

EXTRACCIÓN DE CAROPROTEINAS A PARTIR DE RESIDUOS DE CAMARÓN FERMENTADOS.

R. E. Armenta*, I. Guerrero-Legarreta, S. Huerta

*Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa.
Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Apartado Postal 55-535, México 09340 D.F.*

Resumen

La astaxantina es el pigmento más abundante en los residuos de crustáceos. Debido a su color particular es empleado en la pigmentación de salmónidos, como la trucha arcoiris, en sistemas de acuicultura. La astaxantina esta unida a una proteína, esta asociación da como resultado el color rosa-anaranjado del pigmento. Los residuos de camarón, además de ser un problema para la ecología mexicana debido a su descomposición al aire libre, es una fuente excelente de astaxantina. Se estudió la fermentación láctica, reportada para desproteínizar residuos de camarón, como medio para estabilizar a estos pigmentos. Se seleccionaron iniciadores lácticos en base a su habilidad para reducir el pH del medio en menos de 24 horas. Se probaron cuatro sistemas de extracción durante tres periodos de tiempo con el fin de obtener las condiciones óptimas de extracción. Las concentraciones de astaxantina en los extractos se analizaron por HPLC usando una columna de fase reversa. La separación de la proteína del pigmento se llevó a cabo empleando proteasas comerciales. Los resultados mostraron que la inoculación con *Lactobacillus sp.*, aislada de pescado fue la más eficiente en la reducción de pH. El sistema óptimo de extracción fue empleando éter de petróleo:acetona:agua (15:75:10). Comparando la extracción de residuos fermentados y no fermentados, la fermentación láctica produjo una mejor extracción de los pigmentos. Las proteasas comerciales produjeron una hidrólisis muy eficiente del complejo proteína-pigmento.

Palabras clave: Fermentación láctica, astaxantina, hidrólisis proteica, residuos de crustáceos.

Abstract

Astaxanthin is the most abundant pigment in crustacean wastes. Due to its particular color, it can be used to pigment salmonids, such as rainbow trout, in aquaculture systems. Astaxanthin is bound to a protein, this association results in a pink-orange hue. Prawn waste, besides being a problem to Mexican ecology due to its spoilage in open air, is an excellent source of astaxanthin. Use of lactic fermentation to deproteinize the waste and stabilize the pigment is explored. Starters of lactic acid bacteria were selected according to their ability to decrease pH in less than 24 h. Four solvent systems and three extraction periods were tested in order to obtain the best extraction conditions. Astaxanthin concentration in the extract were analyzed by HPLC using a reverse phase column. Detachment of the protein from the pigment was carried out using commercial proteases. Results showed that a strain of *Lactobacillus sp.*, isolated from fish was the most efficient to decrease pH. The optimal solvent system to extract astaxanthin was petroleum ether:acetone:water (15:75:10). Comparing extraction from fermented to non fermented wastes, fermented wastes gave a higher amount of astaxanthin. Commercial proteases gave a very efficient hydrolysis of the protein-pigment complex.

Keyword: Lactic fermentation, astaxanthin, protein hydrolysis, crustacean waste.

1. Introducción

La astaxantina es el pigmento más abundante en residuos de crustáceos, debido a su color *sui generis*, es muy valorada para pigmentar salmónidos, como la trucha arcoiris, en sistemas de acuicultura (Hardy y Torrisen, 1987). Recientemente, la astaxantina también ha adquirido gran importancia en la industria de cosméticos.

La astaxantina se encuentra unida a una proteína, la estructura espacial de la cual determina la coloración del complejo, en caso del camarón se produce una coloración rosa-anaranjado (Cano-López y col., 1987). El tipo de asociación pigmento-proteína no es conocida y ésta puede definir la habilidad por parte del pez para absorber el pigmento en el músculo. Por otra parte, los desperdicios de

* Autor para la correspondencia. E-mail: roberto-armenta@terra.com; meat@xanum.uam.mx Tel.: 5804 47 17 fax: 5804 47 12 :

camarón han sido un problema ecológico en las zonas de captura en México debido a que son depositados al aire libre, donde sufren descomposición. El uso de la fermentación láctica para desproteínizar los residuos de camarón y estabilizar al pigmento se ha reportado en trabajos previos (Han-Ching y col., 1992; Torrissen y col., 1981; Guerrero y col., 1996). El objetivo del presente estudio fue establecer las condiciones óptimas de la extracción del pigmento del residuo de camarón, así como estudiar el tratamiento enzimático más adecuado para separar el pigmento de la proteína en los residuos previamente tratados por la fermentación láctica.

2. Metodología experimental

Se emplearon inóculos de *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus carnosus* y *Lactobacillus sp.*, identificada como cepa IB2; los dos primeros gentilmente suministrados en forma pura por la Dra. Lone Andersen (Ch. Hansen) y empleados como bioprotectores en carnes, y el tercero aislado de residuos de camarón tropical y amablemente proporcionado por la Dra. Zainoha Zakaria (Universidad de Malasia). Estas cepas se seleccionaron en base a su habilidad para reducir el pH del sustrato en 24 horas. Posteriormente, con el fin de extraer el pigmento carotenóide de los residuos fermentados y no fermentados, se probaron las siguientes mezclas de solventes: agua:cloroformo:metanol (1:2:4), éter de petróleo:acetona:agua (15:75:10) (Meyers y Bligh, 1981), etanol:agua (40:60). Adicionalmente se estudió la eficiencia de extracción del aceite de soya (Chen y Meyers, 1982). Las extracciones se llevaron a cabo en un sistema agitado por 0, 24 y 48 horas. El contenido de astaxantina en los extractos obtenidos fueron analizados por cromatografía de alta resolución (HPLC) utilizando una columna de fase reversa (Mejía y col., 1988). Posteriormente se llevó

a cabo la separación del pigmento y la proteína, empleando enzimas comerciales (savinasa, tripsina y mezcla de savinasa, esperasa, neutrasa y alcalasa) (Novo, Dinamarca) y proteasas aisladas de camarón. En todos los casos se estandarizó la aplicación de 5 unidades de actividad enzimática específica, a pH=7 y 40°C. Se evaluó el grado de hidrólisis cuantificando xantofilas totales mediante un método espectrofotométrico a $\lambda=474$ nm, la proteína soluble se analizó por el método Lowry-Peterson. El contenido de astaxantina, una vez hidrolizada la asociación proteína-pigmento, se analizó por cromatografía de alta resolución empleando la misma columna.

3. Resultados y discusión

La disminución más rápida de pH se llevó a cabo empleando la cepa de *Lactobacillus sp.*, aislada de residuos de camarón ($P > 0.001$) (Fig. 1). Se observó una disminución a pH cercano a 4.0 a las 48 horas de fermentación. La eficiencia en la acidificación del sustrato por esta cepa se explica por el hecho de que fue aislada de camarón tropical, por lo que era un microorganismo ya adaptado al medio, mientras que las otras dos cepas son utilizadas en fermentación de carnes rojas. Debido a la facilidad de los carotenoides de oxidarse causada por su estructura isoprenoide (Britton, 1996) las condiciones reductoras obtenidas por la acidificación del medio promueve un corrimiento electrónico del anillo de β -ionona a las dobles ligaduras conjugadas, siendo posiblemente el motivo de la estabilización de esta estructura. La desproteínización de los residuos es un evento que ocurre en forma paralela a la estabilización del pigmento, ha sido reportado por varios autores como consecuencia de la aplicación de bacterias lácticas seleccionadas a residuos de crustáceos (Guillou y col., 1995;

Guerrero y col., 1996; Cremades y col., 2001; Zakaria y col., 1998).

El sistema de solventes más eficiente para la extracción de astaxantina fue éter de petróleo:acetona:agua en una proporción

15:75:10, en una relación 10:1 con respecto al residuo de camarón ($Pr > 0.001$), obteniéndose una media de $23.5 \mu\text{g/g}$, expresado como xantofilas totales (Fig. 2). El sistema menos eficiente de extracción fue el aceite de soya.

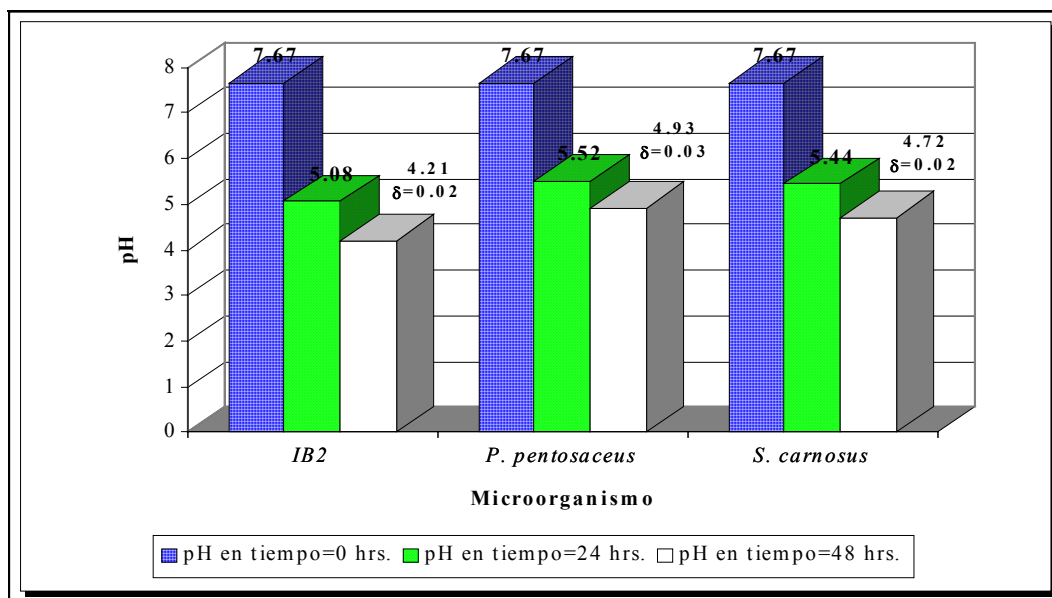


Fig. 1. Valores de pH durante la fermentación láctica.

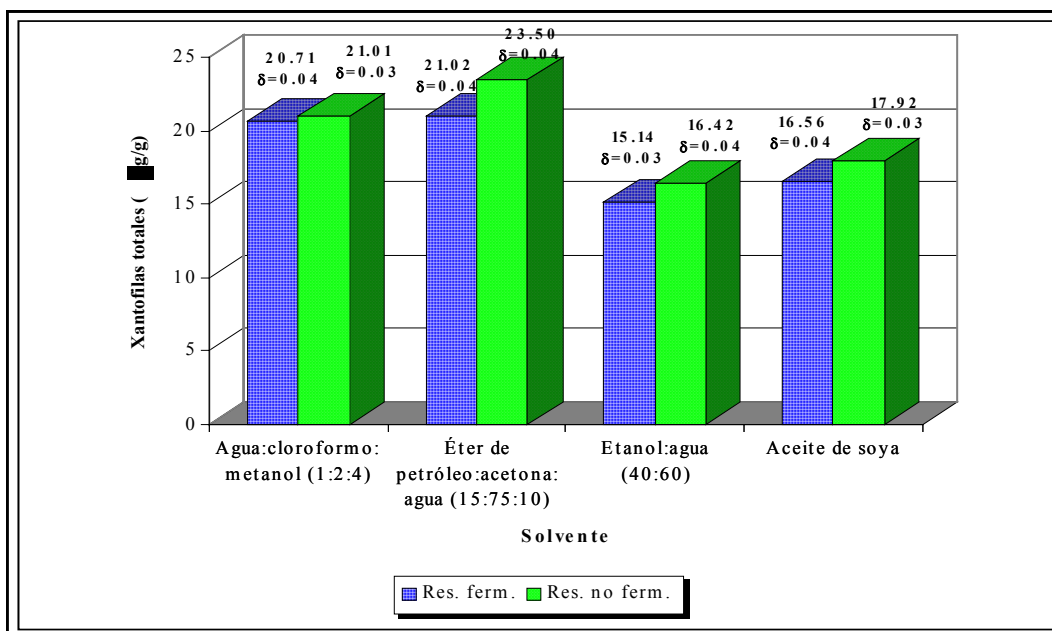


Fig. 2. Xantofilas totales extraídas de residuo de camarón.

Comparando las extracciones de los residuos fermentados con los residuos sin fermentar, se obtuvo una mayor cantidad de astaxantina en los primeros ($Pr>0.001$) (Fig. 3). La fermentación láctica hace que la astaxantina sea más disponible para la extracción con solventes debido a la estabilización del pigmento y a las condiciones reductoras obtenidas (Chen y Meyers, 1983; Guerrero y col., 1996). La fermentación también solubiliza parte de las sales de calcio que forma las vesículas en el exoesqueleto, liberando mayores cantidades de astaxantina (Torrison y col., 1981).

Los resultados de proteína soluble y xantofilas totales después de la hidrólisis enzimática mostraron que la mezcla de enzimas comerciales, además de la savinasa fueron los tratamientos más eficientes en la hidrólisis del complejo pigmento-proteína ($Pr>0.001$). Por otra parte, las proteasas aisladas de camarón y la tripsina tuvieron una eficiencia similar entre sí (Figs. 4 y 5).

Las proteasas comerciales, empleadas en detergentes, eliminaron a la entidad proteica formada de una lipoproteína (Menasveta y col., 1993) lo que hace a esta fracción sensible a la acción enzimática.

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

Se observó que la concentración de astaxantina aumenta después del proceso enzimático, debido a que al estar el pigmento en estado libre se aumenta la sensibilidad de detección ($Pr>0.001$). En la Fig. 6 se muestra la cantidad de astaxantina extraída de material hidrolizado con la mezcla de enzimas comerciales en comparación con residuos no hidrolizados.

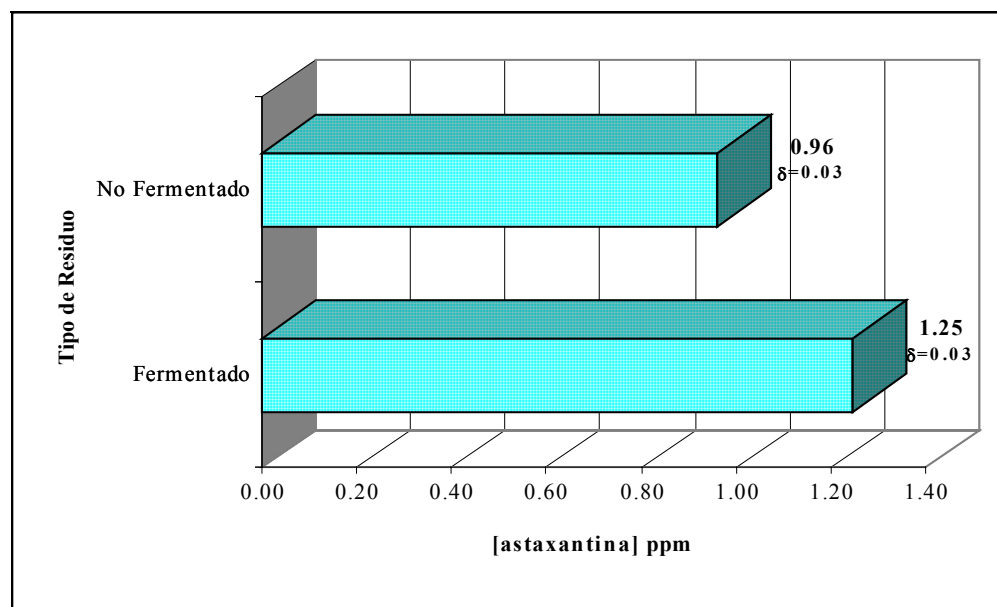


Fig. 3. Astaxantina extraída de residuos de camarón.

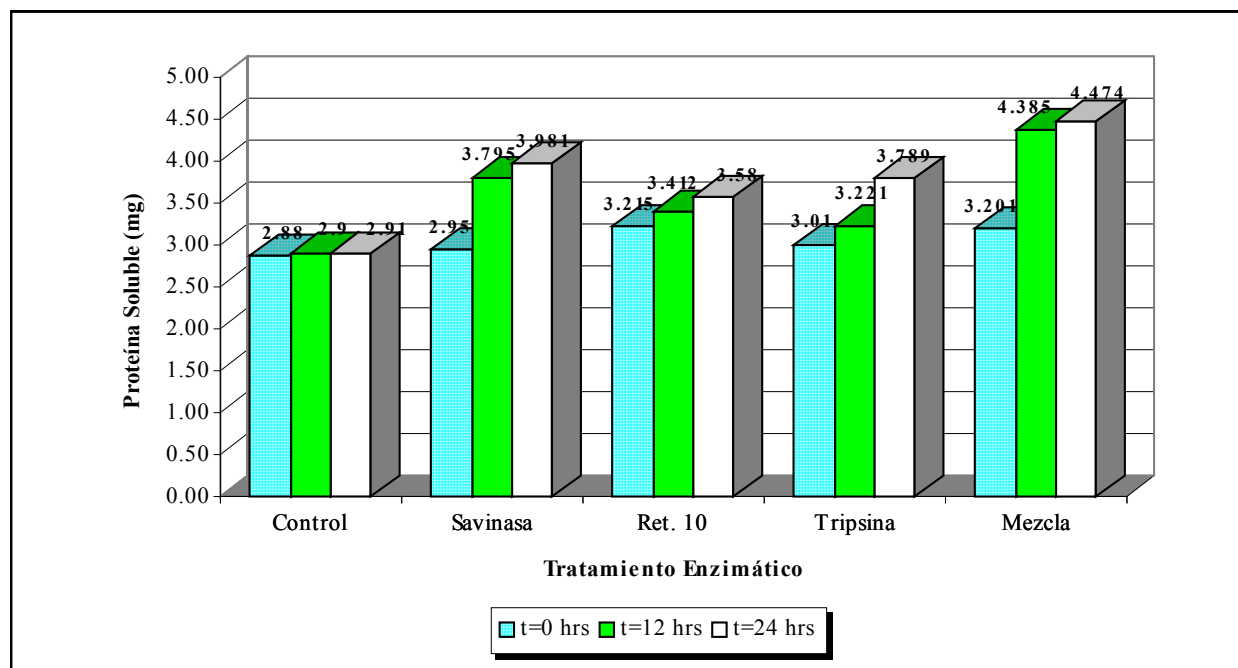


Fig. 4. Proteína soluble ($\delta=0.03-0.14$).

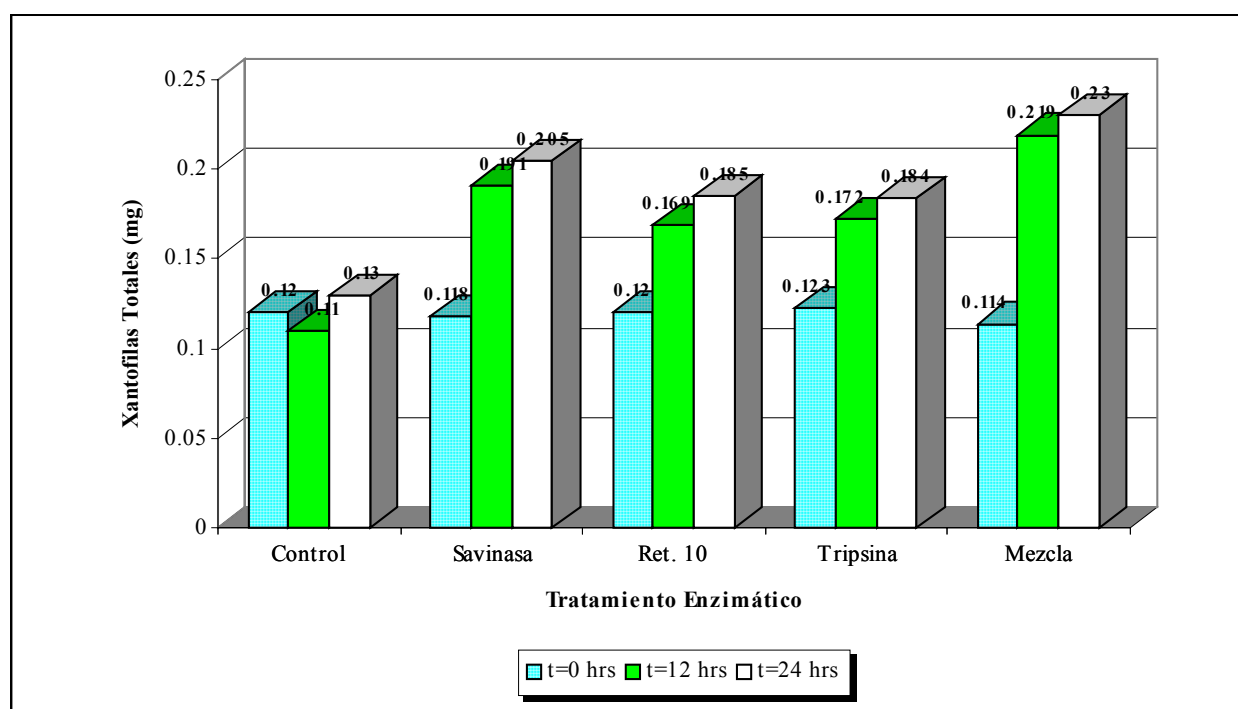


Fig. 5. Xantofilas Totales ($\delta=0.01-0.02$).

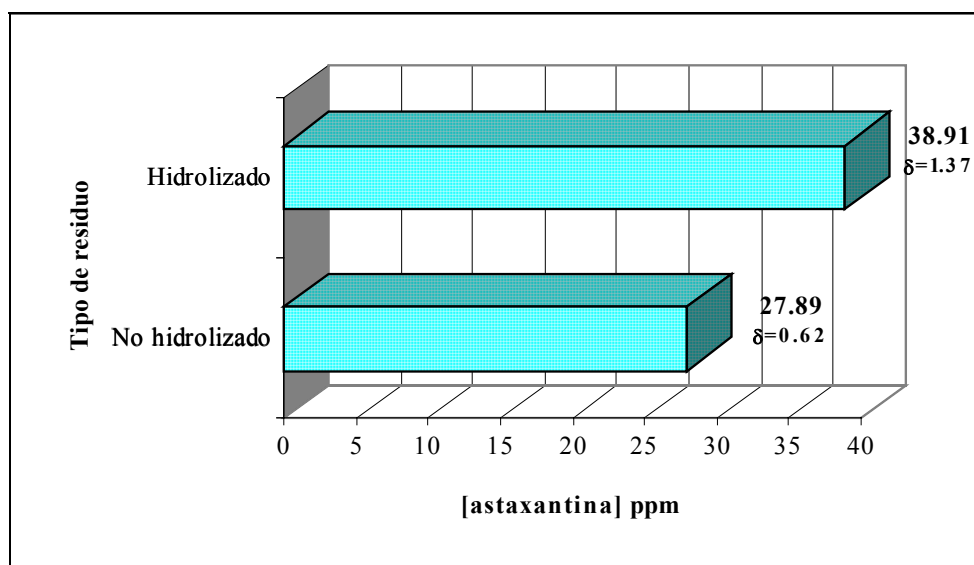


Fig. 6. Contenido de astaxantina antes y después de hidrólisis con una mezcla de 4 enzimas comerciales.

Conclusiones

La fermentación láctica estabiliza a los residuos de camarón, particularmente la estructura de la astaxantina, posiblemente porque promueve el establecimiento de un sistema reducido que protege a los dobles enlaces de la estructura isoprenoide del pigmento, incrementando su rendimiento cuando se emplea un sistema de solventes orgánicos para su extracción. Separando la proteína del pigmento es posible seguir la ruta de absorción del pigmento al músculo del pez en forma más precisa, y por otra parte, es factible caracterizar a la proteína separada.

Referencias

- Britton, G. (1996). Carotenoids, en *Natural Food Colorants*, pp. 197-243. Hendry, G.A.F. y Houghton, J.D. (eds.). Blackie Academic and Professional, 2a. edition. Nueva York.
- Cano-López, A., Simpson, B. K. y Haard, N. F. (1987). Extraction of caroprotein from shrimp process wastes with the aid of trypsin from Atlantic cod. *Journal of Food Science* 52, 503-506.
- Chen, H.M. y Meyers, S.P. (1982). Extraction of astaxanthin pigment from crawfish using a soy oil process. *Journal of Food Science* 47, 892-896.
- Chen, H.M., Meyers, S.P. (1983). Ensilage treatment of crawfish waste for improvement of astaxanthin pigment extraction. *Journal of Food Science* 48, 1516-1521.
- Cremades, O., Ponce, E., Corpas, R., Gutiérrez, J.F., Jover, M., Alvarez Ossorio, M., Parrado, J. y Bautista, J. (2001). Processing of crawfish (*Procambrus clarkii*) for the preparation of carotenoproteins and chitin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 49, 5468-5472.
- Guerrero, I., Zakaria, Z. y Hall, G.M. (1996). Lactic fermentation of prawn waste: comparison of commercial and isolated cultures. En: *Advances in Chitin Science*, pp. 399-406. A. Domard, A., Jeuniaux, E., Muzzarelli, R., Roberts, G. (eds.). Editorial Jacques André. Francia..
- Guillou, A., Khalil, M. y Adamounou, L. (1995). Effects of silage preservation on astaxanthin forms and fatty acid profiles of processed shrimp (*Pandalus borealis*) waste. *Aquaculture* 130, 351-360.

- Hardy, R.W. y Torrissen, O.J. (1987). Carotenoid pigmentation of salmonids. *Aquaculture Magazine* 1, 8-14.
- Han-Ching, L., T., Mauguin, S. y Mescle, J. F. (1992). Application of lactic acid fermentations. En: *Fish Processing Technology*. pp. 193-211. Hall, G. M (ed.). Chapman & Hall. Reino Unido.
- Mejía, L.A., Hudson, E., De Mejía, E.G., Vázquez, F. (1988). Carotenoid content and Vitamin A activity of some common cultivars of Mexican peppers (*Capsicum annum*) as determined by HPLC. *Journal of Food Science* 53, 1448-1451.
- Meyers y, S. P. y Bligh, D. (1981). Characterization of astaxanthin pigments from heat processed crawfish waste. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 29, 505-508.
- Menasveta, P., Worawattanamateekul, W., Larscha, T. y Clark, J. (1993). Correction of black tiger prawn (*Penaeus monodon* Fabricius) coloration by astaxanthin. *Aquaculture Engineering* 12, 203-213.
- Torrissen, O., Tidemann, E., Hansen, F. y Raa, J. (1981). Ensiling in acid-A method to stabilize astaxanthin in shrimp processing by products and improve uptake of this pigment by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* 26, 77-83.
- Zakaria, Z., Hall, G.M. y Shama, G. (1998). Lactic acid fermentation of scampi waste in a rotating horizontal bioreactor for chitin recovery. *Process Biochemistry* 11 (1), 1-6.