:lipasa ($\alpha=0.05$).....	222
35	Análisis de varianza de hidrólisis con celulasa.....	222
36	Comparación múltiple de medias de Duncan para hidrólisis con celulasa ($\alpha=0.05$).....	223
37	Análisis de varianza de hidrólisis con celulasa:lipasa.....	223
38	Comparación múltiple de medias de Duncan para hidrólisis con celulasa:lipasa ($\alpha=0.05$).....	224

Tabla		Página
39	Análisis de varianza de hidrólisis con proteasa en disolventes orgánicos.....	224
40	Comparación múltiple de medias de Duncan para hidrólisis con proteasa en disolventes orgánicos ($\alpha=0.05$).....	225
41	Análisis de varianza de hidrólisis con 15 UP.....	225
42	Comparación múltiple de medias de Duncan para hidrólisis con 15 UP ($\alpha=0.05$).....	226
43	Análisis de varianza de hidrólisis en BEM con 15 UP.....	227
44	Comparación múltiple de medias de Duncan para hidrólisis en BEM con 15 UP ($\alpha=0.05$).....	227
45	Análisis de varianza de hidrólisis en BEM con 20 UP.....	228
46	Comparación múltiple de medias de Duncan para hidrólisis en BEM con 20 UP ($\alpha=0.05$).....	228
47	Análisis de varianza de estabilidad de astaxantina sin interacciones.....	229
48	Comparación múltiple de medias de Duncan para porcentajes de degradación de astaxantina a las 8 semanas de tratamientos sin interacciones ($\alpha=0.05$).....	229
49	Comparación múltiple de medias de Duncan para porcentajes de producción de astaceno a las 8 semanas de tratamientos sin interacciones ($\alpha=0.05$).....	230
50	Análisis de varianza de estabilidad de astaxantina con interacciones.....	230
51	Pruebas de <i>t</i> para la concentración de aminoácidos en carotenoproteínas.....	231

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Anatomía externa del camarón.....	7
2	Distribución de la producción camaronícola en México.....	13
3	Producción de camarón entre 1977 y 2001.....	14
4	Personal laborando en el descabezado de camarón.....	15
5	Contaminación con residuo de camarón.....	16
6	Descomposición del β -caroteno.....	35
7	Estructura de la astaxantina con esquema de numeración.....	40
8	Modelo de la estructura de la apocrustacianina, subunidad A2, mostrando la posición del ligando carotenóide y los aminoácidos aromáticos a su alrededor.....	68
9	Representación esquemática del proceso de separación con membranas.....	71
10	Clasificación de membranas.....	72
11	Diagramas esquemáticos de los principales tipos de membranas.....	73
12	Esquemas de los procesos de membrana.....	77
13	Comparación de membranas anisotrópicas con convencionales.....	78
14	Variación del flux con el tiempo.....	79
15	UF convencional y de flujo cruzado.....	79
16	Polarización de la concentración durante la UF.....	80
17	Principio del reactor de membrana operado con enzimas disueltas.....	81
18	Diagrama esquemático de un BEM.....	81
19	Polarización con gel.....	83
20	Reactores de contacto directo.....	84
21	Reactor de difusión.....	85
22	Reactor de multifase.....	85
23	Fermentación de residuos de camarón.....	96
24	Extracción de pigmentos.....	97
25	Análisis de astaxantina por HPLC.....	100
26	Hidrólisis de carotenoproteína por proteasa.....	102
27	Hidrólisis de carotenoproteína por proteasa:lipasa.....	103
28	Acción de celulasa sobre la carotenoproteína.....	104
29	Acción conjunta de celulasa:lipasa sobre la carotenoproteína.....	104
30	Hidrólisis de carotenoproteína por proteasa en sistema de disolventes orgánicos.....	105
31	BEM P-28 y baño para mantener la temperatura en el reactor.....	106
32	Hidrólisis de carotenoproteína en sistema modelo.....	109
33	Hidrólisis de carotenoproteína por proteasa en BEM.....	109
34	Concentración de pigmentos por OI.....	111
35	Análisis de estándares de pigmentos por HPLC.....	112
36	Disminución del pH en los residuos de camarón por <i>Lactobacillus paracasei</i> A3.....	119
37	Cromatograma de astaxantina.....	122
38	Proteína soluble en hidrólisis con proteasa.....	124
39	Xantofilas totales en hidrólisis con proteasa.....	125

Figura	Página
40 Proteína soluble en hidrólisis a pH 8.....	126
41 Xantofilas totales en hidrólisis a pH 8.....	127
42 Proteína soluble en hidrólisis con proteasa:lipasa.....	128
43 Xantofilas totales en hidrólisis con proteasa:lipasa.....	129
44 Proteína soluble en disociación de carotenoproteína con celulasa.....	130
45 Xantofilas totales en disociación de carotenoproteína con celulasa.....	131
46 Proteína soluble en disociación de carotenoproteína con celulasa:lipasa.....	132
47 Xantofilas totales en disociación de carotenoproteína con celulasa:lipasa.....	133
48 Proteína soluble en hidrólisis con proteasa en sistema de disolventes 15:75:10.....	135
49 Xantofilas totales en hidrólisis con proteasa en sistema de disolventes 15:75:10.....	135
50 Proteína soluble en hidrólisis con proteasa en sistema de disolventes 15:65:20.....	136
51 Xantofilas totales en hidrólisis con proteasa en sistema de disolventes 15:65:20.....	137
52 Estandarización del flux de permeado en UF.....	139
53 Estandarización del flux de permeado en OI.....	139
54 Estimación del PMC de la membrana de 10 kDa.....	140
55 Estimación del PMC de la membrana de 1000 Da.....	141
56 Proteína soluble en hidrólisis en sistema modelo.....	142
57 Xantofilas totales en hidrólisis en sistema modelo.....	143
58 Proteína soluble en retenido del hidrolizado (hidrólisis con 15 UP).....	144
59 Proteína soluble en permeado del hidrolizado (hidrólisis con 15 UP).....	144
60 Xantofilas totales en retenido (hidrólisis con 15 UP).....	145
61 Xantofilas totales en permeado (hidrólisis con 15 UP).....	146
62 Proteína soluble en retenido (hidrólisis con 20 UP).....	147
63 Proteína soluble en permeado (hidrólisis con 20 UP).....	148
64 Xantofilas totales en retenido (hidrólisis con 20 UP).....	148
65 Xantofilas totales en permeado (hidrólisis con 20 UP).....	149
66 Flux de permeado a 2 bares.....	151
67 FC volumétrico a 2 bares.....	151
68 Proteína soluble concentrada por UF.....	152
69 Proteína soluble en hidrólisis a cuatro presiones.....	153
70 Xantofilas totales en hidrólisis a cuatro presiones.....	153
71 Flux de permeado a cuatro presiones.....	154
72 FC volumétrico a cuatro presiones.....	155
73 Concentración de xantofilas totales por OI.....	156
74 Flux de permeado en OI.....	157
75 FC volumétrico en OI.....	158
76 Cromatograma de estándares de carotenoides.....	162
77 Cromatograma de Carophyll pink ^{MR}	163
78 Cromatograma de residuo de camarón fermentado.....	163
79 Cromatograma de astaxantinas y astaceno.....	165
80 Estabilidad de astaxantina en muestras almacenadas en oscuridad.....	165
81 Estabilidad de astaxantina en muestras almacenadas a la sombra.....	166

Figura		Página
82	Estabilidad de astaxantina en muestras almacenadas en exposición al sol.....	167
83	Estabilidad de astaxantina en muestras almacenadas en recipientes abiertos.....	168
84	Estabilidad de astaxantina en muestras almacenadas en recipientes cerrados sin evacuación del oxígeno.....	168
85	Estabilidad de astaxantina en muestras almacenadas al vacío.....	169
86	Estabilidad de astaxantina en muestras almacenadas a 15°C.....	169
87	Estabilidad de astaxantina en muestras almacenadas a 25°C.....	170
88	Estabilidad de astaxantina en muestras almacenadas a 45°C.....	171
89	Estabilidad de astaxantina en muestras almacenadas bajo luz de día y aire, a 25°C.....	174
90	Estabilidad de astaxantina en muestras almacenadas bajo luz de día y aire, a 45°C.....	174
91	Estabilidad de astaxantina en muestras almacenadas bajo luz de día y al vacío, a 25°C.....	175
92	Estabilidad de astaxantina en muestras almacenadas bajo luz de día y al vacío, a 45°C.....	176
93	Estabilidad de astaxantina en muestras almacenadas en oscuridad y aire, a 45°C.....	176
94	Estabilidad de astaxantina en muestras almacenadas en oscuridad y aire, a 25°C.....	177
95	Estabilidad de astaxantina en muestras almacenadas en oscuridad y al vacío, a 25°C.....	178
96	Estabilidad de astaxantina en muestras almacenadas en oscuridad y al vacío, a 45°C.....	178
97	Composición de aminoácidos no esenciales.....	182
98	Composición de aminoácidos esenciales.....	182
99	Determinación del PMC.....	214
100	Curva de calibración de astaxantina.....	218
101	Curva de calibración de astaceno.....	218
102	Curva de calibración de electroforesis.....	219
103	Electroforetograma de carotenoproteína.....	219

1. INTRODUCCIÓN

La producción de camarón en México es una de las actividades económicas más importantes, que le ha permitido desde 1999 obtener ingresos por arriba de los 300 MDD anuales. En la actualidad son más de 90,000 toneladas métricas las que se cosechan en los diversos sectores de producción. De esta cantidad aproximadamente un 65% se exporta y el resto se queda en el país para consumo nacional. El camarón, aparte de ser apreciado por sus características organolépticas, se reporta como un alimento altamente nutritivo por la calidad de su proteína en la cual pueden encontrarse cantidades significativas de aminoácidos esenciales, característica que puede extenderse a las proteínas encontradas en el cefalotórax del crustáceo. Al descabezar el camarón se producen cerca de 40,000 toneladas métricas de residuos que no son aprovechados y que representan un foco de contaminación ambiental

Estos desperdicios se concentran en los estados del país con mayor índice de captura del crustáceo, los que rodean al Golfo de California, y se producen prácticamente durante todo el año porque se cuenta con una infraestructura adecuada en granjas de cultivo.

Se considera al camarón como el crustáceo más abundante en la naturaleza, conteniendo en su caparazón al pigmento carotenoide astaxantina, el cual se encuentra unido a una proteína formando los complejos conocidos como carotenoproteínas que varían en colores: azul, verde o café.

Los colores brillantes y variados en los crustáceos se deben a la presencia de pigmentos carotenoides en forma libre o, en su mayoría, asociados con proteínas, unión que les proporciona estabilidad. Estos pigmentos en crustáceos se encuentran generalmente esterificados con ácidos grasos. Sin embargo, el pigmento no manifiesta su color rojo-anaranjado característico hasta que se encuentra libre de la fracción proteica, situación que se observa durante el cocinado de crustáceos por la desnaturalización de la carotenoproteína.

Actualmente, el mayor empleo de la astaxantina es la pigmentación de la carne de salmónidos para lograr el tinte rojo-rosado que distingue a algunas especies y que exige el consumidor. Es necesario incluir en la dieta de los peces a este pigmento porque estos animales no pueden sintetizarla *de novo*. El precio del salmón y la trucha en el mercado depende en parte del grado de intensidad que tenga el color rojo en el músculo del pez, lo cual influye globalmente sobre la aceptación del producto por parte del consumidor.

A través de evaluaciones sensoriales se ha determinado que hay preferencia del consumidor por elegir músculo de salmón pigmentado con astaxantina y no otros carotenos, debido a que se relaciona con un color rojo más natural. También se ha encontrado evidencia de que los niveles de astaxantina en el alimento afecta el sabor y textura de los filetes. El metabolismo de los salmónidos prefiere a los pigmentos altamente polares como la astaxantina, es por ello que utilizándola se logran mayores niveles de pigmentación comparado con cantaxantina y zeaxantina, de naturaleza menos polar.

La carencia de astaxantina en la dieta de cultivos de camarón y especies de salmónidos puede provocarles enfermedades, siendo importante la adición del caroteno en sus dietas para alcanzar altos porcentajes de supervivencia. En otros animales como las gallinas, el pigmento o sus derivados se utilizan para la pigmentación de las yemas de huevo.

El mercado mundial de astaxantina se estima en 200 MDD anuales, donde un kilogramo del pigmento se cotiza en 2,500 dólares. Aún el 95% de este mercado esta cubierto por el pigmento sintético, pero este disminuye poco a poco porque los consumidores demandan cada vez más productos de origen natural, situación que hace atractiva la búsqueda de fuentes naturales del pigmento.

Este interés por los carotenos naturales se refleja en la realización de estudios de extracción acerca de fuentes variadas que incluyen a plantas y residuos de crustáceos, además de microorganismos como algas, levaduras y bacterias.

Las evidencias científicas sugieren que la astaxantina posee un poder antioxidante superior al que presentan otros carotenoides como el β -caroteno, zeaxantina, cantaxantina, vitamina C y vitamina E. La astaxantina puede brindar protección contra cánceres de diversos tipos, proteger a la piel de la radiación ultravioleta y aumentar la respuesta inmune, entre muchos otros efectos significativos de mejoramiento de la salud, es por ello que recientemente han salido al mercado productos funcionales de astaxantina, extraída de algas, para el consumo humano que hacen alusión a su alto poder antioxidante.

También la industria de cosméticos muestra una tendencia al uso de colorantes naturales, entre los cuales se encuentra la astaxantina, apreciada por las tonalidades rojas-naranjadas que proporciona además de no presentar reacciones alérgicas por su origen natural.

Por su estructura insaturada, estos pigmentos son inestables ante condiciones de procesamiento como altas temperaturas, luz y oxígeno, ya que su oxidación se acelera mediante un mecanismo de autooxidación.

En estudios anteriores en este laboratorio se ha encontrado que en los residuos de crustáceos los pigmentos pueden estabilizarse aplicando una fermentación láctica, además de la conocida estabilización por la adición de antioxidantes comerciales como BHA y BHT.

Asimismo, se ha demostrado que al realizar un ensilado láctico con residuos de crustáceos se logran mayores rendimientos de extracción de astaxantina, debido principalmente al ambiente reductor que predomina en la fermentación.

El principal problema para extraer a la astaxantina de los residuos de crustáceos es su unión con las proteínas, lo cual puede obviarse mediante el empleo de enzimas proteolíticas que incrementen el nivel de pigmentos libres en las extracciones, aumentando esa digestión con un tratamiento preliminar de los residuos por medio del ensilado láctico.

La separación a través de procesos de membrana ofrece ventajas para la separación de compuestos moleculares de alto valor. Esta operación puede desarrollarse modificando temperaturas y otros parámetros de proceso lo que permite reducir posibles alteraciones químicas de los compuestos de interés, hecho fundamental en industrias del ramo alimentario y farmacéutico. Además, estos procesos pueden desarrollarse en lote para pequeñas cantidades o en forma continua para mayor escala.

Los bioreactores enzimáticos de membrana han incrementado su empleo en los últimos años en procesos que requieren transformaciones enzimáticas al mismo tiempo que sucede un proceso de separación del producto a través de membranas, donde comúnmente se requiere que el proceso catalítico sea continuo, para lo cual este tipo de reactores son unidades especiales que permiten conseguir ese objetivo a través de la integración, en operaciones continuas sencillas, del proceso enzimático, separación y concentración del producto, así como la recuperación del catalizador.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Camarón

2.1.1. Anatomía

El camarón, *Litopenaeus sp.*, pertenece a la familia de los decápodos, los cuales tienen dos mandíbulas y varios apéndices frente a la boca que les ayudan en su alimentación. El cuerpo de los decápodos está compuesto por una serie de segmentos duros llamados somitos, los cuales se encuentran ya sea fusionados unos con otros, o ligados con extremidades flexibles que se unen a un par de brazos desarrollados con pinzas, consideradas como piernas. Detrás de estas se encuentran cuatro pares de piernas caminadoras, 10 en total, por ello el término decápodo. Los camarones y las langostas mantienen a las piernas debajo del abdomen para nadar, pero también las usa para dirigir alimento hacia su boca (Figura 1) (Anónimo, 2001).

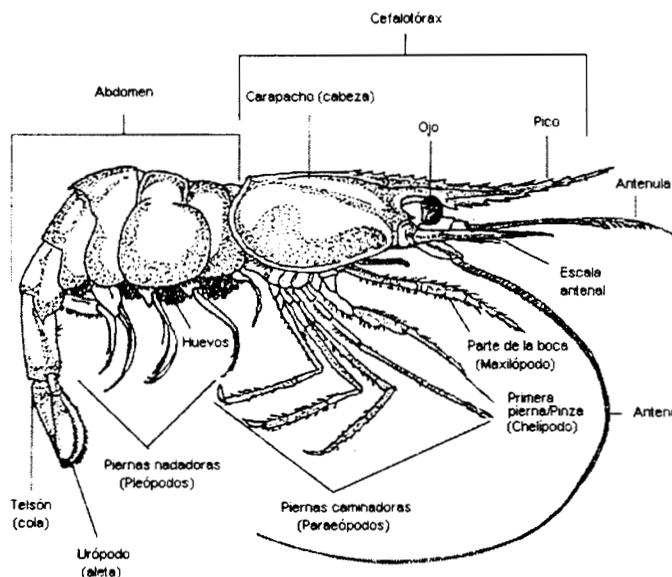


Figura 1. Anatomía externa del camarón.

(Anónimo, 2000; Anónimo, 2001)

Las hembras usan estos pleópodos para llevar huevos. La antena y antenulas frente a la boca son sus órganos sensoriales, menos desarrollados que en los cangrejos, y ayudan para el nado y alimentación en su estado larval, el par pequeño, las antenulas, contienen sacos con fluidos usados para la orientación del animal, equivalente al oído interno humano. El par largo de antenas es muy movable y

sensible, y puede desplazarse en todas direcciones, esto permite al crustáceo moverse con seguridad aún en aguas oscuras. La antena también contiene células del gusto. Su sentido del tacto es aumentado por pelillos finos situados en sus extremidades, permitiéndoles sentir aún movimientos ligeros. Los ojos están situados sobre el tronco, presentando estas facetas complejas, con 7,000 a 30,000 ojos individuales en cada uno. Sin embargo, y aún con este tipo de visión se orientan principalmente por el tacto (Anónimo, 2000; Anónimo, 2001).

El cuerpo de este crustáceo está cubierto con un caparazón sólido de quitina, el cual contiene carbonato de calcio que le confiere su dureza. Esta estructura sólida está unida a la subyacente capa de piel, formando el exoesqueleto, los músculos también están unidos a este caparazón exterior (Ruello, 1976; Anónimo, 2000).

2.1.2. Composición

El camarón es un alimento altamente nutritivo, 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).

El agua es el mayor componente de la parte comestible del camarón, y el factor determinante de los atributos sensoriales de los productos comerciales preparados. Gates y col. (1999) determinaron humedades en *L. vannamei* de Honduras y *Metapenaeus lysianassa* de Indonesia, encontrando valores entre 68.84 y 85.45%. En el caso del camarón de origen asiático estos valores son menores.

Las composiciones aproximadas de los residuos de camarón (cefalotórax) se presentan en la Tabla 2. La quitina contenida dentro de la fracción de fibra cruda es alrededor de 18.4 % en base seca.

Entre la fracción de lípidos se encuentran, además de las sustancias liposolubles responsables del aroma y sabor típicos del camarón, los pigmentos liposolubles de

tipo carotenoide, responsables en parte del color que presenta el camarón *in vivo* y después de la cocción (Mathur y Narang, 1990).

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

Componente	Cantidad
Agua	78.2 g
Proteína	18.1 g
Grasa	0.8 g
Carbohidratos	1.5 g
Calcio	63 mg
Fósforo	166 mg
Hierro	1.6 mg
Tiamina	0.02 mg
Niacina	3.2 mg
Riboflavina	0.03 mg
Calorías	91 cal

(Charley, 1987)

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

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

(Anónimo, 1975)

2.1.3. Explotación mundial del camarón

La producción mundial de camarón, de acuicultura y captura, alcanzó 3.5 millones de toneladas métricas (TM) en 1997. Actualmente, China es el mayor productor de camarón en el mundo, contribuyendo con alrededor del 24% de la producción

mundial del crustáceo. Indonesia, Tailandia, India y Vietnam son otros productores importantes (Globefish, 1999).

La especie más abundante de camarón producida es el “camarón tigre” gigante representando el 17% de la producción total en sistemas de acuicultura. El 40% de la producción camaronícola mundial corresponde al conocido como “camarón para pasta” (Akiami), una especie pequeña (Globefish, 1999).

Estados Unidos es el principal productor de camarón congelado con 152,000 TM en 1997. India es el segundo mayor productor de camarón congelado en el mundo (14% del total de camarón producido). Ecuador también tiene un lugar importante con 109,000 TM en 1997. Este país se ha expandido en la industria de la acuicultura, su alta producción en 1999 fue debido a los efectos de El Niño, provocando que la larva de camarón llegara a ser más abundante debido al agua caliente (Globefish, 1999).

Tailandia fue el mayor exportador mundial con 126,000 TM (1,300 MDD). Asimismo, este país ha venido concentrando más cantidad de camarón en forma de producto preparado y preservado (Globefish, 1999).

Indonesia fue hasta 1992 el segundo mayor exportador de camarón. Posteriormente, en 1996, India ocupó el segundo lugar, en 1997 Ecuador ocupó esa posición con casi 110,000 TM. Estados Unidos continúa siendo el principal mercado del camarón ecuatoriano, importando el 56% del total de la producción a aquel país. El mercado europeo creció en 1998, con un mercado compartido del 31%. El mayor importador de camarón ecuatoriano en Europa es España, seguido por Francia e Italia (Globefish, 1999).

Recientemente las cantidades producidas por cultivo en Ecuador se han visto considerablemente reducidas por problemas de enfermedades como la “mancha blanca” que han aumentado la mortandad del crustáceo (Globefish, 1999).

Las importaciones de camarón fresco y congelado alcanzaron 1.2 millones de TM en 1994, cayendo posteriormente. Este declive puede ser atribuido a la reducción de las importaciones por parte de los tres principales países compradores: Japón, Estados Unidos y España. El mercado del camarón en Japón se interrumpió repentinamente en Agosto de 1994 después de que los comerciantes pararon de comprar el crustáceo debido a su bajo consumo y a los altos costos de almacenamiento en frío. Hubo también un decremento en las importaciones por problemas experimentados con los productores de camarón tailandés, los cuales afectaron al mercado nipón. Indonesia ha llegado a ser el mayor proveedor en el mercado japonés, pero recientemente este país ha sufrido una reducción en sus envíos (Globefish, 1999).

India, también sufrió un decremento en sus envíos de camarón a Japón. Sin embargo, después de trece años, ha vuelto a ser para Japón el mayor proveedor de camarón en 1998, debido al redireccionamiento de las exportaciones hindúes hacia ese país como resultado de la prohibición de importación de los alimentos de mar de Asia hacia la Unión Europea, la cual inició en la mitad de 1997. Indonesia perdió su primer posición en 1997 debido a problemas de enfermedades en sus granjas. Tailandia es el primer proveedor de camarón hacia Estados Unidos, aunque en 1997 se redujo la producción de camarón tailandés y pese a que sus exportaciones se han concentrado en el mercado americano, estas no han podido crecer (Globefish, 1999).

El incremento de las importaciones de camarón en Estados Unidos ha provenidó de Latinoamérica, especialmente Ecuador. India y Bangladesh exportaron más camarón al mercado americano, probablemente porque estos países han tratado de abrir el comercio con otras naciones por el cierre de mercado con la Unión Europea. Recientemente, Ecuador mostró grandes envíos hacia Estados Unidos como resultado de su excelente producción causada por El Niño, aunque posteriormente han tenido graves problemas con enfermedades (Globefish, 1999).

Las importaciones de camarón fresco y congelado por parte de la Unión Europea no han fluctuado grandemente entre 1990 y 1998. No obstante, sus exportaciones han sufrido un incremento global del 56%. Ecuador, su principal proveedor, es el país que ha registrado un crecimiento mayor en exportaciones de camarón hacia esa parte del mundo (Globefish, 1999).

2.1.4. Explotación del camarón en México

Las principales especies de camarones que se encuentran en las costas y mares de nuestro país son: *L. stylirostris*, *L. vannamei*, *L. californiensis* y *L. aztecus*; el primero de ellos mejor conocido como camarón azul, y el segundo como camarón blanco; las tres primeras especies se encuentran, pescan y cultivan a lo largo del Océano Pacífico, principalmente en los estados de Nayarit y en los que rodean al Golfo de California: Sinaloa, Sonora, Baja California Norte y Baja California Sur. En el Golfo de México, los mayores productores son Veracruz, Tabasco, Campeche y Tamaulipas, su mayor proporción de captura en mar abierto es de *L. aztecus* o camarón café y *L. vannamei* en cultivo (SAGARPA, 2001).

Actualmente la producción camaronícola en México rebasa 90,000 TM, las cuales se encuentran distribuidas en: a) captura en mar abierto, b) esteros y bahías y, c) cultivo en granjas (Figura 2).

De esta cantidad, el 60 a 70% se destina a exportación, para lo cual el camarón es descabezado, siendo sólo el 55% del camarón la parte comestible. Esto hace que se produzcan alrededor de 35,000 a 40,000 TM de desperdicios no aprovechados y que representan un foco de contaminación (SAGARPA, 2002).

De la totalidad de camarón producido, 65% es exportado y el resto se destina a consumo nacional. De 1992 a 2001 la producción pasó de 66,210 a 91,120 TM, un incremento del 37.62%. Esta producción le permitió a México en el 2001 obtener ingresos por más de 300 MDD por exportaciones (SAGARPA, 2002).

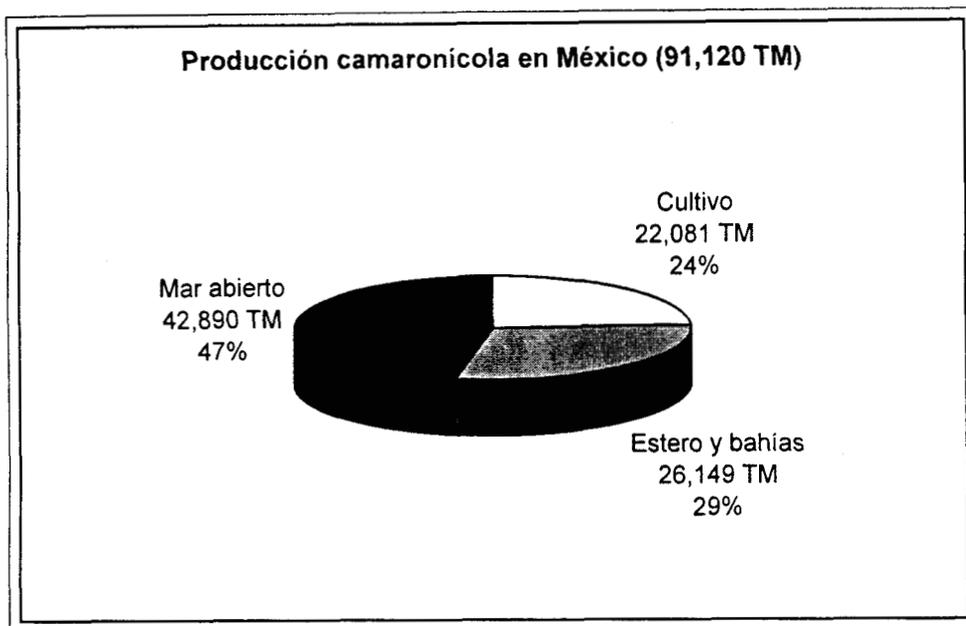


Figura 2. Distribución de la producción camaronícola en México.
(SAGARPA, 2002)

En 1952 se capturaban alrededor de 35,000 TM de camarón, en 1970 el índice de captura aumentó por arriba de 60,000 TM. En la Figura 3 se muestra la producción de este crustáceo en México desde 1977 hasta 2001. Entre 1979 y 1989 se mantuvo entre 70,000 y 80,000 TM, con la excepción de 1987, cuando por primera vez se produjeron más de 80,000 TM. En los tres años posteriores a 1989 hubo un decremento, con cifras por debajo de 70,000 TM. En el período 1993 a 1996 nuevamente se superó esta cantidad, con excepción de 1995 (69,845 TM). A partir de 1997 la producción camaronícola ha estado por arriba de 80,000 TM debido al repunte que la acuacultura ha tenido en los últimos años; en 1999 se cruzó la barrera de 90,000 TM (SAGARPA, 2002).

Ante la creciente producción camaronícola a través de su reproducción controlada en granjas, se estima que en los próximos años la cifra en TM aumentará, pero a la vez se agravará el problema de contaminación, ya que fundamentalmente toda la producción de granjas es de exportación, teniendo que realizar la operación del descabezado justo después del momento de su captura.

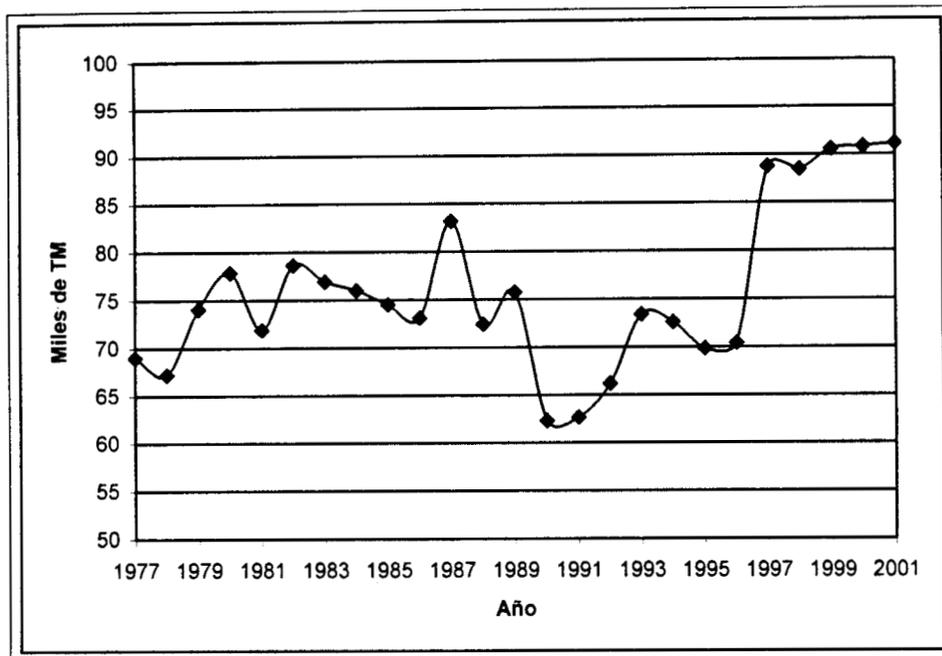


Figura 3. Producción de camarón entre 1977 y 2001.
(SAGARPA, 2002)

En 2001, el 24% de la producción total se produjo a través de la camaronicultura, lo cual ubica a México dentro de los primeros 10 productores de camarón por medio de acuacultura y el segundo en América Latina (SAGARPA, 2002).

Los estados de Sinaloa y Sonora son los que tienen la mejor infraestructura para pesca en mar abierto, así como las granjas camaronícolas más grandes en extensión de espejo de agua, productivas y mejor desarrolladas. Debido a esto, también son los lugares donde se producen la mayor cantidad de desperdicios de cabeza de camarón, existiendo en varios puntos estratégicos de alta producción la disponibilidad permanente para el aprovechamiento de este subproducto (Armenta, 1998).

La acuacultura es la vía de mayor crecimiento como método de producción del camarón, desplazando poco a poco a la captura de estero y bahía donde, por el crecimiento demográfico y la situación económica, se ha incrementado el número de pescadores, hecho que suscita enfrentamientos entre pescadores tradicionales y nuevos oficientes de la pesquería (Sánchez, 1999).

La captura de camarón es un ejemplo de lo mucho que falta por hacer en la actividad pesquera del país y de las opciones aprovechables mediante investigación, organización y trabajo (Sánchez, 1999).

Al ser el camarón mexicano tan apreciado en el extranjero, principalmente en Estados Unidos, donde se consume el mayor porcentaje, empresas transnacionales como Ocean Garden^{MR} ha invertido en nuestro país 15 MDD para financiar el desarrollo e incrementar la producción de los sectores pesquero y acuícola del país. Ante esta situación, se espera una mayor cantidad de fuentes de empleo e ingresos al país, pero también un aumento en el volumen de los desperdicios camaronícolas (Figura 4) (Notimex, 1999).



Figura 4. Personal laborando en el descabezado de camarón.
(Armenta, 1999)

Los residuos de camarón se producen durante la mayor parte del año en los estados del país donde se practica su cultivo, y los volúmenes aumentan considerablemente entre los meses de Septiembre y Noviembre cuando se permite su captura en bahía y mar abierto (Armenta, 1998). El único manejo de las ocho toneladas diarias de desperdicios que se generan en estas zonas en los días de cosecha de la granja es apilar las cabezas en zonas determinadas, a cierta altura se mezclan con tierra.

Cuando se satura la zona con cabezas de camarón, se busca otro lugar cercano para apilar de nuevo (Figura 5) (Ahumada, 1999).



Figura 5. Contaminación con residuo de camarón.
(Armenta, 1999)

2.2. Pigmentos

De acuerdo a la FDA (Food and Drug Administration de los Estados Unidos) un colorante o pigmento es cualquier material que imparte color, u otra sustancia obtenida por síntesis o artificio similar extraída o derivada, con o sin intermediario del cambio final de identidad, a partir de un vegetal, animal o mineral u otra fuente y que cuando es añadida o aplicada a alimentos, medicamentos o cosméticos, es capaz de impartir color por sí misma.

La producción mundial de pigmentos se estima en alrededor de 700,000 TM, un poco más de la mitad se emplea para la industria textil, mientras que sólo el 2.2% se destina a alimentos. La proporción de pigmentos naturales está aumentando debido a la toxicidad de algunos compuestos sintéticos. Sin embargo, cerca del 80% de las ventas totales de los colorantes en Estados Unidos, el mayor mercado, es cubierto por tres pigmentos químicos: tartrazina, azonaftoles y rojo 40 (FDA, 2001).

2.2.1. Implicaciones del color

Kanner (1978) menciona que el color es una propiedad de la materia directamente relacionada con el espectro de la luz, por lo cual, puede medirse físicamente en términos de su energía radiante o intensidad, y por su longitud de onda. El ojo humano sólo lo percibe cuando su energía corresponde a una longitud de onda que se encuentra en el intervalo de 380 a 780 nm. De acuerdo a lo anterior, la definición de color es: la parte de la energía radiante que el ser humano percibe mediante las sensaciones visuales que se generan por la estimulación de la retina del ojo.

El color es, junto con la calidad microbiológica, y el sabor en caso de los alimentos, uno de los parámetros principales con los que se evalúa un producto biológico. Sin embargo, no importa cual sea su calidad, nadie lo aceptará si no tiene el color adecuado. Actualmente se tiene el reto de sustituir colores sintéticos por naturales (Pszczola, 1998). En la industria alimentaria, el color es el atributo que se aprecia al primer impacto, los pigmentos se usan como aditivo, pues no son los constituyentes esenciales (Badui, 1999).

2.2.2. Clasificación de pigmentos naturales

En términos generales, los pigmentos relacionados con los alimentos se pueden dividir en ocho categorías:

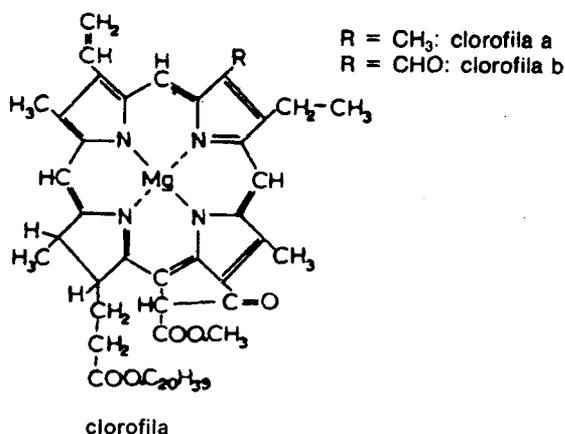
1. Carotenoides
2. Clorofilas
3. Antocianinas
4. Flavonoides
5. Betalainas
6. Taninos
7. Mioglobina y hemoglobina
8. Otros

Los seis primeros se encuentran fundamentalmente en productos vegetales, aún cuando llegan a estar presentes en derivados de origen animal; esto ocurre cuando en la dieta de los animales se incluyen vegetales ricos en pigmentos a excepción de los carotenoides que también se encuentran en crustáceos y algunos microorganismos como levaduras y algas (Simpson, 1983; Badui, 1999).

A continuación se ofrece una breve monografía referente a cada grupo de pigmentos. Con respecto al grupo de carotenoides, se profundiza en la sección 2.3.

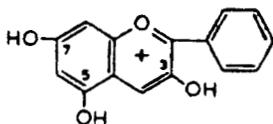
Clorofila

Es el pigmento vegetal más abundante en la naturaleza, ya que la mayoría de las plantas la contienen en diversas concentraciones. La fotosíntesis es uno de los procesos anabólicos más importantes que se lleva a cabo en nuestro planeta, el cual se realiza a través este pigmento. Es un proceso de suma importancia en la vida de todos los organismos, ya que es el principal mecanismo por el cual se sintetizan los diferentes carbohidratos que se encuentran en la naturaleza. Las hojas de la mayoría de las plantas deben su color verde a la clorofila, pero ésta va desapareciendo al acercarse a la senescencia, para dejar paso a otros pigmentos como los carotenoides; el mismo proceso se presenta en los frutos inmaduros, que siendo verdes se tornan amarillos, rojos, etc., por la pérdida de la clorofila y la síntesis de otras sustancias coloridas en la etapa de maduración (Pfander, 1992).



Antocianinas

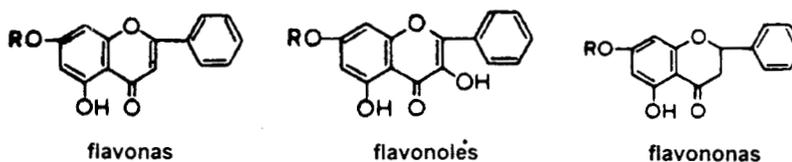
Al igual que los flavonoides y las betalainas, son pigmentos hidrosolubles con características de glucósidos; están constituidos por una molécula de antocianidina, como aglucón, a la que se une un azúcar por medio de un enlace β -glucosídico. La estructura química básica de estos aglucones es el ion flavilio que consta de dos anillos aromáticos: un benzopirilo y un fenol. Es muy común que una misma antocianidina reaccione con más de un carbohidrato para formar distintas antocianidinas. Son responsables de los colores rojo, anaranjado, azul y púrpura de las uvas, manzanas, rosas, fresas y muchos otros productos de origen vegetal, principalmente frutas y flores. Generalmente se encuentran en la cáscara o piel, como en el caso de las peras y las manzanas, pero también se pueden localizar en la parte carnosa, como en las fresas y las ciruelas (Badui, 1999).

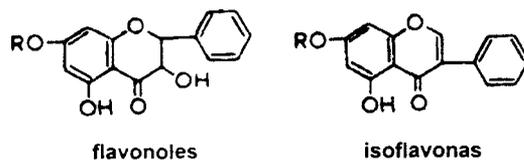


ion flavilio (estructura fundamental de las antocianidinas)

Flavonoides

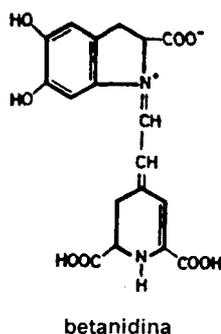
Son compuestos fenólicos que abundan en la naturaleza. Debido a que tienen una estructura química muy parecida a la de las antocianinas normalmente se encuentran en diversos frutos los dos tipos de compuestos ya que ambos grupos de pigmentos siguen un proceso biosintético común. Estos pigmentos son generalmente amarillos, y a pesar de que existen en un número muy elevado, no contribuyen de manera importante al color de los alimentos. Se localizan en diversas frutas como peras, fresas, manzanas, cerezas, duraznos, naranjas y limones. Sin embargo, sí son responsables en gran medida de la astringencia de diversos productos, como el té (Anónimo, 1986).





Betalainas

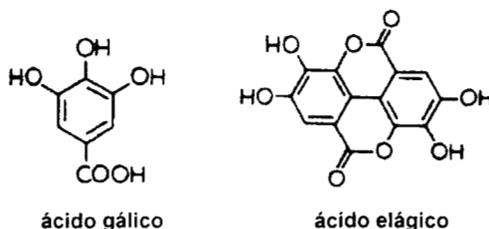
Este término se refiere a un grupo de aproximadamente 70 pigmentos hidrosolubles, con estructuras de glucósidos, derivados de la 1,7-diazoheptametina, y que se han dividido en dos grandes clases: los rojos o betacianinas, y los amarillos o betaxantinas. Se encuentran en pocas plantas y flores, entre las que destaca el betabel (*Beta vulgaris*), la tuna roja y otras ocho familias del orden *Centrospermae*. Las betalainas más estudiadas son las del betabel, que se localizan en las vacuolas y cuya betacianina principal recibe el nombre de betanina, representa hasta 95% del total de los pigmentos en este tubérculo. La del amaranto (*Amaranthus tricolor*) es una de las betacianinas que últimamente han sido motivo de investigación. La amarantina, que se extrae de las hojas rojas, se ha usado en algunos países para colorear diversos alimentos (Mabry, 1966; Teutonico y Knorr, 1985; Huang y von Elbe, 1986).



Taninos

Los taninos son una clase de compuestos fenólicos incoloros o amarillo-café, que de acuerdo con su estructura y reactividad con agentes hidrolíticos, particularmente ácidos, se han dividido en dos grupos: los hidrolizables y los no hidrolizables o condensados. Su peso molecular varía normalmente entre 500 y 3,000 Da. Por su estructura poseen propiedades reductoras y actúan como antioxidante protegiendo a

los vinos tintos. Sirven de sustrato en las reacciones de oscurecimiento enzimático, sobre todo en productos como el café y el cacao, y son los responsables de la astringencia de muchos frutos inmaduros, como el plátano, la pera, la uva, la manzana, etc., debido a que tienen la propiedad de reducir las características de lubricación de la saliva pues precipitan las proteínas y las glucoproteínas que contiene ésta (Anónimo, 1986; Pfander, 1992).

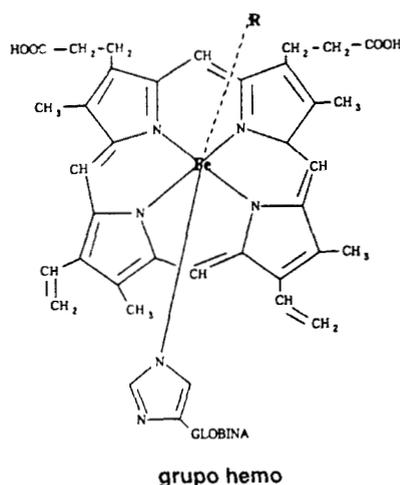


Mioglobina y hemoglobina

Estos dos pigmentos son proteínas conjugadas o hemoproteínas responsables del color rojo del músculo y de la sangre, respectivamente, que se encuentran solamente en productos de origen animal. Ambos pigmentos desempeñan funciones biológicas muy importantes: la hemoglobina se encarga del transporte del oxígeno de los pulmones a los diferentes tejidos, y ahí queda retenido temporalmente en la mioglobina, hasta que se consume en el metabolismo aerobio. En cada 100 g de sangre hay aproximadamente 78 g de agua y 18.5 de proteínas, las cuales están constituidas por 1.2 g de globulinas, 2.3 g de albúminas y 15 g de hemoglobina. Esta hemoglobina posee una estructura cuaternaria de tetrámero, de peso molecular 67,000 Da, integrada por dos polipéptidos o cadenas α con 141 aminoácidos cada uno, y dos cadenas β con 146 aminoácidos. A pesar de las diferencias de composición entre las diferentes hemoglobinas que se conocen, todas presentan una estructura globular y una cuaternaria de tetrámero (Badui, 1999).

El grupo hemo presente en la mioglobina, hemoglobina y en otras proteínas, es una metaloporfirina, moléculas muy coloreadas por su estructura tetrapirrólica cíclica conjugada. El grupo hemo está constituido por una estructura anular orgánica

compleja, la protoporfirina, a la que se halla unida un átomo de hierro en estado ferroso (II) (Pérez y col., 2000).



Otros

Incluye un gran número de compuestos que también imparten color tanto a los tejidos vegetales como animales. Se incluyen quinonas, xantonas, la riboflavina con sus respectivas coenzimas, los citocromos, el gosipol en la semilla de algodón, etc. Debido a que no son abundantes contribuyen poco al color de los alimentos. En los últimos veinte años se ha dado un incremento significativo en compuestos aislados de organismos marinos, los cuales tienen relevancia como productos naturales, o recién llamados nutraceuticos. Un gran número de diterpenos, compuestos C₂₀, precursores de sustancias, como el geraniol, tienen estructuras isoprenoides y se cree son sustancias producidas en condiciones de estrés en los organismos. Entre estos compuestos se encuentran algunas con diversas actividades biológicas: antibióticos, antivirales, antibacterianos y feromonas. Los diterpenos conocidos como giberelinas, son reguladores del crecimiento en plantas; el retinol, o vitamina A es otro diterpeno, y uno más lo comprenden los xenicanos, los cuales contienen un anillo de nueve miembros, lo que permite suponer que tienen una actividad similar a la de otros diterpenos encontrados en la naturaleza (Henry, 1996; Oshima, 1998; Badui, 1999; Vasconcellos, 2001).

2.2.3. Fuentes de pigmentos

Sintéticas

Los compuestos que requieren certificación incluyen a las sustancias químicas sintetizadas con alto grado de pureza, cada lote es aprobado por organismos gubernamentales. Los pigmentos sintéticos han sido usados ampliamente debido a sus ventajas como estabilidad y homogeneidad del color, sobre los naturales. Sin embargo, muchos causan problemas de salud (Anónimo, 1986; Francis, 1987).

Entre los pigmentos sintéticos con mayores ventas destacan los compuestos azo, las antraquinonas, los indigos, los etilbenos y los triarilmetano. Los más importantes desde el punto de vista comercial son los pigmentos azo (31.5% de ventas), seguidos por las antraquinonas (21.6%) y los etilbenos (17.1%). Los pigmentos azo son la clase química más grande de los compuestos coloridos sintéticos, su versatilidad es tal que están disponibles en casi todos los colores, se caracterizan por poseer un grupo cromóforo $-N=N-$, y pueden ser mono, di y triazo. Entre los colores más importantes están los amarillos 5 y 6, los rojos 2, 4 y 40 y el naranja B. Los segundos colorantes sintéticos más abundantes son las antraquinonas, y su característica principal es la de poseer uno o más grupos carboxilo en un sistema de anillos conjugados, al menos con tres anillos condensados (FDA, 2001).

Al parecer, muchos pigmentos sintéticos pueden causar daños menores a la salud, como el amarillo sunset y el amarillo tartrazina, asociados con algunas alergias; la tartrazina causa reacciones como asma y rinitis, y parece inducir hiperactividad en niños. En el amplio mercado de bebidas carbonatadas se ha prohibido el uso de pigmentos sintéticos como el rojo 2, reemplazándose por el rojo 40, aún rechazado en muchos países. Los colorantes azo han sido prohibidos en la Unión Europea (Pszczola, 1998).

Debido a que cada vez hay más consumidores conscientes en adquirir alimentos con una buena calidad nutricional, incluyendo elementos vitamínicos, los colorantes

sintéticos han visto decrecer su popularidad. Sin embargo, los pigmentos sintéticos poseen ventajas como: firmeza de color, amplio intervalo del tinte, bajo costo en su uso, alta efectividad, baja variación de lote a lote y no presentan aromas o sabores de especias (Henry, 1996; Pszczola, 1998).

Europa y Japón han reducido sus demandas de pigmentos sintéticos y los de origen natural se solicitan en mayor medida. Mientras que en el resto del mundo, la demanda por colorantes sintéticos sigue aumentando 2 a 3% por año (Lorenz y Cysewski, 2000).

Naturales

En la industria se emplean distintos materiales sintéticos y naturales para impartir color a los alimentos y hacerlos aceptables para el consumidor. En la Tabla 3 se enlistan distintos pigmentos naturales con sus fuentes de obtención, en este caso se emplea la materia prima seca y molida o un extracto de ésta rico en el agente activo.

Tabla 3. Pigmentos naturales utilizados como colorantes en alimentos.

Fuente	Agente activo
Achiote, anato, <i>Bixa orellana</i>	Bixina (carotenoide)
Azafrán, <i>Crocus sativus</i>	Crocetina (carotenoide)
Betabel, <i>Beta vulgaris</i>	Betalainas
Cúrcuma, <i>Curcuma longa</i>	Curcumina
Cochinilla, <i>Dactylopius coccus</i>	Ácido carmínico
Pimiento rojo, <i>Capsicum annum</i>	Capsantina (carotenoide)
Enocianina	Polímeros de antocianinas
Zanahoria, <i>Daucus carota</i>	β -caroteno (carotenoide)
Cempasúchil, <i>Tagetes erecta</i>	Luteína (carotenoide)
Plantas verdes	Clorofila

(Badui, 1999)

En los últimos años se han eliminado del mercado varios de los colorantes rojos sintéticos por considerarlos tóxicos, lo cual ha ocasionado que en varios países industrializados se incremente la demanda de los pigmentos naturales (Henry, 1996).

Los pigmentos naturales no necesitan certificación, así como los químicamente idénticos a los naturales. Estos pigmentos naturales son producidos por microorganismos, vegetales, animales o minerales o por síntesis química pero con estructuras idénticas a las naturales (Wissgott y Bortlik, 1996; Pszczola, 1998).

El análisis de su composición debe de estar dentro de los siguientes límites (FDA, 2001):

- a) Plomo < 5 mg/kg
- b) Arsénico < 2 mg/kg
- c) Mercurio < 1 mg/kg
- d) Metales pesados < 10 mg/kg
- e) Residuos de ignición < 0.1%
- f) Residuos por ignición < 0.1%
- g) Análisis por espectrometría de absorción
- h) Análisis de compuestos por cromatografía en papel, capa fina o columna

En la Tabla 4 se indican los pigmentos que no requieren de certificación en Estados Unidos.

Tabla 4. Colorantes naturales exentos de certificación en Estados Unidos.

Colorante	Año de aprobación	Usos y restricciones
Aceite de endospermo de maíz		
Aceite de zanahoria	1967	Alimentos en general
Alimento o extracto de Tagetes (<i>Aztec marigold</i>) (<i>cempasúchil</i>)	-	Alimento para pollos
Astaxantina	-	Pigmentación de salmónidos
Azafrán	1966	Alimentos en general
Azul ultramarino	-	Consumo animal
Betabel deshidratado	1967	Alimentos en general
Cantaxantina	1967	Alimentos en general
Caramelo	1963	Alimentos en general
Dióxido de titanio	1966	Alimentos en general
Extracto de anato (achiote)	1963	Alimentos en general
Extracto de cáscara de uva (enocianina)	1966	Bebidas carbonatadas, bases de bebidas y bebidas alcohólicas
Extracto de cochinilla y carmín	1969 y 1967	Alimentos en general
Extracto de color de uva	1981	Alimentos excepto bebidas
Gluconato de hierro	1967	Aceitunas maduras
Harina de algas secas: <i>Alga Haematococcus</i> y <i>Levadura Phaffia</i>	2000	Pigmentación de salmónidos
Harina de semilla de algodón parcialmente tostada	1964	Alimentos en general
Jugo de frutas	1966	Alimentos en general
	1995	Aditivo en polvo
Jugo de vegetales	1966	Alimentos en general
	1995	Aditivo en polvo
Oleoresina de paprika	1966	Alimentos en general
Oleoresina turmerica	1066	Alimentos en general
Paprika	1966	Alimentos en general
Riboflavina	1967	Alimentos en general
Turmerico (cúrcuma)	1966	Alimentos en general
β -apo-8'-carotenal	1963	Alimentos en general
β -caroteno	1964	Alimentos en general

(FDA, 2001)

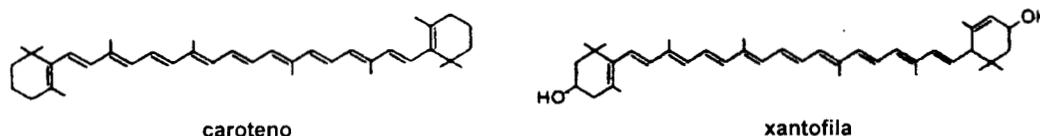
2.3. Carotenoides

2.3.1. Generalidades y estructura

En 1913, E.V. McCollum y Marguerite Davis mostraron que el factor liposoluble en mantequilla -después caracterizado como vitamina A- estimulaba el crecimiento de ratas alimentadas con una dieta incompleta. La creencia de que algunos extractos de plantas coloreadas con efectos similares, más tarde conocidos como carotenoides, podran ser convertidos en vitamina A fue confirmado por T. Moore en 1930 (VERIS Research Information Service, 1999).

La investigación sobre carotenoides inició en 1831 cuando Wackenroder aisló carotenos de zanahorias. Poco tiempo después, en 1837, Berzelius llamó *xantofilas* a los pigmentos amarillos de las hojas del otoño (Pfander, 1992).

Los carotenoides que contienen uno o más átomos de oxígeno en su estructura se conocen como *xantofilas* (Haila, 1999).

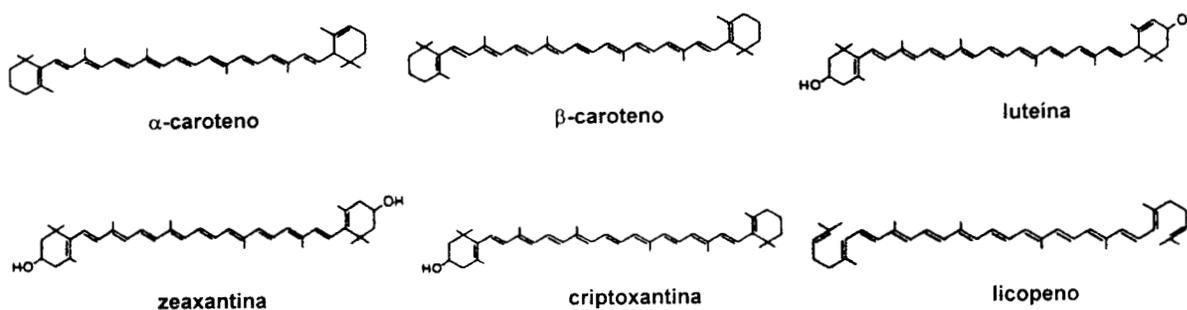


Desde entonces los carotenoides han sido objeto de un gran número de estudios acerca de sus varias fuentes, localización fisiológica, funciones y propiedades. Los carotenoides son hidrocarburos poliinsaturados que consisten de una cadena de carbonos con varios dobles enlaces conjugados (unidades de isopreno), la estructura esta ciclada en uno o ambos extremos para formar anillos cíclicos llamados ionona. La constitución de la serie de dobles enlaces conjugados ocasiona la variabilidad de las longitudes de onda absorbidas que dan origen a la característica de los colores que van del amarillo al rojo (Shahidi y Brown, 1998).



Cada doble enlace en la cadena poliénica del carotenoide puede existir en dos configuraciones, los isómeros geométricos *trans* y *cis*. El doble enlace *cis* ocasiona impedimento estérico entre los átomos de hidrógeno y grupos metilos más cercanos, es por ello que generalmente los isómeros *cis* son termodinámicamente menos estables que la forma *trans*. La mayoría de los carotenoides se encuentran en la naturaleza predominante o completamente en su forma *trans* (Haila, 1999).

Los carotenoides más abundantes son: α-caroteno, β-caroteno, luteína, zeaxantina, criptoxantina y licopeno.



Los carotenoides son liposolubles, manifiestan una amplia gama de colores amarillos y rojos en productos vegetales y animales. Su distribución en la naturaleza es muy abundante, se estima que al año se producen en la naturaleza alrededor de 100,000,000 TM de estos compuestos (Carotenoid Society, 1999).

En organismos vivos, los carotenoides desempeñan funciones importantes, como la coloración del cuerpo, tejidos, o fluidos biológicos, permitiendo de ese modo la adaptación al ambiente, y que pueden asumir diversas funciones fisiológicas como las relacionadas con la respiración y la visión. Los carotenoides son responsables de la coloración de las aves, peces, insectos y algunos invertebrados. Dado que sólo las plantas y microorganismos sintetizan carotenos *de novo*, los encontrados en animales provienen de las plantas que fueron ingeridas en algún punto de la cadena alimenticia. La presencia de estos colorantes en los animales es el resultado de los hábitos alimenticios, absorción, transformaciones metabólicas y simbiosis (Shahidi y Brown, 1998).

Originalmente los carotenoides se consideraron importantes sólo por el hecho de ser precursores de la vitamina A. Más recientemente, hubo interés significativo en la evaluación de los carotenos en situaciones no relacionados con su carácter de pro-vitamina A. Aunque las propiedades de los antioxidantes del β-caroteno se descubrieron a finales de la década de 1960, su importancia biológica no se conoció hasta mucho más tarde. Desde hace poco, el interés en los carotenoides ha sido motivado en gran parte por la observación constante de que los consumidores de

frutas y vegetales, particularmente verde oscuros y los vegetales amarillos intensos, tienen un bajo riesgo de contraer cáncer (VERIS Research Information Service, 1999).

2.3.2. Fuentes

Los carotenoides son compuestos abundantes en plantas, microorganismos y animales, aunque estos últimos no los sintetizan *de novo*, producen naturalmente colores brillantes; se han identificado entre 500 y 600 carotenoides específicos. Solamente un número pequeño de carotenoides han sido encontrados en cantidades apreciables en sangre y tejidos humanos (VERIS Research Information Service, 1999).

Dado su amplia distribución en la naturaleza, las fuentes de carotenoides son variadas (Tabla 5). Las mezclas naturales pueden ser obtenidas a partir de algas o aceite de palma; mientras que las frutas y vegetales son fuentes de carotenoides específicos, como el licopeno en los tomates. La luteína se extrae de las flores caléndulas, como la flor de cempasúchil, y se encuentra en bajas concentraciones en algunas frutas y vegetales; la zeaxantina es aislada de algas y de maíz; la criptoxantina se obtiene de cítricos y frutas tropicales (VERIS Research Information Service, 1999).

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 y ocasiona un cambio de color de manera individual (Simpson, 1983). Kennedy (1979) menciona que los crustáceos muestran brillantes como colores azul, verde, púrpura, rojo y anaranjado junto con un negro o café, debido a los pigmentos carotenoides, los cuales se pueden encontrar en forma libre, pero más comúnmente como carotenoproteínas.

Tabla 5. Carotenoides en algunas fuentes (mg/kg).

Fuentes	β -caroteno	α -caroteno	Luteína y zeaxantina	Licopeno	Criptoxantina	Astaxantina
Animales						
Camarón, harina ^a						0-200
Camarón, carotenoproteína liofilizada ^b						1160
Cangrejo rojo, en aceite de soya ^c						>550
Frutas y vegetales^d						
Apio, crudo	1.50	0	2.32	0	0	
Brócoli, cocido, drenado	10.42	0	22.26	0	0	
Durazno, crudo	0.97	0.01	0.57	0	0.24	
Durazno, enlatado, drenado	3.34	0	0.33	0	1.41	
Ejote verde, cocido, drenado	5.52	0.92	7	0	0	
Espinaca, cocida, drenada	52.42	0	70.43	0	0	
Espinaca, cruda	55.97	0	119.38	0	0	
Lechuga, romana, cruda	12.72	0	26.35	0	0	
Mandarina, cruda	0.71	0.14	2.43	0	4.85	
Mango, crudo	4.45	0.17			0.11	
Naranja, cruda	0.51	0.16	1.87	0	1.22	
Naranja, jugo fresco	0.04	0.02	0.36		0.15	
Papa, dulce, horneada	94.88	0	0	0	0	
Papaya, cruda	2.76	0	0.75	0	7.61	
Pimiento, rojo, crudo	23.79	0.59			22.05	
Pimiento, verde, crudo	1.98	0.22				
Sandía, cruda	2.95	0	17	48.68	1.03	
Tomate, rojo, cocido	3	0	1.50	44.00	0	
Tomate, rojo, crudo	3.93	1.12	1.3	30.25	0	
Tomate, jugo, enlatado	4.28	0	0.6	93.18	0	
Toronja, rosa, cruda	6.03	0.05	0.13	14.62	0.12	
Zanahoria, cruda	88.36	46.49				
Microorganismos						
Levadura <i>Phaffia rhodozyma</i> ^{e, f}						30-2100
Alga <i>Haematococcus</i> , base seca ^f						15000-30000
Plantas^g						
Cempasúchil, extracto			9 X 10 ⁵ (luteína)			
Cucurbitácea, extracto			3.8 X 10 ⁵ (zeaxantina)			
Producto sintético						
Carophyll pink, Hoffman La Roche						80

(^aTorrissen y col., 1989; ^bSimpson y Haard, 1985; ^cSpinelli y Mahnken, 1978; ^dAgricultural Research Service, 1998; ^eMeyer y Preez., 1994; ^fLorenz y Cysewski, 2000)

Como se mencionó antes, los animales no pueden sintetizar carotenoides, sin embargo, se ha reportado que los camarones *Litopenaeus* convierten a los carotenoides ingeridos en su dieta en 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,

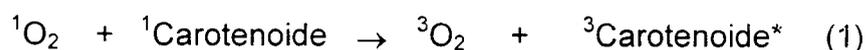
como el β -caroteno, el crustáceo era capaz de sintetizar astaxantina y depositarla en su exoesqueleto.

Algunas especies de peces, como koi y varios crustáceos (*Litopenaeus japonicus* y *Litopenaeus monodon*), tienen los mecanismos enzimáticos requeridos para convertir a los carotenoides en astaxantina (Davis, 1985; Chien y Jeng, 1992).

2.3.3. Efecto antioxidante

Los carotenoides son antioxidantes que previenen o controlan la generación de radicales libres y neutralizan moléculas reactivas como el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) que pueden iniciar las reacciones en cadena. Los carotenoides pueden también funcionar como antioxidantes interruptores o bloqueadores de las reacciones iniciadas, especialmente a presiones parciales de oxígeno bajas. Por consiguiente, los carotenoides previenen la generación de radicales libres impidiendo las reacciones por las cuales se generan (Cross, 1987; Shimidzu, 1996).

La ventaja de los carotenoides en la neutralización física de las moléculas oxidantes de $^1\text{O}_2$, es que pueden actuar como antioxidantes sin cambiar su propia estructura. Esta neutralización de $^1\text{O}_2$ se caracteriza principalmente por la disipación de energía (*) como calor (reacciones 1 y 2), mientras que en las reacciones de neutralización química entre carotenoides y radicales libres, como la oxidación de lípidos, hay una transferencia de electrones (Haila, 1999).



Krinsky (1994) y Edge y col. (1997) mencionan que la estructura de dobles enlaces conjugados ricos en electrones de los carotenoides es la principal responsable de:

- a) Su excelente habilidad para neutralizar físicamente moléculas de $^1\text{O}_2$ sin experimentar un cambio en su estructura

- b) Su reactividad química con radicales libres
- c) Su propia oxidación

Los pigmentos que muestran protección máxima tienen nueve o más dobles enlaces conjugados y grupos en los extremos de su estructura (Edge y col., 1997).

El licopeno es más eficiente que el β -caroteno en la neutralización del $^1\text{O}_2$, sin embargo, esto no significa que sea un mejor antioxidante, ya que es más susceptible a la oxidación que el β -caroteno y por lo tanto se consume más rápido (Edge y col., 1997).

Se han propuesto tres mecanismos por medio de los cuales los carotenoides neutralizan a los radicales libres (Haila, 1999):

- a) Transferencia de electrones formándose un radical-catión del carotenoide



- b) Reacción de adición



- c) Abstracción de hidrógeno formando un radical neutral del carotenoide



La luteína y el β -caroteno son estructuralmente similares, sin embargo, la luteína posee un grupo hidroxilo adicional en cada anillo de β -ionona (pp. 27-28), lo que la hace más hidrofílica. En estudios *in vivo*, la luteína ha mostrado propiedades antioxidantes mayores al β -caroteno. La astaxantina, el carotenoide presente en

crustáceos y peces marinos, es también estructuralmente similar al β -caroteno, pero con grupos hidroxilos y cetos en cada anillo de β -ionona. El potencial antioxidante de la astaxantina se ha demostrado en estudios *in vivo* e *in vitro* (Chopra y col., 1993; O'Connor y O'Brien, 1998).

Ziegler y Subar (1991) mencionan que los radicales libres son producidos como bioproductos metabólicos originados por contaminantes ambientales (como dióxido de nitrógeno y ozono del aire contaminado, metales pesados, hidrocarburos halogenados, radiaciones ionizantes y humo de cigarro). En ausencia de antioxidantes, los radicales libres altamente reactivos atacan a las paredes y constituyentes celulares, incluyendo al ADN y proteínas, particularmente aquellos que contienen ácidos grasos poliinsaturados (AGP). Cuando estos radicales libres reaccionan con AGP generan radicales libres, los cuales pueden dañar tanto a la estructura como a la función de las membranas celulares, ácidos nucleicos y regiones proteicas con densidad electrónica alta. Esto puede resultar en: muerte de la célula o alteración de la respuesta celular a hormonas y neurotransmisores; mutaciones potencialmente carcinogénicas, e inactivación de enzimas y otras proteínas.

2.3.4. Estabilidad

La estructura insaturada de los carotenoides los hace susceptibles a la oxidación, particularmente en las dobles ligaduras, inducida por las diferentes condiciones de procesamiento como altas temperaturas, radiaciones electromagnéticas y oxígeno (Haila, 1999). Su oxidación se acelera con el calor mediante un mecanismo similar 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 (Ishiwari, 1980). Badui (1999) indica que 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.

Los carotenoides puros son inestables en presencia de oxígeno. La pérdida de color es la característica más usual de su propia oxidación. Los carotenoides *in vivo* son mucho más estables que aquellos aislados en soluciones orgánicas. *In vivo*, generalmente se localizan formando una parte integral en la estructura compleja de membranas. Sin embargo, las propiedades físicas y químicas del carotenoide en las membranas se deben a sus interacciones con otras moléculas como lípidos y proteínas (Haila, 1999).

La oxidación y subsiguiente desintegración de los carotenoides no es aleatoria, esta se inicia en un extremo de la molécula, el proceso inicia en el extremo abierto antes que en el anillo terminal de ionona. El color característico de los carotenoides desaparece paulatinamente conforme se van saturando y rompiendo las dobles ligaduras por saturación (Kearsley y Rodríguez, 1981; Mordi y col., 1993).

En los alimentos existe una relación entre la oxidación de los carotenos y la autooxidación de las grasas, los radicales libres oxidan a los carotenoides, sin embargo el factor individual más importante en su oxidación es el oxígeno. También la temperatura afecta la estabilidad del caroteno aumentando la velocidad de oxidación e incrementando su susceptibilidad al desnaturalizar la proteína protectora, aunque en ausencia de aire soportan temperaturas relativamente altas, y con respecto a la humedad, la pérdida de color es más veloz en ausencia de agua (Yamauchi y col., 1993; Frankel, 1995).

Los productos de la oxidación de carotenoides son una mezcla compleja de compuestos con grupos epóxidos, hidroxilos y carbonilos (Figura 6) (Handelman, 1996). La degradación de β -caroteno generalmente produce compuestos con grupos carbonilos (Haila, 1999). Handelman y col. (1991) también obtuvieron este tipo de

productos cuando disolvieron al β -caroteno en condiciones extremas como 100% de oxigenación a 60°C y agregando un activador de la oxidación (azo-bis-isobutironitrilo).

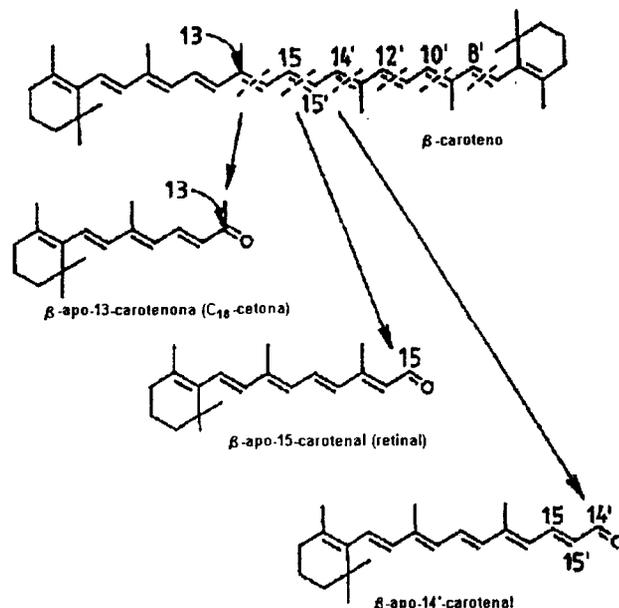


Figura 6. Descomposición del β -caroteno.
(Handelman y col., 1991; Haila, 1999)

2.3.5. Funcionalidad

Los carotenoides desempeñan diversos papeles biológicos. A pesar de sus estructuras semejantes cada uno desempeña distintas funciones. Algunos, como el α -caroteno, β -caroteno y la β -criptoxantina son precursores de la vitamina A y pueden ser convertidos metabólicamente a vitamina A, siendo el β -caroteno el que tiene el potencial más alto como provitamina (de Pee y col., 1998).

Estos compuestos neutralizan a los radicales libres de oxígeno protegiendo a las células, siendo el licopeno el de mayor actividad neutralizante. El daño oxidativo resultante del ataque de radicales libres ha sido relacionado con la vejez prematura, cáncer, arterosclerosis, cataratas, degeneraciones maculares y enfermedades degenerativas (Cross, 1987; Shimidzu, 1996).

Los carotenoides aumentan la respuesta inmune (van den Berg, 1999) y protegen la piel contra el daño resultante a la exposición de rayos UV (Black y Chan, 1975).

La luteína y zeaxantina son los únicos carotenoides presentes en la región macular de la retina y son relacionados con el funcionamiento normal de la mácula, responsable de la visualización detallada de las formas (Seddon y col., 1994; Jacques y col., 1998; Smith y col., 1999).

Ciertos carotenoides, incluyendo licopeno y β -caroteno, incrementan la comunicación entre células por el acrecentamiento del intercambio de señales regulatorias (Ziegler y Subar, 1991).

Los carotenoides han mostrado inhibición de varios tipos de cáncer: licopeno con el cáncer de próstata (Giovannucci y col., 1995), de pecho (Dorgan y col., 1998) y del tracto digestivo (Franceschi y col., 1994); luteína, zeaxantina, α -caroteno y β -caroteno con cáncer de pulmón (Jain y col., 1990) y de pecho (Zhang, 1999); β -caroteno con cáncer oral (Barbone y col., 1996), epitelial (Ramaswamy y col., 1990), cervical (Palan y col., 1991; Peng y col., 1998), de pecho (Potishchman y col., 1990; Negri y col., 1996; Jumaan y col., 1999), de pulmón (Kune y col., 1989; Candelora y col., 1994; Mayne y col., 1994) y de la tiroides (D'Abanzo y col., 1997), y criptoxantina con cáncer cervical (Batieha y col., 1993).

Se reportan en la literatura una cantidad importante de estudios entre la ingesta de carotenoides y la reducción de enfermedades coronarias. Morris y col. (1994) demostraron una relación inversa entre los niveles séricos de carotenoides y el riesgo de enfermedades coronarias, mientras que Gey y col. (1993) y Street y col. (1994) reportaron un riesgo alto de muerte por enfermedades del corazón en individuos con bajo nivel sérico de carotenoides totales.

En un multiestudio realizado en países europeos, se obtuvo un efecto significativo inverso asociado entre los niveles de licopeno en los tejidos adiposos y el riesgo del primer infarto grave (Kohlmeier y col., 1997).

2.3.6. Requerimientos nutricionales

El β -caroteno y otros carotenoides son fuentes de vitamina A cuando el cuerpo los necesita para satisfacer sus requerimientos. Dado que también poseen otras funciones biológicas, incluyendo la capacidad antioxidante, su uso no se debe solamente a su actividad provitamina A y los requerimientos para su utilización varían de acuerdo al estatus individual de estrés oxidativo (Ziegler y Subar, 1991; van het Hof y col., 1998)

En general, la ingesta estimada diaria, basada en intervalos de dieta promedio es de 1.5-3 mg para β -caroteno y de 3.6-7.6 mg para carotenoides totales (VERIS Research Information Service, 1999).

No hay una dosis oficial sugerida de ingesta para carotenoides, aunque la ingesta recomendada de vitamina A es 1000 equivalentes de retinol (RE) para hombres y 800 para mujeres (VERIS Research Information Service, 1999). El factor de conversión es el siguiente (Ziegler y Subar, 1991):

1RE = 1 μ g retinol
= 6 μ g β -caroteno
= 12 μ g de otros carotenoides provitamina A

Basándose en las directrices de las agencias gubernamentales para ingestas óptimas de frutas y vegetales en la prevención de enfermedades crónicas, se observa que 6 mg diarios de β -caroteno es una ingesta adecuada (Ziegler y Subar, 1991). La Alianza para la Investigación del Envejecimiento, una organización para el apoyo al ciudadano de los Estados Unidos para la investigación y mejoramiento de la

salud e independencia de las personas de la tercera edad, ha recomendado de 10 a 30 mg de β -caroteno por día para una salud óptima (VERIS Research Information Service, 1999).

En México, Bourges (1983) del Instituto Nacional de la Nutrición recomienda el consumo diario de equivalentes de retinol que se indica en la Tabla 6, en la cual se agregaron las equivalencias en β -caroteno y otros carotenoides.

Tabla 6. Consumo recomendado de vitamina A en México.

Edad/Condición	RE	β -caroteno (mg)	Otros carotenos (mg)
0-10 años	500	3	6
11 en adelante	1000	6	12
Embarazadas y lactantes	1500	9	18

La Secretaría de Salud (2000) presentó un proyecto de Norma Oficial Mexicana (PROY-NOM-035-SSA2-2000) para la prevención y control de enfermedades en la perimenopausia y postmenopausia de la mujer, en el cual se recomienda un consumo mínimo de 800 μ g de vitamina A, lo cual equivale a 800 RE (4.8 mg de β -caroteno o 9.6 mg de otros carotenoides).

Los suplementos nutricionales naturales contienen varios carotenoides -incluyendo α - y β -caroteno, licopeno, zeaxantina, criptoxantina y luteína- que se encuentran en varias frutas y vegetales amarillos y verde oscuros. Los suplementos de carotenoides sintéticos contienen sólo β -caroteno compuesto por isómeros *trans*, mientras que el β -caroteno de fuentes vegetales está compuesto por isómeros *trans* y *cis*. El 9-*cis*- β -caroteno tiene mayor capacidad antioxidante que el isómero *trans* del β -caroteno (Ben-Amotz y Levy, 1996).

El único efecto común asociado con la ingesta alta de carotenoides (30 mg o más por día), a partir de suplementos o alimentos ricos en carotenoides, es el amarillamiento

de la piel. Este es un problema inofensivo que desaparece cuando la ingesta de pigmentos se reduce (Bendich, 1988).

2.4. Astaxantina

La astaxantina (3,3'-dihidroxi- β,β -caroteno-4,4'-diona) es un compuesto intensamente colorido que se clasifica dentro del grupo de los carotenoides. Se encuentra de forma natural en la dieta de varias especies acuáticas como el salmón, trucha, camarón, peces ornamentales y crustáceos. Este pigmento 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 que después pasan 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 (Hirschberg, 2001).

La astaxantina es abundante en la naturaleza, especialmente en los ambientes marinos, y es probablemente el pigmento mejor conocido por provocar el tinte rojo-rosado en la carne de los salmónidos, también en camarón, langostas y cangrejo. Porque estos animales no son capaces de sintetizar astaxantina *de novo*, los pigmentos carotenoides deben suministrarse en sus dietas (Lorenz y Cysewski, 2000).

2.4.1. Química y estabilidad

La molécula de astaxantina tiene dos carbonos asimétricos localizados en las posiciones 3 y 3' de los anillos benzenoicos sobre cualquiera de las partes finales o extremos de la molécula. Diferentes enantiómeros de la molécula se producen como consecuencia de las distintas formas en que los grupos hidroxilo están unidos a los centros asimétricos de los átomos de carbono (Figura 7).

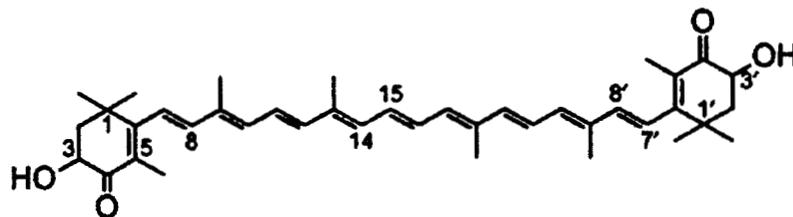


Figura 7. Estructura de la astaxantina con esquema de numeración.
(Lorenz y Cysewski, 2000)

Cuando el grupo hidroxilo se une y proyecta arriba del plano de la molécula, es "configuración R", y cuando el grupo hidroxilo se adhiere para proyectarse debajo del plano de la molécula, se conoce como "configuración S". Por lo tanto, los tres enantiómeros posibles son designados como: 3R,3R'; 3S,3S'; y 3R,3S' (meso) (Lorenz y Cysewski, 2000). Estos tres estereoisómeros que forman la mezcla racémica están en una proporción de 1:2:1, han sido observados en varias especies de camarón así como en otros crustáceos. La astaxantina produce un color rojo-anaranjado, cuando su concentración es menor con respecto a otros carotenos que tienen un mayor grado de oxidación se observa una tendencia al color amarillo (Schiedt y col., 1993).

La astaxantina es biosintetizada a través de la ruta isoprenoide, la cual también es responsable de la gran variedad de moléculas de lípidos solubles como los esteroides, esteroides, prostaglandinas, hormonas y vitaminas D, K y E. La ruta inicia en acetil-CoA y prosigue a través del pitoeno, licopeno, β -caroteno y cantaxantina antes de los pasos oxidativos finales para llegar a la astaxantina (Davis, 1985).

Los isómeros *trans* de la astaxantina natural se convierten en una mezcla *cis-trans*, especialmente en 9-*cis* y 13-*cis*. El incremento de la temperatura, exposición a la luz o la presencia de ácidos, pueden provocar la formación de isómeros *cis* (Johnson y An, 1991). Yuan y Chen (1999) observaron que en disolventes orgánicos a distintas temperaturas los isómeros *trans* son parcialmente isomerizados a sus formas *cis*, principalmente a 13-*cis*-astaxantina; las velocidades de isomerización fueron distintas

para cada disolvente, obteniendo el orden diclorometano > cloroformo > diclorometano:metanol (25:75) > metanol > acetonitrilo > acetona > sulfóxido de dimetilo, sobre la base del cual concluyen que para impedir la isomerización del pigmento deben evitarse los disolventes clorados y temperaturas altas.

Debido al largo sistema de dobles enlaces conjugados de la astaxantina, en su estado libre, es mucho más sensitiva a los efectos dañinos de la luz, calor, ácido y álcali, que cuando esta forma el complejo carotenoproteína (Johnson y An, 1991; Shahidi y Brown, 1998).

Meyers y Bligh (1981) mencionan que cuando los carotenoides contenidos en crustáceos se someten a procesos de extracción con altas temperaturas en presencia de oxígeno, se promueve la oxidación de astaxantina a astaceno.

2.4.2. Fuentes

2.4.2.1. Crustáceos

El pigmento más abundante en crustáceos es la astaxantina, la cual puede encontrarse en forma libre, esterificada, o formando complejos con proteínas (Torrissen y col., 1989). Este complejo se conoce como carotenoproteína, y sólo cuando se encuentra libre de la parte proteica se manifiesta el color rojo-anaranjado característico de la astaxantina (Schiedt y col., 1993). En los crustáceos, los carotenoides se acumulan en el carapacho como carotenoproteínas, variando la apariencia de un color azul claro a un rojo tenue, este fenómeno en su medio natural sirve como medio de protección de algunas especies (Schiedt, 1987).

Menasveta y col. (1993) indican que la unión de la proteína con el grupo cromóforo, se encuentra principalmente en decápodos. El calentamiento ocasiona la desnaturalización de este complejo, resultando un marcado cambio de color que va del verde-oscuro a un rojo brillante, esto se observa muy fácilmente en el cocinado de los cangrejos.

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 quitina, proteína residual y astaxantinas (Meyers, 1994). Estas últimas son la fuente natural de los pigmentos para los salmones silvestres, y también se usan para aumentar por medio del color el valor comercial de muchas especies acuícolas como truchas arcoiris y salmones. El interés que han adquirido los carotenos naturales ha ocasionado que se realicen estudios con el fin de elevar su aprovechamiento a partir de fuentes naturales (Simpson y Haard, 1985).

En estudios de fijación de astaxantina proveniente de krill en "salmón coho", Mori y col. (1989) concluyeron que prácticamente no hay diferencia en la absorción y depósito de los diésteres de astaxantina y astaxantina sintética libre (Carophyll pink^{MR}). Los carotenoides en el tracto intestinal se componen exclusivamente de astaxantina libre, lo que sugiere que el salmón coho tiene la capacidad de hidrolizar en el intestino casi toda la astaxantina esterificada. Esto coincide con lo reportado por Greene y Selivonchik (1987), quienes encontraron que el salmón rosado hidroliza en el intestino casi todos los ésteres con lipasas no específicas. Además, el hecho de que se detectaron bajos niveles de astaxantina en el tracto intestinal sugiere que estos carotenoides son transportados rápidamente dentro de la sangre a través del intestino (Mori y col., 1989).

En los salmónidos, truchas y salmones, la astaxantina se encuentra en estado libre en el músculo y plasma, lo que indica que los ésteres de astaxantina son hidrolizados en el tracto digestivo y que este pigmento se absorbe en su forma libre (Sivtseva, 1982; Schiedt y col., 1986; Torrissen y col., 1989). En crustáceos, cantidades relativas de astaxantina se encuentran en forma esterificada y en la mayoría de los experimentos empleando crustáceos y residuos de crustáceos como alimento para salmónidos, estas fuentes lograron el nivel de pigmentación más eficiente, un resultado no esperado por los niveles de astaxantina libre que esta fuente contiene. La razón de esta inesperada observación es desconocida, pero puede estar

relacionada con otros compuestos que se encuentran en los crustáceos, y que pueden facilitar la absorción y depósito de los pigmentos carotenoides (Torrissen y col., 1989).

Camarón

El camarón del género *Litopenaeus*, ubicado en el grupo de los decápodos, es el crustáceo más abundante, y la astaxantina es el carotenoide que se encuentra en mayor concentración en su caparazón. Específicamente, el color del cuerpo de los crustáceos depende cuantitativa y cualitativamente de la presencia de carotenoides en los cromóforos hipodérmicos y en la capa pigmentada del exoesqueleto epidérmico (Katayama, 1972). Este pigmento también se encuentra unido a una proteína, formando carotenoproteínas solubles en agua y variantes en colores que van del azul al verde o café. Únicamente después del cocinado o la extracción con disolventes, la astaxantina liberada adquiere un color típico rojo-anaranjado (Schiedt y col., 1993).

La mayor parte de la astaxantina en el tejido epidérmico corresponde a la forma esterificada; los complejos de carotenoides con proteínas, carotenoproteínas y carotenolipoproteínas, predominan en el exoesqueleto. La astaxantina se muestra como un pigmento rojo, pero cuando forma complejos con proteínas, la absorbancia de la luz cambia provocando variaciones en el color que van del azul-verde al café. Así, pese al hecho de que la astaxantina es el grupo prostético cromóforo de las diferentes carotenoproteínas, pueden lograrse colores distintos. El color rojo de los crustáceos cocinados se produce por la liberación de los grupos prostéticos individuales de la astaxantina, que se desnaturalizan por el calor (Lorenz y Cysewski, 2000).

Torrissen y col. (1989) mencionan que los carotenoides presentes en el camarón están combinados con los grupos amino de la quitina y proteínas mediante enlaces tipo base Schiff. Los mismos autores indican que se han desarrollado algunos

métodos de extracción de carotenoproteínas a partir de *Pandalus borealis*, y los niveles de astaxantina en el alimento formulado a partir de los residuos de este camarón estuvieron entre 0 y 200 mg/kg, lo cual depende de la calidad del residuo, la especie, método de secado, y empleo de antioxidantes. El alimento a partir de residuo de camarón se ve limitado por las cantidades variables de astaxantina y los altos costos del secado.

Se ha confirmado la utilización de alimentos o harinas de camarón como fuentes naturales de pigmentos desde que se observó un incremento en el contenido de los carotenoides en la piel y el músculo de la trucha. El total de astaxantina en harina seca de camarón noruego es de aproximadamente 25.2 mg/kg (88% diéster y 12% monoéster), al incorporarla en un 30% en la dieta de la trucha arcoiris, el pigmento se deposita en la piel en forma de diéster, mientras que la forma libre se encuentra en el músculo. Sin embargo sólo se ha logrado una fijación que no excede el 3%, esto debido a que alrededor del 90% de los pigmentos se desechan a través de las heces por la baja digestibilidad de los mismos por parte de la trucha. El origen de la baja fijación de los carotenoides se debe a la pobre cantidad de pigmento que se encuentra en forma libre, los altos contenidos de quitina y carbonato de calcio impiden una buena absorción. Por lo tanto deben de hacerse esfuerzos dirigidos al desarrollo de técnicas industriales que cumplan objetivos como: preservar el contenido de carotenoides en el residuo de camarón fresco, extraer los pigmentos o la descalcificación de las harinas (Torrissen y col., 1981; Choubert y Luquet, 1983).

2.4.2.2. Algas

En la naturaleza, las algas sintetizan la astaxantina concentrándola dentro de la cadena alimenticia a través del zooplancton y crustáceos, los cuales son consumidos por el salmón, trucha y otros animales acuáticos (Kitahara, 1984).

La astaxantina es otro carotenoide de alto valor producido por microalgas, lo cual esta alcanzando éxito comercial. Las microalgas son una fuente potencial de células

únicas de proteína, obtenidas por el secuestro del dióxido de carbono, que puede ser utilizado en la purificación de los efluentes y para la producción de biocombustibles. Sin embargo, el costo de producción de las microalgas es alto, 5-20 dólares por kg en peso seco. Estos altos costos de producción impiden el uso de las microalgas como fuentes comerciales de productos mercantiles, que pueden ser obtenidos a bajo costo por otros métodos. Sin embargo, han sido desarrolladas pequeñas industrias productoras de microalgas para la obtención de materiales de alto valor. La *Spirulina* es producida por las industrias de la salud y nutrición en Estados Unidos, China, India y Cuba. En Australia y Israel se produce β -caroteno a partir de *Dunaliella* (Lorenz y Cysewski, 2000).

Antes que *Haematococcus* llegara a ser comercialmente disponible, las fuentes naturales de astaxantina incluían aceite o harinas de krill, aceite de cangrejo y levadura *Phaffia*. Sin embargo, estas fuentes tienen bajas concentraciones de astaxantina, entre 0.15% en los aceites a 0.40% en levadura *Phaffia*. Como resultado, las cantidades requeridas en los alimentos para lograr una pigmentación eficiente agregan un volumen indeseable de otros compuestos como quitina y cenizas a los alimentos. En contraste, *Haematococcus* contiene 1.5-3% de astaxantina (base seca) y ha ganado aceptación en acuicultura y otros mercados como una forma concentrada de astaxantina natural (Lorenz y Cysewski, 2000).

2.4.2.3. Levaduras

La levadura *Phaffia rhodozyma* contiene astaxantina como carotenoide principal, de 50 a 800 mg/kg, dependiendo de la cepa y las condiciones de crecimiento (Johnson y col., 1980). Utilizando esta levadura se han llegado a obtener concentraciones entre 1.35 y 2.1 mg/g de astaxantina, agregando al medio de cultivo un precursor monoterpénico como el α -pineno empleando como sustrato jugo de uva, dependiendo también de la fase de crecimiento en que se encuentre el microorganismo (Meyer y Preez, 1994).

Los altos niveles de astaxantina en *P. rhodozyma* la hacen una fuente posible de pigmentos para salmónidos. Sin embargo, es interesante observar que utilizando esta fuente de pigmentos en langosta (*Homarus americanus*) no se presenta acumulación de astaxantina, lo que sugiere que la configuración de la astaxantina en la levadura (3R,3'R) no puede integrarse como componente de la carotenoproteína crustaciana, y por lo tanto no es de valor en langosta (Torrissen y col., 1989).

2.4.2.4. Bacterias

También se han explorado bacterias como posibles fuentes de carotenoides. En 1999, investigadores de la Universidad Hebrea de Jerusalén patentaron a la bacteria *Paracoccus marcusii* MH1, la cual produce y secreta carotenoides, como adonixantina y astaxantina, al medio de cultivo. Los carotenoides son acumulados dentro de pequeñas partículas dentro de las células bacterianas, las cuales son secretadas fuera de la célula hacia el medio, fenómeno que no se ha observado en ninguna otra bacteria. Los pigmentos secretados se encuentran en pequeñas vesículas que contienen 87% de adonixantina y 8% de astaxantina, en sus formas libres, y el resto lo constituyen otros carotenoides (Hirschberg, 2001).

Fraser y col. (1997), aislaron de las bacterias marinas *Agrobacterium aurantiacum* y *Alcaligenes sp.* cultivo PC-1, los genes que codifican para las enzimas CrtZ y CrtW que participan en la síntesis de astaxantina. Llevaron a cabo la inserción de esos genes en *Escherichia coli* logrando expresar los genes biosintéticos insertados.

En muestras de suelos salinos de una granja en Alejandría, Egipto, Asker y Ohta (1999) encontraron una bacteria extremadamente halofílica (no indican el nombre), la cual tiene una alta habilidad para sintetizar carotenoides, principalmente cantaxantina; esta bacteria crece en concentraciones superiores al 10% de cloruro de sodio y sulfato de magnesio, produciendo hasta 2.06 mg de carotenoides por cada gramo de células en base seca; los autores esperan mejorar la producción mediante la obtención de una mutante o por aislamiento del gen responsable para cada tipo de carotenoide.

2.4.2.5. Sintéticos

Torrissen y col. (1989) relatan que en 1964 Hoffman La Roche (Basilea, Suiza) comenzó la producción comercial de cantaxantina sintética para la coloración de alimentos. Esta cantaxantina sintética se vendió bajo los nombres de "Roxanthin^{MR}" o Carophyll red^{MR}". Durante los años 1970's, este pigmento llegó a ser la fuente de colorante dominante en el cultivo de salmónidos. La astaxantina libre, "Carophyll pink^{MR}", fue sintetizada por la misma compañía en escala comercial en la segunda mitad de los años 1980's. Al parecer, en salmónidos la astaxantina es mejor absorbida y depositada que la cantaxantina.

En la actualidad la etiqueta de este producto comercial, Carophyll pink^{MR}, indica que contiene un 8% de astaxantina libre con una combinación de isómeros en equilibrio.

2.4.3. Importancia y aplicaciones

El precio de la astaxantina es de aproximadamente 2,500 dólares por kilogramo, con un mercado mundial estimado en 200 MDD por año. Aunque más del 95% de este mercado consume astaxantina sintética, actualmente los consumidores demandan productos naturales, haciendo a los pigmentos sintéticos menos deseables, lo que provee una oportunidad para la producción de astaxantina natural (Lorenz y Cysewski, 2000).

El dinamismo del mercado pesquero ha ocasionado que se demande cada vez más productos con características específicas, tendientes a satisfacer los gustos y preferencias del consumidor y por tanto aumentar su demanda. Una de estas características es el color, que en el caso particular de la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) representa uno de los factores más importantes de su comercialización. Lo anterior obedece a que en el medio natural presenta un color rosado en el músculo, lo que no sucede cuando la especie se somete al cultivo, siendo la solución el incluir en su dieta la cantidad adecuada del pigmento (Gobantes y col., 1998).

Estos pigmentos se utilizan principalmente para conferir color a muchas especies acuícolas como truchas arcoiris y salmones, aumentando así su valor comercial. Es importante destacar la importancia que representa la trucha arcoiris en la producción acuícola de México, que según registros de la FAO (Food and Agriculture Organization) presentó un incremento de 1985 a 1995 de 35.8% variando la producción en los años citados de 269 a 1559 TM, respectivamente. Esta producción es ofertada a través de la operación de 183 granjas de producción localizadas en nueve entidades (FAO, 1998).

2.4.3.1. Cultivo de salmón y trucha

El mayor mercado de la astaxantina es como fuente de pigmentación en acuicultura, principalmente en el salmón y la trucha. El continuo crecimiento de su cultivo ha creado una demanda enorme por pigmentos. El color del músculo de los salmónidos es el resultado de la absorción y depósito de la astaxantina consumida (Goodwin, 1984).

Las astaxantinas son los principales carotenoides en muchas especies acuáticas como truchas, salmones y otros animales, este pigmento no puede ser sintetizado por ellos mismos, lo que hace necesario incluirlo en su alimento (Chen y Meyers, 1982a; Foss y col., 1984). Los niveles de carotenoides en salmónidos silvestres pueden variar reflejando diferencias en el género, especie, tamaño, estado de madurez y metabolismo específico del pigmento. Los niveles mínimos de astaxantina en el músculo para visualizar una pigmentación aceptable son de 4 a 5 mg/kg (Meyers, 1994).

El carotenoide astaxantina desempeña el papel más importante en el cultivo de otros salmónidos como la trucha arcoiris. El efecto de la astaxantina en estos organismos repercute en el mejoramiento de funciones biológicas y nutricionales (Meyers, 1994). Un estudio en Noruega demostró que el buen crecimiento y supervivencia del salmón del Atlántico depende de la astaxantina en su dieta. Se encontró un crecimiento mínimo de los peces cuando se alimentaba con niveles de astaxantina menores a 5.3

mg/kg; los niveles de astaxantina mayores a 5.3 mg/kg proporcionaron un crecimiento normal en los peces, además de niveles altos de lípidos (Christiansen y col., 1995).

2.4.3.2. Peces ornamentales

Los colores luminosos de los carotenoides en peces tropicales no sólo son la llave de identificación para especies y señales de apareamiento, pueden también tener funciones fisiológicas importantes. Los peces ornamentales obtienen los carotenoides a partir de la alimentación con algas, corales o presas que tienen acumulados estos pigmentos. Los microcrustáceos, zooplancton, son por mucho los más abundantes de los animales marinos y actúan como el alimento principal de una amplia variedad de animales grandes. La astaxantina y la tunaxantina, libres o formando complejos, son los carotenoides más abundantes encontrados en todos los animales marinos. Uno de los grandes retos en la industria ornamental tropical-marina es lograr las réplicas veraces de colores en los peces que son mantenidos en cautiverio (Ako y Tamaru, 1999; Lorenz y Cysewski, 2000).

2.4.3.3. Aves de corral

Los índices de coloración en las yemas de huevo están correlacionados con las concentraciones de astaxantina, zeaxantina y luteína. A las gallinas que se les retiran los carotenoides de sus dietas, adquieren un valor de cuatro en la escala de color, lo cual es un color basal, en menos de dos semanas. Un estudio demostró que la astaxantina en 6 mg/kg resulta en valores de coloración promedios de 10.75 después de 15 días, el cual en la escala de color es un valor dentro del rango aceptable para el consumidor. Estos resultados han sido corroborados en estudios con aves de corral utilizando astaxantina natural esterificada de residuos de cangrejo. En este estudio, la astaxantina produjo un incremento lineal en la coloración de la yema de huevo, y con 1 mg/kg se obtuvieron los valores óptimos de 10-11. Las concentraciones de astaxantina mayores a 5 mg/kg, con cualquier nivel de alimentación con maíz amarillo, producen yemas de un color rojo profundo (Lee, 1986; Lorenz y Cysewski, 2000).

2.4.3.4. Cultivo de camarón

El camarón kuruma (*Litopenaeus japonicus*) y el camarón tigre (*Litopenaeus monodon*) son mundialmente cultivados, y su demanda y producción se incrementan constantemente. El valor de estos camarones en el mercado se basa predominantemente en el color de su cuerpo (Katayama, 1972).

La carencia de astaxantina en la dieta de cultivos de *L. monodon* ha sido la causa del "síndrome del color azul" o "enfermedad azul". Después de cuatro semanas de alimentación con dietas que contenían 50 mg/kg de astaxantina a camarones que padecían de este síndrome, estos recuperaron la pigmentación normal verdoso-café. Al concluir el estudio, los análisis de sus tejidos revelaron una apariencia normal y un incremento mayor al 300% en el contenido de carotenoides; aquellos alimentados con una dieta comercial sin astaxantina tuvieron sólo un incremento del 14% en la cantidad de carotenoides y mantuvieron la tonalidad azul (Menasveta y col., 1993). Se aisló una concentración de 50.75 mg/kg de carotenos totales del exoesqueleto de camarón silvestre y de cultivo suplementado con suficiente astaxantina (50 mg/kg). Por el contrario, los especímenes que mostraron la enfermedad azul tenían concentraciones de pigmentos entre 4 y 7 mg/kg. Cuando el camarón con la enfermedad azul es cocinado adquiere un color amarillo claro y no es comerciable, comparado con la coloración rojo brillante característica del camarón silvestre (Menasveta y col., 1993).

El efecto de varios carotenoides (β -caroteno, cantaxantina y astaxantina) en la pigmentación de *L. japonicus* ha sido estudiado por Yamada (1990). Este autor encontró que los tres carotenoides se depositaron en el tejido, sin embargo, aquellos que fueron alimentados con astaxantina tuvieron los mayores niveles carotenoides en el tejido (16.5 mg/kg del peso del cuerpo). Este resultado fue aproximadamente 23% más alto que los obtenidos suministrando cantaxantina y 43% mayor que aquellos en que los camarones eran alimentados con β -caroteno, lo que demostró que la astaxantina es la fuente de carotenoides más efectivo para la pigmentación de

camarón. Yamada (1990) estableció que incrementando el nivel de astaxantina en la dieta de camarones hasta 200 mg/kg su depósito también aumenta hasta alcanzar un máximo de 29.1 mg/kg. La astaxantina, en comparación con el β -caroteno, fue también el pigmento más efectivo para la coloración de *L. japonicus* (Chien y Jeng, 1992). Adicionalmente, Yamada (1990) observó una disminución de la mortalidad de camarón adulto alimentado con una dieta enriquecida con carotenos, en comparación con aquellos que recibieron dietas libres de pigmentos. Se ha observado hasta un 91% de supervivencia cuando se suministran 100 mg/kg de astaxantina, comparado con un 57% de un grupo control alimentado sin astaxantina (Yamada, 1990).

Chien y Jeng (1992) también encontraron que la supervivencia es más alta en los camarones alimentados con astaxantina en sus dietas, con una correlación positiva entre la supervivencia y la concentración de pigmento en los tejidos, sugiriendo que la astaxantina puede servir como reserva intracelular de oxígeno; esto le permitiría al camarón sobrevivir bajo condiciones hipóxicas o de bajo oxígeno disuelto, que son comunes en estanques de cultivo. Los camarones que fueron alimentados con 100 mg/kg astaxantina en sus dietas tuvieron una supervivencia promedio del 77%, en contraste con el 40% en camarones alimentados con β -caroteno.

2.4.3.5. Cosméticos

Otra aplicación de la astaxantina, que está adquiriendo una importancia, es en la industria mundial de cosméticos, donde la tendencia es cada vez más hacia el uso de colorantes naturales. Las tonalidades rojas-anaranjadas que se alcanzan con la astaxantina la han hecho atractiva en la formulación de productos de belleza, además de que su carácter natural la exentan de posibles reacciones hipoalérgicas (Arad y Yaron, 1992; Pszczola, 1998; Oshima, 1998).

2.4.3.6. Efectos metabólicos y de salud

Además de la funcionalidad de carotenoides descrita en la sección 5.3.5, ha sido demostrado que la astaxantina tiene un mayor efecto significativo que el β -caroteno

que encuentra en su camino. La hembra pone hasta 20,000 huevos en Octubre o Noviembre, tras lo cual los salmones adultos flotan corriente abajo y regresan al mar.

Al contrario que las diversas especies de salmón del Pacífico, el salmón del Atlántico no muere tras su primer apareamiento, sino que regresa año tras año a su lugar de reproducción. Las crías recién nacidas o alevines permanecen en el agua dulce durante unos dos años. Transcurrido este tiempo, los salmones jóvenes, llamados esguines o murgones, que han adquirido un color plateado, nadan hasta el mar.

Varias subespecies de salmón del Atlántico viven en los lagos del norte de Estados Unidos y Canadá y jamás viajan al mar. Reciben el nombre de salmones no migratorios. Estos salmones son mucho más pequeños que los migratorios, y alcanzan un peso máximo de unos 16 kilogramos.

2.5.1.3. Trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*)

Las truchas verdaderas constituyen el género *Salmo* y los salvelinos el género *Salvelinus*. La trucha arcoiris se clasificaba como *Salmo gairdneri*, pero tras recientes revisiones se ha propuesto para la especie el nuevo nombre de *Oncorhynchus mykiss*. Esta trucha procede del oeste de Estados Unidos y se caracteriza por presentar una banda rosada en los flancos.

Las truchas de mar son anadromas, es decir, desde el mar remontan los ríos para reproducirse. Sin embargo, la mayoría de las especies viven exclusivamente en agua dulce y se encuentran en la mayor parte de los lagos y las corrientes de agua del hemisferio norte. Se alimentan de casi cualquier clase de materia animal fresca, como peces pequeños, crustáceos y larvas de insectos. Al igual que los salmones, las truchas desovan durante la primavera y en ocasiones en el otoño, según la latitud y las especies.

2.5.2. Producción

La cosecha de salmón silvestre ha declinado en los últimos diez años y probablemente alcanzó su máximo nivel sustentable en aproximadamente 800,000 TM anualmente. A la inversa, el cultivo de salmón y trucha se incrementaron substancialmente durante el mismo período. En 1999 la producción mundial de salmón de granja se estimó en más de 750,000 TM. Esta cifra alcanzó un millón de TM en el año 2001 y se espera que llegue a 1.3 millones para el 2005. Aunque por muchos años Noruega ha sido el líder productor de salmón de granja, su contribución en la producción total podría disminuir; sin embargo aún se espera que produzcan alrededor de 620,000 TM para el 2005. Más recientemente, Chile ha entrado al mercado del cultivo del salmón, y las condiciones ideales que existen en ese sureño país permitirán una expansión significativa, estimada en aproximadamente 350,000 toneladas en el 2005 (Lorenz y Cysewski, 2000).

Debido a la disminución en las poblaciones mundiales de salmón la acuicultura se ha expandido para satisfacer la demanda creciente del mercado de este salmónido. La cría del salmón hasta llegar a la fase adulta se inició en Noruega en los primeros años de la década de 1960 (Mills, 1989). El salmón del Atlántico se cultiva principalmente en Noruega, Chile, Escocia, Canadá y Estados Unidos.

De 1989 a 1998 la producción de trucha en México aumentó 192%, llegando hasta 1612 TM, cantidad valuada en 46,153,000 pesos y que representa 2.6% del valor total de la acuicultura general de diversas especies. Esto ubica a la trucha junto con el ostión en la cuarta actividad acuícola más remunerable después del camarón (64.7%), tilapia (22.7%) y carpa (4%) (Álvarez y col., 1999).

En México son 136 granjas las que cultivan las tres principales especies de peces, de las cuales 86 son de trucha, 33 de tilapia y 17 de carpa; el 56% del esquema de producción de la trucha está asociado al sistema familiar (Álvarez y col., 1999).

2.5.4. Pigmentación del músculo de salmónidos

En la producción de salmónidos por métodos de acuicultura, para obtener el color similar de la carne del salmón silvestre, el pez es alimentado con harina de pescado que ha sido añadida con colorantes. La astaxantina y cantaxantina son los dos oxicarotenoides más utilizados con este fin; la trucha pigmentada, por otra parte, alcanza mayores precios de mercado que la de carne blanca (Turujman y col, 1997).

Generalmente, la astaxantina y cantaxantina se suministran en concentraciones de 40-75 mg/kg de alimento, y el salmón coloreado intensamente contiene 5-20 mg de astaxantina o cantaxantina/kg de músculo (Sigurgisladdottir y col., 1994).

El precio del salmón o trucha se relaciona parcialmente a la intensidad del tono rojo en el pez. La coloración en los cultivos de salmónidos afecta a la aceptación del producto por parte del consumidor y en consecuencia al precio final del producto (Sheehan y col., 1998). El rechazo de la carne de salmónidos no pigmentada hace que el color rojo del músculo tenga una gran importancia económica para la industria de cultivo de peces. En un estudio que examinó el contenido de carotenoides y correlacionándolo con evaluaciones sensoriales, se mostró preferencia por el músculo del salmón con alta concentración de astaxantina, presumiblemente por la pigmentación natural roja. También hubo evidencia de que los niveles de astaxantina en el alimento pueden afectar el sabor y textura del filete (Sigurgisladdottir y col., 1994). Por lo tanto, los granjeros deben de proveer los pigmentos adecuados a sus productos cultivados, con el fin de satisfacer la expectativa de los consumidores.

Se ha demostrado que la astaxantina comercial se absorbe, transporta y deposita de igual manera que la ingerida por el pez en condiciones silvestres. Sin embargo, los salmónidos depositan preferencialmente a los carotenoides más polares como astaxantina, antes que cantaxantina y zeaxantina, y los menos polares como β -caroteno (Schiedt y col., 1985; Sheehan y col., 1998). La pigmentación de

salmónidos cambia durante toda su vida, en trucha arcoiris joven es menos eficiente que con trucha madura (Bjerkeng y col., 1992).

En salmón cultivado se estima que son retenidos el 4-5% de los pigmentos suministrados en el alimento, este bajo valor de retención se debe en parte a la pobre absorción de los carotenoides en el intestino y a la baja retención en el músculo (Hardy y col., 1990; Wathne y col., 1998).

Una vez que el salmón alcanza 300-400 g, la suplementación con pigmentos carotenoides incrementa los costos de alimentación en un 7-10%. Se estima que la pigmentación del salmón con carotenos, incrementa 10-15% el costo total de operación de la granja. Esto se debe a la baja eficiencia de absorción y los requerimientos de suministro continuo de carotenoides en la dieta para alcanzar la pigmentación (Hardy y col., 1990; Sigurgisladottir y col., 1994).

Los mecanismos que vinculan al pigmento con el músculo del salmón no son completamente entendidos. Ningún estudio específico se ha encargado de examinar la unión de los carotenoides a los componentes del músculo de la trucha arcoiris o salmón del Atlántico (Storebakken y No, 1992). Es, por lo tanto, importante para la industria acuícola, entender el mecanismo a través del cual los carotenoides se unen al músculo del pez, y los factores que influyen en la retención total de los pigmentos en salmónidos. Para lograr altos niveles de retención de pigmentos en peces cultivados, es necesario incrementar la biodisponibilidad de los carotenoides presentes en la dieta, o modificar las prácticas actuales de pigmentación. El incremento del porcentaje de retención de carotenos permitiría el alcanzar el mismo grado de pigmentación con menores costos (Christiansen y col., 1995).

2.6. Obtención de astaxantina a partir de residuos de crustáceos

2.6.1. Extracción

Los procedimientos para obtener astaxantina a partir de residuos de crustáceos son variados, pueden consistir en una extracción directa ya sea con disolventes o aceites orgánicos; otras metodologías reportan a los ensilados químicos y microbianos como un tratamiento de los residuos previo a la extracción (Armenta, 1998).

El principal problema para la extracción de astaxantina lo representa su unión con proteínas, generalmente de alto peso molecular. Esta interacción le proporciona estabilidad al caroteno. Cuando los residuos de crustáceos se someten a diversos procesos, como el secado, la unión entre los dos componentes se debilita o se rompe, disminuyendo la estabilidad del pigmento (Chen y Meyers, 1982b).

Los factores que se utilizan en el procesamiento y almacenamiento de los residuos de crustáceos, como son el sistema de disolventes, temperatura, exposición al oxígeno y a la luz, antioxidantes, inciden directamente en la calidad y cantidad de la astaxantina obtenida (Chen y Meyers, 1984).

Todos los estudios que a continuación se mencionan refieren importancia al uso de sustancias antioxidantes en los procesos de extracción de pigmentos, entre los cuales destacan el BHA, BHT y otros productos comerciales como el Endox^{MR}, Ethoxyquin^{MR} y Santoquin^{MR}.

Meyers y Bligh (1981) emplearon el sistema ternario de disolventes orgánicos éter de petróleo:acetona:agua (15:75:10) (v/v/v) para extraer carotenoides de desechos de cangrejos, recuperando aproximadamente 150 mg/kg de pigmentos, que por estudio cromatográfico se conoció que el 49.4% eran astaxantinas esterificadas, 40.3% sin esterificar y 10.3% de astaceno.

Utilizando aceite de soya a altas temperaturas Spinelli y Mahnken (1978) llegaron a extraer mas de 550 mg/kg, y al recircular dos veces más este extracto (proceso de tres etapas) obtuvieron un aceite con alta concentración de carotenos (1,550 mg/kg), que agregaron a la dieta del salmón coho resultando buenos niveles de pigmentación.

La mayor parte de las metodologías empleadas en la extracción de carotenoides a partir de residuos de crustáceos reportan resultados que oscilan entre 0 y 200 mg/kg de astaxantina (Torrissen y col., 1989).

2.6.2. Utilización de proteasas

Las proteasas son enzimas proteolíticas que hidrolizan los enlaces peptídicos con distintos grados de intensidad y selectividad (Badui, 1999). Sus fuentes pueden ser microbianas, vegetales y animales; cada enzima proteolítica tiene distintas características como temperatura óptima, pH, sitios específicos de hidrólisis, etc., parámetros que se consideran para la selección adecuada de la proteasa según la finalidad del proceso (Horton y col., 1993).

Una fuente importante de proteasas son las de origen marino, estas son enzimas hidrolíticas de especies acuáticas que tienen la capacidad de catalizar la degradación de enlaces peptídicos de proteínas; estas proteasas tienen alta capacidad de hidrólisis a bajas temperaturas y actividad-estabilidad en pHs de cualquier tipo. De los organismos acuáticos hasta ahora conocidos, cerca de 7,000 especies son de agua dulce y alrededor 13,000 de agua salada, por lo cual puede esperarse que a partir de esta fuente se puede obtener igual o mayor número de proteasas que las encontradas en especies de origen terrestre (Haard y Simpson, 1994).

La proteasas microbianas son otra fuente importante de este tipo de enzimas, pero debido a que se someten a rigurosas pruebas toxicológicas, el número de microorganismos autorizados para su extracción aún es reducido. La preferencia para el uso en alimentos es hacia las proteasas de fuentes animales y vegetales (Haard y Simpson, 1994).

Comercialmente, cerca del 50% de las enzimas industriales son proteasas, usándose principalmente en alimentos y detergentes. En ciertos procesos donde es necesaria la hidrólisis de proteínas, se puede lograr por medios físicos y químicos, como pH y temperaturas altas, sin embargo, las ventajas que ofrecen las proteasas para el mismo objetivo son: mayor especificidad sin reacciones indeseables, activación bajo parámetros no extremos de pH y temperatura, eficiencia a bajas concentraciones, y pueden inactivarse después de haber elaborado el alimento (Haard y Simpson, 1994).

Algunos autores (Simpson y Haard, 1985; Cano-López y col, 1987), para la recuperación de carotenoproteína han empleado proteasas de origen bacteriano y animal, dentro de estas últimas, tripsinas de diversas fuentes: bovina, porcina y de bacalao; logrando recuperar el 80% de la proteína y carotenoides totales del residuo de camarón (*Pandalus borealis*), cuantificándose hasta 1,160 mg/kg de astaxantina en la carotenoproteína liofilizada, con potencial para proveer carotenoides suficientes a los peces cultivados a través del suplemento con carotenoproteína.

2.6.3. Ensilados

El ensilado se define como el proceso de conservación que utiliza ácidos que evitan el crecimiento de microorganismos patógenos. Existen dos tipos de acuerdo al tipo de acidificación: *químico* y *microbiano*; en el primero de ellos se lleva a cabo la adición de ácidos minerales u orgánicos, y en el microbiano se adiciona un inóculo de bacterias lácticas para promover una fermentación (Hall y De Silva, 1994).

Chen y Meyers (1983) mencionan que el ensilado de residuos de crustáceos protege de temperaturas altas a la astaxantina extraída. Lo cual se demuestra con la mayor acumulación del pigmento en el músculo de la trucha al usar alimentos de residuos de camarón ensilados (Anónimo, 1992).

La solubilización de las estructuras formadas por calcio (vesículas) en el carapacho del crustáceo pueden aumentar los rendimientos de extracción de astaxantina y su posterior fijación en el músculo del pez al ser suplementado en su dieta con este residuo; las razones por las cuales el ensilado mejora la digestibilidad del pigmento no son del todo conocidas, quizás la relación con otros compuestos que se encuentran en los crustáceos facilitan su absorción y depósito; en trucha arcoiris la digestión de astaxantina de residuos ensilados es del 71% en relación con el 45% de la astaxantina de residuos frescos (Torrissen y col., 1989).

2.6.3.1. Ensilado químico

Este tipo de ensilado comprende el empleo de ácidos de grado industrial, como el ácido sulfúrico o el ácido propiónico, los cuales son agregados para disminuir el pH rápidamente, y una vez cumplido el tiempo del proceso se extraen los pigmentos generalmente usando aceite de soya (Omara-Alwala y col., 1985).

En otras ocasiones se usan mezclas de ácido propiónico y ácido fórmico (1:1) (Chen y Meyers, 1983). Estos mismos autores agregan que a nivel piloto el ensilado con ácido propiónico o ácido sulfúrico incrementa un 15-18% la eficiencia de extracción de pigmentos con relación al rendimiento de extracción obtenido empleando residuos de crustáceos sin ensilar.

Los mismos autores (Chen y Meyers, 1984), implementaron, antes de la extracción de carotenos con aceite de soya, un ensilado ácido de cangrejo de río con una mezcla de ácidos orgánicos, principalmente propiónico, logrando incrementar la recuperación del pigmento en un 40-50%; en el ensilado encontraron actividad enzimática de tripsina.

Guillou y col. (1995) mejoraron en aproximadamente 16% la extracción de astaxantina a partir de residuos de camarón (*Pandalus borealis*) por medio del ensilado con una mezcla de ácidos inorgánicos fuertes (ácido sulfúrico y ácido

fosfórico) y uno orgánico (ácido propiónico), reportando 20.4% de astaxantina diesterificada, 76.1% monoesterificada y 3.5% libre. El ensilado ácido de residuo camarón, con la cantidad adecuada de antioxidantes y un pH bajo, proporciona protección eficiente que evita la degradación de la astaxantina por más de tres meses de almacenamiento del ensilado, lo que permitiría la incorporación de esta técnica económica para conservar el residuo de camarón y transportarlo a los sitios donde sería incorporado a los alimentos para peces, o como un pretratamiento que facilita la extracción de productos altamente valuados como la astaxantina, enzimas, lípidos, proteínas y quitina.

La desventaja del uso de ácidos minerales en el ensilado, es que en su mayoría son compuestos corrosivos, lo que ocasiona subproductos altamente contaminantes (Owens y Mendoza, 1985), además de una hidrólisis excesiva de la proteína que puede ocasionar la formación de péptidos que producen sabores amargos (Fagbenro, 1997). Muchos investigadores han usado ácidos orgánicos como propiónico, fórmico, sulfúrico o acético para preservar los residuos de camarón y cangrejo, aunque estos ácidos son caros y pueden ser corrosivos al equipo de procesamiento (Evers y Carroll, 1996).

2.6.3.2. Ensilado microbiano

El término fermentación se refiere a la transformación de sustancias orgánicas en compuestos simples por medio de enzimas o microorganismos (Mackie y col., 1971). Sobre la base de lo anterior, la fermentación láctica puede definirse como un proceso microbiano complejo donde las bacterias lácticas llegan a ser la microflora predominante (Frazier, 1993).

Uno de los métodos más antiguos para la preservación de los alimentos es la fermentación ácido láctica, que permite obtener mejores propiedades sensoriales y nutricionales; en estas fermentaciones las bacterias lácticas producen ácido láctico *in situ* por el consumo de carbohidratos, estos microorganismos pueden ser de la flora natural o provenir de un inóculo (Frazier, 1993).

El ensilado microbiano de residuo de crustáceos es una fermentación semisólida comprendida dentro de las fermentaciones en estado sólido, las cuales, según Mitchell y Lonsane (1992), se caracterizan por el crecimiento de microorganismos sobre sustratos insolubles en agua con la presencia de cantidades variables de agua libre. Para evitar confusiones referentes al agua libre, Moo-Young y col. (1983) propusieron que el término fermentación en estado sólido se refiere a todos aquellos procesos que utilizan materiales insolubles en agua para el crecimiento de microorganismos en ausencia de agua libre, con el incremento de la cantidad de agua libre, las fermentaciones en estado sólido se convierten en fermentaciones de suspensiones o partículas sólidas.

La fermentación del pescado, incluyendo la forma artesanal, ha servido como un antecedente para el desarrollo de tecnologías similares en países tropicales dirigidas a la preservación de cabezas de camarón, que por cuestiones de temporada o localización geográfica su disponibilidad puede ser un problema que encuentra solución en el proceso fermentativo al que es necesario la adición de carbohidratos fermentables, como melazas, para el desarrollo del ensilado láctico (Fagbenro, 1997). Los ensilados biológicos no desarrollan en los productos olor a rancidez, lo que puede suceder en los tratamientos químicos (James y col., 1977).

Fagbenro (1997), realizó fermentaciones lácticas con cabezas de camarón, y después de siete días de ensilado disminuyó el pH hasta 4.2 y 4.1 en los tratamientos aerobio y anaerobio respectivamente, por lo cual afirma que la aireación no tiene efecto significativo en la reducción del pH; la concentración de lípidos, fracción donde se encuentra la astaxantina, aumenta significativamente después de seis meses de ensilado, también el nitrógeno no proteico se incrementa un 50%, y la humedad, proteína cruda y ceniza sólo presentan una variación ligera.

Un buen ensilado de residuos de crustáceos no presenta contaminación por hongos y otras bacterias, aunque posterior a los 180 días se incrementa el pH de 4 a 5; la

estabilidad en el pH del ensilado puede deberse a dos causas: la acción amortiguadora de los aminoácidos y sales o por la acción del calcio de la quitina en la neutralización parcial del ácido (Hall y De Silva, 1994).

Los residuos de camarón sometidos a fermentación láctica tienen mayor concentración de astaxantina que los residuos sin fermentar, esto debido a que el ensilado láctico estabiliza a la estructura del pigmento contenido en los residuos del crustáceo (Armenta y col., 2002).

Bacterias lácticas

Las bacterias lácticas son ampliamente utilizadas en la preservación de alimentos y pueden contribuir al desarrollo del sabor; son microorganismos Gram (+), no esporulados y que al fermentar carbohidratos producen ácido láctico como producto principal (Frazier, 1993). Sus requerimientos nutricionales son exigentes porque necesitan vitaminas y aminoácidos para fermentar a los hidratos de carbono (Okafor y Nzeako, 1985).

Owens y Mendoza (1985) indican que la rapidez de crecimiento de las bacterias lácticas, su producción de ácido y supresión de microorganismos competitivos por la disminución del pH u otros factores antimicrobianos, influyen directamente en el desarrollo de una fermentación láctica adecuada, y que los factores con mayor influencia en el crecimiento de las bacterias lácticas y la velocidad en la disminución del pH de la fermentación son:

1. Disposición de carbohidratos fermentables
2. Anaerobiosis
3. Temperatura
4. Concentración de NaCl
5. Concentración de ácidos orgánicos y pH
6. Concentración de CO₂
7. Producción de otros compuestos inhibitorios

8. Capacidad de amortiguamiento del sustrato
9. Cantidad inicial de bacterias lácticas
10. Cantidad inicial de microorganismos competidores
11. Disponibilidad de factores orgánicos de crecimiento

Aunque la carne de pescado tiene baja concentración de carbohidratos se han aislado bacterias lácticas de este sustrato, las cuales presentan menos exigencias nutricionales para su crecimiento (Schroder y col., 1980). También han sido aisladas de alimentos de mar como el camarón, pescado y surimi empacado al vacío (Okafor y Nzeako, 1985). A partir de alimentos marinos Mauguin y Novel (1994) aislaron 86 cultivos, de los cuales 54 pertenecieron al género *Lactococcus*, cuatro se identificaron como *Lactobacillus plantarum*, ocho del género *Leuconostoc* y 16 al de *Carnobacterium*, los cuatro cultivos restantes no fueron identificados; casi el 50% de los cultivos analizados tuvieron patrones similares de fermentación de carbohidratos.

2.7. Carotenoproteínas

El primer aislamiento exitoso de carotenoproteínas de vertebrados lo realizaron Lakshman y Okoh (1993), y comprendió la purificación del complejo β -caroteno-proteína presente en la fracción membranal de hígado de ratas. Aunque ha sido reportada previamente en mamíferos la transportación del β -caroteno en lipoproteínas de baja densidad, el mecanismo de fijación en el tejido, almacenamiento y transporte de este pigmento, no se han dilucidado totalmente.

La unión de carotenoides a sitios hidrofóbicos de las proteínas les permite solubilizarse en sistemas acuosos (Shahidi y Brown, 1998). Los complejos formados se denominan carotenoproteínas, varias de ellas han sido caracterizadas. La asociación del pigmento carotenoide con proteína puede resultar en dos efectos importantes: provocar que el complejo pigmento-proteína llegue a ser soluble en agua, y cambiar el color del pigmento. Muchos de los colores brillantes de los

animales marinos son el resultado de la incorporación a algunas estructuras anatómicas de tales carotenoproteínas. Por ejemplo, el azul oscuro del carapacho de la langosta se debe a la unión de astaxantina y proteínas; sin embargo, los huevos de langosta son de color verde debido a la unión de astaxantina con proteínas de diferente estructura (Zagalsky y col., 1990). La mayoría de las carotenoproteínas conocidas han sido aisladas y caracterizadas a partir de invertebrados marinos, especialmente crustáceos.

Las carotenoproteínas son productos estables en los cuales la fracción carotenoide se combinan como grupo prostético, en proporciones estequiométricas, con la unidad apoproteica (Lakshman y Okoh, 1993).

Han sido caracterizados tres tipos de estos complejos: carotenolipoproteínas, quitinolipoproteínas y carotenoproteínas reales. Las carotenolipoproteínas son sustancias complejas en las cuales están incorporados carbohidratos y lípidos a las fracciones carotenoide y proteica. Estas se encuentran principalmente en los ovarios y huevos de crustáceos, aunque pueden también estar presentes en la sangre, cutícula y epidermis de crustáceos. El segundo grupo de carotenoproteínas, las quitinolipoproteínas, se encuentra en el exoesqueleto de crustáceos, y se compone por quitina y proteína esterificada en el carotenoide. Aunque la quitina no es una proteína, la estructura y características de la relación quitina-carotenoide permite clasificar el complejo quitinocarotenoide como carotenoproteína. Las carotenoproteínas reales se forman cuando un carotenoide, generalmente astaxantina, se une a sitios específicos de una glucoproteína. En la mayoría de los casos, estas carotenoproteínas se encuentran en las superficies externas de los crustáceos que proporcionan su coloración (Shahidi y Brown, 1998).

Como se mencionó anteriormente, los carotenoides libres son ligeramente solubles en medios acuosos. Buchwald y Jencks (1968) demostraron que la adición de pequeñas cantidades de astaxantina en grandes volúmenes de disolventes miscibles

en agua, como el etanol, da como resultado una suspensión estable de agregados o cristales incoloros del pigmento. También encontraron que la presencia de cloruro de sodio induce la formación de agregados, en los cuales la interacción de las moléculas carotenoides provocan un cambio en la absorción máxima de 470 a 555 nm, debido a la formación de productos amarillos. La similitud entre las propiedades de absorción de los agregados amarillos y los pigmentos del mismo color en la langosta, sugieren que el mecanismo de alteración de la estructura, y en consecuencia de las propiedades ópticas de la astaxantina es el mismo en el sistema modelo y el real. En la pigmentación de langosta, la proteína sustituye a la sal en el sistema modelo y mantiene en solución al agregado de pigmentos, pero no es directamente responsable por la alteración del espectro de absorción del pigmento.

La carotenoproteína azul α -crustacianina del carapacho de langosta *Homarus gammarus*, es uno de los ejemplos mejor documentados de la interacción entre un carotenoide y su proteína asociada. La carotenoproteína es un oligómero de 16 subunidades de apoproteínas cada una con un peso molecular de 20 kDa, con una molécula de astaxantina por cada monómero de apoproteína (Figura 8) (Zagalsky y col., 1995). Se ha reportado que el pigmento azul sufre una desnaturalización reversible en presencia de ácidos, disolventes orgánicos, o calor para dar coloraciones púrpura, amarilla, o roja. Sin embargo, el calentamiento del pigmento a 60°C ocasiona una reacción de desnaturalización irreversible (Jencks y Buten, 1964). Nelis y col. (1989) encontraron que el espectro de absorción de la astaxantina difiere considerablemente del complejo astaxantina-crustacianina.

El trabajo de numerosos investigadores ha conducido a la obtención de la estructura cristalizada de la crustacianina. Zagalsky (1997) determinó que las subunidades de este complejo pertenecen a la familia de las proteínas lipocalinas. Estas proteínas, dentro de sus cavidades, se unen a ligandos hidrofóbicos de bajo peso molecular. Este autor usando gráficos computacionales modeló las estructuras terciarias de las uniones de la astaxantina con la proteína, comparando estos resultados contra las coordenadas de ubicación del sistema retinol-proteína.

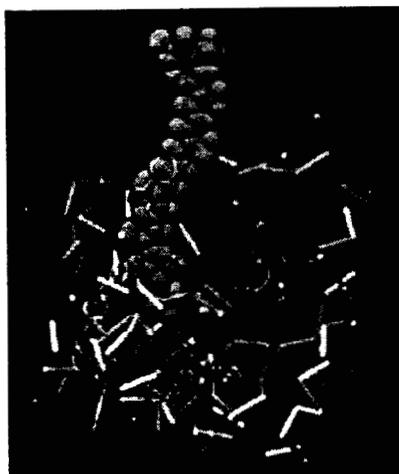


Figura 8. Modelo de la estructura de la apocrustacinina, subunidad A2, mostrando la posición del ligando carotenóide (espacios llenos), y los aminoácidos aromáticos a su alrededor.
(Zagalsky, 1997)

Otros autores (Weesie y col., 1997) dan un peso molecular de 320 kDa para la α -crustacinina, pero reportan que está formada por ocho unidades de β -crustacinina con dos moléculas de astaxantina por apoproteína. Para el mismo complejo, Krawczyk y Britton (2001) indican un peso molecular de 350 kDa con subunidades de 19-21 kDa y dos moléculas de pigmento en cada monómero.

Nur-E-Borhan y col. (1995) aislaron y caracterizaron la carotenoproteína del exoesqueleto y epitelio muscular del camarón tigre negro *Litopenaeus monodon*. El camarón tigre es una especie importante en acuicultura en Asia, y se caracteriza por las bandas azules/negras alrededor del espécimen. Los trabajos anteriores de estos investigadores demostraron que el mayor carotenóide en el exoesqueleto de *L. monodon* es la astaxantina. Como otros crustáceos, este camarón se torna rojo cuando se calienta o es tratado con disolventes orgánicos; este cambio en color corrobora la presencia de astaxantina en la estructura de la carotenoproteína del caparazón y cuerpo del animal (Okada y col., 1994). El peso molecular de la carotenoproteína en el exoesqueleto de este camarón (*L. monodon*) es de 120 kDa, incluyendo seis subunidades de dos o tres distintos pesos moleculares y una

proporción molar estequiométrica de 2:1 (astaxantina:apoproteína); el peso molecular de la carotenoproteína del epitelio muscular de *L. monodon* es de aproximadamente 20 kDa con carencia de subunidades en su estructura y conteniendo a la astaxantina como su grupo prostético (Nur-E-Borhan y col., 1995). Por otra parte, Muriana y col. (1993) obtuvieron un peso molecular de 280 kDa para carotenoproteínas en exoesqueleto del camarón *Litopenaeus japonicus*.

Las características estructurales de los carotenoides unidos a la carotenoproteína azul del cangrejo de río (*Procambarus clarkii*) fueron determinadas por Milicua y col. (1985), quienes observaron esta carotenoproteína contiene seis moléculas de astaxantina por cada molécula de apoproteína, encontraron también que la variación mínima en la cadena poliénica de los grupos funcionales en las estructuras de anillos evita la interacción entre la proteína y carotenoide, que es el motivo de la alta especificidad del sitio de unión del pigmento de *P. clarkii*.

2.8. Procesos de membrana

2.8.1. Las membranas en los procesos de separación

El mayor problema que tienen las industrias químicas, de alimentos y medicinas para producir productos de alto grado, lo constituye la separación, concentración y purificación de las mezclas moleculares. Durante los últimos 200 años los científicos e industriales han desarrollado e implementado técnicas variadas de separación a escala industrial como la destilación, precipitación, cristalización, extracción, absorción, intercambio iónico, etc. Recientemente estos métodos convencionales de separación han sido complementados por procesos que utilizan membranas semipermeables como barreras de separación. En un principio, las membranas y procesos de membrana fueron introducidos como herramientas analíticas en los laboratorios químicos y biomédicos; después su rápido desarrollo permitió su aplicación, con un alto impacto comercial, en la obtención industrial de productos (Lonsdale, 1982).

Los procesos de membrana tienen varias características en común que los hacen herramientas atractivas para la separación de mezclas moleculares. La separación de varios componentes se desarrolla por medios físicos a temperatura ambiente, sin el daño o alteración química de los constituyentes, lo cual es importante para las industrias alimentarias y farmacéutica. Estos procesos pueden también adaptarse a operaciones continuas en gran escala o para el tratamiento en lote de pequeñas cantidades (Strathmann, 1991).

Hoy en día los procesos de membranas se consideran competidores fuertes de las técnicas de separación convencionales; algunos procesos de separación se indican en la Tabla 7, clasificados basándose en las propiedades fisicoquímicas de los compuestos por separar y donde los procesos de membrana (en cursivas) aparecen en casi todas las categorías (Bélafi-Bakó, 2000).

Bélafi-Bakó (2000) menciona las ventajas y desventajas que presentan los procesos de membrana.

Ventajas:

- La separación continua es posible
- Fácil combinación/integración con otros métodos
- Condiciones no extremas
- Fácil escalamiento
- Propiedades variables de las membranas
- No se requieren aditivos

Desventajas:

- Incrustación/polarización
- Vida corta de las membranas
- Baja selectividad o flux

Tabla 7. Procesos de separación basados en propiedades fisicoquímicas.

Propiedad fisicoquímica	Proceso de separación
Tamaño	Tamizado, filtración, <i>microfiltración</i> , <i>ultrafiltración</i> , <i>nanofiltración</i> , <i>diálisis</i> , <i>separación gaseosa</i> , cromatografía en gel
Carga	Intercambio iónico, <i>electrodiálisis</i> , electroforesis, difusión, <i>diálisis de difusión</i>
Punto de ebullición	Destilación, <i>destilación de membrana</i>
Punto de congelación	Cristalización, <i>crio-filtración</i>
Densidad	Centrifugación, sedimentación
Naturaleza magnética	Separaciones magnéticas
Afinidad	Extracción, adsorción, absorción, <i>ósmosis inversa</i> , <i>separación gaseosa</i> , <i>preevaporación</i> , cromatografía de afinidad
Naturaleza química	<i>Membranas líquidas</i>

(Bélafi-Bakó, 2000)

2.8.2. Definición y caracterización

Durante los métodos de separación con membranas la corriente de alimentación es dividida en dos: retenido o concentrado y permeado (Figura 9) (Mulder, 1996).

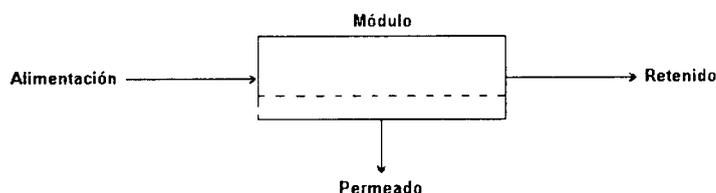


Figura 9. Representación esquemática del proceso de separación con membranas.

Las membranas son barreras permeables-selectivas entre dos fases. La eficiencia de una membrana se determina por la selectividad y el flujo a través de esta, definido como la cantidad, volumen o masa, fluyendo a través de la membrana por unidad de área y tiempo, lo que se conoce como *flux* o velocidad de permeación. La selectividad de la membrana se puede expresar por *R* o por el factor de separación α (Bélafi-Bakó, 2000).

$$R = (C_a - C_p) / C_a = 1 - (C_p / C_a)$$

donde C_a y C_p son las concentraciones de los solutos en la alimentación y en el permeado, respectivamente. Para dos componentes, disolvente y soluto, es conveniente expresar la selectividad en términos de retención. Debido a que el

parámetro R es adimensional, su valor varía entre 100% (retención completa) y 0% (disolvente y soluto pasan con poca resistencia a través de la membrana).

El factor de separación para mezclas con dos componentes A y B se puede expresar como

$$\alpha_{A/B} = (y_A / y_B) / (x_A / x_B)$$

donde y_A y y_B son las concentraciones en el permeado, mientras que x_A y x_B son las concentraciones en la alimentación. Generalmente, el valor del factor de separación es mayor a la unidad, si es igual a uno significa que no hubo separación (Bélafi-Bakó, 2000).

2.8.3. Membranas

Las estructuras y propiedades de las membranas varían, pueden ser homogéneas o heterogéneas, neutrales o con carga, sintéticas o naturales, gruesas o delgadas, etc. El sistema más claro de clasificación se basa en la naturaleza de la membrana (Figura 10) (Bélafi-Bakó, 2000).

Baker (2000) clasifica a las membranas sintéticas como isotrópicas o simétricas, anisotrópicas o asimétricas, cerámicas, metálicas y líquidas. Dentro del primer grupo contempla a las membranas microporosas, no-porosas o densas y cargadas eléctricamente y dentro de las anisotrópicas a las que tienen estructuras de Loeb y Sourirajan (1963) y a las de película-delgada compuesta (Figura 11).

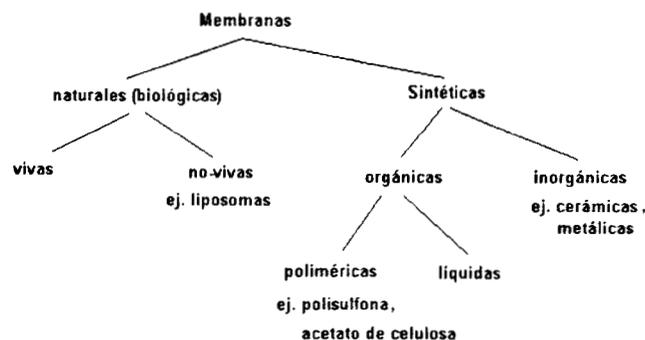


Figura 10. Clasificación de membranas.

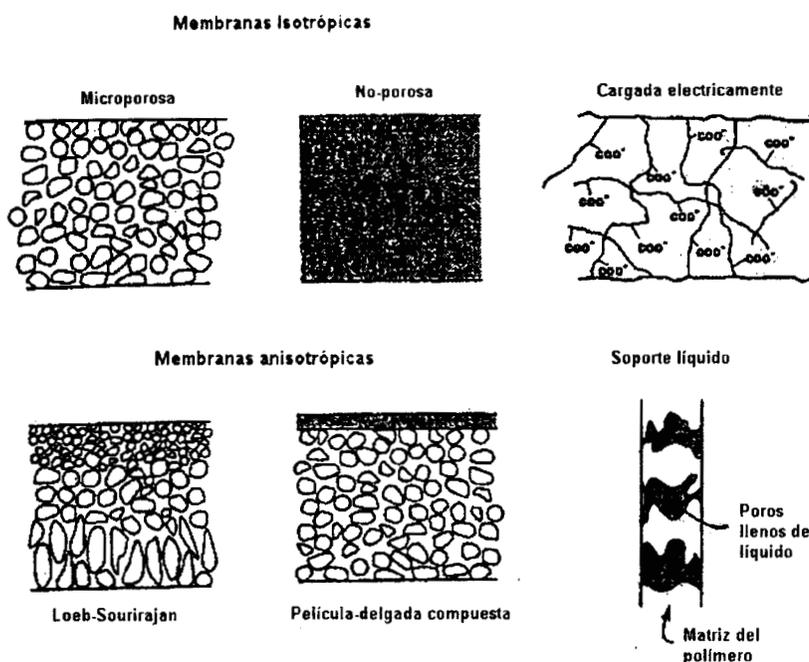


Figura 11. Diagramas esquemáticos de los principales tipos de membranas.
(Baker, 2000)

2.8.3.1. Membranas isotrópicas

Microporosas. Son similares en estructura y función a los filtros convencionales, con poros rígidos interconectados, los cuales no tienen una estructura distribuida al azar. Sin embargo, estos poros difieren de los filtros convencionales en que son extremadamente pequeños, de 0.01 a 10 μm de diámetro. La separación de solutos con estas membranas es una función del tamaño molecular y la distribución del tamaño de los poros. Sólo las moléculas que difieren considerablemente en tamaño pueden ser separadas eficientemente por este tipo de membranas (Baker, 2000).

No-porosas o densas. Consisten en una película densa a través de la cual los permeados se transportan por difusión bajo fuerzas impulsoras de la presión, concentración, o gradiente del potencial eléctrico. La separación de componentes de una mezcla se relaciona con sus relativas velocidades de transporte dentro de la membrana, determinadas por la difusión y solubilidad dentro del material de la membrana (Baker, 2000).

Cargadas eléctricamente. Pueden ser densas o microporosas, con iones de cargas positivas o negativas en las paredes de los poros. Esta separación es afectada por la carga y concentración de los iones en la solución; se usan principalmente para el procesamiento de soluciones de electrolitos en la electrodiálisis (Baker, 2000).

2.8.3.2. Membranas anisotrópicas

La velocidad de transporte de las especies a través de la membrana es inversamente proporcional a su espesor, y por razones económicas, las velocidades altas son deseables, por lo cual las membranas deben ser lo más delgadas posible. El desarrollo de técnicas originales para la fabricación de membranas permitió la obtención de membranas con estructuras anisotrópicas, uno de los mayores logros durante los últimos 30 años. Estas membranas consisten en una capa superficial extremadamente delgada que da soporte a una subestructura porosa más gruesa. Generalmente, las membranas compuestas se construyen con diferentes polímeros; sus propiedades de separación y velocidad de permeación son determinadas por la capa superficial; la subestructura funciona como un soporte mecánico. Estas membranas dan altos flux; casi todos los procesos comerciales las usan (Baker, 2000).

Cerámicas, metálicas y líquidas. Las cerámicas son una clase especial de membranas microporosas utilizadas en microfiltración y ultrafiltración donde se necesita resistencia a los disolventes y a las temperaturas altas. Las membranas metálicas, particularmente de Paladio (Pd), se emplean en la separación de hidrógeno de mezclas de gases, y las de películas de soporte líquido en los procesos de transporte facilitado (Baker, 2000).

2.8.4. Clasificación

Los procesos industriales de membrana más importantes son la microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración y ósmosis inversa, los cuales se consideran como fuerzas impulsoras en procesos de membrana (Bélafi-Bakó, 2000).

Tejeda y col. (1995) caracterizaron a los procesos de membrana basándose en:

- La fuerza impulsora del proceso
- El tipo de membrana
- El rango de tamaño de partícula que retienen las membranas

De acuerdo al tipo de fuerza impulsora (Tabla 8) se clasifican en:

- Gradiente de presión: ultrafiltración (UF) (sección 2.8.5), microfiltración (MF) y ósmosis inversa (OI)
- Gradiente de concentración: diálisis

Tabla 8. Características de los procesos de membrana.

Proceso de membrana			Microfiltración	Ultrafiltración	Ósmosis inversa	Diálisis
Fuerza impulsora			ΔP	ΔP	ΔP	ΔC
Presión de operación (kPa)			100-500	100-500	700-20000	-
Tipo de membrana			Microporosa simétrica	Microporosa asimétrica	Semipermeable asimétrica	Diálisis simétrica
Flux L/m ² h			50-1000	10-200	1-20	
Intervalo de retención						
Especie	Peso molecular (D)	Tamaño (nm)				
Hongos		10 ³ -10 ⁴	✓			
Levaduras		10 ³ -10 ⁴	✓			
Bacterias		300-10 ⁴	✓			✓
Coloides		300-10 ³	✓	✓		✓
Virus		30-300		✓		✓
Proteínas	10 ⁴ -10 ⁶	2-10		✓		✓
Polisacárido	10 ⁴ -10 ⁶	2-10		✓		✓
Enzimas	10 ⁴ -10 ⁶	2-5				✓
Antibióticos	300-10 ³	0.6-1.2			✓	
Azúcar	200-400	0.8-1			✓	
Ác. orgánico	100-500	0.4-0.8			✓	
Ion orgánico	10-100	0.2-0.4			✓	

(Fane y Radovich, 1990)

2.8.4.1. Microfiltración

Las membranas de este proceso, convencionales y asimétricas, tienen poros más grandes que los empleados en la UF. Se utiliza para separar partículas mayores de 1

μm , como coloides y células, de caldos biológicos; como técnica de recuperación celular ha venido desplazado a la filtración convencional y a la centrifugación. El intervalo de presión que maneja es entre 160 y 500 kPa, dependiendo de la capacidad del equipo. En la microfiltración (Figura 12) se obtienen fluxs del orden de 50-1,000 L/m² h, los cuales son mayores a los de UF (Tejeda y col., 1995).

2.8.4.2. Ósmosis inversa

Se basa en el aumento de la presión transmembranal a niveles mucho más grandes a los del equilibrio osmótico, por tanto el flux del disolvente se revierte, pudiendo obtener una solución altamente concentrada (Rautenbach y Albrecht, 1989). Este proceso emplea membranas semipermeables que sólo permiten el paso del disolvente, generalmente agua, para extraerle los solutos de bajo peso molecular. Para que la OI (Figura 12) se lleve a cabo, es necesario un gradiente de presión que venza a la presión osmótica normal de la solución, invirtiendo el flujo espontáneo. En la OI se utilizan presiones relativamente altas que fluctúan entre 700 y 20,000 kPa. Las membranas son películas no-porosas que permiten el paso del disolvente a través de los espacios entre los polímeros que forman a la membrana; los iones en solución no pueden atravesar estos pequeños espacios. Respecto a los fluxs de la OI, varían entre 1 y 20 L/m² h (Tejeda y col., 1995).

2.8.4.3. Diálisis

En este proceso se emplean membranas de poro muy pequeño, menores que en la UF. La diálisis (Figura 12) se basa en el peso, formación y carga molecular de los solutos para su separación de la solución. Debido al gradiente de concentración, se desarrolla una migración del (los) soluto(s) de la solución original a través de la membrana hacia la solución de lavado o dializado. El objetivo principal de la membrana es dejar pasar sólo disolvente y solutos pequeños, evitando el paso de otras partículas que se encuentran en la solución de alimentación; por otro lado, la electrodiálisis se desarrolla bajo la influencia de un campo eléctrico (Tejeda y col., 1995).

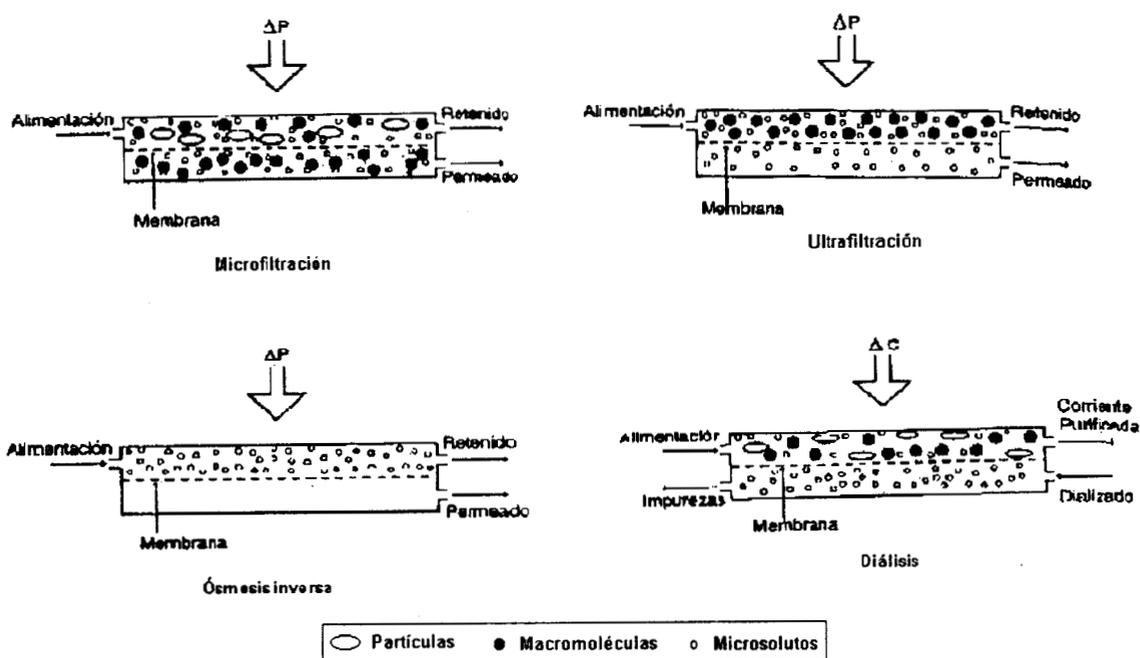


Figura 12. Esquemas de los procesos de membrana.
(Tejeda y col., 1995)

2.8.5. Ultrafiltración

La UF es una operación que utiliza membranas especiales en diferentes tipos de arreglos para separar, por medio de un gradiente de presión, macromoléculas en solución de contaminantes más pequeños (Tejeda y col., 1995). Este proceso emplea membranas microporosas generalmente asimétricas o anisotrópicas para separar macromoléculas o partículas de moléculas pequeñas y disolventes (Figura 12).

La UF puede emplearse con distintos propósitos, uno de ellos es la concentración, cuando la solución retenida es el producto deseado. Cuando el objetivo es separar macromoléculas de moléculas pequeñas como sales, azúcares o alcoholes de una solución y el permeado que sale del sistema se reemplaza con agua desionizada o búfer, el objetivo de la operación es la diafiltración. La purificación ocurre cuando el objetivo es recuperar el permeado que contiene un disolvente de interés o una solución con solutos de bajo peso molecular (Tutunjian, 1985).

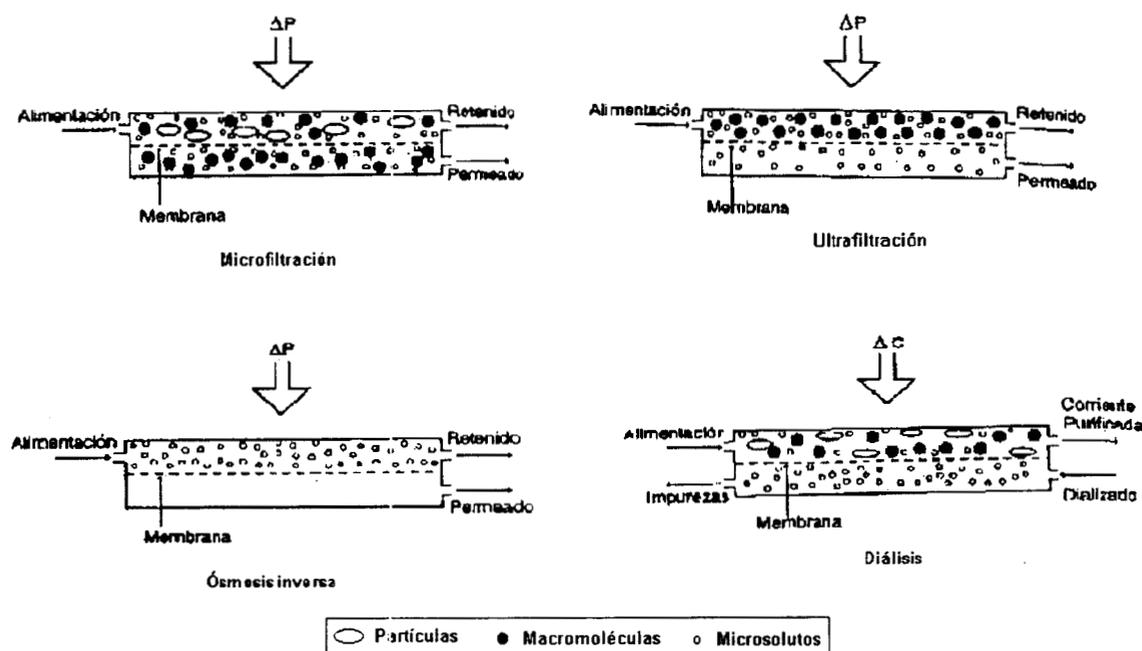


Figura 12. Esquemas de los procesos de membrana.
(Tejeda y col., 1995)

2.8.5. Ultrafiltración

La UF es una operación que utiliza membranas especiales en diferentes tipos de arreglos para separar, por medio de un gradiente de presión, macromoléculas en solución de contaminantes más pequeños (Tejeda y col., 1995). Este proceso emplea membranas microporosas generalmente asimétricas o anisotrópicas para separar macromoléculas o partículas de moléculas pequeñas y disolventes (Figura 12).

La UF puede emplearse con distintos propósitos, uno de ellos es la concentración, cuando la solución retenida es el producto deseado. Cuando el objetivo es separar macromoléculas de moléculas pequeñas como sales, azúcares o alcoholes de una solución y el permeado que sale del sistema se reemplaza con agua desionizada o búfer, el objetivo de la operación es la diafiltración. La purificación ocurre cuando el objetivo es recuperar el permeado que contiene un disolvente de interés o una solución con solutos de bajo peso molecular (Tutunjian, 1985).

2.8.5.1. Membranas

Las membranas anisotrópicas o asimétricas son las más utilizadas en UF debido a que las membranas microporosas convencionales tienen una estructura compleja que provoca la retención irreversible de partículas dentro de la matriz, lo que dificulta su limpieza y reuso (Tejeda y col., 1995).

Estas membranas se componen por dos capas, 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 con aberturas paulatinamente mayores, que facilitan el paso del disolvente y los solutos que logran atravesar la película (Figura 13).

El Peso Molecular de Corte (PMC), que es el peso molecular del soluto globular que es retenido en un 90% en la membrana, caracteriza a las membranas usadas en UF, el cual puede variar entre 500 y 1,000,000 Da para mayor parte de las membranas, representando una retención de tamaño de partícula de 1 a 10,000 nanómetros. Las presiones de este proceso de membrana son moderadas, dentro del intervalo de 100-200 $\text{L/m}^2 \text{ h}$ (Tejeda y co., 1995).

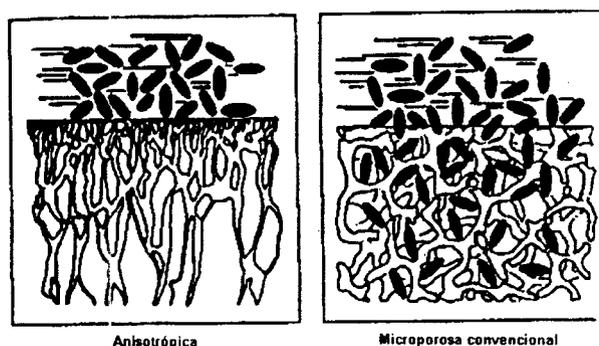


Figura 13. Comparación de membranas anisotrópicas con convencionales.
(Santos y col., 1991)

2.8.5.2. Flux y flujo tangencial

Es el flujo volumétrico por unidad de área de la membrana, generalmente este parámetro se utiliza para especificar equipos de UF (Tejeda y col., 1995; Bélafi-Bakó, 2000).

J representa el flux de permeado o velocidad del permeado a través de la membrana, lo que para el mismo efecto en filtración convencional se conoce como v (Rautenbach y Albrecht, 1989).

$$J = v = Q / A = \text{Gasto volumétrico} / \text{área}$$

El comportamiento típico del flux en los procesos de UF intermitentes se muestra en la Figura 14.

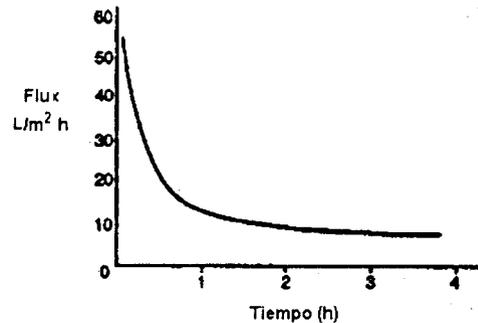


Figura 14. Variación del flux con el tiempo.
(Brocklebank, 1990)

El flux del disolvente a través de la membrana se puede incrementar significativamente empleando flujo tangencial o cruzado en lugar del flujo extremo-cerrado de la filtración convencional (Figura 15). En los sistemas de flujo tangencial 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).

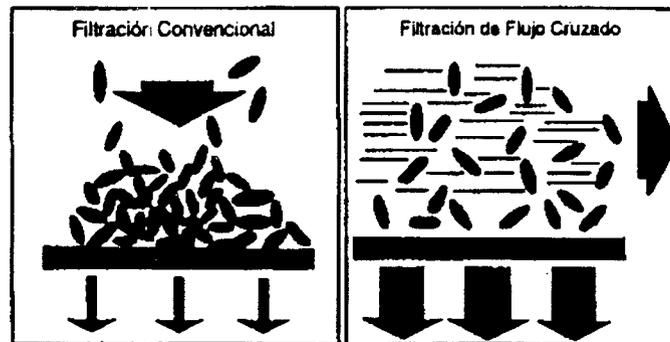


Figura 15. UF convencional y de flujo cruzado.
(Belter y col., 1988)

2.8.5.3. Polarización de la concentración

Es la formación de gradientes de concentración de los solutos en la proximidad de la membrana, ocasionados por las diferentes velocidades de transporte de cada uno de ellos. En la MF, UF y OI este fenómeno (Figura 16) puede incrementar el flux del soluto y disminuir el flux del disolvente por la resistencia al flujo ocasionada por la barrera de concentración, también puede provocar una resistencia adicional por interacción del soluto con la membrana ocasionando incrustaciones (Tutunjian, 1985).

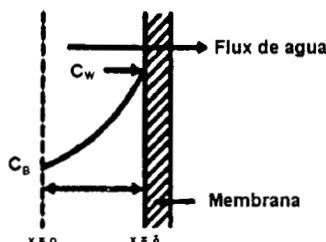


Figura 16. Polarización de la concentración durante la UF.
(Tutunjian, 1985)

2.8.5.4. Incrustación de la membrana

Se presenta cuando el flux se reduce conforme aumenta el tiempo de uso de las membranas; esto no es igual al efecto de polarización de la concentración, ya que incrustación se refiere a la interacción de algunos solutos con la membrana que afectan su porosidad. Con el fin de desincrustar membranas se aplican tratamientos físicos (retrolavado) y químicos, aunque estos aumentan los costos de operación y reducen la vida útil de los equipos (Tejeda y col., 1995).

2.9. Bioreactores enzimáticos de membrana (BEM)

En los últimos años se ha incrementado el uso de los BEM para desarrollar numerosas transformaciones catalizadas por enzimas. Generalmente, una catálisis eficiente necesita transformaciones continuas; los BEM son unidades especiales diseñados para lograrlo, ya que integran en operaciones continuas y simples varios procesos como la conversión biocatalítica, la separación del producto y/o la concentración y recuperación del catalizador (Prazeres y Cabral, 1998).

Los BEM se operan de forma continua y son equipados con membranas de UF; se utilizan para desarrollar transformaciones enzimáticas de sustratos (Figura 17) (Rautenbach y Albretch, 1989).

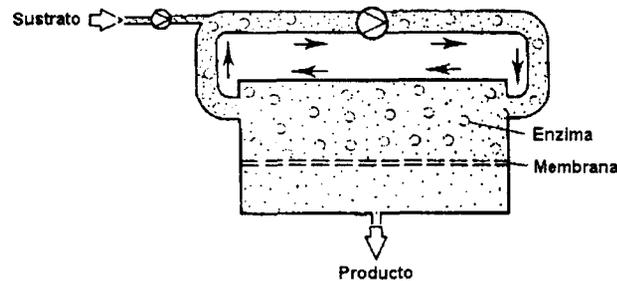


Figura 17. Principio del reactor de membrana operado con enzimas disueltas.
(Rautenbach y Albretch, 1989)

La característica básica de los BEM es la separación de la enzima, productos y sustratos por una membrana semipermeable que crea una barrera selectiva química/física. Los sustratos y los productos se separan de la mezcla de reacción por la acción de la fuerza impulsora (potencial químico, presión, campo eléctrico) presente a través de la membrana y que causa el movimiento ya sea de difusión, convección o migración electroforética de los solutos; por otro lado la enzima es retenida por la membrana, permitiendo establecer una operación continua de alimentación del sustrato y la remoción del producto (Figura 18). El sistema completo puede formarse ensamblando e interconectando tanques y módulos de membrana (Prazeres y Cabral, 1998).

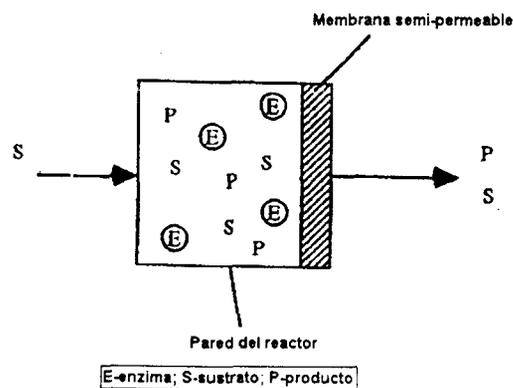


Figura 18. Diagrama esquemático de un BEM.
(Prazeres y Cabral, 1998)

En el bioreactor las membranas pueden emplearse exclusivamente como una matriz para la inmovilización del biocatalizador, sin ningún objetivo de separación (García y col., 1992; Matson y Quinn, 1992). Sin embargo, como lo sugieren Matson y Quinn (1992), el término reactor de membrana debería reservarse para aquellos casos donde la membrana no es solamente un soporte para la enzima, sino que ayuda en el proceso de separación.

2.9.1. Membranas y módulos

La mayoría de las enzimas nativas o modificadas, tienen un peso molecular entre 10,000 y 100,000 daltones, por lo que pueden ser retenidas en un reactor con membranas de UF. La mayor parte de las membranas comercialmente disponibles para UF son asimétricas o anisotrópicas, en las cuales el tamaño de los poros varía continuamente en una dirección (Figura 13) (Prazeres y Cabral, 1998).

La superficie de estas membranas está formada por una capa ultradelgada ubicada sobre una subcapa de alta porosidad. A la capa ultradelgada la forman una red de microporos con un tamaño y distribución en el intervalo de 1 a 100 nm, correspondiente a un PMC de 500 a 100,000 daltones. Durante la operación, debido al gradiente de presión, los disolventes fluyen a través de la membrana, y los solutos son más o menos retenidos de acuerdo a su tamaño. Además de la discriminación por tamaño, puede presentarse un proceso de exclusión estérica para aquellas moléculas con tamaños inferiores o cercanos a las dimensiones de los poros (Prazeres y Cabral, 1998).

La naturaleza química de la membrana puede también interferir en la permeación del soluto debido a interacciones no específicas: electrostáticas, hidrofóbicas e hidrofílicas, ocasionando polarización de la concentración al formarse una segunda capa (capa de gel) que disminuye la permeación (Figura 19). Esto se presenta especialmente cuando se desarrolla una reacción química simultáneamente con el proceso de separación de membrana (Prazeres y col., 1993).

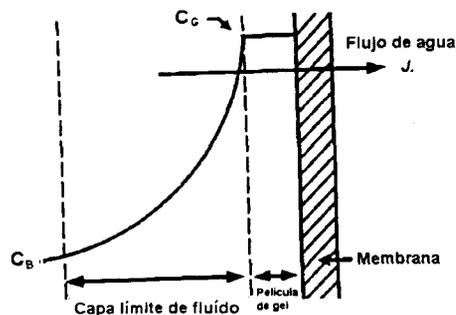


Figura 19. Polarización con gel.
(Tutunjian, 1985)

Los BEM descritos en la literatura han utilizado membranas de nylon, polipropileno, poliamida, poliacrilonitrilo, acetato de celulosa, polisulfona, celulosa, politetrafluoroetileno y carbón. La selección de membranas para procesos enzimáticos particulares debe de hacerse cuidadosamente, ya que el material afecta significativamente la estabilidad de la enzima (Alfani y col., 1990; Nakajima y col., 1992).

Generalmente, las membranas de UF se ensamblan en módulos con una geometría determinada ofreciendo zonas con distintos flujos para las corrientes de alimentación y permeado (Santos y col., 1991; Hildebrandt, 1991). En BEM han sido utilizados distintos tipos de módulos: platos, tubulares, fibra hueca, espiral y celdas (Prazeres y Cabral, 1994).

2.9.2. Clasificación

2.9.2.1. Reactores de contacto directo

En este tipo de reactor, los sustratos se adicionan en el mismo compartimiento del reactor que contiene la enzima. La enzima, soluble o insoluble, puede actuar directamente sobre el sustrato tan pronto como el biocatalizador se adiciona al sistema (Prazeres y Cabral, 1994). Esta clase de reactor se subdivide en:

Reactores de recirculación. Formados por un recipiente agitado acoplado al módulo de ultrafiltración en configuración semicircular; el sustrato es agregado al recipiente con recirculación de la mezcla de reacción a través de la unidad de UF (Figura 20).

Reactores de agotamiento. Se componen exclusivamente por el módulo de UF. En esta configuración, la mezcla de reacción es presurizada contra la membrana y forzada a fluir a través de los microporos (Figura 20).

Reactores de diálisis. Son aquellos en que dos corrientes del proceso, una en cada lado de la membrana, circulan con casi la misma velocidad de flujo, minimizando el flujo conectivo. El sustrato se agrega directamente a la corriente que contiene enzima, y los productos formados pasan a través de la membrana hacia la otra corriente como consecuencia del gradiente de concentración (Figura 20).

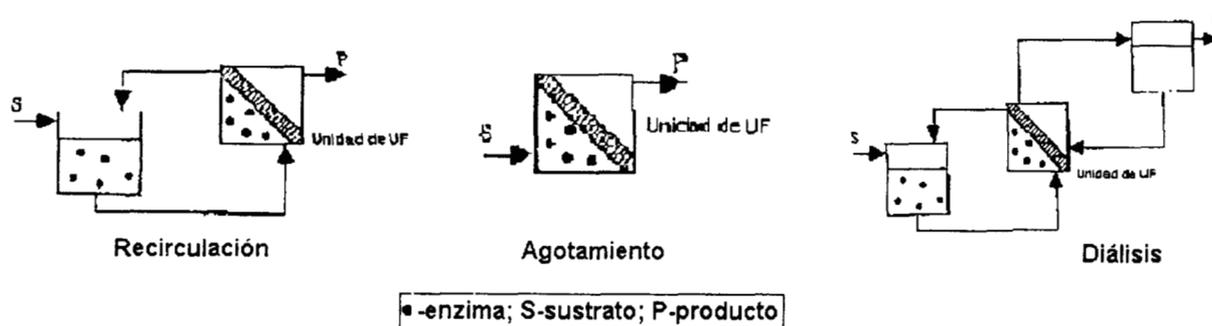


Figura 20. Reactores de contacto directo.
(Prazeres y Cabral, 1994)

2.9.2.2. Reactores de difusión

A diferencia del anterior, en este tipo de reactores el sustrato no se agrega al compartimiento que contiene a la enzima, en vez de ello, el contacto enzima/sustrato se establece sólo después de la difusión de las moléculas de sustrato a través de los microporos de la membrana hacia el otro compartimiento donde se localiza la enzima (Figura 21).

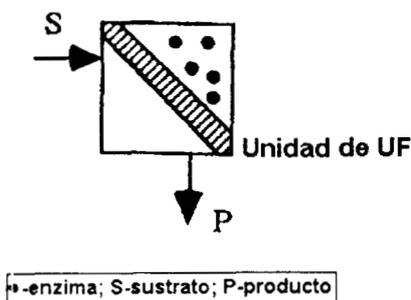


Figura 21. Reactor de difusión.
(Prazeres y Cabral, 1994)

2.9.2.3. Reactores de multifase

Estos promueven el contacto entre la enzima y sustratos en la zona de la matriz membranal. Generalmente, la membrana actúa como soporte para la enzima y como interfase entre dos líquidos inmiscibles, como hidrofílicos e hidrofóbicos; constan de reservorios donde los sustratos y productos pueden solubilizarse (Figura 22).

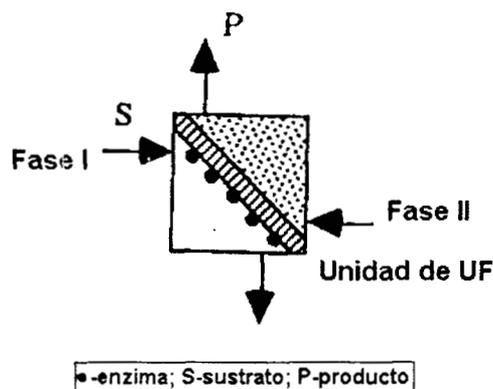


Figura 22. Reactor de multifase.
(Prazeres y Cabral, 1994)

2.9.3. Ventajas y desventajas

Los reactores de membrana tienen ventajas intrínsecas que los hacen un sistema eficiente para la realización de procesos enzimáticos. La Tabla 9 muestra sus ventajas y desventajas.

Tabla 9. Ventajas y desventajas de los BEM.

Ventajas	Desventajas
Operación continua posible	Absorción enzimática desfavorable
Mejores posibilidades de control	Envenenamiento enzimático
Integración de operaciones unitarias	Inactivación de la enzima por su degradación
Velocidades altas de reacción y productividad	Inhibición producto/sustrato en la superficie
Cambio del equilibrio químico	Pérdida de activadores y cofactores enzimáticos
Concentración/enriquecimiento de las soluciones	Concentración de la polarización
Control del peso molecular de hidrolizados	Incrustación de la membrana
Reacciones multifase posibles	Fuga enzimática
Escalamiento simple	

(Prazeres y Cabral, 1998)

2.9.4. Aplicaciones

Dentro de las aplicaciones de los BEM se pueden mencionar las siguientes áreas:

- Hidrólisis de macromoléculas
- Biotransformaciones de lípidos
- Reacciones con cofactores
- Resoluciones ópticas y síntesis de péptidos
- Aplicaciones biomédicas
- Conversión de biopolisacáridos
- Otros

La Tabla 10 muestra algunos ejemplos específicos de aplicaciones de estos equipos dentro de los campos mencionados arriba.

Tabla 10. Aplicaciones de BEM.

Aplicación	Referencia
Hidrólisis de macromoléculas	
Hidrólisis de pectina catalizada por enzimas pectinolíticas	Lozano y col., 1990
Hidrólisis de maltodextrinas por glucoamilasa	Silva, 1990
Hidrólisis de proteínas de pescado catalizada por proteasa	Nakajima y col., 1992
Hidrólisis de almidón a jarabes maltosados usando β -amilasa e isoamilasa	Houng y col., 1992
Hidrólisis de hemoglobina bovina con pepsina	Sannier y col., 1994; Zhao y col., 1995; Woo y McCord, 1994
Preparación de péptidos bioactivos por la hidrólisis de proteínas de la soya usando endopeptidasas	Sonomoto y Okamoto, 1995
Hidrólisis de proteínas del cuerno y pezuñas de las vacas y búfalos usando proteasa de <i>Bacillus subtilis</i>	Kida y col., 1995
Hidrólisis, esterificación y transesterificación de lípidos	
Hidrólisis del aceite de soya por lipasa en reactor con dos distintas membranas	Tanigaki y col., 1993
Hidrólisis de triglicéridos de la grasa de leche empleando lipasa en un sistema de emulsión	García y col., 1992
Síntesis de éteres séricos por un complejo lipasa-surfactante en hexano empleando celdas de UF	Isono y col., 1995
Hidrólisis de lecitina por fosfolipasa	Morgado y col., 1996
Reacciones con coloradores	
Síntesis de L-alanina por alanina deshidrogenasa con regeneración de NADH por lactato deshidrogenasa	Fujii y col., 1991
Producción de NADH con alcohol deshidrogenasa utilizando UF	Peters y Kula, 1991
Síntesis de compuestos orgánicos por metileno-hidroxilasas con reactivación de enzimas electroquímicas usando flavocitocromos	Brielbeck y col., 1994
Resoluciones ópticas y síntesis de péptidos	
Síntesis del dipéptido Phe-Leu catalizada por α -quimotripsina en micelas inversas de TTAB/octanol/heptano	Serralheiro y col., 1994
Síntesis continua del dipéptido Tyr-Arg catalizada por α -quimotripsina en UF	Flörsheimer y col., 1989; Fischer y col., 1994
Resolución de cianometil racémico por lipasa en reactor de fibra hueca	Giorno y col., 1995
Aplicaciones biomédicas	
Hidrólisis de urea por ureasa inmovilizada en membrana de intercambio aniónico	Chen y col., 1994
Remoción extracorporeal de lipoproteínas de baja densidad por fosfolipasa A2 en combinación de reactores de lecho empacado/fibra hueca	Labeque y col., 1993

3. JUSTIFICACIÓN

La astaxantina es un carotenoide que proporciona un color rojo-anaranjado por lo cual es ampliamente utilizado en la industria alimentaria, su mercado principal es la pigmentación de salmónidos, demanda en su mayor parte cubierta por pigmentos sintéticos. Sin embargo las fuentes naturales son abundantes, como los residuos de camarón provenientes del cultivo de este crustáceo en granjas, su pesca en bahía y en mar abierto.

Para lograr niveles de pigmentación en salmónidos que satisfagan la expectativa de los consumidores es necesario que el productor proporcione la cantidad suficiente de astaxantina a los productos cultivados, lo cual representa un incremento del 10 al 15% del costo total de operación, debido a la baja eficiencia del pez en incorporar los pigmentos al músculo, requiriendo de suministros constantes del carotenoide.

México produce grandes cantidades de desperdicios de camarón cada año, los cuales representan un problema de contaminación ambiental; estos volúmenes aumentan en el último tercio del año, cuando no hay veda de camarón en bahía y alta mar. Ha habido pocos intentos para la utilización del subproducto, siendo uno de ellos la pigmentación de las yemas de huevo de granjas avícolas, pero han sido intermitentes y de baja eficiencia. La magnitud de este problema se ejemplifica con la forma en que se tratan los residuos en cada una de las granjas camaronícolas del estado de Sinaloa, donde las más productivas apilan en zonas determinadas hasta ocho toneladas métricas diarias, cuando se satura esa área, se selecciona otro lugar para seguir depositando los desperdicios. Lo mismo acontece, con un gran número de toneladas métricas de cabezas de camarón en los campos pesqueros. Paralelamente está la cantidad aún mayor de residuos que generan los barcos camaroneros por su alta capacidad de captura, y que desechan al mar.

Un kilogramo de astaxantina tiene un costo aproximado a los 2500 dólares. El mercado mundial actual del pigmento se estima en 200 MDD con un crecimiento del 15% por año.

Los pigmentos sintéticos cada vez son más cuestionados por posibles problemas de salud que puede provocar su consumo, lo que origina el creciente interés del consumidor por productos naturales. Esto ha propiciado en varios países una tendencia a la prohibición de los carotenos obtenidos por la vía sintética.

Otras aplicaciones que están expandiendo el mercado de este pigmento natural son el área de cosméticos y la elaboración de suplementos alimenticios para el consumo humano con alto contenido de antioxidante. Por sus potenciales beneficios a la salud, la astaxantina se ha clasificado como un compuesto nutracéutico, no sólo para los seres humanos, sino también para el mejoramiento de funciones biológicas como el crecimiento, reproducción y prevención de enfermedades en especies animales, salmónidos y camarón, entre otros.

Se puede extraer eficientemente y en altas cantidades astaxantina a partir de los residuos de camarón según los métodos indicados en el presente trabajo. La fermentación láctica consigue una prehidrólisis de los residuos que aumenta la extracción de las carotenoproteínas al mismo tiempo que estabiliza a los pigmentos; la hidrólisis de estas carotenoproteínas puede incrementar la liberación de los carotenoides. Esta metodología es adaptable a un bioreactor enzimático de membrana que permite la recuperación de pigmentos y proteína a través de un proceso que admite aumentar su escala de producción.

Un recurso menos aprovechado en este tipo de residuos lo constituye la proteína, la cual puede ser fuente importante de aminoácidos; según resultados de este estudio las carotenoproteínas de los desperdicios fermentados contienen cantidades significativas de aminoácidos incluyendo a los esenciales.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la hidrólisis enzimática de carotenoproteínas de residuos de camarón fermentados para la obtención de astaxantina y desarrollar la separación del pigmento y proteína en un bioreactor enzimático de membrana.

Objetivos específicos

- Llevar a cabo la hidrólisis de carotenoproteínas mediante métodos enzimáticos.
- Estudiar la hidrólisis del complejo en un bioreactor enzimático de membrana.
- Concentrar a la proteína y pigmentos en el bioreactor mediante ultrafiltración y ósmosis inversa, estudiando los flujos de permeado en cada proceso.
- Estudiar por métodos cromatográficos a los pigmentos carotenoides presentes en el extracto.
- Analizar el efecto de los factores luz, oxígeno y temperatura sobre la estabilidad de la astaxantina natural y sintética.
- Conocer la composición de aminoácidos de las carotenoproteínas de residuos de camarón fermentados y no fermentados.
- Evaluar el peso molecular de la fracción proteica obtenida en la disociación del complejo con celulasa.

5. HIPÓTESIS

Un proceso enzimático que logra una hidrólisis adecuada de las carotenoproteínas de residuos de camarón fermentados permite obtener altos rendimientos en pigmentos liberados y proteína, los cuales pueden purificarse y concentrarse en un bioreactor enzimático de membrana.

- La hidrólisis del complejo puede llevarse a cabo mediante el uso de una proteasa, y a su vez el proceso puede mejorarse con la acción conjunta de proteasa:lipasa.
- Con una celulasa es posible dissociar carotenoproteínas en sus dos componentes sin hidrólisis de la parte proteica.
- Es posible la hidrólisis del complejo con proteasa en un bioreactor enzimático de membrana a la vez que sucede una concentración de la proteína por ultrafiltración y permeación de los pigmentos, estos últimos concentrables por ósmosis inversa.
- La iluminación, la temperatura y la presencia de oxígeno afectan la estabilidad de la astaxantina, especialmente los tratamientos que combinan luz y oxígeno.
- Por falta de un vehículo o excipiente protector la astaxantina de origen natural experimenta una mayor oxidación que la astaxantina sintética del Carophyll pink.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material

Se utilizó exoesqueleto de camarón (*Litopenaeus sp.*) obtenido en la central de abasto la Nueva Viga del D.F. El material se molió en un molino para carne Sanitary^{MR} con cedazo de 1/8" y se almacenó bajo congelación a -10°C hasta su posterior utilización.

6.2. Fermentación

La fermentación láctica de los residuos de camarón se desarrolló según la metodología utilizada por Armenta y col. (2002), y que consiste en adicionar a los residuos descongelados 10% de glucosa anhidra y 5% (v/p) del cultivo iniciador *Lactobacillus paracasei* A3 con un tiempo de fermentación del sustrato semisólido de 48 horas a 30°C (Figura 23).

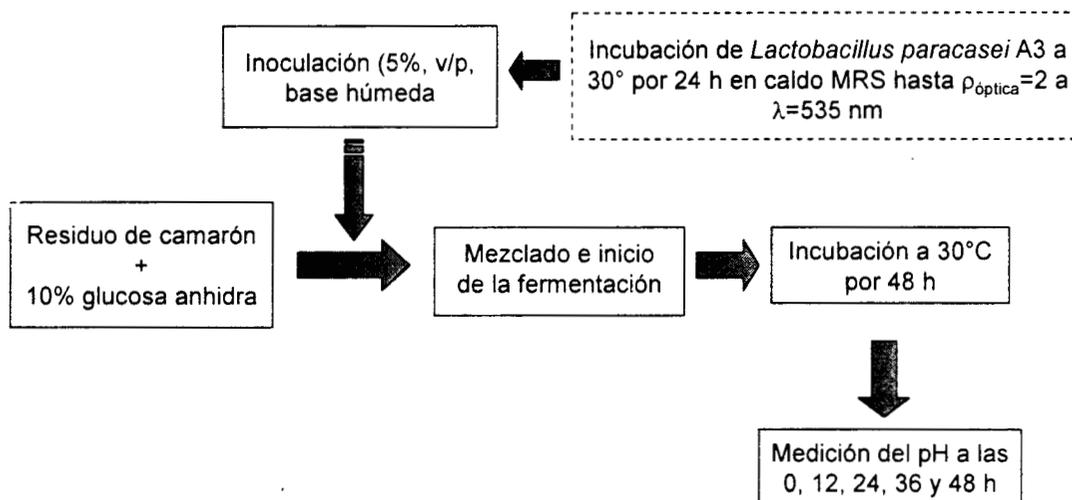


Figura 23. Fermentación de residuos de camarón.

El microorganismo usado en la fermentación fue aislado de residuos de camarón de aguas tropicales y proporcionado por la Dra. Zainoha Zakaria de la Universidad Tecnológica de Malasia, sin ninguna información acerca de su temperatura y pH óptimos. Para obtener una densidad óptica = 2 a una $\lambda = 535$ nm en el inóculo, la bacteria se incubó en caldo MRS a 30°C durante 24 horas. La determinación de la $\rho_{\text{óptica}}$ se realizó empleando un espectrofotómetro Beckman DU^{MR} 650 (Fullerton, California).

Las fermentaciones se desarrollaron en recipientes de cristal ámbar con tapa de plástico y capacidad para 1.1 litros, utilizando como volumen de fermentación 1 kg de residuo de camarón. Este sistema se sometió a incubación a 30° en baño de agua Felisa con control de temperatura FE-371 (México, D.F.).

La medición del pH se llevó a cabo utilizando un potenciómetro Beckman modelo 50 (Fullerton, California).

6.3. Extracción y concentración de carotenoproteínas

El sistema de disolventes orgánicos empleado para la extracción de las carotenoproteínas fue el reportado por Meyers y Bligh (1981), compuesto por éter de petróleo:acetona:agua (15:75:10). Esta mezcla de disolventes se utilizó en una proporción 1:10 (p/v) con respecto al residuo fermentado; se adicionó 0.01 % de la mezcla de antioxidantes BHA:BHT para protección de los pigmentos (Figura 24).

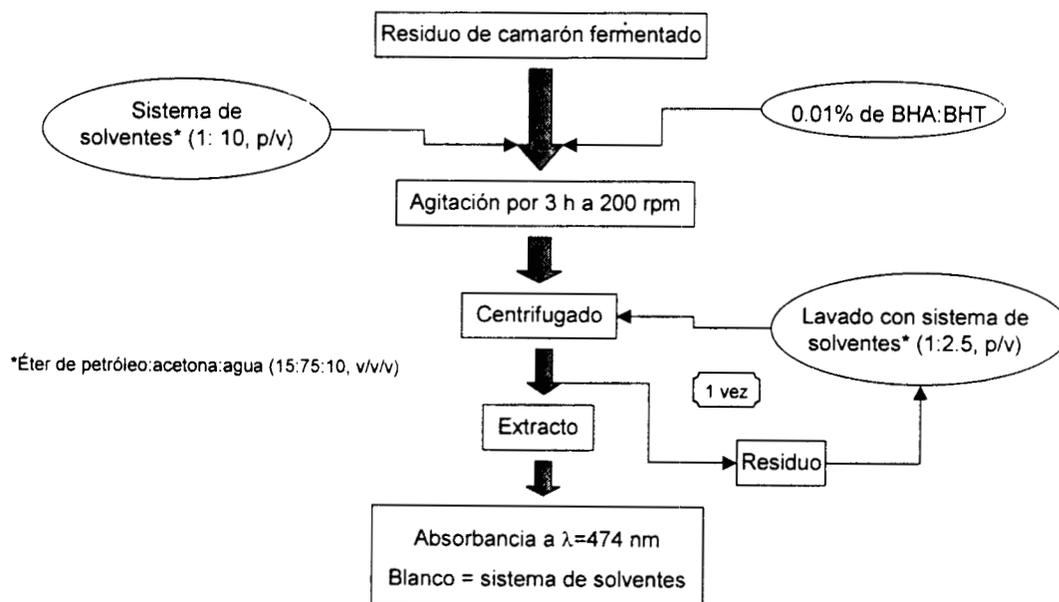


Figura 24. Extracción de pigmentos.

El tiempo total de extracción fue de tres horas, con una agitación constante de 200 rpm, a temperatura ambiente y evitando la luz, para realizar esta operación se empleó una incubadora de agitación orbital Lab-Line^{MR} (Melrose Park, Illinois).

La solución obtenida fue de color rojo por la presencia de carotenoides; esta se recuperó por medio de centrifugación a 7000 rpm por 10 minutos a 4°C en una centrífuga Beckman J2-MI con rotor No. JA-14 (Palo Alto, California). Después de separar el sobrenadante, se hizo un lavado de los residuos con 25% del volumen del sistema de disolventes empleado al inicio de la extracción; de nuevo se centrifugó a la misma velocidad para la recuperación del extracto, el cual se reunió con el volumen de la primera extracción. A la solución de disolventes rica en carotenoproteínas se le determinaron xantofilas totales.

Los extractos fueron liofilizados en un liofilizador Labconco modelo 77510 (Chicago, Illinois), obteniéndose un concentrado de la carotenoproteína en forma de polvo. Estos liofilizados se obtuvieron partiendo de un volumen inicial de 200 mL en cada recipiente, en un tiempo aproximado de 10 horas a -45°C y 120×10^{-3} mbares. La carotenoproteína liofilizada se usó posteriormente para los estudios de hidrólisis enzimática.

6.3.1. Xantofilas totales

Las cuantificaciones de esta variable en los extractos se realizaron en una celda de cuarzo resistente al efecto corrosivo de disolventes, midiendo la absorbancia a una $\lambda=474$ nm, en un espectrofotómetro Beckman DU^{MR} 650 (Palo Alto, California).

El valor de absorbancia se sustituyó en la fórmula reportada por la AOAC (1990) para xantofilas totales.

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

Donde: A = absorbancia a 474 nm; D = factor de dilución; P = peso de la muestra en gramos; 236 = absortividad específica de la *trans*-luteína y; 1000 = factor de conversión a mg/kg.

El factor de dilución tuvo un valor de

$$125 \text{ mL de disolvente (100 mL iniciales + 25 mL lavado) / 10 g residuo (v / p) = 12.5}$$

6.3.2. Análisis de astaxantina por HPLC

Los extractos se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Este equipo estaba equipado con una columna de fase reversa Symmetry^{MR} C₁₈ para separar pigmentos carotenoides y sus ésteres. Se siguió el método reportado por Guillou y col. (1993) que utilizan una fase móvil de acetonitrilo / cloroformo / metanol / agua / ácido propiónico (71:22:4:2:1, v/v/v/v/v) y una velocidad de flujo igual a 1 mL/min.

La fase móvil fue previamente filtrada con una membrana Millipore^{MR} de 0.45 µm resistente a disolventes y posteriormente desgasificada antes y durante su empleo en el cromatógrafo por inyección de nitrógeno gaseoso.

El equipo de HPLC (Massachussets, Estados Unidos) empleado bajo condiciones isocráticas tuvo las siguientes características: inyector Rheodyne 7125 con loop de 50 µL, columna Waters^{MR} Symmetry^{MR} C₁₈ (4 µm) No. WAT054205 de 150 mm de largo por 3.9 mm de diámetro interno, 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 se filtraron utilizando filtros Gelman^{MR} Acrodisc^{MR} GHP No. 13 de 0.45 µm. Se emplearon volúmenes de inyección de 50 µL, con 10 minutos como tiempo total de análisis para cada muestra; el intervalo de longitud de onda que se empleó fue entre 400 y 500 nm; el cromatograma específico se obtuvo a una longitud de onda de 474 nm, la λ en la que la astaxantina presenta su absorbancia máxima.

Se elaboró una curva de calibración utilizando estándar de astaxantina suministrado por cortesía de Hoffman-La Roche (Basilea, Suiza), correlacionando distintas concentraciones del carotenoide con las áreas correspondientes de los cromatogramas.

La Figura 25 muestra un esquema del análisis por HPLC de la astaxantina de los residuos fermentados.

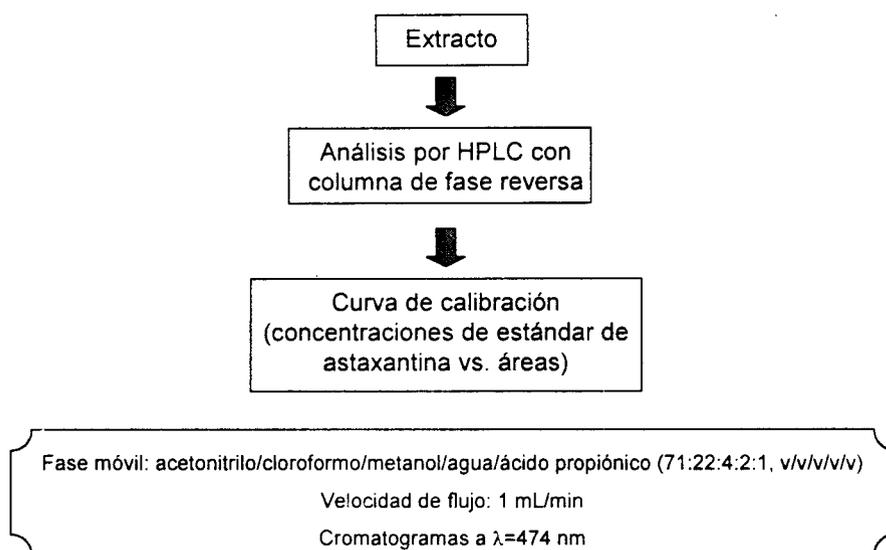


Figura 25. Análisis de astaxantina por HPLC.

6.4. Hidrólisis enzimática de carotenoproteínas

Se utilizaron cuatro tratamientos enzimáticos para la hidrólisis de la carotenoproteína: con proteasa comercial Savinase^{MR}; con una mezcla de la anterior proteasa y la lipasa comercial Lipolase^{MR}; con la celulasa comercial Viscozyme^{MR} L; con la acción combinada de la celulasa y lipasa referidas arriba. Todas las enzimas fueron suministradas por la compañía Novo Nordisk Products (Bagsvaerd, Dinamarca).

Todas estas enzimas se encuentran en estado líquido, provienen de microorganismos no patógenos clasificados como no tóxicos, son biodegradables y resistentes a efectos mecánicos. Por su alta capacidad de remoción de manchas proteicas, el mayor uso de esta proteasa es en la formulación de detergentes para

lavandería y cocina. La lipasa también encuentra su aplicación en los detergentes, ya que facilita la remoción de grasa y aceite contenida en manchas. La celulasa se utiliza en el rompimiento de paredes celulares para la extracción de componentes valiosos de tejidos vegetales (Novo Nordisk, 1998).

6.4.1. Proteasa

6.4.1.1. Actividad enzimática

Una unidad de actividad proteolítica (UP) se define como la cantidad de enzima necesaria para lograr un incremento en la absorbancia de 0.001 por minuto a las condiciones que se mencionan a continuación (Kunitz, 1947).

Las UP se determinaron de acuerdo al método de Kunitz (1947), el cual utiliza caseína al 1% (Merck) como sustrato (p/v) disuelta en 50 mL de búfer de fosfatos de sodio 0.05 M, con agitación continua durante 20 minutos a temperatura de ebullición en baño de agua. Después de enfriar a temperatura ambiente se ajustó el pH a 7.

En el anexo 1 se describe el método empleado.

6.4.1.2. Sistema

Al conocer la cantidad de proteasa requerida para alcanzar 5, 10 y 15 UP se procedió a la hidrólisis de la carotenoproteína en un sistema con las siguientes características: en tubos de ensayo cubiertos con papel aluminio para protección de la luz, se depositaron 10 mL de búfer de fosfatos 0.05 M a pH 7, 1 mg/mL de carotenoproteína liofilizada, se calentó a 40°C con agitación de 80 rpm, cuantificándose la proteína soluble y las xantofilas totales a las 0, 12 y 24 horas. También se experimentó a pH 8 para comparar los resultados de hidrólisis proteica con los obtenidos a pH 7 (Figura 26).

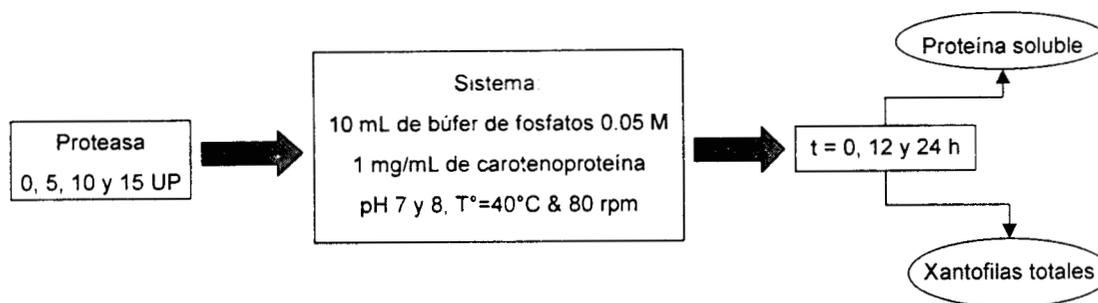


Figura 26. Hidrólisis de carotenoproteína por proteasa.

6.4.1.3. Proteína soluble

Se determinó la proteína soluble a la carotenoproteína contenida en todos los sistemas e hidrolizados resultantes de la acción catalítica de las enzimas estudiadas por el método de Peterson (1977). La curva de calibración se elaboró con seroalbúmina bovina (Sigma) como solución patrón, en un intervalo de concentración de 0 a 300 mg/L.

En el anexo 2 se describen los reactivos y método empleado.

6.4.2. Proteasa:lipasa

6.4.2.1. Actividad enzimática de lipasa

Una unidad de actividad lipolítica (UL) es la cantidad de enzima necesaria para liberar un μmol por minuto de ácido butírico a las condiciones que se describen a continuación.

Para determinar la actividad enzimática de la lipasa y conocer las cantidades requeridas para alcanzar las UL correspondientes se utilizó el método analítico, con algunas adecuaciones, proporcionado por Novo Nordisk, que se basa en la hidrólisis de la tributirina a pH 7 y el consumo de álcali en la titulación de ácido butírico resultante hasta la recuperación del pH inicial. Los reactivos y metodologías se indican en el anexo 3.

6.4.2.2. Sistema

Las unidades experimentales fueron similares a las utilizadas en la sección 6.4.1.2, pero empleando la proteasa en conjunción con la lipasa. Se fijaron 15 UP de la proteasa, variando las UL de lipasa; las combinaciones que se estudiaron fueron: 15:0, 15:5, 15:10 y 15:15 (UP:UL). El sistema se mantuvo a pH 8 y 40°C (Figura 27).

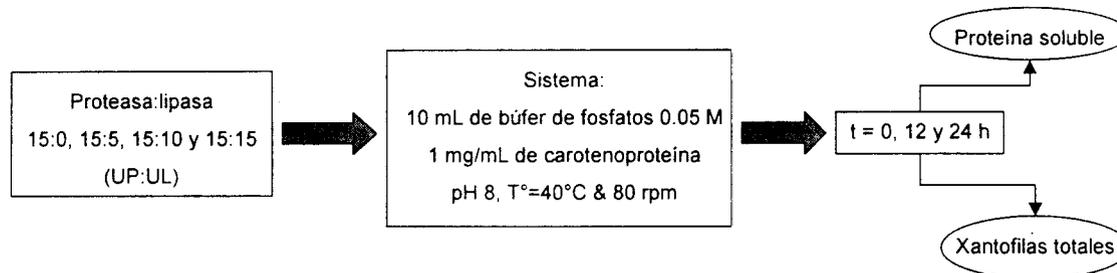


Figura 27. Hidrólisis de carotenoproteína por proteasa:lipasa.

6.4.3. Celulasa

6.4.3.1. Actividad enzimática

Una unidad de β -glucanasa (BG) se define como la cantidad de enzima, que bajo las condiciones indicadas abajo, libera glucosa u otros carbohidratos reductores con el correspondiente poder de reducción de 1 μ mol de glucosa por minuto.

En el anexo 4 se indica el procedimiento que se realizó para la determinación de la actividad de la β -glucanasa de acuerdo al método reportado por Somogyi y Nelson (1944), que cuantifica a la glucosa u otros azúcares reductores resultantes de la hidrólisis del β -glucano.

6.4.3.2. Sistema

Se probaron 5, 10 y 15 BG de celulasa, los ensayos se desarrollaron bajo las condiciones del sistema descritas en la sección 6.4.1.2, pero fijando pH 5 (Figura 28).

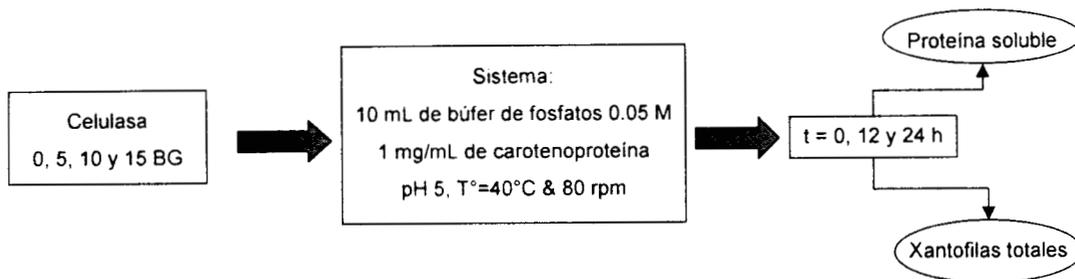


Figura 28. Acción de celulasa sobre la carotenoproteína.

Debido a la obtención de resultados positivos con celulasa en la separación de las dos fracciones de la carotenoproteína, caroteno y proteína, y al observar que la separación parcial aumentaba de acuerdo a la cantidad de BG, se aumentaron a 20 y 25 las BG de celulasa en el sistema.

6.4.4. Celulasa:lipasa

Los procedimientos para medir la actividad enzimática de celulasa y lipasa se indican en las secciones 6.4.3.1 y 6.4.2.1 respectivamente.

En páginas anteriores se describieron los ensayos enzimáticos con la acción conjunta de proteasa:lipasa que aumentó el grado de hidrólisis de la carotenoproteína con relación a la acción individual de la proteasa. Por lo tanto se decidió estudiar el efecto conjunto de celulasa:lipasa y observar el posible aumento en la disociación del complejo. Para este experimento se fijó la cantidad de BG con la que se logró una mayor disociación de carotenoproteína, variándose sólo la cantidad de UL de 0 hasta 20. Las combinaciones celulasa:lipasa fueron: 20:0, 20:5, 20:10, 20:15 y 20:20 (BG:UL) en las condiciones referidas en la sección 6.4.1.2, a un pH 5 (Figura 29).

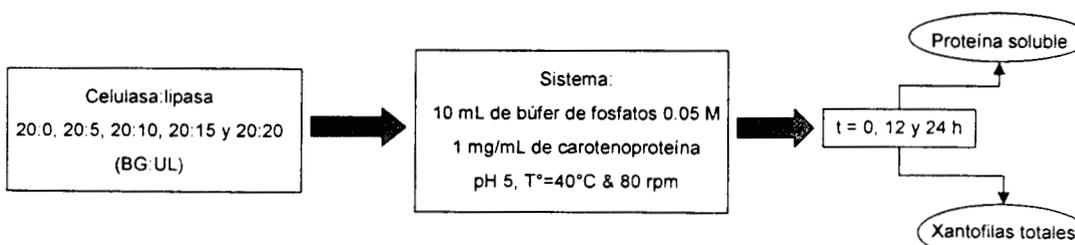


Figura 29. Acción conjunta de celulasa:lipasa sobre la carotenoproteína.

6.5. Hidrólisis enzimática de carotenoproteínas en disolventes orgánicos

Para observar el efecto de los disolventes orgánicos en la hidrólisis de la carotenoproteína por proteasas, se llevaron a cabo ensayos directamente en los extractos de éter de petróleo:acetona:agua. La cantidad de carotenoproteína en los extractos fue de 2 mg por cada mL de extracto. Para estandarizar el método con la concentración referida en el sistema de la sección 6.4.1.2, los extractos se diluyeron (1:1) con la misma mezcla de disolventes hasta obtener una concentración de 1 mg/mL. Según los resultados obtenidos en un sistema modelo con búfer de fosfatos, la proteasa a un pH 8 hidroliza en mayor grado a la carotenoproteína. El pH de los extractos con disolventes varió entre 8.1 y 8.5, por lo que no fue necesario ajustarlo a 8 para este estudio. En estos extractos con disolventes se adicionó la misma cantidad de enzima usada en el búfer de fosfatos para alcanzar 15 UP, aunque también se probó con 20 UP, con el fin de observar el efecto de un exceso en la cantidad de enzima adicionada.

Se estudiaron dos proporciones distintas de disolventes orgánicos en las muestras: la utilizada a lo largo de las extracciones (15:75:10) y otra con menor cantidad de acetona y mayor volumen de agua (15:65:20). Por último, por motivo de los bajos puntos de ebullición de los disolventes, no se utilizaron 40°C de temperatura en el tratamiento del sistema, sino 25°C (Figura 30).

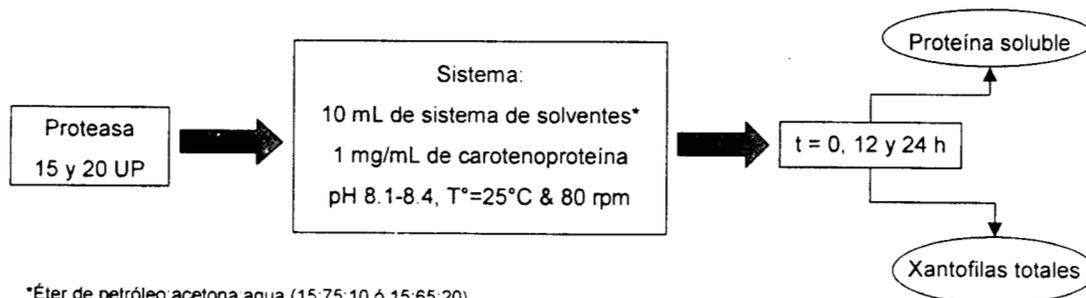


Figura 30. Hidrólisis de carotenoproteína por proteasa en sistema de disolventes orgánicos.

6.6. Separación de astaxantina en bioreactor enzimático de membrana

6.6.1. Características del bioreactor

Se utilizó un bioreactor enzimático de membrana (BEM) Celfa modelo P-28^{MR} (Seewen, Suiza) que se muestra a la derecha de la Figura 31, con capacidad volumétrica de 0.5 litros. El sistema está compuesto por una celda de membrana, bomba de recirculación y mezclado. Fue construido para llevar a cabo procesos de microfiltración, ultrafiltración y ósmosis inversa, usando membranas planas de 75 mm (44.17 cm²), las cuales se intercambian fácilmente.

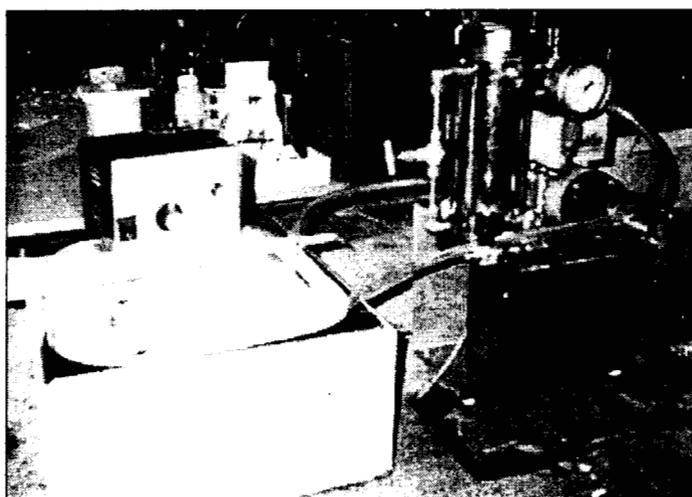


Figura 31. BEM P-28 (derecha) y baño para mantener la temperatura en el reactor (izquierda).

El BEM P-28^{MR} posee un cilindro presurizado para la solución de alimentación, unido a la celda por medio de un canal de flujo de aproximadamente 4.5 x 3 mm. El flujo de alimentación rocía a la membrana mediante un flujo tangencial al igual que las unidades industriales. Se obtienen velocidades altas del líquido debido al flujo turbulento, lo que minimiza el fenómeno de incrustación de la membrana.

La bomba de recirculación está acoplada magnéticamente a un motor eléctrico, lo cual permite el ajuste continuo entre velocidades de flujo entre 0.1 y 6 litros por minuto. El sistema está construido para resistir presiones hasta de 40 bares. Las

presiones arriba de 8 bares pueden controlarse por una válvula que se encuentra en el sistema de recirculación. Las presiones altas pueden alcanzarse por una alimentación de nitrógeno contenido en un cilindro externo, contando con una válvula de seguridad para proteger al sistema de sobrepresiones. El cilindro de alimentación tiene una chaqueta para el enfriamiento o calentamiento del líquido, por lo que es posible trabajar con temperaturas arriba de 90°C.

6.6.2. Determinación del flux de permeado

6.6.2.1. Ultrafiltración

Después de instalar en el BEM una membrana de polisulfona (Danish Separation Systems AS, Copenhagen, Dinamarca) con un peso molecular nominal (PMN) de 10 kDa, la primera operación realizada fue su compactación recirculando agua a dos bares de presión durante dos horas. Posterior a esta operación se hizo un análisis para observar si el flux del agua presentaba un comportamiento lineal con respecto a la presión.

$$J = \text{volumen o peso del líquido} / \text{área de la membrana} \star \text{tiempo} = \text{L/m}^2 \text{ h ó kg/m}^2 \text{ h}$$

Para obtener la cinética del flux se utilizaron presiones de 0 a 3.5 bares en intervalos de 0.5. Los flujos volumétricos del permeado se registraron en períodos de un minuto.

6.6.2.2. Ósmosis inversa

Para este proceso se instaló en el BEM una membrana de polisulfona (Danish Separation Systems AS, Copenhagen, Dinamarca) con un PMN de 1000 Da. En este caso, se conectó un tanque con nitrógeno gaseoso para obtener presiones altas. En la compactación de la membrana se usó agua a 10 bares de presión durante 2 horas. Después de esta operación se obtuvo la cinética del flux registrando el flujo de permeado durante un minuto a cada unidad de presión en el intervalo de 5 a 10 bares.

6.6.3. Determinación del peso molecular de corte

6.6.3.1. Ultrafiltración

Para conocer el peso molecular de corte (PMC) se utilizaron estándares de polietilenglicol (PEG) con distintos pesos moleculares: 4, 6, 10 y 20 kDa. Desarrollando el procedimiento descrito en el anexo 5.

6.6.3.2. Ósmosis inversa

Se llevó a cabo el mismo procedimiento seguido para UF, sustituyendo los compuestos de las soluciones por otros de menor peso molecular como PEG de 1000 y 600 Da, rafinosa y sacarosa con 594.52 y 342.3 Da respectivamente. También se emplearon soluciones electrolito con 2000 mg/L de NaCl y Na₂SO₄ para conocer su porcentaje de retención en la membrana ($f \star 100$).

6.6.4. Hidrólisis de carotenoproteína y separación por UF

6.6.4.1. Actividad enzimática

Se hicieron las determinaciones de actividad enzimática de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 6.4.1.1 para conocer la cantidad de proteasa necesaria para alcanzar las UP correspondientes en el sistema modelo y BEM.

6.6.4.2. Hidrólisis de carotenoproteína en sistema modelo

Para comparar la cinética de hidrólisis de carotenoproteína en el sistema modelo con la obtenida en el BEM, se repitió la hidrólisis descrita en la sección 6.4.1.2, a pH 8 con cuantificaciones de proteína y xantofilas totales cada 60 minutos durante 24 horas (Figura 32).

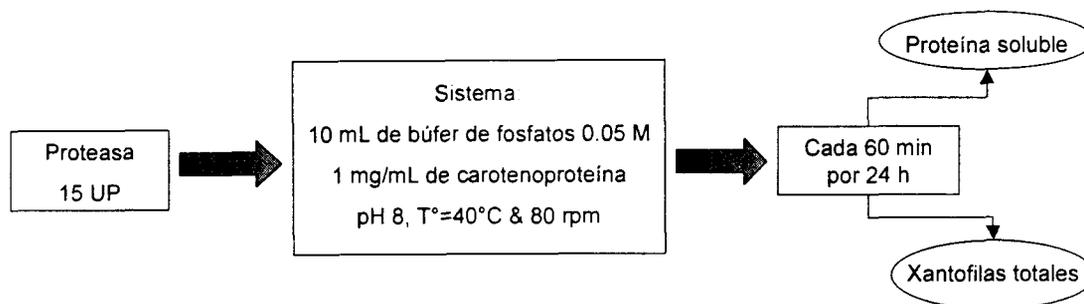


Figura 32. Hidrólisis de carotenoproteína en sistema modelo.

6.6.4.3. Hidrólisis de carotenoproteína en BEM

Se disolvió 1g/L de carotenoproteína en búfer de fosfatos 0.05 M a un pH 8, para conocer la cinética de hidrólisis se siguió la metodología que se describe en el anexo 6.

La Figura 33 muestra el esquema del BEM utilizado para la hidrólisis de la carotenoproteína, con una membrana de un PMC de 10.5 kDa y 2 bares de presión en el sistema.

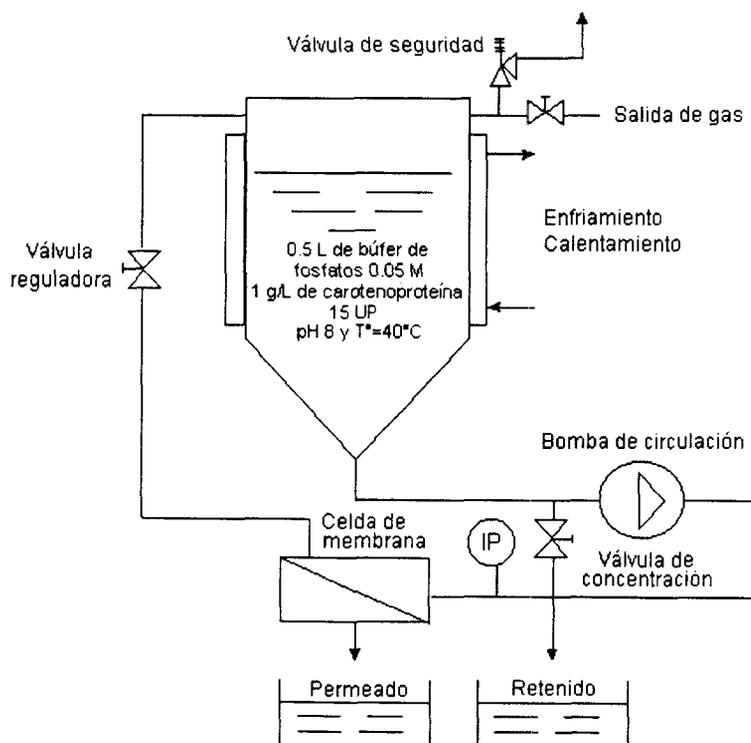


Figura 33. Hidrólisis de carotenoproteína por proteasa en BEM.

Debido a que al finalizar las 16 horas del proceso los resultados aún mostraron una pendiente marcada de hidrólisis de carotenoproteína se decidió repetir el experimento utilizando 20 UP.

6.6.4.4. Hidrólisis, factor de concentración y flux a distintas presiones de trabajo

Para observar el efecto de la fuerza impulsora, provocada por la presión hidrostática en el BEM, sobre la hidrólisis de la carotenoproteína, el factor de concentración volumétrico (FC) y el flux, también se hicieron experimentos a 1.5, 2.5 y 3 bares de presión, para comparar los resultados con los obtenidos a 2 bares. Estos ensayos se llevaron a cabo con 20 UP cuantificando las variables cada 60 minutos dentro del período de 3 a 11 horas y las demás condiciones indicadas en la sección 6.6.4.3.

Por ser un proceso en lote, el volumen final del concentrado o retenido (V_c) se determinó por el balance de masa entre el volumen inicial (V_i) y el volumen del permeado (V_p).

$$V_c = V_i - V_p$$

La relación con la cual se obtuvo el factor de concentración volumétrico fue:

$$FC = V_i / V_c$$

6.6.5. Concentración del pigmento por OI

El permeado resultante de la UF del hidrolizado de carotenoproteína fue una solución rica en pigmentos ya que estos compuestos lograron atravesar la membrana y la mayor parte de la proteína fue retenida en la membrana de 10.5 kDa. Por lo cual, buscando la concentración del pigmento, se instaló en el BEM una membrana de polisulfona con un PMC de 793 Da.

En la Figura 34 se ilustra el esquema de la OI realizada en el BEM a temperatura ambiente durante siete horas de operación a 10 bares de presión, por lo cual se instaló al BEM un tanque con nitrógeno gaseoso para aumentar la fuerza impulsora en el sistema.

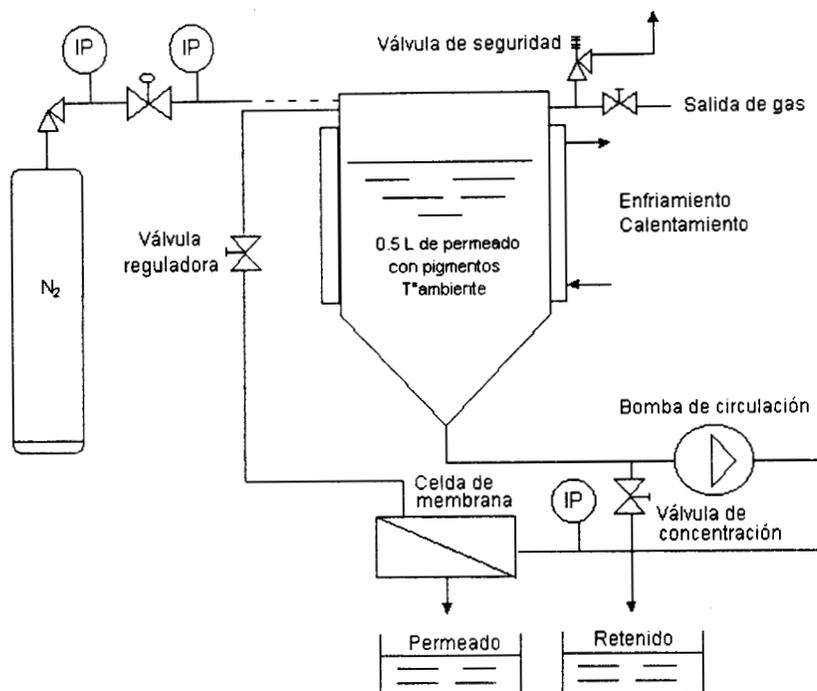


Figura 34. Concentración de pigmentos por OI.

6.7. Análisis de estándares de pigmentos

Este análisis se realizó por medio de HPLC en columna de fase reversa (sección 6.3.2). Los estándares fueron amablemente suministrados por Hoffman-La Roche (Basilea, Suiza), siendo un total de 11 carotenoides distintos: astaxantina AST-120, cantaxantina, zeaxantina, capsantina, luteína, 3-hidroxi-4-oxo- β -carotin, astaceno, astaxantina en cristal, neurosporina, (3S)- β -criptoxantina y (3R)-criptoxantina. Además de Carophyll pink^{MR}, de la compañía referida anteriormente, que contiene 8% de astaxantina sintética.

Con la finalidad de conocer los tiempos de retención de cada uno de los estándares y las áreas de los cromatogramas a diversas concentraciones, se solubilizaron en acetona, purificaron con filtros para disolventes de 0.45 μm Gelman^{MR} Acrodisc^{MR} GHP No. 13, y se inyectaron al equipo cromatográfico, utilizando como fase móvil acetonitrilo / diclorometano / metanol / agua / ácido propiónico (71/22/4/2/1, v/v/v/v/v),

a un flujo de 1 mL/min, analizando un intervalo de longitud de onda entre 400 y 500 nm, y con tiempos de 20 minutos de análisis por inyección (Figura 35).

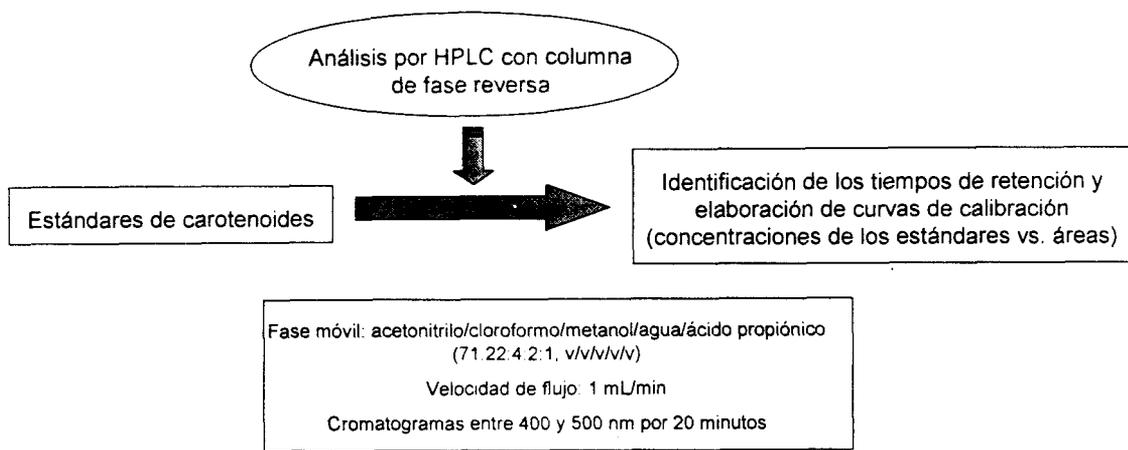


Figura 35. Análisis de estándares de pigmentos por HPLC.

6.8. Estabilidad de astaxantina

El efecto de tres fuentes de variación (iluminación, temperatura y disponibilidad de oxígeno) sobre la estabilidad de astaxantina obtenida de residuos de camarón fermentado, en comparación con astaxantina sintética (Carophyll pink^{MR}) se estudió a través de dos diseños experimentales: un diseño en el que se consideraron las fuentes de variación en forma independiente, y un diseño que incluyó las interacciones entre estos. En ambos casos, las variables de respuesta fueron la concentración de astaxantina y de astaceno, durante un total de 8 semanas, analizando las muestras cada una y dos semanas para el diseño sin y con interacciones, respectivamente. El estudio se llevó a cabo por duplicado.

6.8.1. Diseño sin interacciones

Unidades experimentales: Se colocaron 100 mg de carotenoproteína liofilizada con 1% de astaxantina libre (1 mg) obtenida de residuos de camarón fermentados, o 12.5 mg de Carophyll pink^{MR} con 8% de astaxantina libre (1 mg) en frascos de 10 mL.

El efecto de la iluminación, temperatura y disponibilidad de oxígeno se estudió a través de tres bloques, según se indica en la Tabla 11.

Tabla 11. Condiciones constantes y variables en el estudio de la degradación de astaxantina.

Bloque	Constantes	Variables
I	<ul style="list-style-type: none"> • Temperatura ambiente (20°C) • Disponibilidad de oxígeno (frascos cerrados) 	Iluminación: <ul style="list-style-type: none"> • Luz de día • Oscuridad • Exposición al sol
II	<ul style="list-style-type: none"> • Iluminación: sombra • Disponibilidad de oxígeno: frascos cerrados 	Temperatura: <ul style="list-style-type: none"> • 15°C • 25°C • 45°C
III	<ul style="list-style-type: none"> • Iluminación: sombra • Temperatura (20°C) 	Disponibilidad de oxígeno: <ul style="list-style-type: none"> • Frascos abiertos • Frascos cerrados

Los datos se sujetaron a análisis de varianza para cada condición variable, tomándose como fuente de variación el tiempo de estudio y el tipo de pigmento (natural o sintético) en efectos de primer orden, sin interacciones.

6.8.2. Diseño con interacciones

Se empleó el siguiente diseño factorial completo:

		Pigmento																				
		Natural						Sintético														
Tiempo (semanas)		Luz			Iluminación			Oscuridad			Luz			Iluminación			Oscuridad					
		Aire	Temperatura	Disponibilidad de oxígeno	Vacío	Temperatura	Disponibilidad de oxígeno	Aire	Temperatura	Disponibilidad de oxígeno	Vacío	Temperatura	Disponibilidad de oxígeno	Aire	Temperatura	Disponibilidad de oxígeno	Vacío	Temperatura	Disponibilidad de oxígeno	Aire	Temperatura	Disponibilidad de oxígeno
0	25°C	45°C	25°C	45°C	25°C	45°C	25°C	45°C	25°C	45°C	25°C	45°C	25°C	45°C	25°C	45°C	25°C	45°C	25°C	45°C	25°C	45°C
2																						
4																						
6																						
8																						

Los datos se sujetaron a análisis de varianza y prueba de Duncan, donde las variables de respuesta fueron % de astaxantina y de astaceno. El estudio se realizó por duplicado.

Para la cuantificación cromatográfica de astaxantina y astaceno se solubilizaron las muestras (1 mg de pigmento) en 25 mL de agua destilada; se tomó un mL de esa dilución para diluirla 1:1 con acetona, obteniendo una concentración final de 0.02 mg/mL o 20 ppm de astaxantina/astaceno. Después de filtrarse, la muestra se inyectó y analizó en HPLC conforme lo descrito en la sección 6.3.2. El oxígeno fue evacuado de las unidades experimentales utilizando nitrógeno gaseoso; la ausencia de luz se consiguió cubriendo los frascos de cristal con papel aluminio.

6.9. Composición y peso molecular de la carotenoproteína

6.9.1. Análisis de aminoácidos

Se analizó el contenido de aminoácidos de las carotenoproteínas de residuos de camarón fermentados y no-fermentados. Para esto se utilizó un analizador de aminoácidos Beckman modelo 6300 con el software "Gold" (Palo Alto, California), con búferes Beckman E, F y D almacenados a 4°C, reactivo de ninhidrina almacenada a 4°C durante toda una noche mezclada con dos partes de agua desionizada, y búfer de regeneración Beckman a 4°C. Los procedimientos de hidrólisis y pre-hidrólisis de oxidación se desarrollaron de acuerdo a la metodología reportada por Gehrke y col. (1985). En el anexo 7 se describe la preparación de las muestras.

6.9.2. Electroforesis de carotenoproteína

El análisis se realizó empleando el equipo Mini-Protean II Slab Cell de Bio-Rad^{MR} (Richmond, California), en geles de poliacrilamida con un gel de separación y concentración del 10 y 4% respectivamente. La concentración de proteína en la muestra fue de 7 mg/mL, los estándares con marcadores de alto peso molecular (SIGMA P 1677) cubrieron un intervalo de pesos moleculares entre 30 y 205 kDa.

Para la migración proteica se aplicó un voltaje constante de 200 voltios por 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 haciendo cambios de la solución.

Mediante una curva de Log del peso molecular contra R_f se conoció el peso molecular aproximado de la fracción proteica obtenida por la acción de celulasa.

6.10. Análisis estadístico

Se aplicó un diseño completamente al azar para evaluar a cada uno de los tratamientos enzimáticos sobre las carotenoproteínas utilizando proteasa, proteasa:lipasa, celulasa y celulasa:lipasa. Las fuentes de variación fueron: tipo de enzima y tiempo de proceso. La variable de respuesta fue la cantidad de pigmento y proteína liberados. Los datos se sometieron a un análisis de varianza y comparación múltiple de medias de Duncan (Steel y Torrie, 1988). Los resultados de la hidrólisis en BEM a distintas presiones también se evaluaron con este diseño, empleando las mismas variables de respuesta.

Los estudios de estabilidad de pigmento natural y sintético se llevaron a cabo aplicando dos diseños experimentales, según se explicó en la sección 6.8. En el caso del primer diseño (sin interacciones) se analizó el efecto de las fuentes de variación de acuerdo a lo descrito en la Tabla 11.

Se empleó también un diseño factorial completo $2^4 \times 5$ (tipo de pigmento: natural y sintético; disponibilidad de oxígeno: vacío y aire; iluminación: luz y oscuridad; temperatura: 25 y 45°C; y tiempo de estudio: 0, 2, 4, 6 y 8 semanas) (sección 6.8.2) en arreglo totalmente al azar, llevándose a cabo por duplicado. Los datos se sometieron a análisis de varianza y pruebas múltiples de medias de Duncan (Steel y Torrie, 1988).

En el análisis de aminoácidos de carotenoproteínas de residuos de camarón fermentados y no fermentados, las posibles diferencias fueron analizadas para cada aminoácido a través de pruebas de *t*.

Todos los análisis estadísticos se efectuaron mediante el uso del paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System), adaptado a una computadora personal (SAS Institute, 2000).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Fermentación

Después de 48 horas de fermentación láctica de residuos de camarón con *Lactobacillus paracasei* A3 la disminución promedio de pH fue de 7.7 a 4.15. La Figura 37 muestra los valores medidos en el transcurso de 10 fermentaciones a los tiempos 0, 12, 24, 38 y 48 horas (Figura 36).

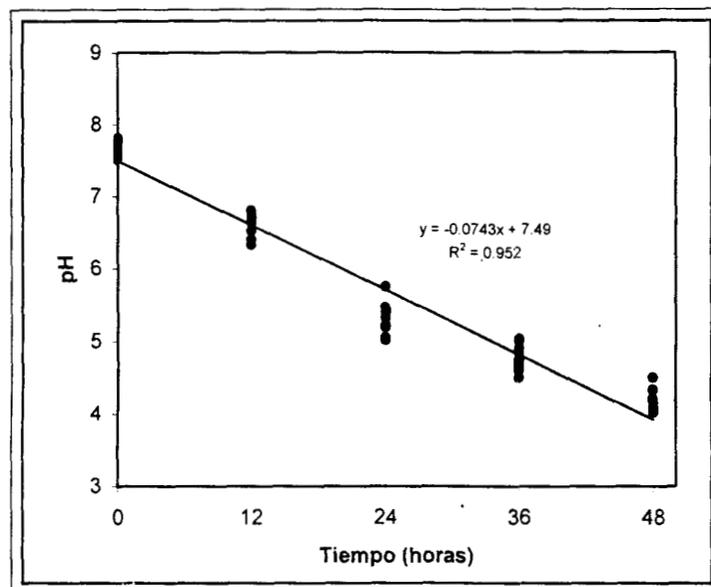


Figura 36. Disminución del pH en los residuos de camarón por *Lactobacillus paracasei* A3.

La Tabla 12 indica el pH medio a cada tiempo de medición (media de 10 repeticiones).

Tabla 12. pH promedio de 10 fermentaciones.

Tiempo (horas)	pH
0	7.7
12	6.61
24	5.28
36	4.79
48	4.15

Cada 12 horas se obtuvo un pH significativamente diferente ($P > 0.0001$). La habilidad que tiene este cultivo iniciador para la producción alta de ácido láctico durante la

fermentación de residuos de camarón puede deberse a que esta bacteria fue aislada de camarón tropical (Sri Lanka), lo que indica su habilidad para desarrollarse en este tipo de material biológico.

La fermentación láctica de los residuos de camarón ocasiona una prehidrólisis de carotenoproteínas, además de que protege a los residuos de contaminaciones con otros microorganismos. En residuos no fermentados de camarón, Simpson y Haard (1985) y Cano-López y col. (1987) utilizaron EDTA para prevenir el deterioro causado por microorganismos mientras recuperaban proteína mediante el uso de proteasas.

7.2. Pigmentos en el extracto

Según Guillou y col. (1995) la mayor parte de la astaxantina en crustáceos se encuentra mono o diesterificada con ácidos grasos en sus grupos hidroxilo, lo que además de su larga cadena de dobles enlaces, le confiere al pigmento un carácter en su mayor parte no polar, permitiendo su alta solubilización en el sistema de disolventes éter de petróleo:acetona:agua (15:75:10), donde sus dos primeros componentes son de naturaleza no polar. Sin embargo, Shahidi y Brown (1998) y Zagalsky y col. (1990) mencionan que la asociación del pigmento con la proteína puede provocar que la carotenoproteína llegue a ser soluble en agua, lo cual también puede relacionarse con la eficiencia de extracción del sistema de disolventes empleado, ya que contiene un 10% de fase acuosa.

La cantidad de xantofilas promedio después de 10 extracciones con el sistema de disolventes éter de petróleo:acetona:agua (15:75:10) fue de 272.26 mg/kg. En el proceso de extracción para cada 10 g de residuo se utilizaron 125 mL del sistema de disolventes éter de petróleo:acetona:agua (15:75:10), del cual se pierde un 4.8% (6 mL) por evaporación durante el proceso. Por lo tanto, la relación residuo de camarón/disolvente fue: $10 \text{ g} / 119 \text{ mL} = 0.084 \text{ g/mL}$.

De cada mL de extracto se recuperaron en promedio 22.87 μg de xantofilas totales. Como se emplearon 0.084 g de residuo para cada mL de sistema de disolventes, el rendimiento de pigmentos totales fue de 272.26 mg/kg.

Esta cantidad de xantofilas totales supera lo reportado por Torrissen y col. (1989) para varios residuos de crustáceos, que fluctúan entre 0 y 200 mg/kg.

En el análisis de astaxantina por HPLC, la curva de calibración elaborada con el estándar tuvo R^2 0.9904 (anexo 7). Al cuantificar el contenido de este pigmento en los extractos se obtuvo un promedio de 245 mg/kg, lo que representa un 90% de las xantofilas totales (Tabla 13).

Tabla 13. Cantidades de pigmentos en el extracto

Pigmento	Contenido promedio (mg/kg)	% con respecto a xantofilas totales
Astaxantina	245	90
Cantaxantina	15.24	5.6
Zeaxantina	1.61	0.6
3S- β -criptoxantina	3.9	1.43
3R- β -criptoxantina	1.83	0.67
Total	270.8	98.3
Xantofilas totales	272.26	100

La señal característica de astaxantina en el estándar, Carophyll pink^{MR} y extractos se presentó a los 5.063 minutos (Figura 37).

La mayor parte de la astaxantina cuantificada en los extractos corresponde a la que se encuentra en estado libre por efecto de la fermentación y proceso de extracción, la mayor proporción, que aún se encuentra unida a proteínas, no puede ser medida bajo el método espectrofotométrico utilizado para conocer la cantidad de pigmentos totales. Esto coincide con lo afirmado por Zagalsky y col. (1990), los cuales mencionan que en crustáceos las proteínas de alta densidad unidas a la astaxantina

interfieren, por impedimento u obstrucción en la absorción de luz, sobre la cuantificación espectrofotométrica del pigmento. Nelis y col. (1989) estudiando la asociación astaxantina-crustacianina, observaron que el espectro de absorción de la astaxantina libre es muy distinto al espectro de absorción cuando el pigmento forma parte del complejo. Al cambio en los espectros de absorción de astaxantina por influencia de la proteína se le conoce como efecto batocrómico.

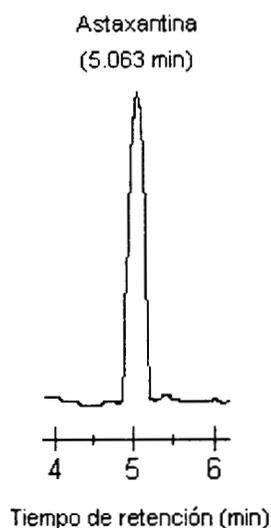


Figura 37. Cromatograma de astaxantina

Al liofilizarse los extractos se obtuvieron aproximadamente 23.8 mg de carotenoproteína por cada g de residuo de camarón fermentado, lo cual significa que para obtener un gramo del complejo se requieren 42 g de residuo o 500 mL del extracto, considerando 4.8% de pérdida por evaporación de este último. Sabiendo que hay 272.26 mg/kg de xantofilas totales en los extractos y que se necesitan 42 gramos de residuo para obtener 1 g de liofilizado, la cantidad base de pigmentos totales libres por gramo de carotenoproteína fue de alrededor de 11.43 mg.

Al haberse cuantificado por HPLC la astaxantina en los extractos (245 mg/kg), se concluyó que 1 g de carotenoproteína contiene alrededor del 1% de astaxantina libre.

7.3. Hidrólisis enzimática de carotenoproteínas

Para cada cinética de hidrólisis con los diversos tratamientos enzimáticos se llevaron a cabo un total de seis repeticiones. En esta sección, para cada cinética se indican, sobre los valores promedio letras mayúsculas que representan el agrupamiento que otorga la prueba múltiple de medias de Duncan con $\alpha=0.05$.

7.3.1. Proteasa

7.3.1.1. Hidrólisis a diversas UP

El experimento se desarrolló bajo pH 7 y temperatura de 40°C, midiendo las variables proteína soluble y xantofilas totales a los tiempos cero, 12 y 24 horas.

La razón por la cual se eligió a Savinasa^{MR} como la enzima para hidrolizar carotenoproteínas fue que en ensayos anteriores se comparó su actividad proteolítica con diversas proteasas comerciales (Armenta, 1998), resultando ser la más eficiente en la hidrólisis del complejo ($P>0.0001$).

Se eligió una temperatura de 40°C para la hidrólisis de carotenoproteína debido a que es la temperatura reportada como óptima de la enzima (Novo Nordisk, 1998), además, a esta temperatura aún no se tiene un efecto notable en la oxidación de los pigmentos. Simpson y Haard (1985) mencionan que los carotenoides tienen una mayor estabilidad a temperaturas relativamente altas (30-40°C) que a temperaturas bajas (4°C), debido a que el mecanismo de oxidación de los pigmentos carotenoides puede asociarse con el proceso oxidativo de los ácidos grasos insaturados y la oxidación enzimática de ciertos lípidos del pescado, los cuales ocurren más rápidamente a temperaturas cerca de los 0°C que a temperaturas más altas.

En la Figura 38 se observa que con 15 UP en 24 horas se logró el mayor grado de hidrólisis del complejo, en segundo término se ubicó el tratamiento con el mismo número de UP en 12 horas, y posteriormente el de 10 UP-24 horas, todos con diferencia significativa ($P>0.0001$).

También se aprecia que con 15 UP en 12 horas se alcanzó un mayor grado de hidrólisis, 31.5 mg/g más de proteína soluble, que con 5 UP en 24 horas ($P>0.0001$), y no se encontró diferencia significativa entre el tratamiento con 5 UP-24 horas y 10 UP-12 horas.

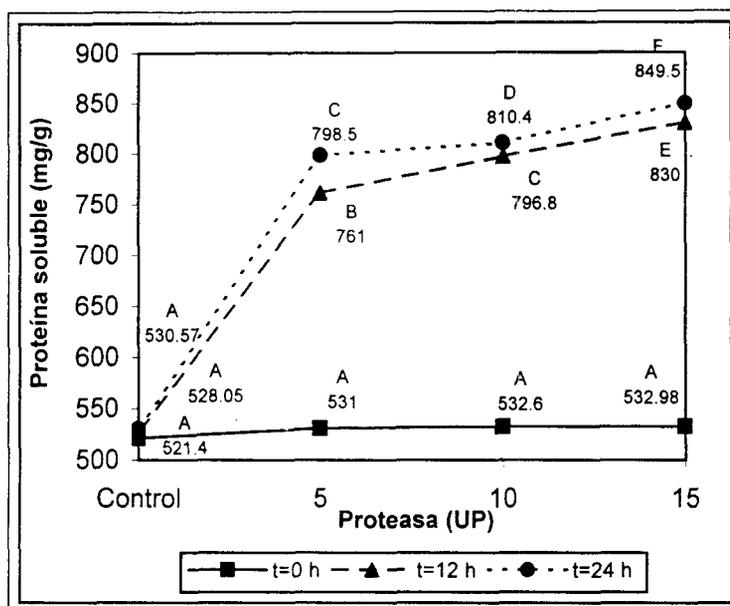


Figura 38. Proteína soluble en hidrólisis con proteasa.

Aunque en 24 horas y 15 UP todavía se logró una alta solubilización de la proteína ($P>0.0001$), la diferencia con el tratamiento de 12 horas no es muy grande lo que podría suponer una elección de 12 horas por el ahorro de tiempo en el proceso.

En cuanto a las xantofilas totales (Figura 39), el tratamiento más eficiente en la hidrólisis del complejo fue con 15 UP en 24 horas ($P>0.0001$), lo cual coincidió con el resultado obtenido cuantificando proteína soluble. Las xantofilas totales libres se incrementaron, desde 11.5 hasta 46.7 mg/g, en un 306%. Los siguientes tratamientos en orden decreciente de liberación de xantofilas totales también fueron similares a los obtenidos midiendo proteína soluble. Entre el tratamiento con 5 UP por 24 horas y con 10 UP por 12 horas no se distingue una diferencia significativa.

En resumen, puede afirmarse que con 15 UP ya sea a 12 o 24 horas se obtuvo una mayor hidrólisis de carotenoproteína.

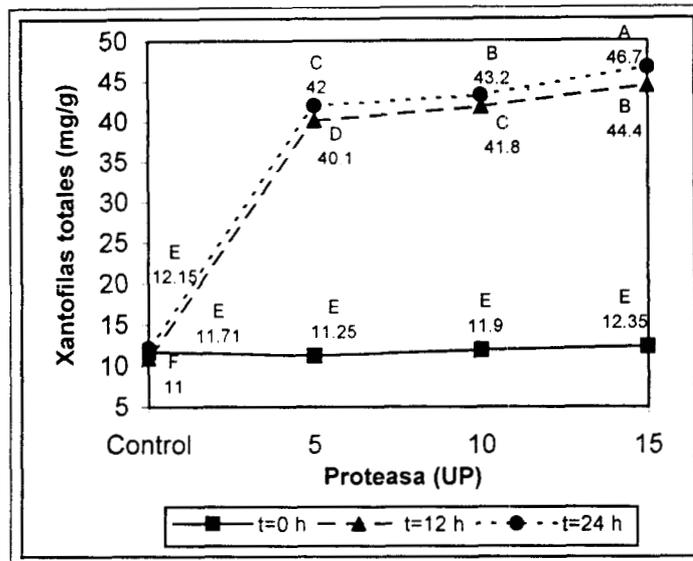


Figura 39. Xantofilas totales en hidrólisis con proteasa.

El porcentaje de proteína soluble, con respecto a un gramo de carotenoproteína, obtenido sólo con la fermentación láctica fue 53% (53 mg/g), cantidad similar al 56% reportado por Cano-López y col. (1987) en residuos de camarón usando tripsina de bacalao a pH 7.7 por 48 horas a 4°C. Esto permite suponer que durante el desarrollo del ensilado láctico se hidrolizaron parcialmente, por medio de proteasas nativas, las carotenoproteínas de los residuos de camarón.

Mediante el uso de 15 UP de proteasa comercial por 24 horas, con base en un gramo de carotenoproteína, se mejoró la recuperación de proteína en un 32%, alcanzando 85% (849.5 mg/g), porcentaje superior al 80% reportado por Simpson y Haard (1985), quienes aplicaron individualmente proteasas bacterianas y tripsina de diversas fuentes en distintos tratamientos a pH 7, 4°C por 24 horas y 50°C por 30 minutos.

El mayor grado de hidrólisis obtenido con esta enzima comercial puede deberse a lo reportado por el fabricante (Novo Nordisk, 1998), quien indica su alta capacidad en la

remoción de manchas proteicas, siendo su principal uso en detergentes biodegradables. A esto puede agregarse su funcionamiento en presencia de altas concentraciones de lípidos, compuestos bioquímicos presentes en los residuos de camarón y en la lipoproteína de alta densidad (HDL) unida al pigmento.

7.3.1.2. Comparación de hidrólisis a pH 7 y 8

Debido a que la información proporcionada por Novo Nordisk (1998) indicaba pH 8 como el óptimo para la hidrólisis con la proteasa comercial, se realizó la cinética de hidrólisis a este pH, cuantificando proteína soluble (Figura 40) y xantofilas totales (Figura 41) en tiempos de 0, 12 y 24 horas a 40°C.

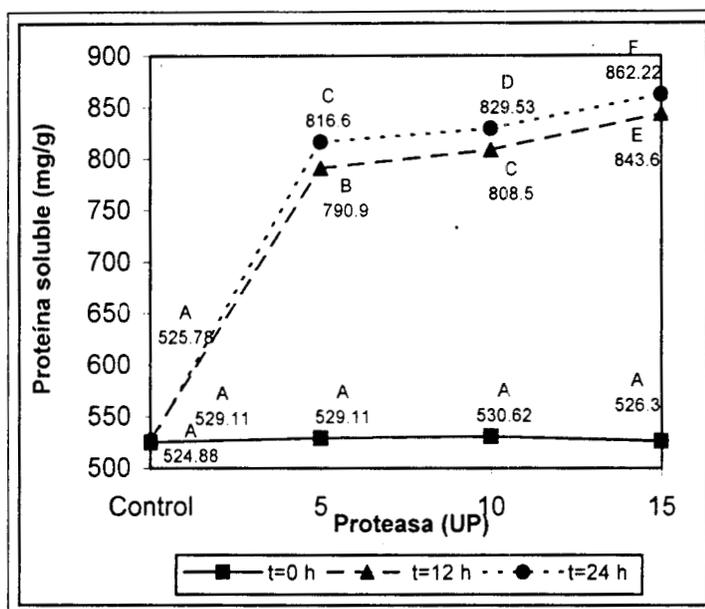


Figura 40. Proteína soluble en hidrólisis a pH 8.

Los resultados de proteína soluble y xantofilas totales revelaron que con todas las UP estudiadas se logró una mayor hidrólisis del complejo que a pH 7, siendo el tratamiento más eficiente 15 UP por 24 horas ($P > 0.0001$).

El porcentaje de proteína soluble con 15 UP, en referencia a un gramo de carotenoproteína, fue de 86.2% (862.22 mg/g), lográndose un incremento de 1.2% con respecto al conseguido a pH 7.

La cantidad máxima de pigmentos totales liberados bajo el tratamiento más eficiente, 15 UP en 24 horas, fue 48.18 mg/g lo cual representó, con respecto a los pigmentos totales en tiempo cero, un incremento del 319% en xantofilas totales libres, y 3.17% más que el rendimiento máximo a pH 7.

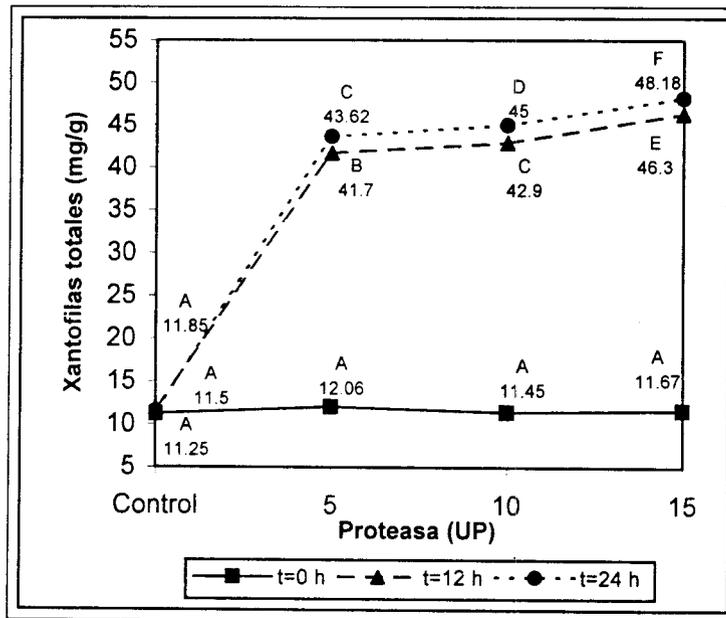


Figura 41. Xantofilas totales en hidrólisis a pH 8.

Se observó también que no hay diferencia significativa en xantofilas totales entre los tratamientos con 10 UP, pH 8 por 12 horas (42.9 mg/g) y el de 15 UP, pH 7 por 12 horas (44 mg/g).

Sobre la base de los resultados obtenidos con la proteasa comercial puede establecerse que las mejores condiciones de acción enzimática para lograr la mayor hidrólisis del complejo a 40°C son: 15 UP por 24 horas a pH 8, y el tratamiento con 15 UP por 12 horas a pH 8 ($P > 0.0001$).

7.3.2. Proteasa:lipasa

La proteína que esta unida al pigmento es una lipoproteína de alta densidad (HDL), por tal motivo se decidió emplear una lipasa en conjunción con una proteasa comercial para un posible mejoramiento en la hidrólisis del complejo, además de que

podría aumentar el rendimiento en cuanto a astaxantina libre de lípidos, ya que según Guillou y col. (1995) la mayor parte del pigmento se encuentra esterificado con ácidos grasos.

En las Figuras 42 y 43 se puede observar que los tratamientos 15:15 y 15:10 (UP:UL) lograron una mayor hidrólisis de carotenoproteína, mejorando significativamente la liberación de xantofilas totales en relación con las cantidades obtenidas bajo la acción individual de 15 UP de proteasa por 24 horas ($P>0.0001$).

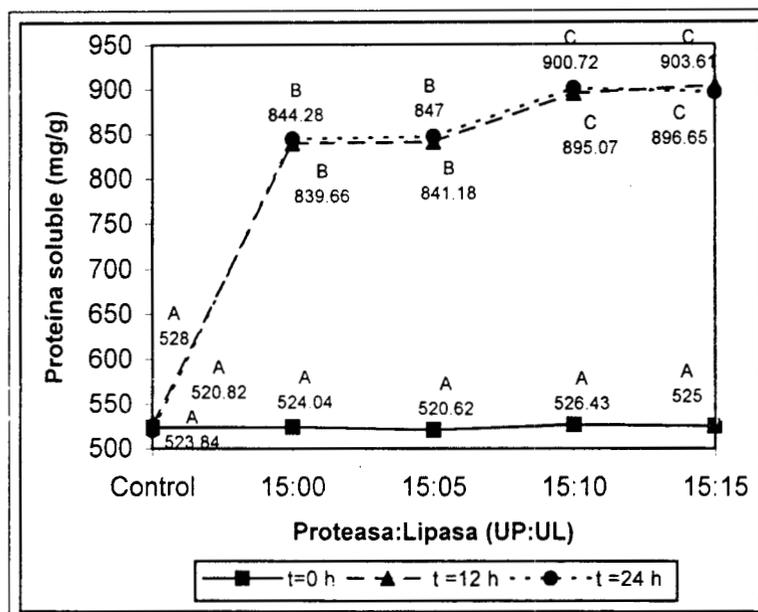


Figura 42. Proteína soluble en hidrólisis con proteasa:lipasa.

Al evaluar el efecto de la combinación de 15:05, se obtuvieron resultados similares a los alcanzados sin la adición de lipasa (15:00), sin embargo, bajo la combinación 15:10 (UP:UL) se mejoró considerablemente la hidrólisis.

Puede suponerse que no hubo diferencia notable entre los tratamientos 15:15 y 15:10 (UP:UL), por los cuales se obtuvo 90% de proteína soluble, lo que significa un aumento del 6 y 3.8% con respecto al rendimiento máximo promedio alcanzado con proteasa a pH 7 y 8, respectivamente.

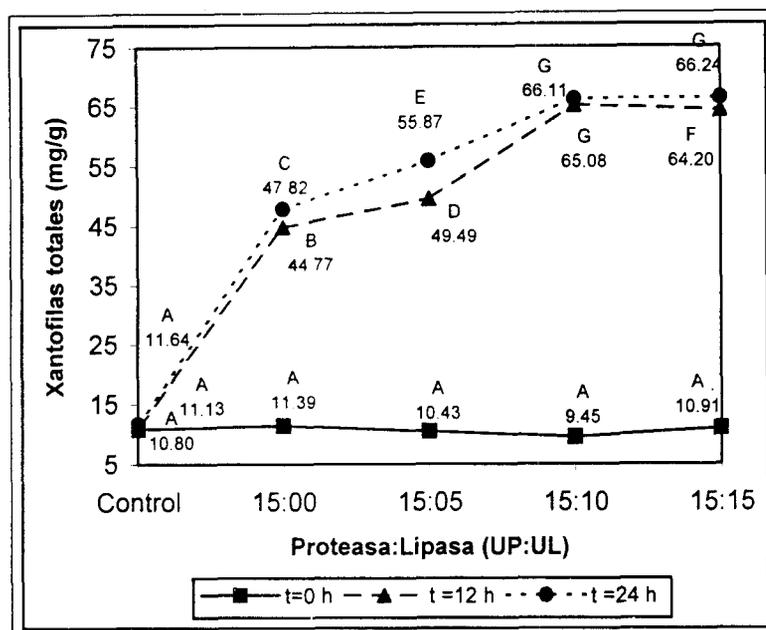


Figura 43. Xantofilas totales en hidrólisis con proteasa:lipasa.

El promedio de xantofilas totales obtenido con los tratamientos 15:10 y 15:15 (UP:UL), sin diferencia significativa, fue de 65.81 mg/g, lo cual representó un aumento del 36.6% (17.63 mg/g) en la recuperación de pigmentos con respecto al rendimiento máximo obtenido con proteasa (48.18 mg/g) y 472.2% más en relación con los 11.5 mg/g en tiempo cero.

De acuerdo a los resultados, el tratamiento proteasa:lipasa más eficiente en la hidrólisis de carotenoproteínas, a pH 8 y 40°C, fue con 15:10 (UP:UL) por 12 horas.

La lipasa comercial (Lipolase^{MR}), que se utiliza en lavandería para la remoción de grasa y aceite contenida en manchas (Novo Nordisk, 1998), solubiliza los lípidos que forman parte de la estructura de la lipoproteína, permitiendo a su vez que la proteasa pueda acceder con mayor facilidad a las subunidades de apoproteínas que contienen como grupo prostético una o dos moléculas de astaxantina por cada subunidad (Nur-E-Borhan y col., 1995; Zagalsky, 1997).

7.3.3. Celulasa

Se decidió experimentar con una celulasa comercial (Viscozyme^{MR} L) bajo la hipótesis de lograr una separación del pigmento sin hidrólisis de la fracción proteica, es decir, actuando directamente en el sitio de unión de la proteína con el pigmento evitando la formación de péptidos; esta enzima se utiliza para el rompimiento de paredes celulares en la extracción de componentes de tejidos vegetales, y su pH óptimo se encuentra entre 3.3 y 5.5 (Novo Nordisk, 1998).

En la Figura 44 puede notarse que la proteína soluble cuantificada fue prácticamente la misma bajo todas las BG a distintos tiempos, 524-534 mg/g, no habiendo diferencias significativas ($P>0.0043$) en la mayor parte de los tratamientos enzimáticos con diversas BG y tiempos.

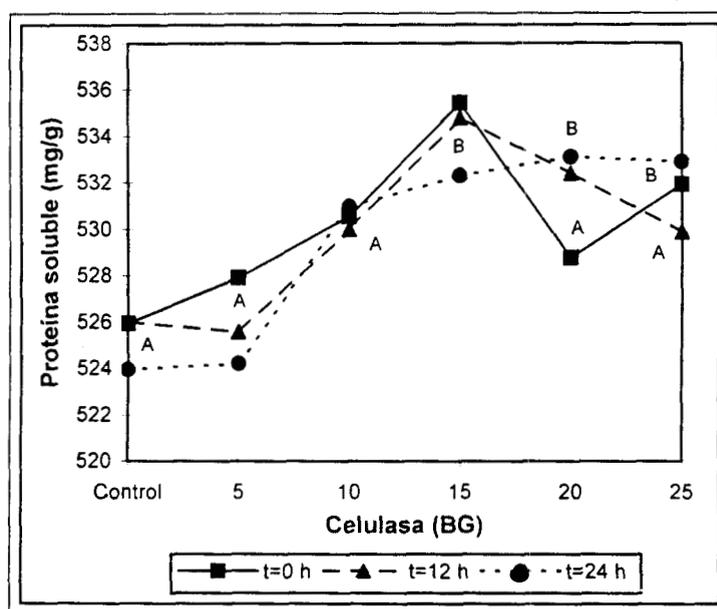


Figura 44. Proteína soluble en disociación de carotenoproteína con celulasa.

Al analizar las cantidades de xantofilas totales obtenidas (Figura 45), es posible suponer que el motivo por el cual no incrementó la proteína soluble en el sistema se debe a que el complejo fue disociado por una celulasa que posiblemente actuó en el sitio de unión del pigmento y la proteína, separando a esta última de una forma completa e impidiendo el aumento de proteína soluble en el medio.

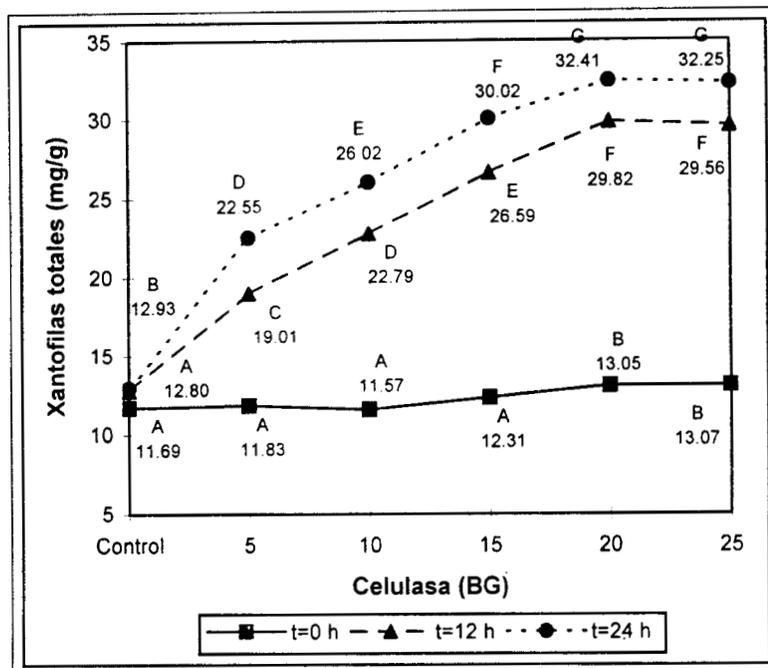


Figura 45. Xantofilas totales en disociación de carotenoproteína con celulasa.

Con 15 BG por 24 horas se alcanzaron 30.02 mg/g de xantofilas totales, que representó 161% de pigmentos liberados con relación al promedio de 11.5 mg/g del control, y 62.3 y 45.61% de la cantidad alcanzada con los tratamientos de 15 UP, pH 8 en 24 horas y 15:10 (UP:UL) por 12 horas, respectivamente. Inicialmente los primeros experimentos se realizaron con 0, 10 y 15 BG, pero al observar que hasta 15 BG había un aumento lineal en cuanto a xantofilas totales se aumentó a 20 y 25 BG en el sistema.

Los tratamientos con 20 y 25 BG por 24 horas no mostraron una diferencia significativa entre ellos, pero sí con respecto a 15 BG ($P > 0.0001$). El promedio de xantofilas de los dos últimos tratamientos en 24 horas fue de 32.33 mg/g, 7.7% más que lo alcanzado con 15 BG; los pigmentos libres aumentaron 181.1% con respecto al control, y representan el 67.1 y 49.12% de las cantidades máximas obtenidas con proteasa y la combinación proteasa:lipasa, respectivamente.

7.3.4. Celulasa:lipasa

Se observó que la mayor hidrólisis del complejo con proteasa se produjo cuando se usó conjuntamente con lipasa. Por tanto se decidió usar esta última junto con celulasa para intentar una mejor separación.

De acuerdo a los resultados mostrados en la sección 7.3.3, 20 y 25 BG fueron los tratamientos con los que se alcanzó la mayor disociación del complejo, por lo cual se fijaron 20 BG y se variaron sólo las UL del sistema de 0 hasta 20 UL en intervalos de 5 UL.

La proteína soluble, al igual que en la sección 7.3.3, no aumentó significativamente a lo largo del proceso debido a que la proteína no se hidrolizó y a que los lípidos se solubilizaron por acción de la lipasa (Figura 46).

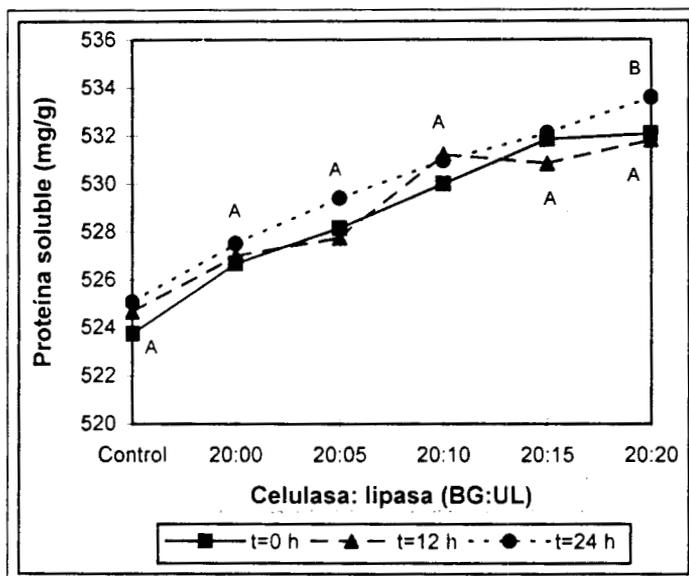


Figura 46. Proteína soluble en disociación de carotenoproteína con celulasa:lipasa.

La cantidad de xantofilas totales (Figura 47) de los tratamientos de 20:15 y 20:20 (BG:UL) 24 horas fue de 38.05 mg/g. Con respecto a los 11.5 mg/g del control, esto representa un aumento del 230.8% en la cantidad de pigmentos, 17.69% más que con el tratamiento de 20 BG por 24 horas.

La cantidad de pigmentos liberados representó el 79% de la concentración alcanzada por la acción individual de la proteasa y 57.81% de la cantidad de carotenoides obtenidos con el tratamiento de proteasa:lipasa.

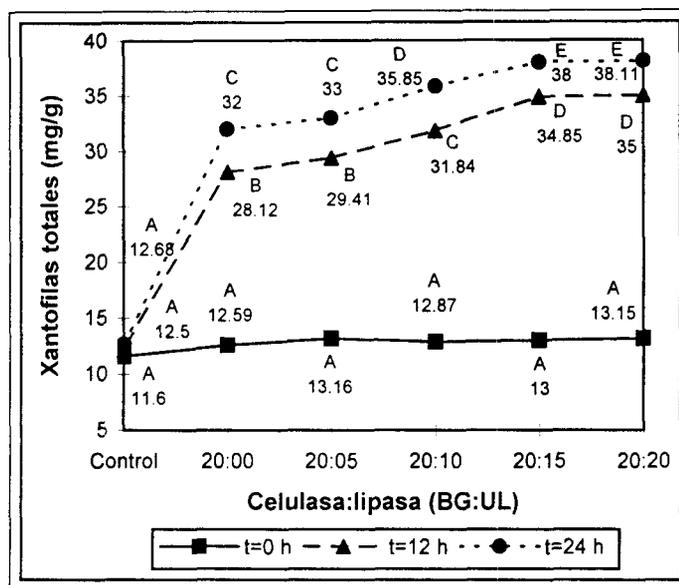


Figura 47. Xantofilas totales en disociación de carotenoproteína con celulasa:lipasa.

Sobre la base de lo anterior se puede afirmar que la máxima disociación, sin hidrólisis del complejo, se consiguió utilizando 20:15 (BG:UL) por 24 horas ($P > 0.0001$).

En general, los pigmentos liberados con los tratamientos con celulasa y celulasa:lipasa son menores que los obtenidos con los tratamientos con proteasa y proteasa:lipasa, por los cuales se alcanzaron entre 48 y 66 mg/g de pigmentos totales. Sin embargo, la importancia en el uso de celulasa y celulasa:lipasa radica en su capacidad de separación de la proteína en forma no hidrolizada, lo cual puede abrir una gama de posibles nuevos estudios acerca de la estructura y aplicación de la misma.

En la Tabla 14 se presenta un resumen de los tratamientos más eficientes en cada sistema enzimático experimentado.

Tabla 14. Características de los mejores tratamientos en cada sistema enzimático.

Sistema enzimático	Tratamiento	Xantofilas totales (mg/g)	% de mejoramiento de xantofilas totales/control	% de proteína soluble/g de carotenoproteína
Control	Control	11.5	0	53
Proteasa	15 UP, pH 7, 24 h	46.7	306	85
	15 UP, pH 8, 24 h	48.18	319	86.2
Proteasa:lipasa	15:10 (UP:UL), 12 h	65.81	472.2	90
Celulasa	20 BG, 24 h	32.33	181.1	53
Celulasa:lipasa	20:10 (BG:UL), 24 h	38.05	230.8	53

Los porcentajes de incremento de proteína soluble con respecto al control (530 mg/g) representado por el ensilado microbiano (530 mg/g), fueron de 60.28% para 15 UP, pH 7 en 24 horas; 62.68% para 15 UP, pH 8 en 24 h; y 69.81% para 15:10 (UP:UL) por 12 horas. Como en los tratamientos con celulasa no hubo proteólisis, el aumento de proteína soluble con esta enzima fue de cero.

7.4. Hidrólisis de carotenoproteínas en disolventes orgánicos

Considerando una posible disminución en la actividad enzimática por efecto de los disolventes en la conformación de la enzima, se procedió a estudiar el efecto de un tratamiento con 5 UP más que en el tratamiento con mayor eficiencia de proteasa en búfer de fosfatos. Se realizaron seis repeticiones en el sistema éter de petróleo:acetona:agua.

Los valores medios de concentraciones de proteína soluble y xantofilas totales para el sistema 15:75:10 se muestran en las Figuras 48 y 49, respectivamente.

De acuerdo a resultados presentados en la Tabla 14, empleando 15 UP, pH 8 en 24 horas, utilizando solamente proteasa se obtuvieron 862 mg/g de proteína soluble. Cuando se hidrolizó el complejo carotenoproteína bajo las mismas condiciones, en el sistema de disolventes 15:75:10, la concentración de proteína soluble fue 745.3 mg/g, lo que significó una disminución de 11.67%. Fue necesario aumentar la concentración de la enzima a 20 UP para alcanzar niveles similares de proteína soluble obtenida al actuar la proteasa en búfer de fosfatos.

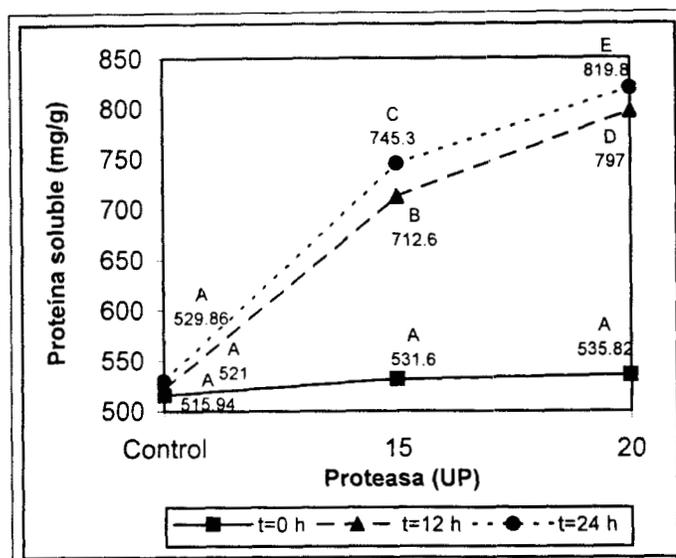


Figura 48. Proteína soluble en hidrólisis con proteasa en sistema de disolventes 15:75:10.

De esta forma, después de tratamiento con 20 UP en el sistema 15:75:10 se hidrolizó la proteína en un 82% sobre la base de un gramo de carotenoproteína, cantidad 3 y 4.2% menor que los porcentajes alcanzados con los tratamientos con proteasa y proteasa:lipasa, respectivamente.

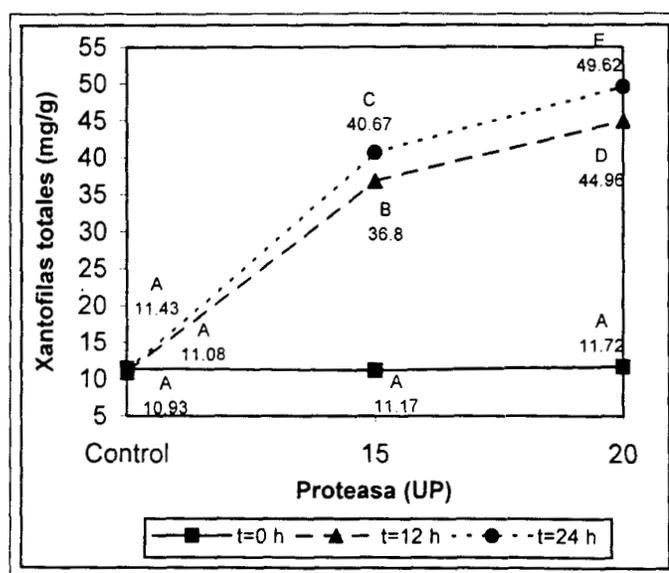


Figura 49. Xantofilas totales en hidrólisis con proteasa en sistema de disolventes 15:75:10.

En cuanto a la concentración de xantofilas totales los resultados fueron similares. Con 15 UP en el sistema de disolventes la liberación de pigmentos disminuyó

15.58% en relación con 48.18 mg/g obtenidos en búfer de fosfatos. La hidrólisis máxima (49.62 mg/g) se obtuvo con 20 UP en 24 horas, que representa 75.39% sobre la base de 65.81 mg/g obtenidos con el tratamiento enzimático más eficiente, 15:10 (UP:UL), 12 horas, en búfer de fosfatos.

En las Figuras 50 y 51 se muestran las concentraciones de proteína soluble y xantofilas totales, respectivamente, obtenidos utilizando el sistema de disolventes en una proporción 15:65:20. Las proporciones se modificaron a 10% menos de acetona y 10% más de agua bajo la suposición de que podría mejorarse la actividad de proteasa al disminuir la cantidad de acetona en el medio.

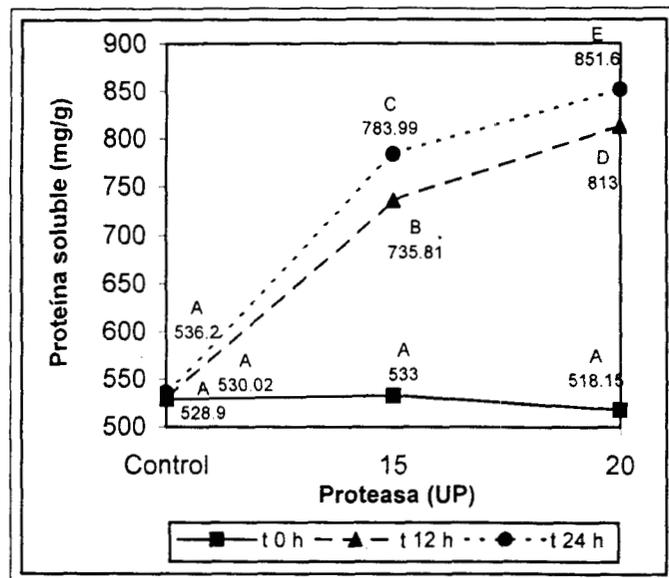


Figura 50. Proteína soluble en hidrólisis con proteasa en sistema de disolventes 15:65:20.

En este sistema, la concentración de proteína soluble alcanzada con 20 PU en 24 horas aumentó 3.1% con respecto a la cantidad alcanzada con la misma cantidad de enzima en el sistema 15:75:10 ($P > 0.0001$).

En las dos proporciones la máxima hidrólisis de carotenoproteína se obtuvo al emplear 20 UP por 24 horas; los disolventes en proporción 15:65:20 representaron un mejor ambiente para proteasa ya que en el se logró la mayor liberación de xantofilas totales y recuperación de proteína.

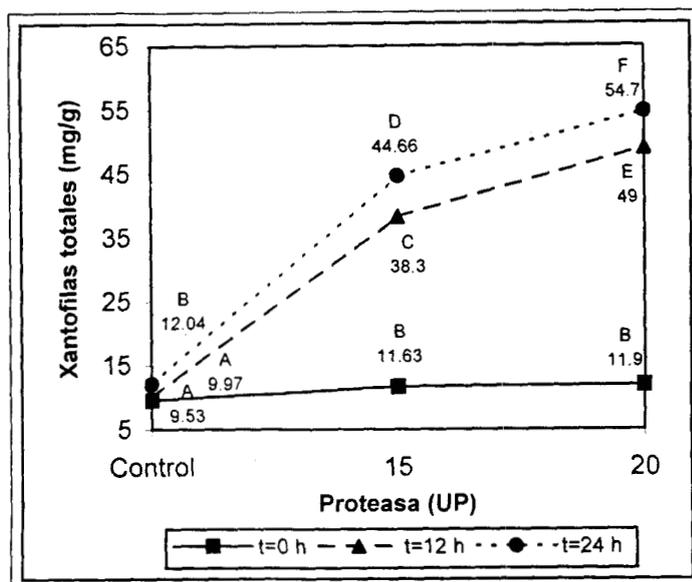


Figura 51. Xantofilas totales en hidrólisis con proteasa en sistema de disolventes 15:65:20.

La Tabla 15 resume los resultados obtenidos con 15 y 20 UP en los dos sistemas de disolventes, comparándolos con las cantidades máximas alcanzadas con los tratamientos enzimáticos más eficientes de proteasa y proteasa:lipasa en búfer de fosfatos.

Tabla 15. Hidrólisis con proteasa en distintas proporciones de disolventes.

Proporción de disolventes	Tratamiento enzimático	Xantofilas totales (mg/g)	% de 48.18 ¹	% de 65.81 ²	% de proteína soluble/g	% de mejoramiento con respecto a 530 ³
15:75:10	15 UP, 24 h	40.67 ^a	84.4	61.8	74.5 ^a	40.5
	20 UP, 24 h	49.62 ^c	102.1	75.4	82 ^c	54.7
15:65:20	15 UP, 24 h	44.66 ^b	92.7	67.8	78.4 ^b	48
	20 UP, 24 h	54.7 ^d	113.5	83.1	85.1 ^d	60.5

¹mg/g de xantofilas totales obtenidas con 15 UP a pH 8 por 24 horas en búfer de fosfatos;

²mg/g xantofilas totales obtenidas con 15:10 (UP:UL) por 12 horas en búfer de fosfatos;

³mg/g de proteína soluble en carotenoproteína extraída de residuos de camarón fermentados.

Las medias con el mismo superíndice no son significativamente diferentes.

La actividad enzimática de proteasa se vio afectada por el ambiente de disolventes orgánicos, lo cual según Matsumoto y col. (2001) se debe a un cambio en la conformación de la enzima por efecto de los disolventes. Sin embargo, los niveles de pigmentos libres, especialmente con 20 UP durante 24 horas, fueron mayores que las cantidades obtenidas en búfer de fosfatos.

Estos resultados de hidrólisis en disolventes orgánicos pueden atribuirse a dos factores: el primero, que mencionan Matsumoto y col. (2001), se refiere a un cambio de polaridad en la capa de hidratación que rodea a la enzima, la cual adquiere características hidrofóbicas facilitando la velocidad de distribución de sustratos no polares hacia la capa hidratada. Por otra parte, Shahidi y Brown (1998) mencionan que la proteína unida al pigmento es no polar, siendo su unión con carotenoides lo que le confiere la capacidad para disolverse en sistemas acuosos, esta naturaleza no polar de la fracción proteica de la carotenoproteína puede aumentar cuando el complejo se encuentra en disolventes orgánicos y, por consecuencia, incrementar la interacción del sustrato (carotenoproteínas) con la proteasa utilizada para llevar a cabo la hidrólisis.

Matsumoto y col. (2001) concluyen que en disolventes orgánicos la estructura de la enzima es rígida debido al aumento en la interacción hidrofóbica que provoca un cambio conformacional favoreciendo la interacción del sitio activo con el sustrato.

El segundo factor que puede explicar la hidrólisis en un sistema de disolventes son las características de la proteasa comercial utilizada (Savinasa^{MR}), que de acuerdo con el fabricante (Novo Nordisk, 1998) puede tener una alta actividad aún en condiciones no favorables de pH, temperatura y composición acuosa, lo que la hace adecuada para su uso en la formulación de detergentes biodegradables.

7.5. Obtención de astaxantina en un bioreactor enzimático de membrana

Según la clasificación realizada por Prazeres y Cabral (1994), el BEM utilizado en todos los ensayos referidos en esta tesis corresponde a un bioreactor de recirculación dentro del grupo de los BEM de contacto directo.

7.5.1. Flux de permeado

7.5.1.1. Ultrafiltración

Para el proceso de UF se estandarizó el BEM; la membrana utilizada tenía un PMN de 10 kDa. La linealidad del flux de permeado (J) del agua con respecto a diversas

presiones de operación se muestra en la Figura 52, lo que constata que la membrana no tuvo algún daño mecánico o defecto de fabricación. En este caso la membrana seleccionada presentó el patrón típico de linealidad del flujo a distintas presiones, lo que permitió continuar con el procedimiento para conocer el PMC de la membrana.

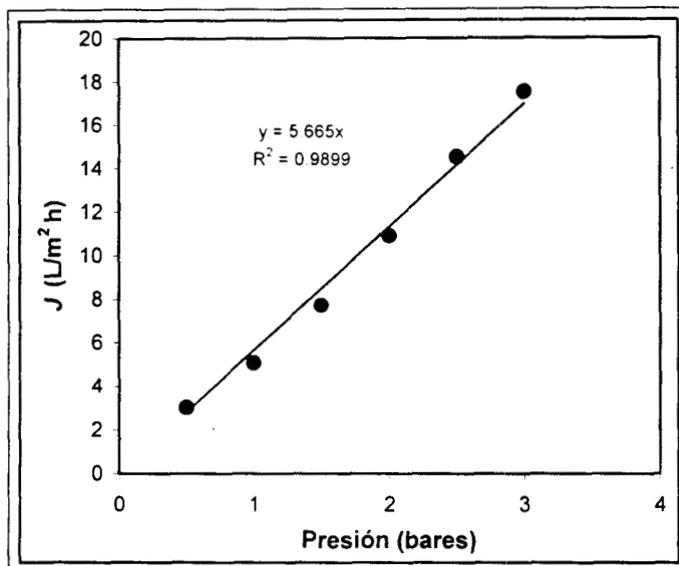


Figura 52. Estandarización del flux de permeado en UF.

7.5.1.2. Ósmosis inversa

Para el proceso de OI se utilizó una membrana con un PMN de 1000 Da en el BEM; flux del agua a diversas presiones se muestra en la Figura 53.

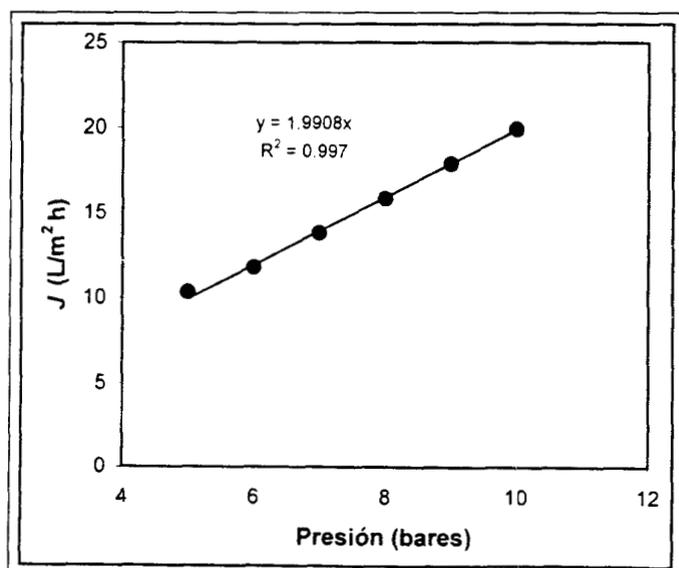


Figura 53. Estandarización del flux de permeado en OI.

Con esta membrana se obtuvo una cinética lineal del flujo de permeado, lo que permitió proseguir con la determinación del PMC.

7.5.2. Peso molecular de corte

7.5.2.1. Ultrafiltración

Para la determinación del PMC fue necesario conocer los valores f y $\text{Log}(f/1-f)$ (Tabla 16), los cuales se obtuvieron sobre la base del COT en mg/L cuantificado en muestras recolectadas en el retenido y permeado de soluciones con 600 mg/L de PEG de distintos pesos moleculares.

Tabla 16. Valores f y $\text{Log}(f/1-f)$ para distintos pesos moleculares de PEG en UF.

Peso molecular del PEG (kDa)	$f=(\text{COT}_{\text{alimentación}}-\text{COT}_{\text{permeado}})/\text{COT}_{\text{alimentación}}$	$\text{Log}(f/1-f)$	% de retención ($f \cdot 100$)
4	0.5308	0.0536	53
6	0.6800	0.3273	68
10	0.9411	1.2036	94.1
20	0.9932	2.1645	99.3

El PMC de la membrana de 10 kDa se estimó al graficar PM vs. $\text{Log}(f/1-f)$ en el punto de intersección donde el valor de $\text{Log}(f/1-f)=1$ (Figura 54).

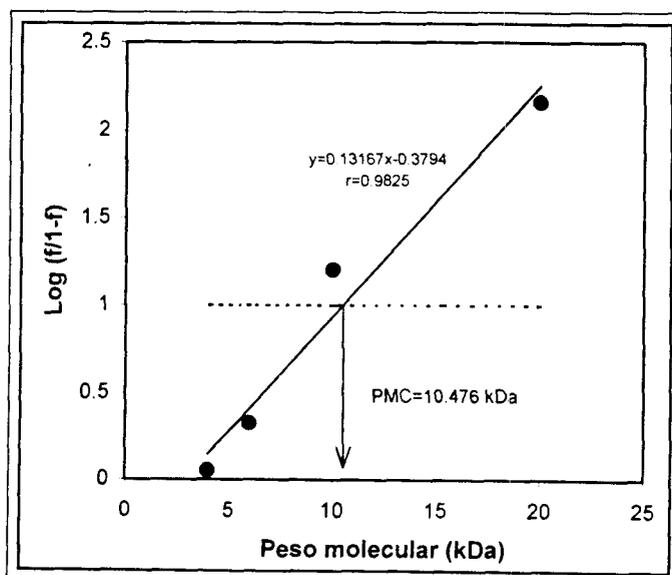


Figura 54. Estimación del PMC de la membrana de 10 kDa.

El PMC fue 10.476 kDa, lo cual representó una corrección del +4.76% o +0.476 kDa sobre el valor original del PMN (10 kDa).

7.5.2.2. Ósmosis inversa

Dado que el PMN de la membrana fue de 1000 Da, se utilizaron soluciones de PEG con pesos moleculares menores que los empleados en UF, además de rafinosa y sacarosa. Los resultados se indican en la Tabla 17.

Tabla 17. Valores de f y $\text{Log}(f/1-f)$ para distintos pesos moleculares de PEG en OI.

Compuesto	Peso molecular (Da)	f	$\text{Log}(f/1-f)$	% de retención ($f \times 100$)
Sacarosa	342.3	0.282	-0.4058	28.2
Rafinosa	594.52	0.5385	0.0670	53.8
PEG	600	0.5617	0.1077	56.1
PEG	1000	0.9862	1.8540	98.6

El PMC de la membrana fue de 792.94 Da, por lo que se hizo una corrección de -20.7% o 207 Da por abajo del valor del PMN de 1000 Da (Figura 55).

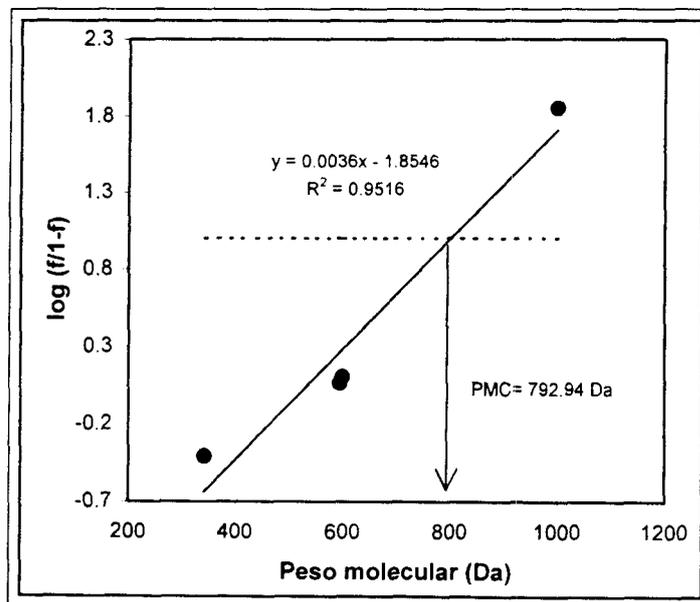


Figura 55. Estimación del PMC de la membrana de 1000 Da.

Los porcentajes de retención ($f \star 100$) de las soluciones con 2000 mg/L de electrolito fueron 67% para NaCl y 94% para Na₂SO₄. Al tener el sulfato de sodio una menor entalpía de hidratación (-1955 kJ/mol) que el cloruro de sodio (-779 kJ/mol), el Na₂SO₄ tiene mayor capacidad de hidratación, formándose un mayor número de capas de moléculas de agua alrededor de los iones, las cuales obstaculizan su paso a través de una membrana con peso PMC bajo (793 Da) (Rautenbach y Albrecht, 1989).

7.5.3. Hidrólisis de carotenoproteína en BEM

7.5.3.1. Sistema modelo de referencia

Se llevó a cabo una cinética de hidrólisis en tubos de ensaye bajo las condiciones más eficientes del sistema modelo con proteasa (15 UP, pH 8 por 24 horas), cuantificando la concentración de proteína soluble y xantofilas totales cada 60 minutos.

Los resultados de tres repeticiones de este proceso enzimático se muestran en las Figuras 56 y 57.

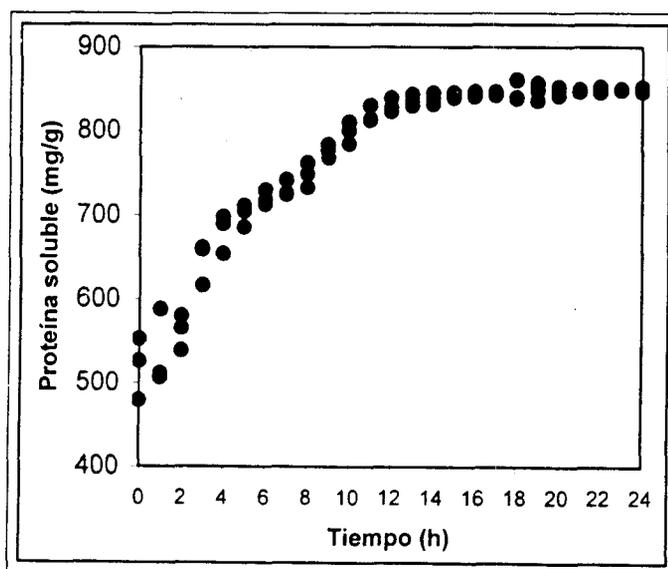


Figura 56. Proteína soluble en hidrólisis en sistema modelo.

Sobre la base del comportamiento de las dos variables, se observó que el período de mayor hidrólisis fue entre 2 y 14 horas, alcanzándose velocidades de hidrólisis de

23.12 mg/g h de proteína soluble y 2.6 mg/g h de pigmentos totales. Después de 16 horas de tratamiento el aumento fue menor, 0.69 mg/g h y 0.06 mg/g h de proteína soluble y xantofilas totales, respectivamente.

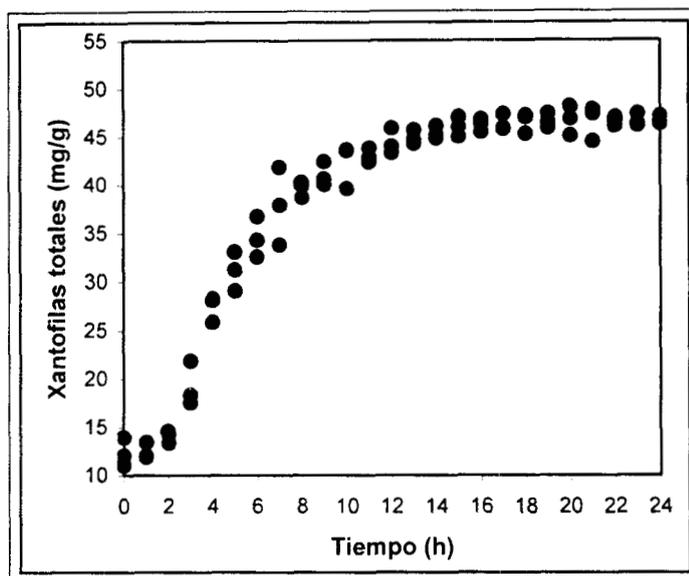


Figura 57. Xantofilas totales en hidrólisis en sistema modelo.

Transcurridas 16 horas la pendiente de hidrólisis fue cercana a cero, por lo cual se decidió llevar a cabo la hidrólisis en BEM entre 0 y 16 horas. Durante este tiempo se obtuvo un promedio de 844 mg/g (84.4%) de proteína soluble y 46.2 mg/g de xantofilas totales, cantidades similares a los 862 mg/g de proteína soluble y 48.18 mg/g de xantofilas totales obtenidos cuando se cuantificaron estas variables a 0, 12 y 24 horas (sección 7.3.1.2).

7.5.3.2. Hidrólisis de carotenoproteína con 15 UP

Se llevaron a cabo seis repeticiones del proceso enzimático empleando 15 UP, los valores fueron graficados en mg/g de carotenoproteína.

La Figura 58 muestra los resultados de proteína soluble en el retenido producida a una velocidad de 25.58 mg/g h; la mayor producción se presentó entre 3 y 13 horas, sin embargo, la hidrólisis continuó posteriormente a 6.73 mg/g h ($P > 0.0001$). El

porcentaje de hidrólisis respecto a un gramo de carotenoproteína a las 16 horas fue del 76%, 8.4% por debajo de lo obtenido con el sistema modelo (sección 7.5.3.1).

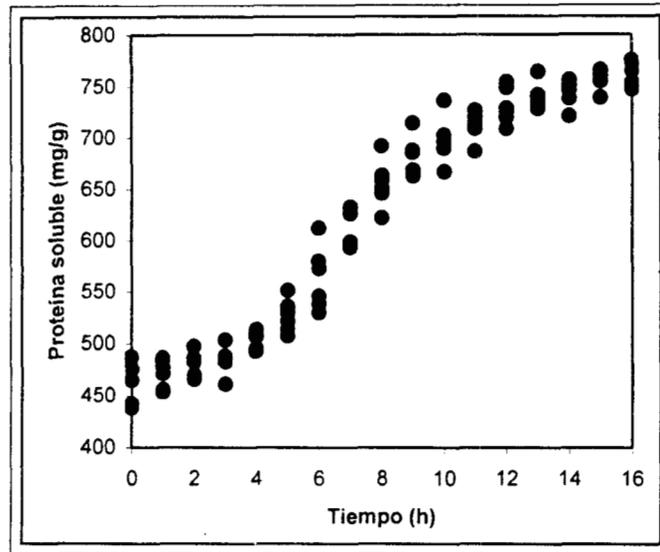


Figura 58. Proteína soluble en retenido del hidrolizado (hidrólisis con 15 UP).

Al finalizar el tiempo de estudio de 16 horas el promedio de proteína soluble en el permeado fue menor a 18 mg/g (<1.8%) (Figura 59), lo que significó que la mayor parte de la fracción proteica, 98.2% sobre la base de un gramo de carotenoproteína, se recuperó en el retenido al no atravesar la membrana de 10.5 kDa.

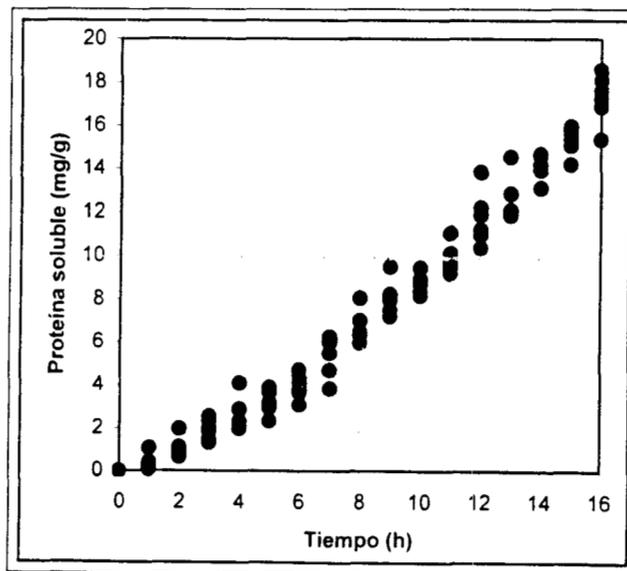


Figura 59. Proteína soluble en permeado del hidrolizado (hidrólisis con 15 UP).

En cuanto a las xantofilas totales en el retenido (Figura 60), su concentración disminuyó de 11.5 mg/g (cantidad base en un gramo de carotenoproteína) hasta una media de 4.6 mg/g, por lo que se puede concluir que conforme se desarrolló la hidrólisis enzimática en el BEM los pigmentos liberados no permanecieron en el retenido, atravesando la membrana de UF dado que su peso molecular, alrededor de 570 Da, es inferior al PMC de la membrana. Cabe señalar que la cantidad de pigmentos cuantificada al término del experimento fue muy pequeña considerando que el volumen de concentración final promedio fue de 61.2 mL, 12.24% del volumen inicial (500 mL).

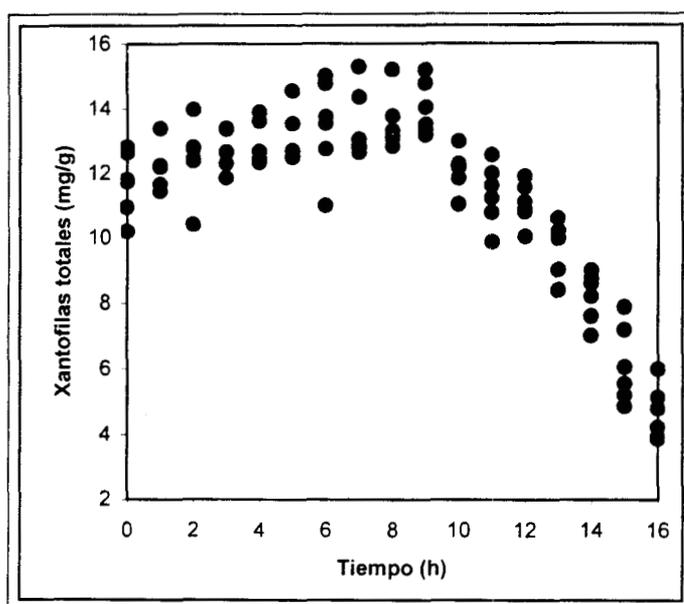


Figura 60. Xantofilas totales en retenido (hidrólisis con 15 UP).

En la Figura 61 se muestran las concentraciones de xantofilas totales en el permeado, el período con mayor velocidad de recuperación (3.11 mg/g h), al igual que proteína soluble, se presentó entre las 3 y 13 horas, después de este tiempo la liberación de pigmentos fue de 1.44 mg/g h ($P > 0.0001$). Culminadas las 16 horas del proceso se cuantificó una media de 36.55 mg/g de pigmentos, 20.89% por debajo de 46.2 mg/g liberados después de 16 horas en el sistema modelo (sección 7.5.3.1).

Al mostrar los resultados un nivel alto de hidrólisis entre las 13 y 16 horas, sin una fase estacionaria en la liberación de proteína soluble en el retenido y xantofilas totales en el permeado, se decidió aumentar la concentración de la enzima a 20 UP.

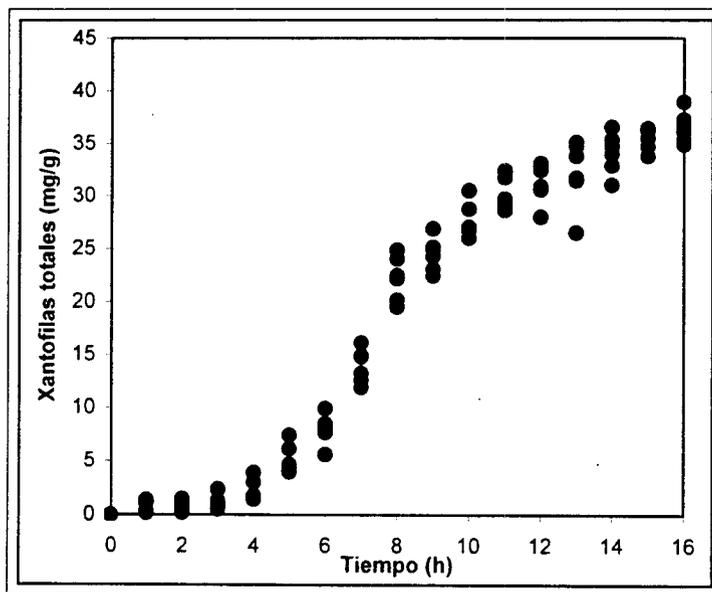


Figura 61. Xantofilas totales en permeado (hidrólisis con 15 UP).

7.5.3.3. Hidrólisis de carotenoproteína con 20 UP

La hidrólisis en BEM con 20 UP se llevó a cabo con seis repeticiones; todos los valores se graficaron en las Figuras correspondientes.

La proteína soluble en el retenido (Figura 62), mostró cuatro etapas claramente definidas, donde la mayor pendiente o velocidad de producción fue de 26.64 mg/g h entre 3 y 9 horas. La etapa inicial de 0 a 3 horas tuvo una velocidad de hidrólisis de 9.5 mg/g h, 15 mg/g h en la semiestabilización entre 9 y 14 horas, y en la parte estacionaria (14 a 16 horas) una velocidad de 7.24 mg/g h.

Sobre la base de un gramo de carotenoproteína, el promedio del porcentaje de hidrólisis fue 78.8%, lo que significó un aumento de 2.8% con respecto al obtenido con 15 UP, y 5.6% por debajo de los 844 mg/g alcanzados en el sistema modelo.

Al ser el método más eficiente (con 20 UP), se determinaron las ecuaciones para cada etapa de proteína soluble en el retenido y xantofilas totales en el permeado. Los coeficientes de regresión y coeficientes de determinación (R^2) se indican en la Tabla 18.

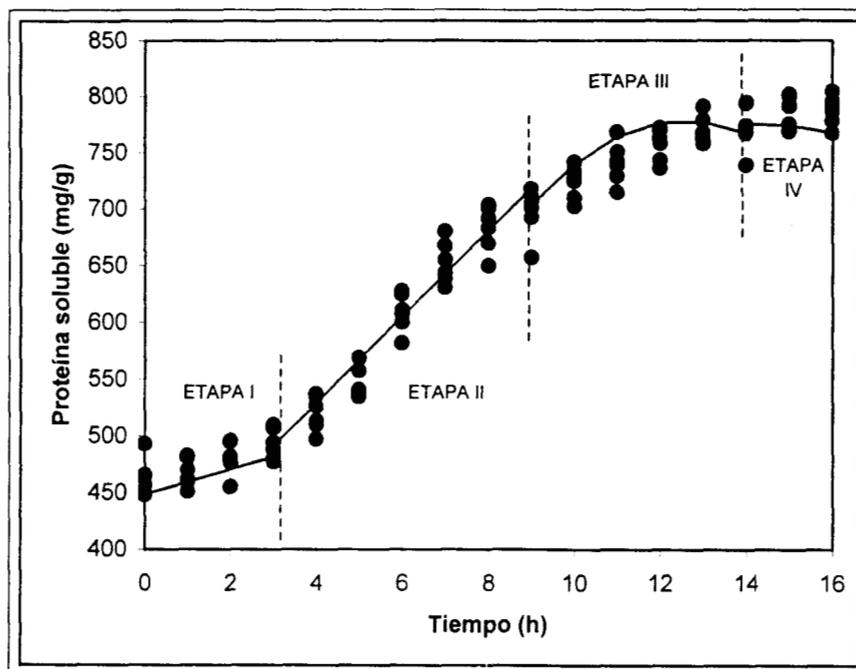


Figura 62. Proteína soluble en retenido (hidrólisis con 20 UP).

La concentración de proteína soluble en el permeado fue menor a 20 mg/g, esto porque la mayor parte se retuvo por la membrana (Figura 63).

Tabla 18. Análisis de regresión de proteína soluble en retenido y xantofilas totales en permeado.

Etapa	Proteína soluble				Xantofilas totales			
	β_0	β_1	β_2	R^2	β_0	β_1	β_2	R^2
I	448.4	$11.67x_1$		0.9988	0.086	$1.209x_1$		0.996
II	377.11	$38.019x_1$		0.9914	5.5526	$3.9x_1$		0.997
III	150.3	$147.71x_1$	$-5.8718x_2$	0.9821	16.369	$6.9648x_1$	$-0.218x_2$	0.9762
IV	263.87	$72.035x_1$	$-2.535x_2$	0.9945	10.01	$6.475x_1$	$-0.215x_2$	0.9931

Las xantofilas en el retenido (Figura 64) disminuyeron desde una concentración inicial de 11.5 mg/g hasta 2.7 mg/g, permanecieron por debajo de 14 mg/g en el retenido durante toda la hidrólisis ya que los pigmentos atravesaron la membrana conforme eran liberados por la acción enzimática.

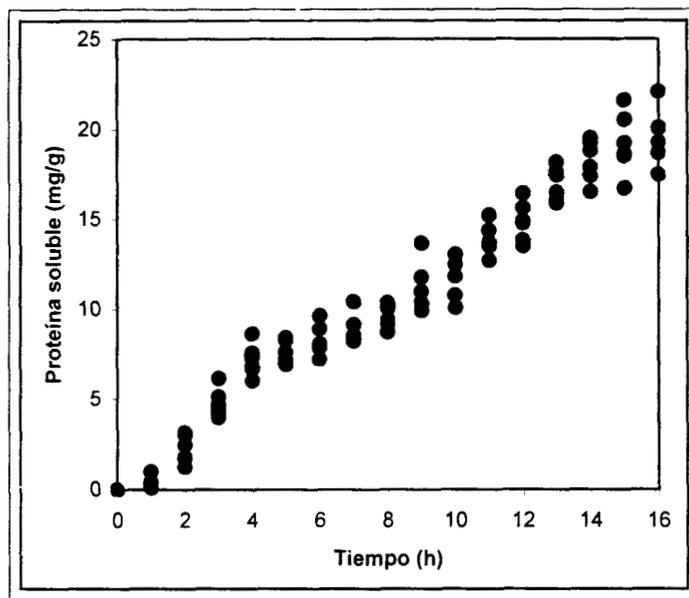


Figura 63. Proteína soluble en permeado (hidrólisis con 20 UP).

La recuperación de pigmentos en el permeado (Figura 65) después de 14 horas de tratamiento no mostró diferencia significativa ($P > 0.0001$), obteniendo una media de 38.1 mg/g, lo cual representó 82.46% de la cantidad recuperada en el sistema modelo (46.2 mg/g), un aumento de 3.46% con respecto a lo obtenido con 15 UP. Es de hacer notar que con 20 UP el tiempo de proceso se redujo de 16 a 14 horas.

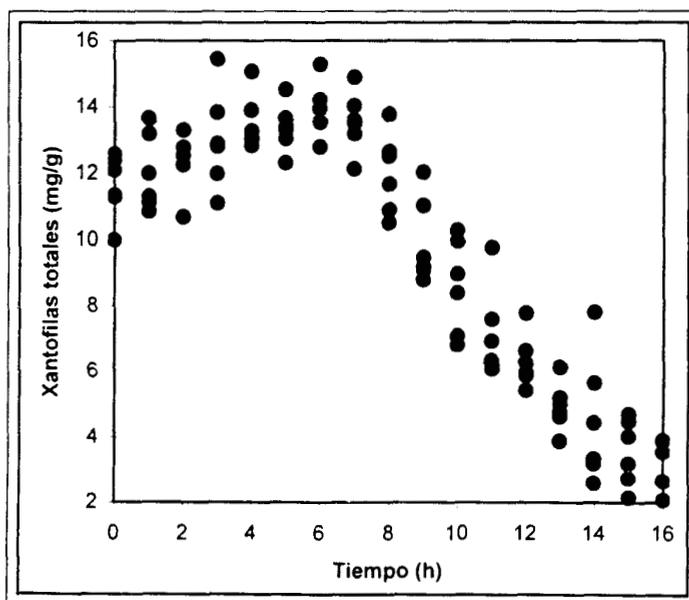


Figura 64. Xantofilas totales en retenido (hidrólisis con 20 UP).

La cinética de recuperación de pigmentos, al igual que de proteína soluble, se dividió en cuatro etapas con distintas velocidades: iniciación con 1.22 mg/g h entre 0 y 3 horas; máxima liberación con 3.9 mg/g h entre 3 y 9 horas; semiestabilización con 2.12 mg/g h entre 9 y 14 horas; y de 14 a 16 horas con 0.32 mg/g h en la etapa estable.

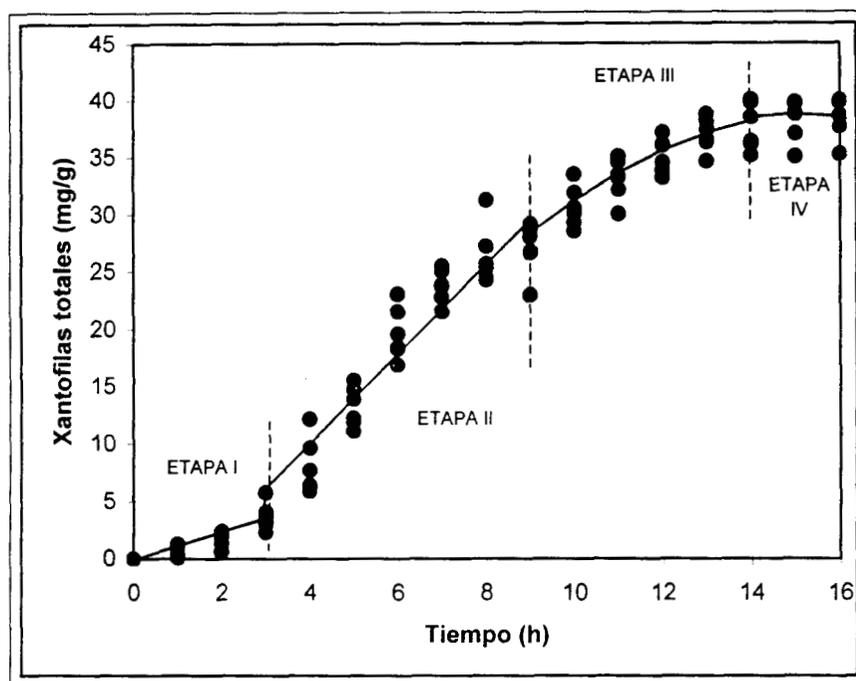


Figura 65. Xantofilas totales en permeado (hidrólisis con 20 UP).

En la Tabla 19 se muestra un resumen de las condiciones en que se obtuvo la máxima hidrólisis en BEM comparándolos con los obtenidos en el sistema modelo.

Tabla 19. Resultados de hidrólisis con proteasa en BEM.

Lugar de hidrólisis	Tratamiento enzimático	Xantofilas totales (mg/g)	% de 46.2 ¹	% de proteína soluble/g	% de mejoramiento con respecto a 530 ²
Sistema modelo	15 UP, 16 h	46.2 ^c	100	84.4 ^c	59.2
BEM	15 UP, 16 h	36.5 ^a	79.1	76 ^a	43.4
	20 UP, 14 h	38.1 ^b	82.4	78.8 ^b	48.6

¹mg/g de xantofilas totales obtenidas con el sistema modelo (sección 7.5.3.1);

²mg/g de proteína soluble en carotenoproteína extraída de residuos de camarón fermentados.

Las medias con el mismo superíndice no son significativamente diferentes.

Las concentraciones de xantofilas totales obtenidas en BEM, en comparación con el tratamiento modelo más eficiente en la hidrólisis del complejo (15:10 UP:UL proteasa:lipasa por 12 horas), fueron 55.46% con 15 UP por 16 horas, y 57.9% obtenida con 20 UP por 14 horas.

Para conocer la eficiencia de la membrana en la retención de los pigmentos y proteína se determinaron los valores de selectividad (R) (p. 71) para cada uno de los componentes de la solución, siendo del 0% para los carotenoides, lo que indica que estos compuestos atravesaron sin resistencia a la membrana. En cuanto a la proteína, la R fue de 96.6%, lo cual se entiende como una alta resistencia de la membrana al paso de la fracción proteica, concentrándola en el retenido.

El factor de separación ($\alpha_{\text{pigmento/proteína}}$) (p. 72), utilizado para mezclas de dos componentes, fue de 97.55, valor que al ser muy superior a la unidad indica una alta separación de los compuestos.

7.5.3.4. Cinéticas de hidrólisis, factor de concentración y flux a varias presiones

La presión de operación del BEM en las hidrólisis con 15 y 20 UP fue de 2 bares. Fue necesario analizar el comportamiento del flux de permeado con respecto al tiempo para conocer si era estable a lo largo del proceso. Entre más cercano a cero sea el valor del flux significa la polarización de la concentración ocasionada por la formación de gradientes de concentración de los solutos en la proximidad de la membrana (Tutunjian, 1985), o provocado por la afectación de la porosidad de la membrana por la interacción con algunos solutos, fenómeno conocido como incrustación de la membrana (Tejeda y col., 1995). La Figura 66 muestra el comportamiento de este parámetro en el transcurso de 16 horas en el proceso de separación en BEM a dos bares de presión (datos en triplicado).

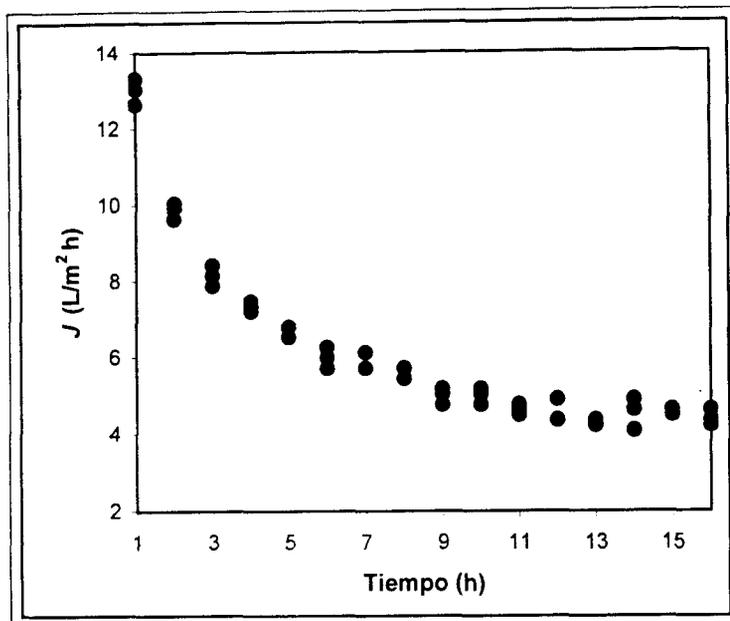


Figura 66. Flux de permeado a 2 bares.

El promedio del flux de permeado medido en la primera hora fue de 13 L/m² h, al final del proceso de separación a las 16 horas el flux disminuyó hasta 4.4 L/m² h; el flux se mantuvo constante a partir de las 11 horas. La reducción, por tanto fue de 66.1%, el 33.9% restante fue aún un alto porcentaje considerando que sólo se mantuvo durante las cinco últimas horas del proceso. El factor de concentración volumétrico (FC) medido a cada flux de permeado se muestra en la Figura 67 (datos por triplicado).

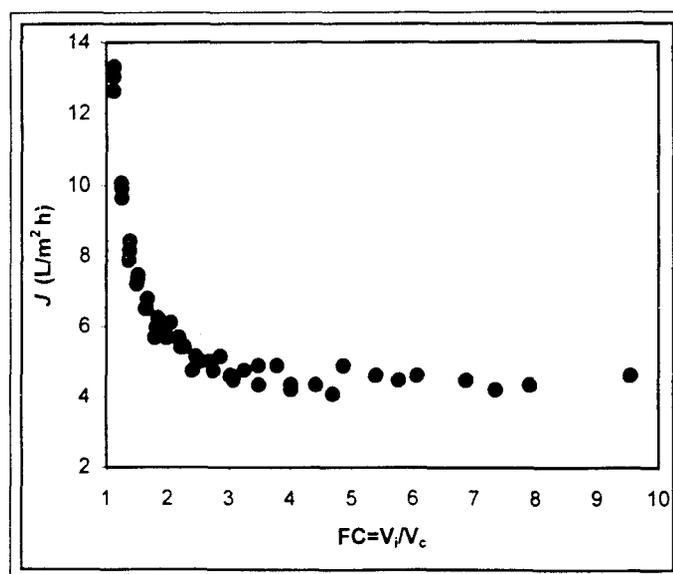


Figura 67. FC volumétrico a 2 bares.

Conforme transcurrió el tiempo del proceso de separación por UF, el flux de permeado disminuyó hasta estabilizarse mientras que el FC aumentó. A las 16 horas se alcanzó un FC medio de 8.27, lo que significó que la fracción proteica en el retenido se concentró volumétricamente 8.27 veces con respecto a su valor original ($FC = V_{inicial} / V_{concentración}$).

Como se mencionó anteriormente, el flux de permeado se estabilizó en un valor promedio de $4.4 \text{ L/m}^2 \text{ h}$, obtenido a partir de $FC \geq 4.3$, valores medidos a partir de 11 horas de proceso.

La Figura 68 (seis repeticiones del proceso) muestra el comportamiento de la concentración de proteína soluble en el retenido.

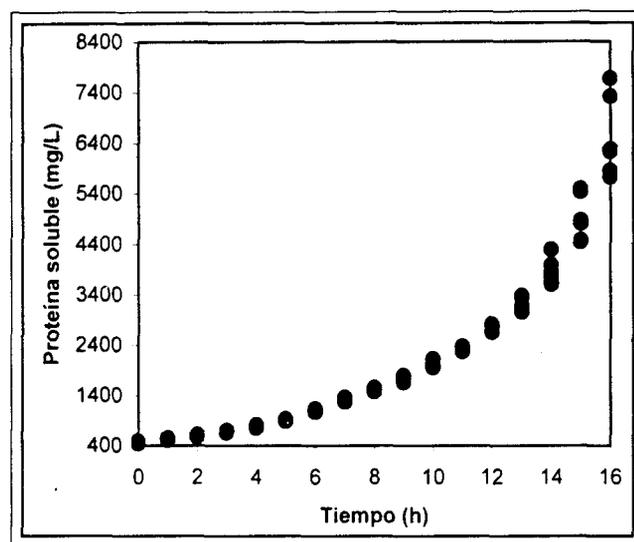


Figura 68. Proteína soluble concentrada por UF.

El efecto de la presión en la hidrólisis en BEM se estudió a tres niveles: 1.5, 2, 2.5 y 3 bares, en un período de 3 a 11 horas que incluyó a la etapa de máxima liberación de proteína soluble y pigmentos a dos bares (3-9 horas). Esto permitió observar el posible incremento en la separación de los componentes, factor de concentración y flux de permeado respecto al aumento de la fuerza impulsora. La Figura 69 y 70 muestran por triplicado los valores de proteína soluble en el retenido y xantofilas totales en el permeado, respectivamente.

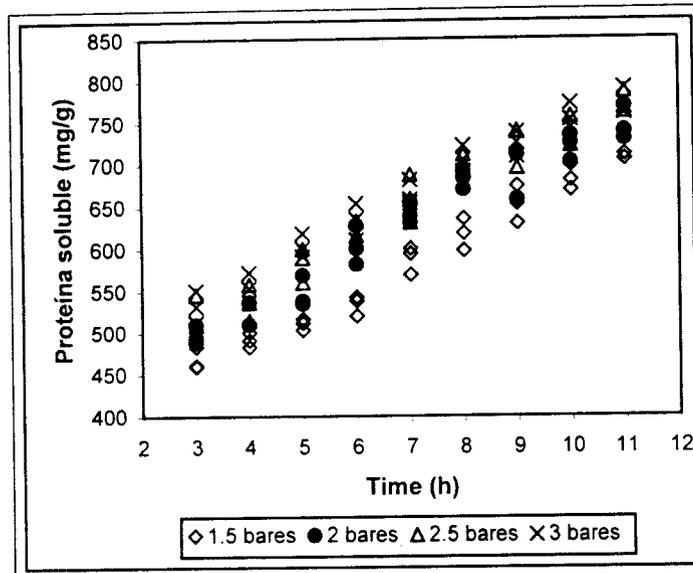


Figura 69. Proteína soluble en hidrólisis a cuatro presiones.

Las cinéticas de liberación de proteína soluble y xantofilas totales de 3 a 11 horas no presentaron diferencia significativa entre las velocidades de hidrólisis con respecto a las presiones. La velocidad de liberación fue de 31 mg/g h para proteína soluble y 3.5 mg/g h para xantofilas totales.

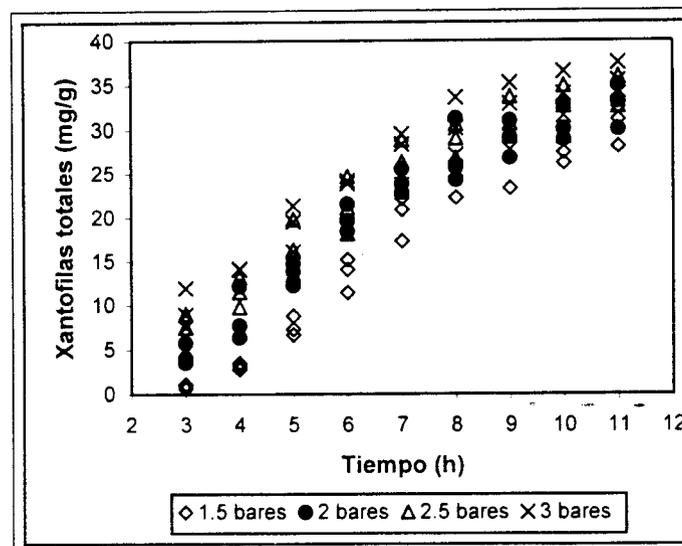


Figura 70. Xantofilas totales en hidrólisis a cuatro presiones.

Sin embargo, si se observó una diferencia significativa ($P > 0.0001$) entre las presiones con respecto a la cantidad de proteína y pigmentos liberados al final del proceso (Tabla 20).

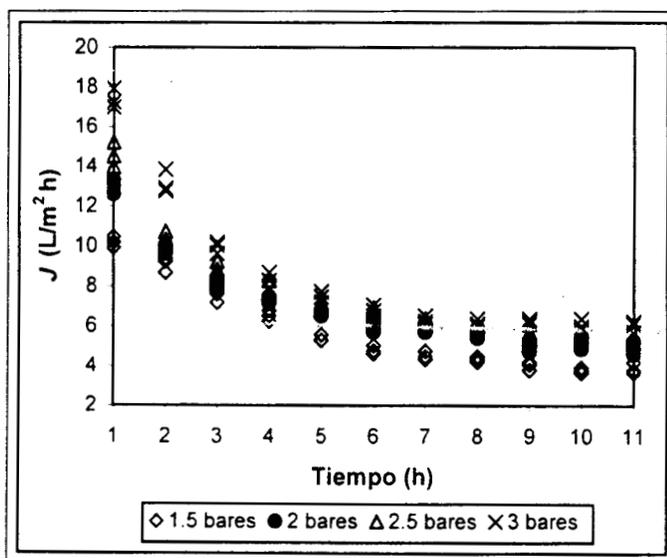
Tabla 20. Proteína y pigmentos liberados en 11 horas a cuatro presiones.

Presión de operación (bares)	Proteína soluble (mg/g)	Xantofilas totales (mg/g)
1.5	717.8 ^a	30.6 ^a
2	745.6 ^b	32.7 ^b
2.5	771.2 ^c	34.1 ^c
3	774.6 ^c	35.8 ^d

Las medias con el mismo superíndice no son significativamente diferentes.

Al aplicar presiones de 2.5 y 3 bares no se encontró diferencia significativa en la concentración de proteína; con respecto a xantofilas totales si se detectaron diferencias significativas entre las cuatro presiones aplicadas. La Figura 71 muestra el comportamiento del flux de permeado a las diversas presiones de operación en el mismo intervalo de tiempo.

A mayor presión de operación del BEM, el flux cuantificado fue mayor principalmente en las primeras cinco horas, lo cual se apreció en los primeros 120 minutos. El tratamiento con 1.5 bares mostró valores del flux similares (3.8 L/m² h) a partir de las 10 horas; y de 5.2 L/m² h a partir de las 9 horas al aplicar 2 y 2.5 bares. Finalmente, a 3 bares el flux se estabilizó en 6.1 L/m² h a partir de las 7 horas.

**Figura 71. Flux de permeado a cuatro presiones.**

Los FC volumétricos con respecto al flux de permeado alcanzado en cada una de las fuerzas impulsoras de trabajo se muestran en la Figura 72.

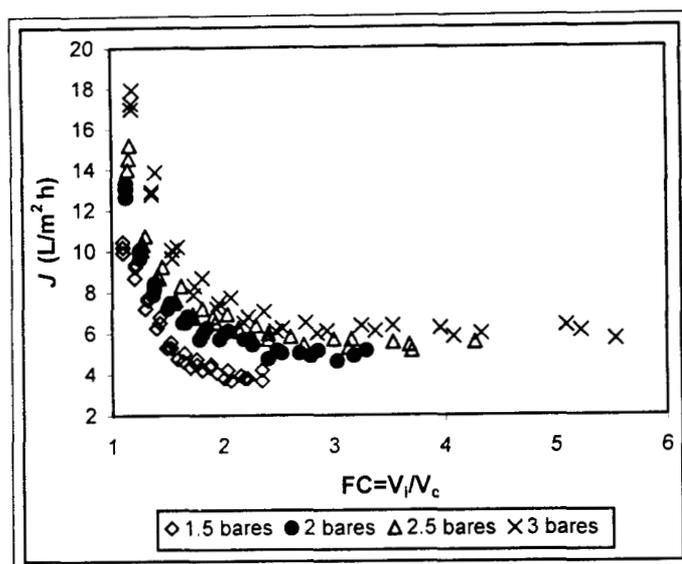


Figura 72. FC volumétrico a cuatro presiones.

Al final de las 11 horas de estudio los FC promedio en la UF fueron de 2.3, 3.1, 3.8 y 5.9 para las presiones de 1.5, 2, 2.5 y 3 bares respectivamente. Se observó que a 3 bares se obtuvieron los mayores valores de flux de permeado y FC, sin embargo, se puede predecir que un rápido aumento del FC significaría una reducción acelerada del volumen inicial de la solución, disminuyendo el tiempo de operación del BEM por el agotamiento de la solución inicial, situación que provocaría una mayor retención del pigmento en la membrana de UF por la disminución de su liberación de la fracción proteica debido a que la enzima dispone de menor tiempo de hidrólisis sobre la carotenoproteína.

Prazeres y Cabral (1998) recomiendan que para el manejo adecuado de un BEM debe seleccionarse la presión de operación a la cual se proporcione el tiempo suficiente para que la enzima interaccione con el sustrato y lo transforme, al mismo tiempo que se consiga una estabilización aceptable del flux de permeado minimizando la polarización de la concentración. Sobre la base de lo anterior puede decirse que 2 bares fue la presión idónea para una hidrólisis de carotenoproteína en el BEM, a esta presión se obtuvo el máximo nivel de proteína, aunque no de xantofilas totales (Tabla 20). A esta presión el flux original disminuyó 66% hasta

estabilizarse en 4.4 L/m² h a partir de la onceava hora, en un proceso que requiere 14 horas para lograr el rendimiento máximo (Figura 66).

7.5.4. Concentración de astaxantina por OI

Para concentrar los pigmentos por medio de OI se utilizó el permeado resultante de la UF del hidrolizado. La solución a concentrar tenía un contenido inicial de 38 mg/g o mg/L de xantofilas totales. Los valores de concentración considerando el FC correspondiente a cada hora se indican en la Figura 73 (tres repeticiones).

Al final del proceso se obtuvo en el retenido una solución concentrada en pigmentos con una media de 177.25 mg/L y un FC de 4.66 (Figura 74), por tanto las xantofilas se concentraron 4.66 veces, una reducción de 393 mL (78.6%) con respecto al volumen inicial de 0.5 L. Al dividir esta concentración final entre el FC se obtuvieron 38 mg/g de carotenoproteína, cuantificados en la solución inicial.

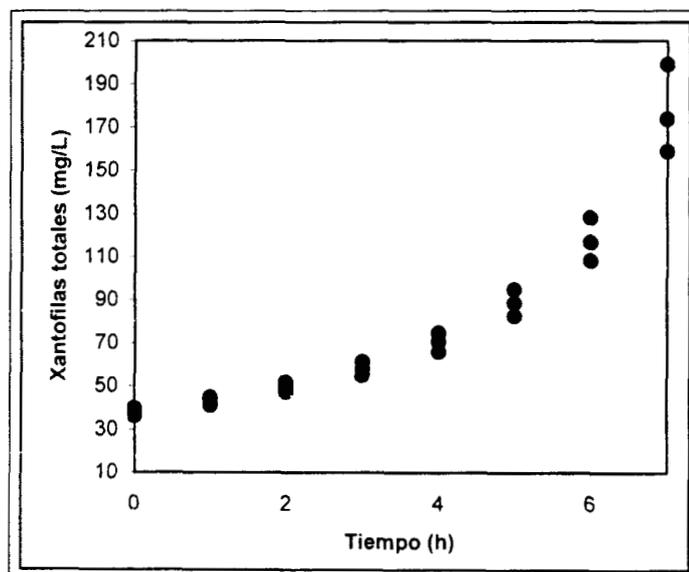


Figura 73. Concentración de xantofilas totales por OI.

La membrana utilizada presentó una alta resistencia al paso de los pigmentos, obteniendo una selectividad (R) del 100% debido a que no se detectaron carotenoides en el permeado. Esta retención total de los pigmentos por OI también pudo apreciarse visualmente a través del permeado totalmente incoloro, que sugirió

una retención del 100% de los pigmentos en el volumen de concentración. Al cuantificar las xantofilas totales en el líquido que atravesó la membrana se comprobó que no estaban presentes. Es posible que la retención de las xantofilas se debió a que, a pesar de que estas tienen un PM aproximado a los 560 Da, inferior al PMC de la membrana (793 Da), no atravesaron la membrana debido a que se encontraban unidos a pequeños péptidos, tan sólo la unión con dos aminoácidos como la lisina aumenta el peso molecular hasta 822 Da, valor superior al PMC.

En la Figura 74 se observa el comportamiento del flux de permeado con respecto al tiempo de operación del BEM. El proceso inició con una velocidad media de 13.22 L/m² h y se estabilizó a partir de las 6 horas a 12 L/m² h, lo que indicó una disminución del 9.2%. Esta disminución pequeña del flux pudo ser provocada por dos factores: la presión alta en el proceso (10 bares) o el tiempo relativamente corto en que el pigmento se concentró.

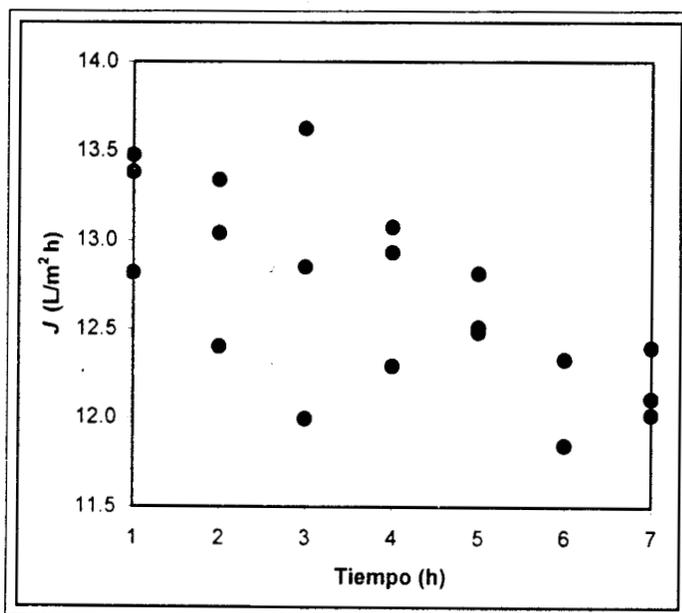


Figura 74. Flux de permeado en OI.

El comportamiento del flux con respecto al FC se muestra en la Figura 75. A lo largo de siete horas de concentración de pigmentos el FC aumentó en promedio de 1 a 4.66, un incremento del 466%, lo que indicó que el volumen final del retenido fue de

107 mL, 393 mL de líquido atravesaron la membrana. La estabilización del flux de permeado en $12 \text{ L/m}^2 \text{ h}$ se presentó a partir de un $\text{FC} \geq 3.1$, obtenido a las 6 horas de proceso.

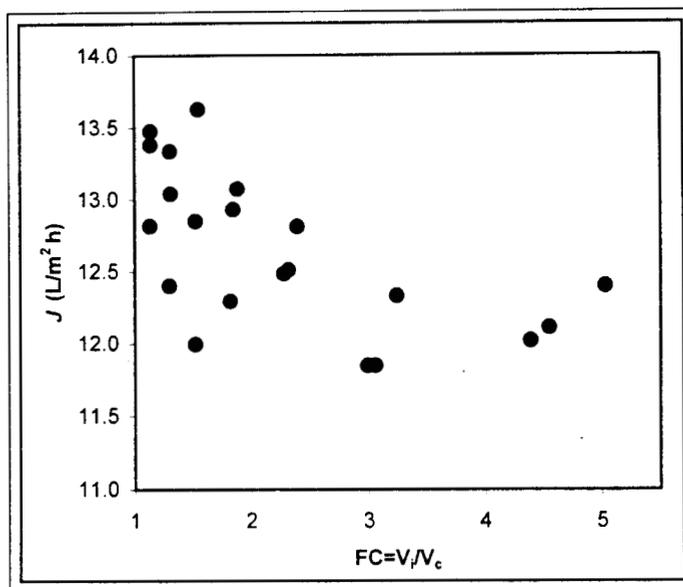


Figura 75. FC volumétrico en OI.

Los resultados anteriores pueden dar lugar a la evaluación de parámetros de ingeniería tanto de la ultrafiltración como de la ósmosis inversa.

En particular, a través de las gráficas presentadas en las Figuras 66 y 74, se pueden obtener las resistencias de la membrana y de la capa de soluto de polarización. Para la ultrafiltración de la proteína el flux de permeación disminuyó 66%, mientras que para la ósmosis inversa la disminución fue de 9.2%.

Lo anterior sería útil para la evaluación tanto de la resistencia de la membrana (R_m) como de la capa de sólidos (R_{pc}), dado que la resistencia total (R_T) es la suma de ambas resistencias que actúan en serie. La segunda resistencia sería evaluada puntualmente a través de los valores de J , tomados a intervalos de tiempo discretos de las Figuras mencionadas. De esta manera al tomar la ecuación (Tejeda y col., 1995):

$$J = \Delta P / R_T$$

En la que

$$R_T = R_m + R_{pc}$$

R_T podría expresarse como:

$$R_T = \Delta P / f(t)$$

Donde $f(t)$ es la función que se expresa gráficamente en las Figuras 66 y 74, misma que puede evaluarse de manera empírica para cada caso.

Dado que ΔP es conocida y constante a lo largo de la operación, los valores instantáneos de R_T pueden conocerse y de ellos evaluar tanto R_m como R_{pc} . Este último parámetro variará a lo largo de la corrida y determinará el momento en el que la operación deba suspenderse por razones de economía del proceso.

Por otro lado, con el objeto de caracterizar el proceso, podría proponerse el uso del coeficiente de rechazo instantáneo, mismo que está definido por:

$$\sigma = 1 - (C_p / C_a)$$

Este valor sería también útil para determinar el momento en el que la operación debe ser suspendida en aras de lograr economías viables de la separación.

Tanto R_{pc} como σ podrán caracterizar el proceso para una membrana determinada ($R_m = \text{constante}$) y soluciones conocidas, y serán útiles en el diseño de procesos de mayor escala.

Los parámetros que determinan en forma individual tanto R_m como R_{pc} , podrán ser motivo de estudios posteriores que incidan en la predicción de estos valores y que proporcionen información útil para el diseño de otros sistemas de separación por membrana.

7.6. Rendimiento de pigmentos de los tratamientos empleados

La Tabla 21 muestra los rendimientos de pigmentos por kg de residuo de camarón fermentado obtenidos en los tratamientos más eficientes.

Tabla 21. Rendimientos de extracción de pigmentos.

Fuente	Pigmentos (mg/kg)
Extracto con disolventes (15:75:10)	272.2
Hidrólisis con proteasa (15 UP, 24 h)	1100-1140
Hidrólisis con proteasa:lipasa (15:10 , UP:UL, 12 h)	1567
Hidrólisis con proteasa en proporción de disolventes (15:65:10) (20 UP, 24 h)	1302
Hidrólisis con celulasa (20 BG, 24 h)	769.7
Hidrólisis con celulasa:lipasa (20:10, BG:UL, 24 h)	905.9
Hidrólisis con proteasa en BEM (20 UP, 14 h)	907.1

Estas cantidades estuvieron compuestas por aproximadamente un 90% de astaxantina. Los niveles de recuperación obtenidos en todos estos tratamientos se ubicaron por arriba de 200 mg/kg indicado por Torrissen y col. (1989) para residuos de diversos tipos de crustáceos, incluidos los de camarón.

Spinelli y Mahnken (1978), por medio de un proceso de tres etapas de concentración con aceite de soya, llegaron a obtener hasta 1550 mg/kg de carotenos a partir de residuos de cangrejo rojo, a una temperatura de proceso alta (90°C), que pudo afectar al porcentaje de astaxantina que conforma a los pigmentos totales. Al realizar el proceso en una sola etapa, la concentración fue de 550 mg/kg, cantidad inferior a la obtenida en esta tesis en el BEM, donde la hidrólisis y separación del pigmento a través del permeado se integran en una sola operación.

Simpson y Haard (1985) reportan 1160 mg/kg en carotenoproteína liofilizada extraída de residuos de camarón *P. borealis* tratados con tripsina. El objetivo de estos autores fue separar a la astaxantina de la fracción proteica hidrolizada utilizando esta mezcla para la alimentación de salmónidos.

En la presente tesis se logró el aislamiento y concentración de las dos fracciones en BEM, alcanzando FC volumétricos de 8.27 y 4.66 para proteína y pigmentos, respectivamente, y una selectividad o retención (*R*) de 96.6% para proteína soluble en ultrafiltración y 100% para xantofilas totales en ósmosis inversa, lo que permitiría utilizar el pigmento en otras áreas de aplicación donde se requiere astaxantina pura. Los hidrolizados de residuos sin concentrar a la astaxantina por procesos de membrana, pueden ser empleados en alimentación animal ya que los porcentajes de proteína soluble alcanzados fueron aún más altos que los reportados por Simpson y Haard (1985) y Cano-López y col. (1987).

El separar a la astaxantina obtenida en cada uno de los tratamientos permite aumentar su biodisponibilidad en la dieta de salmónidos alcanzando niveles más altos de retención en el músculo del pez. Choubert y Luquet (1983) mencionan que 30 mg de astaxantina por kilogramo de dieta son suficientes para lograr un 15-20% de fijación en el músculo de la trucha arcoiris, haciéndolo más atractivo para el consumidor. Actualmente, para pigmentar salmón se usan cantidades que fluctúan entre 40 y 75 mg/kg (Sigurgisladottir y col., 1994).

Aunque gran parte de la astaxantina en crustáceos se encuentra esterificada con ácidos grasos, a lo largo de la presente tesis, la extracción de los pigmentos de residuos de camarón fue más eficiente de lo que podría esperarse sobre la base de su cantidad de astaxantina libre.

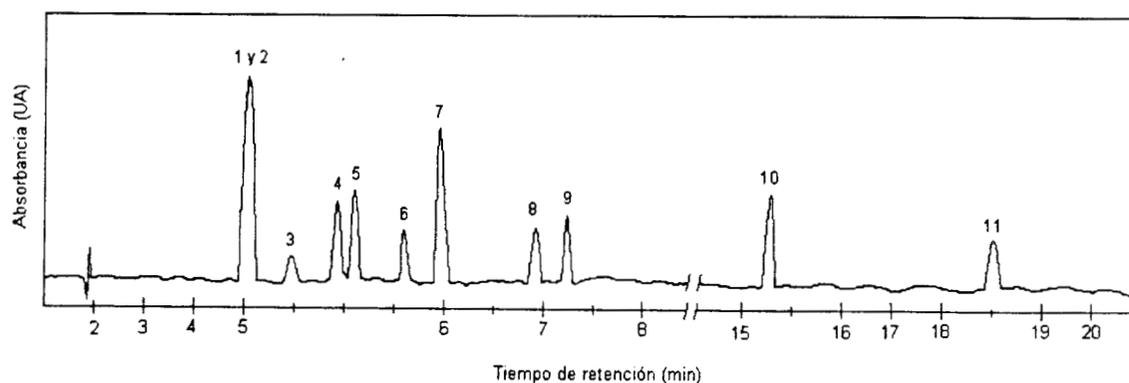
La mayor proporción de astaxantina libre obtenida de tratamientos con lipasas podría aumentar aún el grado de fijación del pigmento en músculo. Sin embargo, son necesarios estudios sobre la composición de lípidos en la carotenoproteína, antes y después de la hidrólisis enzimática, que harían posible conocer el grado de acción lipolítica de la enzima.

7.7. Análisis de pigmentos presentes en residuos de camarón

Se analizaron un total de 11 estándares distintos por HPLC, los tiempos de retención y las longitudes de onda a la cual presentaron su absorción máxima se presentan en la Tabla 22. El número indicado en la primera columna identifica la señal correspondiente en el cromatograma general que se muestra en la Figura 76.

Tabla 22. Tiempos de retención y λ de absorción máxima de los estándares.

Número	Estándar	Tiempo de retención (min)	λ de absorción máxima (nm)
1	Astaxantina AST-120	5.063	474
2	Astaxantina en cristal	5.065	474
3	Astaceno	5.23	494
4	Luteína	5.43	452
5	Zeaxantina	5.503	468
6	Capsantina	5.807	470
7	Cantaxantina	5.945	472
8	(3S)- β -criptoxantina	6.849	467
9	(3R)- β -criptoxantina	7.24	467
10	3-hidroxi-4-oxo- β -carotin	15.147	465
11	Neurosporina	18.53	442

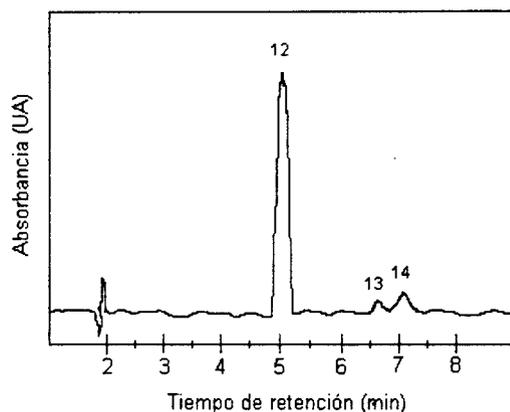


1. Astaxantina AST-120; 2. Astaxantina en cristal; 3. Astaceno; 4. Luteína; 5. Zeaxantina; 6. Capsantina; 7. Cantaxantina; 8. (3S)- β -criptoxantina; 9. (3R)- β -criptoxantina; 10. 3-hidroxi-4-oxo- β -carotin; 11. Neurosporina.

Figura 76. Cromatograma de estándares de carotenoides.

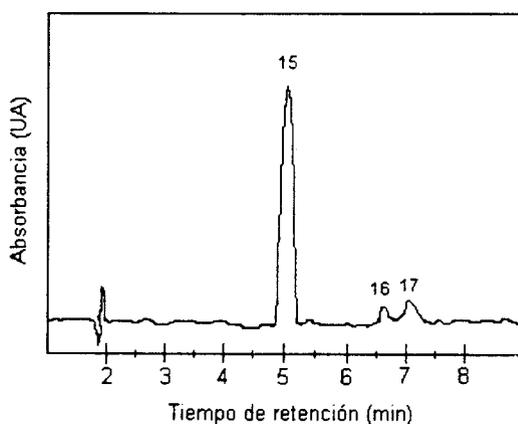
La astaxantina AST-120 y en cristal se obtuvo en forma de isómero *trans*, configuración óptica que puede convertirse en una mezcla *cis-trans* bajo la acción de factores como temperatura, luz, presencia de ácidos (Johnson y An, 1991) y disolventes orgánicos (Yuan y Chen, 1999).

También se obtuvieron los cromatogramas de Carophyll pink^{MR} (Figura 77) y de residuos de camarón fermentados (Figura 78).



12. *trans*-astaxantina; 13. 9-*cis*-astaxantina; 14. 13-*cis*-astaxantina

Figura 77. Cromatograma de Carophyll pink^{MR}.



15. *trans*-astaxantina; 16. 9-*cis*-astaxantina; 17. 13-*cis*-astaxantina

Figura 78. Cromatograma de residuo de camarón fermentado.

La señal 12 del Carophyll pink^{MR} y 15 de residuo fermentado corresponden a *trans*-astaxantina. Según Yuan y Chen (1999) son 9-*cis*-astaxantina las señales 13 y 16

(6.66 minutos) de la fuente natural y sintética, respectivamente; 14 y 17 (7.1 minutos) corresponden a 13-*cis*-astaxantina. Estos dos compuestos son producto de la isomerización de moléculas *trans* de astaxantina.

Al considerar como 100% la suma de las áreas de los isómeros *trans* y *cis* de astaxantina, se obtuvieron 87 y 85% de *trans*-astaxantina, 4 y 5% de 9-*cis* astaxantina y 9 y 10% de 13-*cis*-astaxantina en el Carophyll pink^{MR} y residuos de camarón, respectivamente, indicando una proporción similar en isómeros de astaxantina.

Aunque se usó una mezcla de disolventes orgánicos (éter de petróleo:acetona:agua, 15:75:10) para la extracción de pigmentos de los residuos de camarón fermentados, el alto porcentaje de *trans*-astaxantina concuerda con lo afirmado por Yuan y Chen (1999) quienes obtuvieron un nivel bajo de isomerización en comparación con otros disolventes como diclorometano, cloroformo, metanol y acetonitrilo.

Al tener una biblioteca de datos con los diferentes estándares de pigmentos a distintas concentraciones se consideraron las curvas de calibración para astaxantina ($R^2=0.9904$) y astaceno ($R^2=0.9842$) (anexo 8) para llevar a cabo el análisis de estabilidad de astaxantina de residuos de camarón y Carophyll pink^{MR}, resultados que se indican a continuación.

7.8. Estabilidad de astaxantina

Los cromatogramas mostrados en las Figuras 77 y 78 corresponden al tiempo cero del procedimiento realizado para el estudio de la estabilidad de astaxantina natural y sintética, respectivamente. Cuando la astaxantina se oxida, el cromatograma característico es el que se muestra en la Figura 79, apareciendo el pico de astaceno a los 5.23 minutos. En los procedimientos para la extracción de carotenoides a partir de crustáceos se promueve la oxidación de astaxantina a astaceno por efecto de los sistemas de extracción con altas temperaturas y oxígeno (Meyers y Bligh, 1981).

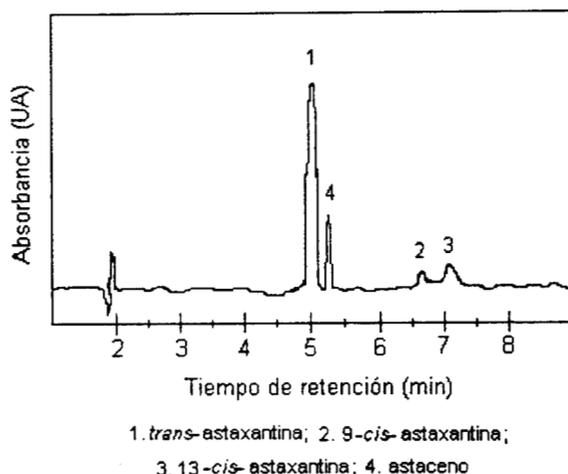


Figura 79. Cromatograma de astaxantinas y astaceno.

A continuación se muestran los resultados del efecto de la luz, oxígeno y temperatura en la estabilidad del pigmento natural y el sintético. Los análisis se llevaron a cabo por duplicado.

7.8.1. Diseño sin interacciones

La Figura 80 se muestra las cantidades de astaxantina y astaceno cuantificadas a lo largo de ocho semanas de estudio en muestras almacenadas en la oscuridad. La cantidad de astaxantina disminuyó conforme transcurrió el tiempo con un aumento paulatino de astaceno.

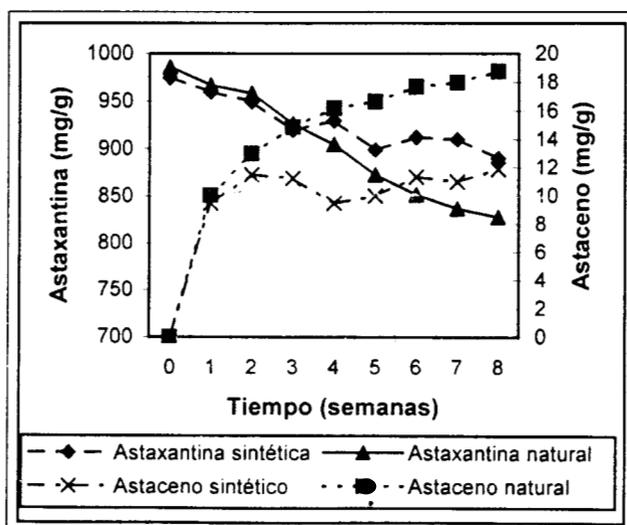


Figura 80. Estabilidad de astaxantina en muestras almacenadas en oscuridad.

La ausencia de luz es importante en la preservación del pigmento ya que la astaxantina es sensible a la radiación visible (380-780 nm), es por ello que al proteger a las unidades experimentales de la oscuridad la cantidad de astaxantina disminuye 100 mg/g (10%) del pigmento sintético y 150 mg/g (15%) de astaxantina de residuos de camarón. La cantidad de astaceno aumentó en pequeña proporción (1.9%) debido a la poca degradación de la astaxantina.

Según se esperaba, las muestras almacenadas en la luz (Figura 81) presentaron mayor degradación de astaxantina con respecto a las muestras almacenadas en oscuridad, al término del estudio hubo una disminución de 24% de pigmento sintético y 23% del natural sin mostrar una diferencia entre ambos significativa hasta después de la sexta semana.

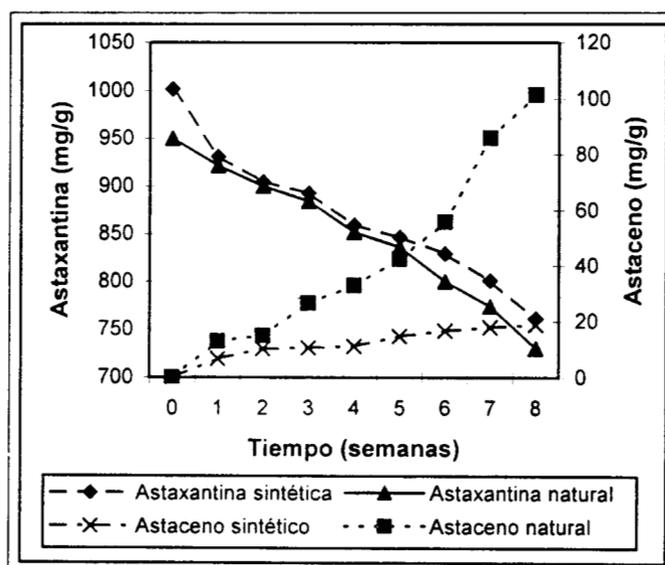


Figura 81. Estabilidad de astaxantina en muestras almacenadas a la sombra.

La cantidad de astaceno aumentó con el tiempo de análisis, siendo mayor en las muestras del pigmento natural a partir de la segunda semana. Hubo una diferencia significativa en la concentración de astaxantina entre muestras almacenadas en luz y las almacenadas en oscuridad ($P > 0.0001$).

En las muestras almacenadas en exposición a la luz solar la astaxantina disminuyó considerablemente ($P>0.0001$), al concluir el tiempo de estudio se había perdido 63% y 72% de astaxantina sintética y natural, respectivamente (Figura 82).

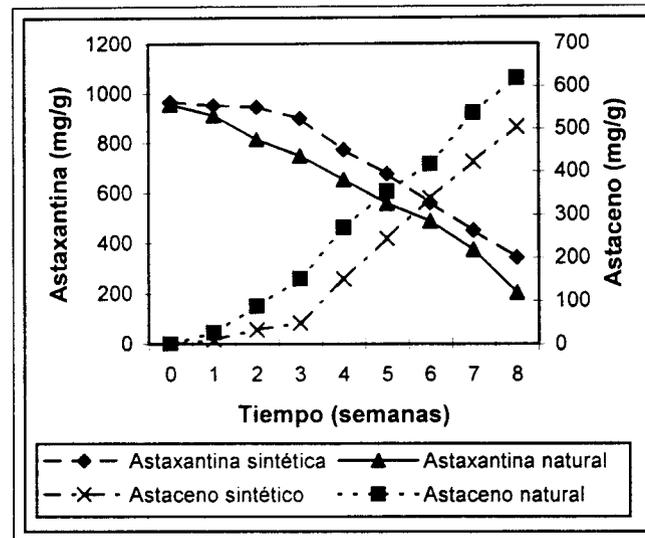


Figura 82. Estabilidad de astaxantina en muestras almacenadas en exposición al sol.

La mayor degradación del pigmento se debió al efecto de la luz solar sobre la estabilidad de la astaxantina; al mismo tiempo que en estas muestras se alcanzó una temperatura de 35°C, lo cual aumentó significativamente la degradación a astaceno a partir de la tercera semana ($P>0.0001$).

La degradación de astaxantina en muestras almacenadas en recipientes abiertos en oscuridad se muestra en la Figura 83. Se oxidó 27.1% de la astaxantina sintética y 33.7% de la natural.

En estas muestras, la cantidad de astaceno sintético y natural aumentó hasta 163 mg/g y 195 mg/g, respectivamente.

La cantidad de astaxantina en muestras almacenadas en recipientes cerrados pero sin evacuación del oxígeno se muestra en la Figura 84, degradándose 13.1 y 15.7% la astaxantina sintética y natural, respectivamente.

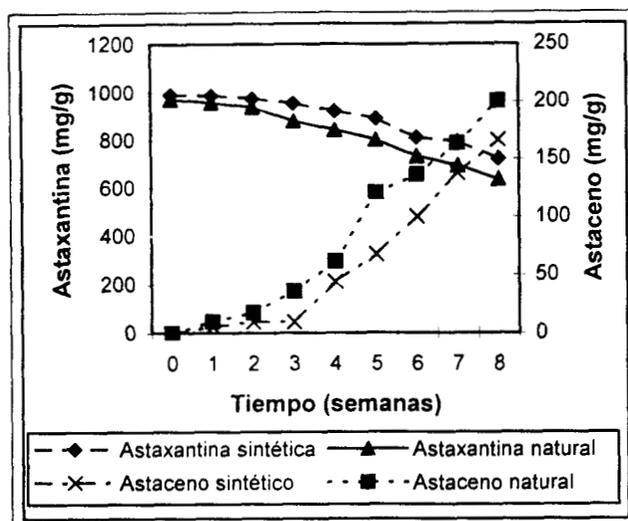


Figura 83. Estabilidad de astaxantina en muestras almacenadas en recipientes abiertos

La concentración de astaxantina no mostró una diferencia significativa entre ambos tipos de pigmentos hasta después de la sexta semana de análisis ($P>0.0001$); el astaceno aumentó significativamente en muestras naturales a partir de la cuarta semana.

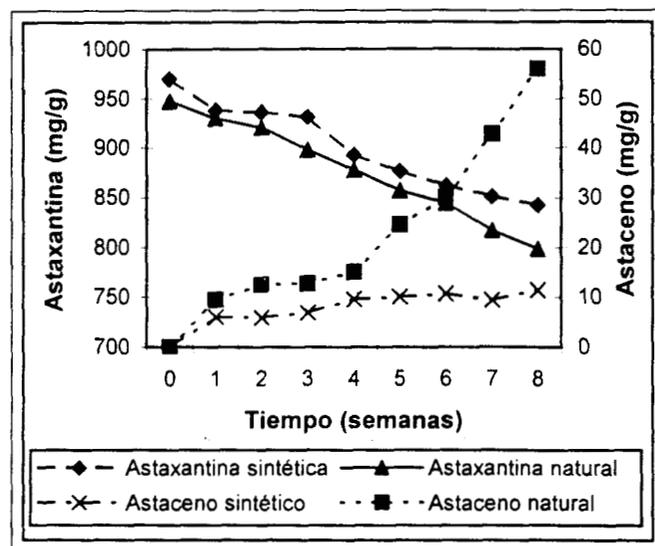


Figura 84. Estabilidad de astaxantina en muestras almacenadas en recipientes cerrados sin evacuación del oxígeno.

Al evacuar el oxígeno de las unidades experimentales se consiguió el mayor nivel de conservación de astaxantina, oxidándose a la octava semana sólo el 6.8 y 18.6% de la astaxantina sintética y natural, respectivamente (Figura 85).

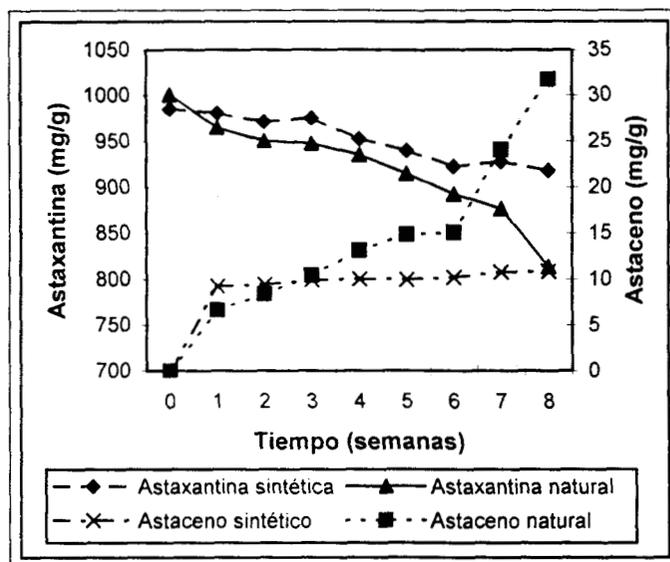


Figura 85. Estabilidad de astaxantina en muestras almacenadas al vacío.

La oxidación de astaxantina fue mayor a partir de la sexta semana de análisis, cuando el astaceno aumentó significativamente ($P > 0.0001$).

Cuando las muestras se almacenaron a 15°C se presentó menos oxidación de la astaxantina sintética y natural (Figura 86), observándose una mayor degradación en el pigmento de fuente natural, especialmente después de la quinta semana.

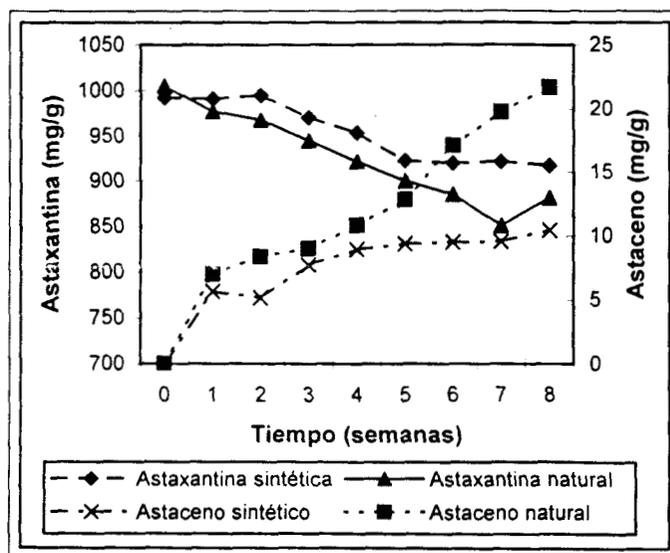


Figura 86. Estabilidad de astaxantina en muestras almacenadas a 15°C.

Al finalizar el experimento los porcentajes de pérdida de astaxantina sintética y natural fueron 7.5% y 12.2%, respectivamente. Las concentraciones de astaceno empezaron a ser significativamente diferentes a partir de la quinta semana ($P>0.0001$).

El almacenamiento a 25°C también logró un buen nivel de conservación de astaxantina, con un aumento del 6.2% de oxidación sobre la base de los resultados obtenidos a 15°C al concluir la octava semana del estudio (Figura 87).

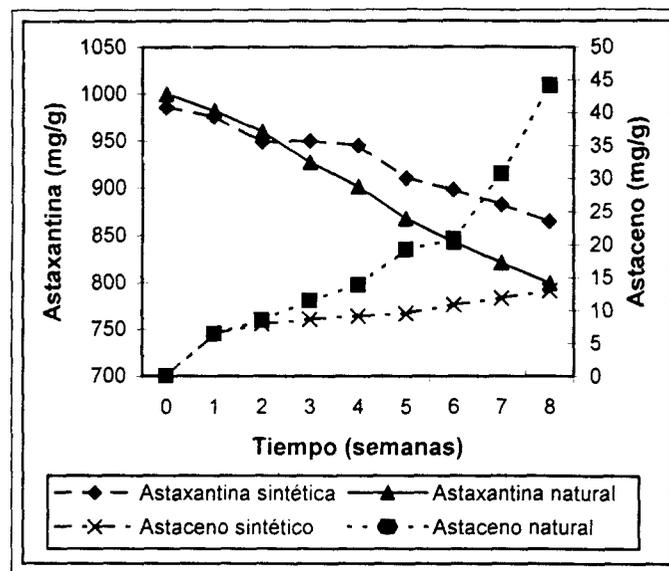


Figura 87. Estabilidad de astaxantina en muestras almacenadas a 25°C.

La concentración de astaxantina sintética y natural mostró una diferencia significativa a partir de la cuarta semana de análisis ($P>0.0001$); los porcentajes de oxidación al concluir el estudio fueron de 12.2% para la fuente sintética y 20% para la natural.

La concentración de astaceno empezó a mostrar una diferencia significativa entre las dos fuentes ($P>0.0001$) hasta después de la tercera semana.

El almacenamiento a 45°C resultó ser el tratamiento con el cual se afectó mayormente la estabilidad del caroteno, y por consecuencia con un incremento en la

producción de astaceno. La interacción de la alta temperatura con el oxígeno no evacuado de los recipientes ocasionó un aumento en la oxidación de astaxantina (Figura 88).

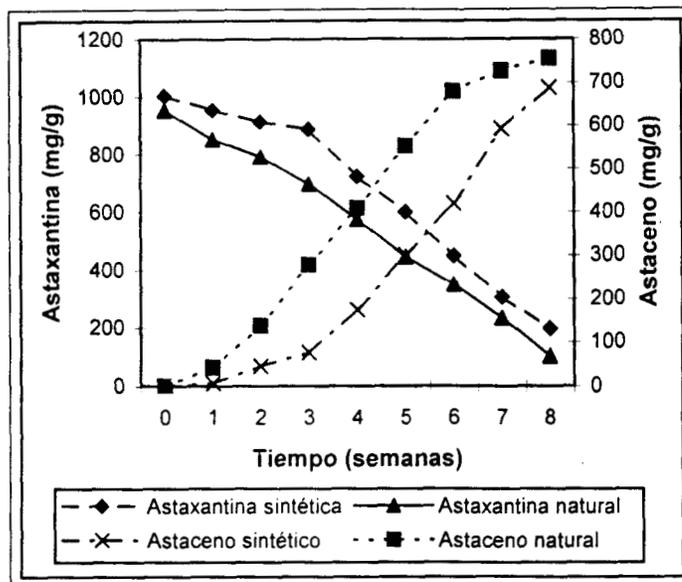


Figura 88. Estabilidad de astaxantina en muestras almacenadas a 45°C.

Se observó una diferencia significativa en la concentración de astaxantina y astaceno a partir de la segunda semana de estudio, mostrando mayor degradación el pigmento de origen natural; al finalizar el experimento se había oxidado 80.5% del caroteno sintético por 83.7% del natural, con una concentración de astaceno de 694 y 752 mg/g, respectivamente.

El efecto de los factores estudiados sobre la oxidación de astaxantina pudo evaluarse cualitativamente por el color que presentaban las soluciones formuladas con los pigmentos de cada una de las unidades experimentales, al presentarse un color amarillo claro, característico del astaceno, en muestras oxidadas en las últimas 3 semanas. Haila (1999) menciona que la pérdida de color es la característica más común de la oxidación de los carotenoides. El rojo-anaranjado es el color característico de una solución de astaxantina, el cual cambia paulatinamente a tonalidades amarillo-claro conforme se oxida. El color característico de los

carotenoides también desaparece al saturarse y romperse las dobles ligaduras (Kearsley y Rodríguez, 1981; Mordi y col., 1993), por lo que después de que la astaxantina se oxida hasta astaceno ocurre una degradación estructural de la molécula.

En conclusión, a las condiciones estudiadas los pigmentos de fuente sintética y natural presentaron una diferencia significativa de oxidación a partir de la tercera semana de análisis ($P > 0.0001$). Esta diferencia se debió a que la astaxantina sintética del Carophyll pink^{MR} está protegida de promotores oxidantes como luz, temperatura u oxígeno por la presencia de un vehículo o soporte, generalmente gomas o polímeros, y que representan el 92% de este producto.

En cambio, en el pigmento de origen natural sólo se tuvo la protección de la proteína que originalmente se encuentra unida al pigmento, un vehículo inestable en comparación a gomas y polímeros. Sin embargo, las diferencias en cuanto a estabilidad no fueron tan marcadas, para el caso de la astaxantina natural podría mejorarse con la elección de un soporte adecuado y uso de antioxidantes.

Los factores individuales de mayor influencia en la oxidación de astaxantina fueron la exposición a la luz solar, y el almacenamiento a 45°C, condiciones importantes ya que en las regiones del país donde se producen los mayores volúmenes de residuo de camarón las temperaturas son elevadas y con alta intensidad lumínica, condiciones que prevalecen durante seis meses del año.

Los altos porcentajes de oxidación en las muestras almacenadas en exposición al sol y 45°C se debieron en parte al efecto del oxígeno del aire que no fue evacuado de los recipientes. Yamauchi y col. (1993) mencionan que los carotenoides experimentan bajos grados de oxidación a temperaturas relativamente altas, siempre y cuando se evite la presencia de catalizadores como oxígeno y luz.

Finalmente, las condiciones en que la astaxantina se oxidó en menor grado fueron el almacenamiento en la oscuridad, o en la sombra, a 15°C. Sin embargo, el almacenamiento a 25°C y en vacío también evitan la oxidación.

La Tabla 23 muestra los porcentajes de oxidación de astaxantina natural y sintética.

Tabla 23. Porcentajes de degradación de astaxantina natural y sintética a las 8 semanas de almacenamiento (diseño sin interacciones).

Fuente de variación	Pigmento	
	Sintético	Natural
Oscuridad	10	15
Sombra	24	23
Luz solar	63	72
Recipientes abiertos	27.1	33.7
Recipientes cerrados	13.1	15.7
Vacío	6.8	18.6
15°C	7.5	12.2
25°C	12.2	20
45°C	80.5	83.7

7.8.2. Diseño con interacciones

La Figura 89 muestra la degradación de astaxantina y producción de astaceno en muestras almacenadas bajo luz de día y aire, a 25°C a lo largo de ocho semanas de almacenamiento.

Tomando como base la concentración inicial de astaxantina, a las ocho semanas de almacenamiento hubo una pérdida por oxidación de 92.4% y 88.4% de fuente natural y sintética, respectivamente. El astaceno aumentó 79 y 72.1%, respectivamente. La diferencia en el nivel de oxidación de acuerdo al origen de los pigmentos fue significativa a partir de la sexta semana ($P > 0.0001$).

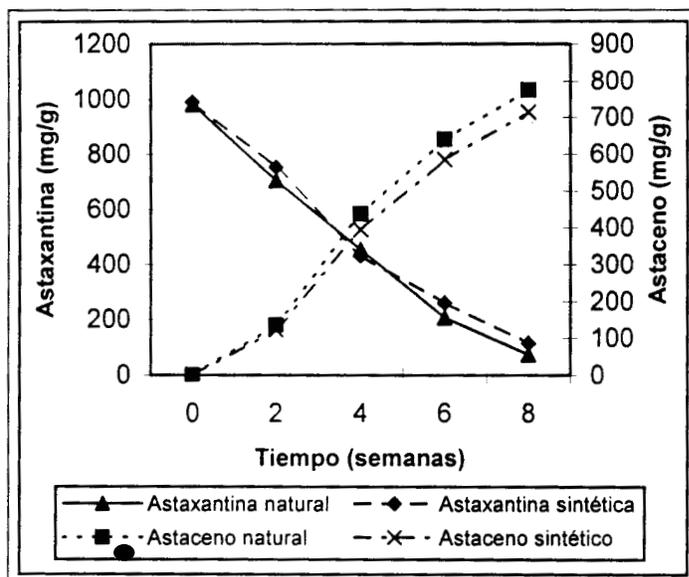


Figura 89. Estabilidad de astaxantina en muestras almacenadas bajo luz de día y aire, a 25°C.

En muestras almacenadas bajo luz de día y aire, a 45°C, la astaxantina natural se oxidó después de 8 semanas en 96.7% y 93.3% de la astaxantina sintética. Los porcentajes de astaceno se incrementaron en 85.4% para el natural y 80.5% para el sintético (Figura 90).

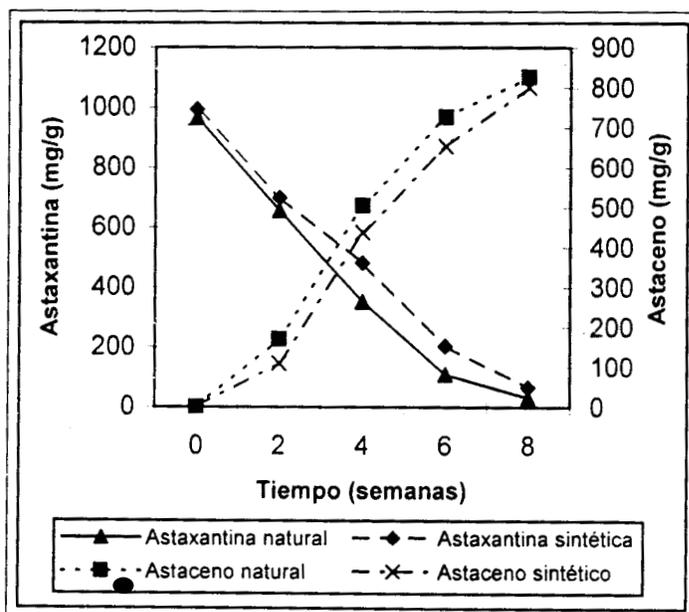


Figura 90. Estabilidad de astaxantina en muestras almacenadas bajo luz de día y aire, a 45°C.

Hubo diferencia significativa entre los carotenos naturales y sintéticos entre la cuarta y sexta semana, y al final del estudio las cantidades cuantificadas fueron similares, lo que indicó que este tratamiento reunió a las condiciones promotoras de mayor oxidación de pigmentos, resultando una degradación casi total de la astaxantina proveniente de las dos fuentes.

Las muestras almacenadas bajo luz de día y vacío, a 25°C (Figura 91), no mostraron diferencia significativa con las muestras almacenadas en iguales condiciones de luz y oxígeno, pero a 45°C (Figura 92), obteniéndose al final del estudio una disminución en la concentración de astaxantina de 13.1%, y un incremento de 1.2% de astaceno. Tampoco hubo diferenciación entre los resultados entre la oxidación del pigmento natural y sintético.

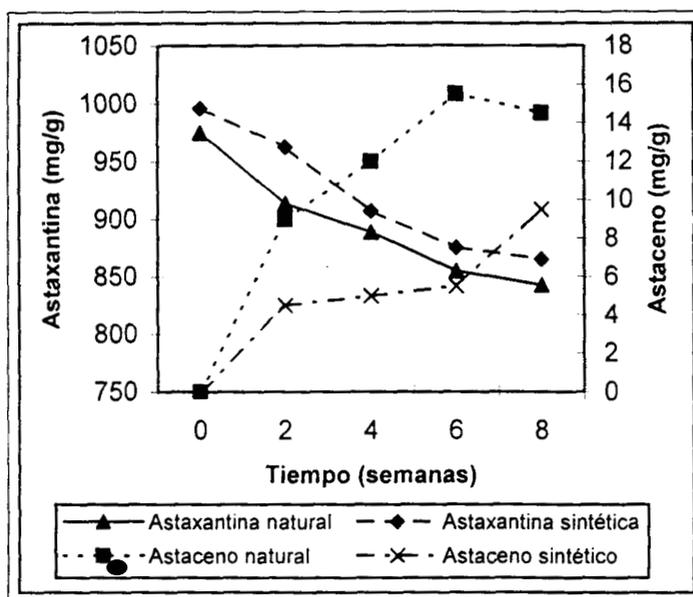


Figura 91. Estabilidad de astaxantina en muestras almacenadas bajo luz de día y al vacío, a 25°C.

Entre estos dos tratamientos no hubo diferencia significativa, las condiciones empleadas permitieron conservar la astaxantina sin oxidación considerable.

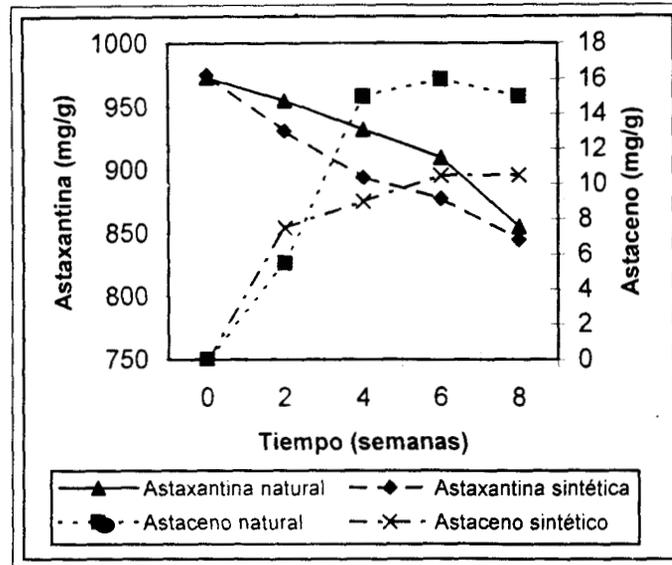


Figura 92. Estabilidad de astaxantina en muestras almacenadas bajo luz de día y al vacío, a 45°C.

En muestras almacenadas en la oscuridad y con aire, a 45°C (Figura 93), se observó una degradación de astaxantina natural de 95.5% a las 8 semanas de almacenamiento y 89.1% de sintética, correspondiendo a 76.7 y 71.8% de aumento en la cantidad de astaceno natural y sintético, respectivamente. La degradación de fuentes natural y sintética no presentó diferencia significativa hasta la sexta semana ($P > 0.0001$).

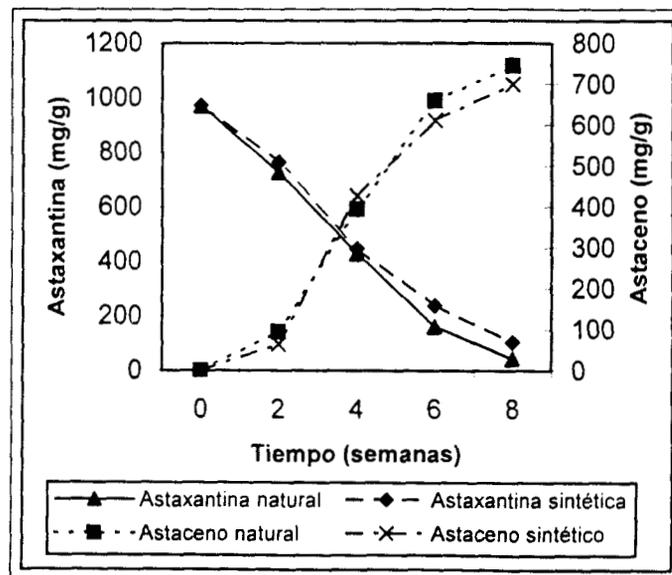


Figura 93. Estabilidad de astaxantina en muestras almacenadas en oscuridad y aire, a 45°C.

La Figura 94 muestra el efecto del almacenamiento en oscuridad y aire, a 25°C. Transcurridas ocho semanas de estudio hubo una pérdida de 72.5% de la astaxantina natural con un aumento de 52.4% de astaceno; el pigmento sintético se oxidó 67% con un incremento de 45.7% en astaceno.

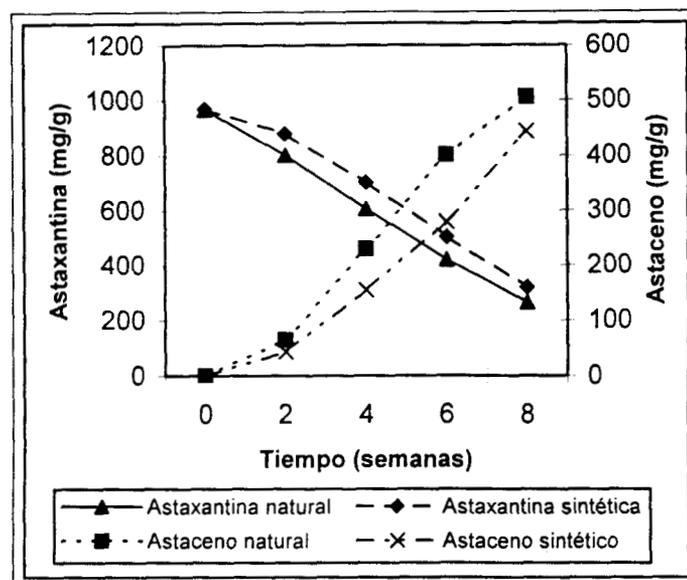


Figura 94. Estabilidad de astaxantina en muestras almacenadas en oscuridad y aire, a 25°C.

Se observó una diferencia significativa en la oxidación de astaxantina a partir de la segunda semana, y en la producción de astaceno desde los 28 días ($P > 0.0001$).

Las muestras almacenadas en oscuridad y al vacío, a 25°C, presentaron un menor grado de oxidación (Figura 95); la ausencia de luz y oxígeno son las condiciones más adecuadas de preservar a la astaxantina. Sin embargo, no se observó diferencia significativa con el tratamiento con las mismas condiciones de iluminación y disponibilidad de oxígeno, a 45°C (Figura 96).

Al finalizar las ocho semanas del estudio, el porcentaje de oxidación de astaxantina, sin diferencia significativa entre los pigmentos natural y sintético, fue del 2.49%, con un aumento muy pequeño de astaceno (0.1%).

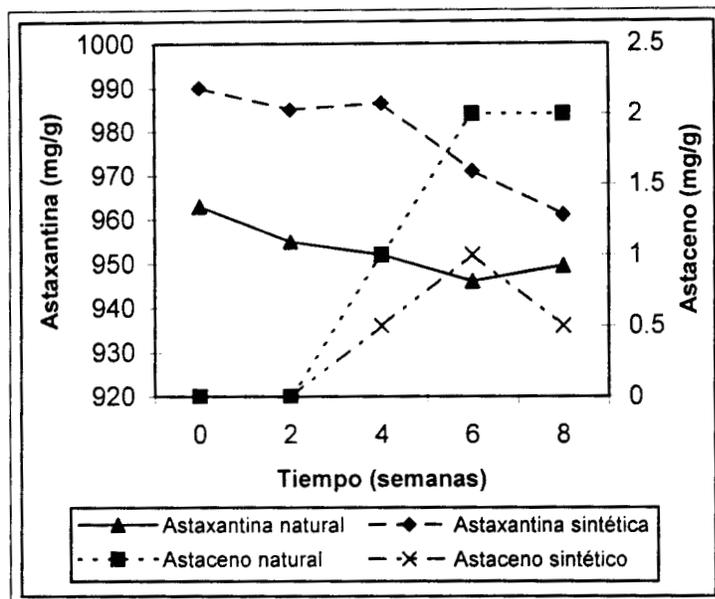


Figura 95. Estabilidad de astaxantina en muestras almacenadas en oscuridad y al vacío, a 25°C.

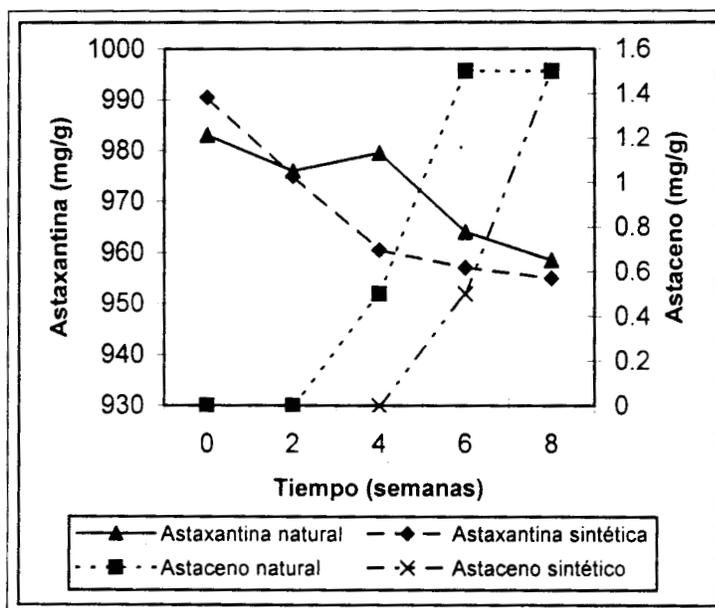


Figura 96. Estabilidad de astaxantina en muestras almacenadas en oscuridad y al vacío, a 45°C.

La Tabla 24 muestra los porcentajes de oxidación de astaxantina y el incremento de astaceno en cada tratamiento; estos en el orden en que promovieron la oxidación de astaxantina natural y sintética, de más a menos oxidante.

Tabla 24. Efecto de la interacción de factores sobre la estabilidad de astaxantina natural y sintética a las 8 semanas de almacenamiento (diseño con interacciones).

Secuencia de mayor a menor grado de oxidación	Agrupamiento de Duncan ($\alpha=0.05$)	Origen del pigmento	Condiciones			% de degradación de astaxantina	% de producción de astaceno
			Iluminación	Disponibilidad de oxígeno	Temperatura		
1	A	Natural	Luz	Aire	45°C	96.7	85.4
2	B	Natural	Oscuridad	Aire	45°C	95.5	76.7
3	C	Sintético	Luz	Aire	45°C	93.3	80.5
4	C	Natural	Luz	Aire	25°C	92.4	79
5	D	Sintético	Oscuridad	Aire	45°C	89.1	71.8
6	D	Sintético	Luz	Aire	25°C	88.4	72.1
7	E	Natural	Oscuridad	Aire	25°C	72.5	52.4
8	F	Sintético	Oscuridad	Aire	25°C	67	45.7
9	G	Natural	Luz	Vacío	45°C	13.1	1.2
10	G	Sintético	Luz	Vacío	45°C	12.8	1.2
11	G	Natural	Luz	Vacío	25°C	12.5	1
12	G	Sintético	Luz	Vacío	25°C	12.2	1.3
13	H	Natural	Oscuridad	Vacío	45°C	3.3	0.1
14	H	Sintético	Oscuridad	Vacío	45°C	3.1	0.2
15	H	Natural	Oscuridad	Vacío	25°C	2.4	0.1
16	H	Sintético	Oscuridad	Vacío	25°C	2.2	0.1

La presencia de oxígeno, luz y temperaturas altas son los factores que afectaron en mayor grado la estabilidad de astaxantina, acelerando las reacciones de deterioro. La presencia de oxígeno, aún a 25°C fue más oxidante que los tratamientos a 45°C pero en ausencia de oxígeno y luz ($P>0.0001$). A este respecto, Ishiwarati (1980) indica que el mecanismo de oxidación de carotenoides, parecido a la autooxidación de las grasas insaturadas, se acelera con el calor, pero la reacción es catalizada por la presencia del oxígeno o la luz. Esto significa que el calor influye sobre la estabilidad del caroteno pero ese efecto es mayor cuando en el ambiente hay oxígeno y luz disponibles.

Frankel (1995) considera que el factor individual más importante en la oxidación de carotenos es el oxígeno, y agrega que la temperatura afecta la estabilidad de los

pigmentos carotenoides incrementando la velocidad de su oxidación, aunque en ausencia de aire pueden soportar temperaturas relativamente altas.

En general, la oxidación fue mayor para la astaxantina de residuos de camarón, lo cual, como se mencionó anteriormente, pudo deberse a la falta de un vehículo o excipiente protector como lo posee la astaxantina sintética en el producto comercial Carophyll pink^{MR}. Aún así, la astaxantina natural tuvo un comportamiento de oxidación similar al sintético durante las primeras etapas de exposición a los factores estudiados, posiblemente debido al efecto protector de la fracción proteica. Aunque este efecto de protección disminuyó conforme transcurrió el tiempo, especialmente en los tratamientos a temperatura de 45°C. El motivo de la disminución del efecto protector de la proteína posiblemente se relaciona a lo reportado por Yamauchi y col. (1993) y Frankel (1995) quienes mencionan que las proteínas protectoras tienden a desnaturalizarse a temperaturas altas, haciendo a los carotenoides susceptibles al contacto con el oxígeno y la luz.

7.9. Patrón de aminoácidos en carotenoproteínas de residuos de camarón fermentados y no fermentados

Los análisis de aminoácidos de muestras de carotenoproteína obtenidas de residuos fermentados y no fermentados, por triplicado, se muestran en la Tabla 25; los aminoácidos esenciales se indican con letras *cursivas*.

El promedio de ambas carotenoproteínas mostró que fueron ricas en aspartato, glutamato y los aminoácidos esenciales leucina y lisina (128.1, 142.4, 111.2 y 97.25 mg/g, respectivamente). Por otro lado, las carotenoproteínas extraídas de residuos de camarón fermentados fueron una mejor fuente ($P>0.0001$) de los aminoácidos esenciales fenilalanina ($P>0.001$), histidina, treonina y triptófano ($P>0.0001$) (51.3, 32.1, 55.7 y 36 mg/g, respectivamente). Los aminoácidos esenciales arginina (58 mg/g) y valina (47 mg/g) se encontraron en mayor concentración en las carotenoproteínas de residuos no fermentados ($P>0.0001$).

Tabla 25. Composición de aminoácidos de carotenoproteína.

Aminoácido	Abreviatura	PM (g/mol)	Carotenoproteína de residuo no fermentado				Carotenoproteína de residuo fermentado			
			mg/g	% proteína	mol	% mol	mg/g	% proteína	mol	% mol
Alanina	Ala	89	45.4	4.54	0.0510	7.09	45	4.5	0.0506	6.81
Arginina	Arg	174	58	5.8	0.0333	4.63	46.2	4.62	0.0266	3.58
Aspartato	Asp	133	129.5	12.95	0.0974	13.53	126.7	12.67	0.0953	12.84
Cistina	Cys	240	15	1.5	0.0063	0.87	12	1.2	0.0050	0.67
Fenilalanina	Phe	165	42.6	4.26	0.0258	3.59	51.3	5.13	0.0311	4.19
Glicina	Gly	75	36.2	3.62	0.0483	6.70	31.2	3.12	0.0416	5.61
Glutamato	Glu	147	142.6	14.26	0.0970	13.48	142.2	14.22	0.0967	13.04
Hidroxilisina	H-Lys	162	1.6	0.16	0.0010	0.14	3	0.3	0.0019	0.25
Hidroxiprolina	H-Pro	131	0.7	0.07	0.0005	0.07	2.3	0.23	0.0018	0.24
Histidina	His	155	23	2.3	0.0148	2.06	32.1	3.21	0.0207	2.79
Isoleucina	Ile	131	40.2	4.02	0.0307	4.26	39.8	3.98	0.0304	4.09
Leucina	Leu	131	113.3	11.33	0.0865	12.01	109.1	10.91	0.0833	11.22
Lisina	Lys	146	98.3	9.83	0.0673	9.35	96.2	9.62	0.0659	8.88
Metionina	Met	149	20.2	2.02	0.0136	1.88	20.4	2.04	0.0137	1.85
Prolina	Pro	115	23.2	2.32	0.0202	2.80	25.3	2.53	0.0220	2.96
Serina	Ser	105	32.3	3.23	0.0308	4.27	40	4	0.0381	5.13
Taurina	Tau	125	1.9	0.19	0.0015	0.21	2.1	0.21	0.0017	0.23
Tirosina	Tyr	181	21.7	2.17	0.0120	1.67	35.5	3.55	0.0196	2.64
Treonina	Thr	119	38.4	3.84	0.0323	4.48	55.7	5.57	0.0468	6.31
Triptófano	Trp	204	19.4	1.94	0.0095	1.32	36	3.6	0.0176	2.38
Valina	Val	117	47	4.7	0.0402	5.58	37.2	3.72	0.0318	4.29
Total			950.5	95.05	0.7199	100	989.3	98.93	0.7420	100

Las Figuras 97 y 98 muestran las concentraciones de los aminoácidos no esenciales y esenciales, respectivamente, cuantificados en carotenoproteínas de los dos tipos de residuos. Se obtuvieron mayores cantidades de serina y tirosina ($P>0.0001$) en complejos de residuos ensilados, mientras que en los no fermentados la concentración de glicina fue mayor ($P>0.0015$). Es de notarse las concentraciones altas de aspartato, glutamato, y de los aminoácidos esenciales leucina y lisina.

En general se observó que las carotenoproteínas de residuos de camarón son una fuente importante de aminoácidos, obteniendo en casos particulares, cantidades más altas.

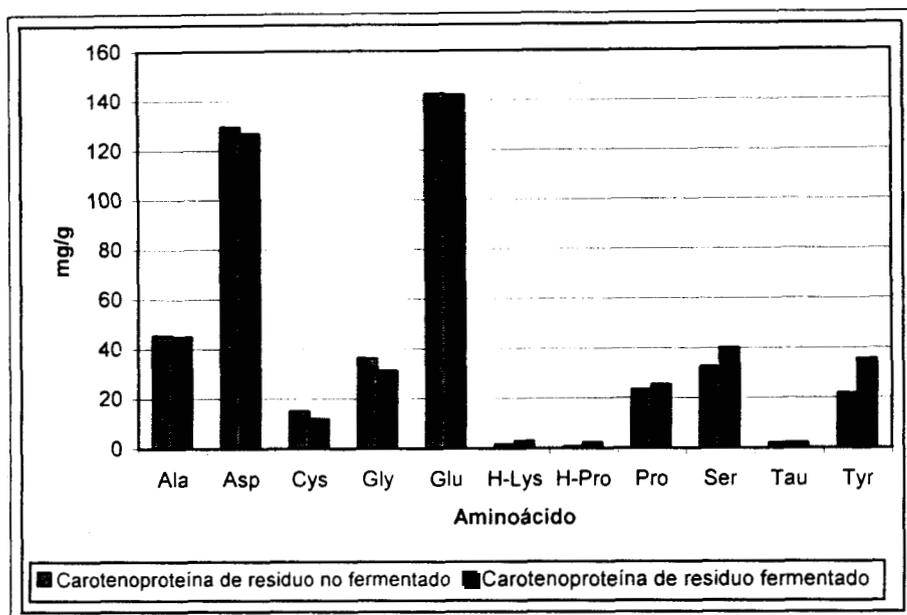


Figura 97. Composición de aminoácidos no esenciales.

Las carotenoproteínas provenientes de residuos fermentados tuvieron una mayor proporción de aminoácidos esenciales como fenilalanina, histidina, treonina y triptófano, lo cual tal vez se debió a que la carotenoproteína extraída no se encontraba pura debido a la presencia de cierta cantidad de biomasa de las bacterias lácticas que se desarrollaron durante el ensilado microbiano de los residuos de camarón, y que formaron parte de los extractos finales de carotenoproteínas.

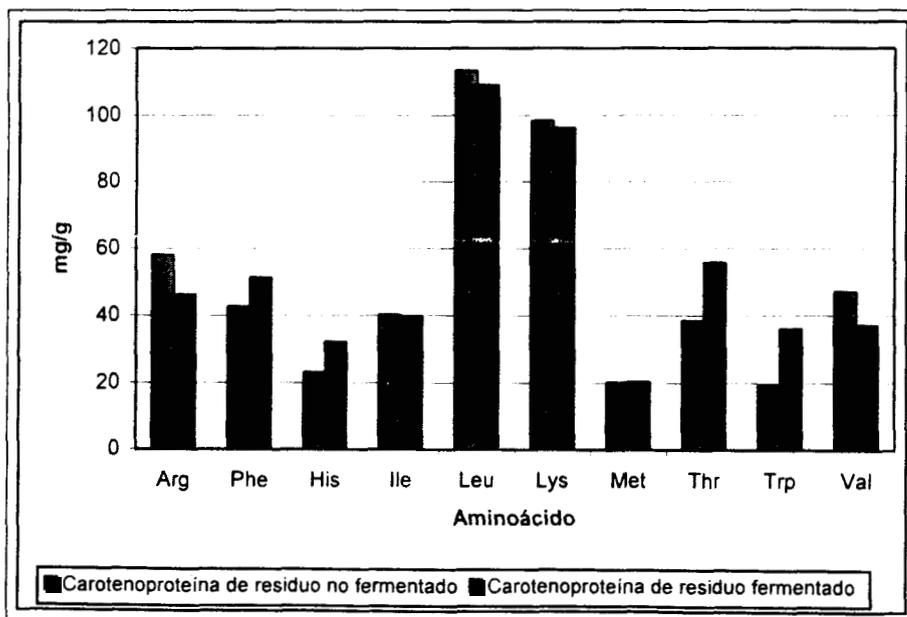


Figura 98. Composición de aminoácidos esenciales.

7.10. Peso molecular de carotenoproteína

Para este análisis se utilizó a la fracción proteica obtenida bajo la acción de celulasa debido a que, de acuerdo a los resultados mostrados en las secciones 7.3.3 y 7.3.4 hubo una disociación de los componentes de la carotenoproteína, sin hidrólisis de esta última.

Al someter a electroforesis la proteína separada por la acción de celulasa se obtuvo el valor correspondiente de R_f que se interpoló en la curva de calibración ($R^2=0.9793$) (anexo 9), obteniendo un peso molecular de 260 kDa. No se observaron otras bandas en el electroforetograma (anexo 9) que indicaran una alta concentración de péptidos de bajo peso molecular, lo cual comprobó la separación de proteína no hidrolizada con una liberación parcial de astaxantina a partir de las carotenoproteínas.

En otros estudios sobre carotenoproteínas, Zagalsky y col. (1995) encontraron un peso molecular de 320 kDa para la carotenoproteína azul α -crustacianina del carapacho de langosta *Homarus gammarus*, estos autores comentan que este compuesto es un oligómero formado por 16 subunidades de apoproteínas de 20 kDa y una molécula de astaxantina por cada subunidad, haciendo un total de 16 moléculas de pigmento por carotenoproteína. Por su parte Nur-E-Borhan y col. (1995) reportaron un peso molecular de 120 kDa para las carotenoproteínas del exoesqueleto del camarón *Litopenaeus monodon*, con seis subunidades de dos o tres pesos moleculares distintos por dos moléculas de astaxantina en cada apoproteína. Otros autores como Weesie y col. (1997) también reportan un peso molecular de 320 kDa para la α -crustacianina, pero formada por ocho unidades de β -crustacianina con dos moléculas de astaxantina por apoproteína; finalmente, para el mismo tipo de complejo, Krawczyk y Britton (2001) reportaron 350 kDa con subunidades de 19-21 kDa y dos moléculas de pigmento en cada monómero.

Muriana y col. (1993) obtuvieron un peso molecular de 280 kDa para carotenoproteínas en el exoesqueleto del camarón *Litopenaeus japonicus*, valor similar al obtenido en la presente tesis como el peso molecular de carotenoproteínas de residuos de camarón fermentado. Finalmente, es necesario estudiar el número de subunidades de apoproteínas que conforman a la carotenoproteína obtenida, así como la proporción estequiométrica pigmento:monómero apoproteico, empleando métodos como resonancia magnética nuclear modelamiento a través de gráficos computacionales.

8. CONCLUSIONES

- El tratamiento con proteasa más eficiente para la hidrólisis de carotenoproteínas fue con 20 UP a pH 8 por 24 horas, obteniendo una hidrólisis del 84.4-86.2% de la proteína y 46.2-48.18 mg/g de pigmentos.
- La combinación proteasa:lipasa más adecuada fue la desarrollada con 15:10 (UP:UL) por 12 horas, alcanzando un 90% de hidrólisis proteica y la cantidad de pigmentos liberados más alta (65.81 mg/g).
- Se comprobó que el tratamiento con celulasa puede lograr una disociación del complejo sin hidrólisis de la proteína, el tratamiento más eficiente fue con 20 BG por 24 horas liberando 32.33 mg/g de carotenos.
- El número de BG anterior combinadas con 10 UL de lipasa mejoró la liberación de los pigmentos totales (38.05 mg/g) en 24 horas.
- Se alcanzó un alto nivel de hidrólisis del complejo disuelto en el sistema de disolventes orgánicos éter de petróleo:acetona:agua, logrando la mayor actividad con 20 UP por 24 horas en el sistema 15:65:20 el cual liberó 54.7 mg/g de pigmentos con 85.1% de hidrólisis proteica.
- Fue posible desarrollar la separación enzimática de la proteína y los pigmentos en un bioreactor enzimático de membrana, encontrando que con 20 UP por 14 horas se consiguió el mayor grado de hidrólisis, 78.8% de proteína y 38.3 mg/g de pigmentos.
- Se recuperó el 98.2% de la fracción proteica en el retenido alcanzando un FC volumétrico de 8.27 mediante una membrana de UF con un PMC de 10.5 kDa instalada en el BEM.
- Se logró separar a los pigmentos a través del permeado de la UF, y posteriormente se concentraron volumétricamente 4.66 veces por OI en el BEM con membrana de 793 Da de PMC.

- Mediante HPLC se obtuvieron los datos referentes a tiempos de retención y curvas de concentración de 11 estándares de pigmentos, además del registro de los cromatogramas de astaxantina sintética y natural.
- La astaxantina sintética fue más estable que la natural; la exposición directa al sol y la temperatura de 45°C provocaron su mayor oxidación. La combinación de luz, oxígeno y alta temperatura fue la que más incidió en la estabilidad del caroteno, siempre presentándose los mayores niveles de degradación particularmente en los tratamientos donde se combinaron la presencia de luz y oxígeno.
- Se analizó la composición en aminoácidos de las carotenoproteínas de residuos de camarón fermentados y no fermentados, ambas fueron ricas en aspartato, glutamato y en los aminoácidos esenciales leucina y lisina (128.1, 142.4, 111.2 y 97.25 mg/g, respectivamente); en cuanto a los demás aminoácidos esenciales las carotenoproteínas de residuos ensilados tuvieron mayores niveles de fenilalanina, histidina, treonina y triptófano (51.3, 32.1, 55.7 y 36 mg/g, respectivamente), mientras que en los residuos no fermentados se encontró en mayor proporción a la arginina (58 mg/g) y valina (47 mg/g).
- El peso molecular de la proteína dissociada del pigmento por celulasa fue de 260 kDa, con lo cual se comprobó que no hubo hidrólisis del complejo, debido a que el peso molecular reportado de la carotenoproteína sin tratamiento enzimático es de 265 kDa aproximadamente.

Las carotenoproteínas de residuos de camarón fermentados pueden representar un valor agregado a la industria camaronícola debido a su alto contenido significativo de astaxantina; también poseen una alta concentración de proteína y bajos contenidos de quitina y cenizas, condiciones que son favorables para la nutrición de salmónidos.

La separación enzimática de los componentes del complejo influye directamente sobre los posibles usos del pigmento, ya que sólo en su forma libre se manifiesta e

incrementa su potencial colorante teniendo una mayor eficiencia de fijación en el músculo de peces, además de que en esta forma se puede utilizar en otro tipo de industrias como de alimentos y cosméticos, e inclusive en la elaboración de productos antioxidantes para el consumo humano que hasta ahora sólo se fabrican con astaxantina extraída de algas.

La purificación y concentración de pigmentos pudieron desarrollarse mediante ultrafiltración seguida de ósmosis inversa en un bioreactor enzimático de membrana, un proceso combinado y accesible al escalamiento. Además del pigmento se obtuvo proteína, que sobre la base de su composición de aminoácidos puede ser una buena fuente de estos compuestos, incluyendo a los esenciales.

La astaxantina natural en general mostró buenos niveles de estabilidad, sin embargo es recomendable realizar estudios dirigidos a mejorarla, posiblemente por medio de la adición de polímeros que funcionen como un vehículo o excipiente que protejan, junto con antioxidantes, a los pigmentos contra promotores oxidantes, sistema empleado en productos comerciales sintéticos.

La cantidad de residuos de camarón en México es abundante, y los resultados de este trabajo pueden establecer bases importantes para su aprovechamiento al mismo tiempo de poder contribuir a la disminución del nivel contaminante que estos desperdicios representan al ser desechados al medio ambiente.

9. RECOMENDACIONES

Se recomienda que estudios futuros se dirijan a la hidrólisis enzimática de carotenoproteínas en el bioreactor enzimático de membrana utilizando el tratamiento más eficiente en la liberación de pigmentos (proteasa:lipasa) y celulasa:lipasa para la disociación del complejo.

Asimismo, el estudiar el efecto de las propiedades físicas de la carotenoproteína utilizada en términos de tamaño de partícula, porosidad de la misma y capacidad de dispersión. Con esto se lograría determinar si es posible mejorar la hidrólisis del complejo, a través del manejo de estas propiedades físicas, bajo las condiciones de hidrólisis establecidas para la enzima y así evaluar la posibilidad de usar menores cantidades de la misma para lograr el mismo grado de separación. De esta forma la competencia entre aspectos catalíticos (caracterizados por la k de velocidad) y de transporte (caracterizados por la difusión) sería asimismo conocida y susceptible de ser utilizada en la evaluación del proceso, su diseño, escalamiento y establecimiento de condiciones de operación.

También hacer estudios para desarrollar el proceso de recuperación de astaxantina y proteína a una mayor escala de operación.

Finalmente, mejorar la estabilidad de la astaxantina natural mediante la adición de vehículos y antioxidantes a los pigmentos recuperados; además desarrollar estudios dirigidos a la evaluación y utilización de los hidrolizados de proteínas como compuestos atractantes.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Agricultural Research Service. 1998. Nutrient data laboratory. USDA-NCC Carotenoid Database for U.S. Foods. Beltsville Human Nutrition Research Center. 173 p.
- Ahumada, E. 1999. Comunicación personal. Granja camaronícola Ahumada. Kilómetro 37.5 de la carretera Guasave-Las Glorias. Guasave, Sinaloa, México.
- Ako, H. y Tamaru, C.S. 1999. Are feeds for Food fish practical for aquarium fish?. *International Aqua Feeds* 2:30-36.
- Alfani, F.L., Cantarella, L., Gallifuoco, A. y Cantarella, M. 1990. Membrane reactors for the investigation of product inhibition of enzyme activity. *Journal of Membrane Science* 52:339-350.
- Álvarez, P., Ramírez, C. y Orbe, A. 1999. Desarrollo de la acuicultura en México y perspectivas de la acuicultura rural. <http://www.red-arpe.ci/paper/doc_04.pdf> Febrero 18, 2001.
- Anónimo. 1975. *Agricultural Handbook. Composition of foods*. U.S. Department of Agriculture. p. 8.
- Anónimo. 1986. Food colors. *Food Technology* 4(1):49.
- Anónimo. 1992. Astaxanthin-technical Q & A. *Infotech International* 6:55.
- Anónimo. 2000. Shrimp, Crab and Crayfish-Decapoda Anatomy and Biology. <<http://www.shrimpcrabsandcrayfish.co.uk>> Junio 23, 2001.
- Anónimo. 2001. Aquarium. Department of Marine Resources of Maine. <http://www.state.me.us/dmr/rm/Aquarium/teachers-guide/sample_pages_of_teachers_guide.htm> Septiembre 21, 2001.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1990. *Official Methods of Analysis*. 15ª edición. Washington, D.C. 537 p.
- Arad, S.M. y Yaron, A. 1992. Natural pigments from red microalgae for use in foods and cosmetics. *Trends in Food Science and Technology* 3:92-97.
- Armenta, R. 1998. Estudios sobre carotenoproteínas extraídas de residuos de camarón fermentados y no-fermentados. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Ciudad de México. 113 p.
- Armenta, R. 1999. Colección fotográfica personal.
- Armenta, R., Guerrero, I. y Huerta, S. 2002. Astaxanthin extraction from shrimp waste by lactic fermentation and enzymatic hydrolysis of the carotenoprotein complex. *Journal of Food Science* 67(2):en prensa.
- Asker, D. y Ohta, Y. 1999. Production of cantaxanthin by extremely halophilic bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 88(6):617-621.
- Badui, S. 1999. *Química de los alimentos*. 3ª edición. Editorial Alhambra. Ciudad de México. 648 p.
- Baker, R.W. 2000. *Membrane Technology and Applications*. McGraw-Hill. Nueva York. 512 p.

- Barbone, F., Franceschi, S., Talamini, R., Barzan, L., Franchin, G., Favero, A. y Carbone, A. 1996. A follow-up study of determinants of second tumor and metastasis among subjects with cancer of the oral cavity, pharynx and larynx. *Journal of Clinical Epidemiology* 49:367-372.
- Batieha, A.M., Armenian, H.K., Norkus, E.P., Morris, J.S., Spate, V.E. y Comstock, G.W. 1993. Serum micronutrients and the subsequent risk of cervical cancer in a population-based nested case-control study. *Cancer Epidemiological Biomarkers Previews* 2:335-339.
- Bélafi-Bakó, K. 2000. Membrane separation processes. En: *Integration of Membrane Processes into Bioconversions*. K. Bélafi-Bakó, L. Gubicza, L. y M. Mulder (Eds.). Kluwer Academic/Plenum Publishers. Nueva York. pp. 3-7.
- Belter, P.A., Cussler, E.L. y Hu, W. 1988. *Bioseparations: Downstream processing for biotechnology*. John Wiley & Sons. Nueva York. pp. 237-270.
- Ben-Amotz, A. y Levy, Y. 1996. Bioavailability of a natural isomer mixture compared with synthetic all-trans β -carotene in human serum. *American Journal of Clinical Nutrition* 63:729-734.
- Bendich, A. 1988. The safety of β -carotene. *Nutrition and Cancer* 11:207-214.
- Binkowski, F.P., Sedmak, J.J. y Jolly, S.O. 1993. An evaluation of *Phaffia* yeast as a pigment source for salmonids. *Aquaculture Magazine* 19:54-59.
- BioPlanet. 2000. Larga vida al salmón.
<http://www.bioplanet.net/magazine/bio_marabr_2000/bio_2000_marabr_reportaje.htm>
Noviembre 27, 2001.
- Bjerkeng, B. Storebakken, T. y Liaaen-Jensen, S. 1992. Pigmentation of rainbow trout from start feeding to sexual maturation. *Aquaculture* 108:333-346.
- Black, H.S. y Chan, J.T. 1975. Suppression of ultraviolet light-induced tumour formation by dietary antioxidants. *Journal of Investigation in Dermatology* 65:412-414.
- Bourges, H. 1983. Valor nutritivo de los alimentos mexicanos; tablas de uso práctico. 8ª edición. En: *Publicación L-12 de la División de Nutrición*. Ciudad de México. 311 p.
- Brielbeck, B., Frede, M. y Steckhan, E. 1994. Continuous electroenzymatic synthesis employing the electrochemical enzyme membrane reactor. *Biocatalysis* 10:49-64.
- Brocklebank, M.P. 1990. Downstream processing plant and equipment. En: *Separation Processes in Biotechnology*. J.A. Asenjo (Ed.): Marcel Dekker. Nueva York. pp. 617-740.
- Buchwald, M. y Jencks, W.P. 1968. Optical properties of astaxanthin solutions and aggregates. *Biochemistry* 7(2):834-843.
- Candelora, E.C., Stockwell, H.G., Armstrong, A.W. y Pinkham, P.A. 1994. Dietary intake and risk of lung cancer in women who never smoked. *Nutrition and Cancer* 17:263-270.
- Cano-López, A., Simpson, B.K. y Haard, N.F. 1987. Extraction of carotenoprotein from shrimp process wastes with the aid of trypsin from Atlantic cod. *Journal of Food Science* 52(2):503-506.
- Carotenoid Society. 1999. <<http://www.carotenoid.uconn.edu>> Mayo, 2001.

- Charley, H. 1987. Tecnología de alimentos. Editorial Limusa. Ciudad de México. pp. 183-185.
- Chen, D.H., Leu, J.C. y Huang, T.C. 1994. Transport and hydrolysis of urea in a reactor-separator combining an anion-exchange membrane and immobilized urease. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 61:351-357.
- Chen, H.M. y 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. y Meyers, S.P. 1984. A rapid quantitative method for determination of astaxanthin pigment concentration in oil extract. *Journal of American Oil Chemistry Society* 61(6):1045-1047.
- Chien, Y. y Jeng, S. 1992. Pigmentation of kuruma prawn, *Penaeus japonicus* Bate, by various pigment sources and levels and feeding regimes. *Aquaculture* 102:333-346.
- Chopra, M., Wilson, R.L. y Thurnham, D.I. 1993. Free radical scavenging ability of lutein *in vitro*. En: Carotenoids in Human Health. L.M. Canfield, N.I. Krinsky y J.A. Olson (Eds.). Annual NY Academic Sciences. Nueva York. pp. 61-67.
- Choubert, G. y Luquet, P. 1983. Utilization of shrimp meal for rainbow trout (*Salmo gairdneri rich*) pigmentation. Influence of fat content of the diet. *Aquaculture* 32:19-26.
- Christiansen, R., Lie, Ø. y Torrissen, O.J. 1995. Growth and survival of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed different dietary levels of astaxanthin: first-feeding fry. *Aquaculture Nutrition* 1:189-198.
- Cross, C.E. 1987. Oxygen radicals and human disease. *Annual Internal Medicine* 107:526-545.
- D'Abanzo, B., Ron, E., La Vecchia, C., Franceschi, S., Negri, E. y Ziegler, R. 1997. Selected micronutrient intake and thyroid carcinoma risk. *Cancer* 79:2186-2192.
- 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.
- Davis, B.H. 1985. Carotenoid metabolism in animals: a biochemist's view. *Pure and Applied Chemistry* 57:679-684.
- de Pee, S., West, C.E., Permaesih, D., Martuti, S. y Hautvast, J. 1998. Orange fruit is more effective than are dark green, leafy vegetables in increasing serum concentrations of retinol and β -carotene in school children in Indonesia. *American Journal of Clinical Nutrition* 68:1058-1067.
- Dorgan, J.F., Sowell, A., Swanson, C.A., Potischman, N., Miller, R., Schussler, N. y Stephenson, H.E. 1998. Relationships of serum carotenoids, retinol, α -tocopherol and selenium with breast cancer risk: results from a prospective study in Columbia, Missouri (United States). *Cancer Causes and Control* 9:89-97.

- Edge, R., McGarvey, D.J. y Truscott, T.G. 1997. The carotenoids as antioxidants – a review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 41:189-200.
- Evers, D.J. y Carroll, D.J. 1996. Preservation of fresh crab or shrimp waste. *Animal Science Feed and Technology* 59:233-244.
- 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*. J.A. Asenjo (Ed.). Marcel Dekker. Nueva York. pp. 209-262.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 1998. Pesca en Estados Unidos de México. <http://www.fao.org/fi/fcp/FICP_MEX_s.asp> Julio 12, 2000.
- FDA (Food and Drug Administration). 2001. Center for food safety & applied nutrition. <<http://www.cfsan.fda.gov>> Noviembre, 2001.
- Fischer, A., Bommarius, A.S., Drauz, K. y Wandrey, C. 1994. A novel approach to enzymatic peptide synthesis using highly solubilizing N^α-protecting groups of amino acids. *Biocatalysis* 8:289-307.
- Flörsheimer, A., Kula, M.R., Schütz, H.J. y Wandrey, C. 1989. Continuous production of kyotorphin. *Biotechnology and Bioengineering* 33:1400-1405.
- Foss, P., Storebakken, T., Schiedt, K., Liaaen-Jensen, S., Austreng, E. y 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.
- Franceschi, S., Bidoli, E., La Vecchia, C., Talamini, R., D'Avanzo, B. y Negri, E. 1994. Tomatoes and risk of digestive tract cancers. *International Journal of Cancer* 59:181-184.
- Francis, F.J. 1987. Lesser-known food colorants. *Food Technology* 4(87):62-63.
- Frankel, E.N. 1995. Natural and biological antioxidants in food and biological systems. Their mechanism of action, applications and implications. *Lipid Technology* 49:77-80.
- Fraser, P.D., Miura, Y. y Misawa, N. 1997. *In vitro* characterization of astaxanthin biosynthetic enzymes. *Journal of Biological Chemistry* 272(10):6128-6135.
- Frazier, W.C. 1993. *Microbiología de los alimentos*. 4^a edición. Editorial Acribia. Madrid. pp. 215-223.
- Fujii, T., Miyawaki, O. y Yano, T. 1991. Modeling of hollow-fiber capillary reactor for the production of L-alanine with coenzyme regeneration. *Biotechnology and Bioengineering* 38:1166-1172.
- García, H., Malcata, F.X., Hill, C.G. y Amundson, C.H. 1992. Use of *Candida rugosa* lipase immobilized in a spiral wound membrane reactor for the hydrolysis of milkfat. *Enzyme and Microbial Technology* 14:535-545.
- Gates, K.W., Parker, A.H., Feng, J., Huang, Y.M. y Rainey, T.L. 1999. Moisture content of commercial shrimp measured by a halogen moisture analyzer and the AOAC vacuum method. En: *Libro de Resúmenes del Congreso Anual del Institute of Food Technologists*. Julio 24-28. Chicago, IL.

- Gehrke, C.W., Wall, L.L., Absheer, J.S., Kaiser, F.E. y Zumwalt, R.W. 1985. Sample preparation for chromatography of amino acids: acid hydrolysis of proteins. *Journal of Association Official Analytical Chemistry* 68(5):811-821.
- Gey, K.F., Stahelin, H.B. y Eichholzer, M. 1993. Poor plasma status of carotene and vitamin C is associated with higher mortality from ischemic heart disease and stroke: Basel prospective study. *Clinical Investigation* 71:3-6.
- Giorno, L., Molinari, R., Drioli, E., Bianchi, D. y Cesti, P. 1995. Performance of a biphasic organic/aqueous hollow fibre reactor using immobilized lipase. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 64:345-352.
- Giovannucci, E., Ascherio, A., Rimm, E.B., Stampfer, M.J., Colditz, G.A. y Willett, W.C. 1995. Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. *Journal of National Cancer Institute* 87:1767-1776.
- Globefish. 1999. Shrimp Analysis.
<<http://www.globefish.org/publications/commodityupdate/199912/shrimp.htm>> Enero 24, 2001.
- Gobantes, I., Choubert, G. y Gómez, R. 1998. Quality of pigmented (astaxanthin and cantaxanthin) rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets stored under vacuum packaging during chilled storage. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 46:4358-4362.
- Goodwin, T.W. 1984. The biochemistry of the carotenoids. Volumen 1. Chapman & Hall. Londres. 375 p.
- Greene, D.H.S. y Selivonchick, D.P. 1987. Lipid metabolism in fish. *Lipid Research* 26:53-85.
- Guillou, A., Choubert, G. y de la Noüe, J. 1993. Separation and determination of carotenoids, retinol, retinal, and their dehydro forms by isocratic reversed-phase HPLC. En: *Analytical Methods Section. Food Chemistry* 476:93-99.
- 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.
- Haard, N.F. y Simpson, B.K. 1994. Proteases from aquatic organisms and their uses in the seafood industry. En: *Fisheries Processing: Biotechnological Applications*. A.M. Martin (Ed.). Chapman & Hall. Londres. pp. 133-154.
- Haila, K. 1999. Effects of carotenoids and carotenoid-tocopherol interaction on lipid oxidation *in vitro*. Tesis Doctoral. University of Helsinki. Helsinki. 64 p.
- Hall, G.M. y De Silva, S. 1994. Shrimp waste ensilation. *Infotish International* 2(94):27-30.
- Handelman, G.F. 1996. Carotenoids as scavengers of active oxygen species. En: *Handbook of Antioxidants*. E. Cadenas y L. Packer (Eds.). Marcel Dekker, Inc. Nueva York. pp. 259-314.
- Handelman, G.J., van Kuijk, F.J., Chatterjee, A. y Krinsky, N.I. 1991. Characterization of products formed during the autooxidation of β -carotene. *Free Radicals in Biological Medicine* 10:427-437.
- Hardy, R.W., Torrissen, O.J. y Scott, T.M. 1990. Absorption and distribution of ^{14}C -labeled cantaxanthin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 87:331-340.

- Henry, B.S. 1996. Natural food colours. En: Natural Food Colorants. G.A.F. Hendry y J.D. Houghton (Eds.). 2^{da} edición. Blackie Academic & Profession. Londres. pp. 40-79.
- Hildebrandt, J.R. 1991. Scale-up and optimization of membrane processes. En: Chromatographic and Membrane Processes in Biotechnology. C.A. Costa y J.S. Cabral (Eds.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Holanda. pp. 415-428.
- Hirschberg, J. 2001. Production of carotenoids (including the ketocarotenoids astaxanthin and adonixanthin) using a novel carotenoid-secreting bacterial species. <<http://www.yissum.co.il/ds11617.htm>> Noviembre 21, 2001.
- Horton, H., Moran, L., Ochs, R., Rawn, J. y Scrimgeour, K. 1993. Bioquímica. Prentice-Hall Hispanoamericana, S.A. Ciudad de México. 736 p.
- Houng, J.Y., Chou, J.Y. y Chen, K.C. 1992. Production of high maltose syrup using an ultrafiltration reactor. Bioprocess Engineering 8:85-90.
- Huang, A.S. y von Elbe, J.H. 1986. Kinetics of the degradation and regeneration of betanine. Journal of Food Science 50:1115-1117.
- Ishiwara, M. 1980. Thermal reaction of β -carotene, part 1. Journal of Analytical Applied Pyrolysis 2:153-161.
- Isono, Y., Nabetani, H. y Nakajima, M. 1995. Wax ester synthesis in a membrane reactor with lipase-surfactant complex in hexane. Journal of American Oil Chemistry Society 72:887-890.
- Jacques, P.F., Chylack, L.T., McGandy, R.B. y Hartz, S.C. 1998. Antioxidant status in persons with and without senile cataract. Archives of Ophthalmology 106:337-340.
- Jain, M., Burch, J.D., Howe, G.R., Risch, H.A. y Miller, A.B. 1990. Dietary factors and risk of lung cancer: results from a case-control study. International Journal of Cancer 45:287-293.
- 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. Londres. pp. 273-275.
- Jencks, W.P. y Buten, B. 1964. The denaturation of crustacyanin. Archives of Biochemistry Biophysical 107:511-520.
- Johnson, E.A. y An, G.H. 1991. Astaxanthin from microbial sources. Critical Reviews in Biotechnology 11(4):297-326.
- Johnson, E.A., Villa, T.G. y Lewis, M.J. 1980. *Phaffia rhodozyma* as an astaxanthin source in salmonid diets. Aquaculture 20:123-134.
- Jumaan, A.O., Holmberg, L., Zack, M., Mokdad, A.H., Ohlander, S.M., Wolk, A. y Byers, T. 1999. β -carotene intake and risk of postmenopausal breast cancer. Epidemiology 10:49-53.
- Jyonouchi, H. 1995. Astaxanthin, a carotenoid without vitamin A activity, augments antibody responses in cultures including T-helper cell clones and suboptimal doses of antigen. Journal of Nutrition 125:2483-2492.

- Kanner, J. 1978. Carotene oxidizing factors in red pepper fruits (*Capsicum annum* L.); oleoresin-cellulose solid model. *Journal of Food Science* 43:148-154.
- Katayama, T. 1972. The transformation of labeled astaxanthin from the diet of Sea bream, *Chrysophrys major* Temminck and Schegel, to their body astaxanthin. *Bulletin of Japanese Society of Science and Fisheries* 38: 1349-1403.
- Kearsley, T.A. y Rodríguez, N. 1981. The stability and use of natural colours in foods: anthocyanin, β -carotene and riboflavin. *Journal of Food Technology* 16:421-431.
- Kennedy, G. 1979. Pigments of marine invertebrates. *Advances in Marine Biology* 16:309-381.
- Kida, K., Morimura, S., Noda, J., Nishida, Y., Imai, T. y Otagiri, M. 1995. Enzymatic hydrolysis of the horn and hoof of cow and buffalo. *Journal of Fermentation Bioengineering* 80:478-484.
- Kitahara, T. 1984. Carotenoids in the Pacific salmon during the marine period. *Compendium of Biochemical Physiology* 78B:859-862.
- Kohlmeier, L., Kark, J.D., Gomez-Garcia, E., Martin, B.C., Steck, S.E., Kardinaal, A.F.M., Ringstad, J., Thamn, M., Mashev, V., Riemersma, R., Martin-Moreno, J.M., Huttunen, J.K. y Kok, F.J. 1997. Lycopene and myocardial infarction risk in the euramic study. *American Journal of Epidemiology* 146: 618-626.
- Krawczyk, S. y Britton, G. 2001. A study of protein-carotenoid interactions in the astaxanthin-protein crustacyanin by absorption and stark spectroscopy; evidence for the presence of three spectrally distinct species. *Biochimica et Biophysica Acta* 1544:301-310.
- Krinsky, N.I. 1994. The biological properties of carotenoids. *Pure Applied Chemistry* 66:1003-1010.
- Kune, G.A., Kune, S., Watson, L.F., Pierce, R., Field, B., Vitetta, L., Marenstein, D., Hayes, A. y Irving, L. 1989. Serum levels of β -carotene, vitamin A and zinc in male lung cancer cases and controls. *Nutrition and Cancer* 12:169-176.
- Kunitz, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. *Journal of General Physiology* 30:291-310.
- Labeque, R., Mullon, C.J.P., Ferreira, J.P.M, Lees, R.S. y Langer, R. 1993. Enzymatic modification of plasma low density lipoproteins in rabbits: a potential treatment for hypercholesterolemia. *Proceedings of National Academic Science of USA* 90:3476-3480.
- Lakshman, M.R. y Okoh, C. 1993. Carotenoid-protein complexes. En: *Methods in Enzymology*. Volumen 214. L. Packer (Ed.). Academic Press, Inc. San Diego, CA. pp. 74-86.
- Lee, K.S. 1986. Evaluation of crawfish astaxanthin as a natural red pigmenter of egg yolk. *Poultry Science* 65(1):177-178.
- Loeb, S. y Sourirajan. 1963. Sea water demineralization by means of an osmotic membrane. En: *Saline Water Conversion-II. Advances in Chemistry Series Number 28*. American Chemical Society. Washington. 193 p.
- Lonsdale, H.K. 1982. The growth of membrane technology. *Journal of Membrane Science* 10:81-181.

- Lorenz, R.T. y Cysewski, R. 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends in Biotechnology* 18:160-167.
- Lozano, P., Manjón, A. Iborra, J.L., Canovas, M. y Romojaro, F. 1990. Kinetic and operational study of cross-flow reactor with immobilized pectolytic enzymes. *Enzyme and Microbial Technology* 12:499-505.
- Mabry, T. J. 1966. The betacyanins and betaxanthins. En: *Comparative Phytochemistry*. Academic Press. Londres. 286 p.
- Mackie, I.M., Hardy, R. y Hobbs, G. 1971. *Fermented Fish Products*. FAO. Roma. pp. 45-47.
- Mathur, L. y Narang, R. 1990. Shrimp composition. *Aquaculture Digest*. Enero. p. 28.
- Matson, S.L. y Quinn, J.A. 1992. Membrane reactors. En: *Membrane Handbook*. W.S. Ho y K.K. Sirkar (Eds.). van Nostrand Reinhold. Nueva York. pp. 809-832.
- Matsumoto, M., Kida, K. y Kondo, K. 2001. Enhanced activities of lipase pretreated with organic solvents. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 76:1070-1073.
- Mauguin, S. y Novel, G. 1994. Characterization of lactic bacteria isolated from seafood. *Journal of Applied Bacteriology* 76:616-625.
- Mayne, S.T., Janerich, D.T., Greenwald, P., Chorost, S., Tucci, C., Zaman, M.B., Melamed, M.R., Kieley, M. y McKneally, M.F. 1994. Dietary β -carotene and lung cancer risk in U.S. nonsmokers. *Journal of National Cancer Institute* 86:33-38.
- Menasveta, P., Worawattanamateeku, W., Latscha, T. y Clark, J.S. 1993. Correction of black tiger prawn (*Penaeus monodon* Fabricius) coloration by astaxanthin. *Aquacultural Engineering* 12:203-213.
- 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. 1994. Developments in world aquaculture, feed formulations, and role of carotenoids. *Pure and Applied Chemistry* 66(5):1069-1076.
- 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. Biological functions and activities of carotenoids. *Pure and Applied Chemistry* 63:141-146.
- Milicua, J.C.G. Barandiarán, A., Macarulla, J.M., Gárate, A.M. y Gómez, R. 1985. Structural characteristics of the carotenoids binding to the blue carotenoprotein from *Procambarus clarkii*. *Experientia* 41:1485-1486.
- Mills, D. 1989. *Ecology and management of Atlantic salmon*. Chapman & Hall, Ltd. Londres. 237 p.
- Mitchell, D.A. y Lonsane, B.K. 1992. Definition, characteristics and potential. En: *Solid Substrate Cultivation*. H.W. Doelle, D.A. Mitchell y C.E. Rolz (Eds.). Elsevier Science Publishers, Ltd. Londres. pp. 1-13.

- Moo-Young, M., Moreira, A.R. y Tengerdy, R.P.: 1983. Principles of solid-substrate fermentation. En: *The Filamentous Fungi*. Volumen 4. J.E. Smith, D.R. Berry y B. Kristiansen (Eds.). Edward Arnold. Londres. pp. 117-144.
- Mordi, R.C., Walton, J.C., Burton, G.W., Hughes, L., Ingold, K.U., Lindsay, D.A. y Moffatt, D.J. 1993. Oxidative degradation of β -carotene and β -apo-8'-carotenal. *Tetrahedron Letters* 49:911-928.
- Morgado, M.A.P., Cabral, J.M.S. y Prazeres, D.M.F. 1996. Phospholipase A2-catalysed hydrolysis of lecithin in a continuous reversed micellar membrane reactor. *Journal of American Oil Chemistry Society* 73:337-348.
- Mori, T., Makabe, K., Yamaguchi, K., Konosu, S. y Arai, S. 1989. Comparison between krill astaxanthin diester and synthesized free astaxanthin supplemented to diets in their absorption and deposition by juvenile salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Compendium of Biochemical Physiology* 93B:255-258.
- Morris, D.L., Kritchevsky, S.B. y Davis, C.E. 1994. Serum carotenoids and coronary heart disease – the lipid research clinics coronary primary prevention trial and follow-up study. *Journal of American Medical Association* 272:1439-1441.
- Mulder, M.H.V. 1996. Basic principles of membrane technology. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Holanda. 365 p.
- Muriana, F.J., Ruíz-Gutiérrez, V., Gallardo-Guerrero, L. y Mínguez-Mosquera, M. 1993. A study of the lipids and carotenoprotein in prawn, *Penaeus japonicus*. *Journal of Biochemistry* 114(2):223-229.
- Nakajima, M., Shoji, T. y Nabetani, H. 1992. Protease hydrolysis of water soluble fish proteins using a free enzyme membrane reactor. *Process Biochemistry* 27:155-160.
- Negri, E., La Vecchia, C., Franceschi, S., Levi, F. y Parazzini, F. 1996. Intake of selected micronutrients and the risk of endometrial carcinoma. *Cancer* 77:917-923.
- Nelis, H.J., Lavens, P., Monees, L., Sorgeloos, P. y De Leenheer, A.P. 1989. Carotenoids in relation to *Artemia* development. En: *Biochemistry and Cell Biology of Artemia*. T.H. McRae, J.C. Bagshaw y A.H. Warner (Eds.). CRC Press. Boca Ratón, FL. pp. 292-301.
- Notimex. 1999. Invierte Ocean Garden 15 MDD en desarrollo. *El Financiero*. Sección de negocios. Junio 16. Ciudad de México. p. 33.
- Nova Scotia Department of Fisheries and Aquaculture. 1999. Nova Scotia Aquaculture Development Strategy. <<http://198.166.215.5/fish/aquaculture/strategy/salmon.htm>> Octubre 12, 2000.
- Novo Nordisk. 1998. Hojas técnicas de Savinase^{MR} (B 345e-GB), Lipolase^{MR} (B 434d-GB) y Viscozyme^{MR} L (B 456b-GB). Bagsvaerd, Dinamarca.
- Nur-E-Borhan, S.A., Okada, S., Watabe, S. y Yamaguchi, K. 1995. Carotenoproteins from the exoskeleton and the muscular epithelium of the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Fisheries Science* 61(2):337-343.
- O'Connor, I. y O'Brien, N. 1998. Modulation of UVA light-induced oxidative stress by β -carotene, lutein and astaxanthin in cultured fibroblasts. *Journal of Dermatological Science* 16:226-230.

- Okada, S., Nur-E-Borhan, S.A. y Yamaguchi, K. 1994. Carotenoid composition in the exoskeleton of commercial black tiger prawns. *Fisheries Science* 60:213-315.
- 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.
- Oshima, T. 1998. Recovery and use of nutraceutical products from marine resources. *Food Technology* 52(6):50-54.
- Owens, J.D. y Mendoza, L.S. 1985. Enzymically hydrolysed and bacterially fermented fishery products. *Journal of Food Technology* 20:273-293.
- Palan, P.R., Mikhail, M.S., Basu, J. y Romney, S.L. 1991. Plasma levels of antioxidant β -carotene and α -tocopherol in uterine cervix dysplasias and cancer. *Nutrition and Cancer* 15:13-20.
- Peng, Y.M., Peng, Y.S., Childers, J.M., Hatch, K.D., Roe, D.J., Lin, Y. y Lin, P. 1998. Concentrations of carotenoids, tocopherols and retinol in paired plasma and cervical tissue of patients with cervical cancer, precancer and noncancerous diseases. *Cancer Epidemiological Biomarkers Previews* 7:347-350.
- Pérez, J.A., Fernández, J. y Sayas E. 2000. Fundamentos físicos, químicos, ultraestructurales y tecnológicos en el color de la carne. En: *Nuevas Tendencias en la Tecnología e Higiene de la Industria Cárnica*. M.R. Rosmini, J.A. Pérez-Álvarez y J. Fernández-López (Eds.). Universidad Miguel Hernández. Orihuela, España. pp. 51-71.
- Peters, J. y Kula, M.R. 1991. Continuous production of NADPH with thermostable secondary alcohol dehydrogenase in an enzyme membrane reactor. *Biotechnology Applied Biochemistry* 13:363-370.
- Peterson, G.L. 1977. A simplification of the protein assay of Lowry *et al.*, which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry* 83:346-356.
- Pfander, H. 1992. Carotenoids: An Overview. En: *Methods in Enzymology*. Vol. 213. L. Packer (Ed.). Academic Press, Inc. San Diego, CA. pp. 14-31.
- Potishchman, N., McCulloch, C.E., Byers, T., Nemoto, T., Stubbe, N., Milch, R., Parker, R., Rasmussen, K.M., Root, M., Graham, S. y Campbell, T.C. 1990. Breast cancer and dietary and plasma concentrations of carotenoids and vitamin A. *American Journal of Clinical Nutrition* 52:909-915.
- Prazeres, D. M. F. y Cabral, J. M. S. 1998. Enzymatic membrane bioreactors: current state of the art and future prospects. En: *Recent Advances in Marine Biotechnology. Volumen 2: Environmental Biotechnology*. M. Fingerman, R. Nagabhushanam y M.F. Thompson (Eds.). Oxford & IBH Publishing Co., Ltd. Nueva Delhi. pp. 182-223.
- Prazeres, D.M.F. y Cabral, J.M.S. 1994. Enzymatic membrane bioreactors and their applications. *Enzyme and Microbial Technology* 16:738-750.

- Prazeres, D.M.F., García, F.A.P. y Cabral, J.M.S. 1993. Ultrafiltration membrane reactor for the lipolysis of olive oil in reversed micellar media. *Biotechnology and Bioengineering* 41:761-770.
- Pszczola, D. 1998. Natural colors: pigments of imagination. *Food Technology* 52(6):70-76.
- Ramaswamy, P.G., Krishnamoorthy, L., Rao, V.R. y Ghargava, M.K. 1990. Vitamin and provitamin A levels in epithelial cancer: a preliminary study. *Nutrition and Cancer* 14:273-276.
- Ranby, B. y Rabek, J.F. 1978. Singlet oxygen. Wiley. Londres. 178 p.
- Rautenbach, R. y Albrecht, R. 1989. Membrane processes. John Wiley & Sons. Nueva York. 459 páginas.
- Ruello, N. 1976. Biological characteristics of Australian prawns. *Australian Fisheries*. Febrero. pp. 4-9.
- Sánchez, M. 1999. Amenazados, los productos finitos de las profundidades acuáticas. *El Financiero*. Sección de Economía. Junio 9. Ciudad de México. pp. 20-21.
- Sannier, E., Piot, J.M., Dhuslter, P. y Guillochon, D. 1994. Stability of a mineral membrane ultrafiltration reactor for peptic hydrolysis of hemoglobin. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 61:43-47.
- Santos, J.A.L., Mateus, M. y Cabral, J.M.S. 1991. Pressure driven membrane processes. En: *Chromatographic and Membrane Processes in Biotechnology*. C.A. Costa y J.S. Cabral (Eds.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Holanda. pp. 177-205.
- SAS (Statistical Analysis System) Institute. 2000. Manual del usuario del software para windows versión 2000. Cary, Carolina del Norte. 219 p.
- Schiedt, K. 1987. Absorption, retention and metabolic transformations of carotenoids in chicken, salmonids and crustacea. Tesis Doctoral. Norwegian Institute of Technology. University of Trondheim. Oslo-Basilea. 91 p.
- Schiedt, K., Bischof, S. y Glinz, E. 1993. Metabolism of carotenoids and *in vivo* racemization of (3S,3'S)-astaxanthin in the crustacean *Penaeus*. En: *Methods in Enzymology*. Volumen 214. L. Packer (Ed.). Academic Press, Inc. San Diego, CA. pp. 148-168.
- Schiedt, K., Leuenberger, P.J., Vecchi, M. y Glinz, E. 1985. Adsorption, retention and metabolic transformations of carotenoids in rainbow trout, salmon and chicken. *Pure and Applied Chemistry* 57(5):685-692.
- Schiedt, K., Vecchi, M. y Glinz, E. 1986. Astaxanthin and its metabolites in wild rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Compendium of Biochemical Physiology* 83B(1):9-12.
- Schroder, K.E., Clausen, E., Sandberg, A.M. y Raa, J. 1980. Psychrotrophic *Lactobacillus plantarum* from fish and its ability to produce antibiotic substance. En: *Advances in Fish Science and Technology*. Connel y J.J. Farnham (Eds.). Fishing News Books, Ltd. Londres. pp. 480-483.
- Secretaría de Salud. 2000. Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-035-SSA2-2000, Prevención y control de enfermedades en la perimenopausia y postmenopausia de la mujer. Criterios para brindar la atención médica. <<http://www.ci.shcp.mx/indice/dof/documentos/2001/marzo/08032001/salud08mar01.html>> Diciembre 2, 2001.

- Seddon, J.M., Ajani, U.A., Sperduto, R.D., Hiller, R., Blair, N., Burton, T.C., Farber, M.D., Gragoudas, E.S., Haller, J., Miller, D.T., Yannuzzi, L.A. y Willett, W. 1994. Dietary carotenoids, vitamins A, C and E and age-related macular degeneration. *Journal of American Dietary Association* 272:1413-1420.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2001. Anuario estadístico de pesca. Ciudad de México. 142 p.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2002. Anuario estadístico de pesca. Ciudad de México. 125 p.
- Serralheiro, M.L., Prazeres, D.M.F. y Cabral, J.M.S. 1994. Dipeptide synthesis in a reversed micellar membrane reactor with precipitation. *Enzyme and Microbial Technology* 16:1064-1073.
- Shahidi, F. y Brown J.A. 1998. Carotenoids pigments in seafoods and aquaculture. *Critical Reviews in Food Science* 38(1):1-67.
- Sheehan, E.M., O'Connor, T.P., Sheehy, P.J.A., Buckley, D.J. y Fitzgerald, R. 1998. Stability of astaxanthin and cantaxanthin in raw and smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) during frozen storage. *Food Chemistry* 63(3):313-317.
- Shimidzu, N. 1996. Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms. *Fisheries Science* 62:134-137.
- Sigurgisladottir, S., Parrish, C.C., Lall, S.P. y Ackman, R.G. 1994. Effects of feeding natural tocopherols and astaxanthin on Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillet quality. *Food Research International* 27:23-32.
- Silva, M.C.B.M. 1990. Optimization of a continuous membrane bioreactor for the saccharification of starch using temperature as a control variable: experimental study and simulation analysis. Tesis Doctoral. University of Reading. Reading. 83 p.
- Simpson, B.K. y Haard, H.F. 1985. The use of proteolytic enzymes to extract carotenoproteins from shrimp wastes. *Journal of Applied Biochemistry* 7:212-217.
- Simpson, K.L. 1983. Relative value of carotenoids as precursors of vitamin A. *Annual Publication of Nutrition Society* 42:7.
- Sivtseva, L.V. 1982. Qualitative composition and distribution of carotenoids and vitamin A in the organs and tissues of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Ichthyology* 22(1):96-101.
- Smith, W., Mitchell, P., Webb, K. y Leeder, S.R. 1999. Dietary antioxidants and age-related maculopathy-the blue mountains eye study. *Ophthalmology* 106:761-767.
- Somogyi, F. y Nelson, A. 1944. Determination of β -glucanase activity. *Journal of Biological Chemistry* 153:375-378.
- Sonomoto, K. y Okamoto, Y. 1995. An integrated bioreactor system for biological active peptides from isolated soybean proteins. *Annual N.Y. Academic Sciences* 750:435-440.
- Spinelli, J. y Mahnken, C. 1978. Carotenoid deposition in pen-reared salmonids fed diets containing oil extracts of red crab (*Pleuroncodes planipes*). *Aquaculture* 13:213-223.

- Steel, R.G. y Torrie, J.H. 1988. Bioestadística: principios y procedimientos. 2ª edición. McGraw-Hill. Ciudad de México. 884 p.
- Storebakken, T. y No, H.K. 1992. Pigmentation of rainbow trout. *Aquaculture* 100:209-229.
- Strathmann, H. 1991. Fundamentals of membrane separation processes. En: *Chromatographic and Membrane Processes in Biotechnology*. C.A. Costa y J.S. Cabral (Eds.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Holanda. pp. 153-175.
- Street, D.A., Comstock, G.W., Salkeld, R.M. Schuep, W. y Klag, M.J. 1994. Serum antioxidants and myocardial infarction – are low levels of carotenoids and α -tocopherol risk factors for myocardial infarction?. *Circulation* 90:1154-1161.
- Tanaka, T. 1994. Chemoprevention of mouse urinary bladder carcinogenesis by the naturally occurring carotenoids astaxanthin. *Carcinogenesis* 15:15-19.
- Tanigaki, M., Sakata, M. y Wada, H. 1993. Hydrolysis of soybean oil by lipase with a bioreactor having two different membranes. *Journal of Fermentation Bioengineering* 75:53-57.
- Tejeda, A., Montesinos, R.M y Guzmán, R. 1995. *Bioseparaciones*. Editorial Unison. Hermosillo, Sonora, México. 842 p.
- Teutonico, K.A. y Knorr, D. 1985. Amaranth: composition properties, applications of a rediscovered Food crop. *Food Technology* 39(4):49-51.
- 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.
- Torrissen, O.J., Hardy, R.W. y Shearer, K.D. 1989. Pigmentation of salmonids-carotenoid deposition and metabolism. *Critical Reviews in Aquatic Sciences* 1(2):209-225.
- Turujman, S.A., Wamer, W.G., Wei, R.R. y Albert, R.H. 1997. Rapid chromatographic method to distinguish wild salmon from aquacultured salmon fed synthetic astaxanthin. *Journal of AOAC International* 80(3):622-632.
- Tutunjian, R.S. 1985. Ultrafiltration processes in biotechnology. En: *Comprehensive Biotechnology*. M.Y. Murray (Ed.). Pergamon Press. Nueva York. pp. 411-437.
- van den Berg, H. 1999. Carotenoid interactions. *Nutrition Reviews* (57)1:1-10.
- van het Hof, K.H., Gaertner, C., West, C.E. y Tijburg, L.B.M. 1998. Potential of vegetable processing to increase the delivery of carotenoids to man. *International Journal of Vitamin Nutrition Research* 68:366-370.
- Vasconcellos, J.A. 2001. Alimentos Funcionales. Coceptos y Beneficios para la Salud. <http://www.worldfoodscience.org/vol1_3/feature-3a.html> Diciembre 14, 2001.
- VERIS Research Information Service. 1999. Carotenoids fact book. LaGrange, IL. 39 p.
- Wathne, E., Bjerkeng, B., Storebakken, T., Vassvik, V. y Odland, A.B. 1998. Pigmentation of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) fed astaxanthin in all meals or in alternating meals. *Aquaculture* 159:217-231.

- Weesie, R.J., Jansen, F.J.H.M., Merlin, J.C., Lugtenburg, J., Britton, G. y Groot, H.J.M. 1997. ^{13}C magic angle spinning NMR analysis and quantum chemical modeling of the bathochromic shift of astaxanthin in α -crustacyanin, the blue carotenoprotein complex in the carapace of the lobster *Homarus gammarus*. *Biochemistry* 36:7288-7296.
- Wissgott, U. y Bortlik, K. 1996. Prospects for new natural food colorants. *Trends in Food Science and Technology* 7:298-302.
- Woo, G.J. y McCord, J.D. 1994. Bioconversion of starches into maltotetraose using *Pseudomonas stutzeri* maltotetrahydrolase in a membrane recycle bioreactor: effect of multiple enzyme systems and mass balance study. *Enzyme and Microbial Technology* 16:1016-1020.
- Yamada, S. 1990. Pigmentation of prawn (*Penaeus japonicus*) with carotenoids. I. Effect of dietary astaxanthin, β -carotene and cantaxanthin on pigmentation. *Aquaculture* 87:323-330.
- Yamauchi, R., Miyake, N., Inoue, H. y Kato, K. 1993. Products formed by peroxy radical oxidation of β -carotene. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 41:708-713.
- Yuan, J.P. y Chen, F. 1999. Isomerization of *trans*-astaxanthin to *cis*-isomers in organic solvents. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 47:3656-3660.
- Zagalsky, P. 1997. Peter Zagalsky, Ph.D. <<http://www.bl.rhbc.ac.uk/staff/pzagalsky.html>> Enero 24, 2001.
- Zagalsky, P.F., Mummery, R.S., Eliopoulos, E.E. y Findlay, J.B.C. 1990. The quaternary structure of the lobster carapace carotenoprotein, crustacyanin: studies using cross-linking agents. *Compendium of Biochemical Physiology* 97B(4):837-848.
- Zagalsky, P.F., Mummery, R.S., Eliopoulos, E.E. y Keen, J.N. 1995. Crustacyanin, the lobster carapace astaxanthin-protein: effects of modification of tyrosine residues of apocrustacyanin with tetranitromethane on the ability of the protein to reconstitute astaxanthin. *Compendium of Biochemical Physiology* 110B(2):393-401.
- Zhang, S., Hunter, D.J., Forman, M.R., Rosner, B.A., Speizer, F.E., Colditz, G.A., Manson, J.E., Hankinson, S.E. y Willett, W.C. 1999. Dietary carotenoids and vitamins A, C and E and risk of breast cancer. *Journal of National Cancer Institute* 91:547-556.
- Zhao, Q., Piot, J.M., Sannier, F. y Guillochon, D. 1995. Peptic hemoglobin hydrolysis in an ultrafiltration reactor at pilot scale reactor at pilot scale generates opioid peptides. *Annual N.Y. Academic Sciences* 750:452-458.
- Ziegler, R.G. y Subar, A.F. 1991. Vegetables, fruits and carotenoids and the risk of cancer. En: *Micronutrients in Health and in Disease Prevention*. A. Bendich y C.E. Jr Butterworth (Eds.). Marcel Dekker, Inc. Nueva York. pp. 97-126.

11. ANEXOS



ANEXO 1:

Actividad enzimática de proteasa

Una vez que se tuvo preparado el sustrato para la determinación de las UP, se procedió de la siguiente manera:

1. Se rotularon seis tubos de ensayo, dos de muestra, dos para blancos y dos para testigos, se les adicionó un mL de sustrato a cada uno y se incubaron a 40°C en baño de agua.
2. A los marcados como muestras se les agregó 0.15 mL de enzima, y en el caso de los blancos, solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M.
3. Se incubó por 20 minutos a 40°C.
4. Se adicionaron 2 mL de solución al 5% (p/v) de ácido tricloroacético (ATC) a todos los tubos para detener la reacción enzimática.
5. A los tubos testigos se les agregó 0.15 mL de enzima después de la adición de ATC, para estandarizar a cero la proteína de la propia enzima.
6. Se agitaron los tubos y se tomaron 1.5 mL para depositarlos en viales.
7. Se centrifugaron los viales por 15 minutos a 12,000 rpm en microcentrífuga para viales Sorvall^{MR} MC12C.
8. Se midió absorbancia de los sobrenadantes a $\lambda=280$ nm.

Se obtuvo un promedio de las dos repeticiones para conocer la absorbancia del ensayo enzimático.

$$\text{Abs. del ensayo enzimático} = \text{Abs. de la muestra} - \text{Abs. del testigo}$$

Con la cual se conoció el número de UP de la dilución enzimática empleada, y la cantidad de proteína en la dilución para obtener la cantidad de enzima necesaria, en mg/L, para alcanzar las UP requeridas.

ANEXO 2:

Determinación de proteína soluble

Reactivos

Reactivo A. Se mezclaron partes iguales (25% de cada una) de los siguientes componentes:

- 125 mL de agua destilada
- 125 mL de solución CTC (carbonato tartrato de cobre) la cual se preparó con la mezcla de dos soluciones, la primera formada con 12.5 g de Na_2CO_3 disueltos en 62.5 mL de agua destilada, y la segunda con 0.125 g de CuSO_4 y 0.25 g de tartrato de potasio disueltos ambos en 62.5 mL de agua destilada.
- Solución al 10% de SDS
- Solución 0.8 N de NaOH

Este reactivo se mantiene estable al menos por dos semanas a temperatura de 20°C.

Reactivo B. Reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma) diluido 1:1 con agua destilada, el cual es estable a temperatura de 20°C en recipiente de cristal ámbar.

Se agregó 1 mL del reactivo A a las muestras o en su caso solución patrón, se mezclaron y se dejaron reposar por 10 minutos a 25°C. Posteriormente se agregaron 0.5 mL del reactivo B, agitando con la ayuda de mezclador Super-Mixer Lab-Line modelo 1290 (Melrose Park, Illinois). Después los tubos se dejaron reposar por 30 minutos a 25°C en la oscuridad para posteriormente leer absorbancia a $\lambda=750$ nm.

ANEXO 3:

Actividad enzimática de lipasa

Reactivos

Reactivo emulsificante. Se pesaron 4.475 g de NaCl y 0.1025 g de KH_2PO_4 y se pusieron en un vaso de precipitado de 500 mL, posteriormente se agregaron 100 mL de agua destilada y 135 mL de glicerol bajo agitación vigorosa esparciendo 1.5 g de goma arábica (Sigma) dentro de la solución, continuando la agitación hasta completar la disolución. La solución se transfirió a un matraz aforado de 250 mL y se completó ese volumen con agua destilada. Este reactivo puede permanecer estable a temperatura ambiente hasta por un mes.

Sustrato de tributirina 0.16 M (emulsión). Se preparó mezclando 7.5 mL (5%) de tributirina (Sigma), 117.5 mL (78.33%) de agua destilada y 25 mL (16.66%) del reactivo emulsificante en un vaso de precipitado de 250 mL, y posteriormente se llevó a cabo una homogenización de la emulsión, utilizando un homogenizador ESGE modelo 133/1281-0 (Basilea, Suiza), durante 2.5 minutos. La emulsión se transfirió a un recipiente de cristal color ámbar. Esta solución es estable sólo por un día.

El procedimiento que se siguió para la determinación de las UL se desarrolló por duplicado de la siguiente manera:

1. Se colocaron 30 mL de sustrato (tributirina 0.16 M) en un recipiente con agitación vigorosa constante.
2. Se precalentó el sustrato por 3 minutos a 30°C .
3. Se sumergió el electrodo del potenciómetro dentro del sustrato.
4. Se adaptó una bureta de titulación con NaOH 0.05 N
5. El pH se ajustó a 7 con la solución alcalina, después el volumen consumido de la bureta se reajustó a cero.
6. Se adicionaron 2 mL de solución enzimática.
7. La acción lipolítica se desarrolló durante 5 minutos.

8. Inmediatamente después de ese tiempo se inició la titulación con NaOH 0.05 N hasta la obtención de pH 7 nuevamente.
9. Se observó el volumen del titulante consumido para sustituirlo en la fórmula indicada abajo.

$$UL/mL = (\text{Volumen consumido de la soln. titulante en mL} \star \text{Dilución de la enzima}) / 0.1$$

ANEXO 4:

Actividad enzimática de celulasa

Reactivos

Búfer de fosfatos Sørensen 1/30 M, pH 7. Para preparar 250 mL se pesaron 1.26 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 0.168 de KH_2PO_4 y se colocaron en un matraz aforado completando el volumen con agua destilada.

Sustrato de β -glucano al 1%. Se pesaron 125 mg de β -glucano (de cebada, Sigma) en un vaso de precipitado y se agregaron 12.5 mL de búfer de fosfatos Sørensen 1/30 M a pH 7.5, disolviéndose con agitación y calentamiento a 60°C aproximadamente. Al enfriarse a temperatura ambiente se verificó que el pH estuviera en 7.5. El tiempo de almacenamiento sugerido es de un día.

Reactivo de Somogyi. En un recipiente de cristal color ámbar se pesaron 7.02 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 8 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 100 mL de agua destilada y 20 g de NaOH 1 N y $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, los cuales fueron disueltos en una solución de 36 g de sulfato de sodio anhidro en 200 mL de agua destilada.

Reactivo de Nelson. Se pesaron 6.25 g de molibdato de amonio y se disolvieron en 112.5 mL de agua destilada con 5.25 mL de H_2SO_4 . A esta solución se le agregó otra compuesta por 0.75 g de arsenato disódico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) disuelto en 125 mL de agua. La solución resultante se incubó a 37°C por 24-48 horas, y después se depositó en un recipiente de cristal color ámbar.

Solución-reserva de glucosa al 2%. En un matraz aforado de 100 mL se pusieron 2 g de glucosa anhidra y se completó el volumen con agua destilada.

Solución estándar de glucosa (0.15 mg/mL). Se tomaron 0.75 mL de la solución-reserva de glucosa y se adicionaron a 100 mL de agua destilada en un matraz aforado de 100 mL. Se recomienda preparar esta solución a diario.

Los pasos que se siguieron para la determinación de las BG fueron:

1. Se rotularon 5 tubos de ensayo con las letras *M*, *BM*, *BS*, *E* y *B* respectivamente, donde: *M* = *muestra* (sustrato de β -glucano más solución enzimática); *BM* = *blanco de la muestra* (búfer de fosfatos Sørensen más solución enzimática); *BS* = *blanco del sustrato* (β -glucano más agua destilada); *E* = *estándar* (solución de glucosa); y *B* = *blanco* (agua destilada).
2. A los tubos *M* y *BS* se les agregó 0.25 mL de sustrato, a *BM* 0.25 mL de búfer de fosfatos Sørensen 1/30 M a pH 7.5, a *E* 0.5 mL de solución de glucosa (0.15 mg/mL), y a *B* 0.5 mL de agua destilada.
3. A *M* y *BM* se les adicionó 0.25 mL de la solución enzimática, y a *BS* 0.25 mL de agua destilada.
4. A los 30 minutos se agregó 0.5 mL del reactivo de Somogyi a todos los tubos.
5. Los tubos se agitaron y se cerraron con esferas de plástico Kjeldhal.
6. Todos los tubos se colocaron en agua hirviendo por 20 minutos.
7. Ya que se enfriaron a temperatura ambiente, se les agregó 0.5 mL del reactivo de Nelson, retirando las esferas Kjeldhal justo antes de la adición.
8. Los tubos se agitaron hasta disolver un precipitado rojo que pudiera aparecer.
9. Se agregaron 10 mL de agua destilada agitándose vigorosamente.
10. Se leyó la absorbancia a $\lambda=520$ nm

La actividad de las celulasas se puede expresar en BG/g ó BG/mL por la siguiente fórmula:

$$BG/g \text{ ó } BG/mL = (G * D) / (0.180 * P * 0.25 * 30)$$

Donde: $G = [\text{glucosa}]_M - [\text{glucosa}]_{BS}$; $D =$ volumen de dilución de la enzima en mL; $0.180 =$ peso molecular de la glucosa en $\text{mg}/\mu\text{mol}$; $P =$ peso de la muestra y/o volumen ($\rho_{\text{viscozyme}} = 1.2 \text{ g/mL}$); $0.25 =$ volumen de la solución enzimática usada para el ensayo; y $30 =$ minutos de acción enzimática.

Para obtener el valor de G en mg/mL fue necesario conocer las concentraciones de glucosa en M y BS , las cuales se obtuvieron con las fórmulas:

$$[\text{glucosa}]_M \text{ en mg/mL} = (\text{Absorbancia de } M * [\text{glucosa}]_E * 2) / \text{Absorbancia de } E$$

$$[\text{glucosa}]_{BS} \text{ en mg/mL} = (\text{Absorbancia de } BS * [\text{glucosa}]_E * 2) / \text{Absorbancia de } E$$

Donde: Abs. de $M =$ Abs. de M tomando como blanco a BM ; Abs. de $E =$ Abs. de E tomando como blanco a B ; Abs. de $BS =$ Abs. de BS tomando como blanco a B ; y $2 =$ dos mediciones de absorbancia en la fórmula (M y E ó BS y E).

ANEXO 5:

Determinación del PMC

1. Se colocaron 0.5 L de la solución de PEG correspondiente con una concentración de 600 ppm.
2. Se dejó circular por 30 minutos a presión de 1 bar.
3. Se tomó la muestra por duplicado de la solución proveniente del tanque (retenido) y del permeado (1-2 mL).
4. Se analizó el carbono orgánico total (COT) de las muestras recolectadas*.
5. Se evacuó el líquido restante y se lavó el equipo recirculando agua por al menos 30 minutos.
6. Se inició de nuevo el procedimiento desde el punto número 1 para otra solución de PEG con distinto peso molecular.

*Las determinaciones del COT se hicieron inyectando las muestras en un analizador de carbono Dohrmann^{MR} modelo DC-85-A (Santa Clara, California).

Con las mediciones de COT se obtuvo el factor de concentración (f), que representa la proporción de material retenido en la membrana.

$$f = (\text{COT}_{\text{alimentación}} - \text{COT}_{\text{permeado}}) / \text{COT}_{\text{alimentación}}$$

De f se obtuvo el parámetro de $\text{Log}(f/1-f)$, el cual graficado contra el peso molecular correspondiente permitió conocer el PMC de la membrana en el sitio de intersección donde $\text{Log}(f/1-f) = 1$ (Figura 98).

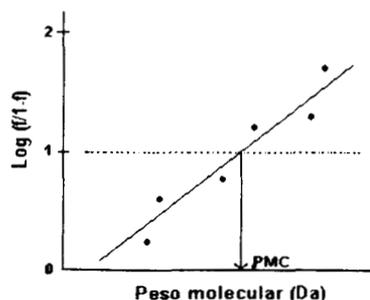


Figura 99. Determinación del PMC.

ANEXO 6:

Hidrólisis de carotenoproteína en BEM

1. Se colocó la solución en el tanque del BEM.
2. Se activó el sistema de recirculación en la chaqueta del bioreactor para mantener la temperatura a 40°C.
3. Después de lograr la temperatura deseada en la solución, se agregó la cantidad necesaria de proteasa para alcanzar 15 UP y se ajustó la presión del sistema a dos bares.
4. El tiempo total de la hidrólisis fue de 16 horas, midiendo, en el retenido y permeado, las variables de proteína soluble y xantofilas totales cada 60 minutos, el análisis en el permeado se inició después de cumplida la primera hora del proceso.

ANEXO 7:

Preparación de muestras para análisis de aminoácidos

Hidrólisis ácida y alcalina

1. Se colocaron 25 mg de proteína en tubos para hidrólisis con tapa-rosca de teflón.
2. Se adicionaron 12.5 mL de HCl 6N.
3. Se sustituyó la tapa de teflón con un tapón de goma con una "T" de cristal, a la que en uno de sus extremos se conectó una línea de vacío.
4. El otro extremo de la "T" se conectó a un contenedor de nitrógeno.
5. Se circuló nitrógeno en el sistema por un minuto.
6. El tubo con la mezcla de hidrólisis se puso en un baño ultrasónico para ayudar a la remoción de aire disuelto en la solución.
7. Se purgó el tubo con nitrógeno por medio de la "T" de cristal.
8. La remoción del aire por reducción de la presión, sonicación y nitrógeno se realizó dos veces (repetición desde el punto 5).
9. Se aumentó levemente la presión de nitrógeno en el tubo.
10. Se quitó la "T" de cristal y se sustituyó al tubo de hidrólisis la tapa-rosca de teflón.
11. Se hidrolizó la muestra a 110°C por 24 horas.
12. Se eliminó el ácido del hidrolizado por liofilización.
13. El hidrolizado se disolvió en 5 mL de búfer de dilución de la muestra (citrato de sodio 0.2 N a pH 2.2).
14. Se filtró a través de una de membrana de 0.45 μm (Gelman^{MR} Acrodisc^{MR} GHP No. 13).
15. Inyección de la muestra al analizador de aminoácidos.

Durante la hidrólisis ácida, el triptófano es destruido casi por completo, es por ello que para su cuantificación se llevó a cabo una hidrólisis básica que no destruye a

este aminoácido. Se utilizó el mismo procedimiento indicado en la hidrólisis ácida sustituyendo el HCl 6N por NaOH 6N.

Para la cuantificación de cistina y metionina, las muestras se sometieron a una pre-hidrólisis de oxidación, utilizando ácido per fórmico, para transformarlos a ácido cisteico y metionina sulfonada, respectivamente.

Pre-hidrólisis de oxidación para preservar cistina y metionina

1. Se colocaron 25 mg de proteína en un tubo de hidrólisis y se cerró con taparosca de teflón.
2. El tubo con la mezcla de hidrólisis se depositó en un baño de hielo.
3. Se agregaron 10 mL de la mezcla de ácido per fórmico* y se agitó suavemente.
4. Se refrigeró a 0° durante toda la noche (14 horas).
5. Se adicionó un mL de HBr al 48% (en baño de hielo) agitando lentamente, después de 5 minutos se retiró al tubo del hielo.
6. Se esperó a que adquiriera la temperatura del ambiente y se evaporó el disolvente por liofilización.
7. El polvo resultante se sometió a la hidrólisis ácida descrita anteriormente.

**Mezcla de ácido per fórmico:* Un mL de H₂O₂ al 30% a 9 mL de ácido fórmico al 88%, dejando que la mezcla permanezca una hora a temperatura ambiente, antes de su uso se enfrió hasta 0°C en baño de hielo.

ANEXO 8:

Curva de calibración para estándar de astaxantina y astaceno

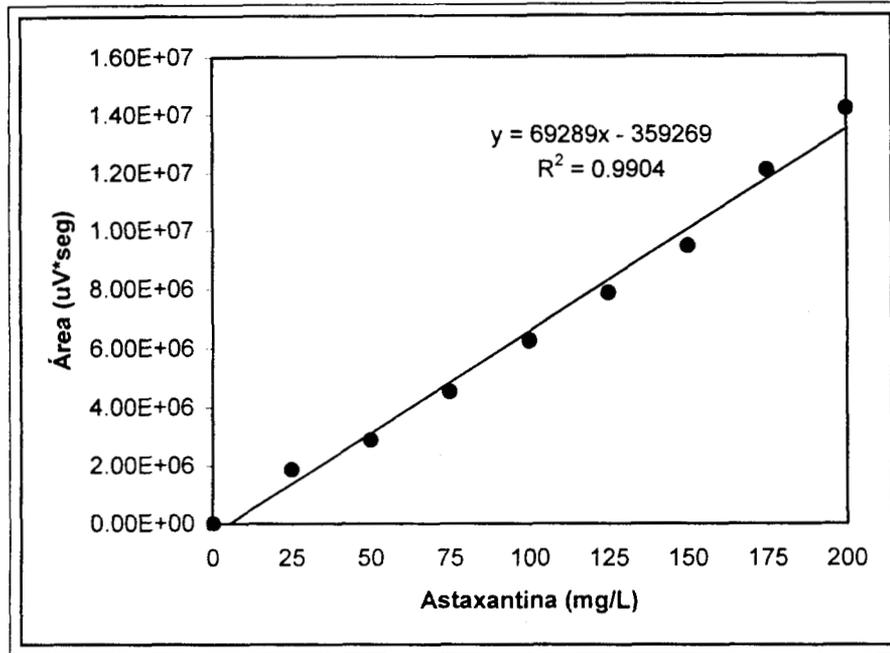


Figura 100. Curva de calibración de astaxantina

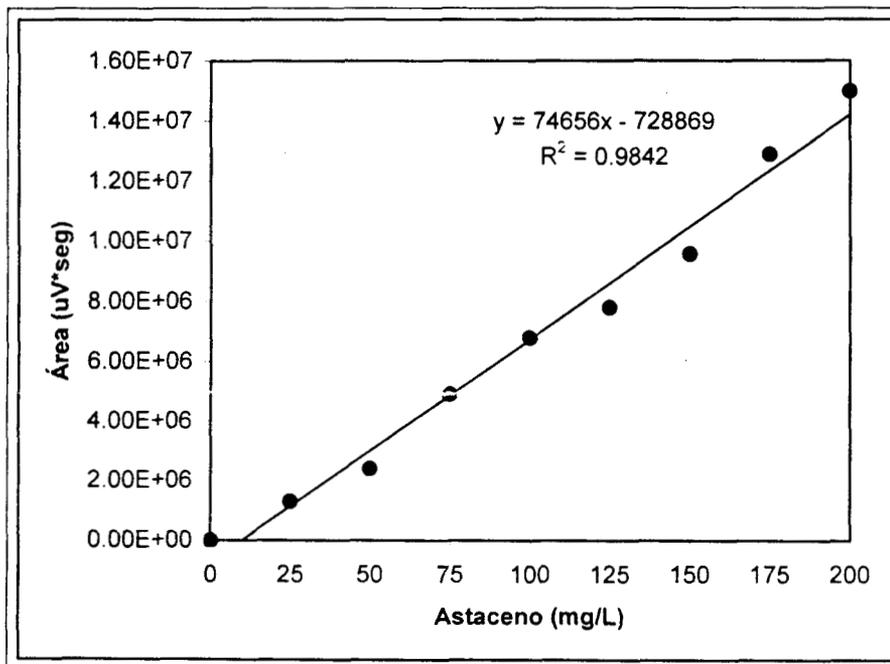


Figura 101. Curva de calibración de astaceno.

ANEXO 9:

Electroforesis de carotenoproteína

Tabla 26. Estándares de electroforesis

Estándar	PM (kDa)	Log PM	Rf
Miosina	205	2.31	0.226
β -galactosidasa	116	2.06	0.436
Seroalbúmina	66	1.82	0.608
Ovoalbúmina	45	1.65	0.65
Anhidrasa carbónica	29	1.46	0.85
α -lactoalbúmina	14.2	1.15	0.96

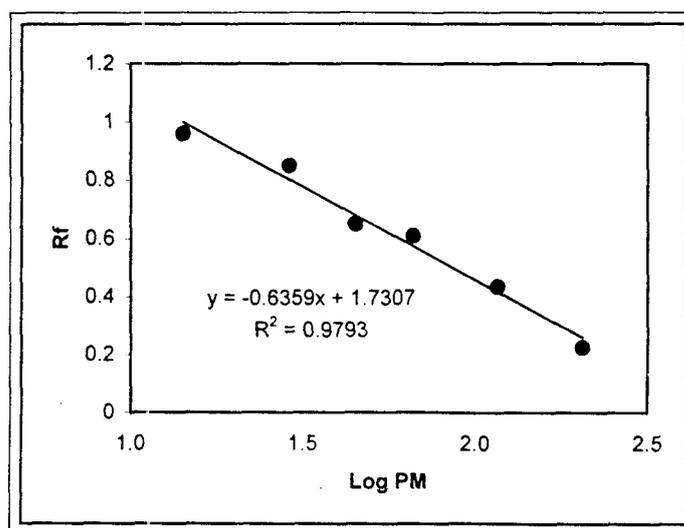


Figura 102. Curva de calibración de electroforesis.

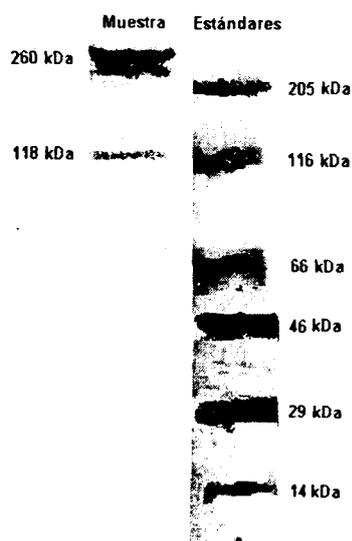


Figura 103. Electroforetograma de carotenoproteína.

ANEXO 10:

Análisis estadístico

a) Fermentación láctica

Tabla 27. Análisis de varianza del pH de la fermentación.

Variable respuesta	Fuente de variación	P >
pH	tiempo	0.0001

Tabla 28. Comparación múltiple de medias de Duncan para pH de la fermentación ($\alpha=0.05$).

Fuente de variación	Niveles	pH
Tiempo	0	7.7 ^a
	12	6.61 ^b
	24	5.28 ^c
	36	4.79 ^d
	48	4.15 ^e

Las medias con el mismo superíndice no son significativamente diferentes.

b) Hidrólisis enzimática de carotenoproteínas

Proteasa

Tabla 29. Análisis de varianza de hidrólisis con proteasa.

Variable respuesta	Fuente de variación	P >
Xantofilas totales	UP y tiempo	0.0001
Proteína soluble	UP y tiempo	0.0001

Tabla 30. Comparación múltiple de medias de Duncan para hidrólisis con proteasa ($\alpha=0.05$).

Fuente de variación		Variable respuesta	
UP	Tiempo (h)	Xantofilas totales (mg/g)	Proteína soluble (mg/g)
0	0	11 ^a	521.4 ^a
0	12	11.71 ^a	528.05 ^a
0	24	12.15 ^b	530.57 ^a
5	0	11.25 ^a	531 ^a
5	12	40.1 ^c	761 ^b
5	24	42 ^d	798.5 ^c
10	0	11.9 ^b	532.6 ^a
10	12	41.8 ^d	796.8 ^c
10	24	43.2 ^e	810.4 ^d
15	0	12.35 ^b	532.98 ^a
15	12	44.4 ^e	830 ^e
15	24	46.7 ^f	849.5 ^f

Las medias con el mismo superíndice no son significativamente diferentes.

Proteasa con 15 UP a pH 7 y 8

Tabla 31. Análisis de varianza de hidrólisis con proteasa a pH 7 y 8.

Variable respuesta	Fuente de variación	P >
Xantofilas totales	pH y tiempo	0.0001
Proteína soluble	pH y tiempo	0.0001

Tabla 32. Comparación múltiple de medias de Duncan para hidrólisis con proteasa a pH 7 y 8 ($\alpha=0.05$).

Fuente de variación		Variable respuesta	
pH	Tiempo (h)	Xantofilas totales (mg/g)	Proteína soluble (mg/g)
7	0	12.35 ^a	532.98 ^a
7	12	44.4 ^b	830 ^b
7	24	46.7 ^d	849.5 ^d
8	0	11.67 ^a	526.3 ^a
8	12	46.3 ^c	843.6 ^c
8	24	48.18 ^e	862.22 ^e

Las medias con el mismo superíndice no son significativamente diferentes.

Proteasa:lipasa**Tabla 33. Análisis de varianza de hidrólisis con proteasa:lipasa.**

Variable respuesta	Fuente de variación	P >
Xantofilas totales	UP:UL y tiempo	0.0001
Proteína soluble	UP:UL y tiempo	0.0001

Tabla 34. Comparación múltiple de medias de Duncan para hidrólisis con proteasa:lipasa ($\alpha=0.05$).

Fuente de variación		Variable respuesta	
UP:UL	Tiempo (h)	Xantofilas totales (mg/g)	Proteína soluble (mg/g)
0	0	10.80 ^a	523.84 ^a
0	12	11.13 ^a	520.82 ^a
0	24	11.64 ^a	528 ^a
15:00	0	11.39 ^a	524.04 ^a
15:00	12	44.77 ^b	839.66 ^b
15:00	24	47.82 ^c	844.28 ^b
15:05	0	10.43 ^a	520.62 ^a
15:05	12	49.49 ^d	841.18 ^b
15:05	24	55.87 ^e	847 ^b
15:10	0	9.45 ^a	526.43 ^a
15:10	12	65.08 ^g	895.07 ^c
15:10	24	66.11 ^g	900.72 ^c
15:15	0	10.91 ^a	525 ^a
15:15	12	64.20 ^f	896.65 ^c
15:15	24	66.24 ^g	903.61 ^c

Las medias con el mismo superíndice no son significativamente diferentes.

Celulasa**Tabla 35. Análisis de varianza de hidrólisis con celulasa.**

Variable respuesta	Fuente de variación	P >
Xantofilas totales	BG y tiempo	0.0001
Proteína soluble	BG y tiempo	0.0043

Tabla 36. Comparación múltiple de medias de Duncan para hidrólisis con celulasa ($\alpha=0.05$).

Fuente de variación		Variable respuesta	
BG	Tiempo (h)	Xantofilas totales (mg/g)	Proteína soluble (mg/g)
0	0	11.69 ^a	524.3 ^a
0	12	12.8 ^a	526.07 ^a
0	24	12.93 ^b	526.1 ^a
5	0	11.83 ^a	524.76 ^a
5	12	19.01 ^c	525.3 ^a
5	24	22.55 ^d	527.9 ^a
10	0	11.57 ^a	529.51 ^a
10	12	22.79 ^d	530.1 ^a
10	24	26.02 ^e	531.4 ^a
15	0	12.31 ^a	531.98 ^b
15	12	26.59 ^e	534.63 ^b
15	24	30.02 ^f	535.6 ^b
20	0	13.05 ^b	529.04 ^a
20	12	29.82 ^f	532.16 ^b
20	24	32.41 ^g	532.4 ^b
25	0	13.07 ^b	530 ^a
25	12	29.56 ^f	531.8 ^b
25	14	32.25 ^g	533.5 ^b

Las medias con el mismo superíndice no son significativamente diferentes.

Celulasa:lipasa

Tabla 37. Análisis de varianza de hidrólisis con celulasa:lipasa.

Variable respuesta	Fuente de variación	P >
Xantofilas totales	BG:UL y tiempo	0.0001
Proteína soluble	BG:UL y tiempo	0.0031

Tabla 38. Comparación múltiple de medias de Duncan para hidrólisis con celulasa:lipasa ($\alpha=0.05$).

Fuente de variación		Variable respuesta	
BG:UL	Tiempo (h)	Xantofilas totales (mg/g)	Proteína soluble (mg/g)
0	0	11.6 ^a	523.8 ^a
0	12	12.5 ^a	524.6 ^a
0	24	12.68 ^a	525.87 ^a
20:00	0	12.59 ^a	526.11 ^a
20:00	12	28.12 ^a	526.82 ^a
20:00	24	32 ^c	527.03 ^a
20:05	0	13.16 ^a	525.33 ^a
20:05	12	29.41 ^b	527.9 ^a
20:05	24	33 ^c	529.3 ^a
20:10	0	12.87 ^a	530.45 ^a
20:10	12	31.84 ^c	531.44 ^a
20:10	24	35.85 ^d	530.69 ^a
20:15	0	13 ^a	530.9 ^a
20:15	12	34.85 ^d	529.56 ^a
20:15	24	38 ^e	531.77 ^a
20:20	0	13.15 ^a	531.09 ^a
20:20	12	35 ^d	532.13 ^a
20:20	14	38.11 ^e	533.89 ^b

Las medias con el mismo superíndice no son significativamente diferentes.

En disolventes orgánicos

Tabla 39. Análisis de varianza de hidrólisis con proteasa en disolventes orgánicos.

Variable respuesta	Fuente de variación	P >
Xantofilas totales	UP, proporción de disolventes y tiempo	0.0001
Proteína soluble	UP, proporción de disolventes y tiempo	0.0001

Tabla 40. Comparación múltiple de medias de Duncan para hidrólisis con proteasa en disolventes orgánicos ($\alpha=0.05$).

Fuente de variación			Variable respuesta	
UP	Proporción de disolventes	Tiempo (h)	Xantofilas totales (mg/g)	Proteína soluble (mg/g)
0	15:75:10	0	10.93 ^a	515.94 ^a
0	15:75:10	12	11.08 ^a	521 ^a
0	15:75:10	24	11.43 ^a	529.86 ^a
0	15:65:20	0	9.53 ^a	528.9 ^a
0	15:65:20	12	9.97 ^a	530.02 ^a
0	15:65:20	24	12.04 ^a	530.02 ^a
15	15:75:10	0	11.17 ^a	531.6 ^a
15	15:75:10	12	36.08 ^b	712.6 ^b
15	15:75:10	24	40.67 ^c	745.3 ^c
15	15:65:20	0	11.63 ^a	533 ^a
15	15:65:20	12	38.3 ^b	735.81 ^b
15	15:65:20	24	44.66 ^d	783.99 ^d
20	15:75:10	0	11.72 ^a	535.82 ^a
20	15:75:10	12	44.96 ^d	797 ^d
20	15:75:10	24	46.92 ^d	819.8 ^e
20	15:65:20	0	11.9 ^a	518.15 ^a
20	15:65:20	12	49 ^e	813 ^e
20	15:65:20	14	54.7 ^f	851.6 ^f

Las medias con el mismo superíndice no son significativamente diferentes.

En sistema modelo de referencia (15 UP por 24 horas)

Tabla 41. Análisis de varianza de hidrólisis con 15 UP.

Variable respuesta	Fuente de variación	P >
Xantofilas totales	Tiempo	0.0001
Proteína soluble	Tiempo	0.0001

Tabla 42. Comparación múltiple de medias de Duncan para hidrólisis con 15 UP ($\alpha=0.05$).

Fuente de variación: tiempo (h)	Variable respuesta	
	Xantofilas totales (mg/g)	Proteína soluble (mg/g)
0	24.70 ^a	519.64 ^a
1	24.91 ^a	535.62 ^a
2	27.13 ^b	561.74 ^b
3	27.14 ^b	645.85 ^c
4	29.74 ^c	680.76 ^d
5	32.13 ^d	700.94 ^e
6	34.52 ^e	720.32 ^f
7	37.85 ^f	731.4 ^f
8	39.60 ^g	748.09 ^g
9	41.00 ^h	776.55 ^h
10	42.26 ⁱ	798.46 ⁱ
11	43.00 ⁱ	819.19 ^j
12	44.40 ^j	830.18 ^j
13	44.90 ^j	836.1 ^j
14	45.38 ^j	839.21 ^h
15	46.01 ^h	842 ^h
16	46.20 ^h	843.95 ^h
17	46.33 ^h	845.03 ^h
18	46.50 ^h	846.75 ^h
19	46.61 ^h	847.32 ^h
20	46.68 ^h	848.02 ^h
21	46.57 ^h	848.75 ^h
22	46.60 ^h	849.1 ^h
23	46.62 ^h	849.32 ^h
24	46.70 ^h	849.5 ^h

Las medias con el mismo superíndice no son significativamente diferentes.

En BEM con 15 UP por 16 horas**Tabla 43. Análisis de varianza de hidrólisis en BEM con 15 UP.**

Variable respuesta	Fuente de variación	P >
Xantofilas totales	Tiempo	0.0001
Proteína soluble	Tiempo	0.0001

Tabla 44. Comparación múltiple de medias de Duncan para hidrólisis en BEM con 15 UP ($\alpha=0.05$).

Fuente de variación: tiempo (h)	Variable respuesta	
	Xantofilas totales en permeado (mg/g)	Proteína soluble en retenido (mg/g)
0	0.00 ^a	464.23 ^a
1	0.60 ^a	471.73 ^a
2	0.71 ^a	481.23 ^a
3	1.11 ^a	484.92 ^b
4	2.25 ^b	502.00 ^c
5	5.11 ^c	526.69 ^d
6	7.95 ^d	563.06 ^e
7	13.92 ^e	613.27 ^f
8	22.20 ^f	655.28 ^g
9	24.44 ^g	680.28 ^h
10	27.66 ^h	696.86 ^h
11	30.08 ⁱ	711.59 ⁱ
12	31.30 ^j	730.76 ^j
13	32.23 ^j	740.50 ^j
14	34.10 ^k	743.18 ^j
15	35.23 ^k	757.08 ^k
16	36.55 ⁱ	760.71 ^k

Las medias con el mismo superíndice no son significativamente diferentes.

En BEM con 20 UP por 16 horas**Tabla 45. Análisis de varianza de hidrólisis en BEM con 20 UP.**

Variable respuesta	Fuente de variación	P >
Xantofilas totales	Tiempo	0.0001
Proteína soluble	Tiempo	0.0001

Tabla 46. Comparación múltiple de medias de Duncan para hidrólisis en BEM con 20 UP ($\alpha=0.05$).

Fuente de variación: tiempo (h)	Variable respuesta	
	Xantofilas totales en permeado (mg/g)	Proteína soluble en retenido (mg/g)
0	0.00 ^a	464.47 ^a
1	0.53 ^a	467.87 ^a
2	1.51 ^b	481.24 ^a
3	3.66 ^c	492.99 ^b
4	8.00 ^d	520.14 ^c
5	13.22 ^e	546.38 ^d
6	19.64 ^f	608.84 ^e
7	23.74 ^g	652.87 ^f
8	26.37 ^h	683.37 ^g
9	27.03 ⁱ	698.37 ^g
10	30.67 ^j	723.43 ^h
11	33.07 ^k	740.90 ^h
12	35.11 ^l	757.31 ⁱ
13	36.96 ^m	770.15 ⁱ
14	37.65 ^m	773.41 ⁱ
15	38.18 ⁿ	788.43 ^j
16	38.30 ⁿ	787.90 ^j

Las medias con el mismo superíndice no son significativamente diferentes.

c) Estabilidad de astaxantina

Diseño sin interacciones**Tabla 47. Análisis de varianza de estabilidad de astaxantina sin interacciones.**

Variable respuesta	Fuente de variación	P >
Concentración de astaxantina	Origen del pigmento, iluminación, disponibilidad de oxígeno, temperatura y tiempo	0.0001
Concentración de astaceno	Origen del pigmento, iluminación, disponibilidad de oxígeno, temperatura y tiempo	0.0001

Tabla 48. Comparación múltiple de medias de Duncan para porcentajes de degradación de astaxantina a las 8 semanas de tratamientos sin interacciones ($\alpha=0.05$).

Fuente de variación	Variable respuesta	
	Astaxantina sintética	Astaxantina natural
Iluminación:		
• Oscuridad	10 ^b	15 ^b
• Sombra	24 ^d	23 ^e
• Luz	63 ^f	72 ^g
Disponibilidad de oxígeno:		
• Recipientes abiertos	27.1 ^e	33.7 ^f
• Recipientes cerrados	13.1 ^c	15.7 ^b
• Vacío	6.8 ^a	18.6 ^c
Temperatura:		
• 15°C	7.5 ^a	12.2 ^a
• 25°C	12.2 ^c	20 ^d
• 45°C	80.5 ^g	83.7 ^h

Las medias con el mismo superíndice no son significativamente diferentes.
Hubo diferencia significativa entre astaxantina natural y sintética ($P>0.0001$).

Tabla 49. Comparación múltiple de medias de Duncan para porcentajes de producción de astaceno a las 8 semanas de tratamientos sin interacciones ($\alpha=0.05$).

Fuente de variación	Variable respuesta	
	Astaceno sintética	Astaceno natural
Iluminación:		
• Oscuridad	1.19 ^a	1.9 ^a
• Sombra	1.98 ^a	10.2 ^d
• Luz	50 ^c	61 ^f
Disponibilidad de oxígeno:		
• Recipientes abiertos	16.3 ^b	19.5 ^e
• Recipientes cerrados	1.18 ^a	5.7 ^c
• Vacío	1.13 ^a	3.22 ^b
Temperatura:		
• 15°C	1.04 ^a	2.23 ^a
• 25°C	1.36 ^a	4.42 ^b
• 45°C	69.4 ^d	75.2 ^g

Las medias con el mismo superíndice no son significativamente diferentes.
Hubo diferencia significativa entre astaxantina natural y sintética ($P>0.0001$).

Diseño con interacciones

Tabla 50. Análisis de varianza de estabilidad de astaxantina con interacciones.

Variable respuesta	Fuente de variación	P >
Concentración de astaxantina	Origen del pigmento, iluminación, disponibilidad de oxígeno, temperatura y tiempo	0.0001
Concentración de astaceno	Origen del pigmento, iluminación, disponibilidad de oxígeno, temperatura y tiempo	0.0001

La comparación múltiple de medias de Duncan del diseño con interacciones se indica en la Tabla 24.

d) Patrón de aminoácidos en carotenoproteínas de residuos de camarón fermentados y no fermentados

Tabla 51. Pruebas de t para la concentración de aminoácidos en carotenoproteínas.

Variable respuesta: concentración de aminoácido (mg/g)	Fuente de variación		P >
	Carotenoproteína de residuo de camarón no fermentado	Carotenoproteína de residuo de camarón fermentado	
Alanina	45.4	45	0.5896
Arginina	58	46.2	0.0001
Aspartato	129.5	126.7	0.1706
Cistina	15	12	0.0075
Fenilalanina	42.6	51.3	0.0010
Glicina	36.2	31.2	0.0015
Glutamato	142.6	142.2	0.6728
Hidroxilisina	1.6	3	0.0291
Hidroxiprolina	0.7	2.3	0.0002
Histidina	23	32.1	0.0006
Isoleucina	40.2	39.8	0.9490
Leucina	113.3	109.1	0.0215
Lisina	98.3	96.2	0.1601
Metionina	20.2	20.4	0.8820
Prolina	23.2	25.3	0.0379
Serina	32.3	40	0.0001
Taurina	1.9	2.1	0.5265
Tirosina	21.7	35.5	0.0001
Treonina	38.4	55.7	0.0001
Triptófano	19.4	36	0.0001
Valina	47	37.2	0.0001

ANEXO 11:

Copia de la publicación derivada de la tesis

Referencia:

Journal of Food Science

Abril de 2002, Vol. 67, No. 3, pp. 1002-1006.

Astaxanthin Extraction From Shrimp Waste by Lactic Fermentation and Enzymatic Hydrolysis of the Carotenoprotein Complex

R. ARMENTA-LÓPEZ, I. GUERRERO L., AND S. HUERTA

ABSTRACT: Natural carotenoids are an alternative to synthetic orange-red pigments. They are present in crustaceans as a protein-pigment complex. In order to extract this highly unstable pigment, crustacean waste must be stabilized; lactic fermentation is a simple and environmentally friendly method to achieve this goal. Shrimp wastes were inoculated with *Lactobacillus* bacterial cultures. Carotenoids were then extracted with an organic solvent system. Protein-pigment splitting was carried out using a mixture of 4 commercial enzymes; and the protein was separated from the pigment by ultrafiltration. Electrophoretograms showed that the pigment was attached to a 265-kDa protein. Splitting the protein-pigment complex allows studies on pigment absorption, stability and application.

Keywords: astaxanthin, carotenoids, crustacean waste, lactic fermentation, enzymatic hydrolysis

Introduction

THE USE OF SOME SYNTHETIC COLORANTS IN THE FOOD INDUSTRY has been restricted due to possible toxicity (Baublis and others 1994; Giusti and Wrolstad 1996; Gao and Mazza 1996). As a result, alternative natural colorants have been explored during the last decade. According to Hendry (1996), natural colors are derived from natural edible sources and are permitted throughout the world. The most widely distributed pigments are carotenoids, distinctive red to yellow colors in plants and animals. Astaxanthin is a red-orange carotenoid found in some birds and fish, although it is mainly associated with invertebrate animals such as shrimp, crabs, and lobsters. The pigment is composed of 3 stereoisomers in a racemic mixture forming a complex with a protein that accumulates in the crustacean exoskeleton (Schiedt and others 1993). This complex can be green, purple, or blue in the living animal, acquiring a red color when subjected to heat treatment (Britton (Spelling Correct? Reference Has Briton) 1996). Protein-free astaxanthin can be used in a variety of products such as foods, feeds, cosmetics, and pharmaceuticals. The red-orange color of astaxanthin is associated with high quality in some foods such as salmon and trout; therefore, the inclusion of this pigment in their diets results in improved quality. Natural carotenoids, in addition, play an important role in fish reproduction (Chen and Meyers 1983).

Shrimp production in Mexico, mainly of genus *Penaeus*, is around 80,000 metric tons (MT) per y, of which 60% is exported. Only 55% of the animal is edible, the rest is composed of inedible cephalothorax and exoskeleton. These fractions represent 35,000 MT per y of potentially polluting wastes in catching and farming areas (SEMARNAP 1998). Crustacean residues have been processed to obtain materials of added value such as chitin, enzymes, and pigments. As the residues have a high amount of protein (47.7%) and calcium (26.8% reported as ash) (USDA 1975) deproteinization-demineralization treatments are necessary. The industrial process to extract chitin involves an environmentally aggressive alkali-acid treatment (Johnson and Peniston 1982; Knorr 1991). In addition, when this treatment is applied, carotenoid pigments are severely damaged, mainly due

to the acid. An alternative method to deproteinize crustacean residues is using fermentation with lactic acid bacteria. In this way, the protein content is reduced up to 50% (Hall and Da Silva (Spelling Correct? Reference has De Silva) 1994). A subsequent, less aggressive, chemical treatment can be used if the main final product is chitin (Guerrero and others 1996). Lactic fermentation can also be a process to obtain carotenoids, especially astaxanthin (Torrissen and others 1981; Chen and Meyers 1983) stabilizing the residues by acid production. Astaxanthin extraction from the stabilized fermented waste as well as from the fermentation broth can be achieved by solvent extraction (Armenta 1998).

In nature, protein-pigment interaction increases carotenoid stability (Britton 1996). Several authors (Chen and Meyers 1982; Simpson and Haard 1985; Cano-López and others 1987) applied proteolytic enzymes to disrupt the protein-pigment bond, increasing carotenoid extraction by 58% or splitting the chitin-pigment interaction obtaining protein-enriched pigments (Hansen and Llanes 1994).

The objective of this work was to obtain protein-free astaxanthin from shrimp waste, stabilized by lactic acid fermentation and extracted by organic solvents.

Materials and Methods

Raw material

Shrimp heads were obtained from animals (*Penaeus sp.*) caught along the Mexican Pacific coastline. The raw material was kindly supplied by the Central Seafood Market administrative office, Mexico City. The residue was ground in a meat grinder using a one-eighth inch sieve, and frozen at -10 °C until utilization.

Pigment stabilization and extraction

In order to identify the most efficient strain for pH reduction, 3 lactic starters were tested: *Pediococcus pentosaceus* P-1 and *Staphylococcus carnosus* MC-1, kindly supplied by Dr. Lone Anderson (Chr. Hansen's, (City?) Denmark) and a strain isolated from tropical water shrimp by Dr. Zainoha Zakaria, Univ. of Loughborough, (City?) England, identified as a *Lactobacillus* species. This

lactic acidifying strain was isolated by growing in selective MRS broth under anaerobic conditions (Zakaria 1998 **Spelling Correct? Reference Has Zakaria. Also Should This be Zakaria/Zakaria and Others? There is no Reference for Zakaria 1998**). All starters were grown in MRS broth at 30 °C during 24 h.

After thawing, 100-g waste portions were placed into 250-mL glass flasks, and mixed with 10% glucose (w/w) and 5% inoculum cell suspension (v/w) (optical density of cell suspension = 1.0) forming a semisolid substrate. The flasks were placed in a water bath at 30 °C for 48 h. The response variable was pH, measured with a potentiometer at 0, 24, and 48 h of fermentation.

Three organic solvent systems (v/v/v) were compared for their efficiency of pigment extraction: chloroform:methanol:water (1:2:4), petroleum ether:acetone:water (15:75:10) (Meyers and Bligh 1981), and ethanol:water (40:60). A lipid system, soybean oil, was also tested. Ten grams of fermented residue were placed in glass flasks and added with extraction system in 1:10 (w/v) fermented waste:solvent system proportion, or 1:2 (w/w) proportion when soybean oil was used (Chen and Meyers 1982). The flasks were stored for 30 h at 20 °C with 200 rpm constant agitation. Pigment oxidation was prevented by wrapping the flasks with aluminum foil and adding 0.01% BHA:BHT (1:1).

Xanthophyll concentration in the organic phase, expressed as μg pigment/g residue, was spectrophotometrically determined at $\lambda = 474$ nm. Pigment concentration was obtained from the equation (AOAC 1990):

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

where A is absorbance at $\lambda = 474$ nm; D is dilution factor; P is sample weight; and 236 is transluetein specific absorption.

In order to determine the concentration of carotenoids and their esters in pigment extracts, a reverse-phase Waters SymmetryTM C₁₈ column fitted to an HPLC system (**Location of Manufacturer?**) was used (Mejía and others 1988; Christophersen and others 1989). The mobile phase was 80% (9:1) ethyl acetate:methanol-water(1:1). Total analysis time was 10 min. The astaxanthin peak was at $\lambda = 474$ nm. Astaxanthin concentration was obtained from a standard curve constructed using Carophyll pinkTM (Hoffman-La Roche, Nutley, N.J., U.S.A.) containing 8% synthetic astaxanthin. Various concentrations of this pigment were correlated to the respective areas in the chromatogram.

Protein-pigment hydrolysis

The caroprotein contained in the organic system was lyophilized and 1 mg dried caroprotein was resuspended in 10 mL of 0.05 M phosphate buffer, pH 5. Three enzymatic systems were tested, each one equivalent to 5 enzymatic units (EU): savinaseTM (Novo Nordisk Bio Chem, Franklinton, N.C., U.S.A.); bovine pancreas trypsin (Aldrich, Milwaukee, Wis., U.S.A.); and a mixture of 4 commercial enzymes, savinaseTM:neutraneTM:alcalaseTM:esperaseTM (Novo Nordisk Bio Chem, Franklinton, N.C., U.S.A.) using 1.25 EU of each enzyme. One enzymatic activity unit was defined as the amount of enzyme necessary to produce 1 μmol of tyrosine/min at 37 °C in a reaction mixture of 2.5 mL (μmol tyrosine/min mL) read at 280 nm (Kunitz 1947). In order to define the enzyme amount necessary to have 5 EU, the proteolytic activity of each enzyme was also determined by the method reported by Kunitz (1947). Proteolysis was carried out at 40 °C with continuous stirring. Soluble protein concentration and total xanthophylls were determined at a 0, 12, and 24 h of incubation. Soluble protein con-

centration was determined in the hydrolysate according to the method reported by Peterson (1977). As the mixture of 4 enzymes was the most efficient hydrolysis method, the rest of the studies reported here were carried out in hydrolysates obtained with this enzymatic treatment.

Astaxanthin and peptide separation and analysis

The hydrolyzed protein and pigment moieties in the reaction mixture were separated by ultrafiltration using Millipore equipment (Bedford, Mass., U.S.A.) fitted with anisotropic YM membranes (Amicon-stirred cells), 50 kDa cut-off dia. The extract was concentrated by lyophilization (-40 °C, 133×10^{-3} mBar during night) and further resuspended in phosphate buffer.

The molecular weight distribution of peptides resulting from the enzymatic hydrolysis was determined by gel filtration chromatography. Electrophoresis of the pigment extract was also carried out to separate the most abundant proteins and peptides. Gel filtration was carried out in an HPLC system (Waters **Location of Manufacturer?**) fitted with a Sephacryl-100-R column, 1000-100,000 Da molecular weight range. The column was equilibrated and eluted with sodium phosphate buffer with 0.02 M KCl, pH 7.5, according to the technique reported by Muriana and others (1993).

Electrophoresis was carried out according to the method described by Laemmli (1970). Acrylamide (12%) was used as the separation gel and 4% as the stacking gel in a Mini-Protean II Slab Cell (Bio-Rad, Richmond, Calif., U.S.A.). Sample concentration of 6 to 7 mg/mL and a mixture of SDS-gel markers (Sigma Chemicals Co, St. Louis, Mo., U.S.A.) from 30 to 205 kDa were applied. After staining with 1% Coomassie blue during 30 min and developing with 40% ethyl alcohol/10% acetic acid for 4 h, the gels were scanned using an Ultrascan XL densitometer (Pharmacia-LKB, Bromma, Sweden).

Total xanthophyll concentration in the retentate and permeate was evaluated according to the method described before. All fractions, before and after hydrolysis, retentate and permeate were analyzed for astaxanthin content using HPLC equipment fitted with a SymmetryTM C₁₈ column that separated carotenoids and their esters (Mejía and others 1988; Christophersen and others 1989). The mobile phase was 20% ethyl acetate/80% methanol:water (9:1). Total analysis time was 10 min, the eluted fractions were read at $\lambda = 474$ nm. A calibration curve was constructed using Carophyll pinkTM (Hoffman-La Roche, Nutley, N.J., U.S.A.) containing 8% synthetic astaxanthin.

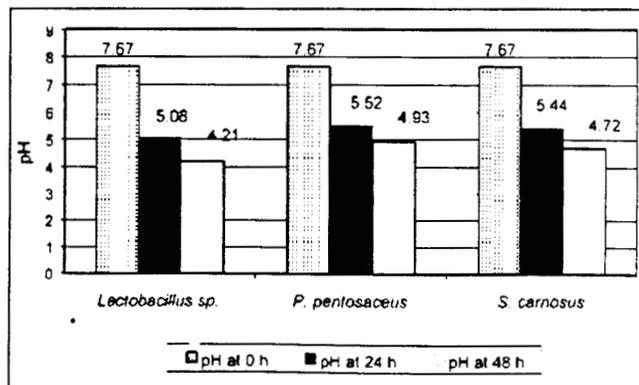


Figure 1—pH decrease during shrimp waste fermentation with 3 lactic bacteria

Data were subjected to analysis of variance and Duncan's multiple range tests using a SAS program (SAS Institute, 1989).

Results and Discussion

Pigment stabilization and extraction

The *Lactobacillus* culture was the most efficient one in decreasing pH after 48 h of fermentation ($P > 0.0001$) reaching a pH close to 4.0 (Figure 1). There was no statistical difference between pH reduction by *S. carnosus* and *P. pentosaceus*.

Since the *Lactobacillus* has been isolated from tropical shrimp wastes, it was already adapted to the substrate. As a result, the waste inoculated with this bacterial culture showed a faster pH decrease as compared to wastes inoculated with *S. carnosus* and *P. pentosaceus*. These strains were very efficient in decreasing pH in pork, but not in biological material of marine origin. As carotenoid oxidation starts in the isoprenoid structure (Britton (Spelling Correct? Reference has Briton) 1996), reducing conditions favored by an acid environment promoted an electronic shift from the β -ionone ring towards the isoprenes, possibly being the reason for structure stabilization. Lactic acid also promoted waste deproteinization, a method reported as an alternative for chitin extraction from crustacean (Hall and Da Silva (Spelling Correct? Reference has De Silva) 1994; Hansen and Llanes 1994; Guillou and others 1995).

Extraction yield, reported as total xanthophyll concentration, showed the highest value when petroleum ether:acetone:water (15:75:10) was used ($P > 0.0001$), followed by chloroform:methanol:water (1:2:4) ($P > 0.0001$). The least efficient systems were soybean oil and the ethanol:water mixture (40:60). As the analytical method detects only free xanthophylls, it is assumed that the actual amount of extracted pigments corresponded to a concentration higher than the reported value, as part of the pigment was bound to the protein moiety. In all extraction systems, total xanthophyll concentration was higher when nonfermented residues were used (Figure 2). It is important to note that, in terms of total xanthophylls, even when the concentration was lower in fermented residues, no significant difference was detected, but reducing conditions prevented isoprenoid oxidation (Kennedy 1979).

It is also important to stress that total xanthophylls include not only astaxanthin, but also derivatives containing oxygen (hydroxy, keto, epoxy, methoxy, and carboxylic acid groups) (Britton (Spelling Correct? Reference has Briton) 1996). Therefore, when

HPLC reverse-phase chromatography was used to determine astaxanthin concentration, higher values were obtained for fermented (1.25 $\mu\text{g/g}$) than for nonfermented residues (0.96 $\mu\text{g/g}$) (Figure 3). Lactic fermentation made astaxanthin more available for extraction due to the fact that lactic fermentation of crustacean residues increased astaxanthin stability as it promoted a reducing environment (Torrissen and others 1981; Chen and Meyers 1983; Guerrero and others 1996). Lactic fermentation also solubilizes structures formed by calcium salts in the shrimp exoskeleton, known as vesicles, containing large amounts of pigment. Therefore, ensilation increased astaxanthin availability by the extraction system (Torrissen and others 1981). Smaller peaks, probably corresponding to oxidized pigments, were observed after 6.5 min of analysis.

Protein-pigment hydrolysis

Total soluble protein and total xanthophyll concentration showed that applying the enzyme mixture (savinaseTM:neutraseTM:alcalaseTM:esperaseTM) for 24 h resulted in the highest efficiency in splitting the protein-pigment complex. The second most efficient treatment was observed when the same enzyme mixture was allowed to act for 12 h (Figure 4 and 5). SavinaseTM treatment also resulted in good protein extraction after a 24-h treatment, although soluble protein was 796.2 mg/g and total xanthophylls 41 mg/g as compared to 894.8 mg/g and 46 mg/g of protein and xanthophylls, respectively, obtained after 24 h of treatment with the enzyme mixture. Therefore, for the rest of these studies only the enzyme mixture was applied. The main application of the 4 commercial enzymes used is for detergent formulations to remove protein-type stains, savinaseTM is particularly used to remove lipid-bound proteins (Novo Enzymes 1997). The protein bound to astaxanthin in crustaceans is actually a lipoprotein (Menasveta and others 1993), making the complex susceptible to enzymatic action. For the same reason, protein separation from the pigment moiety does not occur as an entire molecule, but is depleted into peptides of different molecular weights. By SDS-PAGE peptide molecular weights in the retentate were obtained (Table 1). The caroprotein molecular weight, 265 kDa ($R_f = 0.166$), was similar to that reported by Muriana and others (1993) with *Penaeus japonicus* of 280 kDa; 65 and 55 kDa peptides were found in the retentate ($R_f = 0.632$ and 0.672, respectively), whereas in the permeate smaller peptides of 20 kDa, were present ($R_f = 0.906$). Due to pos-

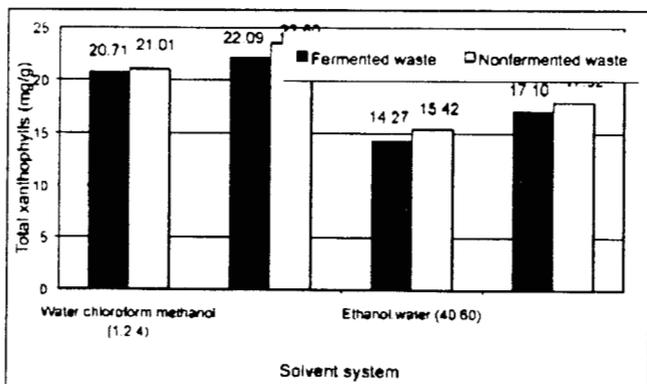


Figure 2—Total xanthophylls extracted from fermented and nonfermented shrimp wastes

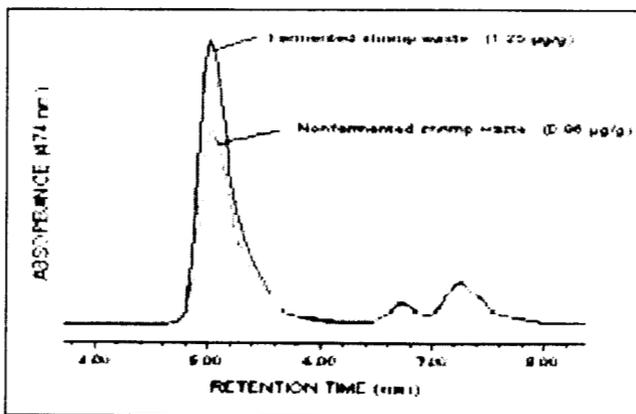


Figure 3—Astaxanthin concentration in extracts obtained from fermented and nonfermented shrimp wastes

Table 1—Approximate molecular weights of caroprotein and peptides in the retentate and permeate of the hydrolyzed pigment extract

Sample	R _f	Molecular weight (kDa)
Caroprotein	0.166	265
Retentate	0.632, 0.672	65, 55
Permeate	0.906	20

sible generation of peptides smaller than 20 kDa undetected by electrophoresis, molecular weight distribution using gel filtration was also carried out. The main peaks obtained corresponded to peptides of 63, 52 (the most abundant), 19, 8.0, and 3.0 kDa (Figure 6). Small-molecular weight-fractions could be present in hydrolyzed extracts, although the lower detection limit of the column (1 kDa) did not allow their detection.

Trypsin was included in this study for comparative purposes as this enzyme has been reported by other authors (Cano-López and others 1987). Astaxanthin concentration increases after enzymatic treatment were probably due to the fact that when the pigment is unbound to the protein spectrophotometric sensitivity increases.

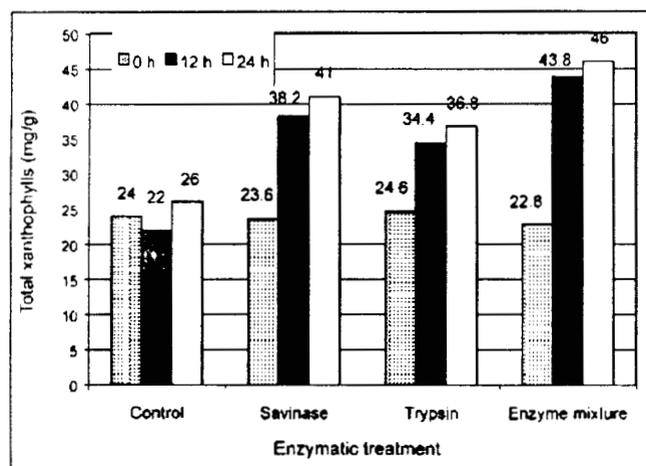


Figure 4—Total xanthophyll concentration obtained by 3 enzymatic treatments of pigment extracts

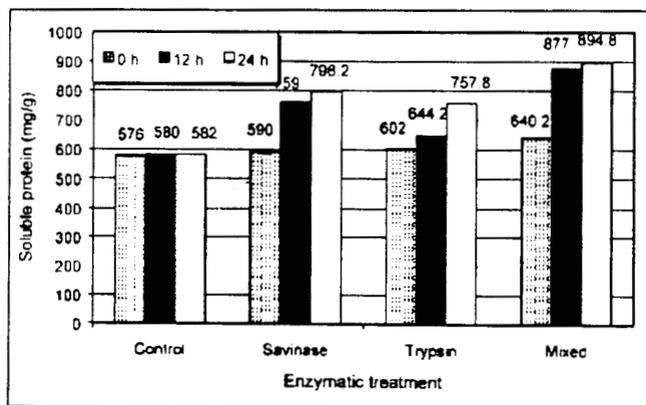


Figure 5—Total soluble protein obtained by 3 enzymatic treatments of pigment extracts

Table 2—Ultrafiltration mass balance* of hydrolyzed caroprotein from fermented shrimp waste

Variable	Hydrolyzed sample before ultrafiltration	Retentate	Permeate
Total xanthophylls (mg)	41.542 (100%)	1.01 (2.43%)	48.077 (115%)
Soluble protein (mg)	887.8 (100%)	827.512 (94%)	15.66 (1.77%)

*basis: 1 g caroprotein

Ultrafiltration of hydrolyzed caroprotein

Ultrafiltrations allowed the separation of 94% of peptides higher than 50 kDa produced by enzymatic treatment. The mass balance for peptides, expressed as soluble protein, and total xanthophylls is shown in Table 2.

Only 1.77% of protein passed through the membrane, whereas most xanthophylls (48.077 mg/g) were in the permeate. The total amount of protein, in retentate and permeate, was 95.77%; the remaining 4.23% protein could be lost by fouling in pipes and fittings. Xanthophyll determination by spectrophotometry included an error term giving 115%. The main source of error was due to turbidity in the hydrolyzed extract prior filtration. However, the amount of protein in the permeate affecting light absorption was very small (15.66 mg/g). Therefore, quantification was more precise in the filtered extract than in the nonhydrolyzed extract prior to filtration.

Only 2.43% xanthophylls were in the retentate (1.01 mg/g), possibly because most of the pigment was already separated from the protein moiety or was bound to peptides smaller than 50 kDa migrating through the membrane. Figure 7 shows the astaxanthin content in the retentate and permeate. Since ultrafiltration is an efficient method to purify astaxanthin, the highest amount of this pigment was in the filtrate obtained from the hydrolyzed caroprotein extract (47.92 µg/g); the lowest concentration was in the retentate (1.36 µg/g). The nonhydrolyzed extract, as well as the hydrolyzed extract prior filtration, had intermediate astaxanthin concentrations (27.89 and 38.91 µg/g). The lower value in the nonhydrolyzed extract was possibly due unbound protein that blocked light absorption.

Conclusions

INOCULATION OF A *LACTOBACILLUS* BACTERIAL CULTURE ISOLATED from tropical shrimp stabilized shrimp residues, especially the astaxanthin structure, thereby increasing the extraction yield

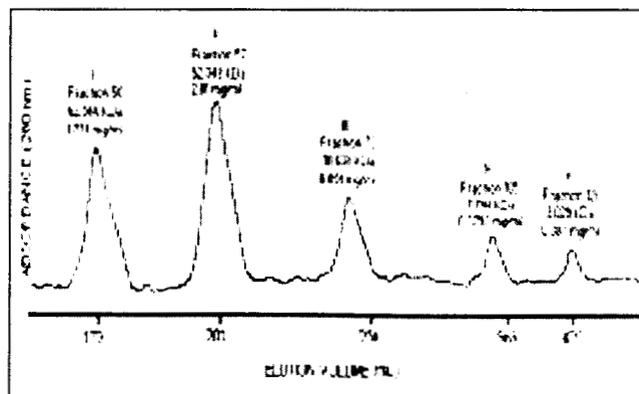


Figure 6—Peptides obtained from enzyme-treated caroprotein

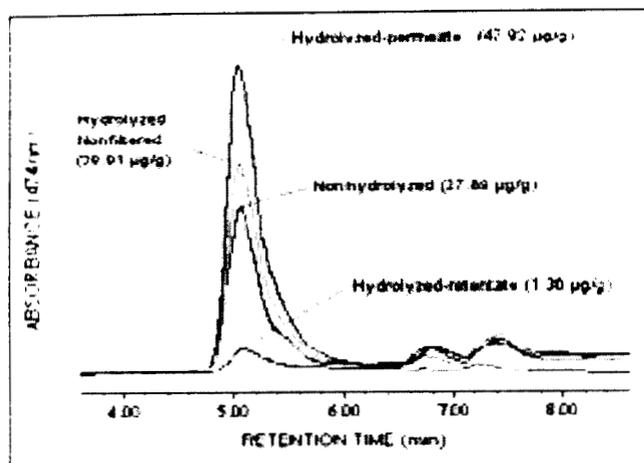


Figure 7—Astaxanthin concentration in caroprotein before and after ultrafiltration, and in nonhydrolyzed samples.

with organic solvents. The highest extraction yield was obtained with petroleum ether:acetone:water (15:75:10), plus added BHA:BHT, and carrying out the process in the dark to prevent oxidation. An enzymatic treatment using a mixture of 4 commercial enzymes was effective in splitting the protein-pigment complex; good results were also obtained using savinase™. A highly purified astaxanthin extract can be obtained by ultrafiltration. However, the use of the above-mentioned enzymes depleted the protein moiety; therefore, studies on the entire protein moiety could not be further carried out.

References

- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis, 15th ed. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists. (Number of Pages?)
- Armenta R. 1998. Estudios sobre caroproteínas extraídas de residuos de camarón fermentados y no fermentados. [MSc Thesis]. Mexico City: Universidad Autónoma Metropolitana. (Total Number of Pages? Where is Thesis Available?)
- Baublis A, Spomer A, Berber-Jiménez MD. 1994. Anthocyanin pigments: comparison of extract stability. *J Food Sci* 59 (6):1219-1234.
- Britton (Spelling Correct? Text Has Britton) G. 1996. Carotenoids. In: Hendry GAF, Houghton JD, editors. *Natural food colorants*. 2nd ed. New York: Blackie Academic and Professional. P 197-243.
- Cano-López A, Simpson BK, Haard NF. 1987. Extraction of carotenoprotein from shrimp process wastes with the aid of trypsin from atlantic cod. *J Food Sci* 52(2):503-506.
- Chen HM, Meyers SP. 1982. Extraction of astaxanthin pigment from crawfish using a soy oil process. *J Food Sci* 47(3):892-896.
- Chen HM, Meyers SP. 1983. Ensilage treatment of crawfish waste for improvement of astaxanthin pigment extraction. *J Food Sci* 48(5):1516-1521.
- Christophersen AG, Knuthsen P, Skibsted LH. 1989. Determination of carotenoids in salmonids. *Lebensm Unters Forsch* 188:413-418.
- Gao L, Mazza G. 1996. Extraction of anthocyanin pigments from purple sunflower hulls. *J Food Sci* 61(3):600-603.

- Giusti MM, Wrolstad RE. 1996. Characterization of red radish anthocyanins. *J Food Sci* 61(2):322-326.
- Guerrero I, Zakaria Z, Hall GM. 1996. Lactic fermentation of prawn waste: comparison of commercial and isolated cultures. In: Domard A, Jeuniaux C, Muzzarelli R, Roberts G, editors. *Advances in chitin science*. Volume 1. Lyon, France: J. André. P 399-404.
- Guillou A, Khalil M, Adambounou L. 1995. Effects of silage preservation on astaxanthin forms and fatty acids profiles of processed shrimp (*Pandalus borealis*) waste. *Aquacul* 130:351-360.
- Hall GM, De Silva (Spelling Correct? Text Has Da Silva) S. 1994. Shrimp waste ensilation. *Infofish Intern* 2(94):27-30.
- Hansen ME, Llanes A. 1994. Applications of crustacean wastes in biotechnology. In: Martin AM, editor. *Fisheries processing: Biotechnological applications*. London: Chapman and Hall. P 174-205.
- Hendry GAF. 1996. Natural pigments in biology. In: Hendry GAF, Houghton JD, editors. *Natural food colorants*. 2nd ed. New York: Blackie Academic and Professional. P 1-39.
- Johnson EL, Peniston QP. 1982. Utilization of shellfish waste for chitin and chitosan production. In: Martin RE, Flick GJ, Hebard CE, Ward DR, editors. *Chemistry and Biochemistry of marine food products*. Westport: AVI Publishing Co. P 415-422.
- Kennedy GY. 1979. Pigments of marine invertebrates. *Adv Marine Biol* 16:309-381.
- Knorr, D. 1991. Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. *J Food Sci* 45(2):114-122.
- Kunitz M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. *J Gen Physiol* 30:291-310.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Mejía LA, Hudson E, De Mejía EG, Vázquez F. 1988. Carotenoid content and vitamin A activity of some common cultivars of Mexican peppers (*Capsicum annuum*) as determined by HPLC. *J Food Sci* 53(5):1448-1451.
- Menasveta P, Worawattanamateekul W, Latscha T, Clark JS. 1993. Correction of black tiger prawn (*Penaeus monodon* Fabricius) coloration by astaxanthin. *Aquacul Eng* 12:203-213.
- Meyers SP, Bligh D. 1981. Characterization of astaxanthin pigments from heat processed crawfish waste. *J of Agric Food Chem* 29:505-508.
- Muriana FJ, Ruiz-Gutiérrez V, Gallardo-Guerrero L, Mínguez-Mosquera MI. 1993. A study of the lipids and carotenoprotein in prawn, *Penaeus japonicus*. *J Biochem* 114(2): 223-229.
- Novo Enzymes. 1997. Protease catalog. Franklinton, N. C. (Total Number of Pages?)
- Peterson GL. 1977. A simplification of the protein assay of Lowry and others which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83:346-356.
- SAS Institute. 1989. SAS User's Guide. Cary, N.C. (Total Number of Pages?)
- Schiedt K, Bischof S, Glinz E. 1993. Metabolism of carotenoids and *in vivo* racemization of (3S, 3'S)-astaxanthin in the crustacean *Penaeus*. *Meth Enzymol* 214(215):148-168.
- SEMARNAP (Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca, Mexico). 1998. Anuario estadístico de pesca. Mexico City. (Total Number of Pages?)
- Simpson BK, Haard NF. 1985. The use of proteolytic enzymes to extract carotenoproteins from shrimp wastes. *J Appl Biochem* 7:212-222.
- Torrissen O, Tidemann E, Hansen F, Raa J. 1981. Ensilage in acid-A method to stabilize astaxanthin in shrimp processing by products and improve uptake of this pigment by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquacul* 26:77-83.
- USDA. 1975. Composition of Foods. Washington, D.C.: United States Dept. of Agriculture. (Total Number of Pages?)
- Zakaria (Spelling Correct? Text Has Zakaria) Z, Hall GM, Shama GM. 1998. Lactic acid fermentation of scampi waste in a rotating horizontal bioreactor for chitin recovery. *Process Biochem* 33(1):1-6.

MS 20010205 Submitted 4/26/01, Accepted 6/29/01, Received 7/5/01

Author R. Armenta-López thanks CONACYT (National Council of Science and Technology-Mexico) for a graduate scholarship. This work was part of a research project funded by CONACYT (Grant 400200-5-28676B).

The authors are with the Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Apartado Postal 55-535. C.P.09340, México, D.F. Mexico. Direct inquiries to author Guerrero L. (E-mail: e-mail: meat@xanum.uam.mx).