

Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa



**Estudio del uso de enzimas comerciales en la
preparación de quitina a partir de desperdicios
de camarón.**

T E S I S

Especialización en Biotecnología

P R E S E N T A

Q.F.B. Carmen Josefina Juárez Castelán

Directora de tesis:

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto

Lector de tesis:

M.C. Ladislao Arias Margarito



28 de mayo de 2010

Esta tesis se realizo en el Laboratorio de Biopolímeros del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, bajo la dirección de la Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto. El trabajo experimental se llevo a cabo con financiamiento de SEP-CONACYT No. 105628 y CONAPESCA.

El H. Jurado designado por la división de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la idónea comunicación de resultados que presentó:

Q.F.B. Carmen Josefina Juárez Castelán

El día 28 de mayo de 2010



Directora de tesis:

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto.

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad-Iztapalapa, Departamento de Biotecnología.

Lector de tesis:

M.C. Ladislao Arias Margarito.

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad-Iztapalapa, Departamento de Biología de la Reproducción.

A G R A D E C I M I E N T O S

A la Dra. Keiko Shirai Matsumoto por la oportunidad que me brindo al incorporarme en su grupo de trabajo, por el asesoramiento, confianza, amistad y apoyo brindados durante mi estancia en el laboratorio.

Al Dr. Ladislao Arias Margarito por su calidad humana, por el apoyo que me otorgo durante la parte práctica de este trabajo y por el tiempo dedicado en la revisión de esta tesis.

A la Dra. Neith Pacheco López por la disposición, sugerencias y conocimientos transmitidos.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, Gabriel Viguera, Diana Alonso, Gustavo Martínez, Belem Flores, Zaizy Rocha, Paola Islas, Carolina de Santiago, Facundo Muñiz y Andrés Uriel por hacerme más amena la estancia en la UAM-I, por sus consejos y sobre todo por su amistad.

A la familia Carrasco Navarro por abrirme las puertas de su hogar y por su confianza.

DEDICATORIAS

A ti mamá Elvira Castelán Bautista y a ti papá Jesús J. Juárez Jiménez por que siempre se esforzaron a inclinarme hacia el buen camino, por el ejemplo de trabajo y esfuerzo que toda la vida he visto en ustedes, por el apoyo, confianza y amor que siempre me han brindado a manos llenas. Esta es la única forma con que les puedo pagar un poco todo lo que han hecho por mí. Los amo, admiro y respeto. Gracias.

A mis hermanos Gaby, Vero, Jesús y Jimena, que son parte fundamental en mi vida, a mis sobrinos Diego, Dany, Vico, Andy y Emi porque me cambio la vida cuando llegaron a este mundo, a René y Javier por sus consejos y apoyo. Porque son mi gran familia, los amo.

A mi abuelita Josefina, tíos y primos por ser parte de mi vida y por la unión que siempre han mostrado.

A mi esposo Ulises Carrasco el cual ha sido un ejemplo a seguir y me ha impulsado a alcanzar mis metas. Porque en estos momentos comenzamos una hermosa etapa en nuestras vidas y porque los dos somos la fuerza que necesitamos para salir adelante. Gracias por todo tu apoyo y por creer en mí. Te amo.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIAS.....	iv
LISTA DE TABLAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
RESUMEN	vii
ABSTRACT.....	viii
2. REVISION BIBLIOGRAFICA.....	1
2.1 Biopolímeros	1
2.1.1 Quitina y quitosano	2
2.1.2 Estructura de la quitina	2
2.1.3 Obtención de quitina.....	3
2.1.4 Estructura del quitosano	4
2.2 Obtención de la quitina.....	5
2.2.1 Fermentación ácido láctica	5
2.2.2 Extracción del pigmento.....	6
2.2.3 Desmineralización (DM) química de la quitina	6
2.2.4 Desproteínización (DP) química de la quitina	6
2.3 Desproteínización enzimática	7
2.4 Obtención de quitosano: desacetilación.....	7
2.5 Propiedades, características y aplicaciones de quitina y quitosano.	8
3. JUSTIFICACIÓN.....	11
4. OBJETIVOS	12
Objetivo General	12
Objetivos Particulares	12
5. HIPÓTESIS.....	13
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
6.1 Desecho de camarón.....	14
6.2 Microorganismo	14

6.3 Fermentación ácido láctica (escala laboratorio)	15
6.4 Purificación de quitina cruda	15
6.4.1 Desmineralización química	15
6.4.2 Prueba de desmineralización (F1)	15
6.4.3 Desproteínización química	16
6.4.4 Prueba de desproteínización (F1)	16
6.4.5 Purificación de quitina (F1 y F2)	16
6.5 Desproteínización enzimática	18
6.5.1 Enzimas comerciales	18
6.5.2 Selección de proteasas comerciales aplicadas a desecho de camarón	19
6.6 Obtención de quitosanos (desacetilación).....	20
7. ANÁLISIS DE MUESTRAS	22
7.1 Determinación de pH y acidez total titulable (ATT)	22
7.2 Análisis microbiológico.....	22
7.3 Análisis Químico Proximal	22
7.3.1 Determinación del contenido de humedad (%H).....	22
7.3.2 Determinación del contenido de cenizas (%C).....	23
7.3.3 Determinación del contenido de grasa (%G)	23
7.3.4 Determinación de nitrógeno total	23
7.3.5 Nitrógeno Proteico (NP)	24
7.3.6 Nitrógeno de Quitina (NQ).....	24
7.3.7 Determinación de nitrógeno por Análisis Elemental (CHN).....	24
7.3.8 Proteína Soluble (Bradford)	24
7.4 Caracterización de quitinas y quitosanos.....	24
7.4.1 Determinación de solubles.....	24
7.4.2 Grado de acetilación	25
7.4.3 Determinación del peso molecular mediante viscosidad intrínseca η	25
7.4.4 Determinación de Peso Molecular (M_w) de quitinas	26
7.5 Obtención de espectros infrarrojo (FTIR).....	26
8. RESULTADOS Y DISCUSIONES	27
Primera etapa.....	27
8.1 Escalamiento de la fermentación ácido láctica a 500 Kg	27
8.1.1 Determinación de pH y ATT en licor y ensilados.....	28

8.1.2 Cuenta total de bacterias lácticas y coliformes.....	31
8.1.3 Determinación de cenizas (%C).....	34
8.1.4 Determinación de proteína durante F1 y F2.	36
Segunda etapa.....	37
8.2 Desproteínización enzimática del desecho de camarón.....	37
8.2.1 Desproteínización enzimática de quitina cruda con Protamex.....	39
8.2.3 Espectros Infrarrojo (FTIR)	42
Tercera etapa	43
8.3 Purificación de quitina cruda por método termoquímico.	43
Pruebas de DM Y DP realizadas en la empresa de Biopolímeros Acuícolas	44
8.3.1 Determinación de contenido de cenizas en DM de F1.	44
8.3.2 Determinación de contenido de proteína en F1	45
8.4 Determinación de contenido de cenizas y proteínas de quitosanos (F1)	46
8.5 Caracterización de quitosanos (F1)	48
8.6 Purificación y caracterización de quitina cruda obtenida de F2.	49
8.7 Caracterización de quitosanos obtenidos de F2	50
CONCLUSIONES	52
10. PERSPECTIVAS Y TRABAJOS A FUTURO	53
11. BIBLIOGRAFÍA	54
Citas electrónicas	59
Anexo 1.....	60
Curva estándar de proteína soluble (Bradford)	60
Anexo 2.....	61
Espectros infrarrojo de proceso enzimático y termoquímico.....	61
Anexo 3.....	63
Espectros de resonancia magnética nuclear de quitosanos.	63

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tiempos de desmineralización (HCl 0.5N).....	16
Tabla 2. Condiciones óptimas para la actividad enzimática propuestas por el fabricante.....	18
Tabla 3. Enzimas y relaciones sustrato:enzima (S:E) probadas en desecho de camarón.	19
Tabla 4. Condiciones en la desproteínización de la quitina cruda.....	20
Tabla 5. Condiciones de desacetilación de la quitina pura (F1).....	21
Tabla 6. Análisis químico proximal de desecho de camarón empleado como materia prima para los lotes de fermentación de 500 Kg.	28
Tabla 7. Análisis químico proximal de las quitinas crudas obtenidas en F1 y F2..	43
Tabla 8. Variación de %C y %P en desproteínización (NaOH 0.4N)	45
Tabla 9. Caracterización de quitosanos obtenidos a 50 y 60% de NaOH.....	49
Tabla 10. Condiciones de refinamiento de quitina y obtención de quitosano.	50
Tabla 11. Caracterización de quitinas obtenidas.	50
Tabla 12. Caracterización de quitosanos obtenidos.	51
Tabla 13. Características de quitinas y quitosanos comerciales.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la quitina.....	3
Figura 2. Estructura del quitosano.....	4
Figura 3. Desacetilación de la quitina para obtención del quitosano.	8
Figura 4. Aplicaciones de quitina y quitosano.	10
Figura 5. Diagrama de bloques del proceso de purificación de quitina cruda.	17
Figura 6. Diagrama de bloques del proceso de desproteización enzimática.....	20
Figura 7. Diagrama de bloques de proceso termoquímico para obtención de quitosano.....	21
Figura 8. Evolución del pH y producción de ácido láctico durante el lote 1 (F1) del escalado a 500 kg.....	29
Figura 9. Evolución del pH y producción de ácido láctico durante el lote 2 (F2) escalado a 500 kg.....	30
Figura 10. Conteo de bacterias lácticas y coliformes determinados durante la F1 (escala 500 Kg).....	32
Figura 11. Control de temperatura durante la fermentación 1.	32
Figura 12. Conteo de bacterias lácticas y coliformes determinados durante F2 de desechos de camarón.....	33
Figura 13. Porcentaje de cenizas determinado durante F1.	34
Figura 14. Porcentaje de cenizas determinado durante F2.	35
Figura 15. Cambio en el contenido de proteína en el sólido durante la F1 y F2 de desechos de camarón.....	36
Figura 16. Proteína soluble de desecho de camarón determinada durante la desproteización con Protamex.	39
Figura 17. Proteína soluble en quitina cruda con Protamex.	40
Figura 18. Proteína residual en quitina cruda tratada con Protamex en diferentes relaciones S:E.	41

Figura 19. Porcentaje de solubilidad de quitinas crudas desprotenizadas enzimáticamente.....	41
Figura 20. Espectro infrarrojo de absorción de quitina cruda.	42
Figura 21. Espectro infrarrojo comparativo entre: (a) Quitina cruda, (b) Quitina pura y (c) Quitina desproteínizada con Protamex relación S:E 1000.....	43
Figura 22. Porcentaje de cenizas determinadas durante la desmineralización con HCl 0.5 N a temperatura ambiente.	44
Figura 23. Porcentaje de cenizas en quitosanos obtenidos a diferentes concentraciones de NaOH.	46
Figura 24. Porcentaje de proteína residual en quitosanos obtenidos a diferentes concentraciones de NaOH.	47
Figura 25. Porcentaje de solubilidad en quitosanos obtenidos a diferentes concentraciones de NaOH.	48

RESUMEN

El proceso de desproteínización enzimática del desecho de camarón y quitina cruda, es un método económicamente atractivo, ya que evita altos gastos de energía, agua y reactivos. En conjunto con la fermentación ácido láctica se tiene un tratamiento enzimático para la purificación total de la quitina, evitando que sufran daños en su estructura molecular debido a el proceso termoquímico.

En el presente trabajo se evaluaron proteasas comerciales como Alcalasa, Neutrasa y Protamex (de Novozym) en la desproteínización de desechos de camarón, y en quitina cruda. Esta última obtenida mediante un proceso de fermentación con bacterias lácticas.

Para este propósito se incubaron las diferentes enzimas con desecho de camarón seco y molido, aplicando las condiciones óptimas de temperatura y pH recomendadas por el fabricante. Protamex fue la enzima que arrojó los resultados más altos de desproteínización (relación substrato: enzima (S:E) 0.2, 40°C, pH 6, 180 rpm), alcanzando un valor de 6.63 mg/g de proteína soluble a las 3 h del tratamiento. Posteriormente se evaluó el efecto de la relación S:E en la desproteínización de quitina cruda. Se obtuvieron porcentajes de desproteínización (DP) de 87%, 89% y 82% con S:E 1, 100 y 1000, respectivamente, utilizando las mismas condiciones de tratamiento.

Por otra parte, se analizaron los productos obtenidos del escalamiento del proceso de fermentación realizado en la empresa de Biopolímeros Acuícolas S.A de C.V. (Guasave Sinaloa). Estas fermentaciones fueron realizadas a escalas de 500 Kg, aplicando condiciones ya establecidas: 5% (v/p) inóculo de *Lactobacillus sp* (B2), 10% (p/p) de azúcar de caña y 30°C en el desecho de camarón, obteniendo hasta un porcentaje de desmineralización de 74.85% y de desproteínización de 78.2%. Se llevó a cabo la purificación y desacetilación de las quitinas crudas mediante método heterogéneo termoquímico para la obtención y caracterización de quitosano.

ABSTRACT

The chitin preparation was carried out with a previous treatment of the shrimp waste with lactic acid bacteria and followed by enzymatic deproteinization in order to complete fully biological purification. This process is an alternative to chemical treatments and can obtain products that are not damaged in its molecular structure due to the thermochemical process.

In the present study were evaluated commercial proteases (Alcalase, and Protamex Neutrase of Novozym) according to their degree of deproteinization (DP) on shrimp wastes or raw chitins.

For this purpose, the enzymes were incubated with shrimp wastes, previously dried and ground, following optimal conditions of temperature and pH recommended by the manufacturer. Protamex was the enzyme that deproteinized the most at a ratio of substrate: Enzyme (S:E) of 0.2 at 40 ° C and pH 6 under stirring at 180 rpm. At this condition, 6.63 mg/g of soluble protein at 3 h of treatment was achieved. Subsequently, several S:E ratios were evaluated at the previous condition established. The DPs were 87%, 89% and 82% of deproteinization with S:E 1, 100 and 1000 respectively with raw chitin.

On the other hand, the products obtained during the scaling up of the fermentation process carried out in the company Biopolímeros Acuícolas S.A de C.V (Guasave Sinaloa) were analyzed. The fermentation process was performed using the established conditions (5% (v/w) inoculum of *Lactobacillus sp (B2)*, 10% (w/w) sugar cane and 30 ° C). The degrees of demineralization (DM) and deproteinization (DP) achieved were 74.85% of demineralization and deproteinization and 78.2%. The purification and deacetylation of raw chitins obtained with scaling up were carried out by heterogeneous thermo-chemical methods for the preparation of chitosan.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 Biopolímeros

El advenimiento de la biotecnología moderna ha transformado radicalmente la opinión de los científicos acerca de los organismos y de los materiales que producen, mediante el aprovechamiento de las enzimas en la naturaleza o de materia prima marina y agrícola para la transformación de una nueva clase de materiales biodegradables, biocompatibles y renovables.

Con los avances en química y ciencias de materiales, una amplia gama de polímeros sintéticos se han producido en los últimos siglos desempeñando un papel central en la naturaleza y en la economía de la industria moderna. Sin embargo la creciente dependencia a polímeros sintéticos ha causado una serie de preocupaciones hacia el medio ambiente y la salud humana, gracias a que la mayoría de los materiales plásticos no son biodegradables y son derivados de recursos no renovables, dadas sus propiedades de durabilidad y resistencia hacen que estos materiales aseguren su existencia en el medio ambiente y compliquen su eliminación.

Estos problemas han centrado cada vez más atención en polímeros que se derivan a partir de precursores biológicos conocidos como biopolímeros los cuales pueden ofrecer beneficios al medio ambiente gracias a su amplia variedad de aplicaciones como adhesivos, materiales absorbentes, lubricantes, cosméticos, textiles, materiales estructurales, etc.

Los biopolímeros se dividen en dos categorías principales: polímeros que son producidos por sistemas biológicos como microorganismos, plantas y animales, y los polímeros que son sintetizados químicamente pero se derivan de materiales biológicos como aminoácidos, azúcares, grasas naturales o aceites (U.S. Congress, 1993; Pacheco, 2007).

2.1.1 Quitina y quitosano

La quitina fue aislada por primera vez por Braconnot en 1811, a partir de hongos superiores, y por su origen se denominó fungina. El nombre quitina del griego *xitwuy*, que significa cubierta se debe a Odier, que en 1923 la aisló a partir de escarabajos en soluciones alcalinas. Compuesto insoluble en la mayoría de los solventes comunes. La quitina y su derivado principal, el quitosano, son biopolímeros con una gran diversidad de aplicaciones en los diversos campos de la actividad humana. La quitina se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, tanto en el reino animal como en el vegetal, siendo el segundo biopolímero más abundante después de la celulosa, por lo que constituye un importante recurso renovable. La quitina se encuentra presente en artrópodos, insectos, arácnidos, moluscos, hongos y algas entre otros organismos. En los animales aparece asociada a otros constituyentes, tales como lípidos, pigmentos, carbonato de calcio y proteínas (Peniche, 2006).

2.1.2 Estructura de la quitina

La quitina (*N-acetilglucosamina*) es un homopolímero que está compuesto por residuos de *N-acetil-D-glucosamida* (GlcNAc), unidos por enlaces β -(1, 4) (Figura 1) (Chuan, 2006). Es un polisacárido cristalino que cuenta con tres diferentes formas cristalográficas: α -, β - y γ -quitinas. La α -quitina es la isoforma más abundante, se encuentra compactada dando una estructura cristalina donde sus cadenas se encuentran antiparalelas, favoreciendo los enlaces de hidrogeno. La β -quitina tiene un arreglo paralelo con una fuerza intermolecular más débil, dando una molécula menos estable de quitina y la γ -quitina es una mezcla de las dos anteriores (Ramírez y col., 2006). Comparando la abundancia natural de las formas polifórmicas, encontramos que la α -quitina es la más abundante y estable, mientras que las otras dos se presentan en pequeñas proporciones y tienden a ser transformadas en α -quitina (Hirano, 1999).

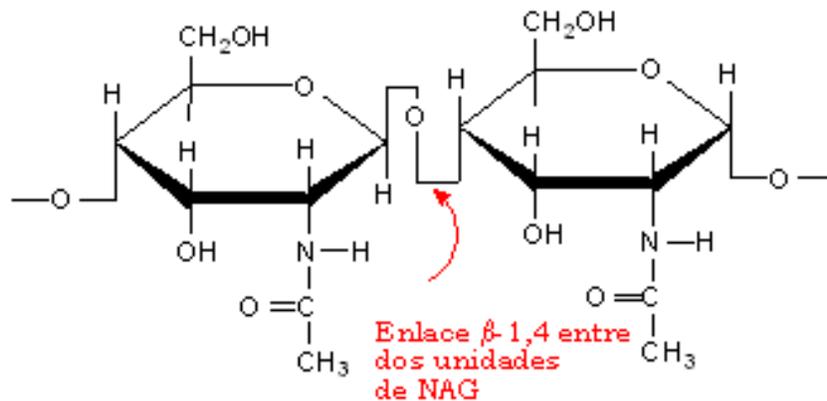


Figura 1. Estructura de la quitina.

Debido a que la quitina cuenta con un alto grado de cristalinidad es insoluble en soluciones acuosas y solventes orgánicos (Tsigos y col.).

2.1.3 Obtención de quitina

El esqueleto de camarón y cangrejo son las principales fuentes para la producción de la quitina a nivel comercial asociada con proteínas, minerales, lípidos y pigmentos, estos tienen que ser removidos para alcanzar un alto grado de pureza para diferentes aplicaciones biológicas necesarias (Percot y col., 2003; Pastor, 2004). Diversos procesos de obtención de quitina se han empleado, destacando los métodos químicos y los biológicos. Dentro de los biológicos, el ensilado, se define como un proceso de conservación en el cual los ácidos adicionados o producidos inhiben el crecimiento de patógenos, presenta ciertas ventajas respecto a los otros, como el permitir la recuperación de productos con valor agregado. Dos tipos de ensilado son los más frecuentes: el ensilado químico, que se basa en la adición de ácidos inorgánicos u orgánicos y posteriormente es neutralizado y el ensilado obtenido por fermentación láctica, en el que el ácido es producido in situ por la fermentación bacteriana de una fuente de hidratos de carbono, y en donde los microorganismos responsables pueden provenir de la microflora natural del desecho o de cultivos iniciadores (Shirai y col., 2001; Cira y col., 2002).

2.1.4 Estructura del quitosano

El quitosano es un polímero policatiónico formado por más de 5000 unidades de glucosamina (2-amido-2desoxi-beta-D-glucosa) unidas por enlaces glicosídicos β -(1, 4) (Figura 2) y se obtiene comercialmente del polímero de la quitina, que se encuentra en la cutícula y exoesqueleto del camarón, entre otras especies, por medio de una desacetilación alcalina (NaOH, 40-60%) (Lárez, 2006; Rabea y col., 2003), tras sustituir los grupos acetamido por grupos amino. La carga positiva que inducen los grupos amino da al quitosano la capacidad de atrapar sustancias como macromoléculas, proteínas, lípidos, metales, etc., cargados negativamente, esta propiedad junto con las anteriores hace que el quitosano tenga un gran potencial para diferentes usos. La estructura molecular del quitosano posibilita también que actúe como liberador de sustancias de una manera controlada, pudiéndose utilizar para incluir aditivos o ingredientes funcionales en los recubrimientos y films.

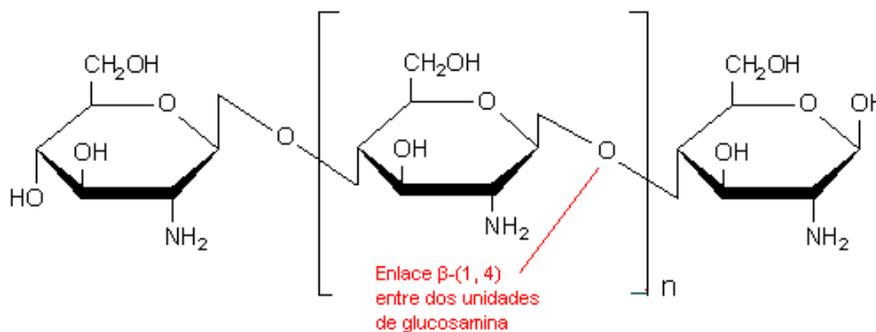


Figura 2. Estructura del quitosano.

El quitosano es insoluble en muchos solventes, pero es soluble en ácidos orgánicos como ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico y ácido málico. El uso del quitosano se ha visto limitado por ser insoluble en agua por su alta viscosidad y por su tendencia a coagular con proteínas a valores de pH altos, se han llevado a cabo modificaciones químicas teniendo como resultado muchos efectos que incrementan su solubilidad en agua (Rabea y col., 2003).

2.2 Obtención de la quitina

La quitina se obtiene al realizar procesos sucesivos de desproteización en medio alcalino y de desmineralización en medio ácido, lavando posteriormente hasta alcanzar pH neutro, sometiendo finalmente el producto a caracterizaciones que definirán sus propiedades (Pastor, 2004; Aye y Stevens, 2004). Dado a que dicho método es poco amigable con el medio ambiente, se ha llevado a cabo el estudio de diferentes procesos alternativos como los procesos enzimáticos de desproteización y la fermentación ácido láctica (Cira y col., 2002; Synowiecki y col., 2003; Rao y Stevens, 2005;).

2.2.1 Fermentación ácido láctica

La fermentación ácido láctica ofrece atractivas ventajas tales como bajos costos de inversión, dar un uso integral a los desechos ya que se pueden separar productos de alto valor comercial. Este proceso combinado con el tratamiento termoquímico es un método para la purificación de la quitina, reduciendo así la cantidad de ácidos y bases requeridas en el tratamiento termoquímico, conocido como proceso biológico-químico (B-Q), lo cual ayuda a la desmineralización y desproteización. La fermentación se realiza en un reactor tipo columna con temperatura controlada y agitación ocasional, usando una bacteria láctica, dando como resultado una fracción sólida conteniendo la quitina cruda y una fracción líquida (licor) rica en proteína natural de camarón, minerales y pigmentos, obteniendo así quitina cruda (Cira y col. 2002). En este proceso con microorganismos, las proteasas de los mismos provocan la hidrólisis de las proteínas (desproteización) y la producción de ácido láctico de los microorganismos durante la fermentación, este contribuye a la desmineralización, principalmente la hidrólisis parcial del CaCO_3 , dependiendo de la cantidad de fuente de carbono y de la concentración de inóculo, aumentando así la estabilidad del desecho de camarón.

La especie *Lactobacillus*, es aero-tolerante y crece relativamente mejor sin agitación. En el caso de la fermentación de camarón se requiere un bajo volumen

de desecho ya que hay una alta producción de CO₂ y podría derramar (Shrinivas y col., 2005; Sini y col., 2007).

2.2.2 Extracción del pigmento

La coloración de los caparazones de crustáceos se debe fundamentalmente a la presencia de pigmentos tales como astaxantina, cantaxantina, astaceno, luteína y el β-caroteno, suelen extraerse con cloroformo, éter, acetato de etilo, etanol o mezcla de solventes. Principalmente la astaxantina se extrae con acetona grado industrial, relación de (1:15) p/v, durante una hora con agitación constante, a temperatura ambiente, evitando la luz directa, ya que esta provoca su degradación (Gimeno y col., 2007; Peniche, 2006).

2.2.3 Desmineralización (DM) química de la quitina

La desmineralización se realiza ya que el principal componente orgánico de los caparazones de los crustáceos es el CaCO₃ el cual se suele eliminar empleando soluciones diluidas de HCl (hasta 10%) a temperatura ambiente (Peniche, 2006), también se han utilizado otros ácidos como: HNO₃, H₂SO₃, CH₃COOH, H₂SO₄, entre otros, a temperatura ambiente a una concentración que varía desde 0.275 a 2M, en un tiempo de 1 a 48 h y a una temperatura de 0 a 100 °C, según la aplicación que tenga la quitina (Cira y col. 2002). La concentración del ácido y el tiempo de tratamiento dependen de la fuente de donde provenga el ensilado, pero deben de evitarse los tratamientos a temperaturas muy altas, que provocan la degradación del polímero (Lárez, 2006).

2.2.4 Desproteínización (DP) química de la quitina

La desproteínización de la quitina se realiza utilizando una solución acuosa diluida de NaOH (1M), a temperaturas desde 25 a los 100°C, con el fin de disolver la proteína. El tiempo del tratamiento puede variar desde 30min a 72 h (Percot y col, 2003; Peniche, 2006). Existen otros agentes que se han utilizado para la extracción del polímero como: Na₂CO₃, NaHCO₃, Na₂SO₃, Na₂S, entre otros. Hay que tener en cuenta que tratamientos por largo tiempo o a temperaturas muy altas

pueden provocar las rupturas de las cadenas y la desacetilación parcial del polímero (Peniche, 2006; Lárez, 2006).

2.3 Desproteínización enzimática

Desde la antigüedad las enzimas se han utilizado en la elaboración de quesos, cerveza y curtido de cuero, el tratamiento de materias primas como peces, crustáceos y algas. Las enzimas exógenas se han utilizado en menor medida que las enzimas endógenas. También se ha utilizado el efecto de sus propias enzimas en el tradicional proceso de fermentación algunos productos de pescado obtenidos por este proceso son de gran tradición en el Sur-Este de Asia, donde las enzimas digestivas activas hidrolizan rápidamente la mayor parte de la proteína donde se obtiene una solución acuosa rica en proteínas para la alimentación y elaboración de productos.

En las últimas décadas se han utilizado gran variedad de enzimas para acelerar diversos procesos (Gildberg, 1993; García-Carreño, 1991). Siendo este un procedimiento alternativo, es la desproteínización enzimática de la quitina cruda obtenida al término de la fermentación ácido láctica, la cual podría usarse potencialmente para hidrolizar la proteína residual presente, utilizando enzimas comerciales (proteasas) (Kafetzopoulos y col. 1993). Las proteasas (Proteinasas, Peptidasas o enzimas Proteolíticas) son enzimas que descomponen los enlaces péptidos que se encuentran entre las proteínas, llamado corte proteolítico.

2.4 Obtención de quitosano: desacetilación

La desacetilación de la quitina se lleva a cabo por hidrólisis de los grupos acetamida (en el C-2) en medio fuertemente alcalino (soluciones concentradas de NaOH o KOH del 40 al 65%) a diferentes temperaturas (Figura 3) (Peniche, 2006; Lárez 2006).

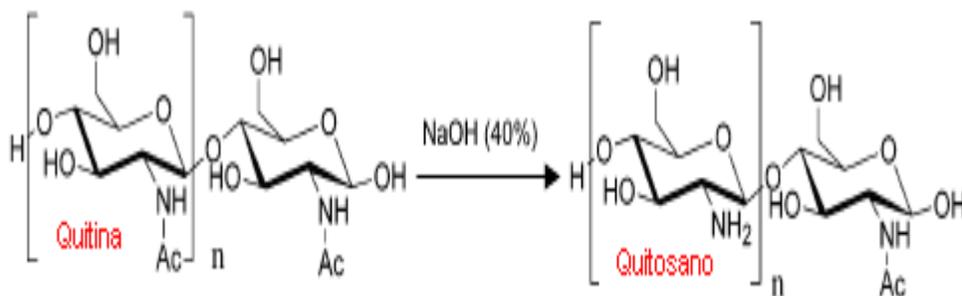


Figura 3. Desacetilación de la quitina para obtención del quitosano.

Debido a que las características del quitosano dependen en gran medida a la fuente del desecho y método de obtención, es importante conocer los diferentes métodos existentes (desacetilación homogénea y heterogénea) y las variaciones que estos producen. La desacetilación homogénea del quitosano se lleva a cabo a bajas temperaturas o a temperatura ambiente, durante largos periodos de tiempo, con lo que se asegura la uniformidad de la reacción, alcanzando valores de acetilación menores. La desacetilación heterogénea es aquella en la que se utilizan altas temperaturas (100 a 140°C) las cuales favorecen la velocidad de la reacción, sin embargo la desacetilación sucede con mayor rapidez en las regiones amorfas del biopolímero, que en las áreas cristalinas, lo que impide una mayor desacetilación, arrojando quitosanos desacetilados heterogéneamente (Nemtsev y col., 2002).

2.5 Propiedades, características y aplicaciones de quitina y quitosano.

El quitosano y la quitina son compuestos comercialmente muy interesantes ya que tienen un contenido alto de nitrógeno (6.89%) en comparación con la celulosa (1.25%). Esto hace que el quitosano sea útil como agente quelante. El uso de los polímeros naturales como celulosa, dextrosa, quitina, quitosano, etc., se ha ido incrementado gracias a que son biocompatibles, biodegradables y no tóxicos en comparación con los materiales sintéticos ya que estos tienen más limitado su uso, pueden ser química o enzimáticamente modificados. Debido a que el quitosano posee grupos aminos reactivos, presenta actividad antimicrobiana, es insoluble en

agua, solventes inorgánicos y medios alcalinos, pero es soluble en ácidos inorgánicos diluidos como: ácido acético, fórmico, succínico, láctico y málico, cuando el ácido se encuentra debajo del pH 6 (Rabea y col. 2003). Las características del quitosano son muy variadas según su aplicación, las más particulares son el grado de acetilación y el peso molecular, comparado con la quitina. La viscosidad de las soluciones que contienen quitosano varía según el grado de acetilación, el peso molecular, la concentración, la fuerza iónica, el pH y la temperatura (Tsigos, y col. 2000). Una de las principales propiedades del quitosano es su acción antimicrobiana frente a diversos microorganismos. El mecanismo exacto de la acción antimicrobiana del quitosano y sus derivados es todavía desconocido, si bien se han propuesto diferentes hipótesis. Todas estas teorías están relacionadas con su naturaleza catiónica que le permite reaccionar con moléculas y superficies cargadas negativamente como las paredes celulares microbianas (Gemma, 1996; Pacheco, 2007). Aunque su actividad antimicrobiana depende de diversos factores que pueden limitar su eficacia, los estudios demuestran que se puede considerar un compuesto interesante para su utilización como conservante en alimentos, con un potencial considerable para mejorar la calidad y seguridad de los mismos (Genta y col., 1997).

El uso alimentario del quitosano está permitido en países como Japón, Corea y Estados Unidos, donde el quitosano se encuentra reconocido como sustancia GRAS (*Generally Recognized as Safe*). También en Nueva Zelanda figura en la lista GRAS de compuestos para nutrición oral desde Abril de 2004. En Europa está permitido su uso en el sector de la dietética (como “atrapador” de grasa) y aunque su aplicación como aditivo alimentario está pendiente todavía de aprobación oficial, las perspectivas de futuro para su uso como ingrediente o aditivo alimentario se pueden considerar optimistas (Ahn y col., 1992).

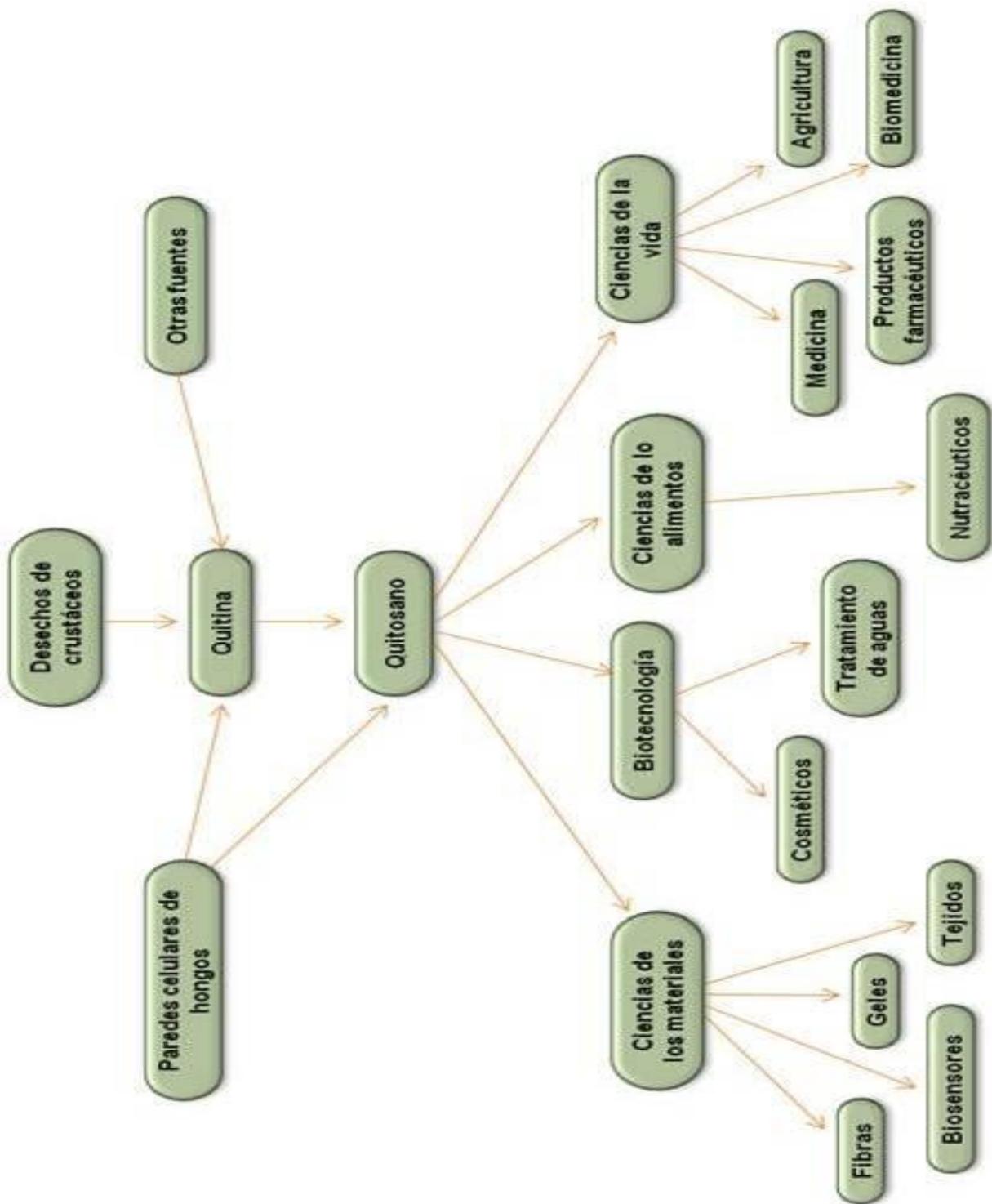


Figura 4. Aplicaciones de quitina y quitosano.

(Tsigos y col., 2000; Lárez, 2006; El Gueddari N., Moerschbacher B. 2003)

3. JUSTIFICACIÓN

La producción de crustáceos es cada vez mayor, sin embargo no se tiene un manejo adecuado para los desechos sólidos que genera esta industria. La quitina y quitosano se obtienen principalmente mediante un método donde se utilizan ácidos y álcalis a altas concentraciones, consumiendo grandes cantidades de energía y agua, este tratamiento no permite la recuperación de otros productos de valor agregado y puede causar la hidrólisis parcial de la quitina. Además la quitina puede contener residuos de proteína que generan alergias en consumidores hipersensibles, motivo por el cual no son aceptados en varios países como ingredientes grado alimenticio ni pueden ser aplicados en el área de la biomedicina.

Por estos motivos se ha propuesto combinar la fermentación ácido láctica seguida de una desproteización con enzimas comerciales para la preparación de la quitina, reduciendo los costos de inversión y supliendo el método químico por un método totalmente biológico.

4. OBJETIVOS

Objetivo General

- Evaluar la desproteínización de desperdicios y quitina cruda de camarón utilizando enzimas comerciales.

Objetivos Particulares

- Establecimiento de condiciones para la obtención de quitinas y quitosanos mediante el método biológico-químico.
- Caracterización de quitinas y quitosanos obtenidos mediante el método biológico-químico.
- Establecimiento de condiciones para la desproteínización de desechos de camarón, mediante el uso de enzimas comerciales.

5. HIPÓTESIS

Las proteasas hidrolizarán la proteína residual de las quitinas obtenidas por la fermentación, evitando el uso de químicos, permitiendo la obtención de quitinas puras, sustituyendo los métodos convencionales.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

La parte experimental de este trabajo se dividió en tres etapas: En la primera etapa se analizaron las muestras sólidas y líquidas obtenidas durante el escalamiento a 500 Kg del proceso de fermentación ácido láctica del desecho de camarón, el cual se realizó en dos lotes (Fermentaciones F1 y F2), conforme a las condiciones determinadas por Cira y col. (2002), en las instalaciones de la empresa Biopolímeros Acuícolas S.A de C.V ubicada en Guasave Sinaloa. y se llevo a cabo la purificación química de la quitina.

En la segunda etapa se realizó una selección de enzimas comerciales (proteasas) para la desproteización del desecho de camarón y de la quitina cruda obtenida al término de la fermentación ácido láctica.

En la tercera etapa se llevo a cabo la purificación de las quitinas crudas obtenidas de F1 y F2, la desacetilación química de las quitinas puras y el análisis químico proximal y caracterización de los productos obtenidos de ambos lotes.

6.1 Desecho de camarón

El desecho consistió en cabezas y exoesqueletos de camarón del género *Litopenaeus spp* obtenido del estado de Sinaloa. Dicho desperdicio fue molido en un molino para carne y almacenado bajo congelación hasta su posterior utilización.

6.2 Microorganismo

El microorganismo utilizado fue una cepa de bacterias ácido lácticas *Lactobacillus sp.* (B2) que fue aislada de desperdicios de camarones tropicales (Shirai y col., 2001). Se inoculó en medio Man, Rogosa and Sharpe (MRS) y se incubaron durante 24 h a 30°C.

6.3 Fermentación ácido láctica (escala laboratorio)

La fermentación ácido láctica fue llevada a cabo en reactores tipo columna con capacidad de 3 Kg, en los cuales se colocó la mezcla de desechos de camarón, 5% (v/p) del inóculo de *Lactobacillus* sp. (B2) y 10% (p/p) azúcar de caña, (mismas condiciones utilizadas en el escalado a 500 Kg). Los reactores se mantuvieron a una temperatura controlada de 30°C durante 120 h (Cira y col., 2002). La fracción sólida en la que se encontró principalmente quitina cruda fue secada y utilizada posteriormente para la desproteínización enzimática.

6.4 Purificación de quitina cruda

6.4.1 Desmineralización química

La desmineralización de quitina cruda fue llevada a cabo en un reactor agitado de acero inoxidable con una solución de HCl (0.4M), a 25 °C, durante 1 h, relación (1:15) (p/v). El producto fue lavado hasta neutralidad con agua corriente y secado a 40 °C durante 24 h para su posterior desproteínización como se muestra en la figura 5 (Cira y col. 2002).

6.4.2 Prueba de desmineralización (F1)

Para F1 se realizó una prueba de desmineralización en las instalaciones de la Planta de Biopolímeros Acuícolas S.A de C.V por el Ing. Jorge Barrera donde se llevo a cabo un enjuague previo con agua caliente (80°C) durante 20 min. Se utilizo una solución de HCl 0.5M para 1 Kg de quitina cruda con agitación constante durante 180 min, tomando muestras cada 30 min como se indica en la tabla 1, determinando él %C en las instalaciones del laboratorio de Biopolímero.

Tabla 1. Tiempos de desmineralización (HCl 0.5N)

No. de muestra	Tiempo de reacción (min)
0	0
1	30
2	60
3	90
4	120
5	150
6	180

6.4.3 Desproteínización química

La desproteínización de la quitina a nivel laboratorio se llevo a cabo en un reactor agitado de acero inoxidable con una solución acuosa de NaOH (0.4M), durante 1h a velocidad baja a temperatura de 25°C con una relación (1:15) (p/v). Una vez concluida la reacción fue lavada con agua corriente hasta neutralidad, secada a 40°C durante 24 h, obteniendo así quitina pura (Cira y col. 2002), la cual fue caracterizada y utilizada en la desacetilación química (Figura 5).

6.4.4 Prueba de desproteínización (F1)

Se realizó una prueba de desproteínización en la Planta de Biopolímeros Acuícolas S.A de C.V., con una solución de NaOH (0.4M) con agitación constante durante 3 h a temperatura ambiente fue enjuagada y secada se determinó la variación de %C y %P

6.4.5 Purificación de quitina (F1 y F2)

La purificación a nivel laboratorio de las quitinas crudas obtenidas de la F1 y F2 se realizo con HCl (0.4M) y NaOH (0.4M) conforme a las condiciones determinadas por Cira y col. (2002) mencionadas en la figura 5, para su posterior desacetilación.

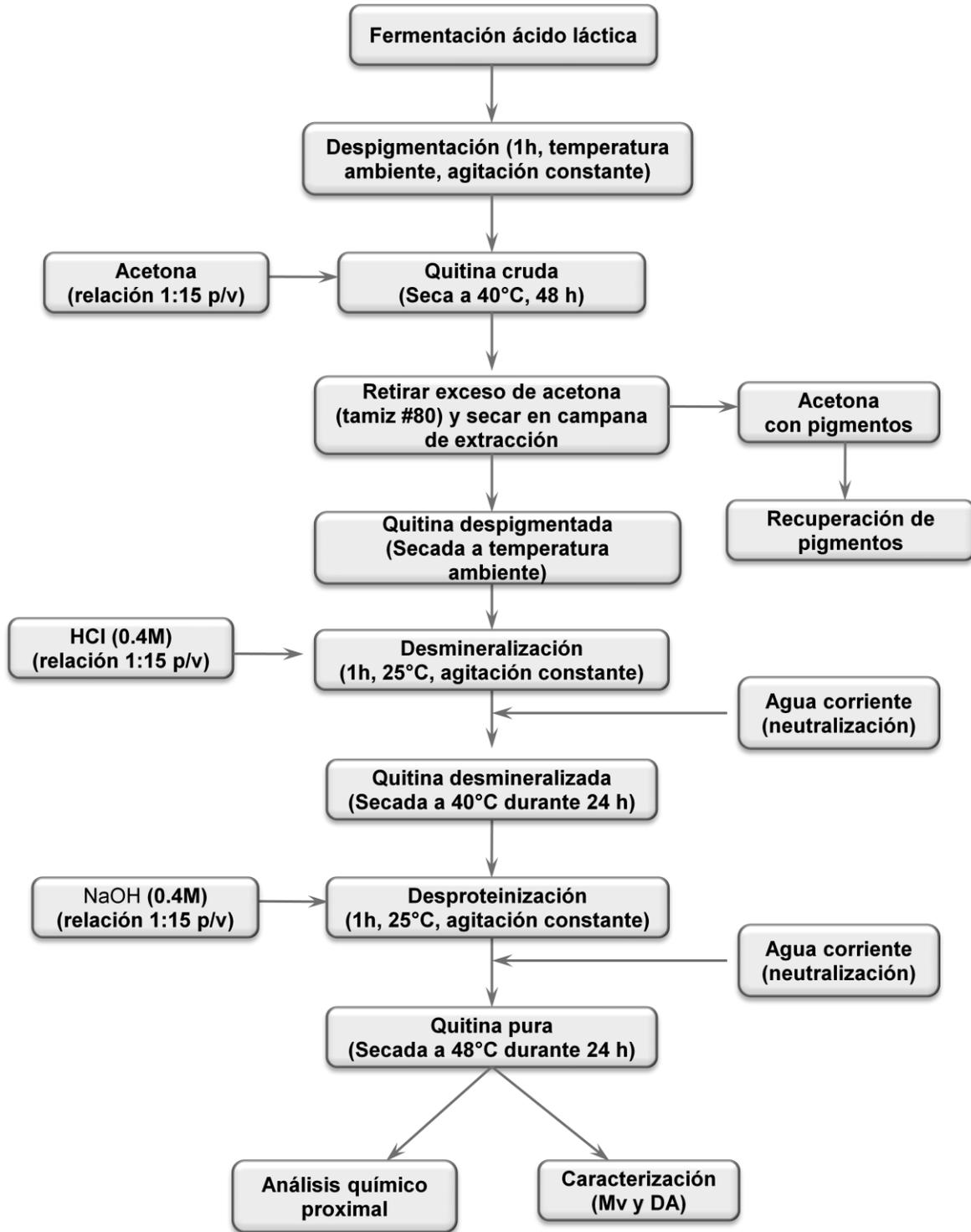


Figura 5. Diagrama de bloques del proceso de purificación de quitina cruda.

6.5 Desproteización enzimática

6.5.1 Enzimas comerciales

Las proteasas comerciales usadas para la hidrólisis de los desechos de camarón y quitina cruda fueron las siguientes:

- Neutrasa (Novozyme): endoproteasa bacteriana producida por cultivo sumergido de una cepa seleccionada de *Bacillus amyloliquefaciens*. Puede ser usada en la mayoría de los casos en que las proteínas tienen que ser degradadas a péptidos. Biocatalizador inmovilizado estable contra autoproteólisis (www.dsm.com).
- Alcalasa® (Novozymes): enzima proteolítica producida por cultivo sumergido de una cepa seleccionada de *Bacillus licheniformis*, El componente principal de la enzima es Subtilisina A (endoproteinasa) (www.dsm.com).
- Protamex™ (Novozymes): es un complejo de proteasas de *Bacillus*, desarrollado para la hidrólisis de las proteínas de alimentos (Kechaou y col., 2009; www.dsm.com).

Para determinar las condiciones de pH y temperatura utilizadas se manejaron los rangos recomendados por el fabricante debido a que con base a estos factores las enzimas pueden ser mejor utilizadas en el proceso, ya que son selectivas y realizan una función catalítica, produciendo cambios específicos en la estructura química del sustrato (Gildberg, 1993).

Tabla 2. Condiciones óptimas para la actividad enzimática propuestas por el fabricante.

Enzima	Origen	AU/g	pH	Temperatura
Alcalasa® Novozymes	<i>Bacillus licheniformis</i>	0.6	6.5 a 8.5	55 a 70°C
Neutrasa Novozymes	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0.8	5.5 a 7.5	45 a 55°C
Protamex™ Novozymes	<i>Bacillus</i>	1.5	5.5 a 7.5	35 a 60°C

(www.novozymes.com; www.dsm.com)

6.5.2 Selección de proteasas comerciales aplicadas a desecho de camarón

Los desechos de camarón se incubaron empleando enzimas comerciales Alcalasa, Neutrasa y Protamex, a diferentes relaciones sustrato:enzima (S:E) (Tabla 3), a temperaturas y pH recomendados por el fabricante (Tabla 2), se determinó proteína soluble por el método de Bradford.

Tabla 3. Enzimas y relaciones sustrato:enzima (S:E) probadas en desecho de camarón.

Enzima	pH	Relación S:E	Temperatura °C
Protamex	6.0, 6.5, 7.5	0.2, 0.33, 0.5, 1, 5	40 y 55
Alcalasa	6.5, 7.5 8.5	0.5	55
Neutrasa	5.5, 6.5, 7.5	0.5	55

La quitina cruda y Protamex fueron pesadas de acuerdo a las diferentes relaciones S:E (Tabla 4) y resuspendidas en un buffer de fosfatos de potasio 50 mM a pH 6, se agitó suavemente en un vórtex y se incubó a una temperatura controlada de 40°C, a 150 rpm durante diferentes períodos de tiempo (20, 60, 120, 180, 240 y 300 min). La enzima fue inactivada por calentamiento ($\geq 90^{\circ}\text{C}$, 3min) antes de ser centrifugada (10,000 rpm, 15 min, 4° C). La fase líquida y sólida fueron separadas para su posterior análisis, obteniendo como productos finales desecho de camarón desproteinizado y quitina cruda desproteinizada (Figura 6) (Gildberg y Stenberg, 2001).

Tabla 4. Condiciones en la desproteínización de la quitina cruda.

Enzima	Condiciones	Relación S:E
Protamex	pH 6.0 Tem. 40°C 180 rpm	0.2, 0.25, 0.33, 0.5

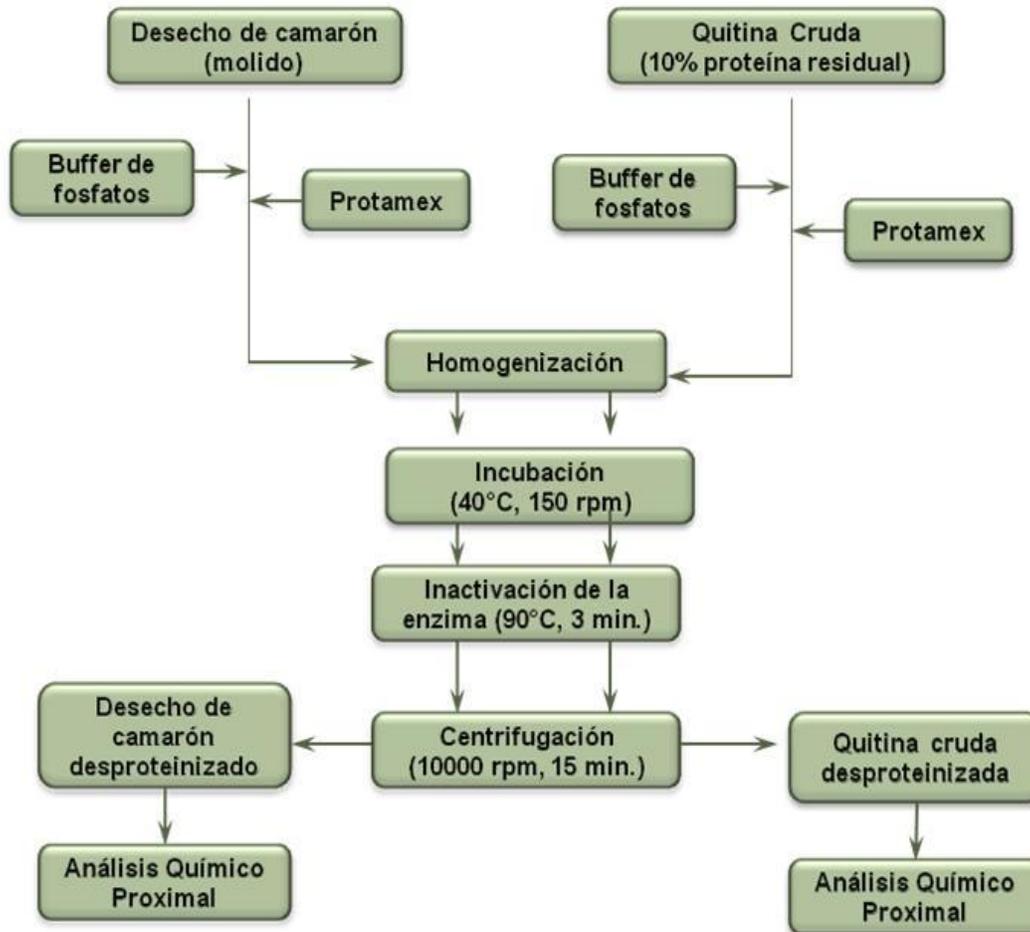


Figura 6. Diagrama de bloques del proceso de desproteínización enzimática.

6.6 Obtención de quitosanos (desacetilación)

La desacetilación de la quitina pura, se llevo a cabo por método heterogéneo en un reactor tipo columna, con soluciones acuosas de NaOH a diferentes concentraciones a 110°C y variando tiempos de reacción, con una relación de (1:15) p/v (Tabla 5). El producto fue enjuagado con agua corriente hasta

neutralidad, secado a 35°C durante 24 h para su análisis y caracterización como se indica en la figura 7.

Tabla 5. Condiciones de desacetilación de la quitina pura (F1).

Concentración % NaOH	Tiempo (h) de reacción
30, 40, 50 y 60	0.5
	1.5
	2
	2.5
	3

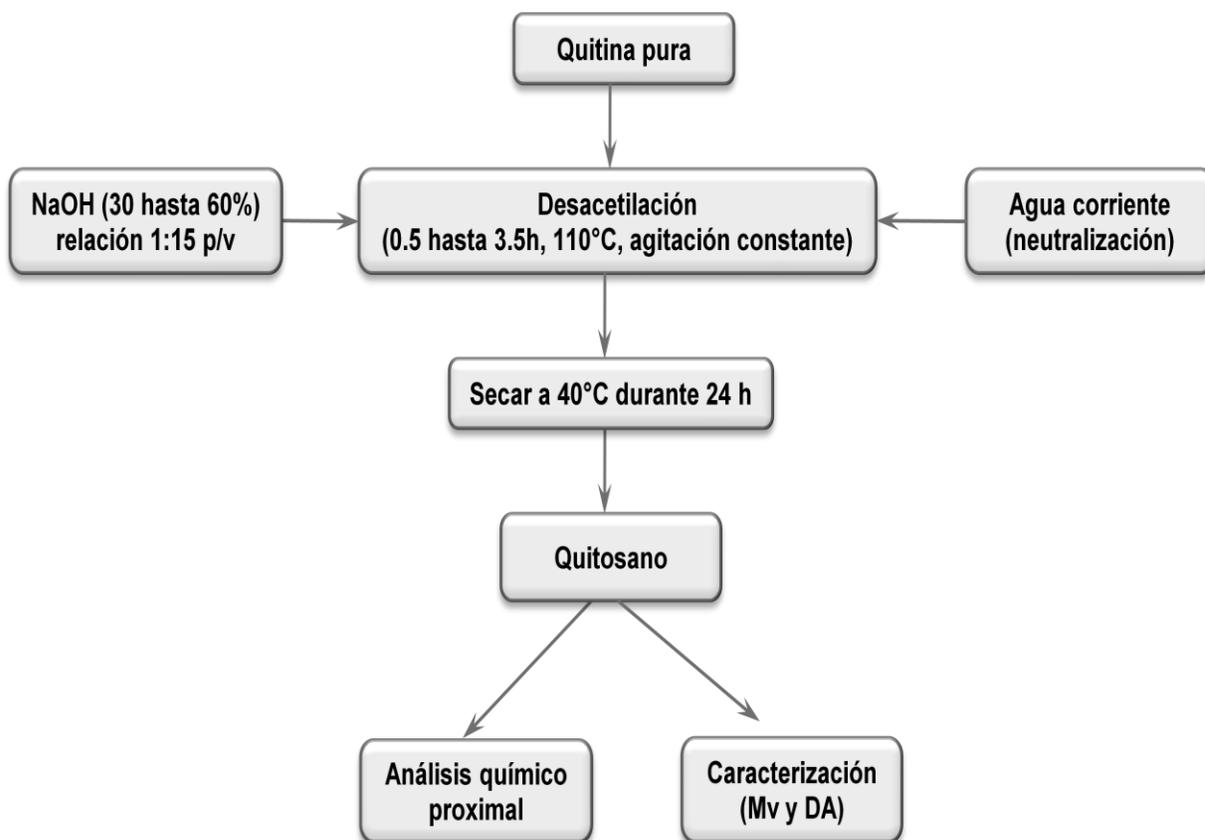


Figura 7. Diagrama de bloques de proceso termoquímico para obtención de quitosano.

7. ANÁLISIS DE MUESTRAS

7.1 Determinación de pH y acidez total titulable (ATT).

El pH se determinó directamente de las muestras sólidas y líquidas de las fermentaciones de escala laboratorio e industrial (500 kg). La ATT fue determinada por titulación potenciométrica, pesando 1g de muestra y diluida (1:10) en agua destilada con agitación magnética constante midiendo el pH inicial y adicionando NaOH 0.1N valorado hasta un pH final de 8. Asumiendo que todo el ácido producido es láctico, entonces 1.0 ml de NaOH es equivalente a 0.009 g de ácido láctico (90 g/mol). La ATT, expresada como porcentaje de ácido láctico fue calculada con la ecuación 1 (Cira y col. 2002):

$$\% ATT = (\text{Volumen del titulante} * 0.009 * N (\text{álcali}) * 10) * 100 \dots \dots (1)$$

7.2 Análisis microbiológico

Se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias lácticas (BAL) y coliformes. Las muestras fueron homogenizadas en solución isotónica 0.09% (p/v) de NaCl, para posteriormente realizar diluciones. El crecimiento microbiano fue determinado por conteo en placa de colonias usando un inóculo de 0.05ml en agar eosina azul de metileno (EMB) para coliformes y agar MRS para bacterias lácticas (BAL) (Anónimo, 1979).

7.3 Análisis Químico Proximal

7.3.1 Determinación del contenido de humedad (%H)

El porcentaje de humedad fue determinado después de secar 2g de muestra en charolas de aluminio durante 24h a 110°C hasta alcanzar peso constante en una estufa con temperatura controlada, calculando el porcentaje por diferencia de pesos con la ecuación 2 (AOAC, 1990).

$$\% H = \left[\frac{(\text{peso charola con muestra sin humedad} - \text{peso charola})}{\text{peso muestra}} * 100 \right] - 100 \dots \dots (2)$$

7.3.2 Determinación del contenido de cenizas (%C)

El porcentaje de cenizas fue determinado después de la combustión de aproximadamente 2g de muestra en crisoles a peso constante, en una mufla a 550°C, durante 4 h (hasta llegar a peso constante), obteniendo así la diferencia de pesos (Ecuación 3) (AOAC, 1990).

$$\% C = \left[\frac{(\text{peso crisol con cenizas} - \text{peso crisol})}{\text{peso muestra}} \right] * 100 \dots \dots (3)$$

7.3.3 Determinación del contenido de grasa (%G)

El porcentaje de grasa se calculo después de la cuantificación de sustancias extraíbles con éter de petróleo por diferencias de pesos con la ecuación 4 (AOAC, 1990).

$$\% G = \left[\frac{(\text{peso vaso con grasa} - \text{peso vaso})}{\text{peso muestra}} \right] * 100 \dots \dots (4)$$

7.3.4 Determinación de nitrógeno total

El nitrógeno total se determino por el método de Kjeldahl, llevando a cabo una combustión en húmedo de la muestra por calentamiento con ácido Sulfúrico concentrado en presencia de catalizadores para reducir el nitrógeno orgánico de la muestra hasta amoniaco, el sulfato de amonio producido se alcaliniza y se destila para desprender el amoniaco que posteriormente es atrapado y titulado (Ecuación 5) (Cira y col., 2002).

$$\text{Nitrógeno total} = \text{Nitrógeno no proteico} + \text{Nitrógeno proteico} \dots \dots (5)$$

7.3.5 Nitrógeno Proteico (NP)

El porcentaje de nitrógeno proteico fue determinado por Kjeldahl calculado restando el nitrógeno de quitina al nitrógeno total y multiplicado por 6.25 (Ecuación 6) (Cira y col., 2002)

$$\% \text{ Proteína residual} = (\text{Nitrógeno total} - \text{Nitrógeno de quitina}) * 6.25 \dots \dots (6)$$

7.3.6 Nitrógeno de Quitina (NQ)

El nitrógeno de quitina fue determinado por el método de Kjeldahl, después de que la muestra fue tratada con ácido y álcali 1N y 5% (p/v), respectivamente durante 1 hora en baño maría (Cira, 2000).

7.3.7 Determinación de nitrógeno por Análisis Elemental (CHN)

Otro método utilizado para la determinación de nitrógeno fue Análisis Elemental en el cual las muestras sólidas fueron secadas y pulverizadas para disminuir su tamaño de partícula y asegurar su homogeneidad. Se analizaron muestras de entre 0.8 y 1.1 mg en un Analizador Elemental Fisons EA1108, determinando el contenido de carbono, hidrógeno y nitrógeno (Cira, 2000).

7.3.8 Proteína Soluble (Bradford)

Se determinó la proteína soluble hidrolizada por enzimas comerciales por el método de Bradford (1976), utilizando una curva estándar de seroalbumina bovina (Anexo 1).

7.4 Caracterización de quitinas y quitosanos

7.4.1 Determinación de solubles

La solubilidad de la quitina se determinó disolviendo 0.02 g de muestra en 25 ml de una solución de (DMAC/LiCl) (5%) p/v a temperatura ambiente, durante 24 h con agitación constante, posteriormente se filtró y se determinó peso seco para obtener el porcentaje de quitina disuelta (Ramírez y col., 2006).

La solubilidad del quitosano se determino disolviendo 0.1 g de muestra en 25 ml de una solución de ácido acético glacial (0.1M) durante 24 h, con agitación constante a temperatura ambiente, determinando por peso seco la cantidad de quitosano soluble (Shrinivas y col., 2005).

7.4.2 Grado de acetilación

La determinación de grado de acetilación (DA) de los quitosanos se determinó por resonancia magnética nuclear de protón (^1H RMN), usando el espectrómetro Bruker CA 300 (Heux y col., 2000; Pacheco y col., 2008). A las quitinas obtenidas se les determinó el DA por medio de relación carbono nitrógeno (C/N) por análisis elemental mediante la ecuación 7 (Kasaai y col., 2000). Por este mismo medio se obtuvieron espectros de quitina pura y quitosano.

$$DA = \frac{C/N - 5.145}{6.861 - 5.145} * 100 \dots \dots (7)$$

7.4.3 Determinación del peso molecular mediante viscosidad intrínseca $[\eta]$

El peso molecular de quitosanos se calculó determinando viscosidad intrínseca, con una solución de ácido acético glacial (2%) y acetato de sodio (0.2M). Los parámetros se determinaron con la ayuda de la ecuación 8 (Mark – Houwink-Sakurada) y las constantes determinadas a y k para el disolvente empleado (Pacheco 2007; Mao y col. 2007; Shrinivas y col. 2005).

$$[\eta] = k \text{PM}^a \dots \dots (8)$$

Donde: $k = 1.38 \times 10^{-5} \frac{\text{L}}{\text{g}}$; $a = 0.85$

7.4.4 Determinación de Peso Molecular (M_w) de quitinas

Se lleva a cabo el mismo procedimiento que con quitosanos pero con las siguientes modificaciones:

- 1.- Se pesan 0.02g de quitina para realizar la solución estándar (0.4 g/L).
- 2.- Como disolvente se utiliza una solución de Dimetilacetoamida (DMAc) conteniendo 5% de cloruro de litio (Pacheco 2007; Mao y col. 2007; Shrinivas y col. 2005).
- 3.- Las constantes utilizadas para este disolvente son:

$$k = 2.4 \times 10^{-4} \frac{\text{L}}{\text{g}}$$

$$a = 0.69$$

7.5 Obtención de espectros infrarrojo (FTIR)

Se obtuvieron espectros infrarrojo de los desechos de camarón, quitinas crudas, quitinas puras y quitinas desproteinizadas enzimáticamente utilizando un espectrofotometro infrarrojo modelo spectrum 100.

8. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Primera etapa

8.1 Escalamiento de la fermentación ácido láctica a 500 Kg

En esta parte de la tesis se presentan los resultados de los análisis a los lotes escalados de la fermentación ácido láctica realizada en la empresa de Biopolímeros Acuícolas S.A de C.V.: F1 y F2.

La conservación de desechos de camarón y de pescado mediante el proceso de fermentación, es un método eficaz que depende de la producción de ácido láctico ya que interviene directamente en el crecimiento de las bacterias competitivas y la inhibición de la microflora indeseable mediante la reducción de los valores de pH. Este proceso permite la recuperación de la quitina y de otros productos de valor agregado como pigmentos y minerales (Shirai, 1999; Rao y col., 2000; Shirai y col., 2001).

Pacheco y col., en el 2009 reportan que las temperaturas entre 30 y 40°C se consideraron las óptimas para la purificación biológica de la quitina y que la mayor recuperación de axtaxantina libre se logra dentro de los 20 y 30°C. Por otra parte Rao y Stevens en el 2005 reportan porcentajes de DM y DP del 52 al 81% utilizando dos cepas de *L. plantarum* adicionando ácido acético al inicio de la fermentación.

Las fermentaciones realizadas en este trabajo se llevaron a cabo con un 5% de inóculo de *Lactobacillus sp (B2)* y un 10% de azúcar de caña como fuente de carbono conforme a los resultados obtenidos en el trabajo realizado por Cira y col en el 2002, donde obtienen un 85% de DM y un 87.6% de DP.

Las quitinas crudas obtenidas de ambos lotes a 500 Kg en la empresa de Biopolímeros Acuícolas fueron químicamente analizadas en el laboratorio de Biopolímeros en la UAM-Iztapalapa., así como también se llevó a cabo la purificación y desacetilación química de las quitinas y su caracterización.

Se realizó un análisis químico proximal de los desechos de camarón utilizados en F1 y F2 mostrando los resultados en la tabla 6. El desecho de camarón para F1 contiene el 33% de materia orgánica de la cual el 15 % corresponde a cenizas, 25% lípidos y 25% proteínas, comparando ambos lotes, F2 tiene menor cantidad de proteína y un 10% más de agua lo que puede repercutir en el proceso fermentativo ocasionando una menor retención del inoculo en el sólido debido al rápido paso a licor.

Tabla 6. Análisis químico proximal de desecho de camarón empleado como materia prima para los lotes de fermentación de 500 Kg.

DESECHO DE CAMARÓN	HUMEDAD (%)	CENIZAS (%)	GRASA (%)	PROTEINA (%)
Fermentación 1	67.29±1.48	15.19±0.75	25.32±0.07	25.90±0.30
Fermentación 2	75.07±1.81	16.19±1.32	25.32±0.07	17.61±0.06

8.1.1 Determinación de pH y ATT en licor y ensilados

Se realizó el análisis de pH y ATT (expresada como ácido láctico) a las muestras tomadas en ambos proceso de fermentación. Los resultados de la variación son mostrados en las figuras 8 y 9. La **F1** inicia con un pH de 7.04 el cual disminuyo constantemente durante el transcurso de la fermentación hasta llegar a un pH de 4.8 a las 140h. La **F2** tuvo un pH inicial de 7.02 el cual se comporta de manera similar llegando a un pH de 5.19 a las 120 h.

Estos comportamientos son similares a los reportados por Cira en el 2000, donde menciona que este efecto es debido a un proceso de inhibición por producto, en donde los iones hidrógeno formados por la ionización del ácido láctico provocan un descenso del pH, inhibiendo a los microorganismos

fermentativos provocando que la acidificación sea detenida más sin embargo, una producción ligera de ácido continua, de tal forma que los compuestos básicos (amonio, aminas, etc.) formados continuamente en el ensilado interactúen con los iones hidrógeno manteniendo el pH constante.

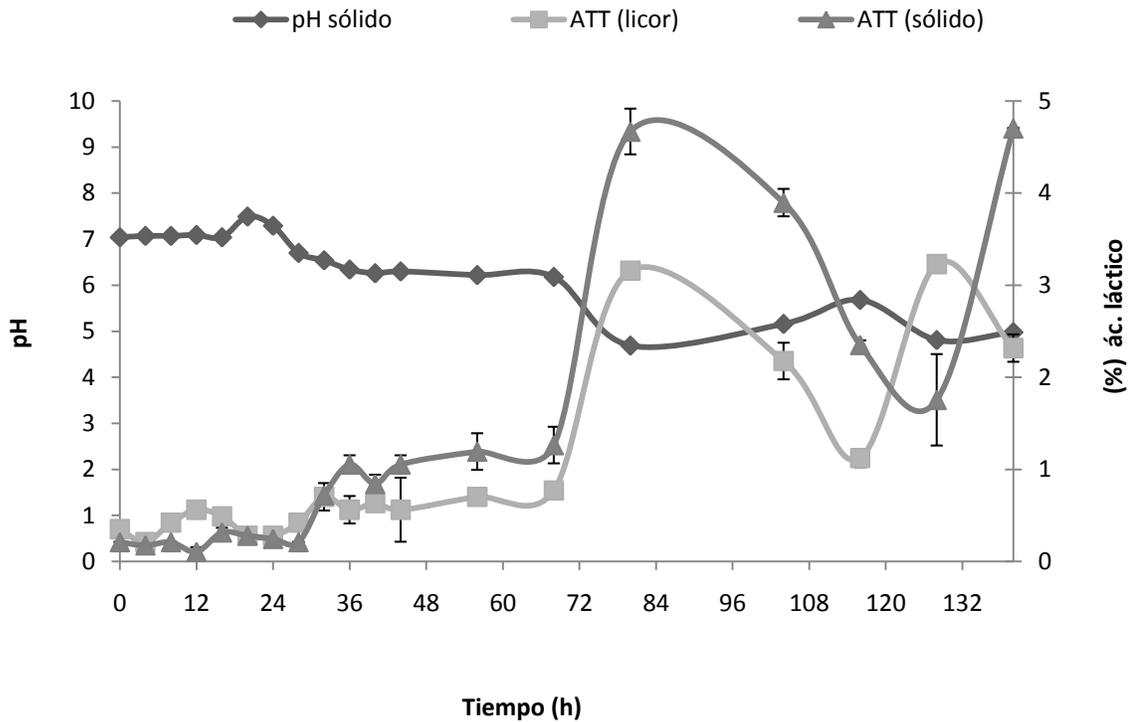


Figura 8. Evolución del pH y producción de ácido láctico durante el lote 1 (F1) del escalado a 500 kg.

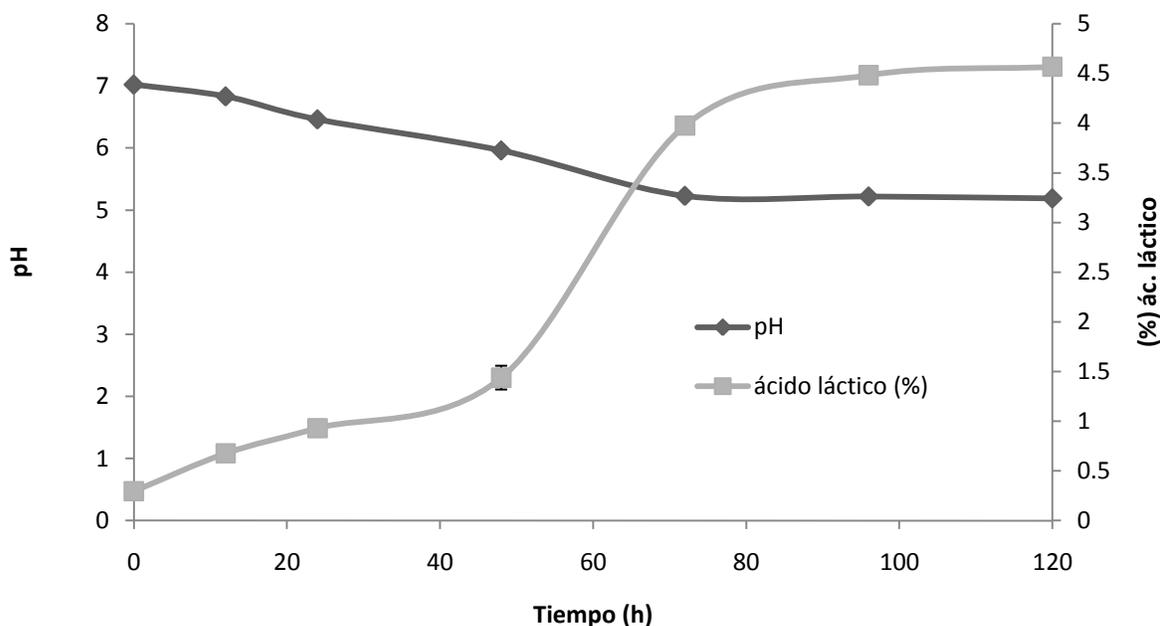


Figura 9. Evolución del pH y producción de ácido láctico durante el lote 2 (F2) escalado a 500 kg.

Las mayores acidificaciones en el sólido de la **F1** fueron de 4.6% de ácido láctico, alcanzada alrededor de las 80 h disminuyendo gradualmente y a las 140 se logró un 4.7% de ácido láctico (Figura 8). Para la **F2** el porcentaje de ácido láctico aumento 1.43% a las 48 h y hasta 4.56% a partir de las 72 h. Las concentraciones altas de ácido láctico pueden explicarse a la capacidad amortiguadora del sustrato, por su riqueza en proteínas y minerales, reflejando que se necesitan grandes cantidades de ácido para lograr disminuir el pH (Cira, 2000). Se observa una ligera diferencia entre las fermentaciones obteniendo un pH menor y una mayor producción de ácido láctico en **F1** en comparación a los datos obtenidos en **F2**. Al reaccionar el carbonato de calcio con el ácido producido provoca la solubilidad del mineral durante la fermentación esto trae consigo la disminución del pH (Xu y col., 2008), lo que nos indica que se está llevando en ambos procesos la desmineralización del desecho de camarón. Cira y col., (2002) reportan que con un inóculo al 5% (v/p) de *Lactobacillus* sp B2 y una temperatura de 30°C, logra los más altos porcentajes de DM y DP. Jung y col., (2005) reportan que incrementando el nivel de inóculo decrece a 4.6 el pH.

8.1.2 Cuenta total de bacterias lácticas y coliformes.

Los recuentos microbianos de ambas fermentaciones, se determinaron en placa a partir de las muestras sólidas. En la figura 10 se muestra la cuenta total de bacterias lácticas de **F1**, a las 24 h disminuyeron en tres unidades debido a que hubo problemas con el control de temperatura la cual no alcanzo los 25°C durante el primer día (Figura 11), esto debido a que el crecimiento esta en función de la temperatura, pH y actividad de agua, variando las condiciones según la especie y fuente de carbono. Se ha reportado que la temperatura óptima de *Lactobacillus sp. (B2)* se encuentra entre 30 y 40°C (Adamberg y col., 2003; Messens y col., 2003; Cayré y col., 2003; Membre y col., 2005). Posteriormente se logró aumentar la temperatura del reactor a 30°C, sin embargo el crecimiento de las BAL se mantuvo entre 7 y 8 unidades logarítmicas de UFC, desde las 30h hasta el final del proceso, por tal motivo no llegó a pH 4, donde se reporta que hay mayor porcentaje de desmineralización (Shirai y col., 2000).

Por otro lado las coliformes se mantuvieron constantes debido a que la temperatura inicial fue muy baja (<15°C) evitando el desarrollo de estas bacterias que a una temperatura mayor a 40°C tienen un mayor crecimiento y son mas competitivas ya que se detectan signos de putrefacción de acuerdo a Pacheco y col., (2009).

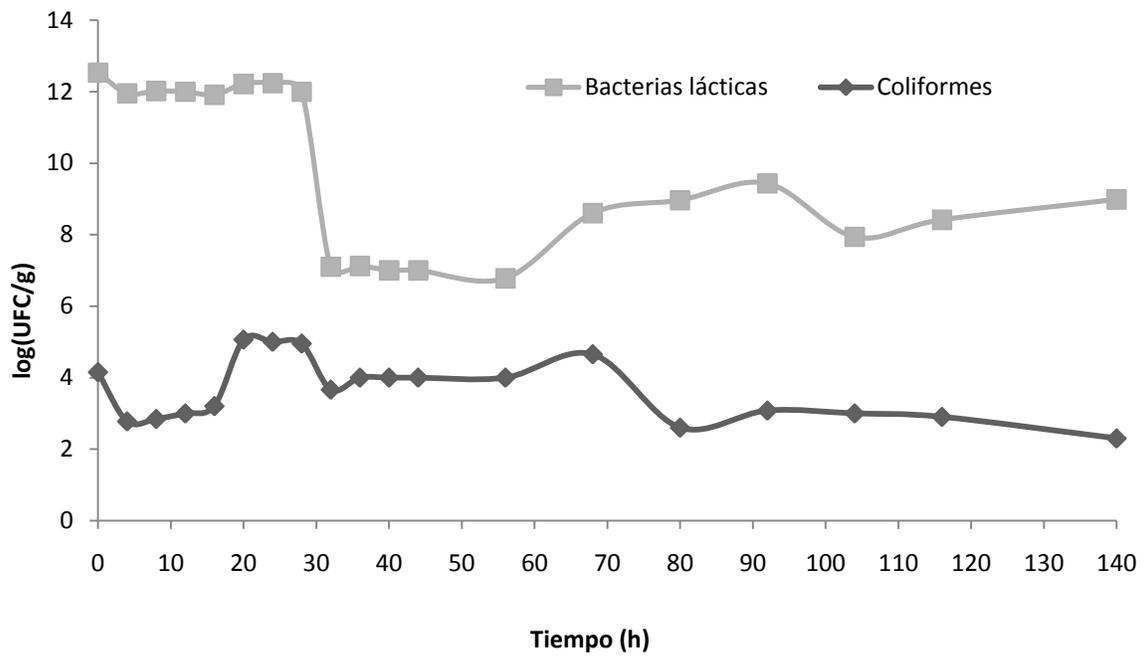


Figura 10. Conteo de bacterias lácticas y coliformes determinados durante la F1 (escala 500 Kg).

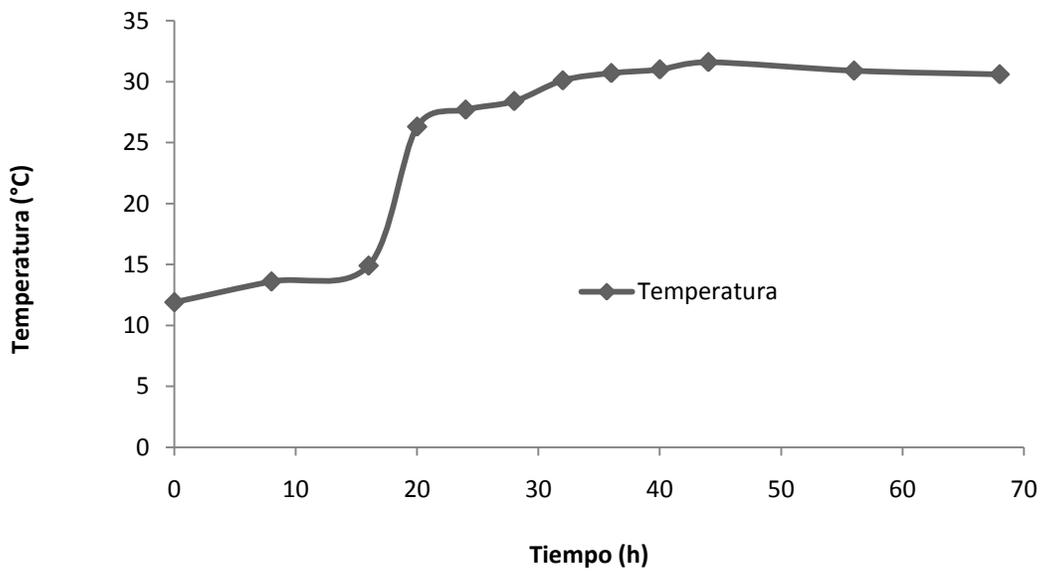


Figura 11. Control de temperatura durante la fermentación 1.

La cantidad de bacterias lácticas reportadas en **F2** (8 y 9 UFC/g) fue menor por 4 unidades, desde el inicio del proceso en comparación con **F1** (12.5 UFC/g), manteniéndose en ese rango hasta las 120 h, este podría ser un motivo del porque la cantidad de ácido láctico producido fue menor. Por otro lado las coliformes descendieron a lo mínimo entre las 48 y 72h ya que las BAL fueron las dominantes, como se muestra en la figura 12. Durante las primeras horas de la fermentación la mayor parte del azúcar es solubilizada y arrastrada hacia la fracción líquida, lo cual puede ser considerado como una limitante para el crecimiento óptimo de las bacterias, tomando en cuenta que el desecho tiene porcentajes altos de agua (Zakaria y col., 1998).

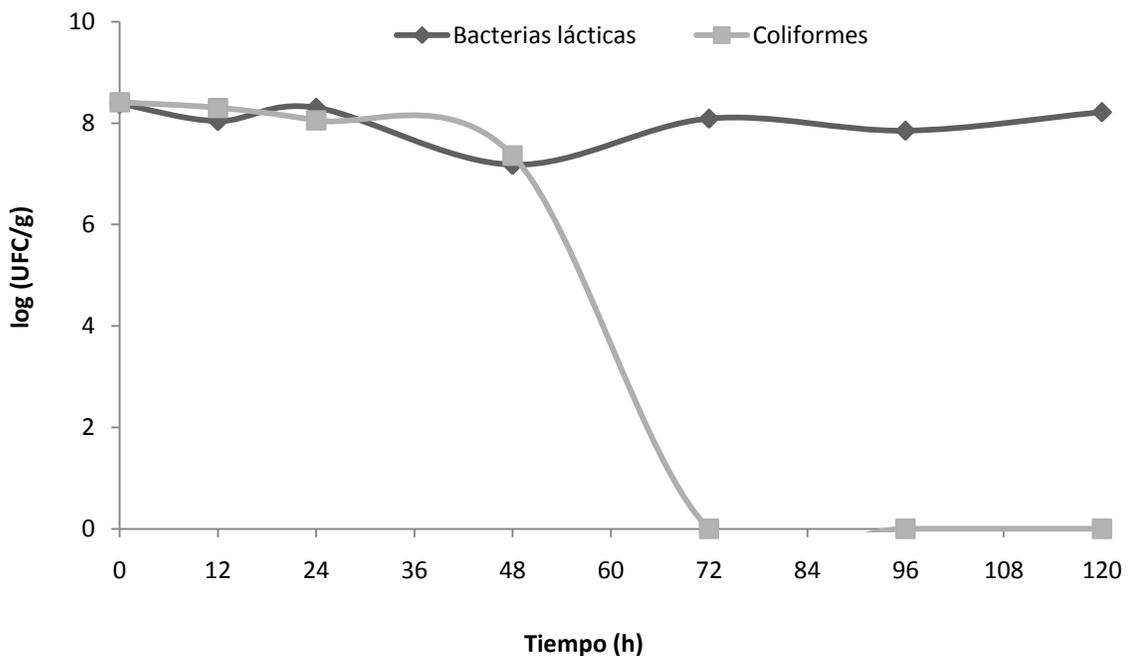


Figura 12. Conteo de bacterias lácticas y coliformes determinados durante F2 de desechos de camarón.

8.1.3 Determinación de cenizas (%C)

La determinación de cenizas en las muestras de **F1** muestran una disminución considerable a partir de las 72 h manteniéndose en alrededor de 3.8% hasta el final del proceso con un porcentaje de DM de 74.8% (Figura 13), lo cual confirma que durante la fermentación se llevo a cabo la solubilidad del carbonato de calcio. Esto provocado por una reacción que existe entre el carbonato de calcio y el ácido láctico, formando lactato de calcio, que precipita y puede ser removido por lavados (Rao y col., 2000; Shrinivas y col., 2005).

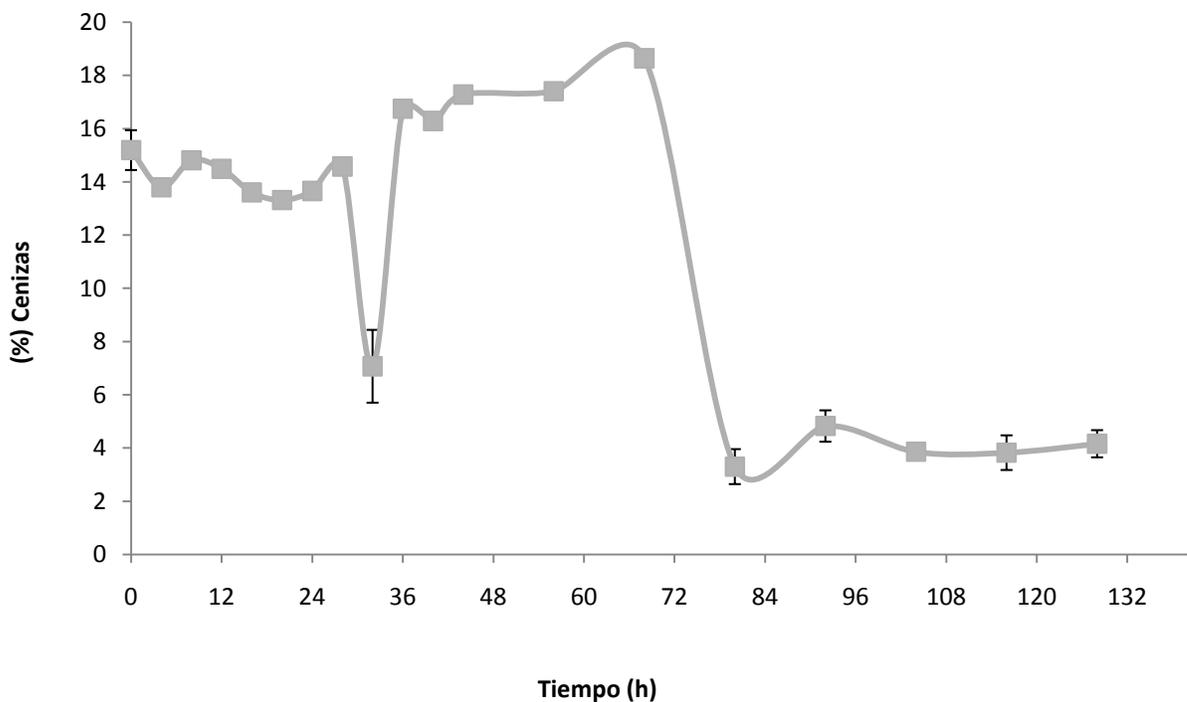


Figura 13. Porcentaje de cenizas determinado durante F1.

De igual manera que F1 se determino el %C sobre las muestras originales de F2 observando que las cenizas se mantuvieron constantes durante las 120 h de fermentación (Figura 14), para verificar estos resultados se determinaron cenizas de dos formas adicionales (2) y (3).

(2) Las muestras originales de la fermentación fueron enjuagadas con agua corriente, secadas a $55 \pm 5^\circ\text{C}$ durante 24 h para determinar el %C.

(3) Las muestras originales fueron desengrasadas para posteriormente determinar %C.

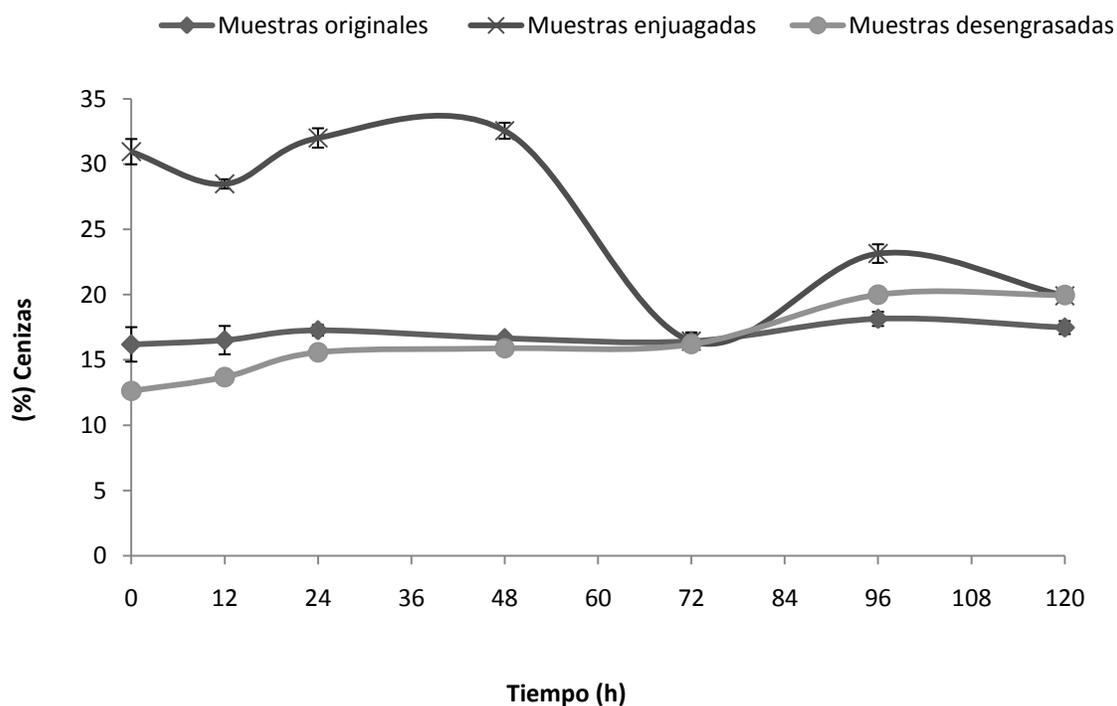


Figura 14. Porcentaje de cenizas determinado durante F2.

En la figura 14 se observa que los %C determinados en las muestras originales y en las muestras desengrasadas se mantuvieron constantes durante en el proceso de fermentación, esto puede deberse debido al alto contenido de agua que tenía el desecho (75%) provocando un filtrado de licor demasiado rápido llevándose consigo el ácido láctico producido, evitando la reacción con el carbonato de calcio, otro motivo puede ser que el agua utilizada en la fermentación haya tenido una alta concentración de minerales o carbonato de calcio y que parte del ácido láctico producido haya reaccionado con el carbonato de calcio contenido en el agua. Por otra parte se observa que la grasa no interfiere en el cálculo de cenizas.

8.1.4 Determinación de proteína durante F1 y F2.

Los resultados de la desproteínización biológica mostrados en la figura 15, determinan una disminución de proteína en el desecho de camarón de F1 la cual tiene un cambio muy notable a las 72 h de un 21.11% a un 8.22% en un lapso de 12 h, quedando 5.64% de proteína al final del proceso, con un porcentaje de DP de 78.22%, esto se debe a la hidrólisis de las proteínas llevando a cabo la desproteínización (Sini y col., 2007). Por otra parte en la F2 solo se lleva a cabo el 15.9% de DP esto puede deberse a la baja concentración de bacterias lácticas que se tuvo desde el inicio de la fermentación. Teniendo finalmente una quitina unida a un mayor porcentaje de proteínas.

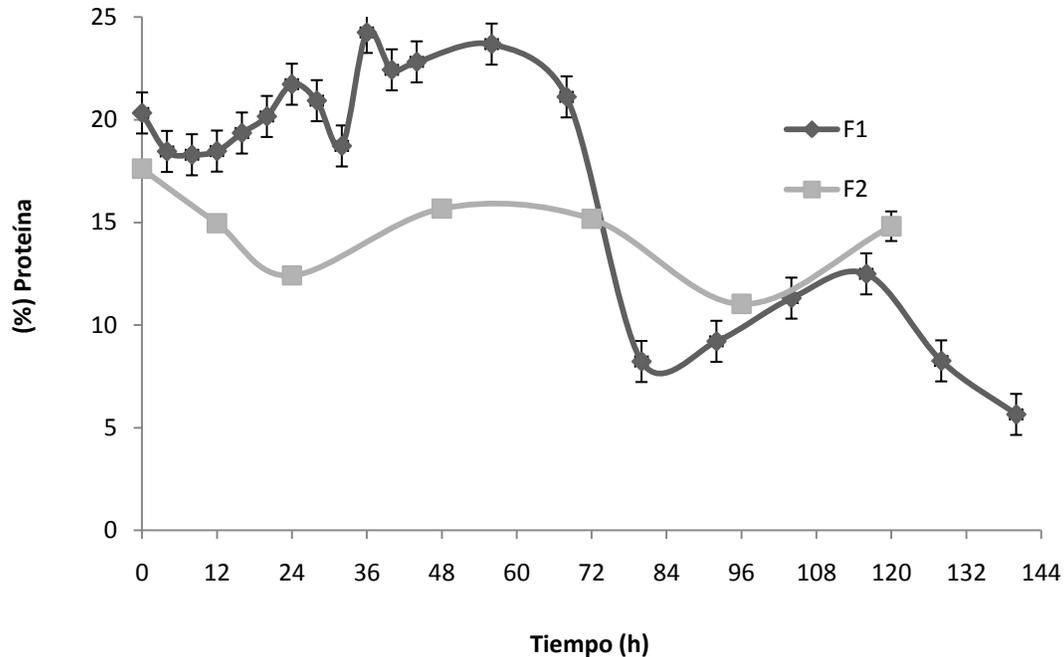


Figura 15. Cambio en el contenido de proteína en el sólido durante la F1 y F2 de desechos de camarón.

Segunda etapa

8.2 Desproteínización enzimática del desecho de camarón

Las principales características de quitinas y quitosanos son: solubilidad, grado de acetilación, peso molecular y contenido de proteína (Rabea y col. 2003) dado esto se buscan nuevos métodos para obtener quitinas y quitosanos con la más alta calidad posible, como lo es el método enzimático que además acorta los costos de obtención. El desecho de camarón que se utilizó para la desproteínización enzimática se secó y molió, lo que proporcionó una mayor homogeneidad a la muestra a desproteínizar, se llevó a cabo el análisis químico proximal del desecho de camarón resaltando que contiene 30% de materia seca

de la cual el 74% es materia orgánica (25% lípidos) y 26% de minerales. Se evaluaron Neutrasa, Alcalasa y Protamex como posibles enzimas comerciales para la desproteínización del desecho de camarón utilizando las diferentes condiciones recomendadas por el fabricante (Tabla 2). Estas enzimas han sido utilizadas en otros trabajos donde se busco la desproteínización de quitina de camarón, cangrejo, viseras de sardina, salmón y algunas otras especies de peces (Gildberg, 2001; Mizani, y col., 2005; Ovissipour, y col., 2009).

En este trabajo de investigación, Protamex fue la única enzima que logró desproteínizar el desecho de camarón, obteniendo 6.63 mg/g de proteína soluble, determinada por el método de Bradford, teniendo un máximo de desproteínización del 36.64% a las 3 horas de incubación a 40°C con una relación S:E de 0.2 siendo esta la menor relación probada ya que al aumentar la cantidad de sustrato no se presenta proteína soluble (Figura 16).

Kechaou y col., en el 2009 reportan el mayor grado de proteína hidrolizada con Alcalasa en vísceras de calamar (*sepia officinalis*) y en vísceras de sardina (7% y 3.3% respectivamente), utilizando pH 8.5, 50°C y 0.1% (w/w) y con Protamex obtienen un grado de hidrólisis de 3.2 y 3.1% respectivamente.

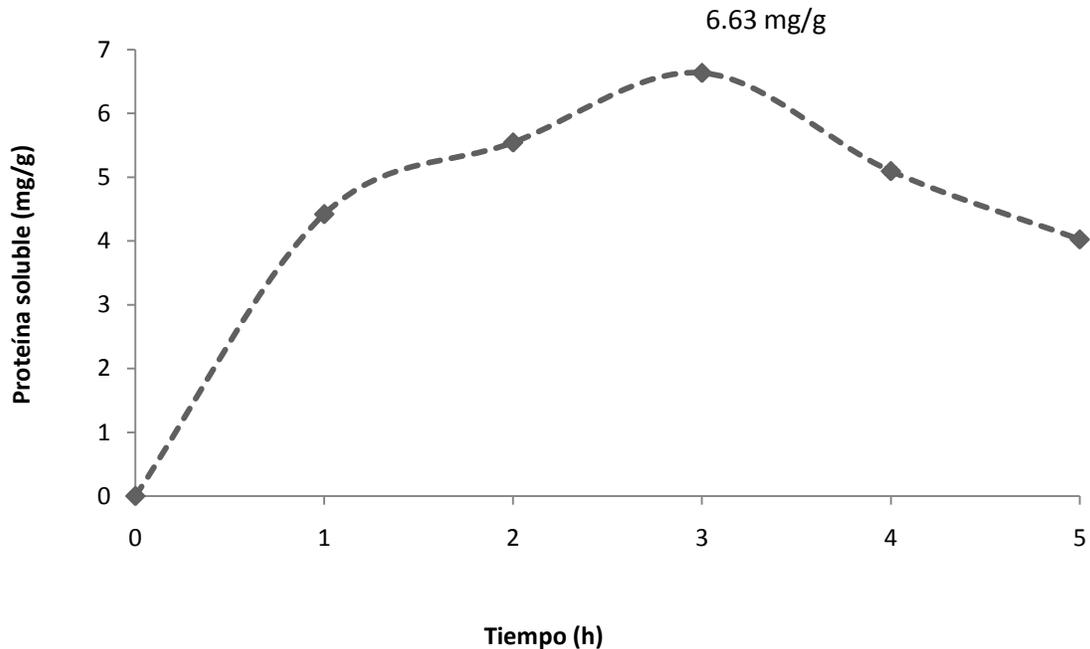


Figura 16. Proteína soluble de desecho de camarón determinada durante la desproteinización con Protamex.

8.2.1 Desproteinización enzimática de quitina cruda con Protamex

La desproteinización enzimática de la quitina cruda de camarón se realizó con Protamex, dados los resultados de la desproteinización del desecho de camarón. En la figura 8 se observa la proteína soluble obtenida de las diferentes relaciones S:E mencionadas en la Tabla 4, con una máxima hidrólisis de proteína de 12 mg/g equivalente al 92.84 % de desproteinización total, con la relación S:E 0.2, con 1 h de incubación, manteniendo los valores de desproteinización al término de la incubación. La menor hidrólisis de proteína obtenida con Protamex se encuentra en la relación S:E 0.5, con un valor de 2.2 mg/g en la primera hora de tratamiento observando que a mayor cantidad de sustrato la hidrólisis de proteína es menor. En otros reportes el comportamiento de la desproteinización con enzimas comerciales es similar al presentado en la figura 17, ya que al inicio de la incubación obtienen los mayores porcentajes de hidrólisis proteica (Shen y col., 2008; Kechaou y col., 2009; Kong y col., 2007).

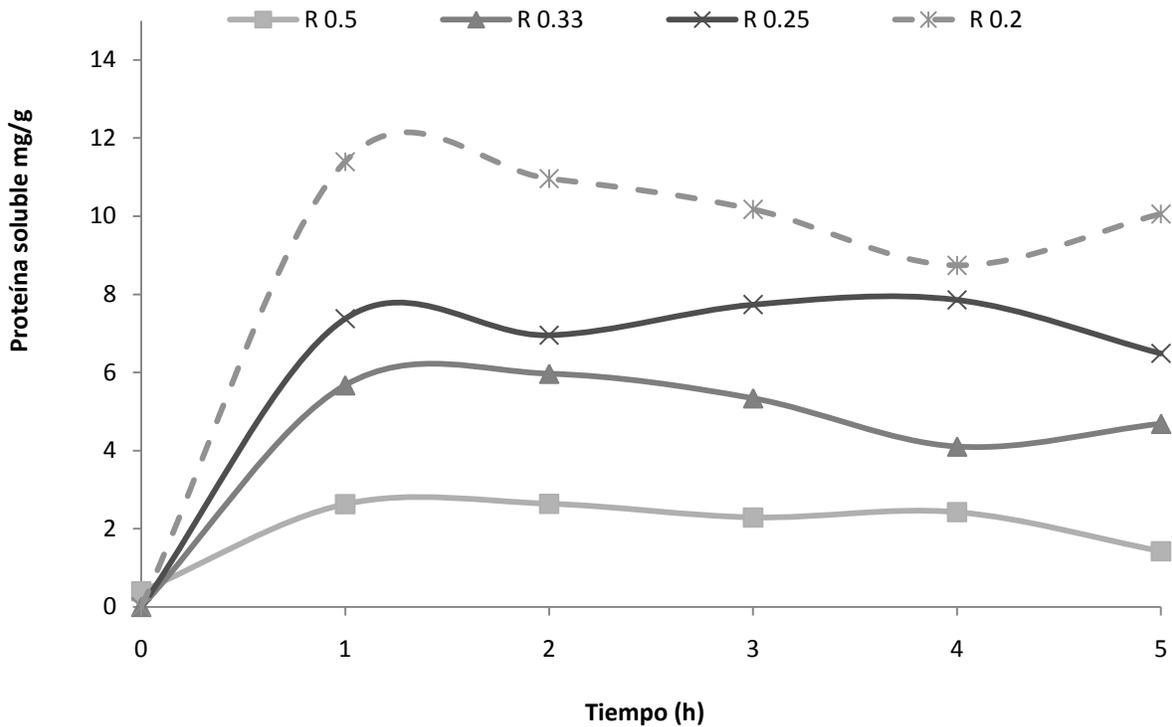


Figura 17. Proteína soluble en quitina cruda con Protamex.

Se determinó el porcentaje de desproteización en la quitina cruda, aumentando la cantidad de sustrato llegando a relaciones S:E de 1, 10 y 1000, con los cuales se obtienen los porcentajes de proteína residual mostrados en la figura 9, determinados por CHN, en los que se observan los siguientes porcentajes de desproteización: 87% - 5 h, 89% - 1 h y 82% - 5 h, en las relaciones S:E de 1, 10 y 1000 respectivamente. Se puede comparar la relación S:E 1000 (0.1% w/w) con el trabajo realizado por Kechaou y col., en el 2009, donde utilizan Protamex al mismo porcentaje obteniendo menor grado de hidrólisis.

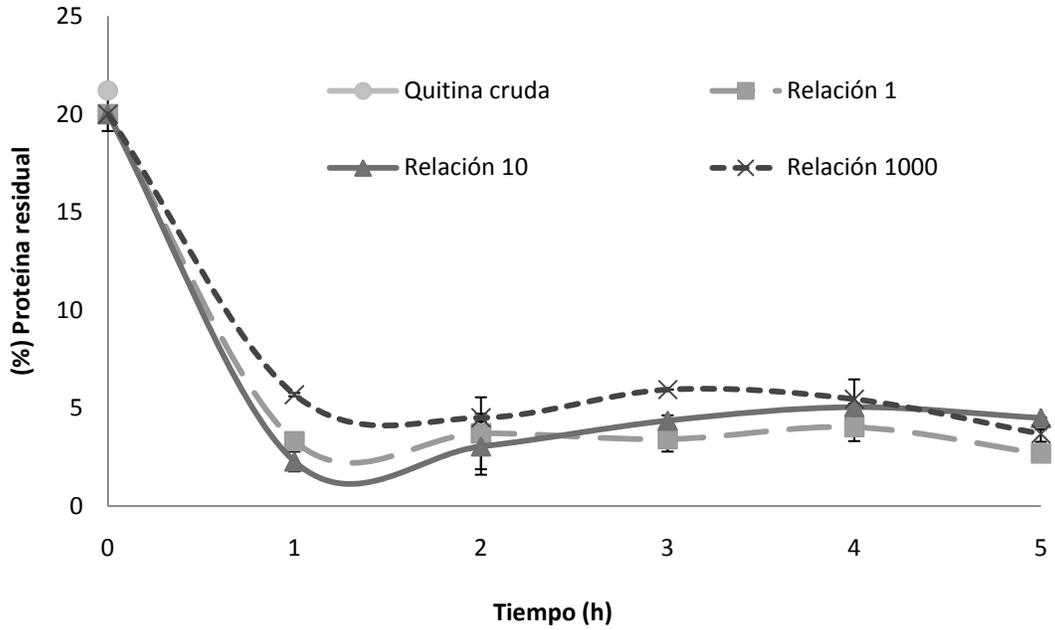


Figura 18. Proteína residual en quitina cruda tratada con Protamex en diferentes relaciones S:E.

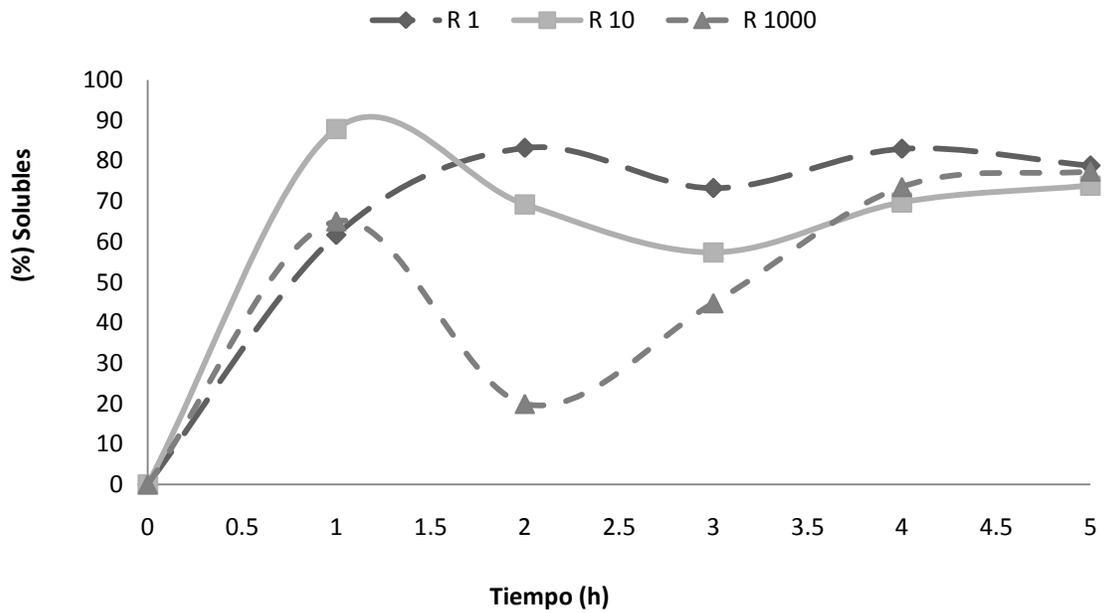


Figura 19. Porcentaje de solubilidad de quitinas crudas desprotenizadas enzimáticamente.

8.2.3 Espectros Infrarrojo (FTIR)

En el espectro de absorción de infrarrojo de la quitina cruda (Figura 20), se observan bandas de 3000 cm^{-1} a 2850 cm^{-1} lo que indica la presencia de metilos ($-\text{CH}_3$), confirmando esto con las bandas que se encuentran alrededor de 1400 cm^{-1} a 1380 cm^{-1} , indicando la deformación de CO-NH producidas en la misma frecuencia, se muestran bandas características de la amina y de $-\text{C}=\text{O}$ alrededor de la región de 1600 cm^{-1} , y un pequeño pico alrededor de 3400 cm^{-1} asignado a la vibración de NH (Marmól y col., 2004).

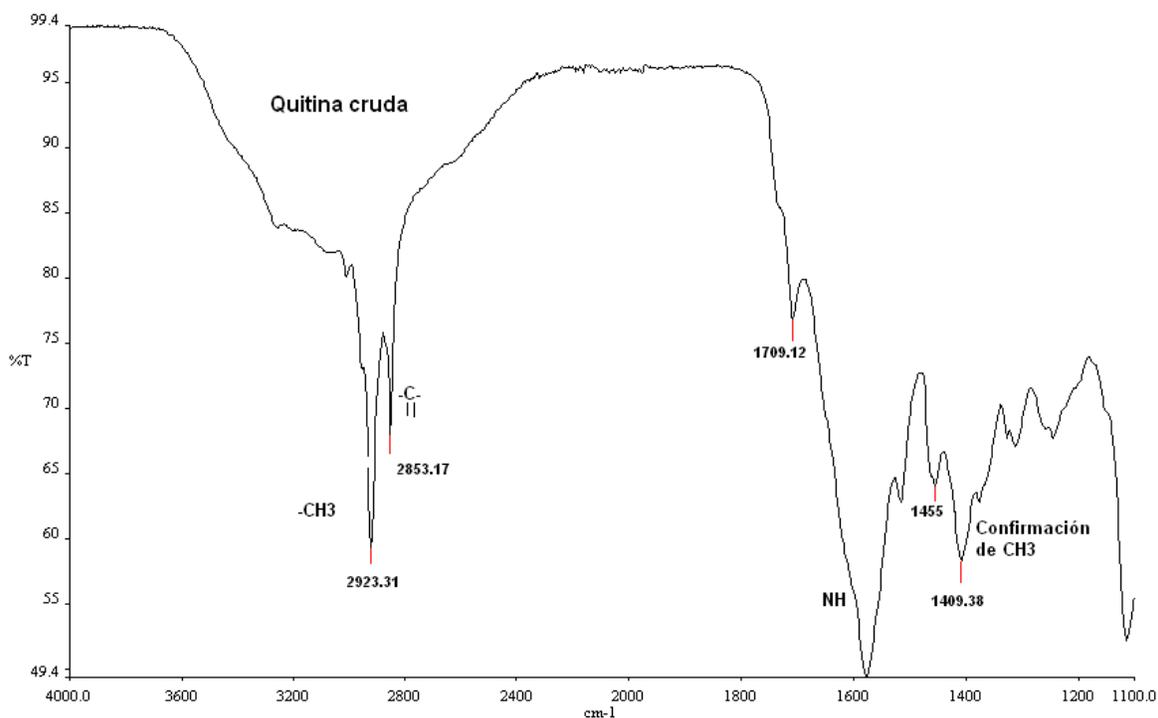


Figura 20. Espectro infrarrojo de absorción de quitina cruda.

La figura 13 muestra los IR realizados a las muestras de quitina cruda, quitina pura (método termoquímico) y quitina tratada con Protamex relación S:E 1000, observándose que no hay correspondencia principalmente entre los espectros de quitina cruda (a) y quitina desproteínizada con Protamex (c) indicando que hubo un cambio en la estructura de (c) después de ser tratada con la enzima comercial ya que hubo una disminución en los picos que se encuentran a 3000 , 1500 y 100 cm^{-1} , teniendo mayor similitud con el espectro de la quitina pura. Los espectros infrarrojo restantes se muestran en el Anexo 2.

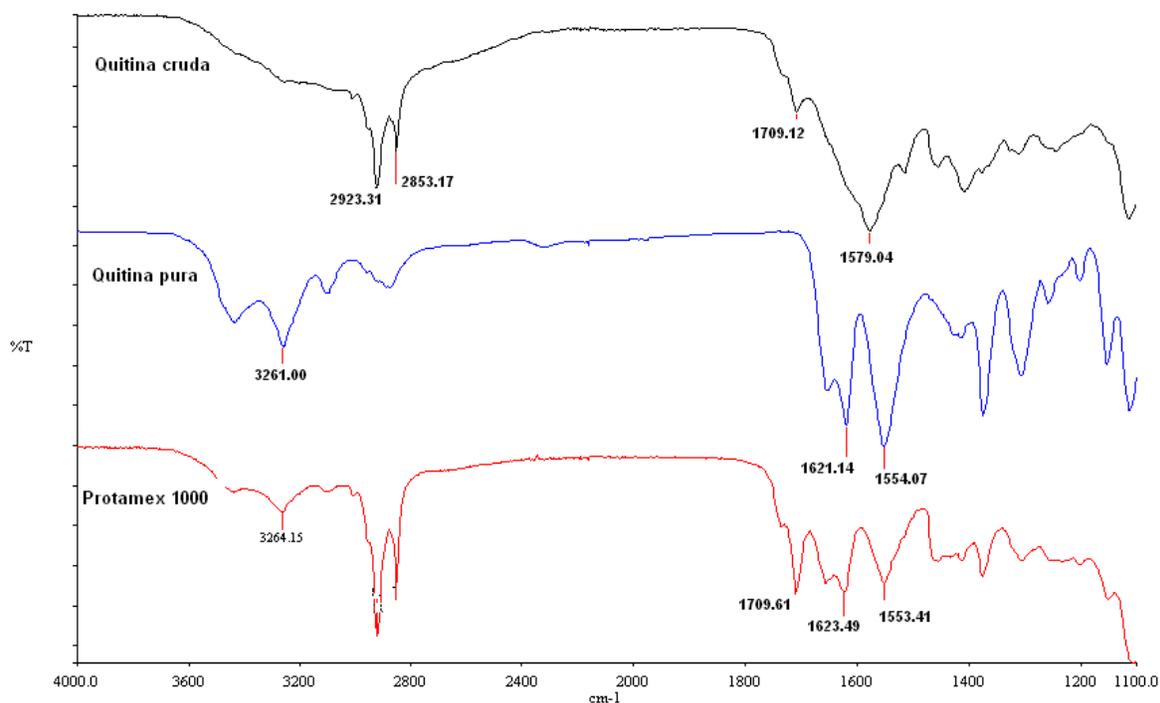


Figura 21. Espectro infrarrojo comparativo entre: (a) Quitina cruda, (b) Quitina pura y (c) Quitina desproteínizada con Protamex relación S:E 1000.

Tercera etapa

8.3 Purificación de quitina cruda por método termoquímico.

La purificación de la quitina tradicionalmente se realiza por métodos termoquímicos empleando grandes cantidades de ácido y bases sin embargo, con el proceso previo de fermentación, se ha logrado reducir las concentraciones de ácidos y álcalis utilizados en la purificación (Cira y col., 2002; Jung y col., 2005). La quitina cruda obtenida fue analizada para determinar el contenido de proteínas y minerales (Tabla 7).

Tabla 7. Análisis químico proximal de las quitinas crudas obtenidas en F1 y F2.

QUITINAS CRUDAS	HUMEDAD (%)	CENIZAS (%)	GRASA (%)	PROTEINA (%)
Fermentación 1	18.11+3.98	4.15±0.65	7.16±0.23	5.64±0.19
Fermentación 2	63.79+1.81	17.47±0.49	8.57±0.72	14.81±0.79

Pruebas de DM Y DP realizadas en la empresa de Biopolímeros Acuícolas

8.3.1 Determinación de contenido de cenizas en DM de F1.

En la figura 22 se muestra el efecto que presenta el tiempo en el tratamiento termoquímico sobre el contenido de cenizas en la quitina cruda. Donde se observa que hay una disminución en los porcentajes de calcio obtenidos conforme se va aumentando el tiempo de reacción. La desmineralización fue monitoreada cada 30 min. durante las tres horas del proceso, logrando la mayor remoción de calcio a la 1.5 h de tratamiento viéndose reflejada con un contenido del 3.07 %C. Cira en el 2000 obtiene valores menores al 1% de cenizas utilizando HCl (0.4M), a las 2 h, 25°C, relación sólido:líquido (1:15).. La solubilidad del carbonato de calcio en la desmineralización química ocurre ya que el ácido adicionado (HCl) reacciona con él carbonato de calcio formando dióxido de carbono, cloruro de calcio y agua (Percot y col., 2002),

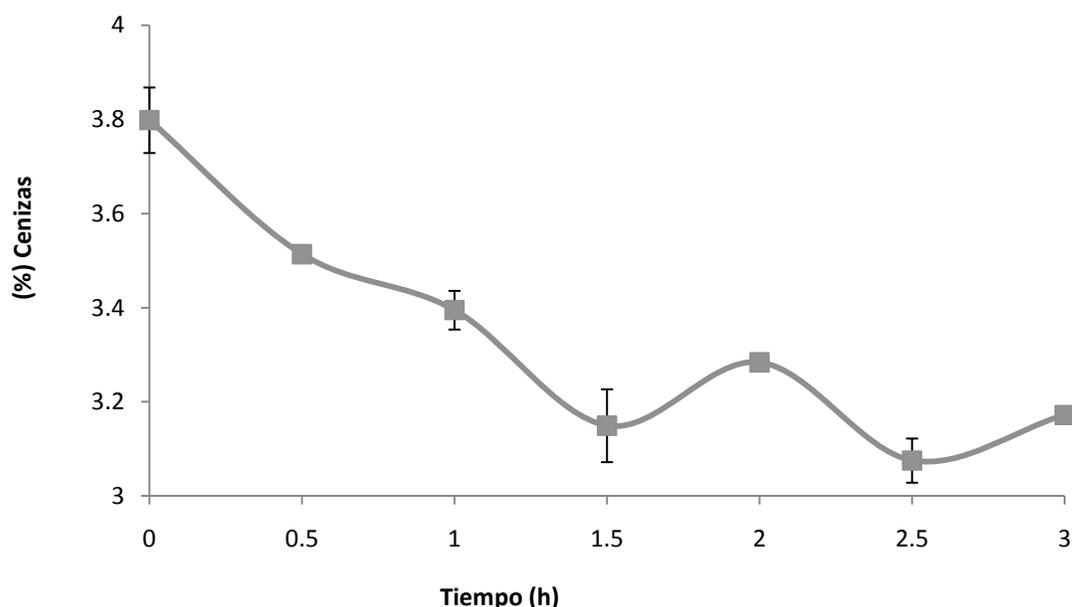


Figura 22. Porcentaje de cenizas determinadas durante la desmineralización con HCl 0.5 N a temperatura ambiente.

8.3.2 Determinación de contenido de proteína en F1

Por otra parte en la tabla 8 se muestra el porcentaje de cenizas y proteína obtenidos en el proceso de desproteínización con el tratamiento alcalino (NaOH 0.4M). Los resultados muestran que el contenido de cenizas en las muestras tomadas cada 30 min. no variaron.

El contenido de proteína final disminuye de un 5.64% (quitina cruda) a un 1.98% empleando NaOH 0.4M, 25°C a las 2 h, relación sólido:líquido (1:15), mismas condiciones con las que Cira y col. en el 2002 obtienen un contenido menor al 2% de proteína unida a quitina. Percot y col., en el 2003 mencionan que en la desproteínización con sosa el remanente de proteína en quitina disminuye conforme aumenta el tiempo de reacción. Liang y col., en 1997 obtienen un 5% de proteína remanente, mencionando que las diferencias entre los resultados obtenidos en diferentes laboratorios podrían ser causadas por las diferencias de especie o el proceso de aislamiento.

Tabla 8. Variación de %C y %P en desproteínización (NaOH 0.4N)

Tiempo de reacción (h)	CENIZAS (%)	PROTEINA (%)
0.5	2.54±0.05	ND
1	2.52±0.14	ND
1.5	2.34±0.14	ND
2	2.69±0.04	ND
2.5	2.51±0.08	ND
3	2.70±0.1	1.98±0.15

ND (no determinado)

8.4 Determinación de contenido de cenizas y proteínas de quitosanos (F1)

La quitina pura de la cual se obtuvieron los quitosanos de la F1 fue purificada con HCl y NaOH (0.4M) conforme a las condiciones reportadas por Cira y col. en el 2002., conteniendo un 2.8 % de humedad, 3.2% de cenizas, 0% de grasa y 6.09% de proteína.

La desacetilación de la quitina se llevo a cabo durante 3.5 h dentro de condiciones heterogéneas (110°C), utilizando diferentes concentraciones de sosa (30, 40, 50 y 60%) provocando la degradación de la quitina. Se determinó el contenido de cenizas encontrando como menor porcentaje 1.32% localizado a las 3 h de reacción con 30% de NaOH, manteniendo porcentajes parecidos a lo largo del del proceso, en comparación con las concentraciones restantes (40, 50 y 60%) el contenido de ceniza es mayor aumentando hasta un 0.6% (Figura 23). Marmól y col., en el 2004, reportan un contenido de cenizas de 0.08% en quitosano obtenido por desacetilación termoalcalina con hidróxido de sodio al 50% a 100°C, relación 1:4 durante 2 h. a partir de desechos de camarón.

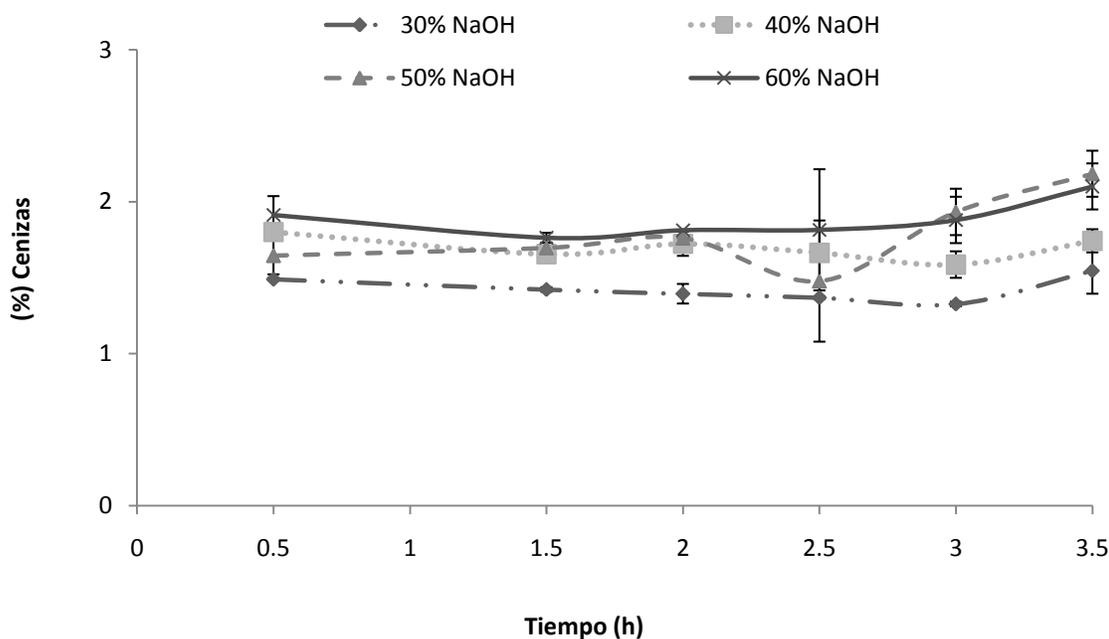


Figura 23. Porcentaje de cenizas en quitosanos obtenidos a diferentes concentraciones de NaOH.

En la figura 24 se presenta el contenido de proteína residual en los quitosanos obtenidos a partir de las condiciones manejadas en la tabla 5. El menor porcentaje de proteína residual se presenta con la concentración más baja de álcali (30% NaOH) a la 1.5h de reacción con un porcentaje de proteína residual de 0.68% que corresponde a un 97.35% desproteínización a partir de la proteína contenida en el desecho de camarón. Se tiene un rango de 2.3 a 5.9% de proteína residual entre las concentraciones restantes. Rao y Stevens en el 2005 obtienen alrededor 0.6% P y 0.21% C por desacetilación alcalina (50% NaOH, 48 h, 50°C) de desecho de camarón.

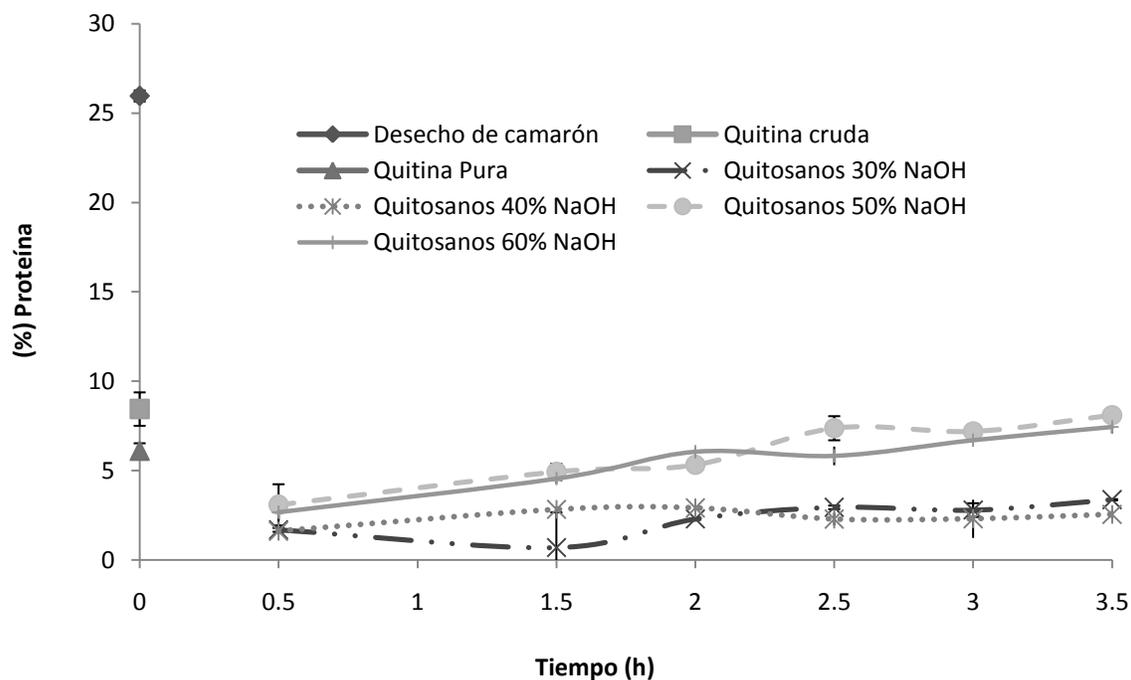


Figura 24. Porcentaje de proteína residual en quitosanos obtenidos a diferentes concentraciones de NaOH.

8.5 Caracterización de quitosanos (F1)

La solubilidad del quitosano fue determinada disolviendo 0.1g de muestra en una solución de ácido acético glacial (0.1M) durante 24 h. En la figura 25 se muestra el efecto que presentaron las diferentes concentraciones de álcali sobre la solubilidad del quitosano. Se obtuvieron los mayores porcentajes de solubilidad (99 y 98%) con las concentraciones de 50 y 60% de NaOH respectivamente, 3.5 h de reacción, estos valores son similares a los obtenidos por Marmól y col., en el 2002 donde obtiene 99% de solubles. Sin embargo estos quitosanos tienen mayor contenido de cenizas y proteínas que los determinados con 30% de sosa.

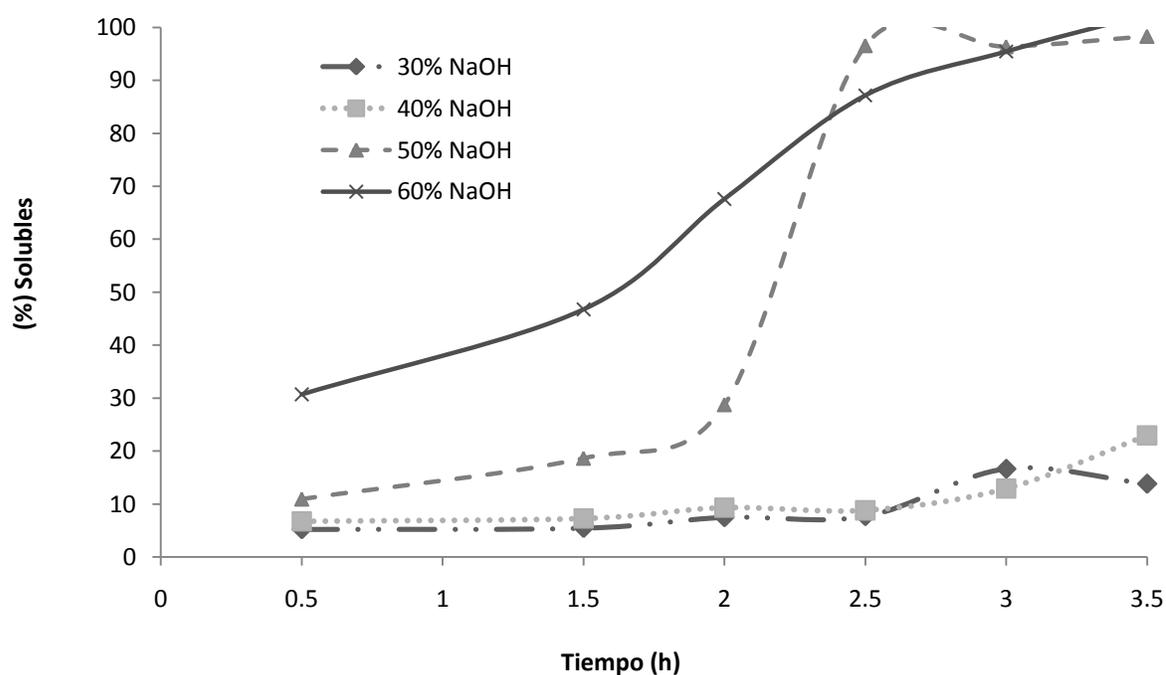


Figura 25. Porcentaje de solubilidad en quitosanos obtenidos a diferentes concentraciones de NaOH.

A los quitosanos con una solubilidad mayor al 50% (quitosanos obtenidos con 50 y 60% de álcali) se les determinó grado de acetilación por medio de resonancia magnética nuclear (H^1 RMN) disolviéndolas en DCI/D_2O , (espectrómetro Bruker AC 300), por la disminución de la intensidad del protón del metilo (Heux y col., 2000; Domard y col., 1987). Los valores obtenidos se encuentran entre 8 y 14%

DA (Tabla 9), Rao y Stevens en el 2005 obtienen un 8% DA en quitosanos obtenidos con el 50% de NaOH.

Tabla 9. Caracterización de quitosanos obtenidos a 50 y 60% de NaOH

% NaOH	Reacción (h)	% Solubles	% DA	Mw (KDa)
50	2.5	96.55	11.45±0.75	209.69
50	3	96.36	10.55±0.12	210.76
50	3.5	98.31	8.21±0.36	273.69
60	2.5	87.15	13.06±0.36	169.08
			13.91±0.17	153.88
60	3	95.44	11.55±0.96	
60	3.5	102.48		188.96

La determinación del peso molecular se realizó mediante viscosidad intrínseca obteniendo los mayores pesos con 50% NaOH a 3 y 3.5h de reacción, sin embargo los pesos obtenidos son bajos, ya que al realizar un proceso heterogéneo se corre el riesgo de obtener hidrólisis en las estructuras si no se manejan los tiempos adecuados ya que se utilizan temperaturas altas (Nemtsev y col. 2002).

8.6 Purificación y caracterización de quitina cruda obtenida de F2.

Las pruebas de refinamiento de quitina obtenida en la F2 se realizarán de acuerdo a las condiciones mostradas en la tabla 10. Se realizarán dos lotes de refinamiento de quitina: (1) se llevaron a cabo los procesos de DM, DP y desacetilación con agua de la llave y reactivos grado industrial nombrado como QLL. (2) los procesos de purificación y desacetilación se llevaron a cabo con agua destilada nombrados como QD y reactivos grado analítico como se muestra en la tabla 11, obteniendo por cada lote dos quitinas puras y dos quitosanos siendo comparados entre sí.

Tabla 10. Condiciones de refinamiento de quitina y obtención de quitosano.

Desmineralización	Desproteínización	Desacetilación
agua de llave - HCl 0.4M (industrial) – 1h temp. ambiente	agua de llave - NaOH 0.4M (industrial) - 1h temp. ambiente	agua de llave - NaOH 50% (industrial) – 3.5h, 110 °C
agua de destilada - HCl 0.4M (reactivo) - 1h temp. ambiente	agua de destilada - NaOH 0.4M (reactivo) - 1h temp. ambiente	agua destilada - NaOH 50% (reactivo) – 3.5 h, 110 °C

Tabla 11. Caracterización de quitinas obtenidas.

	%Cenizas Desmineralización	% Cenizas Desproteínización	% Solubilidad	Mw (Kd)	% DA (CHN)
QLL	2.78 ± 0.03	1.73 ± 0.10	99.76 ± 1.15	823.57	100 ± 0.53
QD	2.54 ± 0.14	0.53 ± 0.11	98.81 ± 1.66	811.81	100 ± 3.31

PM (peso molecular)

Los contenidos de cenizas mostrados en las tablas 11 y 12 muestran que sí hay un efecto en los tratamientos donde se utiliza agua destilada con y ácidos y álcalis grado reactivo, disminuyendo principalmente el contenido de cenizas en el refinamiento de la quitina, atribuyendo esto a el contenido de minerales que existe en agua de llave así como la pureza del ácido clorhídrico empleado.

8.7 Caracterización de quitosanos obtenidos de F2

La desacetilación de la quitina refinada se realizó con 50% de NaOH y 3.5 h de reacción ya que estas fueron las condiciones con mejores resultados en la F1. Se llevaron a cabo dos lotes como se muestra en la tabla 12, obteniendo dos quitosanos uno tratado con agua de la llave y reactivos grado industrial (Q1) y otro tratado con agua destilada y reactivos grado analítico (Q2), teniendo una cantidad menor de cenizas en Q2, los pesos moleculares fueron de 71.78 Kd (Q1) y 18.21 Kd (Q2).

Tabla 12. Caracterización de quitosanos obtenidos.

Quitosano	% Cenizas	% Solubilidad	DA (RMN)
Q1	1.51 ± 0.14	98	12.29 ± 0.91
Q2	0.51 ± 0.016	98	23.82 ± 0.85

Las características de los productos obtenidos en este trabajo son similares a las determinadas a quitinas y quitosanos comerciales por Cho y col., en 1998 (Tabla 13).

Tabla 13. Características de quitinas y quitosanos comerciales.

Quitinas	% Proteína	% Cenizas	% DA
Keumbo Chemical	37.31±0.112.5	0.4±0.0	82.9±0.1
Sigma Chemical	38.81±0.06	2.0±0.2	80.4±1.1
Pronova Biopolymer	43.81±0.04	1.8±0.4	80.4±0.1
Pronova Biopolymer	39.43±0.56	0.3±0.1	80.5±0.8
Quitosanos			
Keumbo Chemical	12.06±0.00	0.3±0.1	9.4±0.0
Sigma Chemica	12.25±0.03	0.2±0.1	10.1±1.1
Pronova Biopolymer	12.12±0.08	1.0±0.2	17.0±0.0
DuPont	10.68±0.28	0.2±0.1	27.5±0.0
Pronova Biopolymer	11.25±0.05	1.7±0.3	13.1±1.1

CONCLUSIONES

La desproteínización enzimática es un proceso adecuado para hidrolizar la proteína de la quitina, ya que los resultados obtenidos muestran que la enzima Protamex si remueve parte de ella en buen porcentaje por lo tanto esta enzima puede ser recomendada para la hidrólisis enzimática del desecho de camarón.

Es importante tomar en cuenta las condiciones como son pH, temperatura y concentración de enzima específicas para cada enzima, ya que de estas va a depender la actividad que se tenga. Así entre más se acerquen las condiciones utilizadas a las óptimas se obtendrán mejores resultados.

El tratamiento por la adición de enzimas actualmente ha ganado importancia en la hidrólisis de proteínas de desechos marinos y en la producción de productos hidrolizados sin embargo es difícil establecer estos procesos a nivel industrial. Esta situación ha ido mejorando gradualmente y sin duda la tecnología enzimática irá ganando importancia, tanto como una alternativa a los procesos convencionales y como una herramienta en el desarrollo de nuevos productos.

Gracias a que la fermentación láctica es un buen proceso para la conservación de los desechos de camarón basándose en condiciones ya establecidas y probadas se logro escalar a 500 Kg con resultados aceptables ayudando a la economía de las empresas camaroneras dándole un uso alternativo a los desechos producidos por ellas mismas a bajo costo.

10. PERSPECTIVAS Y TRABAJOS A FUTURO

- Optimización en el proceso de obtención de quitinas desproteinizadas enzimáticamente con la finalidad de obtener quitinas con mejores características.
- Estudiar la desproteización enzimática aplicada directamente a quitinas biológicas desmineralizadas químicamente.
- Evaluar la capacidad de desacetilación de enzimas comerciales sobre quitinas purificadas para la obtención de quitosanos.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. **AOAC. 1990.** Official methods of analysis, 13th edition. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C.
2. **Adamberg K.,** Kask S., Laht T., Paalme T. 2003. The effect of temperatura and pH on the growth of lactic acido bacteria: a pH-auxostat study. *International Journal of Food Microbiology.* 85: 171-183.
3. **Ahn C.,** B. Lee., E.H. 1992. Utilization of chitin prepared from the shellfish crust. 2. Effect of chitosan film packing on quality of lightly-salted and dried horse mackerel. *Bull. Korean Fish. Soc.* 25(1): 51-57.
4. **Anónimo.**1979. Secretaría de Salubridad y Asistencia, Técnicas generales para análisis microbiológico de alimentos México.
5. **Aye K.,** and Stevens W. 2004. Technical note Improved chitin production by pretreatment of shrimp shells. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* 79: 421-425.
6. **Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248–54.
7. **Cayré M.,** Vignolo G., Garro O. 2003. Modeling lactic acid bacteria growth in vacuumpacaged cooked meat emulsions stored at three temperaturas. *Food Microbiology.* 20: 561-566.
8. **Chou Y.,** Kyoon H., Meyers. 1998. Physicochemical Characteristics and Functinal Properties of Various Commercial Chitin and Chitosan Products. *Journal Agriculture Food Chemistry.* 46: 3839-3843.
9. **Chuan L.** 2006. Review of fungal chitinases. *Department of Plant Pathology.* 161: 345 – 360.
10. **Cira L.** 2000. Escalamiento de un proceso para la recuperación de quitina a partir de desechos de camarón. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa.

11. **Cira L.**, Huerta S., Hall G and Shirai K.. Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemistry* 2002;37:1359-1366.
12. **Domard A.**, Gey C., Rinaudo M., Terrassin C. 1987. ^{13}C and ^1H n.m.r. spectroscopy of chitosan and *N*-trimethyl chloride derivatives. *International Journal Biological Macromolecules*. 9: 233-237.
13. **El Gueddari N.**, Moerschbacher B. 2003. A Bioactivity Matrix for Chitosans as Elicitors of Disease Resistance Reactions in Wheat. *Advances in Chitin Science Volume VII*. 56-59.
14. **García-Carreño F.** 1991. Proteases in food technology. *Biotechnology Education*. 2:(4): 150-153.
15. **Gemma H.**, Du J. 1996. Effect of Application of Various Chitosans with different Molecular Weights on the Storability of Jonagold Apple. *SHS Acta Horticulturae 464: International Postharvest Science Conference*.
16. **Genta I.**, Giunchedi P., Pavanetto F., Conti B, Perugini P., Conte U. 1997. Preparation of Chitosan microparticulate drug delivery systems', in Muzzarelli RAA and Muzzarelli C, *Chitin Handbook*; European Chitin Society, Grottammare, Atec Publisherz. 391-404.
17. **Gildberg A.** 1993. Enzymic Processing of Marine Raw Materials. *Process Biochemistry*. 28: 1-15.
18. **Gildberg A.**, Sternberg E. 2001. A new process for advanced utilisation of shrimp waste. *Process Biochemistry*. 36: 809-812.
19. **Gimeno M.**, Ramírez J., Martínez C., Pacheco N., Garcia R., Barzana E., Shirai K. 2007. One-Solvent Extraction of Astaxantina from Lactic Acid Fermented Shrimp Wastes. *J. of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 10345-10350.
20. **Heux L.**, Brugnerotto J., Desbrières J., Vrsali M., Rinaudo M. 2000. Solid State NMR for Determination of Degree of Acetylation of Chitin and Chitosan. *Biomacromolecules*. 1: 746-751.
21. **Hirano S.** 1999. Chitin and chitosan as novel biotechnological materials. *Polymer International*. 48: 732-734.

22. **Jung W.**, Kuk J., Kim K., Park R. 2005. Demineralization of red crab shell waste by lactic acid fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 67: 851-854.
23. **Kafetzopoulos D.**, Martinou A., Bouriotis V. 1993. Bioconversion of chitin to chitosan: Purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. *Applied Biological Sciences.* 90: 2564-2568.
24. **Kassai M.**, Arul J., Charlet G. 2000. Intrinsic Viscosity-Molecular Weight Relationship for Chitosan. *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics.* 38: 2591-2598.
25. **Kechau E.**, Dumay J., Donnay-Moreno C., Jaouen P., Gouygou J., Bergé P., Amar R. 2009. Enzymatic hydrolysis of cuttlefish (*Sepia officinalis*) and sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using commercial proteases: Effects on lipid distribution and amino acid composition. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 107(2): 158-164.
26. **Kong X.**, Zhou H., Qian H. 2007. Enzymatic hydrolysis of wheat gluten by proteases and properties of the resulting hydrolysates. *Food Chemistry.* 102: 759-763.
27. **Lárez C.** 2006. Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances en Química.* 1(2): 15-21.
28. **Liang K.**, Tsai G. 1997. Response Surface Optimization and Kinetics of Isolating Chitin from Pink Shrimp (*Solenocera melanthro*) Shell Waste. *Journal of Agricultural Food Chemistry.* 45: 1900-1904.
29. **Mao S.**, Augsten C., Mäder K., Kissel T. 2007. Characterization of chitosan and its derivatives using asymmetrical flow field-flow-fractionation: A comparison with traditional methods. *J of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 45: 736-741.
30. **Marmól Z.**, Gutiérrez E., Paéz G., Ferrer J., Rincón M. 2004. Desacetilación termoalcalina de quitina de conchas de camarón. *Multiciencias.* 4(002).
31. **Membré J.**, Leporq B., Vialette M., Mettler E., Perrier L., Thuault D., Zwetering M. 2005. Temperature effect on bacterial growth rate: quantitative microbiology approach including cardinal values and variability estimates to perform growth simulations on/in food. *International Journal of Food Microbiology.* 100: 179-186.

32. **Messens W.**, Verluyten J., Leroy F., Vuyst L. 2003. Modelling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus casei* LTH 1174 in response to temperature and pH values used for European sausage fermentation processes. *International Journal of Food Microbiology*. 81: 41-52.
33. **Mizani M.**, Aminlari M., Khodabandeh M. 2005. An Effective Method for Producing a Nutritive Protein Extract Powder from Shrimp-head Waste. *Food Science and Technology International*. 11(1): 049-6.
34. **Nemtsev S.**, Gamzazade A., Rogozhin S., Bikova V., Bikov V. 2002. Deacetylation of Chitin under Homogeneous Conditions. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 38(6): 521-526.
35. **Oh SY.**, Shih IL., Tzeng YM., Wang SL. 2000. Protease produced by *Pseudomonas aeruginosa* K – 187 and its application in the deproteinization of shrimp and crab shell wastes. *Enzyme and Microbial Technology*. 27: 3-10.
36. **Ovissipour M.**, Abedian A., Motamedzadegan., Rasco B., Safari R., Shahiri H. 2009. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *Food Chemistry*. 115: 238-242.
37. **Pastor A.** 2004. Quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. Pontifica Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial. 25-71.
38. **Pacheco N.** 2007. Efecto de Quitosanos y *Pichia Guillermondii* como agentes de biocontrol contra *Penicillium digitatum*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa.
39. **Pacheco N.**, Garnica-González M., Ramírez–Hernández Y., Flores-Albino B., Gimeno M, Bárzana E., Shirai K. 2009. Effect of temperature on chitin and astaxanthin recoveries from shrimp waste using lactic bacteria. *Bioresource Technology*. 100: 2849-2854.
40. **Pacheco N.**, Larralde P., Sepulveda J., Trombotto S., Domard A., Shirai K. 2008. Evaluation of chitosans and *Pichia guillermondii* as growth inhibitors of *Penicillium digitatum*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 43: 20-26.

41. **Peniche C.** 2006. Estudios sobre quitina y quitosana. Universidad de la Habana. Facultad de Química.
42. **Percot A.,** Viton C., Domard A. 2003. Optimization of Chitin Extraction from Shrimp Shells. *Biomacromolecules*. 4: 12-18.
43. **Rabea E.,** Badawy M., Stevens V., Badawy M., Smagghe, Steurbaut W. 2003. Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. *Biomacromolecules*. 4(6): 1457-1464.
44. **Ramírez L.,** Marín M., Huerta S., Revah S., Shirai K. 2006. Enzymatic hydrolysis of chitin in the production of oligosaccharides using *Lecanicillium fungicola* chitinases. *Process Biochemistry*. 41: 1106-1110.
45. **Rao M.,** Muñoz J., Stevens W. 2000. Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste. *Appl Microbiol Biotechnol*. 54: 808-813.
46. **Rao M.,** Stevens W. 2006. Fermentation of Shrimp Biowaste under Different Salt Concentrations with Amylolytic and Non-Amylolytic *Lactobacillus* Strains for Chitin Production. *Food Technol Biotechnol*. 44 (1): 83–87.
47. **Rocha-Pino Z.,** Shirai K., Arias L., Vazquez-Torres H. 2008. Efecto de la calidad del agua y tamaño de partícula en la producción de quitosano a partir de α -quitina extraída de desperdicios de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). *Revista Mexicana de Ingenieria Quimica* 7(3):299-307.
48. **Shen L.,** Wang X., Wang Z., Wu Y., Chen J. 2008. Studies on tea protein extraction using alkaline and enzyme methods. *Food Chemistry*. 107: 929-938.
49. **Shirai K.** 1999. Utilización de desperdicios de camarón para recuperación de quitina, proteínas y pigmentos por vía microbiana. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa.
50. **Shirai K.,** Guerrero I., Huerta S., Saucedo G., Castillo A., Gonzales R., Hall G. 2001. Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation. *Enzyme and Microbial Technology*. 28: 446-452.
51. **Shrinivas M.,** Stevens W. 2005. Chitin production by *Lactobacillus* fermentation of shrimp biowaste in a drum reactor and its chemical

conversion to chitosan. *J of Chemical Technology and Biotechnology*. 80: 1080-1087.

52. **Sini T.**, Santhosh S., Mathew P. 2007. Study on the production of chitin and chitosan from shrimp shell by using *Bacillus subtilis* fermentation. *Carbohydrate Research*. 347: 2423-2429.
53. **Synowiecki J.**, Al-Khateeb. 2003. Production, properties and some new Applications of chitin and its derivatives, *Critical reviews in Food Science and Nutrition*. 43(2): 145-171.
54. **Tsigos I.**, Martinou A., Kafetzopoulos D. Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. *Institute of Molecular Biology and Biotechnology. Foundation of Research and Technology* 205-312.
55. **U.S. Congress.** 1993. *Biopolymers: Making Materials Nature's Way-Background Paper*, Office of Technology Assessment, OTA-BP-E-102, Washington, DC: U.S Government Printing Office.
56. **Xu Y.**, Gallert C., Winter J. 2008. Chitin purification from shrimp wastes by microbial deproteination and decalcification. *Environmental Biotechnology*. 79: 687-697.
57. **Zakaria Z.**, Hall G., Shama G. 1998. Lactic acid fermentation of scampi waste in a rotating horizontal bioreactor for chitin recovery. *Process Biochemistry*. 3(1): 1-6.

Citas electrónicas

www.conapesca.sagarpa.gob.mx

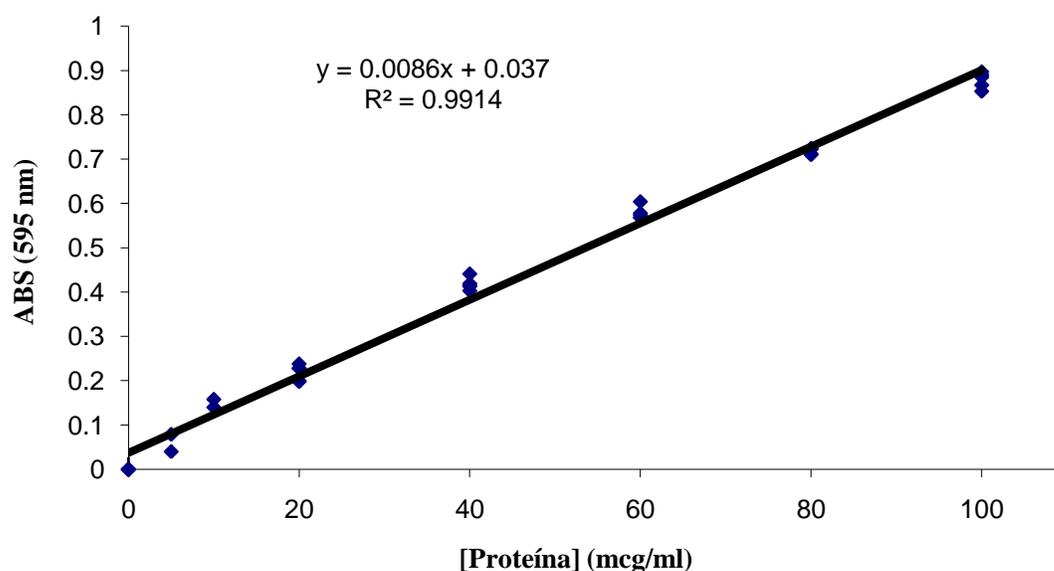
www.novozymes.com

www.dsm.com

Anexo 1

Curva estándar de proteína soluble (Bradford)

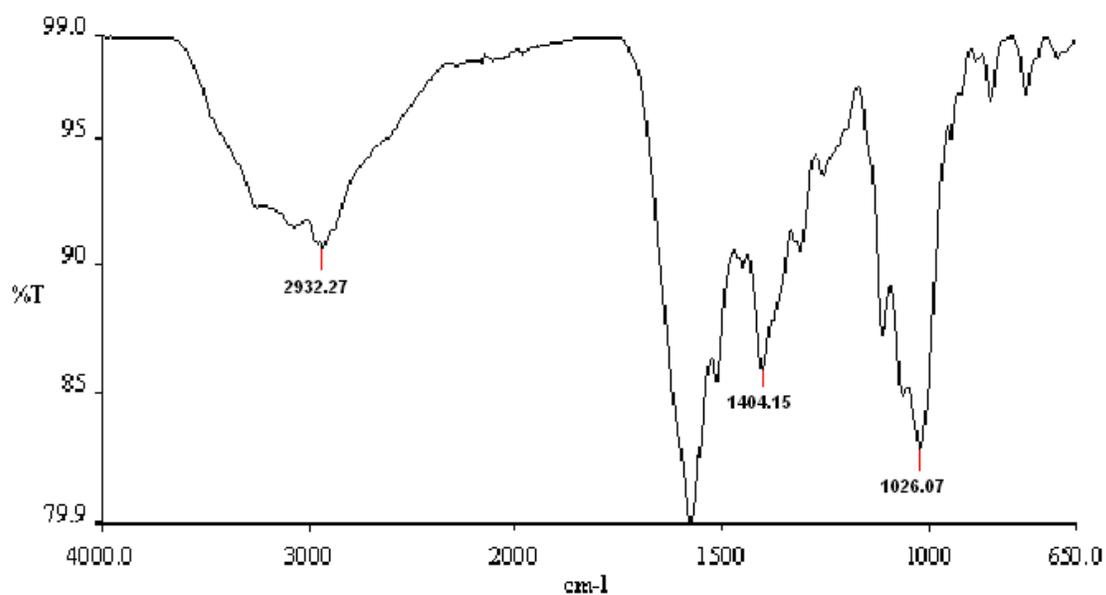
Para la realización de la curva estándar de proteína se utilizaron concentraciones de 0 a 100 mcg/ml de proteína (albumina bovina), la cual fue determinada por espectrofotometría UV a 595 nm. En la siguiente figura se muestra la curva estándar de proteína soluble.



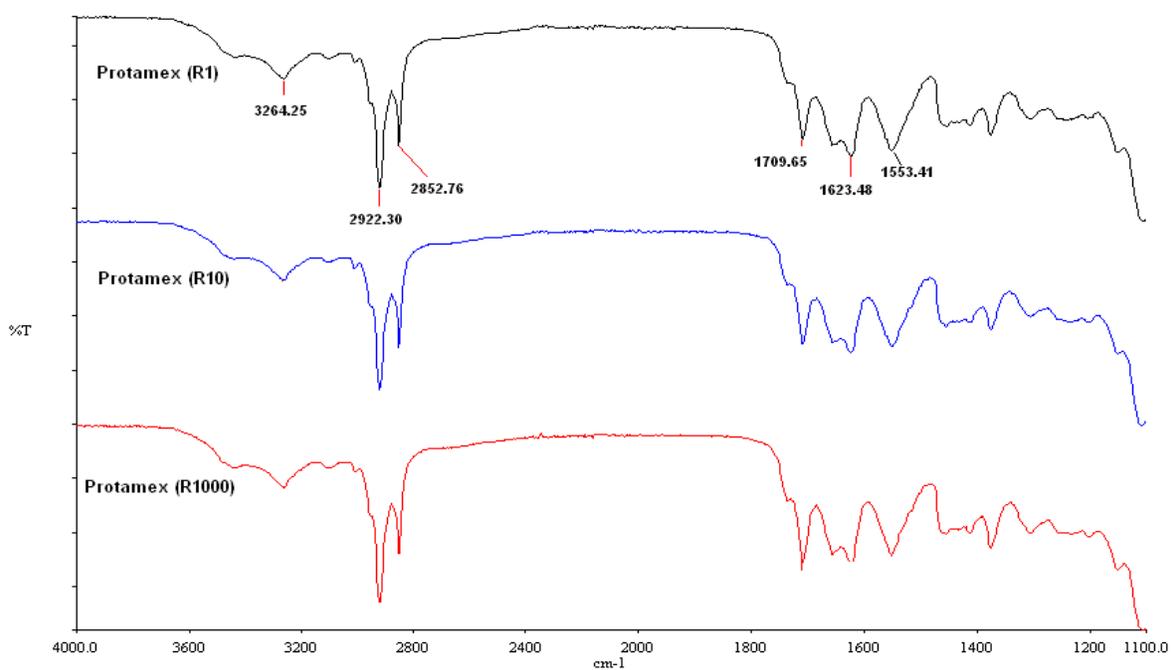
Curva estándar para determinar proteína soluble.

Anexo 2

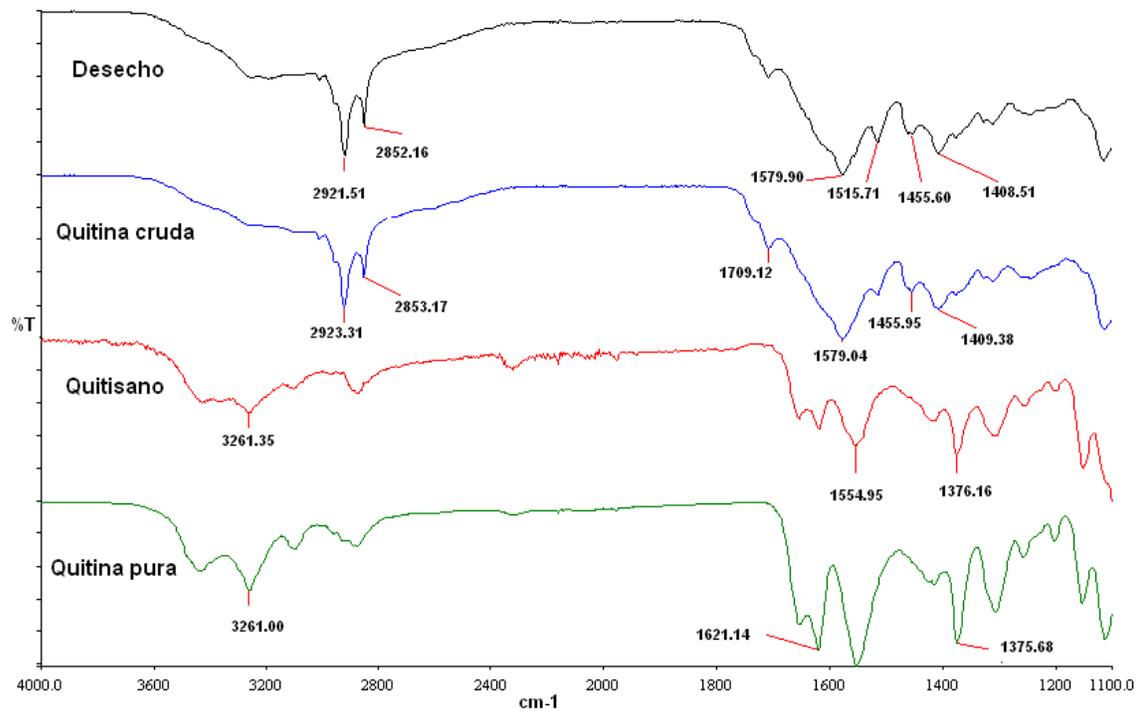
Espectros infrarrojo de proceso enzimático y termoquímico.



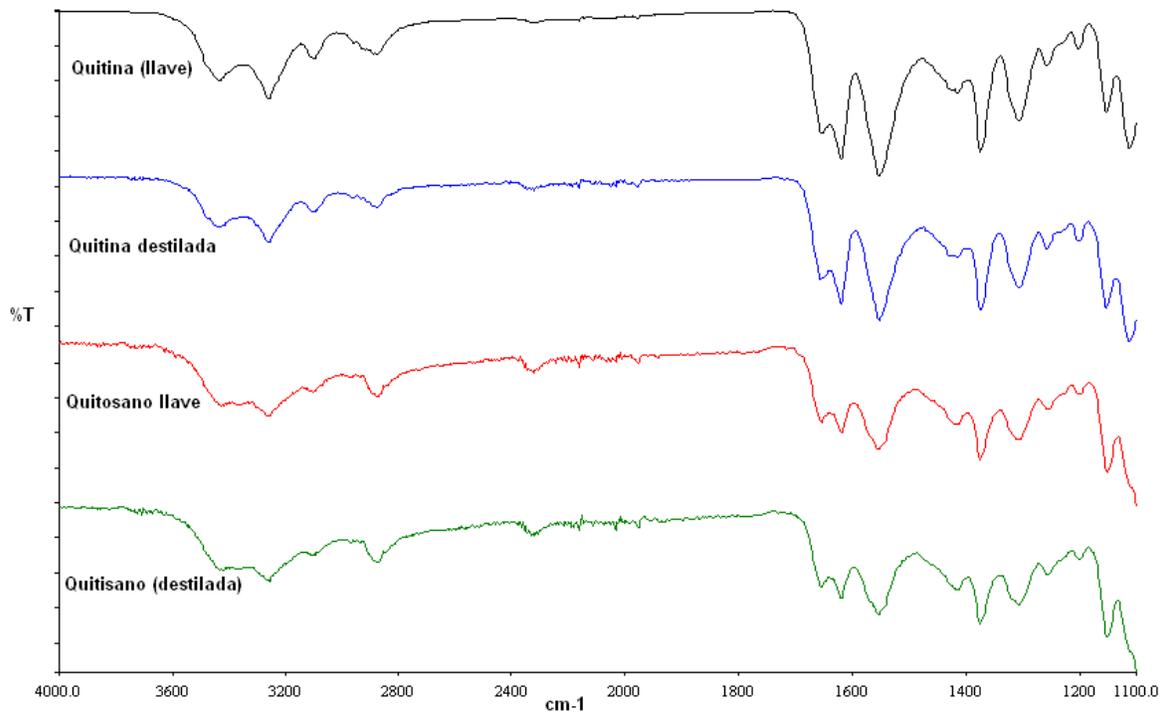
Espectro infrarrojo del desecho de camarón.



Espectro infrarrojo de la quitina cruda desproteínizada enzimáticamente con Protamex: R1, R10 y R1000.



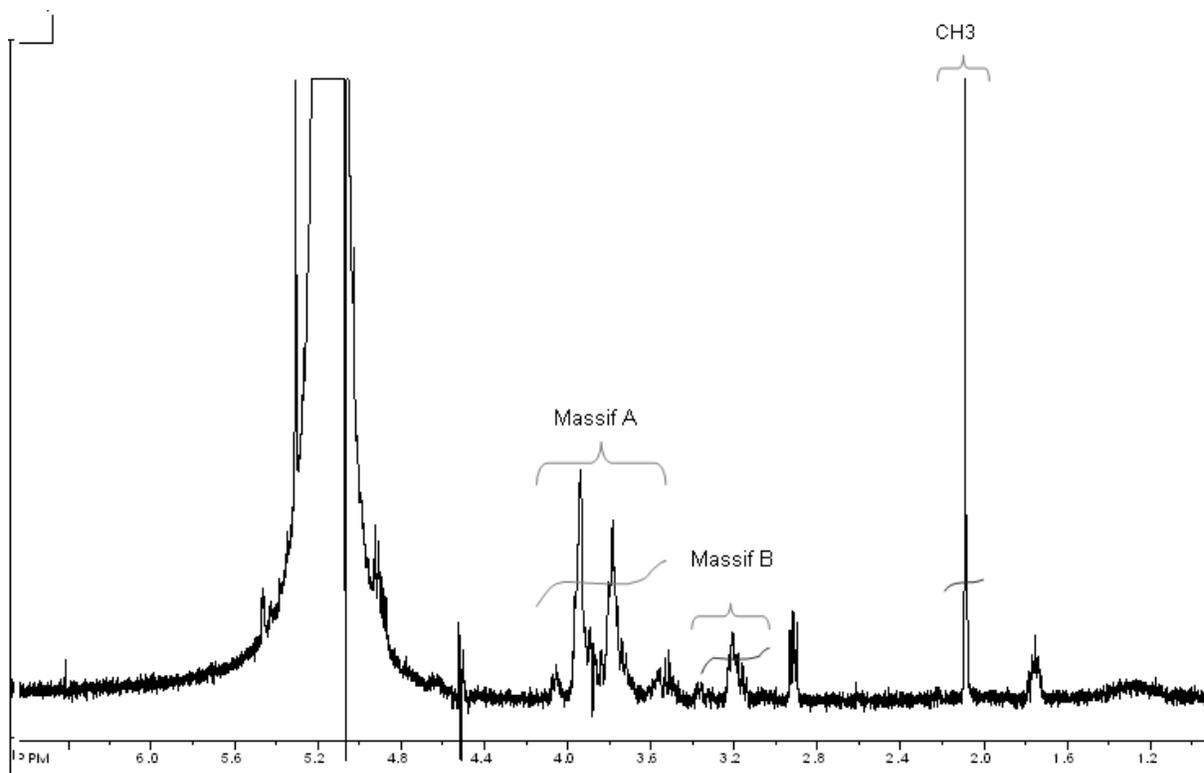
Espectro infrarrojo de comparación entre el desecho de camarón, quitina cruda, quitina pura y quitosano obtenidos por método biológico – químico.



Espectro infrarrojo de comparación entre las quitinas QLL y QD y entre los quitosanos Q1 y Q2.

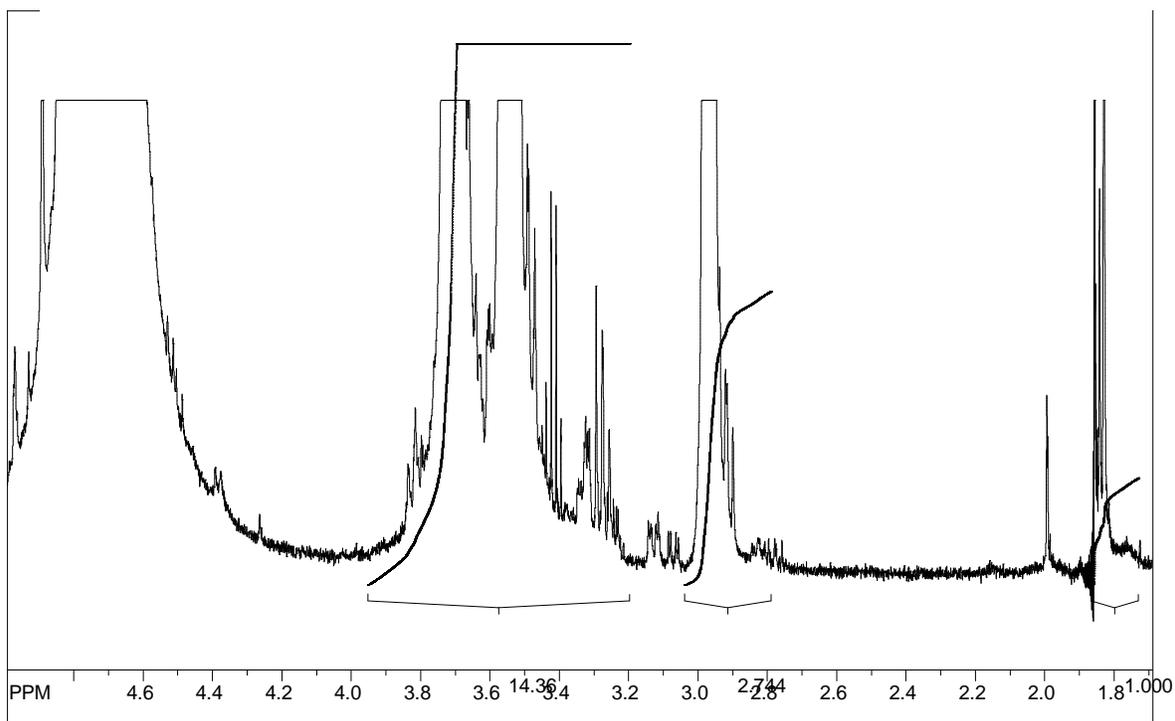
Anexo 3

Espectros de resonancia magnética nuclear de quitosanos.

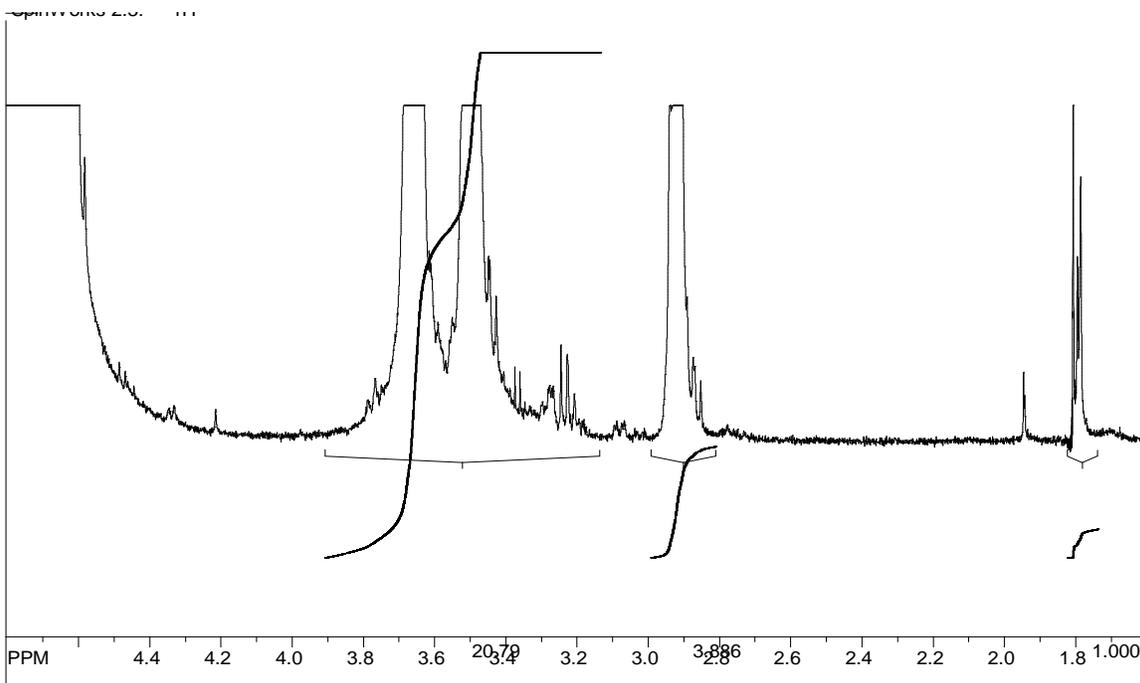


Espectro de RMN^1H (forma clorhidrato) de quitosano obtenido de desecho de camarón, desacetilado por método químico para la determinación del grado de acetilación.

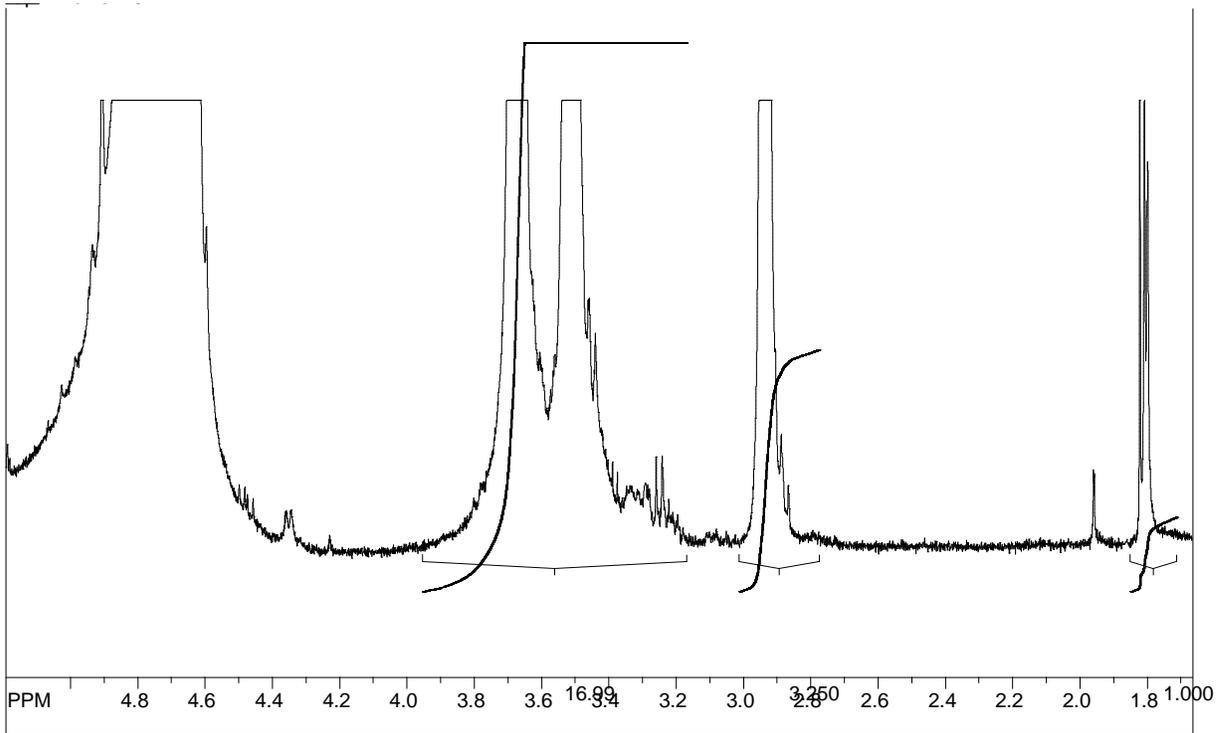
Se obtienen: Masif A: Unidades acetiladas del protón H_2 , y de los protones H_3 , H_6 , Masivo B: Unidades desacetiladas del protón H_2 , CH_3 grupo acetilado del biopolímero (Pacheco, 2007).



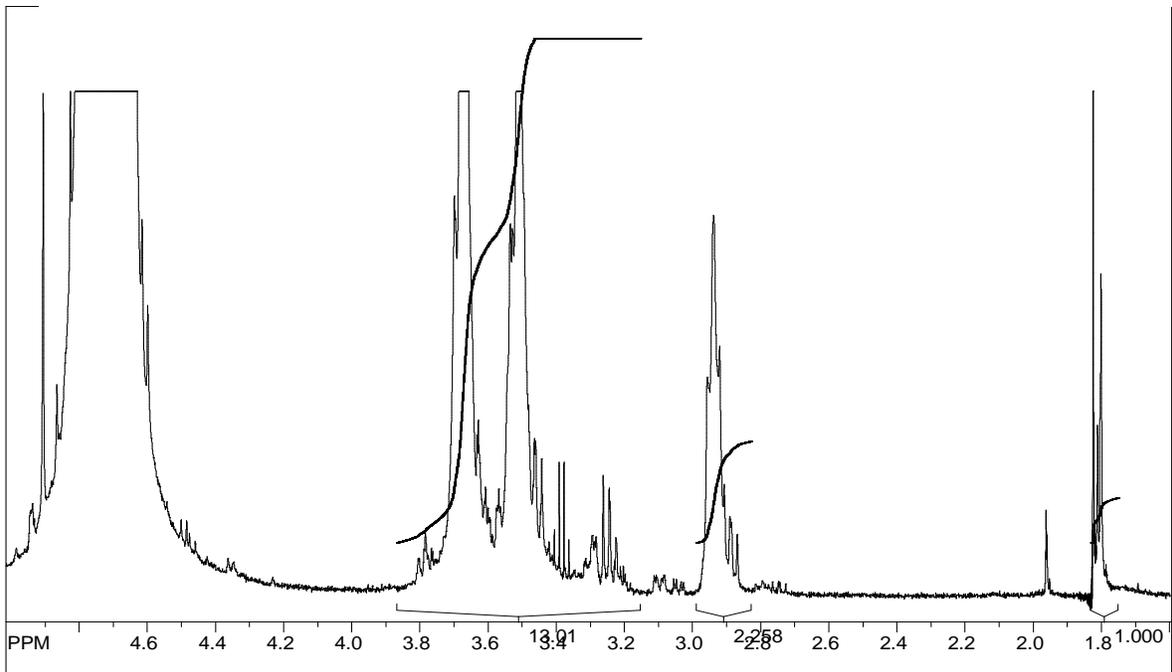
Espectro de RMN¹H de quitosano (50%, 2.5 h de reacción) para la determinación del grado de acetilación.



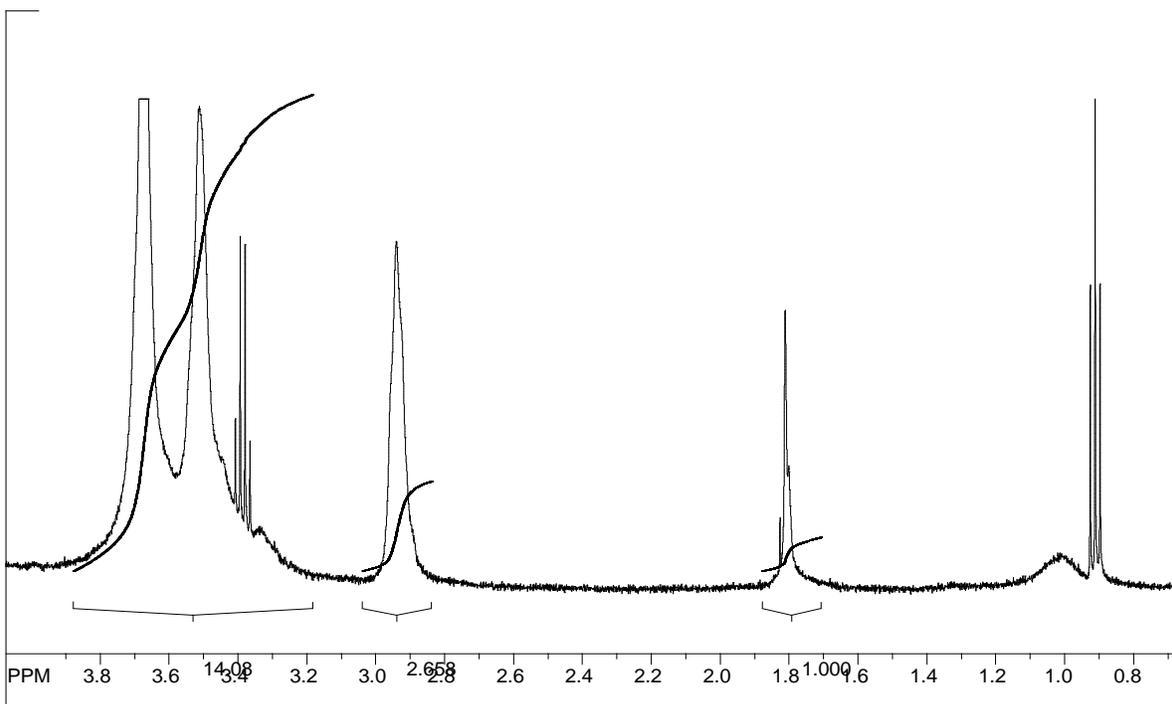
Espectro de RMN¹H de quitosano (50%, 3 h de reacción) para la determinación del grado de acetilación.



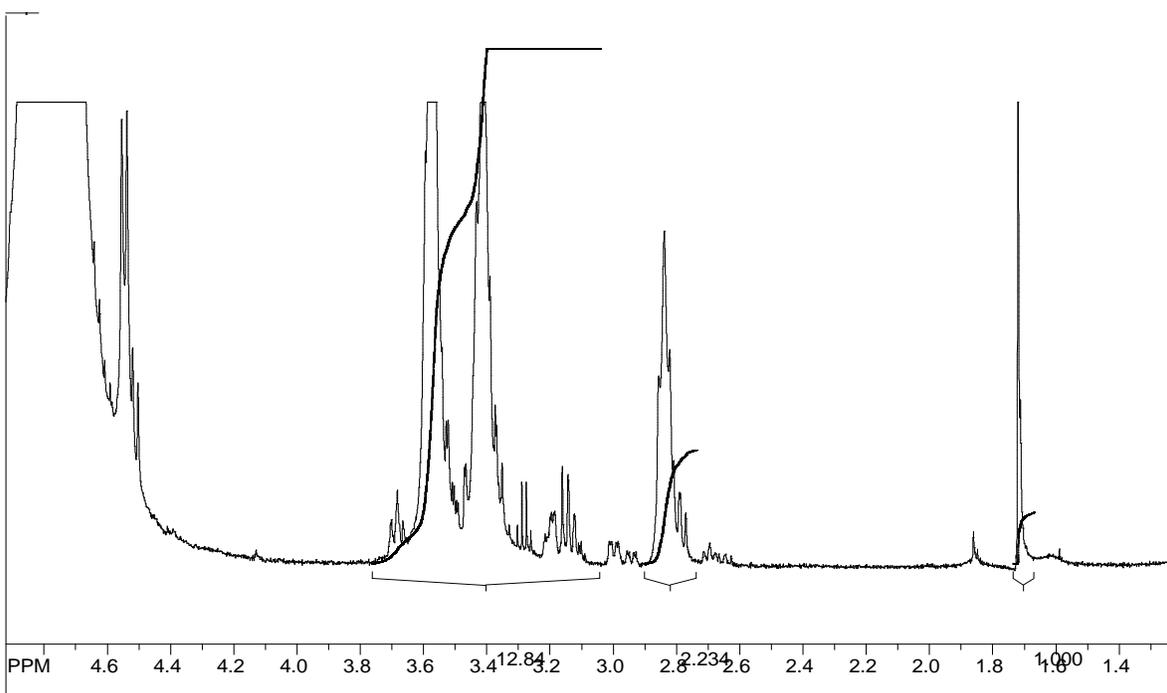
Espectro de RMN¹H de quitosano (50%, 3.5 h de reacción) para la determinación del grado de acetilación.



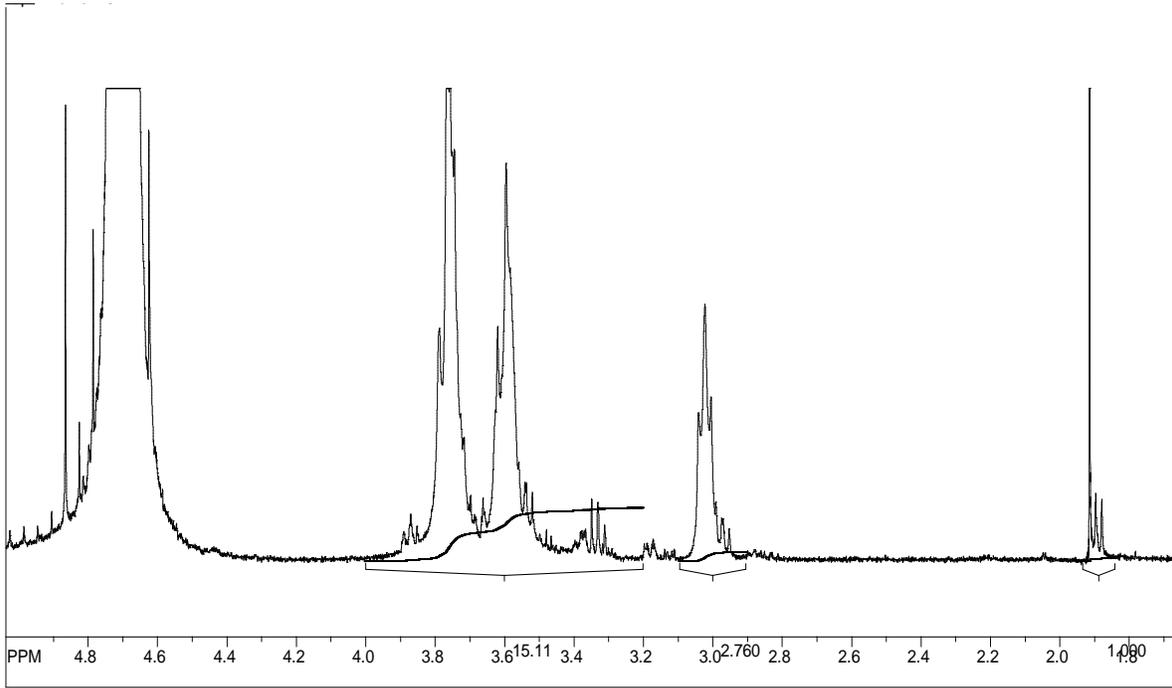
Espectro de RMN¹H de quitosano (60%, 2.5 h de reacción) para la determinación del grado de acetilación.



Espectro de RMN¹H de quitosano (60%, 3 h de reacción) para la determinación del grado de acetilación.



Espectro de RMN¹H de quitosano (60%, 3.5 h de reacción) para la determinación del grado de acetilación.



Espectro de RMN¹H de quitosano (Q1) para la determinación del grado de acetilación.