



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**Procesos de solubilización/precipitación y de hidrólisis
enzimática para la obtención de concentrados de
proteína, a partir de cefalotórax de camarón blanco
Litopenaeus vannamei.**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos
Naturales
(Orientación en Biotecnología)

p r e s e n t a

Cristy Noemí Catzín Yupit

La Paz, B.C.S. Febrero de 2009

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10:00 horas del día 30 del Mes de Enero del 2009, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

“Procesos de solubilización/precipitación y de hidrólisis enzimática, para la obtención y caracterización de concentrados de proteína a partir del cefalotórax de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*”

Presentada por la alumna:

Cristy Noemí Catzín Yupit

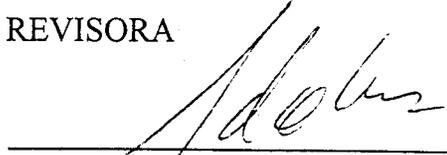
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN

Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA


Dr. César Augusto Salinas Zavala
CO-TUTOR


Dr. Fernando L. García Carreño
CO-TUTOR


Dr. Julio H. Córdova Murueta
DIRECTOR DE TESIS


DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Comité tutorial

Dr. Julio Humberto Córdova Murueta	Director de Tesis
Dr. Fernando Luís García Carreño	Co-tutor
Dr. César Augusto Salinas Zavala	Co-tutor

Comité de Revisión de Tesis

Dr. Julio Humberto Córdova Murueta	CIBNOR, S. C
Dr. Fernando Luís García Carreño	CIBNOR, S. C
Dr. César Augusto Salinas Zavala	CIBNOR, S. C

Jurado de Examen de grado

Dr. Julio Humberto Córdova Murueta	CIBNOR, S. C
Dr. Fernando Luís García Carreño	CIBNOR, S. C
Dr. César Augusto Salinas Zavala	CIBNOR, S. C
Dra. Martha Patricia Hernández Cortés (Suplente)	CIBNOR, S. C

Resumen

Una de las principales formas de comercialización del camarón es congelado y descabezado, la porción comestible es la región abdominal y la región del cefalotórax es desechado por la industria del camarón; éste representa el 45 % de la biomasa que se procesa, cuyos productos de descomposición provocan un impacto ambiental negativo; sin embargo éstos contienen proteínas, quitina y pigmentos con gran potencial económico. La finalidad de este trabajo fue obtener concentrados de proteína por medio del proceso de solubilización/precipitación y de hidrólisis enzimática, y realizar su caracterización funcional. Se manejaron dos lotes de cefalotórax de camarón, uno libre del aditivo metabisulfito de sodio (SM) y el otro tratado con este aditivo (CM), este aditivo es un agente reductor que retarda el proceso de melanización y es utilizado en la industria del camarón para asegurar las características sensoriales del producto.

Para el proceso de solubilización/precipitación se obtuvieron tres concentrados de proteína provenientes de las diferentes fracciones del proceso, estos fueron: concentrado de proteína soluble a pH 7.0 (Ps pH 7.0), concentrado de proteína precipitada a pH 4.0 (PP) y concentrado de proteína soluble a pH 4.0 (Ps pH 4.0); para el proceso de hidrólisis enzimática se obtuvo un concentrado con el 3 % de grado de hidrólisis (HD-3). Se evaluaron las propiedades funcionales de superficie de los concentrados obtenidos, donde la fracción Ps pH 4.0 presentó significativamente una mayor capacidad de formación de espuma (CW), sin embargo la estabilidad de la espuma formada para las fracciones Ps pH 7.0, PP y Ps pH 4.0 oscilaron entre los valores de 50 % y 40 % de estabilidad; la espuma formada por el concentrado del hidrolizado proteico se colapso totalmente a los pocos minutos de formarse la espuma.

En cuanto a la propiedad funcional de emulsión los concentrados de proteína no presentaron diferencias significativas entre ellas; la capacidad de formación de emulsión (CE) fluctuó entre 19 y 23 de CE, cercano a 25 de CE del control (Albúmina de huevo); a pesar de estos resultados la estabilidad de la emulsión formada fue mayor en la fracción Ps pH 4.0 y para HD-3. Entre tratamientos únicamente la fracción Ps pH 4.0 fue la que presentó diferencias significativas en sus propiedades funcionales de superficie, siendo mayor la CW del concentrado CM; caso contrario en la estabilidad de la emulsión que fue el concentrado SM el que presentó mayor estabilidad.

Los concentrados de proteína CM y SM obtenidos por el proceso solubilización/precipitación contienen un buen balance de aminoácidos esenciales y no esenciales; sin embargo, en los HD-3 CM y SM los aminoácidos esenciales His y Val se encuentran a una concentración por debajo de 100 mM. El contenido de proteína para los concentrados de proteína fluctuó entre el 68 % y 75 %, siendo los concentrados de HD-3 CM y SM los que presentaron un contenido ligeramente mayor de proteína.

De acuerdo a las características que presentaron los concentrados de proteína, obtenidos por dos diferentes procesos, el proceso de solubilización/precipitación podría ser una alternativa tecnológica para la obtención de concentrados de proteína funcionales que podrían ser utilizados como aditivo alimentario o como fuente de proteína animal. Además, dentro de este proceso se obtuvo una fracción que no es soluble, compuesta por quitina, lípidos, y quitina asociada a proteínas; esta fracción

puede ser sometida a una hidrólisis enzimática para recuperar quitina, pigmentos e hidrolizados de proteína, aprovechando de esta manera en su totalidad los desechos generados por la industria camaronera.

Palabras claves: Concentrados de proteína, solubilización/precipitación, hidrólisis enzimática, propiedades funcionales.

Vo. Bo. Dr. Julio Humberto Córdova Murueta

Director de Tesis

Abstract

Shrimp farming of *Litopenaeus vannamei* in the Pacific coast of Mexico represents an important industry. The annual production is about 2.5 million ton. The waste materials produced in the shrimp processing industry comprise about 40 to 45% of the whole shrimp weight, this kind of waste is highly perishable and create environmental pollution, but also it is a source of value-added products such as chitin, protein and pigments among others. Shrimp head waste is rich in protein (50-65 %, in dry basis) and usually, it is dried and then used as a protein source in aqua feeds, but the presence of indigestible chitin has limited its use in artificial feeds. Protein and chitin are highly demanded products for different industries and it is important to search for technological strategies to isolate and take advantage of these molecules in added-value products. In this work we used the pH-Shift process and the enzymatic hydrolysis, to obtain protein concentrates from the shrimp head waste (cephalothoraxes) and their functional properties characterization. Two lots of shrimp heads were obtained: with and without sodium methabisulphite.

The protein concentrates obtained were soluble protein at pH 7.0 (Ps pH 7.0), precipitated protein (PP), soluble protein at pH 4.0 (Ps pH 4.0) and hydrolysed protein (HD-3); from both lots of head shrimp waste. Functional characterization showed that the Ps pH 4.0 have excellent foam capacity, the foaming stability for Ps pH 7.0, PP and Ps pH 4.0 was around 40 % and 50 % and only HD-3 showed a void stability. The emulsion capacity from the protein concentrates were approximated that the control (25 % from Albumin), but only Ps pH 4.0 and DH-3 presented higher stability values. The protein concentrates obtained whit pH-shift process presented a good amino acids balance and the HD-3 was poor in two essential amino acids (His and Val). The concentration of proteins was similar in this concentrates just about 68 % and 75 % ($P < 0.05$).

The non soluble fraction discarded in both process, could be used as raw material to get other value component such as chitin, protein hydrolysed and pigments. This study demonstrated that pH-Shift process is an attractive technology for the rapid separation of high value components from shrimp wastes.

Key Words: Protein concentrates, pH-shift process; enzymatic hydrolysis, functional properties.

DEDICATORIA

A quienes forman parte de mi vida y hacen que tenga un brillo especial.

A mis abuelos, a quienes perdí en la trayectoria de esta aventura; por que en vida me enseñaron el verdadero valor de cada momento que se vive y de cada persona.

Que todo ocurre por un motivo y que no podemos cambiarlo, sin embargo podemos intentar que hoy sea mejor que ayer.

A mis padres María D y José A. por amarme, por su amistad y por comprenderme siempre, porque sin ellos parte de esta vida dejaría de brillar como hoy.

A mis hermanos y cómplices: José Alberto, Víctor, Cinthia, Wilma, Jorge, Yoselín y Diana, por compartir juntos tantas aventuras y por su amor.

A mi segunda madre: Ana B. por su amor incondicional, su amistad, sus consejos, su apoyo, por que yo también te amo.

A mi hermana y gran amiga Guadalupe

A la más preciosa e inteligente; quien si no existiera, este trabajo no podría tener agradecimiento ni contenido alguno: CNCY

Ti in yabil, tumen bejlai in yabilmech.

AGRADECIMIENTOS

Si pudiera resumir la vida en una palabra, escogería la palabra decidir. Creo que siempre tenemos que optar ante sus proposiciones. Para quienes decidimos aceptar la investigación como un modo de vida, vemos en la culminación de una tesis una especie de triunfo, una especie de logro personal que de alguna manera justifica la decisión adoptada al menos hasta este punto de la historia. Sin embargo, la tesis propiamente dicha involucra mucho más que resultados y conclusiones en gráficos y textos; se trata de un entrenamiento paulatino que nos permite prepararnos para enfrentar otros desafíos. En ella ponemos muchas energías y volcamos muchos sentimientos que se extienden como un abanico desde la angustia y desazón hasta la euforia y la alegría. Ver la presentación de una tesis es como apreciar una fotografía, en la cual podemos disfrutar de la belleza del paisaje, pero en ella existen además otros detalles invisibles que se pierden en la anécdota y ni siquiera las más bellas palabras pueden asistirnos para describir esa sensación que hemos vivido cuando apreciamos ese paisaje de manera directa. Con la culminación de la tesis, hemos andado parte del camino y si bien a veces creemos que se trata de una senda solitaria, la mayor parte de él estamos acompañados por amigos y compañeros que de alguna u otra forma están con nosotros y nos ayudan. Todas estas personas son ejemplos de los detalles que no aparecen en la fotografía del paisaje, que por más bella que fuese, sin ellas siempre parecería descolorida.

Agradezco al CONACYT por la beca otorgada, por el financiamiento al Dr. Fernando García Carreño en el programa SAGARPA-CONACyT proyecto "Recuperación de proteína del agua de cola proveniente de la industria reductora y de la cabeza de camarón de cultivo para uso como ingrediente en la formulación de alimentos balanceados para acuicultura", aprobado bajo la clave de registro número 11811 en la convocatoria 2007.

Al departamento de postgrado y todo su personal administrativo, por las facilidades y apoyo que me brindaron durante mi estancia de maestría.

Agradezco inmensamente a la Dra. Patricia Hernández Cortés quien fue mi madre adoptiva cuando recién llegue al grupo de Bioquímica, por su apoyo incondicional, sus consejos, su alegría, su amistad y por todo mil gracias.

Por supuesto al Dr. Fernando García Carreño por guiarme y enseñarme en esta aventura de la ciencia, por sus retos, por sus críticas, pero sobre todo mil gracias por su valiosa amistad.

Cómo dejar de agradecer a quien en su momento me ofreció una mano amiga, creyó en mí y me adoptó. Al Dr. Julio Humberto Córdova Murueta, por su paciencia, su tiempo, su amistad.....

Al Dr. Cesar Salinas por la revisión de la tesis y por su comprensión.

A la amiguita Ann por su apoyo moral y emocional, sus sabios consejos y enseñanzas.

A Ana Maria y Tony, de la biblioteca por su apoyo amable y constante.

A mi amiga y hermana Mariana, y a su amor; aunque ella no lo crea y sea demasiado aprensiva conmigo, ya crecí, en serio!

A mi amiga Rivera-Maya (CRP) por todos los momentos vividos, así como los hermanos Bq: Lili, Arlett, Jorge, Hugo y Keny. A l@s amig@s que estuvieron siempre cerca: Adriana, Diana, Santos, Guadalupe, Miriam, Lucio, Naybi, Arizbé, Alejandro, Leo, Abel, Gabriel, Carmen, Alejandra, Elsy, Alwin, Oscar, Juan, Emma, Lolo, Fany, Gloria, Brisa, Viky, Leydi, Johann y Obet. A l@s compañer@s de maestría, y aquellos a quienes en este momento no recuerdo su nombre.

Al amor: que estuvo, está y estará siempre presente, haciendo que mí vida sea mejor.

A todos ellos y a quienes directa o indirectamente han estado conmigo....Muchas gracias!!!.

INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1. 1 Generalidades del camarón.....	1
1. 1. 1 Morfología.....	2
1. 2 Producción acuícola en México.....	3
1. 3 La industria del camarón.....	3
1. 3. 1 Uso de aditivos.....	4
1. 4 La importancia de las proteínas.....	5
1. 5 Estrategias tecnológicas para el aprovechamiento de productos de origen marino	7
1. 5. 1 Proceso de solubilización/precipitación.....	7
1. 5. 2 Proceso de Hidrólisis enzimática.....	8
1. 6 Proteínas y su propiedad funcional en tecnología de alimentos.....	9
1. 6. 1 Solubilidad de proteínas.....	11
1. 6. 2 Espumado.....	12
1. 6. 3 Emulsión.....	12
2. JUSTIFICACIÓN.....	13
3. HIPOTESIS.....	14
4. OBJETIVO.....	14
4.1 Objetivo general.....	14
4. 2 Objetivos específicos:.....	14
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
5. 1 Obtención de muestra.....	15
5. 2 Caracterización químico proximal.....	15
5. 3 Composición de aminoácidos.....	16
5. 5 Obtención de concentrados de proteína por el método de solubilización/precipitación.....	17
5. 6 Obtención de concentrados de proteína por el método de hidrólisis enzimática.....	18
5. 7. Capacidad de formación de espuma y su estabilidad.....	19
5. 8 Capacidad de formación de emulsión y su estabilidad.....	20
5. 8 Caracterización de proteínas por SDS-PAGE.....	20

5. 9. Análisis estadístico.	21
6. RESULTADOS	22
6. 1 Análisis químico-proximal.	22
6. 2 Solubilidad de proteínas a diferentes condiciones de pH.	23
6.3 Obtención de concentrados de proteína por el proceso de solubilización/precipitación (pH-Shift process).	25
6. 3. 1 Rendimientos del proceso de solubilización/precipitación.....	29
6. 4 Obtención de concentrados de proteína por el método de hidrólisis enzimática..	30
6. 4. 1 Rendimientos del proceso de hidrólisis enzimática.	35
6. 5 Contenido de proteína de los concentrados de proteína.....	35
6. 6. Composición de aminoácidos de los concentrados de proteína.....	37
6. 7 Evaluación de las propiedades funcionales de superficie.	39
6. 7. 1 Capacidad de formación de espuma y estabilidad.	39
6. 7. 2 Capacidad y estabilidad de formación de emulsión.....	41
7. DISCUSION DE RESULTADOS	44
7.1 La proteína como molécula de interés, presente en el cefalotórax de camarón....	44
7. 2 Solubilidad de proteínas del cefalotórax de camarón con respecto al pH.	45
7.3 Procesos de solubilización/precipitación y de hidrólisis enzimática, y la obtención de concentrados de proteína.....	46
7. 4 Perfil de aminoácidos y propiedades funcionales de los concentrados de proteína.	48
8. CONCLUSIONES	51
9. REFERENCIAS.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura. 1. Esquema gráfico de la morfología general del camarón.	2
Figura. 2. Solubilidad de proteínas sometidas a diferentes condiciones de pH.....	24
Figura 3. Perfil de proteínas solubles a diferente pH.....	25

Figura 4. Diagrama de la obtención de los concentrados de proteína mediante el proceso de solubilización/precipitación	26
Figura 5. Concentrados de proteína derivados del lote de cefalotórax de camarón, tratado con metabisulfitos de sodio.	28
Figura 6. Concentrados de proteína del lote de cefalotórax de camarón sin metabisulfitos de sodio.	28
Figura 7. Hidrólisis enzimática del homogenado de cefalotórax de camarón	31
Figura 8. Perfil electroforético de las proteínas durante la reacción de hidrólisis enzimática realizada a 28 °C.....	32
Figura 9. Perfil electroforético de las proteínas durante la reacción de hidrólisis enzimática realizada a 50 °C.....	33
Figura 10. Diagrama de flujo para la obtención del hidrolizado de proteína.	34
Figura 11. Concentrado de hidrolizado de proteína.....	34
Figura 12. Rendimiento del proceso de hidrólisis enzimática en base a la materia prima empleada.	35
Figura 13. Capacidad de formación de espuma.....	40
Figura 14. Estabilidad de la capacidad de formación de espuma.	41
Figura 15. Capacidad de formación de emulsión.	42
Figura 16. Estabilidad de la capacidad de formación de emulsión.....	43

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Clasificación taxonómica	2
Tabla II. Análisis químico-proximal del homogenado de cefalotórax de camarón <i>Lotopenaeus vannamei</i>	22
Tabla III. Rendimientos del proceso de solubilización/precipitación.....	30
Tabla IV. Rendimientos del proceso en base a la materia prima utilizada.	30
Tabla V. Análisis químico-proximal de los concentrados de proteína.....	37
Tabla VI. Composición de aminoácidos de los concentrados de proteína obtenidos a partir de cefalotórax de camarón <i>Litopenaeus vannamei</i>	38

LISTA DE ECUACIONES

Fórmula (1)	15
Fórmula (2)	18
Fórmula (3)	19

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de camarones peneidos, ha crecido considerablemente en las últimas tres décadas; son seis las especies de peneidos más cultivadas en el mundo: *Penaeus monodon*; *Fenneropenaeus chinensis*; *F. merguensis*; *Marsupenaeus japonicus*; *L. vannamei* y *L. stylirostris*. Destacan como principales productores de camarón países como Tailandia, Ecuador e Indonesia que aportan el 23%, 17% y 13% de la producción mundial anual respectivamente (FAO, 2000). México ocupa el séptimo lugar mundial como país productor de camarón, cuya producción nacional corresponde al 80% en materia acuícola. La producción acuícola ha progresado durante las últimas dos décadas (Hannesson, 2003), con una tasa de crecimiento en los ochentas del 5.3 % y en los noventa de 7.1 % (FAO, 2002). Actualmente la producción acuícola del camarón a nivel global se encuentra alrededor de 1, 568, 386 toneladas métricas. (FAO; 2006).

1.1 Generalidades del camarón

Los camarones son crustáceos artrópodos mandibulados con apéndices articulados, poseen dos pares de antenas, caparazón, branquias y presentan diferentes estadios larvales. Los camarones de la familia Penaeidae son considerados entre los más importantes a nivel mundial por su valor comercial, dentro de este grupo se encuentra el camarón *Litopenaeus vannamei* (Tabla 1), conocido regionalmente como camarón blanco y ésta es una especie nativa de la costa del Océano Pacífico. Esta especie se distribuye a partir de Sonora en el Golfo de California, México, hasta las costas de Perú; Se le puede encontrar en aguas costeras desde 0 hasta 72 m de profundidad, sobre

fondos fangosos, con preferencia por las aguas marinas en su vida de adulto y por las estuarinas desde postlarva hasta juveniles.

Tabla I. Clasificación taxonómica

Phylum	Arthropoda
Clase	Malacostraca
Orden	Decapoda
Familia	Penaeidae
Género	Litopenaeus
Especie	Litopenaeus vannamei

Clasificación de acuerdo al Integrated Taxonomic Information System (ITIS)

1. 1. 1 Morfología

El cuerpo del camarón se divide en tres regiones: cefalotórax, abdomen y telson (Fig. 1); la porción comestible del camarón es el abdomen, el cual corresponde al 55 % de su peso total (músculo) y el 45 % restante esta conformado por el cefalotórax (SEMARNAP, 1998), el cuál es comúnmente desechado.

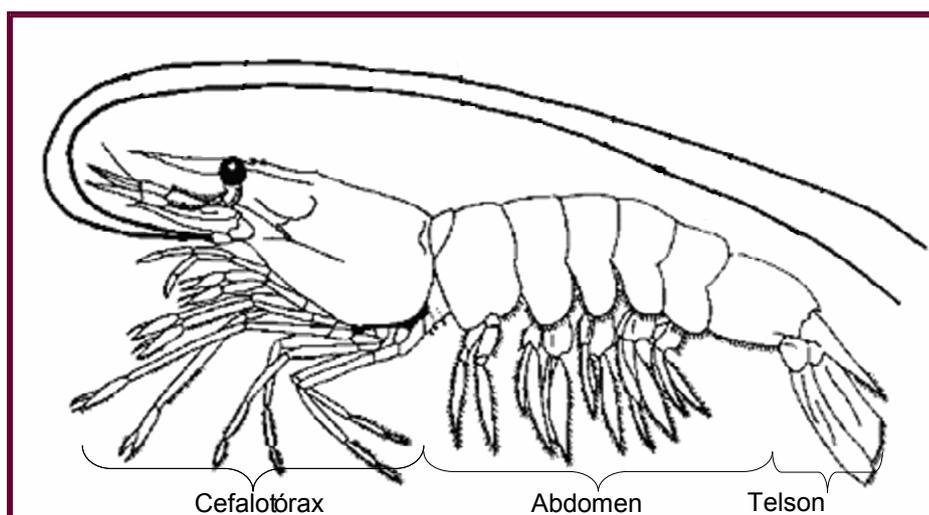


Figura. 1. Esquema gráfico de la morfología general del camarón.

1. 2 Producción acuícola en México

La producción acuícola en México ha aumentado en los últimos 20 años, en especial en el Noroeste del país en donde se encuentra el 97 % de las granjas de camarón, siendo ésta una de las zonas productoras de camarón más importantes en Latinoamérica (Páez et al., 2003). En el Pacífico mexicano habitan 3 especies de peneidos que se explotan comercialmente: *Litopenaeus vannamei*, *Litopenaeus stylirostris* y *Farfantepenaeus californiensis*, siendo la más importante *L. vannamei*, en materia acuícola. Los principales estados productores de camarón son Sinaloa, Sonora, Nayarit y Baja California Sur (Audelo et al, 2006).

1. 3 La industria del camarón

El camarón que se produce en los sistemas de cultivo de nuestro país, se comercializa en diferentes presentaciones; tales como camarón entero congelado, deshidratado, enlatado, sin cabeza y congelado, entre otros. Siendo Estados Unidos el principal mercado para la exportación del camarón cultivado en el Pacífico mexicano, pues tan sólo en el 2007 se exportaron 17, 614 ton a este mercado (FAO-GLOBEFISH, 2007). Una de las principales presentaciones en la que México exporta el camarón al mercado de Estados Unidos es congelado y sin cabeza, ya que en el 2007 nuestro país ocupó el cuarto lugar en la categoría de exportador de camarón en dicha presentación. (FAO-GLOBEFISH, 2007).

1. 3. 1 Uso de aditivos

El camarón es un crustáceo demandado por el paladar de muchas personas en el mundo, y éste requiere un delicado procesamiento para que la frescura y el color se preserven; por lo que todas aquellas empresas que lo exportan deben cumplir con los requisitos internacionales de normas sanitarias y control de calidad. Uno de los problemas a los cuales se enfrentan es a la reacción de melanosis, que provoca el oscurecimiento del camarón y empieza a aparecer de 2 a 12 hr postmortem; en esta reacción de oscurecimiento interviene la enzima polifenoloxidasas (EC. 1. 10. 3. 1). Para retardar este proceso, la industria alimentaria recurre a la aplicación de aditivos como antioxidantes y antibacterianos; tal como el metabisulfito de sodio, que de acuerdo al índice del código alimentario se permite hasta 100 mg SO₂/kg de producto. Los sulfitos han sido usados por la industria pesquera desde los años '50 para prevenir la melanosis (Slattery et al., 1992). La utilización de aditivos en crustáceos está dirigida a la prevención y control de la melanosis que es uno de los mayores problemas relacionados con su comercialización. En la actualidad se permite la utilización de sulfito sódico, sulfito ácido de sodio, metabisulfito sódico y metabisulfito potásico en dosis máximas de acuerdo al índice del código alimentario de 100 mg/kg en el músculo del producto crudo y de acuerdo a las normas australianas de 30 mg/kg en el músculo cocido, el cual es expresado como SO₂. Los sulfitos son compuestos polivalentes que desde un punto de vista tecnológico encuentran aplicación en distintos tipos de alimentos. Entre sus acciones más relevantes destaca su capacidad de retardar el oscurecimiento enzimático y no enzimático, el control e inhibición del crecimiento microbiano, la prevención del enranciamiento oxidativo y la modificación de las propiedades reológicas de los

alimentos. Estos aditivos tienen aplicaciones específicas en relación con cada efecto concreto, pero en la mayoría de los alimentos se usan con más de una finalidad.

1. 4 La importancia de las proteínas.

Desde el punto de vista de la nutrición, las proteínas desempeñan un papel importante, ya que a pesar de existir una gran cantidad de nitrógeno en la Tierra, éste se encuentra en forma elemental en la atmósfera y no se encuentra de manera disponible para satisfacer las necesidades biológicas de los organismos, ya que para la síntesis de proteínas, de ácidos nucleicos y de otras sustancias nitrogenadas de gran interés sólo utilizan el nitrógeno orgánico proveniente de los polipéptidos que obtienen de su dieta. Los subproductos generados por la industria camaronera representan una fuente importante de proteína que podría aprovecharse en alimentos para animales e incluso humanos. Sin embargo se debe de tener presente que cualquier esfuerzo por aprovechar estos desperdicios debe de considerar la probabilidad de que contengan algún aditivo como el mencionado en el apartado anterior, y que éste pudiera tener algún efecto sobre las propiedades del producto final. Los desechos de la industria camaronera pueden dividirse en sólidos y líquidos; entre los primeros encontramos: cefalotórax, cutícula o exoesqueleto, vísceras y fragmentos de carne que no han sido removidos en la operación de pelado, mientras que los desechos líquidos o efluentes, están representados por el agua de blanqueo. En general el rendimiento de los subproductos oscila entre el 35 % y 45 % del peso total del camarón (Shirai *et al.*, 1997).

Los desechos generados por la industria camaronera representan una fuente de contaminación ambiental, sin embargo estos son fuentes de moléculas tales como proteína, quitina y pigmentos; por lo que se ha hecho lo posible por aprovechar estos desperdicios, una de las formas ha sido en la elaboración de harinas (producto secado a fuego directo y luego pulverizado), que se utilizan como una fuente alternativa de proteína en alimentos para peces (Oliveira *et al.*, 2007); sin embargo la presencia de quitina, la cual se encuentra formando complejos estables con la proteína, lo hacen un producto poco digerible.

A estos subproductos se les ha intentado dar otros usos, por ejemplo, Andrade y colaboradores (2007) propusieron el uso de la harina de cefalotórax de camarón para la elaboración de un sazonador (Andrade *et al.*, 2007). También se ha planteado la obtención de subproductos como la quitina, quitosano, (Holanda y Netto, 2006) y carotenoides (Armenta *et al.*, 2002) a partir de desechos de la industria del camarón. Debido a que la proteína es un componente de importancia económica y desde el punto de vista nutricional, se han empleado diversos métodos para aprovechar la proteína presente en los desechos generados por la industria camaronera, uno de ellos es el ensilado (Armenta *et al.*, 2002; Amar *et al.*, 2006). El producto obtenido de este proceso ha sido usado como fuente de proteína para la formulación de alimentos para camarón, y peces (Amar *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2007). Otro método ampliamente utilizado para aprovechar la proteína de los desperdicios de camarón es la hidrólisis enzimática (Simpson y Haard, 1985; Cano *et al.*, 1987; Armenta *et al.*, 2002; Mizani *et al.*, 2005; Holanda y Netto, 2006; Ruttanapornvareesakul *et al.*, 2006), por medio de la cual se obtienen hidrolizados de proteína, estos son una fuente de péptidos biológicamente activos, con usos potenciales en farmacología y como fuente de proteína en la

elaboración de alimento animal (Cangre *et al.*, 1999; Kristinsson y Rasco, 2000; Córdova y García, 2002). Los hidrolizados de proteína obtenidos a partir de cefalotórax de camarón también han sido utilizados como aditivo en la industria alimentaria. Por ejemplo Ruttanapornavareesakul y colaboradores (2006), propusieron el uso de éstos para mantener la estructura y textura de las miofibrillas musculares, ya que evitan la desnaturalización de las proteínas durante los periodos largos de almacenamiento en congelación. La mayor parte de las investigaciones realizadas hasta el momento se han dirigido en la obtención de hidrolizados de proteína, en los cuales se han usado enzimas tales como Alcalasa (Mizani *et al.*, 2005; Holanda y Netto, 2006), o enzimas producidas por microorganismos (Armenta *et al.*, 2002; Amar *et al.*, 2006). Así mismo la hidrólisis enzimática se ha utilizado para la separación y recuperación de otros componentes de interés como quitina y carotenoproteínas.

1. 5 Estrategias tecnológicas para el aprovechamiento de productos de origen marino.

La producción de surimi y otros procesos para extraer proteínas nativas e hidrolizados de proteína se han desarrollado con el fin de optimizar el uso de los recursos pesqueros y para darle valor agregado a subproductos de la pesca y a organismos marinos con nulo o bajo valor comercial.

1.5.1 Proceso de solubilización/precipitación.

Un proceso novedoso que se puede aplicar para recuperar la proteína de los desperdicios de la industria camaronera es el de solubilización/precipitación por pH. La

obtención de proteínas musculares por medio de este proceso fue desarrollado por Hultin y colaboradores (Hultin y Kelleher, 1999; Hultin y Kelleher, 2000; Hultin, 2002); éste proceso es una estrategia tecnológica que ofrece ventajas al utilizar materias primas de origen marino de bajo valor o poco atractivas para ser procesadas por otros métodos. Este proceso esta basado en la solubilización a pH ácido o alcalino de las proteínas musculares, seguida de la precipitación de las proteínas solubles, que al final resulta en la recuperación de un concentrado de proteína útil en la elaboración de productos tipo gel, gel-emulsificado y surimi (Hultin y Kelleher, 1999; Hultin y Kelleher, 2000; Hultin, 2002; Undeland *et al.*, 2002; Kristinsson y Liang, 2006). El proceso de solubilización/precipitación permite la separación selectiva de las proteínas, aislándolas de forma fácil de otros componentes presentes en la materia prima. Así mismo se eliminan diversas reacciones indeseables que se generan durante el manejo del músculo de especies marinas, tales como hidrólisis enzimática la cual se lleva a cabo por enzimas endógenas o por enzimas microbianas, las cuales son reducidas o inhibidas por los pHs ácido o alcalino, ya que se emplean valores extremos, además de que el proceso se lleva a cabo a baja temperatura (4 °C) (Hultin, 2002).

1. 5. 2 Proceso de hidrólisis enzimática

Los hidrolizados pueden definirse como proteínas que han sido seccionadas en péptidos de varios tamaños por métodos enzimáticos. Se sabe que los hidrolizados de proteína poseen características con valor biológico, tales como contenido de péptidos promotores de crecimiento, antioxidantes, antibióticos, anticancerígenos y atractantes, entre otros (Dziuba *et al.*, 1999; Córdova y García, 2002). Las propiedades y usos de los hidrolizados, dependen en gran medida de la enzima que se utilice en el proceso, el

grado de hidrólisis que se le dé y las condiciones en las que se desarrolle la reacción (pH, temperatura) (Dzwolak y Ziajka. 1999). La hidrólisis enzimática se lleva a cabo bajo condiciones no agresivas evitando los extremos que normalmente se requieren para tratamientos químicos y físicos. Para la obtención de hidrolizados funcionales se deben de tener en cuenta muchos factores durante su proceso, entre ellos se encuentran los siguientes puntos.

-Las características deseadas del producto a obtener.

-La elección de la fuente adecuada de proteína.

-La elección de enzimas proteolíticas y sus propiedades catalíticas acordes a las condiciones del proceso (Temperatura y pH)

-El desarrollo de procesos posthidrólisis como el de asegurar que la acción catalítica de las enzimas se ha detenido para evitar hidrólisis exhaustiva de las proteínas.

1. 6 Proteínas y su propiedad funcional en tecnología de alimentos

Las proteínas no solo son fuente de aminoácidos sino que, debido a su naturaleza polimérica, su presencia influye en las características reológicas y de textura de los alimentos que las contienen. La capacidad de las proteínas de conferir una característica a un alimento se le conoce como propiedades funcionales, lo cual se define como “cualquier propiedad fisicoquímica de los polímeros que afecta y modifica algunas características de un alimento y que contribuye a la calidad final del producto” o bien “como cualquier propiedad de un alimento o ingrediente, excepto la nutricional, que

influya en su utilización para obtener un producto deseado” (Pour, 1981; Smith, 1987; Hall, 1996). Las propiedades funcionales son la capacidad de hidratación, el espumado, la emulsificación y la gelificación, entre otros; estas dependen fundamentalmente de factores propios de la molécula como: conformación, relación y disposición de aminoácidos, hidrofobicidad, ionización, carga eléctrica, forma, peso molecular, así como de factores extrínsecos del medio que los rodea y que en ocasiones pueden modificarse, como son pH, fuerza iónica, temperatura, actividad acuosa, constante dieléctrica, etc. (Pour, 1981; Hall, 1996; Belitz, *et al.*, 2004).

Las propiedades funcionales de una proteína dependerán de su estructura primaria (secuencia de aminoácidos), la naturaleza de los residuos en la cadena lateral (polar, no polar, carga positiva o negativa), la proporción de cada clase de aminoácidos y su distribución a lo largo de la cadena, lo cual determinará la solubilidad, hidrofobicidad de superficie y la capacidad de estabilizar espumas, emulsiones y geles. Por otra parte, el tamaño y naturaleza de las cadenas laterales determina la estructura secundaria y terciaria, y ésta a su vez, las posibles interacciones con el medio; por lo tanto, la estructura, tamaño, distribución y los aminoácidos que la conforman, definirá la funcionalidad de una proteína. En el caso de las proteínas musculares, miosina y actina son las principales moléculas responsables de las propiedades funcionales (Hultin y Kelleher, 1999; Undeland, *et al.*, 2002, De la Fuente, 2006). La calidad y estabilidad del producto final son afectadas por las propiedades funcionales de las proteínas (Xiong, 2000). Cuando se requiere producir un concentrado de proteína funcional para ser utilizado en alimentos, las propiedades funcionales de mayor interés son solubilidad, emulsificación y gelificación (Hultin y Kelleher, 1999); también son importantes la viscosidad, retención de agua y el espumado.

1. 6. 1 Solubilidad de proteínas

La solubilidad de las proteínas, que resulta de las propiedades de superficie activa, es la concentración de proteína presente o ligada en el solvente en un estado de equilibrio en la fase líquida. Vista en parte como un parámetro operacional de un proceso, la solubilidad es determinada por la retención de proteína en el sobrenadante obtenido después de centrifugar un sistema de una o dos fases. (Hall, 1996; Vojdani, 1996). Esta característica o propiedad es de gran importancia por su influencia sobre otras propiedades funcionales como la formación de emulsión, espuma y gelificación (Vojdani, 1996; Belitz, *et al.*, 2004). Cambios en la solubilidad de las proteínas pueden ser obtenidos de varias maneras, variando la fuerza iónica, los tipos de iones, pH y/o temperatura, lo cual afecta la naturaleza hidrófoba o iónica de las proteínas. Por efecto del pH, las proteínas adquieren una carga neta negativa o positiva, lo que resulta en una repulsión entre ellas y una hidratación de los residuos cargados, provocando a su vez un incremento de la solubilidad (Damodaran, 1996; Yongsawatdigul y Park, 2004). En el valor de pH en el que la carga neta de la proteína es igual a cero se le conoce como punto isoeléctrico (pI), por debajo de su (pI) las proteínas presentan carga positiva y por arriba de este tienen carga neta negativa. En el momento en que el pH se ajusta cerca del pI se reducen las fuerzas de repulsión permitiendo que se atraigan entre ellas (Yongsawatdigul y Park, 2004; Ingadottir, 2004; Kristinsson y Liang, 2006). Así, la agregación de proteínas a estas condiciones permitirá que estas sean separadas o removidas de la solución por medio de una centrifugación (Hultin *et al.*, 2000; Hultin y Kelleher, 1999).

1. 6. 2 Espumado

La capacidad de formación de espuma juega un papel importante en la elaboración de meregues, mousses, batidos y en la industria cervecera. La capacidad de formación de espuma se debe al carácter anfipático (hidrofilico y apolar/hidrofóbico) de las proteínas, que les permite su adsorción en interfases (aire en una fase continua). Durante el espumado, la función de las proteínas es reducir la tensión interfacial, orientando sus grupos hidrófilos hacia el exterior de la burbuja, en contacto con el agua, y los hidrófobos hacia el interior, en contacto con el aire donde en ciertas ocasiones la capacidad mantener estables estos sistemas se vuelve aun más importante que generar el mismo ([Wilde y Clark, 1996](#)).

1. 6. 3 Emulsión

La emulsión, es definida como una dispersión o suspensión de dos líquidos inmiscibles, donde existe una fase dispersa y una continua. Éstas a su vez son estabilizadas por emulsificadores, los cuales son compuestos capaces de formar una película en la interfase, lo que previene que las fases dispersas se unan entre sí. Las emulsiones en alimentos pueden ser agua en aceite, como las mantequillas, o aceite en agua, como la leche. Una emulsión es intrínsecamente inestable y con el tiempo las gotas de la fase dispersa tenderán a atraerse y poco a poco se romperá la emulsión llegando a la separación de fases. La estabilidad de una emulsión depende del tamaño y posición de las partículas sólidas, además de las fuerzas asociadas con la interfase de aceite y agua ([Hill, 1996](#); [Belitz *et al.*, 2004](#)).

2. JUSTIFICACIÓN

Los desechos generados por la industria camaronera representan entre el 50 % y 70 % de la biomasa que se procesa; y éstos por ser perecederos contribuyen a la contaminación del ambiente. Sin embargo son ricos en componentes con potencial económico tales como proteínas (50-65 %), quitina (11-32 %) y pigmentos (Bataille, 1983; Shahidi, 1991; Ibrain, 1999). Estas características hacen que este “desecho” sea de interés, ya que puede ser aprovechado para la obtención de moléculas como las proteínas, y proporcionar valor a los desperdicios generados en la industria del camarón. No existe reporte alguno sobre la utilización del proceso de solubilización/precipitación por medio de cambios de pH para la recuperación de concentrados de proteína a partir de cefalotórax de camarón, mucho menos sobre las propiedades funcionales, tales como capacidad de formación de espuma y emulsión. La finalidad de este trabajo fue obtener concentrados proteicos, mediante el proceso de solubilización/precipitación y de hidrólisis enzimática, recuperando la proteína como principal molécula de interés. De igual manera se trabajó para caracterizar funcionalmente las proteínas presentes en el cefalotórax de camarón blanco para obtener información valiosa que contribuya a proporcionarle valor al recurso.

3. HIPOTESIS

Si el proceso de solubilización/precipitación permite recuperar proteína sin hidrolizarla y si la hidrólisis parcial afecta de forma negativa a las propiedades funcionales de las proteínas; entonces, los concentrados de proteína obtenidos por el proceso de solubilización/precipitación presentarán mejores propiedades funcionales que los concentrados de proteína obtenidos por hidrólisis enzimática.

4. OBJETIVO

4.1 Objetivo general

Obtención de concentrados de proteína por los procesos de solubilización/precipitación y por medio de hidrólisis enzimática, así como la caracterización funcional de los productos obtenidos.

4.2 Objetivos específicos

1. Obtener concentrados de proteína por el método solubilización/precipitación (pH-Shift process) y por el método de hidrólisis enzimática a partir de muestras de cefalotórax de camarón *Litopenaeus vannamei*.
2. Determinar la composición químico-proximal y de aminoácidos de la materia prima y de los productos obtenidos
3. Caracterizar y comparar las propiedades funcionales de los concentrados de proteína.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5. 1 Obtención de muestra

Se procesaron dos lotes de cefalotórax de camarón *Litopenaeus vannamei*; un lote se obtuvo de los estanques de cultivo del CIBNOR en La Paz B.C.S. y el otro se obtuvo de una empresa maquiladora local de camarones. Éste último lote había sido tratado con metabisulfitos de sodio. Se prepararon mezclas homogéneas a partir de las muestras obtenidas de cefalotórax, para lo cual se empleó un molino centrífugo Retsch Brinkmann con un tamiz de 1 mm de luz de malla, los homogeneizados obtenidos se almacenaron a -20 °C hasta su posterior uso en las evaluaciones correspondientes.

5. 2 Caracterización químico proximal

Proteína. La cuantificación de nitrógeno total se realizó mediante el uso del equipo LECO®-FP-528 (% N x 6.25), se utilizó como estándar EDTA (9.57 % de N). El contenido de proteína total en el homogeneizado de cefalotórax de camarón, se determinó de acuerdo a la Formula (1).

$$\text{Fórmula (1)} \quad Pc = (NT - NQ) \times 6.25$$

Donde Pc es el contenido proteína total corregida en la muestra, NT es el % de nitrógeno total contenido en la muestra y NQ es el % de nitrógeno presente en la quitina de la muestra.

La cuantificación de quitina se llevó a cabo de acuerdo al método de Shahidi y Synowiecki ([Shahidi y Synowiecki, 1991](#)). Se pesaron 10 gr del homogeneizado inicial

y se adicionaron 20 ml de NaOH al 5 %, se expuso a 100 °C durante 2 hr.; posteriormente se filtró y se realizaron varios lavados con agua deionizada. Posteriormente se le adicionó 20 ml de HCl al 5 % y se dejó en agitación por 2 hr a 25 °C; nuevamente se filtró y se realizaron varios lavados con agua deionizada. Se dejó secar por 12 hr a 110°C. El contenido de nitrógeno total contenido en la fracción de quitina se cuantificó por mediante el sistema LECO®-FP-528.

Humedad. El contenido de humedad se determinó por diferencia de peso a 70 °C a un tiempo de exposición de 24 hr, de acuerdo a los métodos oficiales de la AOAC-2005

Lípidos. La determinación de lípidos totales se realizó de acuerdo a los métodos oficiales de la AOAC-2005, se empleo el equipo de Soxtec®-Avanti TECATOR.

Cenizas. Se realizó de acuerdo a los métodos oficiales de la AOAC-2005. Se determinó por diferencia de peso (calcinación a 500 °C / 24 hr).

5. 3 Composición de aminoácidos

La cuantificación de aminoácidos esenciales y no esenciales se realizó mediante el uso de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Las muestras se sometieron a una hidrólisis ácida por 24 hrs a 110 °C, posteriormente se sometieron a evaporación mediante el uso de un rotavapor. Las muestras hidrolizadas y secas, se resuspendieron con agua deionizada y se filtraron antes de inyectar al equipo de HPLC. Se empleó como fase móvil A: acetato de sodio (NaAc) 20 mMol + Trietilamina (TEA) 0.018%, pH 7.2 con ácido acético al 1-2%; y como fase móvil B: 20 % de NaAc 100 mMol, pH

7.2 con ácido acético al 1-2%, + acetonitrilo 40% + MeOH 40%, y con un flujo de 0.45 ml/min.

5. 4 Solubilidad de proteínas de cefalotórax de camarón

Se preparó una mezcla de homogeneizado de cefalotórax de camarón y agua destilada fría (1:10), se disolvió durante 20 seg mediante el uso de una licuadora. Posteriormente la mezcla se fraccionó en 11 recipientes y a cada uno de estos se le ajustó el pH añadiendo HCl 2M ó NaOH 2M según el caso; el rango de pH evaluado fue de 2 a 12. Después de ajustar cada punto de pH se tomó una alícuota de 1 ml, y se centrifugó a $10,000 \times g$ por 20 minutos a 4°C , usando una centrifuga Eppendorf 5804R (Brinkman Instruments Inc., Hamburg, Germany). Posteriormente se cuantificó la proteína soluble empleando el método de Biuret ([Torten y Whitaker 1964](#)), con esta información se generó una curva de solubilidad, donde la variable de respuesta fue la cantidad de proteína soluble y la variable independiente fue el pH. Se empleó como proteína estándar albúmina bovina en un rango de concentración de 1 a 10 mg / ml.

5. 5 Obtención de concentrados de proteína por el proceso de solubilización/precipitación

Se empleó el proceso desarrollado por Hultin y Kelleher ([Hultin y Kelleher, 1999](#)) con algunas modificaciones para este trabajo. Se partió de una mezcla de homogeneizado de cefalotórax de camarón y agua destilada fría (1:10) y disolvió por 20 seg con una licuadora. Posteriormente a la mezcla se le ajustó el pH a 7.0 adicionando HCl (2M), y se centrifugó a $10,000 g$ por 20 minutos a 4°C ; al finalizar se recuperó la fracción del sobrenadante y para lograr la agregación y precipitación de las proteínas,

esta fracción soluble se ajustó a pH 4.0. Seguidamente para sedimentar y recuperar el concentrado de proteína, se sometió a una segunda centrifugación a $10,000 \times g$ por 20 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$; al final se obtuvo una fracción precipitada y otra fracción soluble a pH 4.0. Posteriormente las fracciones resultantes de este proceso fueron liofilizadas.

Con el proceso de solubilización/precipitación se recuperaron tres concentrados proteicos, los cuales fueron: proteína soluble a pH 7.0 (Ps pH 7.0), resultante de la primera etapa de centrifugación; proteína precipitada (PP) y proteína soluble (Ps pH 4.0), ambas obtenidas a pH 4.

5. 6 Obtención de concentrados de proteína por el método de hidrólisis enzimática

El ensayo preliminar para establecer los parámetros operacionales del proceso de hidrólisis enzimática, se realizó a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, a pH 8.0 y se utilizaron las enzimas endógenas presentes en el homogeneizado de cefalotórax de camarón. En la mezcla total de reacción se utilizó el 4 % de proteína como sustrato, el tiempo total de reacción fue de 1 hr, para medir el grado de hidrólisis se registró la cantidad de base consumida cada 5 min.

El grado de hidrólisis se define como: el número de enlaces peptídicos hidrolizados (h) entre el número de enlaces peptídicos totales por unidad de peso (h_{tot}), expresado en porcentaje. El grado de hidrólisis se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación de Adler-Nissen ([Adler-Nissen, 1986](#)).

Fórmula (2).

$$DH = \frac{(B)(N_b)}{(Mp)(\alpha)(h_{\text{total}})} \times 100$$

Donde B es el total de la base consumida (ml), Nb la normalidad de la base, Mp la masa de la proteína en g, y se empleo un valor de $h_{total} = 7.7$. El valor de α se determina utilizando el algoritmo de la siguiente fórmula.

Fórmula (3).

$$\alpha = \frac{1}{1 + 10^{pK - pH}}$$

Donde α es el promedio del grado de disociación de los grupos α -NH₂, pK es el valor promedio del pK de los grupos α -amino liberados durante la hidrólisis.

Se estableció obtener los hidrolizados de proteína con un 3 % de grado de hidrólisis. La reacción de hidrólisis enzimática se llevó a cabo a una temperatura de 50 °C y a un pH de 8.0 y se utilizó las enzimas endógenas presentes en el homogeneizado de cefalotórax de camarón. La reacción de hidrólisis se detuvo bajando la temperatura hasta 4 °C después de 15 min para el lote sin metabisulfito, y a los 25 min en el caso del lote tratado con tal aditivo. Posteriormente la mezcla hidrolizada se sometió a una centrifugación a 10,000 x g por 20 min a 4 °C y seguidamente se recuperó la fracción del sobrenadante, la cual posteriormente fue liofilizada.

5. 7. Capacidad de formación de espuma y su estabilidad

La formación de espuma y su estabilidad se determinó de acuerdo al método de Rudin ([Wilde y Clark, 1996](#)). Este método consistió en preparar una solución al 3% de proteína y agitarla-batirla durante 1 minuto utilizando un impulsor de propela para incorporar aire a la mezcla. La capacidad de formación de espuma se determinó con base en el resultado del incremento del volumen inicial; la estabilidad de la espuma se calculó como el porcentaje del volumen remanente después de 60 minutos de reposo a

temperatura ambiente. Se empleó como control albúmina de huevo, la cual es reconocida como excelente espumante (Matringe y Col., 1999).

5. 8 Capacidad de formación de emulsión y su estabilidad

La capacidad de emulsión se determinó empleando el método de Swift (Hill, 1996). Se preparó una mezcla de proteína, agua y aceite, dando una proporción de 0.3% de proteína y 15.5% de aceite vegetal, y se agitó utilizando un impulsor de propela a máxima velocidad durante 30 segundos. Seguidamente se centrifugó a $5000 \times g$ por 5 minutos en una centrifuga Eppendorf 5804R (Brinkman Instruments Inc., Hamburg, Germany) con rotor SS-34. El volumen de la emulsión generada se registró para cada muestra, la capacidad de emulsión se determinó de acuerdo al resultado de la relación del volumen de la emulsión formada respecto al volumen total inicial del sistema. La estabilidad de la capacidad de formación de emulsión se determinó de acuerdo al volumen de emulsión remanente después de un tratamiento térmico (80 °C por 30 minutos. Se empleo como control albúmina de huevo.

5. 8 Caracterización de proteínas por SDS-PAGE

La caracterización por SDS-PAGE (Laemmli, 1970) se realizó por medio del uso de geles de gradiente de poliacrilamida (7.5 % al 15 %) de 1.5 mm de espesor, bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras. La electroforesis se desarrolló en una cámara vertical (Hofer, Inc, modelo SE 260) a corriente constante (15 mA por gel). Se emplearon estándares de peso molecular: de 14 a 97 kDa. Las bandas de proteínas fueron reveladas por tinción con una solución de azul brillante de Coomassie R-250. Se

eliminó el exceso de colorante con una solución de lavado (metanol 40%; ácido acético 7%). La digitalización de las imágenes se realizó empleando un escáner UMAX 2100XL.

5. 9. Análisis estadístico

Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) no paramétrica y la prueba de Kruskal-Wallis para determinar diferencias significativas ($P < 0.05$) en los experimentos a un 95 % de confiabilidad.

Todos los análisis fueron evaluados por triplicado. Se realizó el análisis de las interacciones entre los lotes utilizados (con y sin metabisulfitos de sodio) y los concentrados de proteína obtenidos. Se corroboró la homogeneidad de varianzas de los datos por la prueba de Barlett, con el fin de identificar tanto las poblaciones de datos con comportamiento normal, así como las que no lo presentaban. Para los análisis no paramétricos se empleó la Prueba de Multirango para determinar cual de las medias fue significativamente diferente de las demás (95 % de confiabilidad). Se utilizaron comparaciones de gráficas de caja y bigote para determinar cual de las poblaciones fue significativamente diferente de las demás (95 % de confiabilidad). El programa utilizado fue Statgraphics^R Plus V. 5. 0.

6. RESULTADOS

6.1 Análisis químico-proximal

La humedad de los homogeneizados de cefalotórax de camarón *Litopenaeus vannamei* de ambos lotes: con y sin metabisulfito de sodio (CM y SM), fue de 72.87 %; y de acuerdo al análisis químico-proximal el contenido de proteína total fue del 59 % para el lote CM y 60 % en el caso del lote SM (Tabla 2). El cefalotórax de camarón está cubierto por el exoesqueleto, éste último está conformado por quitina, por lo cual se determinó el contenido de nitrógeno correspondiente a este polímero; y de acuerdo a la fórmula descrita en la sección de materiales y métodos se calculó el contenido de proteína corregida, el cual para el lote CM fue de 28.57 % y de 29.85 % en caso del lote SM. El contenido de proteína entre los lotes de cefalotórax no presentó diferencias significativas ($P > 0.05$).

Tabla II. Análisis químico-proximal del homogeneizado de cefalotórax de camarón *Litopenaeus vannamei*.

	Con Na ₂ S ₂ O ₅	Sin Na ₂ S ₂ O ₅
(%)	Hi	Hi
Proteína total	59.00 ^a ± 0.67	60.00 ^a ± 0.38
Proteína corregida	28.57 ^a ± 1.02	29.85 ^a ± 0.59
Quitina (nitrógeno total)	4.90 ^a ± 0.15	4.76 ^a ± 0.04
Humedad	1.42 ^a ± 0.16	2.01 ^b ± 0.26
Lípidos	15.37 ^b ± 0.26	14.47 ^a ± 0.25
Cenizas	14.56 ^a ± 0.24	14.35 ^a ± 0.15

Hi: Homogeneizado inicial; Proteína corregida = (% de N total - % de N quitina); Na₂S₂O₅: metabisulfito de sodio. La comparación se realizó entre columnas, las letras iguales indican que no existe diferencia significativa ($P > 0.05$).

6. 2 Solubilidad de proteínas a diferentes condiciones de pH

En el proceso de solubilización/precipitación (pH-shift process) se requiere conocer la solubilidad de las proteínas que son expuestas a diferentes condiciones de pH; el patrón de solubilidad de las proteínas miofibrilares ha sido ampliamente estudiada (Hultin y Kelleher, 1999; Hultin y Kelleher, 2000; Hultin, 2002; Undeland *et al.*, 2002; Kristinsson y Liang, 2006) y la cual se presenta en una típica forma de “U”. Cabe destacar, que éste es el primer trabajo en el que se pretende obtener concentrados de proteína con el proceso de solubilización/precipitación, a partir de lo que es conocido como “desecho” de la industria camaronera; por lo que en el presente trabajo fue necesario evaluar la solubilidad de las proteínas con respecto al pH. Así mismo fue importante evaluar si la proteína de los cefalotórax de camarón que estuvieron expuestos al metabisulfito de sodio presenta alguna diferencia en solubilidad.

Para conocer los anterior se construyó una gráfica de solubilidad en un rango de pH de 2.0 a 12.0, en la cual identificaron los puntos de pH en donde se presenta la máxima y mínima solubilidad de las proteínas; en la [Figura 2](#) se puede apreciar que la solubilidad de las proteínas tanto en el rango alcalino como en el ácido está por encima de 10 mg/ml, siendo a pH de 7.0 donde se presentó la máxima solubilidad (15.23 mg/ml de proteína soluble) en el caso del lote tratado con metabisulfito de sodio. Y a los valores de pH de 2.0, 7.0, 8.0 y 9.0 la solubilidad de las proteínas fue significativamente mayor ($P < 0.05$) en las muestras del lote tratado con metabisulfito de sodio con respecto a las que no fueron tratadas con dicho aditivo. Así mismo se observó que a pH de 4.0 se presenta una solubilidad de proteínas de 5.54 mg/ml para el lote SM y de 5.31 mg/ml en el caso del lote CM. A este pH de 4.0 la mayoría de las proteínas presentes en

el homogeneizado de cefalotórax de camarón que se encontraban solubles a pH alcalino, alcanzan su punto isoeléctrico; sin embargo, ciertas proteínas se mantienen aun solubles a pH de 4.0 (Fig. 2).

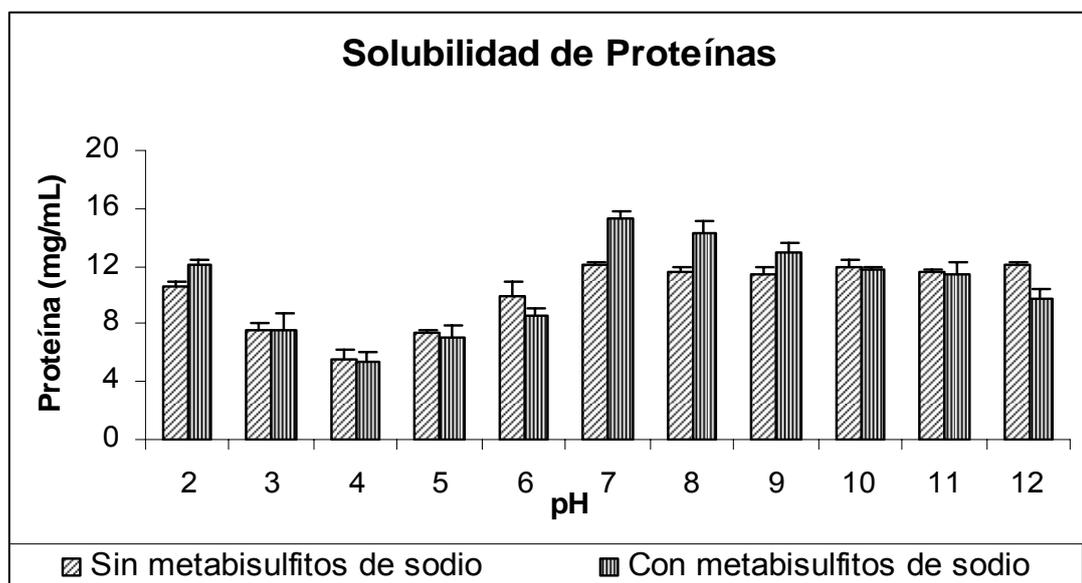


Figura. 2. Solubilidad de proteínas sometidas a diferentes condiciones de pH.

Para corroborar lo observado en la evaluación cuantitativa, se realizó un gel de electroforesis de poliacrilamida, en el cual se observó a diferentes pH's el perfil de bandeo de las proteínas presentes en el homogeneizado de cefalotórax de camarón, en el cual se pudo identificar que las proteínas solubles se encuentran en un rango de aproximadamente 90 kDa hasta 10 kDa (Fig. 3). Así mismo se observó que a partir del pH de 5.0 hasta el pH de 12.0 las proteínas que se encuentran entre 66.0 y 97.0 kDa están presentes en mayor proporción con respecto a lo que se tiene a los pH's de 2.0, 3.0 y 4.0. Por otra parte se observó que en el rango de pH ácido el perfil de bandeo de las proteínas presentes en el rango de 45.0 y 14.4 kDa se encuentran en mayor proporción con respecto a las que se observan en el lado alcalino (Fig. 3).

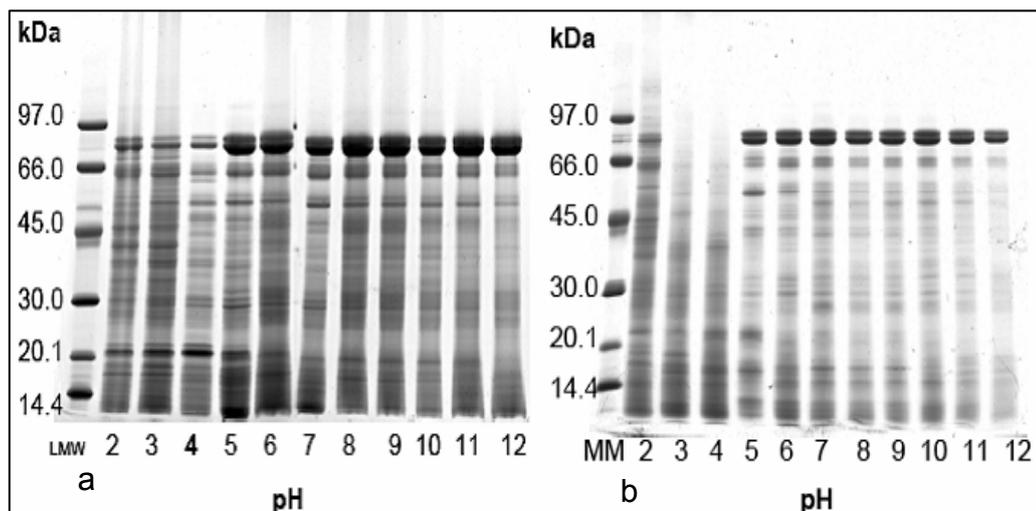


Figura 3. Perfil de proteínas solubles a diferente pH. Carril 1. Marcador de bajo peso molecular; Carriles 2-12. Valores de pH a los que fue sometido; a) Lote no tratado con metabisulfito de sodio, b) Lote tratado con metabisulfito de sodio.

6.3 Obtención de concentrados de proteína por el proceso de solubilización/precipitación (pH-Shift process)

El homogeneizado de cefalotórax de camarón es rico en quitina, pigmentos y proteínas, por lo cual para separar a las proteínas presentes en este homogeneizado se realizó el ajuste del pH inicial de la mezcla a un valor 7.0, siendo que a este pH se favorece la interacción de grupos ionizables de las proteínas con el agua, por lo que se ve reflejado en el incremento de la solubilidad de las moléculas de proteínas; esto se llevó a cabo de acuerdo a lo observado en la curva de solubilidad (Fig. 2). Después de ajustar el pH de la mezcla del homogeneizado por medio de centrifugación la fracción de interés (proteínas solubles a pH 7.0) fue separada del material insoluble (quitina, pigmentos y otros tejidos). Se observó que al ajustar el pH de la muestra inicial al 7.0, la mezcla de proteínas presentó una coloración oscura (café) típica del homogeneizado de cefalotórax de camarón. Sin embargo, al realizar el ajuste a pH 4.0 la coloración de la

muestra cambio a uno más claro que el observado a pH 7.0 (Fig. 4). Una vez ajustado el pH a 4.0 la muestra se sometió a un proceso de centrifugación de la cual se recuperó dos fracciones: una en forma de pasta color rosáceo (proteína precipitada) y otra fracción acuosa con proteína aun soluble (Fig. 4).

La mayor parte de las investigaciones donde se ha empleado el proceso de solubilización/precipitación se han enfocado en la proteína precipitada que se obtiene al final de este proceso (en forma de pasta como se observa en la Fig. 4) ya que la fracción del sobrenadante contiene menos del 15 % de proteína. Sin embargo en este trabajo con cefalotórax de camarón, después de la precipitación de las proteínas a pH 4.0 y su posterior centrifugación, se obtuvieron dos fracciones (Fig. 4); ya que de las proteínas que se mantienen solubles a pH 7.0, el 70 % se recuperó en forma de precipitado y el 30 % restante se mantuvo soluble a pH 4.0.

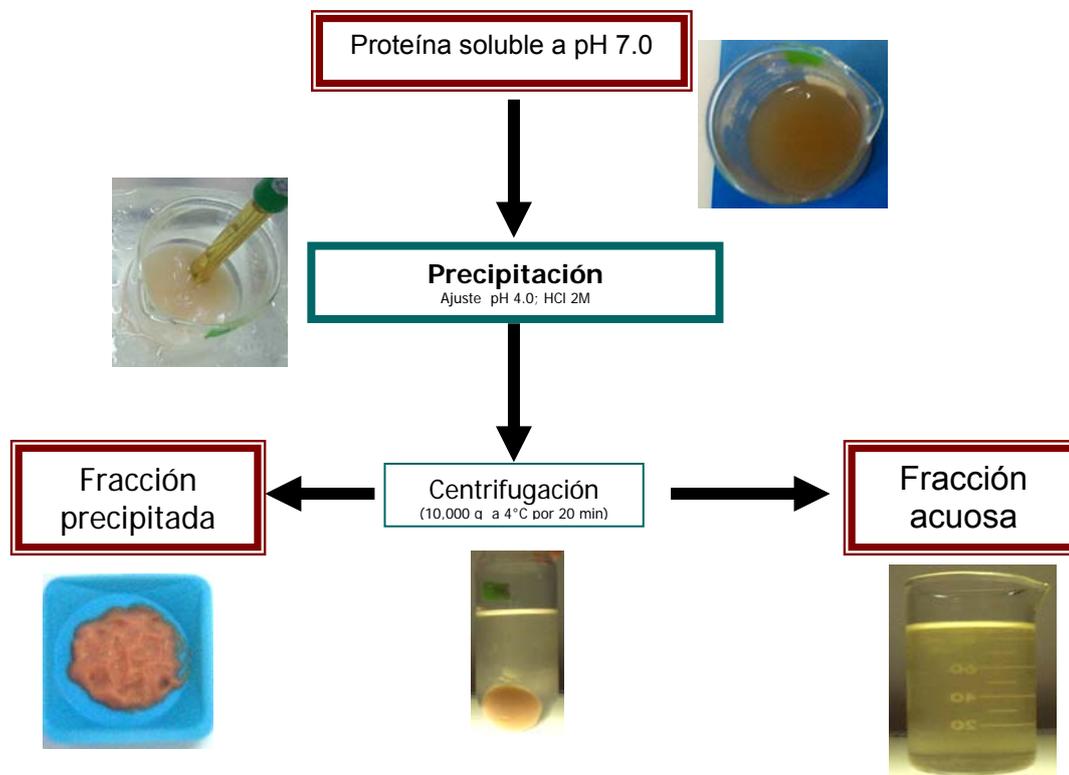


Figura 4. Diagrama de la obtención de los concentrados de proteína mediante el proceso de solubilización/precipitación.

En la fracción no soluble se encuentran presentes quitina, pigmentos y complejos de proteína-quitina y proteína-pigmentos, este material insoluble puede someterse a una posterior hidrólisis enzimática y recuperar hidrolizados de proteína, pigmentos y quitina; de tal manera que se optimice el aprovechamiento total de todas las moléculas presentes en el homogeneizado de cefalotórax de camarón y por tanto proporcionar valor agregado a este desecho de la industria del camarón.

De acuerdo a lo observado durante la obtención de un concentrado de proteína mediante el proceso de solubilización/precipitación, se decidió evaluar las propiedades funcionales de dos fracciones que se obtuvieron al final del proceso; así mismo se consideró caracterizar funcionalmente la fracción de proteína soluble a pH 7.0; por lo que para cada lote de homogeneizado se obtuvo tres concentrados de proteína, los cuales fueron etiquetados como se indican a continuación.

- 1) **Ps pH 7.0** correspondiente a la fracción proteica soluble a pH 7.0
- 2) **PP** proteína precipitada
- 3) **Ps pH 4.0** fracción proteica soluble a pH 4.0
- 4) **Fns** fracción no soluble de la primera fase de centrifugación

De la lista anterior únicamente los tres primeros fueron caracterizados funcionalmente y la Fns fue recuperada y guardada para un uso futuro en la obtención de otros componentes de interés. En las [Figuras 5 y 6](#) se muestra en el recuadro rojo los concentrados de proteína después de haber sido liofilizados, fuera del recuadro se muestra el producto liofilizado de la fracción no soluble a pH 7.0.

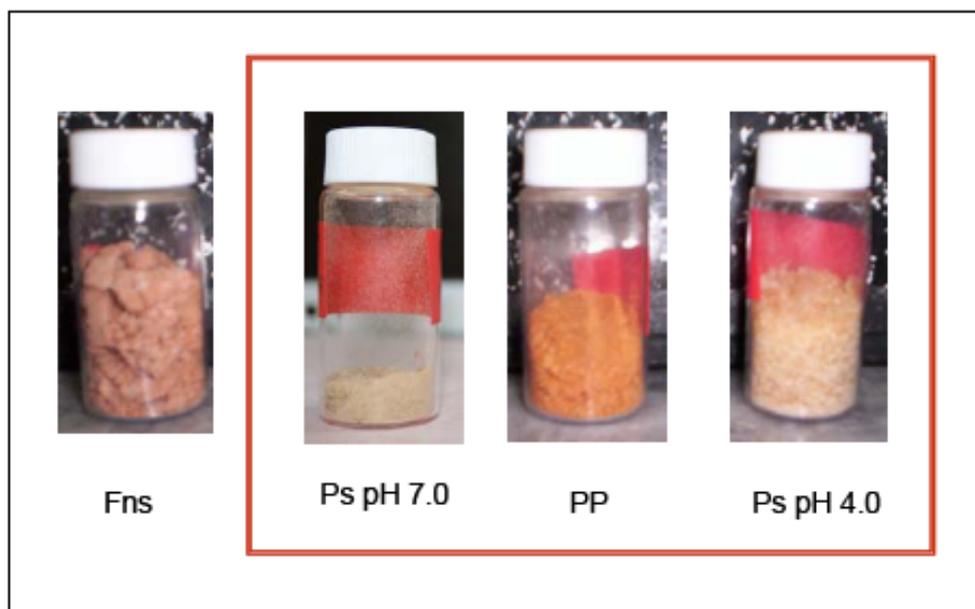


Figura 5. Concentrados de proteína derivados del lote de cefalotórax de camarón, tratado con metabisulfito de sodio. PS: proteína soluble a pH 7 y soluble a pH 4.0; PP: proteína precipitada a pH 4.0; Fns: fracción no soluble.

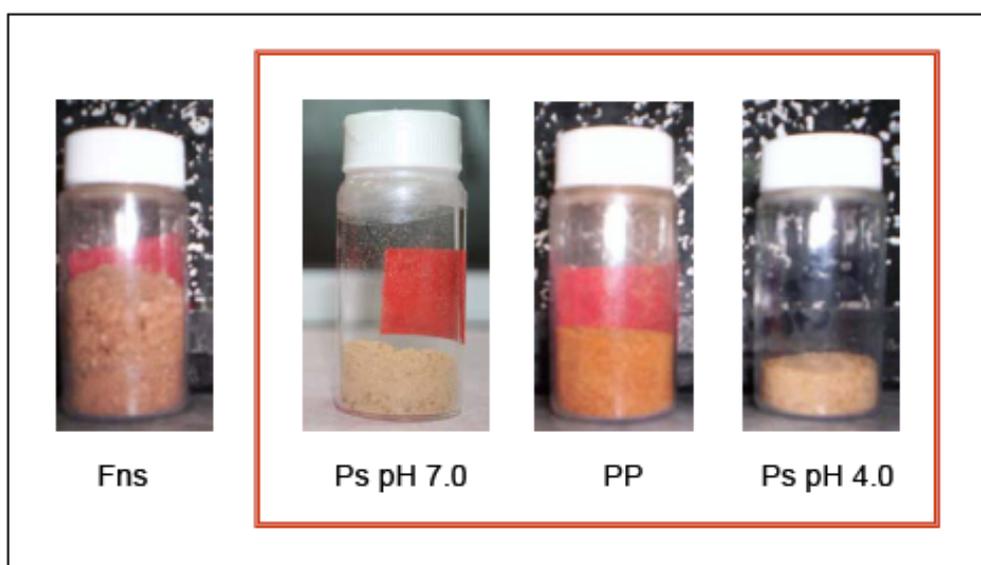


Figura 6. Concentrados de proteína del lote de cefalotórax de camarón sin metabisulfito de sodio. PS: proteína soluble a pH 7 y soluble a pH 4.0; PP: proteína precipitada a pH 4.0; Fns: fracción no soluble.

Los concentrados de proteína difieren en sus características sensoriales de color, claramente se observa que la coloración de Ps pH 7.0 es un rosa pálido; el concentrado de proteína PP presenta una tonalidad rojiza y Ps pH 4.0 tiene un color rosáceo. Estas diferencias de coloración puede deberse a los pigmentos que se encuentran presentes en la materia prima que se empleo (cefalotórax de camarón), cabe mencionar que al realizar el ajuste del pH durante el proceso de solubilización/precipitación también se observó el cambio de coloración cuando la fracción acuosa se aproximaba al punto de pH de menor solubilidad.

6. 3. 1 Rendimientos del proceso de solubilización/precipitación

De acuerdo a la concentración de proteínas solubles cuantificadas por el método de Biuret, se puede observar (Tabla 3), que independientemente del lote (con o sin metabisulfito de sodio) no hay diferencia significativa en términos de rendimiento del proceso en las etapas de solubilización, precipitación y en el rendimiento total. Así mismo se evaluó el rendimiento con base a la materia prima empleada, de los dos concentrados que se obtuvieron al final del proceso de solubilización/precipitación. No se encontró diferencia ($P > 0.05$) entre los lotes de cefalotórax analizados.

Tabla III. Rendimientos del proceso de solubilización/precipitación

Rendimientos de recuperación de proteína (%)			
Fuente	Solubilidad	Precipitación	Total
CM	48 ^a ± 5.3	73 ^a ± 5.5	35 ^a ± 6.3
SM	55 ^a ± 5.3	66 ^a ± 5.5	37 ^a ± 6.3

CM: lote con metabisulfito de sodio; SM: lote sin metabisulfito de sodio. La comparación se realizó entre filas, las letras similares indican que no existe diferencia significativa ($P > 0.05$).

Tabla IV. Rendimientos del proceso en base a la materia prima utilizada.

Rendimientos en base a la materia prima empleada (%)		
Fuente	PP	Ps pH 4.0
CM	20.01 ^a ± 3.5	23.02 ^a ± 2.5
SM	19.60 ^a ± 6.1	25.90 ^a ± 3.7

PP: proteína precipitada; Ps pH 4.0: proteína soluble a pH 4; CM: lote con metabisulfito de sodio; SM: lote sin metabisulfito de sodio. La comparación se realizó entre filas, las letras similares indican que no existe diferencia significativa ($P > 0.05$).

6. 4 Obtención de concentrados de proteína por el método de hidrólisis enzimática

La funcionalidad de las proteínas se ve afectada por el grado de hidrólisis de las mismas, sin embargo algunas requieren ser hidrolizadas para incrementar sus propiedades funcionales. La mayoría de los trabajos en los que se han obtenido hidrolizados de proteína a partir de desechos de la industria del camarón realizan una hidrólisis extensiva, de hasta un 12 % de grado de hidrólisis; sin embargo en ninguno de los trabajos previos se ha reportado la evaluación de la propiedad sensorial de sabor de los hidrolizados obtenidos a partir de desechos del camarón, pues se sabe que una

hidrólisis extensiva puede generar péptidos muy pequeños y ocasionar que el concentrado final posea un sabor amargo.

En el presente trabajo se evaluó el grado de hidrólisis del homogeneizado de cefalotórax de camarón sin la adición de enzimas en la mezcla de reacción; y de acuerdo a la gráfica 7, se observó que a 28 °C el máximo de hidrólisis enzimática fue del 2 % y se mantuvo constante después de los 30 min, este comportamiento fue similar en ambos lotes evaluados (CM y SM). La cinética de hidrólisis a 50 °C mostró un comportamiento diferente, ya que el grado de hidrólisis alcanzado fue del 6 % para el lote SM y del 5 % en el caso del lote CM. El grado de hidrólisis establecido en este trabajo para evaluar las propiedades funcionales de los hidrolizados de proteína fue del 3 %; el cual, en el caso del lote SM se obtuvo a los 15 min después de iniciar la reacción, y para el lote CM el 3 % de grado de hidrólisis se obtuvo a los 25 min de haber iniciado la reacción (Fig. 7).

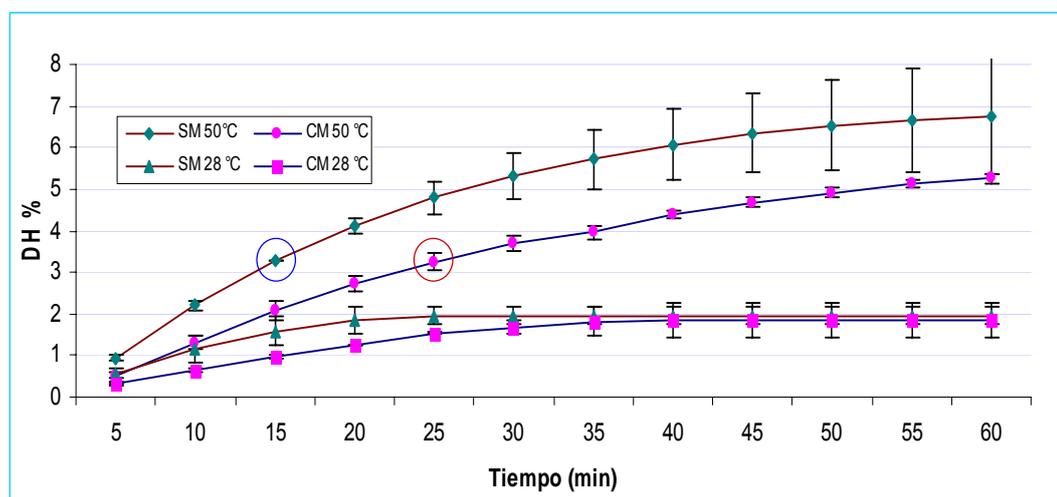


Figura 7. Hidrólisis enzimática del homogeneizado de cefalotórax de camarón

La hidrólisis enzimática que se observó en la figura anterior se corroboró de manera cualitativa por medio de geles de electroforesis de poliacrilamida (SDS-PAGE); en la Figura 8 se observa que a 28 °C el perfil de bandeo de las proteínas que se encuentran en el extracto inicial se mantienen visualmente sin un cambio durante el tiempo en la que se lleva a cabo la reacción (0-60 min).

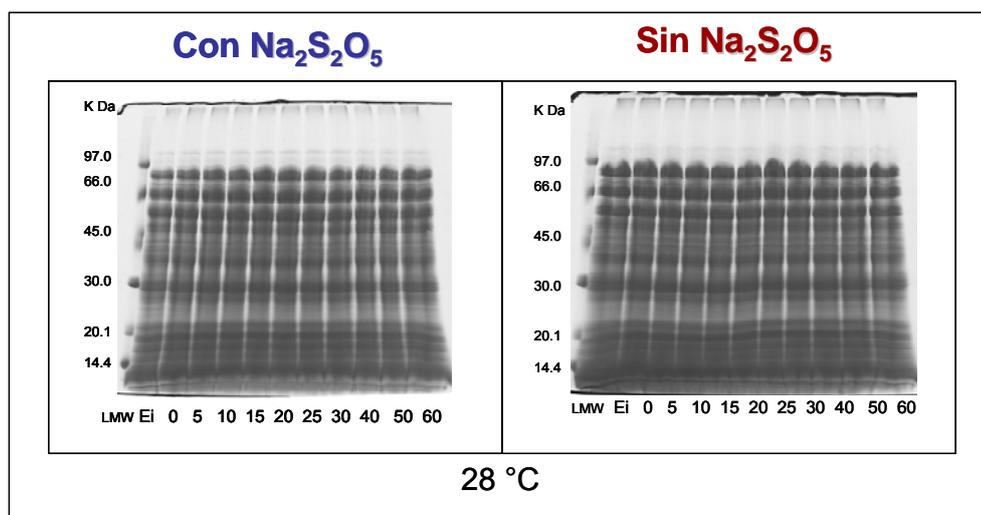


Figura 8. Perfil electroforético de las proteínas durante la reacción de hidrólisis enzimática realizada a 28 °C; Na₂S₂O₅: metabisulfito de sodio.

En la figura 9 se muestra el perfil electroforético del producto de la hidrólisis enzimática realizada a 50 °C; en la cual se pudo apreciar el decremento en la intensidad de bandeo de las proteínas que se encuentran presentes al inicio de la reacción con respecto a las que se observan a partir de los 25 min en el caso del lote CM, y a los 15 min para el lote SM. Se puede distinguir que en los últimos minutos del tiempo de reacción decrece significativamente la intensidad de bandeo de las proteínas con respecto a las que se observan en los primeros minutos de la reacción de hidrólisis, sin embargo es mucho más notable en las bandas de proteína que se encuentran presentes en el rango de 97.0 a 35.0 kDa.

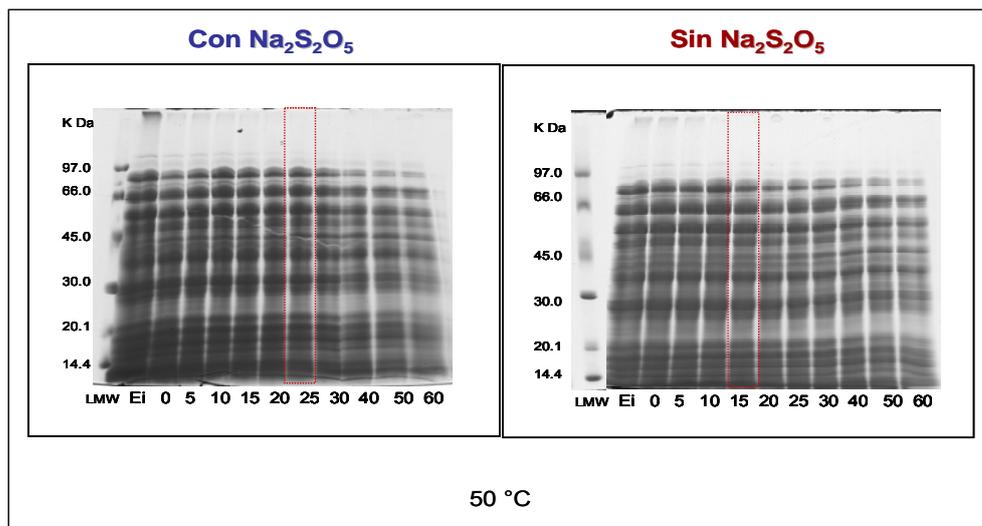


Figura 9. Perfil electroforético de las proteínas durante la reacción de hidrólisis enzimática realizada a 50 °C. El rectángulo en rojo indica el tiempo en el que se alcanzó el 3 % de grado de hidrólisis; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$: metabisulfito de sodio.

Después de establecer el tiempo necesario para alcanzar el 3 % de grado de hidrólisis, se procedió como se muestra en la Figura 10 (diagrama de flujo del proceso de hidrólisis enzimática), a obtener el hidrolizado de proteína. El producto resultante después de la liofilización se muestra en la Figura 11, en la cual se observa que la coloración de estos concentrados es de un tono café claro; el porcentaje de humedad de estos hidrolizados de proteína fue del 12.68 % para el correspondiente al lote CM y de 10.83 para el lote SM.

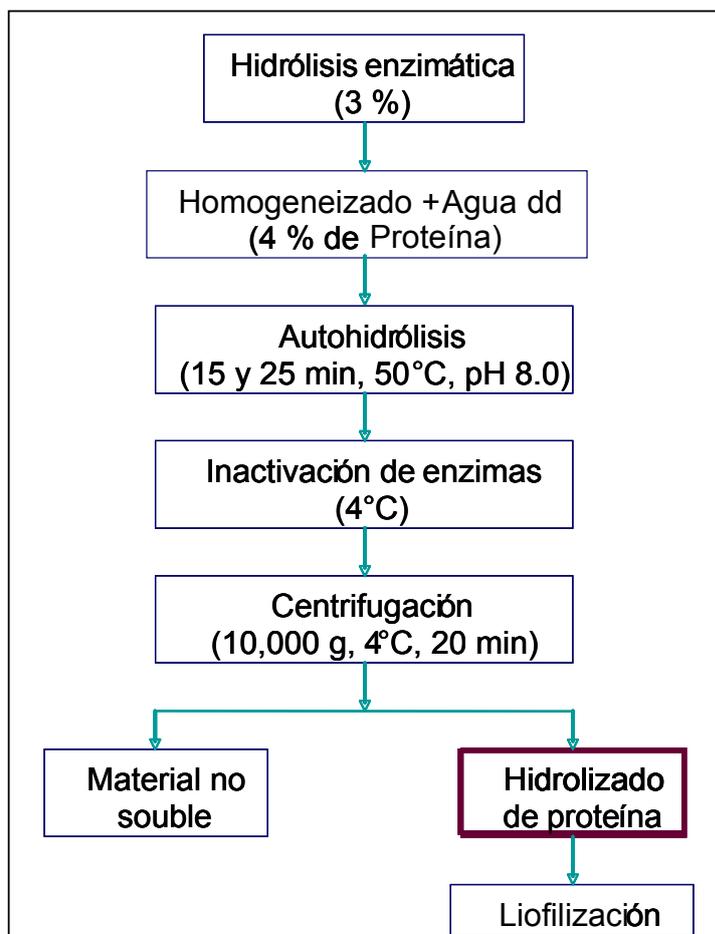


Figura 10. Diagrama de flujo para la obtención del hidrolizado de proteína.



Figura 11. Concentrado de hidrolizado de proteína

6. 4. 1 Rendimientos del proceso de hidrólisis enzimática.

El cálculo del rendimiento de el proceso de hidrólisis enzimática se realizó con base a 1 kg de materia prima empleada; del cual se recupera en forma de concentrado el 47.5 % para el lote CM y del 45.6 en el caso del lote SM. No se identifico diferencias entre lotes evaluados ($P > 0.05$). Al final de este proceso se obtuvo una fracción no soluble que puede ser aprovechada posteriormente para obtener quitina y pigmentos con alto valor comercial.

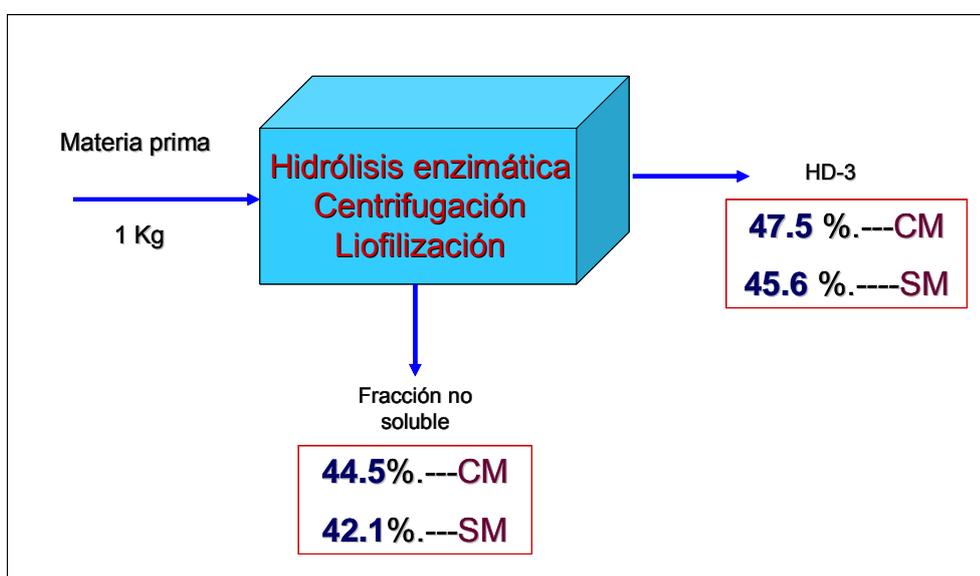


Figura 12. Rendimiento del proceso de hidrólisis enzimática en base a la materia prima empleada. CM: lote con metabisulfito de sodio; SM: lote sin metabisulfito de sodio; HD-3: hidrolizado de proteína. No se identifico diferencias entre lotes evaluados ($P > 0.05$).

6. 5 Contenido de proteína de los concentrados de proteína

Los concentrados de proteína obtenidos mediante la hidrólisis enzimática contienen entre el 60 % y 75 % de proteína (Tabla 5); lo cual es cercano a lo previamente reportado (75 % y el 90 %) en los trabajos de Ruttanapornvareesakul y colaboradores y de Duarte y Netto (Ruttanapornvareesakul y *et al*; 2005; Duarte y Netto, 2006). Con respecto al contenido de proteína en los concentrados, no se

observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los lotes tratados y no tratados con metabisulfito de sodio; sin embargo, el concentrado obtenido por hidrólisis enzimática (DH-3) presentó un porcentaje de proteína significativamente mayor con respecto a los concentrados Ps pH 7.0, PP y Ps pH 4.0; sin embargo a pesar de esto el concentrado DH-3 no es necesariamente la mejor opción con respecto a los concentrados de proteína obtenidos por el proceso de solubilización/precipitación, ya que en términos de escalamiento a nivel piloto y/o industrial, se deberán tomar en cuenta otros factores, tales como el análisis de costo-beneficio derivado de la producción de hidrolizados de proteína, así como el mercado potencial para este producto y las características sensoriales y reológicas del producto final.

El proceso de solubilización/precipitación requiere únicamente del uso de HCl, para realizar los cambios de pH necesarios y así obtener concentrados con un alto contenido de proteína, a diferencia de los hidrolizados de proteína que requieren, el uso de calor y en algunas ocasiones de la adición de enzimas para su obtención y un método eficiente para detener la hidrólisis una vez que se ha alcanzado el grado de hidrólisis previsto y que no modifique las características del producto. Estos puntos pueden considerarse como una ventaja del proceso de solubilización/precipitación (pH-shift) para la obtención de concentrados proteicos a partir de cefalotórax de camarón, con respecto a la hidrólisis enzimática.

Tabla V. Análisis químico-proximal de los concentrados de proteína.

	Con Na ₂ S ₂ O ₅				Sin Na ₂ S ₂ O ₅			
	Ps pH	PP	Ps pH	DH-3	Ps pH	PP	Ps pH	DH-3
	7.0		4.0		7.0		4.0	
Proteína	69	60	68	75	70	60	68	74
	± 0.10	± 0.13	± 0.25	± 0.30	± 0.13	± 0.16	± 0.20	± 0.47
Humedad	7.32	3.52	9.44	11.85	5.63	3.11	7.79	10.83
	± 0.33	± 0.28	± 0.04	± 0.56	± 0.20	± 0.17	± 0.10	± 1.16

Ps pH 7.0: concentrado de proteína soluble pH 7.0; PP: concentrado de proteína precipitada a pH 4.0; Ps pH 4.0: concentrado de proteína soluble a pH 4.0, DH-3: hidrolizado de proteína; Na₂S₂O₅: metabisulfito de sodio.

6. 6. Composición de aminoácidos de los concentrados de proteína

A diferencia de los concentrados de proteína obtenidos por el proceso de solubilización/precipitación, los hidrolizados de proteína carecen de dos aminoácidos esenciales: Histidina (His) y Valina (Val) (Tabla 6); esta deficiencia esta relacionada a la escasa concentración en la que se encuentran en el homogeneizado inicial, en el caso del aminoácido His la concentración inicial fue de 0.59 gr de AA/100 gr de muestra para el lote CM y de 0.43 gr de AA/100 gr de muestra para el lote SM. El total de la concentración inicial de Val fue de 0.12 gr de AA/100 gr de muestra, para ambos lotes evaluados.

Por otra parte el hidrolizado de proteína obtenido en este trabajo (con un 3 % de grado de hidrólisis), presentó menor concentración en el perfil de aminoácidos (gr de AA por cada 100 gr de producto) con respecto a los hidrolizados de proteína que se

obtuvieron a partir de cefalotórax de camarón sometidos a una hidrólisis extensiva (12 % de grado de hidrólisis, a 50 °C durante 12 h) (Ruttanapornvareesakul *et al.*, 2005). Sin embargo, la proporción de los aminoácidos contenida en los concentrados de proteína obtenidos con el proceso de solubilización/precipitación, fue mayor con respecto a los concentrados que fueron sometidos a hidrólisis enzimática, en particular Ps pH 7.0 y Ps pH 4.0.

Tabla VI. Composición de aminoácidos de los concentrados de proteína obtenidos a partir de cefalotórax de camarón *Litopenaeus vannamei*.

	Con Na₂S₂O₅				Sin Na₂S₂O₅			
	gr de AA/ 100 gr. de concentrado				gr de AA / 100 gr. de concentrado			
	Ps pH 7.0	PP	Ps pH 4.0	DH-3	Ps pH 7.0	PP	Ps pH 4.0	DH-3
Esenciales								
His	0.80	0.50	1.08	0.00	0.90	0.42	1.05	0.00
Ile	2.80	1.91	3.35	3.14	2.85	1.72	3.27	2.85
Leu	4.56	3.41	5.76	4.29	4.96	3.06	5.65	4.16
Lys	6.03	4.80	5.98	3.74	6.52	4.44	5.66	3.17
Phe	2.85	2.05	3.72	3.74	1.76	1.83	3.73	3.03
Thr	2.32	1.71	2.89	2.30	2.56	1.54	2.91	2.31
Val	1.36	0.15	0.16	0.00	2.08	0.10	0.17	0.00
No esenciales								
Ala	4.36	3.75	4.59	8.59	4.66	3.21	3.61	7.29
Arg	3.45	3.04	2.82	2.01	3.69	2.54	3.19	1.94
Asp	5.99	4.31	7.53	5.58	6.28	3.80	7.58	5.74
Glu	8.26	6.65	9.05	8.38	9.03	6.10	8.81	8.41
Gly	3.98	4.12	2.71	4.43	4.54	3.59	2.43	3.92
Tyr	2.19	1.58	2.84	1.80	2.42	1.45	2.82	1.82
Pro	4.54	5.23	3.52	6.87	5.28	4.68	3.83	7.11

Ps pH 7.0: concentrado de proteína soluble pH 7.0; PP: concentrado de proteína precipitada a pH 4.0; Ps pH 4.0: concentrado de proteína soluble a pH 4.0, DH-3: concentrado de hidrolizado de proteína; Na₂S₂O₅: metabisulfito de sodio.

6. 7 Evaluación de las propiedades funcionales de superficie.

6. 7. 1 Capacidad de formación de espuma y estabilidad.

Las espumas pueden considerarse como dispersiones de burbujas de gas (generalmente aire) en una fase continua; la función de las proteínas es reducir la tensión interfacial orientando sus grupos hidrofílicos hacia el exterior de la burbuja en contacto con el agua, y los grupos hidrófobos hacia el interior, con el aire. En el presente trabajo se evaluó la capacidad de formación de espuma de los concentrados de proteína obtenidos por el método de solubilización/precipitación y por el método de hidrólisis enzimática; esta propiedad funcional evaluada varió de forma individual entre los concentrados de proteína obtenidos por ambos métodos. La capacidad de formación de espuma que presentó el concentrado Ps pH 7.0 es de 141.11 % (CM) y 136.67 % (SM); para PP de 105.56 % (CM y SM); de Ps pH 4.0 fue de 524.44 % (CM) y 302.22 % (SM); y por último el hidrolizado de proteína presentó un 115.56 % (CM) y de 133.33 % (SM) de capacidad de formación de espuma (Fig. 13).

Por otra parte se puede observar en la Figura 13 que la capacidad de formación de espuma del concentrado de proteína Ps pH 4.0 fue significativamente mayor ($P < 0.05$) con respecto a los otros concentrados de proteína. Entre lotes no se observó diferencias significativas ($P > 0.05$), excepto en el caso del concentrado de proteína Ps pH 4.0 CM.

La capacidad de formación de espuma de las proteínas es importante, sin embargo no todas las que se producen son estables; algunas de ellas tienen una duración momentánea y tienden al colapso; otras presentan una permanencia más prologada, tal

es el caso de la albúmina de huevo. La estabilidad de la espuma formada fue de 46.5 % (CM) y 52.11 % (SM) para el concentrado proteico Ps pH 7.0; 50 % (CM y SM) para el concentrado PP; para la fracción proteica Ps pH 4.0 fue del 36.8 % (CM) y 31.57 % (SM); y en el caso del concentrado de hidrolizado proteico la espuma formada se colapsó. Así mismo como se puede observar en la Figura 14 que en la estabilidad de la espuma formada no hubo diferencia significativa entre lotes. Como control se empleó albúmina de huevo, que resultó significativamente más estable ($P < 0.05$) que los concentrados de proteína obtenidos en este trabajo.

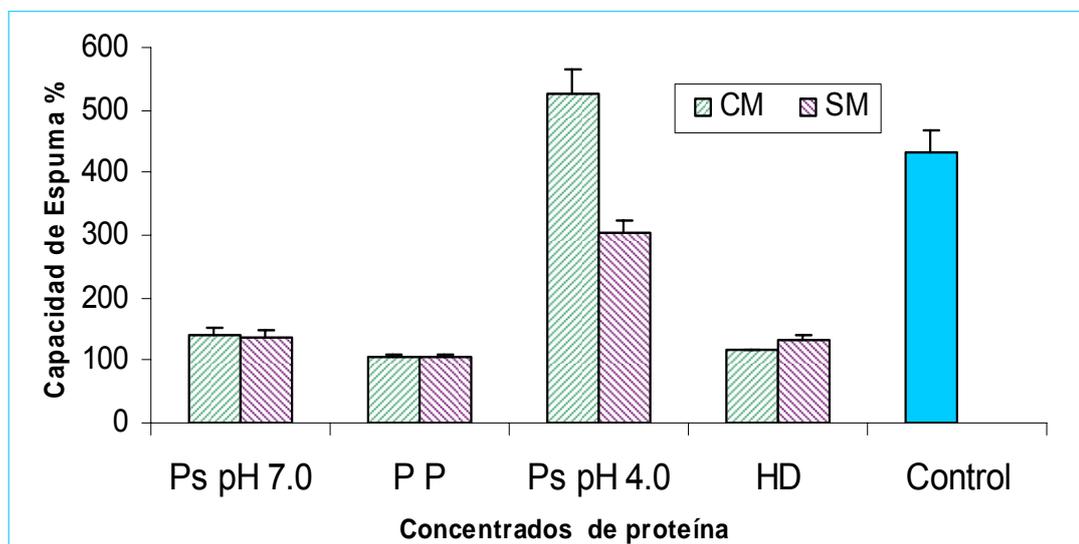


Figura. 13. Capacidad de formación de espuma. CM: lote con metabisulfito de sodio; SM: lote sin metabisulfito de sodio; control: albúmina de huevo en polvo. Ps pH 7.0: concentrado de proteína soluble pH 7.0; PP: concentrado de proteína precipitada a pH 4.0; Ps pH 4.0: concentrado de proteína soluble a pH 4.0, DH-3: hidrolizado de proteína.

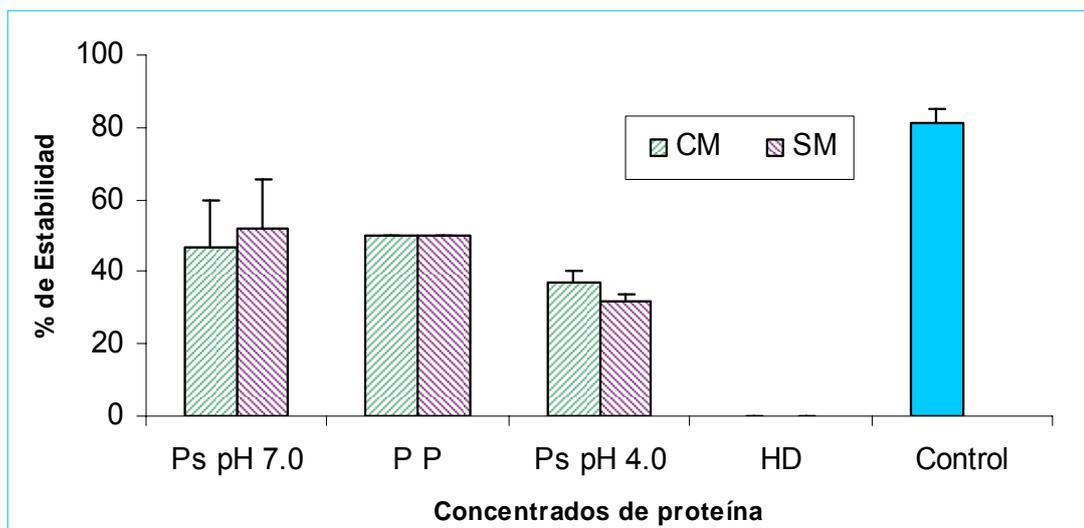


Figura 14. Estabilidad de la capacidad de formación de espuma. CM: lote con metabisulfito de sodio; SM: lote sin metabisulfito de sodio; Control: albúmina de huevo en polvo; Ps pH 7.0: concentrado de proteína soluble pH 7.0; PP: concentrado de proteína precipitada a pH 4.0; Ps pH 4.0: concentrado de proteína soluble a pH 4.0, DH-3: hidrolizado de proteína.

6. 7. 2 Capacidad y estabilidad de formación de emulsión.

Otra propiedad funcional importante de las proteínas es su capacidad de formar emulsiones; por esta razón, para lograr mejores resultados se requiere de cierta hidrofobicidad que permita que las moléculas de proteína migren a la interfase aceite-agua de la emulsión y se retengan allí para reforzar el sistema y darle mayor rigidez y estabilidad. La capacidad de formación de emulsión que presentó el concentrado de proteína soluble a pH 7.0 fue de 19.33 % CM y 20 % SM; para el caso de PP fue de 22 % CM y 20 % SM; para el concentrado de proteína soluble a pH 4.0 fue 24.67 % CM y 23.33 % SM; y para el hidrolizado de proteína fue del 20 % CM y SM. Los porcentajes de formación de emulsión de los concentrados de proteína, se encuentran cercanos al del control que fue del 35 %. De acuerdo a los análisis estadísticos realizados no se presenta diferencia significativa ($P > 0.05$) de esta propiedad funcional entre los dos lotes evaluados (Fig. 15).

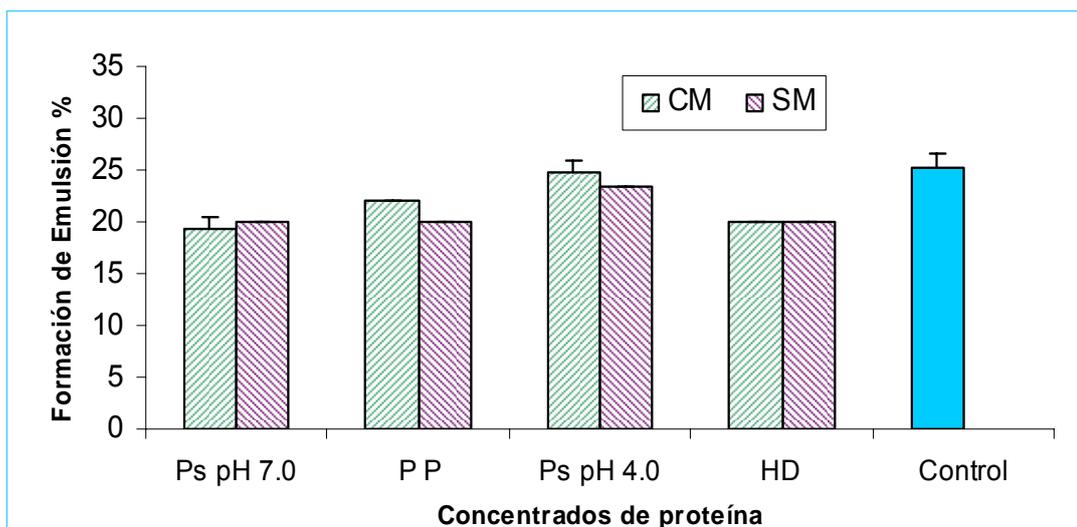


Figura 15. Capacidad de formación de emulsión. CM: lote con metabisulfito de sodio; SM: lote sin metabisulfito de sodio; control: albúmina de huevo en polvo; Ps pH 7.0: concentrado de proteína soluble pH 7.0; PP: concentrado de proteína precipitada a pH 4.0; Ps pH 4.0: concentrado de proteína soluble a pH 4.0, DH-3: hidrolizado de proteína.

La estabilidad de la emulsión es importante para poder ser empleado en la industria de tecnología de alimentos. El concentrado proteico soluble a pH 7.0 fue el que presentó menor estabilidad, siendo del 10.37 % CM y 13.13 SM %; el concentrado proteico PP presento una estabilidad de 42.42 % CM y 30 % SM; en el caso de Ps pH 4.0 fue de 54 % CM y 88.64 % SM; el hidrolizado proteico presentó significativamente ($P \leq 0.05$) mayor estabilidad, ya que presentó 96.67 % CM y 80 % SM. Entre lotes la diferencia en su estabilidad (Fig. 16) no fue significativa ($P > 0.05$).

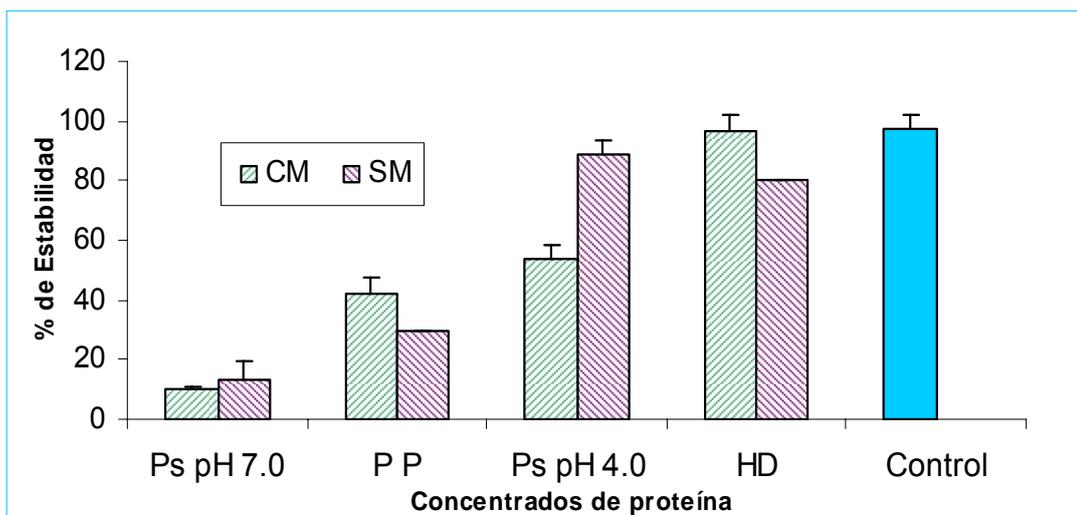


Figura 16. Estabilidad de la capacidad de formación de emulsión. CM: lote con metabisulfito de sodio; SM: lote sin metabisulfito de sodio; control: albúmina de huevo en polvo; Ps pH 7.0: concentrado de proteína soluble pH 7.0; PP: concentrado de proteína precipitada a pH 4.0; Ps pH 4.0: concentrado de proteína soluble a pH 4.0; DH-3: hidrolizado de proteína.

7. DISCUSION DE RESULTADOS

7.1 La proteína como molécula de interés, presente en el cefalotórax de camarón

El contenido de proteína inicial es un dato relevante que se debe conocer para la realización del presente trabajo; ya que la materia prima utilizada para la obtención de concentrados de proteína es el cefalotórax de camarón y éste contiene proteínas (50-65 %), quitina (11-32 %) y pigmentos (Ballaile, 1983; Shahidi, 1991; Ibrain,1999). El contenido de proteína de los homogeneizados de cefalotórax de camarón se determinó en base al nitrógeno total y posteriormente se corrigió con el factor de proteína de 6.25. La cantidad de proteína encontrada, se aproxima a lo reportado por Mizani y col. para *P. semisulcatus* (63.9 %) (Mizani *et al.*, 2005) y por Coward y col. en *P. indicus* (64.1) (Coward *et al.*, 2006), Andrade y colaboradores reportaron 50.27 % de contenido total de proteína para *L. vannamei* (Andrade *et al.*, 2007), en contraste con Holanda y Netto, que reportaron un contenido de proteína del 39.42 % para *Xiohopenaeus kroyeri* (Holanda y Netto 2006). Dichas diferencias entre el contenido de proteína que se reportan; radica no sólo en la especie, estadio de vida en la que se encontraba el camarón, o región geográfica en la que se cultivo o cosecha, sino que en alguno casos no consideran el contenido de quitina presente en la región del cefalotórax del camarón. En este estudio, se corrigió el contenido de proteína restando el contenido de nitrógeno aportado por en el material quitinoso del cefalotórax de camarón resultando un valor de 28.57 % para el lote con metabisulfito de sodio (CM) y de 29.85 % para el lote sin metabisulfito de sodio (SM); sin diferencias significativas entre ellos ($P > 0.05$), lo cual es aproximado a lo reportado anteriormente por Holanda y Netto (Holanda y Netto 2006).

7. 2 Solubilidad de proteínas del cefalotórax de camarón con respecto al pH

Los cambios en la solubilidad de las proteínas pueden ser obtenidos por efecto del pH, ya que las proteínas adquieren una carga neta positiva o negativa, lo que resulta en una repulsión entre ellas y una hidratación de los residuos cargados, provocando a su vez un incremento de la solubilidad (Damodaran, 1996; Yongsawatdigul y Park, 2004). Esta propiedad funcional de las proteínas es de gran importancia, ya que tienen una influencia directa sobre la capacidad de formación de emulsión, de espuma y gelificación (Vojdani, 1996; Belitz, *et al.*, 2004). Se observó que el comportamiento de solubilidad de las proteínas presentes en el cefalotórax de camarón difiere a lo comúnmente observado con proteínas miofibrilares de algunas especies de peces, de calamar y con proteínas de origen vegetal en el caso de cacao blanco (Thawornchinsombut y Park, 2003; Kim *et al.*, 2005; Kristinsson y Liang, 2006; Kristinsson e Ingadottir, 2006; Carvalho *et al.*, 2006; Palafox, 2008). La discrepancia en la solubilidad de las proteínas miofibrilares con respecto a lo observado en el presente trabajo, podría atribuirse a la naturaleza misma de las proteínas presentes en el homogeneizado de cefalotórax de camarón.

A pH de 4.0 se alcanzó el punto isoeléctrico (pI) de algunas de las proteínas que se encuentran en el homogeneizado de cefalotórax de camarón; sin embargo se observó que también a este pH se mantienen solubles otras proteínas, lo cual concuerda con lo que se observó a pH 4.0 con las proteínas presentes en el suero de la leche (Severin y Xia, 2006). Las proteínas están relacionadas con las propiedades funcionales y que son las más importantes en el suero de la leche, son la β -lactoglobulina y la α -lactoalbúmina; las del músculo de peces y calamar, es la miosina; sin embargo en el homogeneizado de cefalotórax de camarón no se ha demostrado su prevalencia.

Se sabe que los iones presentes en una sal, interactúan con las cargas opuestas de las proteínas, lo cual disminuye las interacciones electrostáticas entre las moléculas de las proteínas y por tanto incrementan la solubilidad de las mismas (Vojdani, 1996), así mismo se ha observado con proteínas miofibrilares que la adición de bajas concentraciones molares de NaCl (10 mM), incrementa la solubilidad de las proteínas (Thawornchinsombut y Park, 2003). El metabisulfito de sodio actúa como agente reductor por lo que retrasa el proceso de melanización, sin embargo al ponerse en contacto con el agua, se disuelve formando sus respectivos iones; lo anterior podría considerarse para entender lo observado en la curva de solubilidad de proteínas, ya que las muestras del lote de cefalotórax de camarón tratadas con metabisulfito de sodio presentan mayor cantidad de proteína soluble en algunos valores de pH, siendo significativamente superior a pH 7.0. Mizani y col. (Mizani *et al.*, 2005) observaron que al utilizar 0.200 nmol/L de metabisulfitos de sodio para extraer proteína de cefalotórax de camarón, recuperaron un 48.7 % de proteína y con la utilización de la enzima Alcalasa se recuperó 45.1 % de proteína; ellos atribuyen a estas diferencias a que el metabisulfito de sodio reduce los enlaces disulfuro y por tanto se ve reflejado en un incremento en la solubilidad de las proteínas.

7.3 Procesos de solubilización/precipitación y de hidrólisis enzimática, y la obtención de concentrados de proteína

Al procesar el camarón para el consumo humano, se generan grandes toneladas de desechos y éstos pueden ser aprovechados para la recuperación de concentrado e hidrolizados de proteína, pigmentos y quitina (Armenta *et al.*, 2002; Ruttanapornvareesakul *et al.*, 2005; Holanda y Netto, 2006). El método comúnmente

aplicado para recuperar la proteína presente en el homogeneizado de cefalotórax de camarón, ha sido la hidrólisis enzimática; éste método requiere la adición de una mezcla de enzimas, de un período de hidrólisis de hasta 12 hr y la aplicación de calor (Armenta *et al.*, 2002; Ruttanapornvareesakul *et al.*, 2005; Holanda y Netto, 2006). Sin embargo, con el proceso de solubilización/precipitación solo se requiere de la utilización de ácido o base (HCl o NaOH) y el tiempo que dura el proceso para obtener la pasta de un concentrado de proteína es de aproximadamente 1 h, la temperatura en la que se lleva a cabo el proceso es de 4 °C y las proteínas recuperadas no sufren de hidrólisis alguna (Hultin, 2002).

De acuerdo al cálculo del rendimiento en base a la materia prima empleada, para la recuperación del hidrolizado de proteína fue de 47.5 % CM y de 45.6 % SM, en contraste con el proceso de solubilización/precipitación el rendimiento de la obtención de los concentrados PP y Ps pH 4.0, fue de 43.03 % CM y de 45.5 % SM; con lo cual puede observarse que en ambos procesos se recupera más del 40 % del total de la materia prima utilizada. Por lo anterior puede sugerirse que el proceso de solubilización/precipitación es una alternativa viable para la obtención de concentrados de proteína.

En términos de contenido de proteína que se determinó en los concentrados de proteína que se obtuvieron por los procesos de hidrólisis enzimática y de solubilización/precipitación; el hidrolizado presentó un contenido mayor de proteína (75 % CM y 74 % SM), con respecto a los concentrados Ps pH 7.0 (69 % CM y 70 % SM), PP (60 % CM y SM) y Ps pH 4.0 (68 % CM y SM). En contraste con otros trabajos (Ruttanapornvareesakul *et al.*, 2005; Mizani *et al.*, 2005; Holanda y Netto, 2006) el contenido de proteína reportado para el hidrolizado obtenido con la adición de enzimas

ha sido de aproximadamente del 77 %; lo cual es cercano a lo que se obtuvo en el presente trabajo para el hidrolizado, el cual se obtuvo sin la adición de otras enzimas. Se han realizado trabajos con desechos de camarón en los que se emplea el método de ensilado para la producción de hidrolizados de proteína; en estos se han reportado que el producto final contiene alrededor de 30 % y 39.9 % de proteína. (Plascencia *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2006).

A diferencia del proceso de ensilado y de hidrólisis enzimática, el proceso de solubilización/precipitación consiste de dos pasos generales, la solubilización de la máxima cantidad de proteínas y la posterior precipitación de las proteínas por punto isoeléctrico (Hultin y Kelleher, 1999), además no se requiere de la utilización de calor, y el tiempo de duración del proceso es corto. Así mismo se pueden recuperar concentrados de proteína con un contenido de proteína mayor al de los ensilados. Por otra parte los hidrolizados de proteína obtenidos en este trabajo, presentaron un contenido de proteína cercano a lo reportado por Ruttanapornvareesakul y colaboradores (2005), Mizani y colaboradores (2005), y Holanda y Netto (2006).

7. 4 Perfil de aminoácidos y propiedades funcionales de los concentrados de proteína

Las proteínas están compuestas por aminoácidos y estos pueden clasificarse en términos nutricionales en esenciales y no esenciales. Los concentrados de proteína que se obtuvieron en este trabajo contienen un balance de aminoácidos cercano a lo reportado para ensilados (Plascencia y *et al.*2002), así como para los hidrolizados de proteína (Ruttanapornvareesakul *et al.*, 2005). Sin embargo a diferencia de los concentrados Ps pH 7.0, PP y Ps pH 4.0, el hidrolizado de proteína presentó una

deficiencia en el contenido de dos aminoácidos esenciales (His y Val); la ausencia de dichos aminoácidos en el hidrolizado de proteína obtenido en este trabajo va en desacorde a lo reportado por otros autores ([Plascencia y *et al.*, 2002](#); [Ruttanapornvareesakul *et al.*, 2005](#); [Mizani *et al.*, 2005](#); [Coward *et a.*, 2005](#)), dicha discrepancia puede deberse a que en el homogenado inicial el contenido de estos aminoácidos se encontraba en muy bajas concentraciones (His: 0.59 gr./ 100 de concentrado para el lote CM y de 0.43 gr / 100 de concentrado para el lote SM; para Val: 0.12 gr/ 100 de concentrado para ambos lotes CM y SM).

Se encontró que el contenido de aminoácidos hidrofílicos presentes en el concentrado Ps pH 4.0 es mayor con respecto a los concentrados Ps pH 7.0, PP y DH-3; al utilizar el índice de hidrofobicidad propuesto por Kyte-Doolittle ([1982](#)), el concentrado Ps pH 4.0 fue el que resultó contener más aminoácidos hidrofílicos. Lo anterior puede relacionarse con las características observadas al momento de obtener los concentrados de proteína; ya que precisamente Ps pH 4.0 al estar en contacto con el ambiente, éste rápidamente se hidrataba. Dichas características deben considerarse para dirigir el producto al mercado adecuado.

La evaluación de las propiedades funcionales de los concentrados de proteína, mostró que el concentrado Ps pH 4.0 presentó mayor capacidad de formación de espuma con respecto a los otros concentrados, sin embargo fueron más estables Ps pH 7.0 y PP; la espuma formada por el hidrolizado de proteína se colapsó a los pocos minutos de haberse formado. La pobre estabilidad que se presenta se debe muy probablemente a que las interacciones entre los grupos hidrofílicos de las proteínas y los

grupos hidrofóbicos con la burbuja de aire, es muy débil. La comparación de la capacidad de formación de espuma y su estabilidad de los concentrados de proteína que se obtuvo en el presente trabajo, no es posible ya que éste es el primer reporte de las evaluaciones de propiedades funcionales de superficie. Los cuatro concentrados preparados en esta investigación mostraron una alta capacidad de formación de emulsión. Esto coincide con la proporción de aminoácidos hidrofóbicos presentes en los concentrados, dicha concentración fue mayor en los concentrados Ps pH 4.0 y en DH-3, lo anterior tiene una relación directa con la capacidad y estabilidad de emulsión de estos concentrados. Para confirmar lo observado en este trabajo, se requiere mayor investigación respecto a la evaluación de la superficie hidrofóbica, así como la caracterización de las principales proteínas presentes en los concentrados proteicos obtenidos.

8. CONCLUSIONES

El proceso de solubilización/precipitación es una alternativa para obtener concentrados proteicos a partir de los desechos generados por la industria camaronera; ya que gracias a ello se puede separar de forma fácil y rápida a las proteínas de otras moléculas. En la primera fase de centrifugación se obtuvieron las proteínas que se encontraban solubles a pH 7.0 y otra fracción que no fue soluble está compuesta por quitina, lípidos, y quitina asociada a proteínas; esta fracción puede ser sometida a una hidrólisis enzimática para recuperar quitina, pigmentos e hidrolizados proteicos, aprovechando en su totalidad los desechos generados por la industria camaronera.

Los concentrados de proteína obtenidos por medio del proceso de solubilización/precipitación, poseen características que pueden ser aprovechadas en la industria de la tecnología de alimentos. Otra característica que se observó durante el proceso de obtención de los concentrados de proteína, es la coloración que presentan, la cual va de un color rosa a un color café claro, estas diferencias parecen deberse a la adición de metabisulfito de sodio, los cuales se han utilizado para evitar el proceso de oscurecimiento enzimático conocido como melanosis, pues cabe recordar que en el homogeneizado del cual se partió se encontraban enzimas, como la polifenoloxidasas, la cual está involucrada en el proceso de melanización. Se pueden emplear los cefalotórax de camarón con o sin metabisulfito de sodio, sin embargo habrá que realizar evaluaciones sobre la cantidad remanente de este aditivo al final del proceso de obtención de los concentrados proteicos para poder determinar si la materia prima tratada con este aditivo es apropiada para consumo humano y/o animal.

El contenido de proteína de los concentrados obtenidos por el proceso de solubilización/precipitación, es aproximado al del concentrado obtenido por hidrólisis enzimática; lo que sugiere que el primer proceso puede ser una alternativa tecnológica para la rápida recuperación de concentrados de proteína. Por otra parte el porcentaje de humedad de los diferentes concentrados de proteína, nos indica el potencial aprovechamiento de dichos productos.

De acuerdo al perfil de aminoácidos los concentrados de proteína pueden ser utilizados como aditivos alimentarios o como fuente de proteína animal. Con información generada y a las características observadas de los concentrados de proteína obtenidos en esta investigación, estos pueden ser empleados ya sea como aditivo alimentario en la industria de tecnología de alimentos, así como en la industria de fabricación de alimentos para animales, principalmente organismos marinos.

9. REFERENCIAS.

- Adler-Nissen J. 1986. Enzymic hidrolysis of food proteins. Elsevier Applied Science. p. 427.
- Andrade R., Torres R., Montes E., Chávez M., Naar V. 2007. Elaboración de un sazonador a base de harina de cabezas de camarón de cultivo (*Penaeus sp*). Revista de la Facultad de Química Farmaceutica. Vol. 14 (2): 109-113
- Amar B. Philip R. and Bright I. 2006. Efficacy of Fermented praw shell waste as a feed ingredient for Indian white prawn *Ferinneropanaeus inducus*. J. Aquaculture Nutrition. Vol. 12: 433-442
- Armenta Lopez, Guerrero L and S Huerta. 2002. Astaxanthin Extraction from Shrimp Waste by lactic Fermentation and enzymatic Hydrolysis of the Carotenoprotein Complex. J. Food Chemistry and Toxicology. Vol. 671(5): 1002-1006.
- Audelo J., Díaz M., Peinado M. y Montiel F. 2006. Programa de “Supervisión sanitaria en sistemas de producción de camarones peneidos en el municipio de Ahome, Sinaloa”. Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico. Vol.1 (33):
- Bataille M.P. and Bataille P.F. 1983. Extraction of proteins from shrimp processing waste. J. of Chemical Technology and Biotechnology. Vol. 33: 273–284.
- Belitz, H.; Grosch, W.; Schieberle, P. 2004. Food Chemistry. 3rd. Edition. Ed. Springer. Germany. pp: 61-63.
- Cano-Lopez A, Simpson BK, Haard N. F. 1987. Extraction of carotenoprotein from shrimp process waste whit the aid of trypsin from Atantic cod. J. Food Sci. 47:503-504.

Carvalho, A. V., García N.H. P and Amaya-Farfán J. 2006. Physico-chemical properties of the flour, protein concentrate, and protein isolate of the Cupuassu (*Theobroma grandiflorum* Shum) seed. J. Food Science. Vol. 71(8):573-578.

Córdova-Murueta, J. H. and García Carreño F. L. 2002. Nutritive value of squid and hydrolyzed protein supplement in shrimp feed. Aquaculture. Vol. 210: 371-384.

Coward-Kelly, G., Frank K. A and Mark T. H. 2006. Lime treatment of shrimp head waste for the generation of highly digestible animal feed. Bioresource Technology. Vol. 97: 1515-1520.

Damodaran, S. 1996. Amino Acids, Peptides and Proteins. In Food Chemistry; O. R. Fennema, Ed. Marcel Decker: New York. pp: 321-429.

De la Fuente Betancourt M.G. 2006. Tesis Doctoral: Caracterización de Propiedades Funcionales de Proteína Cruda e Hidrolizada de Manto de Calamar Gigante *Dosidicus gigas*. CIBNOR, La Paz, B.C.S

Dziuba, J., P. Minkiewicz, and D. Natecz. 1999. Biologically active peptides from plant and animal proteins. Polish Journal of Food and Nutrition Science. Vo. 30: 266-272

Dzwolak and Ziajka.1999. Enzymatic hydrolysis of milk proteins under alkaline and acidic conditions. Journal of Food Technology. Vol. 62: 393-395.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2002. The State of World Fisheries and Acuaculture. pp:144

FAO-GLOBEFISH. 2007. Shrimp Market Report - November 2007 – USA. www.globefish.org

Hall, G.M. 1996. Basic concepts. In: Methods of testing protein functionality. Ed. Blackie Academic & Professional, London. pp: 266.

Hannesson, R. 2003. Aquaculture and fisheries. *Marine Policy*. Vol. 27:169-178

Hill, S.E. 1996. Emulsions. In: *Methods of testing protein functionality*. Ed. Blackie Academic & Professional, London. pp: 266.

Holanda HD, Netto FM. 2006. Recovery of components from Shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri*) Processing Waste by Enzymatic Hydrolysis. *J. Food Sci.* Vol. 71(5): C298.

Hultin, H. O. 2002. Recent Advances in Surimi Technology. In *Recent Advances in Marine Biotechnology*. Eds. Science Publisher, Inc.: Enfield, New Hampshire. pp 241-251.

Hultin, H. O.; Kelleher, S. D. 1999. Process for Isolating a Protein Composition from a Muscle Source and Protein Composition. U.S. Patent 6,005,073, December 21.

Hultin, H. O.; Kelleher, S. D. 2000. Surimi Processing from Dark Muscle Fish. In *Surimi and Surimi Seafood*; J. W. Park, Ed.; Marcel Dekker: New York. pp: 59-77.

Ibrain HM, Salama MF, El-Banna HA.1999. Shrimp's waste: chemical composition, nutritional value and utilization. *Nahrung* Vol. 43: 418-423.

Ingadottir, B. 2004. The Use of Acid and Alkali-aided Protein Solubilization and Precipitation Methods to Produce Functional Protein Ingredients from Tilapia. Thesis presented for the degree of Master of Science. University of Florida.

Kim, Y., Yongwatdigul, J., Park, J. and Thawornchinsombut. 2005. Characteristics of sarcoplasmic proteins and their interaction with myofibrillar proteins. *J. of Food Biochemistry*. Vol. 29: 517-532.

Kristinsson, H. G. and Liang Y. 2006. Effect of pH-Shift Processing and Surimi Processing on Atlantic Croaker (*Micropogonias undulatus*) Muscle Proteins. Journal of Food Science. Vol. 71 (5): C304-C312.

Kristinsson, H. G. and Ingadottir B. 2006. Recovery and properties of muscle proteins extracted from Tilapia (*Oreochromis niloticus*) light muscle by pH shift processing. J. Food Sci. Vol. 71(3): 132-141.

Kyte, J. and Doolittle, R.F. 1982. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. J. Mol. Biol., Vol. 157: 105-132

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature. Vol. 227: 680-685.

Matringe E., Phan Tan R., and Lorient D. 1999. Functional properties of milk-egg mixtures. J. Food Science. Vol. 64 (5): 787-791.

Mizani M, Aminlari M, Khodabandeh M. 2005. An effective method for producing a nutritive protein extract powder from shrimp-head waste. Food Sci. Tech. Int. Vol. 11: 49-54.

Oliveira JM, Oliveira E, Bora PS. 2007. Utilization of shrimp industry waste in the formulation of tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus) feed. Bioresour Technol. Vol. 98 (3): 602-606.

Páez Osuna F., Flores Verduzco F., Lyle Fritch L., Alonso Rodríguez R. and Ruiz Fernández A. 2003. Shrimp aquaculture development and the environment in the Gulf of California ecoregion. Mar Pollut Bull. Vol.46: 806-815.

Palafox Carlos H. 2008. Tesis Maestria. Concentrados proteicos por el método de pH-shift. CIBNOR. La Paz. B.C.S.

Pour-El, A, 1981. Protein Functionality: classification, definition and methodology. In protein functionality in foods. Cherry, J.P. Ed. American Chemical society Symposium series 147, W. D. C, pp 1-20.

Plascencia-Jatomea, M., Olvera-Novoa, M., Arredondo-Figueroa, J., Hall, G. and Shirai K. 2002. Feasibility of fishmeal replacement by shrimp head silage protein hydrolysate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L) diets. J. Sci. Food Agric. Vol. 82: 753-759.

Ruttanapornvareesakul, Ikeda M, Hara K, Osako K, Kongpun O. and Nozaki Y. 2005. Effect of shrimp head protein hydrolysates on the state of water and denaturation of fish myofibrils during dehydration. J. Fisheries Sci. Vol. 7: 220-228.

Ruttanapornvareesakul Y, Ikeda M y Col. 2006. Concentration-dependent suppressive effect of shrimp head protein hydrolysate on dehydration-induced denaturation of lizardfish myofibrils. Bioresour Technol. Vol. 97 (5): 762-769.

Salinas, A. (2002). Curso de comercialización de camarón. Panorama Acuícola. Vol.7, 32-34.

Severin, S. y Xia, W. S. 2006. Enzymatic hydrolysis of whey proteins by two different protease and their effect on the functional properties of resulting protein hydrolysates. J. Food Biochemistry. Vol. 30: 77-97.

Shirai K, Huerta S, Saucedo G, Rodríguez G, Hall, G. 1997. Aspects in protein breakdown during the lactic acid fermentation. Adv Chitin Sci. Vol. 2: 56-63.

SEMARNAP. (Secretaria del Medio Ambiente, Recursos naturales y Pesca, Mexico) 1998. Anuario estadístico de pesca. Mexico. pp: 231.

Shahidi F. Synowiecki J. 1991. Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*). J Agric. Food Chem. Vol. 39: 1527-1532.

Simpson BK, Haard NF. 1985. The use of proteolytic enzymes to extract carotenoproteins from shrimp waste. *J. Applied Biochem.* Vol. 7: 212-22.

Smith, L.L. 1987. Functional and biochemical changes in deponed turkey due to frozen storage and lipid oxidation. *J. Food Sci.*, Vol. 52: 22.

Torten, J.; Whitaker, J. R. 1964. Evaluation of the Biuret and Dye-Binding Methods for Protein Determination in Meats. *J. Food Sci.* Vol. 29: 168-174.

Thawornchinsombut S. and Park J. 2003. Role of pH in solubility and conformational change of Pacific whiting muscle proteins. *J of food Biochemistry.* Vol. 28: 135-154.

Undeland, I. A.; Kelleher, S. D.; Hultin, H. O. 2002. Recovery of Functional Proteins from Herring (*Clupea Harengus*) Light Muscle by an Acid or Alkaline Solubilization Process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* Vol. 50: 7371-7379.

Vojdani, F. 1996. Solubility. In: *Methods of testing protein functionality.* G. M. Hall ed. Blackie Academic & Professional, London., 266 pp.

Wilde, P.J. and D.C. Clark. 1996. Foam formation and stability. In: *Methods of testing protein functionality.* G. M. Hall ed. Blackie Academic & Professional, London. 266 pp.

Xiong, Y. L. 2000. Meat Processing. In *Food Proteins, Processing Applications*; S. Nakai and H. W. Modler, Eds.; Wiley-VCH: New York. pp: 89-145.

Yongsawatdigul, J.; Park, J.W. 2004. Effects of Alkali and Acid Solubilization on Gelation Characteristics of Rockfish Muscle Proteins. *J. food Sci.* Vo. 69 (7): C499-C505.