



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Unidad Interdisciplinaria de Ingeniería
Campus Zacatecas
IPN-UPIIZ

“CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE *Artemia salina* Y EVALUACIÓN DE SUS PROPIEDADES FUNCIONALES”

Trabajo escrito correspondiente a la opción de titulación:

Curricular

Que para obtener el grado de:

“Ingeniera en Alimentos”

Presenta:

C. Dania Guadalupe Guerrero De Luna

Asesor:

M. en C. Oscar Javier Ramos Herrera

Zacatecas, Zacatecas a abril del 2023





Folio
UPIIZ/ESA/082/2023

Asunto
DESIGNACIÓN DE ASESORES

2023. Año de Francisco Villa
30 Aniversario de la Declaración sobre
la Eliminación de la Violencia contra la Mujer (ONU)
60 Aniversario del CECyT 7 "Cuauhtémoc" y del CENAC
90 Aniversario de la Escuela Superior de Ingeniería Textil
40 Aniversario del CIDIR, Unidad Oaxaca

Zacatecas, Zac., a 03 de abril de 2023

C. DANIA GUADALUPE GUERRERO DE LUNA
INGENIERÍA EN ALIMENTOS
BOLETA: 201867030298
GENERACIÓN: 2017-2022
PRESENTE

Mediante el presente se hace de su conocimiento que la Subdirección Académica y este Departamento aceptan que el M. en C. Oscar Javier Ramos Herrera, sea su único Asesor, en el tema que propone usted a desarrollar como prueba escrita de la opción de titulación Curricular, con el título y contenido siguiente:

"CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE ARTEMIA SALINA Y EVALUACIÓN DE SUS PROPIEDADES FUNCIONALES".

Se concede un plazo de máximo de un año, a partir de esta fecha, para presentarlo a revisión por el jurado asignado.


SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA
DE INGENIERÍA CAMPUS ZACATECAS
DEPARTAMENTO DE EVALUACIÓN
Y SEGUIMIENTO ACADÉMICO
L.C. María Monserrat Saldaña Noriega
Jefa del Departamento de Evaluación
y Seguimiento Académico


ESTADOS UNIDOS MEXICANOS
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA
DE INGENIERÍA CAMPUS ZACATECAS
SUBDIRECCIÓN ACADÉMICA
MCC. Roberto Oswaldo Cruz
Subdirector Académico
de la UPIIZ





Folio
UPIIZ/ESA/091/2023

2023. Año de Francisco Villa
30 Aniversario de la Declaración sobre
la Eliminación de la Violencia contra la Mujer (ONU)
60 Aniversario del CECyT 7 "Cuauhtémoc" y del CENAC
90 Aniversario de la Escuela Superior de Ingeniería Textil
40 Aniversario del CIIDIR, Unidad Oaxaca

Asunto
AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN

C. DANIA GUADALUPE GUERRERO DE LUNA
INGENIERÍA EN ALIMENTOS
BOLETA: 201867030298
GENERACIÓN: 2017-2022
PRESENTE

Zacatecas, Zac., a 17 de abril de 2023

El suscrito tengo el agrado de informar a usted, que habiendo procedido a revisar el trabajo de titulación que presenta con fines de titulación denominada:

"CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE ARTEMIA SALINA Y EVALUACIÓN DE SUS PROPIEDADES FUNCIONALES".

El departamento de Evaluación y Seguimiento Académico, así como sus asesores, determinaron que el citado Trabajo de Titulación, reúne los requisitos para autorizar la impresión y proceder a la presentación del Examen Profesional debiendo tomar en consideración las indicaciones y correcciones que al respecto se hicieron.



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA
DE INGENIERÍA CAMPUS ZACATECAS
DEPARTAMENTO DE EVALUACIÓN
Y SEGUIMIENTO ACADÉMICO
L.C. MARÍA MONSERRAT SALDAÑA NORIEGA
JEFA DEL DEPARTAMENTO DE EVALUACIÓN
Y SEGUIMIENTO ACADÉMICO

M. EN C. OSCAR JAVIER RAMOS HERRERA
ASESOR



Autorización de uso de obra
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
P r e s e n t e

Bajo protesta de decir verdad la que suscribe **Dania Guadalupe Guerrero De Luna**, estudiante del programa de **Ingeniería en Alimentos** con número de boleta **2018670302**, adscrito a la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería campus Zacatecas; manifiesto ser autora y titular de los derechos morales y patrimoniales de la obra titulada **Caracterización de las proteínas de *Artemia salina* y evaluación de sus propiedades funcionales**, en adelante “El Trabajo de Titulación” y de la cual se adjunta copia, por lo que por medio del presente y con fundamento en el Artículo 27 Fracción II, inciso b) de la Ley Federal del Derecho de Autor, otorgo al Instituto Politécnico Nacional, en adelante el “IPN”, autorización no exclusiva para comunicar y exhibir públicamente total o parcialmente en medios digitales **en la plataforma de la Dirección de Bibliotecas del IPN y/o consulta directa en la Coordinación de Biblioteca de la UPIIZ “El Trabajo de Titulación”** por un periodo de **2 años** contado a partir de la fecha de la presente autorización, dicho periodo se renovará automáticamente en caso de no dar aviso expreso al “IPN” de su terminación.

En virtud de lo anterior, el “IPN” deberá reconocer en todo momento mi calidad de autor de “El Trabajo de Titulación”.

Adicionalmente, y en mi calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales de “El Trabajo de Titulación”, manifiesto que la misma es original y que la presente autorización no contraviene a ninguna otra otorgada por el suscrito respecto de “El Trabajo de Titulación”, por lo que deslindo de toda responsabilidad al “IPN” en caso de que el contenido de “El Trabajo de Titulación” o la autorización concedida afecte o viole derechos autorales, industriales, secretos industriales, convenios o contratos de confidencialidad o en general cualquier derecho de propiedad intelectual de terceros y asumo las consecuencias legales y económicas de cualquier demanda o reclamación que puedan derivarse del caso.

Zacatecas, Zac., a 21 de abril del 2023

Atentamente

Dania Guadalupe Guerrero De Luna

AGRADECIMIENTOS

A mis padres: Ángeles y Gilberto, que fueron mi más grande apoyo y motivación para sacar mi carrera adelante.

A mis hermanos: Carlos, mi compañero de toda la vida, a Yesi por su ayuda económica y uno de mis ejemplos a seguir, y a Beto por todo lo que me ha enseñado.

A Mary, mi amiga fiel desde los 11 años y uno de mis apoyos más grandes.

A mis amigos y compañeros: Deyci, Dianita, Nora, Venancio y Eliza por los momentos, el apoyo y la comida. “El mundo es nuestra cafetería”, y las risas nunca faltaron.

A mis profesores: al maestro Óscar, que sin él este proyecto no sería posible, al Ing. Armando, a la Dra. Cinthya Pamela y a la Dra. Karol por haberme dado la retroalimentación necesaria para esta investigación, y en general por la paciencia y la disposición que demostraron tener para enseñar y para formarme como una gran profesionalista, así como lo demostraron tener también el Dr. Paredes (que fue un gran impulsor en mi primer año de formación superior), la Dra. Carolina y el resto de los maestros y técnicos de laboratorio que me acompañaron en este trayecto de 5 años.

Y finalmente, agradezco a la UPIIZ, y al IPN en general, por todas las facilidades que me otorgó esta institución para cursar y culminar mi carrera universitaria.

Gracias, gracias.

A mis queridos padres:

Quiero dedicarles este trabajo de investigación como reflejo de todo el esfuerzo y sacrificio que hicieron para que yo pudiera llegar a este punto, pues sin ustedes no lo habría logrado. Gracias por todo el apoyo, el amor y la paciencia con la que me han acompañado durante todo este tiempo. Este logro es tanto de ustedes como mío.

Los quiero mucho.

INDICE

	Página
Resumen	iii
Abstract	iii
Índice de tablas	iv
Índice de figuras	iv
Nomenclatura	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LA LITERATURA	1
2.1. Proteínas	1
2.1.1. Propiedades funcionales de las proteínas	2
2.2. Electroforesis tipo SDS-PAGE	2
3. JUSTIFICACIÓN	3
4. HIPÓTESIS	3
5. OBJETIVOS	3
5.1. Objetivo general	3
5.2. Objetivos específicos	3
6. METODOLOGÍA	4
6.1. Cultivo de <i>Artemia salina</i>	4
6.2. Extracción de la biomasa	4
6.3. Acondicionamiento de la muestra	4
6.4. Fraccionamiento de proteínas	4
6.5. Caracterización electroforética	5
6.6. Evaluación de las propiedades funcionales	5
6.6.1. Capacidad espumante	5
6.6.2. Propiedades emulsificantes	5
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	6
7.1. Cultivo de <i>Artemia Salina</i>	6
7.2. Fraccionamiento de proteínas	6
7.3. Caracterización electroforética	7
7.3. Evaluación de las propiedades funcionales	7
7.3.1. Capacidad espumante	7
7.3.2. Propiedades emulsificantes	8
8. CONCLUSIONES	9
9. RECOMENDACIONES Y PROSPECTIVAS	10
10. LITERATURA CITADA	11
APÉNDICE	13

Resumen

Se realizó un cultivo de *Artemia salina* en un sistema por lote, resultando en el 26% de rendimiento en la producción de biomasa seca con respecto a la cantidad de quistes sembrados. Las proteínas del crustáceo se extrajeron por fraccionamiento de acuerdo a su solubilidad y, posteriormente, se realizó una caracterización electroforética mediante electroforesis SDS-PAGE, en donde las albúminas tanto como las glutelinas tuvieron pesos moleculares en intervalos de entre 100 y 150 KDa; las globulinas en intervalos de 15 a 25 KDa y de 100 a 150 KDa; y por último, las prolaminas presentaron pesos moleculares de 25 KDa y de 100 a 150 KDa. En cuanto a sus propiedades funcionales de formación de espuma, se determinó que las albúminas, las globulinas y las glutelinas presentaron una capacidad espumante del 6150%, 1300% y 4700% respectivamente, que ninguna proteína presentó actividad emulsificante (AE), y que las albúminas tuvieron una estabilidad emulsificante (EE) del 2.9%, y del 3% en las glutelinas.

Palabras clave: *Electroforesis de proteínas, Emulsión, Espuma.*

Abstract

Artemia salina was cultured in a batch system, resulting in a 26% yield in dry biomass production with respect to the amount of cysts seeded. Crustacean proteins were extracted by fractionation according to their solubility and then electrophoretic characterization was performed by SDS-PAGE electrophoresis, where albumins and glutelins had molecular weights ranging from 100 to 150 KDa; globulins had molecular weights ranging from 15 to 25 KDa and from 100 to 150 KDa; and finally, prolamins had molecular weights ranging from 25 KDa and from 100 to 150 KDa. Regarding their functional foaming properties, it was determined that albumins, globulins and glutelins presented a foaming capacity of 6150%, 1300% and 4700% respectively, that no protein presented emulsifying activity (AE), and that albumins had an emulsifying stability (ES) of 2.9%, and 3% in glutelins.

Keywords: Protein electrophoresis, Emulsion, Foam.

INDICE DE TABLAS

Número	Tabla	Página
1	Formulación de agua de marina artificial usada en la eclosión y cultivo de <i>Artemia</i> .	13
2	Soluciones utilizadas para el fraccionamiento de proteínas de <i>Artemia salina</i> .	13
3	Composición de los geles de electroforesis.	14
4	Composición del regulador de muestra.	15
5	Composición del regulador del ánodo (Tris 0.2 M).	15
6	Composición del regulador del cátodo.	15
7	Composición del regulador del gel.	15
8	Composición de la solución teñidora.	16
9	Composición de la solución desteñidora.	16

INDICE DE FIGURAS

Número	Figura	Página
1	Proteínas concentradas de <i>Artemia salina</i> .	6
2	Gel de electroforesis de los aislados proteicos de <i>Artemia salina</i> .	7
3	Capacidad espumante en los aislados proteicos de <i>Artemia salina</i>	8
4	Estabilidad emulsificante en los aislados proteicos de <i>Artemia salina</i>	9
5	Colocación de geles de poliacrilamida en las placas de electroforesis.	14

Nomenclatura.

%C	por ciento de acrilamida
%T	por ciento de bis-acrilamida
°C	grados centígrados
A	albúminas
AE	actividad emulsificante
C ₂ H ₅ OH	etanol
CaCl ₂	cloruro de calcio
CE	capacidad espumante
cm	centrím metro
EE	estabilidad emulsificante
g	gramos
G	gravedades
Gl	globulinas
Gt	glutelinas
H	altura
h	horas
H ₂ O	agua
KCl	cloruro de potasio
KDa	kilodaltons
L	litros
mg	miligramos
mg/L	miligramos sobre litro
MgCl ₂	cloruro de magnesio
MgSO ₄	sulfato de magnesio
min	minutos
mL	mililitros
M	molaridad
Ma	marcador
N	normalidad
NaCl	cloruro de sodio
NaHCO ₃	bicarbonato de sodio
NaOH	hidróxido de sodio
P	prolaminas
PSA	persulfato de amonio
R _B	rendimiento de la biomasa
rpm	revoluciones por minuto
s	segundos
SDS	dodecil sulfato sódico
TEMED	tetrametiletilendiamina

V	voltios
v	volúmen
μL	microlitros

1. INTRODUCCIÓN

La *Artemia salina* es un pequeño crustáceo que en estado adulto mide entre 17-18 mm (FAO, Cultivo de *Artemia salina*, s.f.), catalogado como el más primitivo insecto por su constitución fisiológica simple, se utiliza mundialmente como alimento de peces y camarones, y países como España, Brasil, Panamá, México y otros, han intensificado el proceso de cría de biomasa, tanto de la *Artemia* adulta como de quistes (Villamar Ochoa, 2016). Así, Lavens y Sorgeloos (2002) mencionan que el mercado mundial demanda más de 2,000 toneladas anuales de quistes de *Artemia*.

Este crustáceo es rico en proteínas, ya que estas pueden representar hasta el 50% de su composición total; un perfil patrón del contenido proteico de la biomasa de *Artemia salina* indica un porcentaje del 52% al 74% (Villamar Ochoa, 2016). Mientras, Cisneros y Vinatea (2009) informan un cambio en su contenido proteico dependiendo de la alimentación suministrada, ya que con harina de soya reportan un 53.78% y un 65.75% con harina de pescado. Por otro lado, Llosa (2007) menciona que este crustáceo tiene un tenor del 50% al 60%.

Por lo anterior, el presente proyecto tuvo la finalidad de aprovechar este contenido de proteínas, cultivando *Artemia salina* en un sistema por lote, guiado por el proceso descrito por la FAO (FAO, s.f.), teniendo una alimentación a base de harina de soya, ya que se ha demostrado que el contenido proteico de la biomasa aumenta con este sustrato como dieta (Cisneros & Vinatea, 2009), con el fin de obtener el mayor rendimiento posible de biomasa de *Artemia*, la cual se utilizó para aislar sus proteínas por fraccionamiento de acuerdo a Osborne (1924), y se realizó una caracterización electroforética de las mismas por el método descrito por Laemmli (1970). Adicionalmente, se evaluaron sus propiedades de emulsificación y de formación de espuma para abrir la posibilidad de sus aplicaciones en la elaboración y desarrollo de alimentos.

2. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1. Proteínas

Las proteínas juegan un papel central en los sistemas biológicos. Los microorganismos tienen un número mínimo cercano a 3,000 clases de proteínas que abarcan todo tipo de funciones: estructura, transporte, motilidad, defensa, reconocimiento, almacenamiento y la función catalítica que llevan a cabo las enzimas (Badui, 2006).

Las proteínas se clasifican en cuatro categorías de acuerdo con las características de solubilidad: las albúminas son las que se solubilizan en agua a pH 6.6 (v.g. albúmina sérica, ovoalbúmina, y α lactoalbúmina); las globulinas son solubles en soluciones

salinas diluidas a pH 7.0 (v.g. glicinina, faseolina y β -lactoglobulina); las glutelinas son solubles en soluciones ácidas (a pH 2) y alcalinas (a pH 12) (v.g. glutelinas de trigo); y por último las prolaminas son solubles en etanol al 70% (v.g. zeína, gluten de maíz y las gliadinas del trigo). Así, las proteínas poseen propiedades nutricionales, y de sus componentes se obtienen moléculas nitrogenadas que permiten conservar la estructura y el crecimiento de quien las consume; asimismo, pueden ser ingredientes de productos alimenticios y, por sus propiedades funcionales, ayudan a establecer la estructura y propiedades finales del alimento (Badui, 2006).

2.1.1. Propiedades funcionales de las proteínas

La funcionalidad de una sustancia se define como toda propiedad, nutricional o no, que interviene en su utilización. Este comportamiento depende de las propiedades físicas y químicas que se afectan durante el procesamiento, almacenamiento, preparación y consumo del alimento. Algunas propiedades funcionales de las proteínas son: solubilidad, viscosidad, absorción de agua, elasticidad, emulsificación, espumado, gelación, etc. (Kinsella, 1985).

En el caso, para formular una emulsión se requiere: aceite, agua, un emulsificante y energía, generalmente mecánica. Las proteínas como surfactantes son las preferidas para formular emulsiones alimenticias (aceite-agua), debido a que su superficie es activa y favorece la resistencia a la coalescencia (Badui, 2006).

Por otro lado, las espumas consisten en una fase continua acuosa y una fase dispersa gaseosa (generalmente aire). Las proteínas son los principales agentes con actividad superficial que ayudan en la formación y estabilización de la fase gaseosa dispersa. Generalmente, las espumas estabilizadas por proteínas se forman por burbujeo, batido, o agitación de una solución proteínica (Badui, 2006).

2.2. Electroforesis tipo SDS-PAGE

Una forma de caracterizar las proteínas es mediante electroforesis de proteínas. La electroforesis es una herramienta que se utiliza para la separación, identificación y purificación de proteínas. La técnica más empleada es la formación de una placa de gel de poliacrilamida en la que se utiliza el método desarrollado por Laemmli (1970). En este método se lleva a cabo la preparación de placas de gel de poliacrilamida que contienen dodecil sulfato de sodio (SDS), denominándose esta técnica como “SDS-PAGE”. La velocidad de polimerización del gel está determinada por la concentración de persulfato de amonio y TEMED. Mientras que la porosidad del gel, la determinan las proporciones relativas de poliacrilamida (C) y bis-acrilamida (T), siendo menor el poro cuanto más bisacrilamida haya en relación a la concentración de acrilamida. El porcentaje total de acrilamida/bis-acrilamida determina el rango de separación del gel.

El principio que se utiliza en electroforesis se fundamenta en la atracción de cargas eléctricas. Cuando una proteína presenta una carga eléctrica neta, en un campo eléctrico se desplazará al electrodo con carga contraria (Pérez-Chabela *et al.*, 2015).

La migración es proporcional a la carga y al tamaño de la molécula, pero no a su forma. La separación de los complejos SDS-proteína es proporcional solo a la masa de la proteína pues todas tienen la misma carga por unidad de masa. Se puede entonces determinar el peso molecular aparente de cualquier proteína por comparación con un patrón de proteínas de pesos moleculares conocidos. Las movilidades de las proteínas en los geles de SDS-PAGE son funciones lineales del logaritmo de su peso molecular (Weber y Osborne, 1969).

3. JUSTIFICACIÓN

Artemia salina es un alimento vivo para alevines de diferentes especies en la producción acuícola gracias al importante aporte nutrimental que poseen, principalmente como fuente proteica. Razón por la que es cultivada en diferentes partes del mundo y por la cual, la mayoría de las investigaciones se centran en cómo mejorar el rendimiento de su producción, aunque su uso no se ha explorado más allá de dicha finalidad. Es por esto que, al realizar la caracterización de las propiedades funcionales de sus proteínas, se puede crear la pauta para futuras aplicaciones dentro de la industria alimentaria, lo que amplía las opciones de explotación para este crustáceo.

4. HIPÓTESIS

Las proteínas contenidas en *Artemia salina* tienen propiedades espumantes y /o emulsificantes que pueden ser aplicadas en alimentos.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Caracterizar las proteínas de *Artemia salina* y evaluar sus propiedades funcionales.

5.2. Objetivos específicos

- 5.2.1.** Cultivar *Artemia salina* en un sistema por lote.
- 5.2.2.** Aislar el contenido proteico del crustáceo en diferentes fracciones por solubilidad.
- 5.2.3.** Caracterizar las proteínas presentes en la biomasa obtenida empleando electroforesis.
- 5.2.4.** Determinar la capacidad emulsificante y espumante de los péptidos de *Artemia salina*.

6. METODOLOGÍA

6.1. Cultivo de *Artemia salina*

Se basó en la metodología descrita por la FAO (FAO, s.f.) con algunas modificaciones. En un biorreactor con capacidad de 2 L, se colocaron 1 g de quistes de *Artemia salina*/L de agua marina artificial (ver el Apéndice 1). Durante los 7 días de duración, se procuró una temperatura en un intervalo de 25 a 30 °C con una oxigenación dispersa de 4 mg de O₂/L, y una iluminación constante. La alimentación que se suministró fue de 0.0025 g de harina de soya/ L de cultivo con un incremento de 0.01g a partir del segundo día de la eclosión. El rendimiento de la biomasa (R_B) obtenida está dada por la ecuación 1:

$$R_B = \frac{\text{Peso de la biomasa seca obtenida}}{\text{Peso de los quistes de Artemia salina sembrados}} \times 100$$

Ecuación 1. Rendimiento de la biomasa obtenida

6.2. Extracción de la biomasa.

Se extrajo el agua del biorreactor y se refrigeró durante 24 h para incitar la muerte de los crustáceos y facilitar su extracción. Luego, el agua se colocó en un cono Imhoff durante 5 h aproximadamente para separar las *Artemias* de los quistes por diferencia de densidades. Estas, siendo las menos densas, se extrajeron del sobrenadante con una pipeta de transferencia de 10 mL.

6.3. Acondicionamiento de la muestra

La muestra se sometió a un ultracongelador (NBS-Cryo U101 -86, Inglaterra) a -50°C y después a un liofilizador (LABCONCO 64132, Estados Unidos) hasta que se secó por completo para obtener una “harina” con un tamaño de partícula más homogéneo que la hiciera más susceptible al fraccionamiento.

6.4. Fraccionamiento de proteínas.

Se realizó de acuerdo con la metodología de Osborne (1924). Se hizo una mezcla 1:10 muestra/solución (ver el Apéndice 2) que se sometió a agitación en frío por 30 min y a la centrifuga (SOLBAT J-40) durante otros 30 min a 1310 G. Después se extrajo el sobrenadante y se filtró para eliminar los quistes flotantes. Este procedimiento se repitió con la misma muestra para cada una de las soluciones descritas en el Apéndice 2, de manera escalonada y siguiendo el orden expresado. Finalmente, los aislados proteicos se congelaron en un ultracongelador (NBS-Cryo U101 -86, Inglaterra) a -50°C y se secaron en un liofilizador (LABCONCO 64132, Estados Unidos) para concentrarlos.

6.5. Caracterización electroforética.

Se llevó a cabo mediante electroforesis de proteínas, en donde se ensamblaron las placas de electroforesis tal y como se muestra en la Figura 2 (ver el el Apéndice 3), y se utilizaron geles de poliacrilamida, siguiendo el método de Laemmli (1970) modificado. Primeramente, se realizaron los geles separador y concentrador (ver el Apéndice 4), dejando polimerizar el primero para colocar el segundo junto con el peine para formar los pocillos. Después, del fraccionamiento obtenido, se hicieron diluciones 1:100 muestra/agua destilada y se mezclaron 100 μL de estas con 200 μL de regulador de muestra (ver el Apéndice 5). Las mezclas se llevaron al vortex por 3 s y se introdujeron en agua a temperatura de ebullición durante 5 min. Una vez gelificados ambos geles, se armó la cámara electroforética con los reguladores de ánodo y cátodo (ver el Apéndice 5) y se tomaron alícuotas de 20 μL de cada mezcla, que se introdujeron en cada uno de los pocillos en el gel; uno se utilizó para colocar 8 μL del marcador (Nine Evenly Spaced Bands of 10-2250 KDa para uso con SDS-PAGE), y así se dio paso al inicio de la corrida electroforética a 100 V por 100 min. Al finalizar, se extrajo el gel con rigurosidad para sumergirlo en la solución teñidora durante 3 min y después a la solución desteñidora (ver la composición de las soluciones en el Apéndice 5) con agitación constante hasta que el gel reveló las bandas proteicas.

6.6. Evaluación de las propiedades funcionales

6.6.1. Capacidad espumante (CE).

Se utilizó el método Coffman y García (1997) con algunas modificaciones. Se prepararon disoluciones a una concentración de 10 mg/mL de aislado proteico y se sometieron a aireación en una bureta de 250 mL con una bomba (Air pump OC-20, China) y una piedra dispersora de aire. Dependiendo de la cantidad de muestra extraída, se utilizaron diferentes cantidades; 4 mL de albúminas, 5 mL de globulinas y 2.5 mL de glutelinas. Se registraron los volúmenes antes y después del espumado para determinar el %CE con la ecuación 2:

$$CE = \frac{v_1 - v_2}{v_1} \times 100$$

Ecuación 2. Coffman y García (1997)

6.6.2. Propiedades emulsificantes (AE, EE).

Se determinaron de acuerdo con el método de Neto *et al.* (2001) con algunas modificaciones. Se realizaron preparados proteicos a una concentración de 10 mg/mL, y por duplicado, se homogenizaron con una batidora (Hamilton Beach, China) a una razón 1:1 con aceite vegetal constituido por aceite de soya, aceite de canola y aceite de girasol (Aurrera, México). Para actividad emulsificante (AE) se centrifugaron las muestras a 1100 rpm durante 5 min, mientras que para la estabilidad emulsificante

(EE), los duplicados se introdujeron en agua a 80°C durante 30 min antes de centrifugarlas a 1100 rpm durante 5 min. Para ambos casos se midió la altura total del contenido del tubo y la altura de la parte emulsificada. Estas propiedades se determinaron con la ecuación 3 y la ecuación 4:

$$AE = \frac{\text{Altura de la capa emulsificada del tubo}}{\text{Altura del contenido total del tubo}} \times 100$$

Ecuación 3. AE por Neto *et al.* (2001)

$$EE = \frac{\text{Altura de la capa emulsificada luego de calentar}}{\text{Altura del contenido total del tubo luego de calentar}} \times 100$$

Ecuación 4. EE por Neto *et al.* (2001)

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

7.1. Cultivo de *Artemia salina*.

De acuerdo con la ecuación 1, el rendimiento de la biomasa seca obtenida con respecto a la cantidad de quistes sembrados fue del 26%, menor que los resultados de Cisneros y Vinatea (2009) donde obtuvieron un rendimiento del 51.37% en un cultivo semi-intensivo utilizando la misma dieta de harina de soya. Este porcentaje se calculó con los datos proporcionados por el mismo artículo y tomando en cuenta que en 1 g hay 204 000 quistes de *Artemia*, dato promedio de los resultados obtenidos por C. Mallo *et al.* (2004).

7.2. Fraccionamiento de proteínas

La Figura 1 muestra las proteínas extraídas en peso seco, donde cada una se diferencia por los pigmentos que se extrajeron junto con ellas.

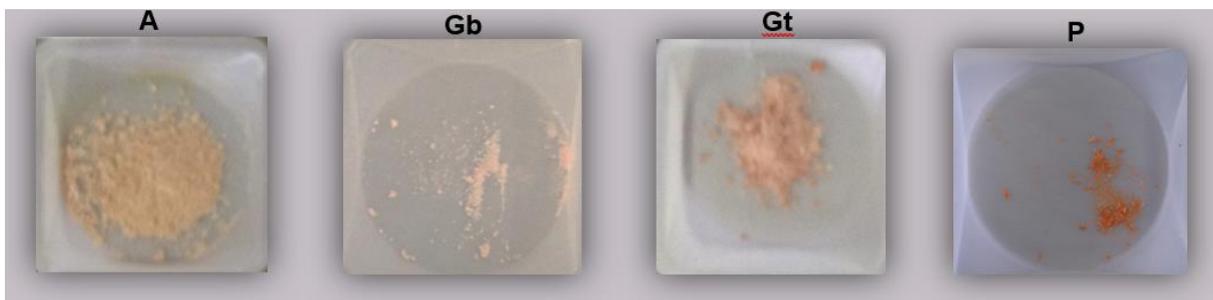


Figura 1. Proteínas concentradas de *Artemia Salina*.

Las albúminas se distinguen por el color amarillo, las globulinas por el salmón claro, las gluteninas por el salmón oscuro y las prolaminas por el color naranja.

7.3. Caracterización electroforética.

En la Figura 2, se puede mostrar el gel resultante de la electroforesis tipo SDS-PAGE.

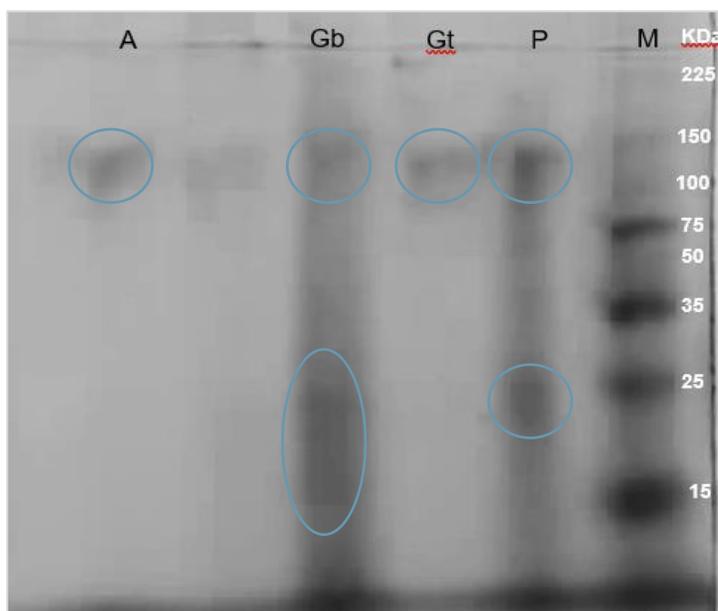


Figura 2. Gel de electroforesis de los aislados proteicos de *Artemia salina*.

Cabe señalar las albúminas tienen un peso molecular en un rango de 100 y 150 KDa, al igual que las prolaminas, mientras que, en las globulinas, se observa una mayor concentración de proteínas cuyos pesos moleculares se encuentran entre 15 a 25 KDa y entre 100 y 150 KDa. Finalmente, en las prolaminas se encuentran pesos moleculares de 25 KDa y entre el intervalo de 100 a 150 KDa.

7.4. Evaluación de las propiedades funcionales

7.4.1. Capacidad espumante (CE).

No se evaluaron las propiedades funcionales de las prolaminas debido a que la cantidad extraída sólo alcanzó para realizar la caracterización electroforética. Sin embargo, en la Figura 3 se muestran los resultados del resto de las proteínas, en donde se puede observar un %CE muy alto para cada una, siendo las albúminas las más destacables con un 6150 %CE.

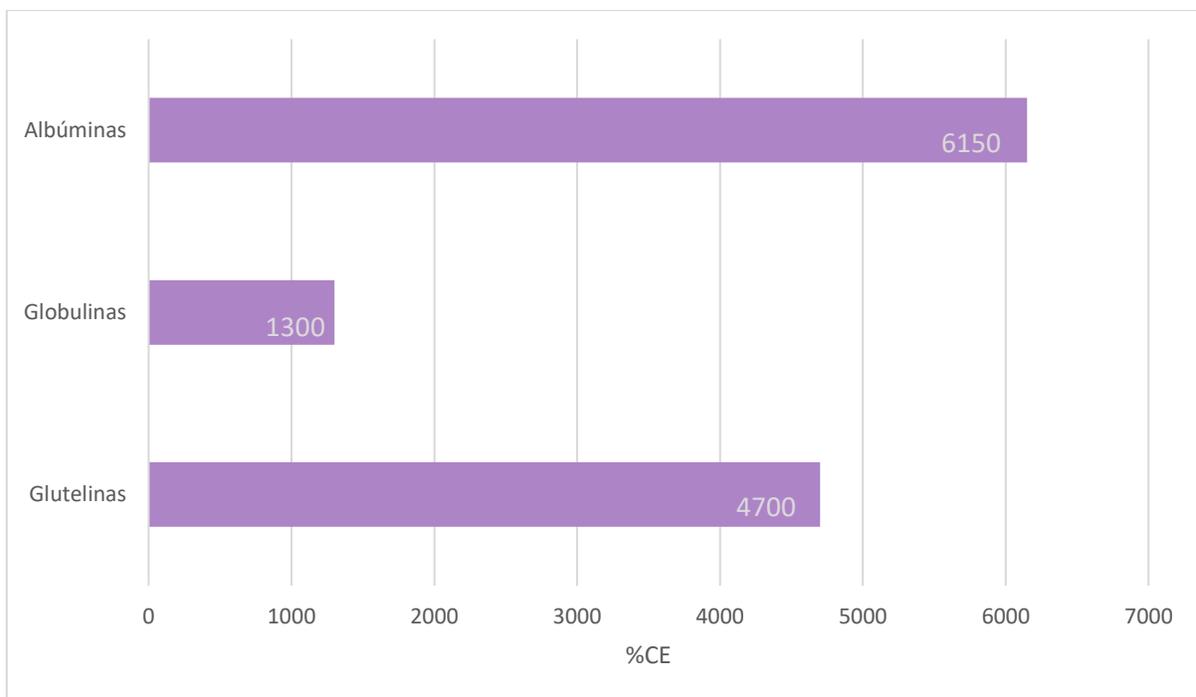


Figura 3. Capacidad espumante en los aislados proteicos de Artemia salina.

El que estas proteínas presentaran capacidad para formar espuma habla de que presentan flexibilidad y una rápida adsorción en la interfase (Fennema *et al.*, 1993). Cabe mencionar que las burbujas de las espumas formadas eran grandes debido al mecanismo de espumado por aireación (Fennema *et al.*, 1993) y, salvo por las albúminas que mantuvieron un volumen de 4 mL de espuma por alrededor de 40 min, el resto de las espumas no se mantuvieron por mucho tiempo después de haber realizado el experimento. El grado de despliegue de las proteínas y la concentración de estas pudieron influir en estos resultados, ya que un despliegue parcial y una alta concentración proteica aseguran una estructura más firme, en tanto que un despliegue total y una concentración proteica baja resultan en la formación de una estructura más débil (Fennema *et al.*, 1993).

7.4.2. Propiedades emulsificantes

Ninguno de los aislados proteicos demostró tener un %AE, pero dos de ellos: albúminas y glutelinas, sí presentaron %EE. Esta información se puede visualizar en el Figura 4.

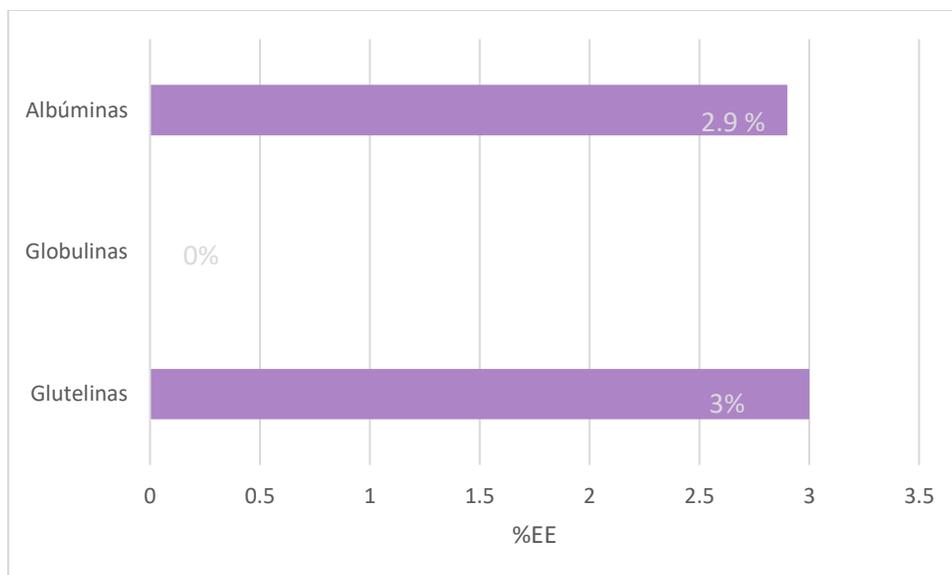


Figura 4. Estabilidad emulsificante en los aislados proteicos de *Artemia salina*.

En un intervalo de 40°C a 80°C ocurre una desnaturalización en las proteínas y, si se desnaturalizan parcialmente sin llegar a la insolubilización, se logrará una mejora de las propiedades emulsificantes pues se incrementan la flexibilidad molecular y la hidrofobicidad superficial lo que favorece la formación de películas altamente viscoelásticas en la interfase aceite-agua (Fennema *et al.*,1993). Esto explica el por qué las albúminas y las glutelinas de *Artemia Salina* presentaron un incremento en las propiedades emulsificantes luego de haber sido sometidas al calor.

Por otro lado, las globulinas no presentaron propiedades emulsificantes de ningún tipo porque estas fueron extraídas con NaCl. La sal puede afectar las propiedades emulsificantes por dos mecanismos: 1. El NaCl puede reducir la repulsión electrostática entre las gotas de la emulsión y 2. La concentración de electrolitos en altas concentraciones pueden alterar la organización estructural de las moléculas de agua, lo que perturba la resistencia de las interacciones hidrofóbicas entre los grupos no polares (McClements, 1999). Además, el resto de las fracciones también contenían cierto grado de sales debido a que la *Artemia* fue cultivada en agua marina artificial y no se hizo un lavado previo al fraccionamiento, lo que puede explicar el por qué en general estas proteínas no mostraron tener propiedades emulsificantes significativas.

8. CONCLUSIONES

El cultivo en el biorreactor permitió obtener un rendimiento de biomasa seca respecto a la cantidad de quistes sembrados del 26.65%.

Artemia salina contiene, a simple vista, una mayor cantidad de globulinas que de otras proteínas.

Cada fracción proteica demostró tener diferentes pigmentos.

Las globulinas y las glutelinas tienen una mayor variedad de proteínas con pesos moleculares diferentes, ya que las primeras tienen fracciones con pesos moleculares de intervalos entre 100 a 150 KDa y de 15 a 25 KDa, mientras que las prolaminas presentaron pesos moleculares entre los 100 a 150 KDa y 25 KDa.

Las albúminas obtuvieron una mayor capacidad espumante (6150%) con respecto a las globulinas (1300%) y las glutelinas (4700%), teniendo estas un peso molecular de 100 a 150 KDa según los resultados de electroforesis. Esto, aunado a que la espuma se mantuvo por 40 minutos, la convierte en una proteína apta para ser aplicada en algún producto alimenticio, como en malteadas, por ejemplo.

En cuanto a las glutelinas, estas presentaron una mejor estabilidad emulsificante (3%) que las albúminas (2.9%) y las globulinas, donde estas últimas no presentaron esta propiedad que puede ser debido a que tenían presencia de sal.

Se demostró que el calor suministrado para determinar la estabilidad emulsificante aumentó las propiedades de emulsificación en las albúminas y las glutelinas debido a la desnaturalización de estas.

9. RECOMENDACIONES Y PROSPECTIVAS

- Realizar el cultivo en biorreactor durante al menos 14 días para que los crustáceos lleguen a la edad adulta y se pueda obtener un mayor rendimiento de la biomasa.
- Evaluar el rendimiento de cada fracción proteica extraída respecto a la cantidad de biomasa obtenida.
- Los pigmentos extraídos junto con las proteínas pueden ser otro caso de estudio para ser aplicados dentro de la industria de los alimentos.
- Dializar cada uno de los aislados proteicos, sobre todo el de las globulinas, antes de evaluar sus propiedades de emulsificación para que la sal (proveniente del agua marina artificial y del fraccionamiento de las globulinas) no interfiera con estas.
- Evaluar la propiedad de espumado con una concentración más alta de proteínas para ver si así presentan una mejor estabilidad espumante a través del tiempo.
- Si el gel de electroforesis no gelifica al poco tiempo de haber sido preparado, utilizar una solución nueva de PSA al 10%.

10. LITERATURA CITADA

- Badui, S. (2006). *Química de los alimentos*. Naucalpan de Juárez, Edo. de México: Pearson Educación.
- Cisneros, R., & Vinatea, E. (2009). Producción de biomasa de *Artemia franciscana* utilizando diferentes dietas. Obtenido de <http://www.scielo.org.pe/pdf/ecol/v8n1-2/a02v8n1-2.pdf>
- C. Mallo, J., E. Sato, N., & L. Fenucci, J. (2004). Calidad de los quistes de *Artemia persimilis* (Piccinelli & Prosdoci) (Crustacea: Branchiopoda) de diferentes zonas de Argentina, como alimento en acuicultura, 79-92. Argentina: *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. Obtenido de <https://www.scielo.cl/pdf/revbiolmar/v39n2/art04.pdf>
- Coffman, C.W.; García, V.V. (1977). Functional properties and amino acid content of protein isolate from Mung bean flour. *J. Food Technol.* 12:473-484.
- Fennema, O. R., Damodaran, S., & Parkin, K. L. (1993). *Química de los alimentos*. Acribia.
- FAO. (s.f.). Cultivo de *Artemia Salina*. Obtenido de <https://www.fao.org/3/ab473s/AB473S04.htm>
- FAO. (s.f.). Obtenido de Producción de nauplios de artemia y quistes desencapsulados para usarlos como alimento en centros de puesta de peces y crustáceos: <https://www.fao.org/3/AB474S/AB474S05.htm>
- Kinsella, J. E.; German, B.; Shetty, J., (1985). Uricase from fish liver el: isolation and some properties. *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Comp. Biochem.*, 82 (4): 621-624
- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lavens, P. y Sorgeloos, P. (2002). The history, present status and prospects of the availability of *Artemia* cysts for aquaculture. *Aquaculture*, 181: 397-403.
- Llosa, J. (2007). *Artemia*, Aportes para el Desarrollo de la Acuicultura en el Perú.
- McClements, D.J. (1999). Emulsion stability. In: Hasenhuettl, G.; Hartel, R. (eds). *Food emulsions: Principles, practice, and techniques*. Boca Raton, London, New York, Washington, DC, USA: CRC Press. p.185-233.
- Neto, V.Q.; Narain, N.; Silvia, J.B.; Bora, P.S. (2001). Functional properties of raw and heat-processed cashew nut (*Anacardium occidentale* L.) kernel protein isolate. *Nah.* 45:258-262.
- Osborne T. B. (1924). *The vegetable proteins*. Longmans, Green and Co., Londres.
- Pérez C. L.; Soriano S. J.; Ponce-Alquicira, E., & Díaz-Tenorio, L. (2015). Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS como herramienta en el estudio de las proteínas miofibrilares. Una revisión. D.F., México, D.F., México: Departamento de Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana.

Villamar Ochoa, C. A. (2016). La *Artemia salina* y su importancia en la producción camaronera. AquaTIC.

Weber, K., M. Osborn. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. The Journal of Biological Chemistry 244: 4406-4412.

APÉNDICE

Apéndice 1. Formulación de agua marina artificial.

Tabla 1. *Agua de mar artificial usada en la eclosión y cultivo de Artemia.*

	Medio de eclosión^a
Sal marina de evaporación (NaCl)	5.0
MgSO ₄ ^b	1.3
MgCl ₂	1.0
CaCl ₂	0.3
KCl ^b	0.2
NaHCO ₃ ^b	2.0

^a en gramos de sal (calidad técnica) por litro de agua dulce.

^b disolver ello separadamente en agua dulce caliente antes de añadir a la solución otras sales.

La FAO establece que este es el contenido idóneo de sales que favorecen la eclosión de los quistes de *Artemia salina*.

Apéndice 2. Fraccionamiento de proteínas de Osborne (1924)

Tabla 2. *Soluciones utilizadas para el fraccionamiento de proteínas de Artemia salina.*

Proteína	Solución
1. Albúminas	H ₂ O destilada
2. Globulinas	NaCl 5%
3. Glutelinas	NaOH 0.02 N
4. Prolaminas	C ₂ H ₅ OH 70%

Apéndice 3. Ensamblaje de la cámara electroforética.

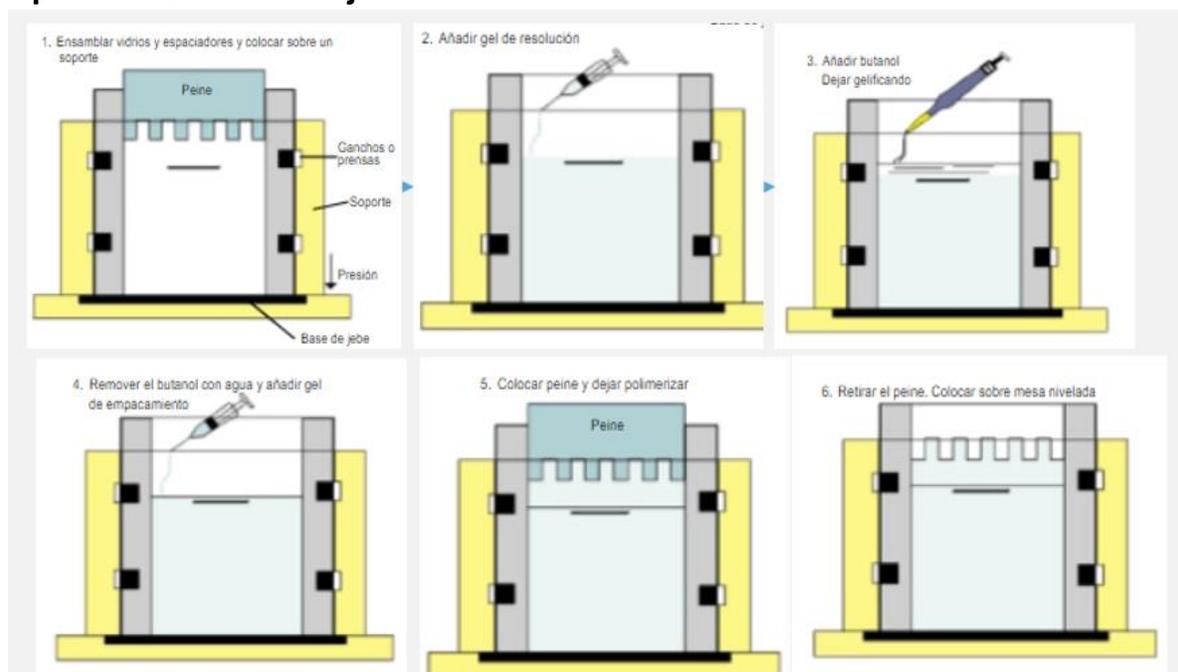


Figura 5. Colocación de geles de poliacrilamida en las placas de electroforesis. Tomada de: https://www.researchgate.net/publication/261136098_MANUAL_DE_PROCEDIMIENTOS_DE_ELECTROFORESIS_PARA_PROTEINAS_Y_ADN

La Figura 1 muestra el procedimiento a seguir para la colocación de los geles en las placas de electroforesis.

Apéndice 4. Geles de poliacrilamida

Tabla 3. Composición de los geles de electroforesis

	Concentrador	Separador
	4% T	10% T
	3% C	3% C
Poliacrilamida	0.7 mL	2 mL
Reg del gel	1.55 mL	3.3 mL
Glicerol	-	1.3 g
Agua	4 mL	3.3 mL
PSA (10%)	32 µL	50 µL
TEMED	8 µL	8 µL

Apéndice 5. Soluciones para electroforesis

Tabla 4. *Composición del regulador de muestra*

	mL
Tris-HCl 1M pH 6.8	0.6
Glicerol 50%	5
SDS 10%	2
Azul de bromofenol 1%	1
Agua	1.4

Tabla 5. *Composición del regulador del ánodo (Tris 0.2 M)*

	Cantidad
Tris	24.228 g
Agua	1 L

*Ajustar pH a 8.9 con HCl concentrado

Tabla 6. *Composición del regulador del cátodo*

	Cantidad
Tricina 0.1 M	17.9 g
Tris 0.1 M	12.11 g
SDS 1%	1 g
Agua	1 L

Tabla 7. *Composición del regulador del gel*

	Cantidad
Tris 3 M	90.85 g
SDS 0.3%	0.75 g
Agua	250 mL

*Ajustar pH a 8.45 con HCl concentrado

Tabla 8. *Composición de la solución teñidora*

	Cantidad
Ácido acético al	
10%	25 mL
Azul de comassie	0.25 g
Metanol al 40%	90 mL
Agua	135 mL

Tabla 9. *Composición de la solución desteñidora*

	Cantidad
Ácido acético	
10%	100 mL
Metanol al 40%	400 mL
Agua	500 mL