



Casa abierta al tiempo

Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE QUITINA
BIOLÓGICA Y SU DESACETILACIÓN A QUITOSANO**

T E S I S

**para obtener el grado de
Maestra en Biotecnología**

P R E S E N T A

Q.F.B. Carmen Josefina Juárez Castelán

Directora de tesis:

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto¹

Asesores:

Dra. Neith A. Pacheco López²

Dr. Miquel Gimeno Seco³

¹Departamento de Biotecnología, Laboratorio de Biopolímeros, UAM-I.

²CIATEJ Unidad Sureste.

³Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM.

25 de Julio del 2012

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNCP) del CONACYT, con la referencia 0014652”.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biopolímeros del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto. El trabajo experimental se llevó a cabo con financiamiento del Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (No. de Proyecto PICSA 11-69).

México D.F. a 25 de Julio del 2012

El H. Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:
“Obtención y caracterización de quitina biológica y su desacetilación a quitosano”
que presentó:

Q.F.B. Carmen Josefina Juárez Castelán

Comité tutorial:

Directora de tesis: Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Biotecnología.
Laboratorio de Biopolímeros.

Presidente:

Dr. Miquel Gimeno Seco. _____

Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

Secretario:

Dr. Alberto López Luna. _____

Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Sinodales:

Dra. Neith Araceli Pacheco López. _____

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C. (CIATEJ) Unidad Sureste.

Dr. Gustavo Martínez Castellanos. _____

Subdirección de Investigación y Posgrado, Instituto Tecnológico Superior de Misantla.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Keiko Shirai Matsumoto por la confianza que me brindo, el asesoramiento, la paciencia y por el gran apoyo recibido en la dirección del presente trabajo.

A la Dra. Neith A. Pacheco López por el apoyo brindado y su asesoría para realizar este trabajo y por su amistad.

Al Dr. Miquel Gimeno Seco, por sus observaciones y sugerencias al presente trabajo.

Al Dr. Gustavo Martínez Castellanos por sus observaciones y tiempo dedicado a la revisión de esta tesis.

Al Dr. Alberto López por sus observaciones, consejos y tiempo dedicado que ayudaron al desarrollo y revisión de esta tesis y por su amistad.

Al Dr. Ladislao Arias Margarito por el apoyo que me otorgo durante la parte práctica de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio y amigos, Andrés, Facundo, Alfonso, Itzel R., Lupita, Monse, Marco Polo, Fabiola, Ariana, Zaizy, Itzel C. y Ruth, por sus consejos, amistad y sobre todo por el apoyo que recibí durante la espera de Rommel.

Quiero agradecer en especial a Alfonso Mayrén y a Itzel Ramírez quienes son parte importante de este trabajo, por su ayuda, comprensión, apoyo y amistad.

De manera muy especial quiero agradecer a la Sra. Marina Navarro por su gran apoyo incondicional que me ha brindado día a día para poder lograr esta meta y a Victor Carrasco.

DEDICATORIAS

Con mucho amor a mi esposo Ulises Carrasco Navarro y a mi hijo Rommel Sebastián, quienes son mis dos amores, mi motivo para seguir adelante y afrontar los momentos difíciles. Siempre estaré con ustedes, los amo.

A mis padres, Elvira y Jesús, por darme la vida y por apoyarme en todo lo que he necesitado, ahora empiezo a entender lo que es ser madre, los amo.

A Gaby, Vero, Jesús, Jimena, Diego, Daniela, Victoria, Andrea, Emiliano, Javier y Rene, por todo su apoyo y siempre estar al pendiente de lo que me pasa, son muy importantes en mi vida, los quiero mucho.

Al Sr. Francisco Carrasco Molina.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABLAS.....	ii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1 La producción de camarón en México.....	1
1.2 Biopolímeros.....	2
1.3 Quitina y quitosano.....	2
1.3.1 Obtención de quitina.....	2
1.3.2 Estructura de la quitina y quitosano.....	3
1.3.3 Obtención de la quitina y quitosano (método químico).....	4
1.4 FAL.....	5
1.5 Proteasas.....	5
1.6 Hidrólisis enzimática.....	6
1.6.1 Condiciones de la hidrólisis.....	7
1.6.2 Condiciones que afectan las reacciones enzimáticas.....	7
1.6.3 Efecto del pH.....	7
1.6.4 Efecto de la temperatura.....	8
1.6.5 Efecto de la concentración de enzima.....	8
1.7 Propiedades físico-químicas de quitina y quitosano.....	8
1.8 Aplicaciones de quitina y quitosano.....	9
1.8.1 Biomateriales.....	10
1.9 Proteínas presentes en el desperdicio de camarón.....	10
1.9.1 Proteínas sarcoplásmicas.....	11
1.9.2 Proteínas miofibrilares.....	11
1.9.3 Proteínas del estroma.....	11

2. ANTECEDENTES.....	12
3. JUSTIFICACIÓN.....	14
4. HIPÓTESIS.....	15
5. OBJETIVOS.....	16
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
6.1 Desperdicio de camarón.....	17
6.2 Microorganismo.....	17
6.3 FAL de desperdicios de camarón.....	17
6.4 Proteasas comerciales.....	18
6.5 Determinación de actividad enzimática proteolítica.....	19
6.6 Obtención de quitina biológica (Desproteización enzimática).....	20
6.6.1 Efecto de las enzimas comerciales sobre la DP de la QPP.....	20
6.6.2 Efecto del pH sobre la actividad de la enzima.....	21
6.6.3 Efecto de la temperatura sobre la actividad enzima.....	21
6.6.4 Efecto de la concentración de enzima sobre la DP de la quitina cruda.....	21
6.7 Quitina purificada químicamente.....	22
7. ANÁLISIS DE MUESTRAS.....	25
7.1 Determinación del contenido de humedad (%H).....	25
7.2 Determinación del contenido de cenizas (%C).....	25
7.3 Determinación del contenido de grasa (%G).....	26
7.4 Determinación de nitrógeno total y nitrógeno proteico.....	26
7.5 Determinación de solubles en ácido acético glacial 0.1M (QT) y en N, N,- dimetilacetamida/cloruro de litio (5%) (QB).....	26
7.7 Determinación de DA.....	27
7.7 Determinación del PM mediante viscosidad intrínseca η	27
7.8 Análisis por espectrofotometrías de infrarrojo (FTIR).....	28
7.9 Análisis estadístico.....	29
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
8.1 FAL.....	30

8.1.1 Cinética de pH y producción de ácido láctico	30
8.1.2 DM y DP del desperdicio de camarón mediante FAL (6.5 y 50 Kg)	33
8.2 Análisis químico proximal	35
8.3. Determinación de actividad proteolítica en las enzimas comerciales	37
8.4. DP de la QPP con enzimas comerciales	38
8.4.1 Efecto de las enzimas proteolíticas comerciales para la DP de la QPP	38
8.4.2 Efecto de pH sobre la actividad de la Proteasa N en la DP de la QPP	40
8.4.3 Efecto de la temperatura sobre la actividad de la Proteasa N en la DP de la QPP	42
8.4.4 Efecto de la concentración sobre la actividad de la Proteasa N en la DP de la QPP	44
8.5 Caracterización de QB, obtención de QT y su caracterización	46
8.6 Espectro infrarrojo de QB y espectro de RMN de QT	47
8.7 Rendimientos	50
9. CONCLUSIONES	52
10. PERSPECTIVAS	53
11. BIBLIOGRAFÍA	54
11.1 Citas electrónicas	58
12. ANEXO	59
Ensayo de actividad enzimática	59
Soluciones amortiguadoras	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la quitina.	3
Figura 2. Estructura química del quitosano.	4
Figura 3. Diagrama para la obtención del desperdicio de camarón fermentado, QB y QT a partir de desperdicio de camarón.	23
Figura 4. Diagrama de análisis químico y caracterización para el desperdicio de camarón, QPP, QB y QT.	24
Figura 5. Evolución del pH durante el proceso de la FAL determinada en licores de 6.5 y 50 Kg de desperdicio de camarón.	31
Figura 6. Evolución en la producción de ácido láctico durante el proceso de la FAL de 6.5 y 50 Kg de desperdicio de camarón.	33
Figura 7. Efecto de las enzimas comerciales a 0.1% y 1.2% p/p sobre la QPP.	39
Figura 8. Efecto del pH sobre la actividad de la Proteasa N en QPP. Letras diferentes indican diferencia significativa entre las medias de dos determinaciones ($\alpha \leq 0.05$).	42
Figura 9. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la Proteasa N en quitina cruda. Letras diferentes indican diferencia significativa entre las medias de tres determinaciones ($\alpha \leq 0.05$).	44
Figura 10. Efecto de la concentración de enzima sobre la actividad de la Proteasa N en QPP. Letras diferentes indican diferencia significativa entre las medias de tres determinaciones ($\alpha \leq 0.05$).	45
Figura 11. Espectro infrarrojo de absorción de QB y QS (quitina comercial (Sigma)).	48
Figura 12. Espectro infrarrojo de absorción del QT obtenido a partir de la QPP y de QTF (Quitosano comercial Fluka).	49
Figura 13. Espectro de RMN ¹ H de QT obtenido a partir de QB.	50

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Producción de camarón en México por acuicultura y captura.	1
Tabla 2. Propiedades generales de la quitina y quitosano.	9
Tabla 3. Aplicaciones de quitina y quitosano.	9
Tabla 4. Estudios reportados sobre el uso de enzimas comerciales para la DP enzimática en desperdicios de camarón.	13
Tabla 5. Condiciones óptimas de pH y temperatura propuestas por el fabricante.	19
Tabla 6. Enzimas y condiciones probadas para el efecto de la DP de la QPP.	20
Tabla 7. Condiciones probadas para la DP de la QPP con proteasas comerciales.	21
Tabla 8 . Porcentajes de DP y DM obtenidos en la FAL de 6.5 y 50 Kg.	35
Tabla 9. Análisis químico proximal del desperdicio de camarón, desperdicio de camarón fermentado y QPP.	35
Tabla 10. Actividad de proteasas comerciales determinadas a pH 7.5 y 30°C.	37
Tabla 11. Análisis químico proximal y caracterización de QB y QT.	46
Tabla 12. Características de quitinas y quitosanos obtenidos por método químico.	47
Tabla 13. Rendimientos de QPP, QB y QT.	51

LISTA DE ABREVIATURAS

BL: Bacterias lácticas

CONAPESCA: Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca

DA: (Degree acetilation)

DCF: Desecho de camarón fermentado

DM: Desmineralización

DMAc: Dimetilacetoamida

DP: Desproteínización

FAL: Fermentación ácido láctica

kDa: Kilodaltones

PM: Peso molecular

QB: Quitina biológica

QPP: Quitina parcialmente purificada

QT: Quitosano

RMN: Resonancia magnética nuclear

TCA: Ácido tricloro acético

RESUMEN

Tradicionalmente la obtención de la quitina y su derivado principal el quitosano implica la DM (desmineralización), DP (desproteínización) y desacetilación química del desperdicio de camarón, utilizando ácidos y bases fuertes en altas concentraciones, lo que provoca la depolimerización y la pérdida de otros productos de valor agregado tales como proteínas y pigmentos. Por otra parte, en este trabajo se evaluaron cuatro proteasas comerciales (Protamex, HT Proteolitic, Deterzyme y Proteasa N) en la obtención de quitina. Para este propósito, las enzimas comerciales se incubaron individualmente con quitina parcialmente purificada obtenida de una FAL (fermentación ácido láctica) del desperdicio de camarón. La Proteasa N mostró mayor actividad sobre la quitina. Una vez seleccionada la proteasa se evaluaron diferentes niveles de pH, temperatura y concentración de enzima. Los mejores resultados fueron obtenidos a un pH 7.5 a 40°C con una concentración de enzima de 0.5% (p/p). Bajo estas condiciones se obtuvo hasta un 99.3% de DP, recuperando quitinas biológicas con un $0.85 \pm 0.16\%$ de contenido de proteína. El proceso de desproteínización enzimática de la quitina es un método económicamente atractivo, ya que evita altos gastos de energía, agua y reactivos. En conjunto con la FAL se tiene un tratamiento biológico para la purificación total de la quitina, evitando que esta sufra daños en su estructura, al mismo tiempo que se busca obtener quitinas con mínimos residuos de proteína. La quitina obtenida por desproteínización enzimática fue caracterizada y desacetilada químicamente para obtener quitosano que a su vez fue caracterizado.

ABSTRACT

The production of chitin involves chemical DM (demineralization) and DP (deproteinization) of the crustacean wastes and further deacetylation towards chitosan using strong acids and bases in high concentrations thus enhancing depolymerization and loss of other potential added value products such as protein and pigments. Alternatively, in this study four commercial proteases (Protamex, HT Proteolitic, Deterzyme and Protease N) were evaluated for chitin deproteinization. For this purpose, the commercial enzymes were individually incubated with partially purified chitin obtained from a previous lactic acid fermentation of shrimp waste. N Protease enzyme displayed highest activity on the waste. Similarly, different pH levels were evaluated, as well as temperature and enzyme concentration. The highest activity was found at pH 7.5 and at 40°C using enzyme concentration of 0.5% (w/w). Under the conditions tested it was obtained up to 99.3% of deproteinization, with a biological chitins having $0.85 \pm 16\%$ of protein content. The process of enzymatic deproteinization of crude chitin is economically attractive because it avoids high costs of energy, water and reagents. The combination of the (LAF) lactic acid fermentation to have a biological crude chitin and further enzymatic treatment for purification total chitin preserves from molecular structure damaging of chitin while having low protein contents. The chitin products were chemically characterized and subsequently carried out the chemical deacetylation towards chitosan which was also analyzed and characterized.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 La producción de camarón en México

México es la sexta potencia mundial en producción de camarón, ubicándolo como uno de los países más importantes en la producción de este crustáceo. La Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca (CONAPESCA) informó, que en el año 2010 se tuvo una producción de 149,000 toneladas de camarón en el país (Tabla 1) (www.siap.gob.mx). Del total de este producto aproximadamente un 45% se considera como desperdicio (cabeza y exoesqueleto), lo cual ha representado un problema ambiental (Cira y col., 2002) en zonas costeras.

Tabla 1. Producción de camarón en México por acuacultura y captura.

Año	Producción de camarón (miles de toneladas)
2000.....	80
2001.....	90
2002.....	87
2003.....	110
2004.....	113
2005.....	142
2006.....	161
2007.....	166
2008.....	180
2009.....	181
2010.....	149

Fuente: SIAP con cifras del Anuario Estadístico 2010 de la CONAPESCA.

Una alternativa de uso para el desperdicio de camarón producido es su procesamiento para la obtención de biopolímeros.

1.2 Biopolímeros

Los biopolímeros de origen marino han sido estudiados y utilizados durante varios años en aplicaciones comerciales y desarrollo de nuevos productos. Algunos de los biopolímeros utilizados actualmente en los ámbitos de la biomedicina y el farmacéutico son la quitina y el quitosano (F2103 – 01, 2007; F2260 – 03, 2008). Una de las fuentes de obtención de estos biopolímeros son a partir de cabezas de camarón que constituye aproximadamente un 45% del total de la producción de este crustáceo (Cira y col., 2002; Duarte de Holanda y Netto, 2006).

1.3 Quitina y quitosano

La quitina y su derivado principal, el quitosano, son biopolímeros con una gran diversidad de aplicaciones en 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).

1.3.1 Obtención de quitina

El exoesqueleto de camarón y cangrejo son las fuentes principales para la producción de la quitina a nivel comercial. Esta se encuentra asociada con proteínas, minerales, lípidos y pigmentos, que son removidos para alcanzar un alto grado de pureza necesaria para diversas aplicaciones (Percot y col., 2003; Pastor, 2004). Existen diferentes procesos de obtención de quitina, tales como los métodos químicos y biológicos. Dentro de estos últimos, se encuentra la FAL (fermentación ácido láctica) que se define como un proceso de conservación en el cual los ácidos producidos inhiben el crecimiento de patógenos, presenta ciertas ventajas respecto a los químicos, como el permitir la recuperación de productos con valor agregado como minerales, pigmentos y proteínas (Shirai y col., 2001;

Cira y col., 2002). Los procesos químicos involucran la DM (desmineralización) y DP (desproteización) con ácidos y bases fuertes y temperaturas moderadas. Sin embargo, el tratamiento químico puede causar la desacetilación parcial de la quitina e hidrólisis del polímero dando como resultado una quitina con propiedades físicas variables en el mismo proceso de obtención. Este método da lugar a desechos corrosivos, siendo necesaria su posterior neutralización (Peniche, 2006; Lárez, 2006; Flores-Albino, 2011).

1.3.2 Estructura de la quitina y quitosano

La quitina es un polímero lineal de residuos de *N*- Acetil glucosamina (D-GlcNAc) unidos mediante un enlace β -(1,4) que produce una estructura rígida no ramificada (Figura 1) (Pacheco, 2010). Se han detectado tres formas polimórficas α -, β - y γ -quitina. La alfa quitina, se presenta en disposición antiparalela, la beta en paralela y la gama presenta dos cadenas paralelas en un sentido y la siguiente en el sentido opuesto. La α -quitina es la más abundante y más estable, mientras que las otras dos se presentan en menos proporción (Ramírez y col., 2006).

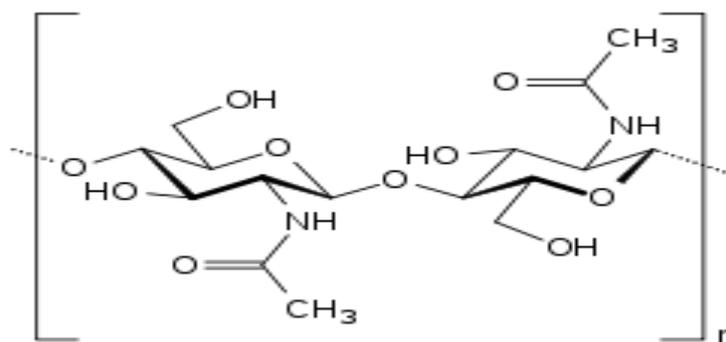


Figura 1. Estructura química de la quitina.

El quitosano es un polímero formado de residuos de *N*- glucosamina (D-GlcN) unidos por enlaces glicosídicos β -(1,4) (Lárez, 2006; Pacheco, 2010) (Figura 2), el cual se obtiene comercialmente por la *N*-desacetilación de la quitina, que se encuentra en el exoesqueleto del camarón, entre otras especies, por medio de un proceso alcalino (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 aplicaciones.

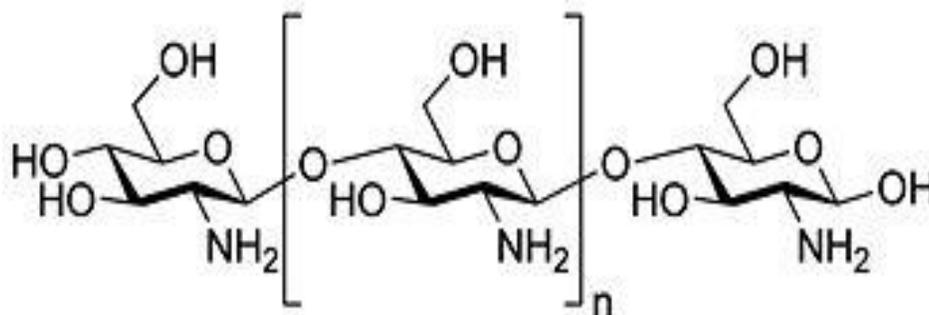


Figura 2. Estructura química del quitosano.

1.3.3 Obtención de la quitina y quitosano (método químico)

La quitina comercial se obtiene al realizar procesos sucesivos de DP en medio alcalino y de DM en medio ácido, lavando posteriormente hasta alcanzar pH neutro, sometiendo finalmente el producto a pruebas que definirán sus propiedades fisicoquímicas como DA (degree acetylation), PM (peso molecular), viscosidad, contenido de humedad y porcentaje de solubles en dimetilacetoamida y cloruro de litio (DMAc/LiCl) para quitinas y en ácidos diluidos para quitosanos (Pastor, 2004; Aye y Stevens, 2004; Pacheco, 2010).

La obtención del quitosano se lleva a cabo mediante la desacetilación de la quitina 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 (Peniche, 2006; Lárez, 2006).

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 DP y la FAL para la obtención de quitina (Cira y col., 2002; Synowiecki y col., 2003; Rao y Stevens, 2006).

1.4 FAL

Un método biológico para la obtención de la QPP (quitina parcialmente purificada) es la FAL que ofrece atractivas ventajas tales como bajos costos de inversión y dar un uso integral a los desperdicios de camarón ya que se pueden separar productos de alto valor comercial. Este proceso combinado con un tratamiento químico con ácidos y álcalis en concentraciones bajas se lleva a cabo para la purificación de la quitina, lo cual permite conservar un PM alto en el polímero, conocido como proceso biológico-químico (B-Q) (Pacheco y col., 2011). En este método se emplean BL (bacterias lácticas), Cira y col., (2002), utilizaron un inóculo de *Lactobacillus spp. B2* (aislado de desperdicios de mariscos), Pacheco y col., (2009) evaluaron el efecto de la temperatura sobre la recuperación de la quitina y la astaxantina a partir de desperdicios de camarón con *L. plantarum*, Duan y col., (2012) probaron diferentes BL, *L. plantarum*, *L. bulgavicus*, *L. delbruekii*, entre otras, en la FAL, obtuvieron los mejores resultados con *L. acidophilus SW01*, aislada a partir de residuos de camarón. Al término de la FAL se obtienen dos fracciones, una sólida que contiene a la quitina y una fracción líquida (licor) rica en proteína, minerales y pigmentos (Cira y col., 2002; Plascencia y col., 2002). En este proceso, las proteasas nativas y microbianas provocan la hidrólisis de las proteínas (DP) (Flores-Albino y col., 2012). Asimismo las BL producen ácido láctico durante la fermentación, esto contribuye a la DM, principalmente la hidrólisis parcial del CaCO_3 , dependiendo de la cantidad de fuente de carbono y de la concentración de inóculo, aumentando además la estabilidad del desperdicio de camarón (Shrinivas y col., 2005; Sini y col., 2007).

1.5 Proteasas

Las enzimas son catalizadores complejos, constituidos por proteínas globulares, que, aceleran la velocidad de las reacciones químicas en un factor de 10^{12} a 10^{20} respecto a las reacciones no catalizadas enzimáticamente (Fennema, 1985) dentro de las cuales encontramos a las proteasas. Las proteasas también conocidas como peptidasas, o enzimas proteolíticas constituyen el grupo más importante de las enzimas industriales frecuentemente usadas, teniendo múltiples aplicaciones en alimentos, farmacia y detergentes industriales, así como en la preparación de cuero y lana, entre otros. Las

enzimas proteolíticas producidas comercialmente son usadas en procesos como la elaboración de cerveza, ablandamiento de carne y elaboración de productos lácteos (González-Rábade y col., 2011). Las enzimas proteolíticas catalizan la hidrólisis de las proteínas con una alta especificidad y selectividad (Rao y col., 1998).

Las proteasas pueden ser clasificadas, por su origen, (animal, vegetal, bacteriano o fúngico), por su modo de acción (endo- o exo-actividad) o con base en su sitio catalítico. Las endoproteasas hidrolizan enlaces peptídicos dentro de la cadena de la proteína. Las exoproteasas, por el contrario, hidrolizan aminoácidos terminales de las proteínas o péptidos. El centro activo contiene aminoácidos o bien cationes metálicos que promueven la catálisis, denominándose serinproteasas, cisteinproteasas, aspartato proteasas, según los aminoácidos que intervengan (serina, cisteína o ácido aspártico). En las metaloproteasas la actividad está promovida por un catión metálico, siendo el zinc el más frecuente. Todas las serinproteasas tienen actividad endo en comparación con las metaloproteasas que son sobre todo exo-proteasas (Benítez y col., 2008; González-Rábade y col., 2011).

1.6 Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática está compuesta por un conjunto de tres reacciones simultáneas de ruptura de enlaces. Primero, la formación de un complejo enzima-sustrato (proteína), y después la ruptura del enlace peptídico dando como resultado la liberación de un péptido. Finalmente, el péptido restante se separa de la enzima después de un ataque nucleofílico de una molécula de agua (Benítez y col., 2008).

Un método alternativo para la hidrólisis de proteína y la obtención de quitina es la hidrólisis enzimática, utilizando enzimas comerciales (Duarte de Holanda y Netto, 2006; Valdez-Peña y col., 2010). Este método, en conjunto con la FAL podría usarse potencialmente para hidrolizar la proteína residual presente en la quitina obtenida del proceso fermentativo.

Uno de los efectos que tiene el uso de enzimas para la obtención de quitina es el impacto ambiental comparado con el método químico ya que no se utilizan reactivos químicos que dañan el medio ambiente (Kumar y col., 2004).

1.6.1 Condiciones de la hidrólisis

Muchos estudios han arrojado que la hidrólisis y sus productos a menudo se ven afectados por diferentes factores como porcentaje de enzima, tiempo de incubación, temperatura, pH, relación enzima-sustrato (Whitaker, 1972), así como el tipo de proteasa y la relación sustrato:volumen, las cuales definen el resultado de la reacción (Benítez y col., 2008; Cheung y Li Chan, 2010). Estos factores determinan la velocidad de reacción y pueden influir en la especificidad de la enzima (Benítez y col., 2008). De acuerdo al pH en que las enzimas presentan la mayor actividad, las proteasas se pueden clasificar en: proteasas ácidas, neutras y alcalinas. La mayoría de las proteasas comerciales, principalmente las neutras y alcalinas, son producidas por microorganismos que pertenecen al género *Bacillus*. Las proteasas ácidas tienen actividad en un intervalo de pH 2 a 6 (Rao y col., 1998). Las proteasas bacterianas neutras son activas en un estrecho intervalo de pH (5 a 8), en condiciones ácidas su actividad disminuye y son poco termoestables (Rao y col., 1998). Las proteasas bacterianas alcalinas se caracterizan por tener una alta actividad en un intervalo de pH de 8 a 13. Su temperatura óptima está alrededor de los 60°C (Rao y col., 1998). En este trabajo se evaluaron proteasas bacterianas neutras y alcalinas (Tabla 3).

1.6.2 Condiciones que afectan las reacciones enzimáticas

Las enzimas poseen una conformación natural estable, variaciones en su conformación suelen ir asociados a cambios con la actividad catalítica. Las reacciones catalizadas por las enzimas están influenciadas por una serie de parámetros experimentales. Algunos son la temperatura, pH, relación enzima:sustrato entre otros (Whitaker, 1972; Fennema, 1985).

1.6.3 Efecto del pH

La actividad enzimática muestra una dependencia significativa de los valores de pH del medio de reacción. Conforme el valor de pH aumenta, la actividad se incrementa hasta un máximo (pH óptimo) y decae a valores de pH extremos. El comportamiento que se presenta a diferentes valores de pH se debe a dos efectos: la participación directa de

grupos iónicos en los mecanismos catalíticos y la participación de los grupos cargados en la estabilización de la estructura de la proteína.

Los grupos iónicos frecuentemente se encuentran asociados con la catálisis enzimática, el estado de protonación es esencial para la reacción. Las desviaciones en los valores de pH óptimo alteran el estado de ionización de los grupos involucrados e inhiben los procesos catalíticos (Fennema, 1985; Bisswanger, 2008).

1.6.4 Efecto de la temperatura

De manera similar a las reacciones químicas, la velocidad de las reacciones catalizadas enzimáticamente se incrementa con la temperatura en un factor de 2^3 por cada 10°C . Conforme aumenta la temperatura, se transfiere más energía cinética a las moléculas reactantes, resultando en un mayor número de colisiones por unidad de tiempo, sin embargo este aumento también resulta en la disminución de la tasa de actividad causada por la termoestabilidad natural de la proteína (Fennema, 1985; Bisswanger, 2008).

1.6.5 Efecto de la concentración de enzima

La concentración de la enzima afecta principalmente en la velocidad inicial de la reacción. A mayor concentración de la enzima mayor actividad catalítica (mayor velocidad inicial), siempre y cuando haya suficiente sustrato, por lo tanto la velocidad inicial varía con la concentración del sustrato y enzima añadidos.

1.7 Propiedades físico-químicas de quitina y quitosano

Los polímeros naturales como la quitina y quitosano cuentan con diferentes propiedades físico-químicas como son el PM, el DA y el contenido de solubles (Pillai y col., 2009; Pacheco, 2010) que determinan en muchas ocasiones su aplicación, las cuales se ven afectadas por el método de obtención. En la Tabla 2 se muestran los intervalos de algunas de las propiedades generales de la quitina y quitosano.

Tabla 2. Propiedades generales de la quitina y quitosano.

Propiedad	Quitina	Quitosano
PM (g-mol ⁻¹)	1 x 10 ⁶ a 2.5 x 10 ⁶	10 ⁵ a 5 x 10 ³
DA	DA > 40	0 a 40
Humedad (%)	8 – 10	6 – 7
Solubilidad	DMAc-LiCl/TCA-MC	Ácidos diluidos

TCA (ácido tricloro acético), MC (diclorometano) (Pillai y col., 2009; Pacheco, 2010)

1.8 Aplicaciones de quitina y quitosano

A nivel comercial la quitina y quitosano son compuestos de gran interés, ya que son obtenidos de fuentes naturales, son biocompatibles, biodegradables y no tóxicos en comparación con los materiales sintéticos (Rabea y col., 2003). El proceso de manufactura puede influenciar en las propiedades y características de la quitina y quitosano como el DA y PM, variando su aplicación. La quitina tiene tres grupos funcionales reactivos, un grupo amino acetilado en C-2 y dos grupos hidroxilo en C-3 y C-5, cuando se lleva a cabo la obtención del quitosano se lleva a cabo la desacetilación del C-2 determinando el DA conforme al porcentaje de acetilos eliminados, el PM es determinado conforme al grado de depolimerización que ocurre en los diferentes tratamientos llevados a cabo (Tsigos y col., 2000; Pacheco, 2007). Algunas de las áreas de aplicación de la quitina y quitosano se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Aplicaciones de quitina y quitosano.

Ciencias de materiales	Biotecnología	Ciencias de los alimentos	Ciencias de la vida
<ul style="list-style-type: none"> • Fibras • Biosensores • Geles • Tejidos 	<ul style="list-style-type: none"> • Cosméticos • Tratamiento de aguas 	<ul style="list-style-type: none"> • Nutraceuticos 	<ul style="list-style-type: none"> • Medicina • Productos farmacéuticos • Agricultura • Biomedicina • Ingeniería de tejidos

(Tsigos y col., 2000; Gueddari, 2003; Lárez, 2006)

1.8.1 Biomateriales

Las características de estructura química y las propiedades físicas son especialmente importantes, ya que abre un gran campo de aplicaciones. En los últimos años se han elaborado biomateriales derivados de la quitina y quitosano, como microesferas, recubrimientos, fibras, nanofibras, películas, polvos, esponjas, soluciones, geles, tabletas, cápsulas, entre otros, muchos de estos biomateriales son usados en el área de alimentos, de cosméticos, farmacia y biomedicina. Algunas de las principales características con que debe de contar la quitina y quitosano para aplicaciones biomédicas es que los biomateriales sean: biodegradables, biocompatibles, bioadhesivos, renovables, antifúngicos, no tóxicos, antibacterianos, antialérgicos, antitrombogénicos, como agente hidratante, policatiónicos, entre otras (Rinaudo, 2008).

La ingeniería de tejidos es una rama dentro del área de ciencias de la vida, que va dirigida fundamentalmente a la estructura y función, desarrollando sustitutos biológicos para restaurar, mantener y mejorar las funciones de los tejidos. Dicho en otras palabras la ingeniería de tejidos, consiste en crear un reemplazo natural o sintético (prótesis), para restaurar, mantener o reparar la función de tejidos u órganos dañados (Kumar y col., 2004).

1.9 Proteínas presentes en el desperdicio de camarón

La aceptación de productos o subproductos pesqueros por parte del consumidor depende de varios factores en cuanto a calidad se refiere (Haard, 1992). Considerándose importante en este aspecto, el que un alimento o producto no represente riesgos en la salud del consumidor, ya que existen proteínas en los mariscos (camarones, langostas, cangrejos, etc.) como la tropomiosina y la miosina que provocan reacciones alérgicas a consumidores incluso mortales. Los mariscos son la causa número 1 de alergia alimentaría en adultos y niños (Ezquerro-Brauer y col., 2004; Ayuso y col., 2009). La proteína en el camarón se puede dividir en tres grupos principales: miofibrilares (proteína principal de la fibra muscular), sarcoplásmicas (ubicado en la región intersticial entre las fibras musculares individuales) y las del estroma (ubicado en el tejido conectivo) (Niammy y col., 2008). Sriket col., en el 2007 reportaron un contenido del 12 al 14% de proteína miofibrilar, de 6 a 8% de proteína sarcoplásmicas y de 0.2 a 3% de proteína

estromal, en carne camarón, siendo la colágena la fracción principal de la proteína del estroma (Sriket col., 2007).

1.9.1 Proteínas sarcoplásmicas

Este grupo lo constituyen las proteínas de la célula muscular que no están asociadas al aparato contráctil. Están formadas por una gran cantidad de proteínas solubles en agua, llamadas miógeno, también solubles en soluciones salinas de baja fuerza iónica, éstas se componen principalmente por mioglobina, cientos de enzimas y otras albuminas, son fundamentalmente enzimas responsables del metabolismo celular (Haard, 1992).

1.9.2 Proteínas miofibrilares

Las proteínas miofibrilares forman parte del aparato contráctil. Las proteínas miofibrilares que se encuentran en mayor proporción en el músculo de organismos marinos son la miosina, actina, tropomiosina. Este tipo de proteínas pueden ser extraídas con soluciones salinas concentradas como el KCl (Haard, 1992).

1.9.3 Proteínas del estroma

El residuo insoluble que queda después de remover las proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares es conocido como estroma; los principales tipos de proteína encontrados en esta fracción son el colágeno y la elastina, las cuales son proteínas pertenecientes al tejido conectivo (Haard, 1992; Ezquerra-Brauer y col., 2004; Niammuy y col., 2008).

2. ANTECEDENTES

Existen diferentes métodos para la obtención de quitina y quitosano, los cuales han sido estudiados en las últimas décadas, estos biopolímeros deben de cumplir con ciertas características físicas y químicas como lo es el PM, el DA y el contenido de proteína, características que suelen variar según la fuente del sustrato y el proceso de obtención de utilizado. El método utilizado tradicionalmente para la obtención de estos polímeros naturales es el químico, que consiste en la DM y DP del desperdicio de camarón empleando ácidos y álcalis como el HCl, HNO₃, H₂SO₄, entre otros y el NaOH, Na₂CO₃, Na₂SO₄ (Peniche, 20006; Lárez, 2006), respectivamente, se emplea acetona para la extracción de pigmentos como la astaxantina (Gimeno y col., 2007). Para la obtención de quitosano se realiza una desacetilación homogénea o heterogéneamente (NaOH o KOH del 40 al 65%) con calor en la cual se lleva a cabo la hidrólisis del grupo acetamida (Peniche, 2006; Nemtsev y col., 2002).

Se ha recurrido a métodos biológicos como la FAL en donde se emplean microorganismos (BL), proceso en el cual además de obtener quitina como producto principal, permite recuperar productos de alto valor comercial como proteínas y minerales, que por el método químico no son recuperados. Existen diversos autores que han estudiado este proceso para la recuperación de quitina, como el estudio publicado por Pacheco y col., (2009) quienes evaluaron diferentes temperaturas sobre la FAL (*L. plantarum*), observando que entre 30 y 40°C obtienen los mayores porcentajes de DP en el desperdicio de camarón (*Litopenaeus vannamei*) y entre 20 a 30°C no existe diferencia significativa para la extracción de astaxantina.

En el trabajo realizado por Flores-Albino y col., (2012) aplicaron el proceso de FAL en medio líquido para la obtención de quitina a partir de desperdicios de jaiba, utilizando melaza como fuente de carbono y un inóculo de *Lactobacillus spp. B2*, estos autores reportaron un 88% de DM, un 56% de DP, con un rendimiento de quitina del 34%, cabe mencionar que en este trabajo purifican la quitina con ácidos y álcalis obteniendo un producto final con un 95% de DA y con 0.81 y 0.12% de minerales y proteína respectivamente, combinando finalmente un método biológico con un químico.

Un factor importante a considerar es que la quitina obtenida por el proceso de fermentación contiene un remanente de proteína, el cual disminuye la aplicación de este polímero, ya que algunas proteínas causan reacciones alérgicas a consumidores (Haard, 1992).

Otro método biológico estudiado para la obtención de la quitina es el enzimático, donde se emplean enzimas comerciales principalmente proteasas para la DP directa del desperdicio de camarón (Duarte de Holanda, 2006), en donde estas enzimas en condiciones favorables de pH y temperatura realizan la mayor hidrólisis proteica posible. Algunos de los trabajos realizados sobre este proceso se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Estudios reportados sobre el uso de enzimas comerciales para la DP enzimática en desperdicios de camarón.

Substrato	Enzima	Concentración enzima (%)	Condiciones de reacción	DP (%)	Referencia
Desperdicio de camarón	Alcalasa	3.0	pH 8.5, 60°C	65	Duarte y col., (2006)
Desperdicio de camarón	Alcalasa	0.5	pH 8, 40 rpm, 6 h, 37°C, -0.2 bar	72.5	Valdez-Peña y col., (2010)
Desperdicio de camarón	Protamex	0.1	pH 6, 40°C, 140 rpm,	36.64	Juárez , (2010)
Desperdicio de camarón	Alcalasa	1.8	pH 8.25, 59.37°C, 84.42 min.	33.13	Dey S y Dora K., (2011)

Con base a los estudios mencionados anteriormente, en el presente trabajo se emplearon enzimas comerciales para la DP de quitina parcialmente purificada obtenida después de la FAL, con la finalidad de disminuir el contenido de proteína y sustituir la purificación química complementaria.

3. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, ha existido un gran interés en la búsqueda de nuevos métodos para la obtención de quitina y su principal producto el quitosano a partir del desperdicio de camarón, estos polímeros tienen una amplia área de aplicaciones en donde cada una de ellas requiere características específicas de PM, DA y contenido de proteína.

A pesar de que se han realizado estudios para la obtención de la quitina, estos han sido en su gran mayoría procesos termoquímicos, utilizando ácidos y álcalis que afectan la estructura de la quitina e. g. hidrólisis del polímero. Otro método de obtención de la quitina es la FAL, proceso biológico en donde se lleva a cabo la DM y DP de la quitina reduciendo en gran medida el uso de reactivos químicos. Sin embargo, en ambos procesos la quitina resulta con residuos de proteína la cual puede causar alergias a consumidores hipersensibles, motivo por el cual las áreas de aplicación para la quitina disminuyen. Se ha reportado que la quitina obtenida por FAL posee características estructurales, i.e. cristalinidad y PM diferentes a aquellas extraídas químicamente (Pacheco y col., 2011).

Por estos motivos, en este trabajo se ha propuesto combinar la FAL seguida de una DP con proteasas comerciales, las cuales hidrolizan las proteínas presentes en la quitina debido a su especificidad, en donde se buscará la obtención de una quitina totalmente biológica, sustituyendo al método químico por método biológico.

4. HIPÓTESIS

Las condiciones óptimas de pH, temperatura y concentración de enzima permitirán alcanzar los mayores porcentajes de desproteinización en la quitina parcialmente purificada, obteniendo quitinas por un método totalmente biológico, sustituyendo el método termoquímico.

5. OBJETIVOS

Objetivo General

- Evaluar la desproteínización utilizando proteasas comerciales en la purificación de quitina.

Objetivos Particulares

- Evaluar la actividad proteolítica de enzimas comerciales en desperdicios fermentados de camarón.
- Establecer condiciones de pH, temperatura y concentración de enzima para la desproteínización de desperdicios fermentados de camarón mediante una enzima comercial previamente seleccionada.
- Obtener y caracterizar quitosano a partir de quitina biológica.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo se llevó a cabo la obtención de QB (quitina biológica) y de QT (quitosano) a partir de desperdicios de camarón, llevando a cabo diferentes procesos (biológicos y químicos) como se muestra en la Figura 3.

6.1 Desperdicio de camarón

El desperdicio procesado en este trabajo consistió en una mezcla de cabezas y exoesqueletos de camarón (*Litopenaeus vannamei*) obtenido del mercado de pescados y mariscos La Nueva Viga (D.F, México). El desperdicio fue molido en una moledora de carne (Torrey 32-3, México), y almacenado en congelación (-20°C) para su caracterización y posterior uso en la FAL.

6.2 Microorganismo

El microorganismo utilizado en la FAL fue la cepa *Lactobacillus spp.* (B2), aislada de desperdicios de camarón tropical (Shirai y col., 2001), que fue cultivado y mantenido en agar MRS (Man, Rogosa and Sharpe) a 30°C, el inóculo se incubo a 30°C durante 24 h.

6.3 FAL de desperdicios de camarón

La FAL se llevó a cabo en un reactor tipo columna con capacidad de 80 Kg, en el cual se colocó la mezcla del desperdicio de camarón, 5% (v/p) de inóculo de *Lactobacillus spp.* (B2) y 10% (p/p) azúcar de caña, se mantuvo en una cámara de incubación a 30°C durante 120 h, según las condiciones reportadas por Cira y col., (2002). La fracción sólida que corresponde al DCF (desperdicio de camarón fermentado) fue enjuagada con agua corriente, secada, molida, tamizada (# 30, tamaño de partícula < 0.59 µm) y almacenada para su caracterización y utilización en la desproteínización enzimática, mientras que el licor fue desechado.

6.4 Proteasas comerciales

Las proteasas comerciales utilizadas para la hidrólisis de la proteína presente en la quitina fueron las siguientes:

- Protamex[®] (Novozymes): complejo de proteasas de *Bacillus*, desarrollado para la hidrólisis de las proteínas de alimentos (Kechaou y col, 2009; www.dsm.com; www.novozymes.com).
- HT Proteolitic[®] 200 (ENMEX): enzima proteolítica bacteriana neutra, grado alimenticio, derivada de *Bacillus subtilis variant*. La HT Proteolitic tiene su mayor actividad en un intervalo de pH 6.5 a 8 a 40°C, presenta actividad en un pH 5.5 a 9 y es estable en un rango de pH 5.5 a 10 manejando temperaturas menores a 50°C. A temperaturas mayores a 60°C, la enzima se inactiva (www.enmex.com.mx; www.deerland-enzymes.com).
- Deterzyme[®] L – 660 (ENMEX): proteasa alcalina bacteriana (*Bacillus licheniformis*), endopeptidasa estable a temperaturas elevadas en soluciones alcalinas, utilizada para la formulación de detergentes biológicos líquidos. Presenta una máxima actividad a pH 9 a 10, su máxima actividad es registrada a 70°C (www.enmex.com.mx; www.deerland-enzymes.com).
- Proteasa N (Sigma Aldrich): proteasa neutra de *Bacillus subtilis* (www.sigmaaldrich.com).

En la Tabla 5 se muestran las condiciones óptimas de pH y temperatura propuestas por los fabricantes.

Tabla 5. Condiciones óptimas de pH y temperatura propuestas por el fabricante.

Enzima	Organismo	pH	Temperatura (°C)
Protamex [®] (Novozymes)	Complejo de proteasas de <i>Bacillus licheniformis</i> y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	5.5 a 7.5	35 a 60
HT Proteolitic [®] 200 (ENMEX)	<i>Bacillus subtilis variant</i>	6.5 a 8	40
Deterzyme [®] L - 660 (ENMEX)	<i>Bacillus licheniformis</i>	9 a 10	70
Proteasa N (Sigma-Aldrich)	<i>Bacillus subtilis</i>	-----	-----

(www.dsm.com; www.novozymes.com, www.sigmaaldrich.com, www.enmex.com.mx; www.deerland-enzymes.com)

6.5 Determinación de actividad enzimática proteolítica

La actividad proteolítica determinada a las proteasas comerciales estudiadas se realizó utilizando como sustrato caseína al 1% (Anexo) disuelta en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.5, así como también una solución de TCA (ácido tricloro acético al 5%) (Kunitz, 1946), aplicando la siguiente ecuación.

$$Ucas = \left[\frac{(Abs\ muestra - Abs\ testigo)}{tiempo\ (min) * 0.001} \right] * Fd \dots \dots (1)$$

donde: Ucas = Unidad de actividad caseinolítica.

Fd = Factor de dilución.

Una unidad de actividad enzimática se define como “la cantidad de enzima que produce un cambio en la absorbancia a 280 nm de 0.001 por minuto en las condiciones descritas anteriormente” (Kunitz, 1946).

6.6 Obtención de quitina biológica (Desproteínización enzimática)

La desproteínización enzimática se llevó a cabo sobre el desperdicio de camarón fermentado, obtenido de la FAL, mediante la adición de las diferentes proteasas comerciales.

6.6.1 Efecto de las enzimas comerciales sobre la DP de la QPP

Para determinar el efecto que tiene cada una de las proteasas comerciales sobre la QPP, se prepararon soluciones al 0.1 y 1.2% de cada enzima a probar (Protamex, HT Proteolitic, Deterzyme y Proteasa N), se ajustó el pH con NaOH o HCl 0.1M, y se agitó suavemente. Se adicionó a la QPP conforme a las condiciones mencionadas en la Tabla 6, se incubó durante 8 h, se obtuvieron muestras en el tiempo inicial (0 h) y final (8 h) (los tratamientos se realizaron por triplicado), de la misma forma se corrieron muestras control. La enzima fue inactivada por calentamiento (~90°C, durante 10min), se filtró y enjuagó cada muestra con 100 ml de agua desionizada. La fase sólida fue secada a 30 °C durante 24 h y almacenada para su posterior análisis, obteniendo como producto final quitina biológica (Gildberg y Stenberg, 2001).

Tabla 6. Enzimas y condiciones probadas para el efecto de la DP de la QPP.

Enzima	pH	Concentración enzima (%) (p/p)	Temperatura (°C)
• Protamex [®] (Prot)	6.0		
• Proteasa N (Prot N)	7.5	0.1 y 1.2	40
• HT Proteolitic [®] 200 (HT)	6.0		
• Deterzyme [®] L – 660 (Det)	7.5		

Relación 1:12 (sustrato:volumen). Agitación 140 rpm.

6.6.2 Efecto del pH sobre la actividad de la enzima

Para determinar el efecto que tiene el pH sobre la actividad proteolítica, se siguió la metodología descrita anteriormente, variando únicamente los niveles de pH mostrados en la Tabla 6 y el amortiguador según el pH probado (Anexo). Esta prueba se realizó con la enzima que presentó mayor actividad (Proteasa N).

6.6.3 Efecto de la temperatura sobre la actividad enzima

Para determinar el efecto que tiene la temperatura sobre la actividad proteolítica, se siguió la metodología descrita en el apartado 6.7.1, variando únicamente los niveles de temperatura (30, 40, 50, 60 y 70°C) (Tabla 7). Esta prueba se realizó con la Proteasa N y pH 7.5, los cuales presentaron mayor actividad.

6.6.4 Efecto de la concentración de enzima sobre la DP de la quitina cruda

Para determinar el efecto que tiene la concentración de la enzima sobre la DP de la quitina cruda, se siguió la metodología descrita anteriormente, variando únicamente la concentración de enzima (0.5, 0.1, 1.2, 1.5 y 2%) (Tabla 7). Esta prueba se realizó con la enzima Proteasa N, pH 7.5 y temperatura de 40°C, los cuales presentaron mayor actividad en las determinaciones probadas anteriormente.

Tabla 7. Condiciones probadas para la DP de la QPP con proteasas comerciales.

Enzima	pH	Temperatura (°C)	Concentración enzima (%) (p/p)
• Proteasa N (Prot N)	3		
	5	30	0.1
	6	40	0.5
	7.5	50	1.2
	8	60	1.5
	9	70	2
	10		
	11		

Relación 1:12 (sustrato:volumen). Agitación 140 rpm.

6.7 Quitina purificada químicamente

Se purificaron 50 g de quitina obtenida de la FAL por método químico, realizando dos lavados con acetona grado industrial el primero con 750 ml durante 45 min con agitación constante y el segundo por 15 min con 400 ml de acetona, se dejó secar la quitina despigmentada después de haber tamizado (# 100, obteniendo partículas < 149 μm). Posteriormente se desmineralizó con HCl y se desproteinizó con NaOH conforme a las condiciones reportadas por Cira, (2000). Esta quitina fue utilizada para determinar el porcentaje de nitrógeno de quitina (nitrógeno no proteico) (Black y Schwartz, 1950).

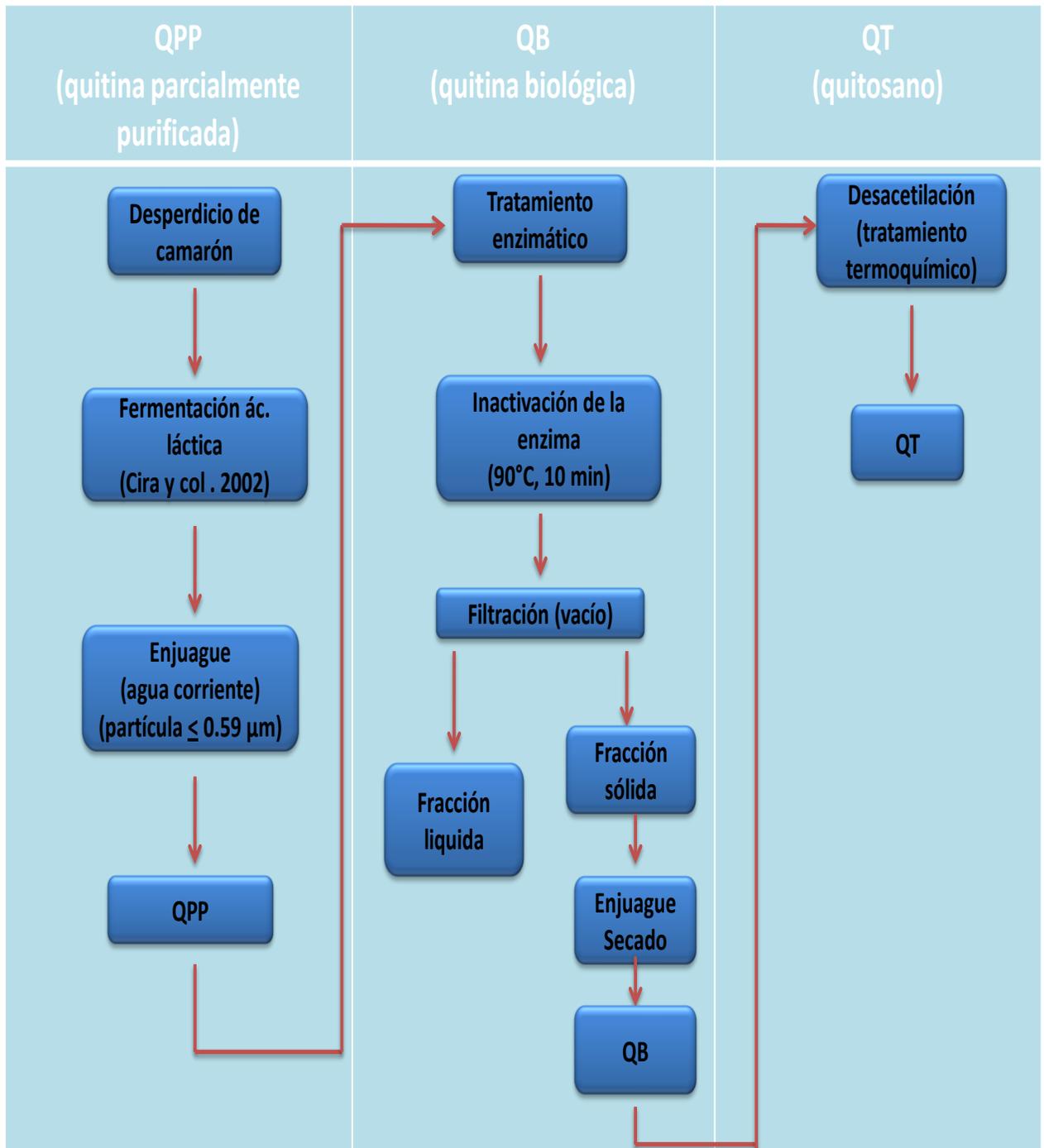


Figura 3. Diagrama para la obtención del desperdicio de camarón fermentado, QB y QT a partir de desperdicio de camarón.

ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN

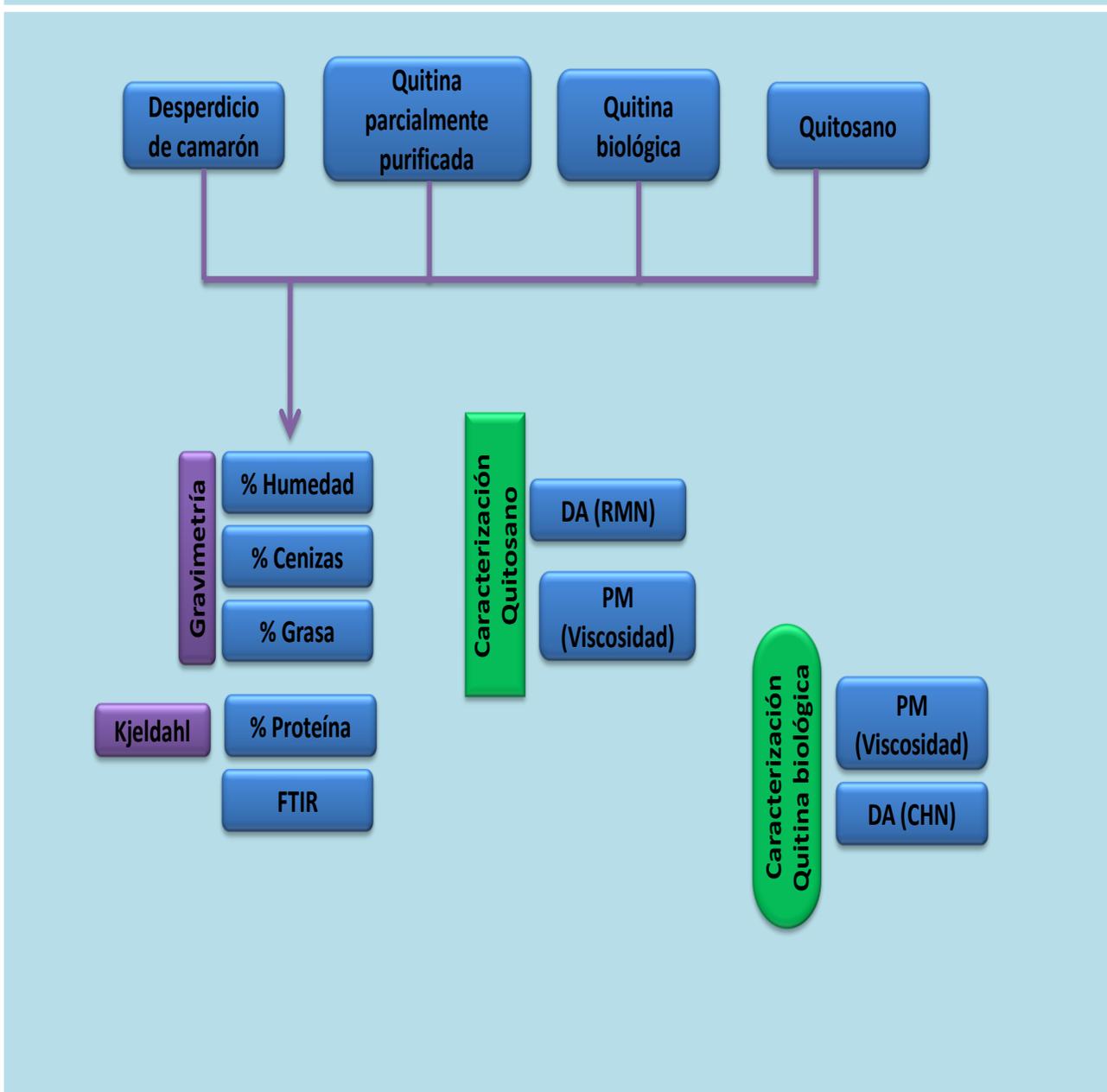


Figura 4. Diagrama de análisis químico y caracterización para el desperdicio de camarón, QPP, QB y QT.

7. ANÁLISIS DE MUESTRAS

Se llevó a cabo el análisis químico proximal y la caracterización de los diferentes productos obtenidos de cada proceso al igual que del sustrato (desperdicio de camarón). Los análisis realizados a cada producto se muestran en la Figura 4.

7.1 Determinación del contenido de humedad (%H)

El porcentaje de humedad se determinó después de secar aproximadamente 2g de muestra en charolas de aluminio durante 24h a 105°C hasta alcanzar peso constante en una estufa con temperatura controlada, calculando el porcentaje por diferencia de pesos con la ecuación 2 (AOAC, 1990; F2103 – 01, 2007).

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

7.2 Determinación del contenido de cenizas (%C)

El porcentaje de cenizas se determinó después de la combustión de aproximadamente 2g de muestra en crisoles a peso constante, en una mufla a 650°C, durante 6 h (hasta llegar a peso constante), por diferencia de pesos, los quitosanos usados en aplicaciones biomédicas tienen bajo contenido de cenizas (Ecuación 3) (AOAC, 1990; F2103 – 01, 2007).

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

7.3 Determinación del contenido de grasa (%G)

El porcentaje de grasa se determinó con la cuantificación de sustancias extraíbles con éter de petróleo, aplicando la siguiente ecuación, mediante la técnica de Soxhlet (VEPL Scientifica SER 148/6, Italia) (AOAC, 1990).

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

7.4 Determinación de nitrógeno total y nitrógeno proteico

El nitrógeno total fue determinado por el método de Kjeldahl (Büchi K-424 y B-339, Suiza), llevando a cabo una combustión en base seco 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).

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

El porcentaje de nitrógeno proteico se determinó por el método de Kjeldahl restando el nitrógeno de quitina al nitrógeno total y multiplicado por 6.25 (Cira y col., 2002).

7.5 Determinación de solubles en ácido acético glacial 0.1M (QT) y en N, N,-dimetilacetamida/cloruro de litio (5%) (QB)

El porcentaje de solubles de la QB obtenida se calculó disolviendo 0.1 g de quitina en 25 ml de una solución de N, N,-dimetilacetamida (DMAc) con cloruro de litio al 5% (Shrinivas y col., 2005), durante 72 h, aplicando calor (50°) esporádicamente, con agitación constante a temperatura ambiente, posteriormente se filtró con membranas de nailon y se secaron a 100°C durante 24 h, por diferencia de pesos se determinó la cantidad de quitina disuelta.

El porcentaje de solubles del QT se calculó disolviendo 0.1 g en 25 ml de una solución de ácido acético glacial (0.1M) durante 72 h, con agitación constante a temperatura ambiente, posteriormente se filtró con papel filtro de celulosa (0.45 micras) y por diferencia de peso se determinó la cantidad de quitosano soluble (Shrinivas y col., 2005).

7.7 Determinación de DA

Se determinó el DA de la quitina biológica obtenida por medio de la relación carbono – nitrógeno (C/N) por análisis elemental mediante la ecuación 6 (Kasaai y col., 2000).

$$DA = \frac{C/N - 5.145}{6.861 - 5.145} * 100 \dots \dots (6)$$

La determinación de DA del quitosano se determinó por RMN (resonancia magnética nuclear) de protón (^1H RMN), el quitosano fue disuelto en una solución de agua deuterada con HCl (1% p/p) mediante agitación magnética durante 48 h, los espectros se obtuvieron de un espectrómetro Bruker CA 300 (Heux y col., 2000; Pacheco y col., 2008).

7.7 Determinación del PM mediante viscosidad intrínseca $[\eta]$

QB

Muestras de QB de 0.1g fueron disueltas en una solución de DMAc/LiCl (5%) (Shrinivas y col., 2005; Pacheco, 2007; Mao y col., 2007). Los parámetros se determinaron con la ayuda de la ecuación 7 (Mark – Houwink-Sakurada) y las constantes determinadas a y k para el disolvente empleado (Shrinivas y col., 2005; Pacheco 2007; Mao y col., 2007).

$$[\eta] = k \text{ PM}^a \dots \dots (7)$$

Constantes

$$k = 2.4 \times 10^{-4} \frac{\text{L}}{\text{g}}$$
$$a = 0.69$$

QT

Muestras de quitosano de 0.1g fueron disueltas en una solución de ácido acético glacial (2%) y acetato de sodio (0.2M). Los parámetros se determinaron con la ayuda de la ecuación 7 de Mark – Houwink-Sakurada y las constantes determinadas a y k para el disolvente empleado fueron las siguientes (Shrinivas y col., 2005; Pacheco, 2007; Mao y col., 2007).

Constantes

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

7.8 Análisis por espectrofotometrias de infrarrojo (FTIR)

Los espectros infrarrojo de las siguientes muestras (tamaño de partícula < 0.59 μm): desperdicios de camarón, QPP, QB, quitina pura obtenida por método químico y QT obtenido a partir de quitina biológica, fueron obtenidos de un sistema ATR equipado con un cristal de zinc y selenio (Spectrum 100 ATR FTIR Perkin Elmer, Estados Unidos) aplicando 16 escaneos por muestra.

7.9 Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos a un análisis estadístico de comparación múltiple de medias por Duncan con el fin de determinar diferencias significativas entre las enzimas comerciales, pH, temperaturas y concentración de enzima ($\alpha \leq 0.05$) para la hidrólisis proteica (SPSS 15.0).

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 FAL

En este trabajo se llevaron a cabo tres FAL dos con una carga de 6.5 Kg y una de 50 Kg, adicionando 5% de inóculo (*Lactobacillus spp. (B2)*) y 10% de azúcar de caña como fuente de carbono condiciones reportadas por Cira y col., (2002). Los resultados reportados más adelante son el promedio de dos FAL de 6.5 Kg comparados con los resultados obtenidos de la FAL de 50 Kg de desperdicio de camarón.

8.1.1 Cinética de pH y producción de ácido láctico

Los cambios en los valores experimentales de pH obtenidos en el licor de las FAL durante las 120 h del proceso, se muestran en la Figura 5. Como se puede observar el pH inicial para las FAL se reporta a las 24 h ya que a las 0 h no se produjo lixiviación. El pH de las FAL de 6.5 Kg inicia en 5.63 ± 0.028 a las 24 h, el cual va disminuyendo constantemente hasta llegar a un pH final de 4.43 ± 0.14 a las 120 h. Los valores son similares a los obtenidos en la FAL de 50 Kg la cual tiene un pH inicial de 5.21 ± 0.02 y un pH final de 4.90 ± 0.03 , cabe mencionar que esta FAL tuvo una duración de 168 h sin presentar algún cambio significativo en pH. Se determinó el pH inicial (0h) y final (120 h) en la fase sólida de ambas FAL. El pH inicial para la FAL de 6.5 Kg fue de 7.41 ± 0.02 y el pH final fue de 4.69 ± 0.07 , la FAL de 50 Kg tuvo un pH inicial de 7.92 ± 0.02 y un pH final de 4.58 ± 0.0 , en ambas FAL se observó la disminución de pH, lo nos indica la acidificación en la fase sólida.

La mayor acidificación alcanzada por Cira y col., (2002) se obtuvo a las 96 h reportando un pH 4.5 en la fracción sólida de la FAL, pH similar a los mencionados en este trabajo.

Pacheco y col., (2009) realizaron FAL de 3.5 Kg, utilizando condiciones similares a las empleadas en este trabajo, en donde evaluaron diferentes temperaturas sobre el proceso fermentativo (15 a 45°C), obtuvieron que entre 30 y 40°C se presentaron los valores de pH más bajos. A 30°C reportaron un valor de pH de 4.4 aproximadamente en la fracción líquida después de las 144 h de la FAL de desperdicio de camarón, valor que es muy similar al obtenido en este estudio.

Este efecto en el pH, se debe a que durante el proceso fermentativo existe la producción de BL, las cuales tienen la capacidad de fermentar carbohidratos y son productoras de ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico como primer producto de FAL (Ringo y Gatesoupe, 1997; Shirai, 2001), el cual es el principal responsable de la disminución de pH. La producción de BL y la disminución del factor de pH provocan la reducción e incluso inhiben el crecimiento de muchos microorganismos patógenos y la flora indeseable, lo que ayuda a la preservar la materia prima (Cira, 2000).

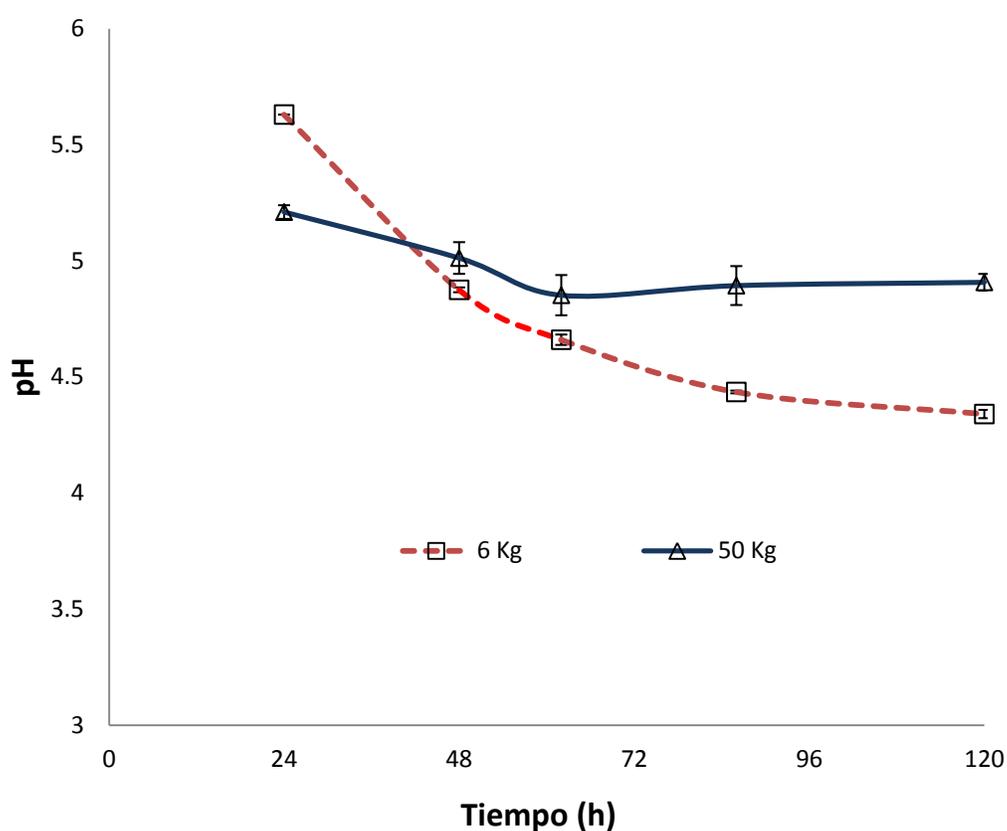


Figura 5. Evolución del pH durante el proceso de la FAL determinada en licores de 6.5 y 50 Kg de desperdicio de camarón.

La producción de ácido en la fermentación tiene un doble efecto sobre el sustrato: el conservar el desperdicio por la disminución del pH, y el de disolver el carbonato de calcio (CaCO_3), el cual está presente en las cabezas y exoesqueleto del crustáceo, aparte de contener quitina y proteína, por lo tanto de esta manera se logra un cierto grado de purificación de la quitina (Cira, 2000).

Los resultados de la variación de ácido láctico durante el proceso de fermentación se muestran en la Figura 6, en donde los valores iniciales de ácido láctico (mmol/g) para las FAL de 6.5 y 50 Kg son de 0.10 ± 0.004 y 0.18 ± 0.014 (mmol/g) respectivamente en los cuales se observa un aumento constante y similar entre las dos fermentaciones hasta las 120 h tiempo en que se observa la mayor acidificación del medio. Los valores finales de ácido láctico son 0.29 ± 0.03 y 0.28 ± 0.01 (mmol/g) respectivamente lo que ayuda a la estabilidad del producto fermentado. Pacheco y col., (2009) reportaron entre un 0.3 a 0.35 mmol/g de ácido láctico, empleando temperaturas de 30, 35 y 40°C a las 144 h del proceso, valores similares a los obtenidos en este trabajo.

Sin embargo Cira y col., (2002) reportaron 0.45 mmol/g de ácido láctico a las 96 h de fermentación del desperdicio de camarón empleando las mismas condiciones, comparado con los datos de este trabajo la cantidad de ácido láctico producido es menor en las fermentaciones de 6.5 y 50 Kg, este resultado se vio reflejado en los porcentajes de DM mencionados más adelante.

Duan y col., (2012) realizaron la FAL de desperdicio de camarón logrando un descenso de pH 6.5 a pH 3.86 y 0.46 mmol/ml de ácido acético a las 24 h del proceso, empleando la bacteria láctica *L. acidophilus* cultivada en MRS, valores obtenidos en menor tiempo que los obtenidos de este trabajo. Cabe mencionar que las condiciones que ellos utilizaron fueron más exigentes que las reportadas en este estudio (37°C, 15% (p/p) de glucosa, 2.5% (p/p) de inóculo, 10% (p/p) de agua y 15 rpm).

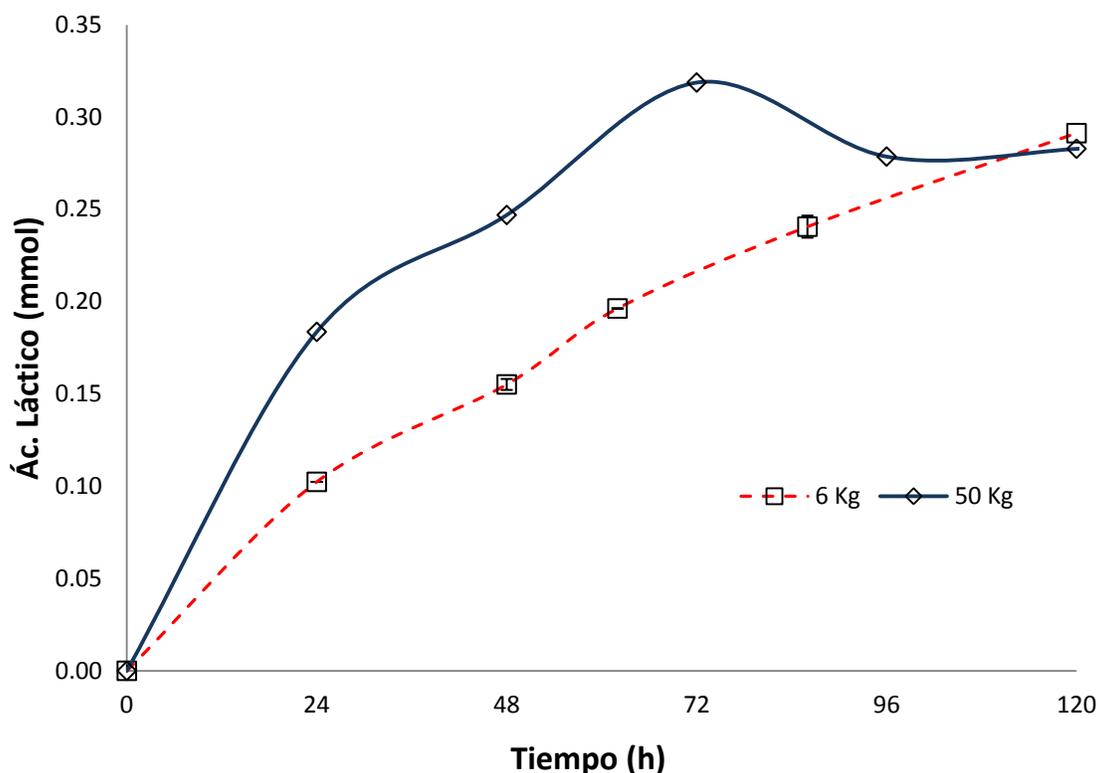


Figura 6. Evolución en la producción de ácido láctico durante el proceso de la FAL de 6.5 y 50 Kg de desperdicio de camarón.

8.1.2 DM y DP del desperdicio de camarón mediante FAL (6.5 y 50 Kg)

Para la FAL de 6.5 Kg el porcentaje de cenizas decreció de $20.31 \pm 1.48\%$ a $10.18 \pm 0.03\%$, lo que equivale a una DM de $49.88 \pm 0.17\%$ a las 120 h del proceso fermentativo, mientras que en la FAL de 50 Kg las cenizas decrecieron de $17.07 \pm 0.72\%$ a $12.45 \pm 0.08\%$, lo que equivale a una DM de 27.05% a las 120 h de fermentación. Al realizar un lavado con agua corriente al desperdicio de camarón fermentado, los porcentajes de DM y DP aumentan ya que al enjuagarse se lograron remover los minerales y proteínas solubilizadas en el proceso de fermentación que se encontraban en el desperdicio de camarón fermentado pero no unidas al él, obteniendo como producto final de esta fase QPP. Por lo tanto los porcentajes de DM y DP para los desperdicios de camarón

fermentados y enjuagados son: 71.09 ± 0.18 y 94.95% respectivamente para la FAL de 6.5 Kg, y para la FAL de 50 Kg los valores de DM y DP son 62.52 y 97.79% (Tabla 8).

Como se mencionó anteriormente, el efecto que se observó en la baja producción de ácido láctico en las FAL, repercutió en los porcentajes de DM. Observándose los valores de DM de la Tabla 8, se puede establecer que estos están por debajo de los reportados por los otros autores sea que el desperdicio de camarón fermentado haya sido enjuagado o no. Por lo tanto la cantidad de ácido láctico producido no fue suficiente para conseguir una remoción más alta de minerales, ya que el ácido producido reacciona con el CaCO_3 presente y lo solubiliza (Shirai y col., 2001), produciendo la purificación parcial de la quitina, por lo tanto cuanto mayor sea la cantidad de ácido láctico que se produzca mayor será el porcentaje de DM (Pacheco y col., 2009).

Los procesos de DM y DP se encuentran fuertemente asociados debido ya que la producción de ácido láctico lleva a cabo la remoción de carbonatos y disminución de pH, lo que ayuda a que las BL predominen en el sustrato, evitando el desarrollo de otros microorganismos indeseables. Las BL tienen un complejo equipo proteolítico que pueden presentar proteasas o peptidasas. Este tipo de proteasas se encuentran ligadas a la membrana por medio de calcio y cuando este se encuentra en bajas concentraciones hay una liberación de la enzima.

Por otra parte, los valores de DP en las FAL estudiadas fueron similares a los reportados por Cira y col., (2002) y por Pacheco y col., (2009), valores que aumentaron al momento de lavar el desperdicio fermentado, logrando remover las proteínas que se encontraban solubles en dicho desperdicio, lo cual nos indicó que las BL endógenas del camarón presentaron una buena actividad proteolítica.

Tabla 8 . Porcentajes de DP y DM obtenidos en la FAL de 6.5 y 50 Kg.

Fermentación	DM (%)		DP (%)	
	DCFS/E	DCFC/E	DCFS/E	DCFC/E
Este trabajo (reactor 6.5 Kg)	49.88 ± 0.17	71.09 ± 0.18	73.48	94.95
Este trabajo (reactor 50 Kg)	71.6	82.58	88.43	97.79
Cira y col. (2002) (reactor 2 y 30 Kg)	85	ND	87.6	ND
Pacheco y col. (2009) (reactor 3.5 Kg)	87	ND	91	ND

S/E (desperdicio de camarón fermentado sin enjuague); C/E (desperdicio de camarón fermentado enjuagado)
ND (No determinado)

8.2 Análisis químico proximal

Por otra parte se determinó la composición química en base seca del desperdicio de camarón, desperdicio de camarón fermentado y de la QPP. Los resultados promedio del análisis químico proximal se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Análisis químico proximal del desperdicio de camarón, desperdicio de camarón fermentado y QPP.

	Humedad (%)	Peso seco (Kg)	Minerales		Grasa		Proteína	
			(%)	(Kg)	(%)	(Kg)	(%)	(Kg)
DC (50 Kg)	76.37	11.81	17.07	2.01	18.43	2.17	30.8	3.63
DCF (10.4 Kg)	55.75	4.60	12.45	0.57	5.78	0.68	7.41	0.34
QPP (1.6 Kg)	4.72	1.59	22.43	0.35	1.83	0.029	3.93	0.062

Todos los resultados son la media de tres determinaciones en base seca, expresadas como masa o porcentaje. DC: Desperdicio de camarón. DCF: Desperdicio de camarón fermentado. QPP: Quitina purificada parcialmente.

El desperdicio de camarón estuvo constituido principalmente por proteína 30.8%, seguido de un 17.07% de cenizas y de un 18.43% de grasa. Porcentajes similares se han encontrado en otros trabajos (Shirai y col., 2001; Shrinivas y col., 2005), donde se ha observado que los desperdicios de camarón están constituidos por compuestos de valor comercial como la quitina (8 al 10%), proteínas (30 al 45%), y minerales como el calcio (de 10 al 20%), porcentajes que pueden variar según la especie utilizada. La proteína es el principal producto que busca eliminarse a lo largo de estos procesos, observándose que durante su transcurso, el contenido de proteína al igual que de los demás componentes va disminuyendo. La proteína que se ha logrado remover durante el proceso de fermentación es de tipo sarcoplásmica y miofibrilar tipos de proteína que no se encuentran fuertemente unidas a la estructura de la quitina (Niammuy y col., 2008). El 3.93% de proteína restante que se encuentra presente en la QPP generalmente sería de tipo estromal, proteína que se buscó hidrolizar con las enzimas comerciales mencionadas más adelante.

En este mismo sentido se observó una disminución importante en el contenido de grasas, cenizas y proteína, en los productos obtenidos al término de cada proceso, comprobando el efecto que produce la FAL sobre el contenido de estos compuestos, reduciendo el contenido de proteína desde un 30.8% hasta un 7.4%. Igualmente se aminoraron estos subproductos después de realizar el lavado del desperdicio de camarón fermentado con agua corriente, este efecto se debió a los remanentes de grasas, minerales y proteínas en la fase sólida de la FAL, que no se encontraban unidos covalentemente a la estructura de la quitina, ya que estos fueron removidos por el efecto de la fermentación, pero no fueron arrastrados junto con el licor, problema que se resolvió realizando el lavado con agua, arrastrando consigo los subproductos solubles y obteniendo así la QPP. Al mezclar la enzima comercial con la QPP, esta reaccionará directamente con las proteínas unidas a la estructura de la quitina.

La quitina pura que se obtuvo por método químico, presentó valores de 0% de grasa, 0.12% de cenizas y un 5.92% nitrógeno siendo este último valor el más importante, por ser un punto de comparación para la determinación de la proteína residual en el proceso biológico.

La QPP obtenida de la FAL de 50 Kg fue la utilizada como sustrato para la DP con las enzimas comerciales.

8.3. Determinación de actividad proteolítica en las enzimas comerciales

Existen diferentes métodos para determinar la actividad de las enzimas proteolíticas, que utilizan proteínas y compuestos sintéticos como sustratos. Las proteasas tienen la capacidad de hidrolizar pequeñas moléculas sintéticas. Un método ampliamente utilizado se basa en el cambio en la solubilidad de una proteína en TCA cuando se somete a la acción de una enzima proteolítica. Dos proteínas usadas comúnmente como estándares son la: caseína y hemoglobina desnaturalizadas. Cuando una enzima proteolítica actúa sobre la proteína, el promedio de péptidos solubles producidos está en proporción a la cantidad de enzima y el tiempo de acción (Whitaker, 1972).

Los resultados de las actividades proteolíticas de las enzimas comerciales utilizando como sustrato caseína, se muestran en la Tabla 10. La máxima actividad se presentó con la enzima Proteasa N (72.56 U/ml), mientras que la menor actividad estimada en este ensayo fue de 4.49 U/ml con la enzima comercial Protamex. El fabricante reporta 8.66 U/mg (*una unidad como la cantidad de enzima que hidroliza la cantidad necesaria de caseína para producir 1 mol (181 g) de tirosina por minuto a pH 7.5 a 37°C*).

Tabla 10. Actividad de proteasas comerciales determinadas a pH 7.5 y 30°C.

Enzima	UCas (U/ml)
Protamex [®]	4.29 ± 1.47
HT Proteolitic [®] 200	9.44 ± 0.30
Deterzyme [®] L - 660	45.75 ± 1.79
Proteasa N	72.56 ± 4.94

Una unidad de actividad enzimática se define como “la cantidad de enzima que produce un cambio en la absorbancia a 280 nm de 0.001 por minuto en las condiciones descritas” (Kunitz, 1946).

Ucas (unidad de actividad caseinolítica)

Autores como Duarte y col., (2006) Dey y Dora, (2011) y Cheung y Li-Chang, (2010) utilizaron otras enzimas para la DP de desperdicios de camarón como Protamex, Alcalasa, Flavourzyme y Neutrasa y reportaron la menor actividad de hidrólisis proteolítica con Protamex.

8.4. DP de la QPP con enzimas comerciales

8.4.1 Efecto de las enzimas proteolíticas comerciales para la DP de la QPP

Se evaluó el efecto de las enzimas comerciales Proteasa N (Sigma), Deterzyme y HT Proteolitic (ENMEX) y Protamex (Novozymes) (40°C y pH 7.5), sobre la QPP obtenida de la FAL de 50 Kg, para determinar cuál de ellas causa el mayor porcentaje de DP sobre el desperdicio de camarón.

Los resultados de este ensayo se pueden observar en la Figura 7, donde se muestran los porcentajes de proteína residual después de la hidrólisis con las proteasas comerciales.

La enzima comercial Proteasa N en una concentración del 1.2% (p/p) presentó a las 8 h de reacción la mayor actividad proteolítica, conteniendo solamente $0.85 \pm 0.16\%$ de proteína presente en la muestra, lo que lleva a un $99.28.4 \pm 0.95\%$ DP en la QPP, recordando que el contenido inicial de proteína en la QPP fue de 3.93%. A una concentración de enzima de 0.1% la Proteasa N desproteinizó el $95.92 \pm 1.04\%$ de proteína, no hidrolizando el 1.25 ± 0.32 de proteína presente en la QPP. Se encontró diferencia significativa con estas dos concentraciones ($\alpha \leq 0.05$).

La enzima comercial Deterzyme hidrolizó el $96.52 \pm 1.34\%$ y $96.13 \pm 1.52\%$ de la proteína presente en la muestra en una concentración de 0.1 y 1.2% (p/p) respectivamente, la proteína no hidrolizada por esta enzima en ambas concentraciones fue de $1.13 \pm 0.44\%$, se realizó un análisis estadístico de comparación de múltiple de medias por Duncan ($\alpha \leq 0.05$) no encontrando diferencia significativa entre estas dos concentraciones.

HT Proteolic hidrolizó el $93.85 \pm 1.02\%$ y el $94.40 \pm 0.43\%$ de la proteína total presente en la QPP, mostrando que no había diferencia significativa entre concentraciones ($\alpha \leq 0.05$). La enzima que arrojó el menor porcentaje de DP ($91.87 \pm 0.94\%$) fue Protamex al 0.1% y un $95.35 \pm 0.68\%$ DP con la concentración de 1.2%, con diferencia significativa ($\alpha \leq 0.05$).

Estos resultados concuerdan con las unidades de actividad enzimática determinadas en este trabajo, donde la mayor actividad calculada fue de 72.5 UCas para la enzima Proteasa N, 45.7 UCas para Deterzyme, 9.4 UCas con HT Proteolitic y 4.29 UCas con Protamex.

Valdez-Peña y col., (2010) realizaron un barrido de enzimas (Alcalasa, Flavorzyme, Lisozima, Papaina y Tripsina) para determinar el porcentaje de DP en camarón, utilizando una relación de 1:20 (S:E) en un amortiguador de fosfatos 0.2M (pH 8), incubando durante 6 h a 37°C a 40 rpm, obteniendo los mejores resultados con la enzima Alcalasa al 0.5%.

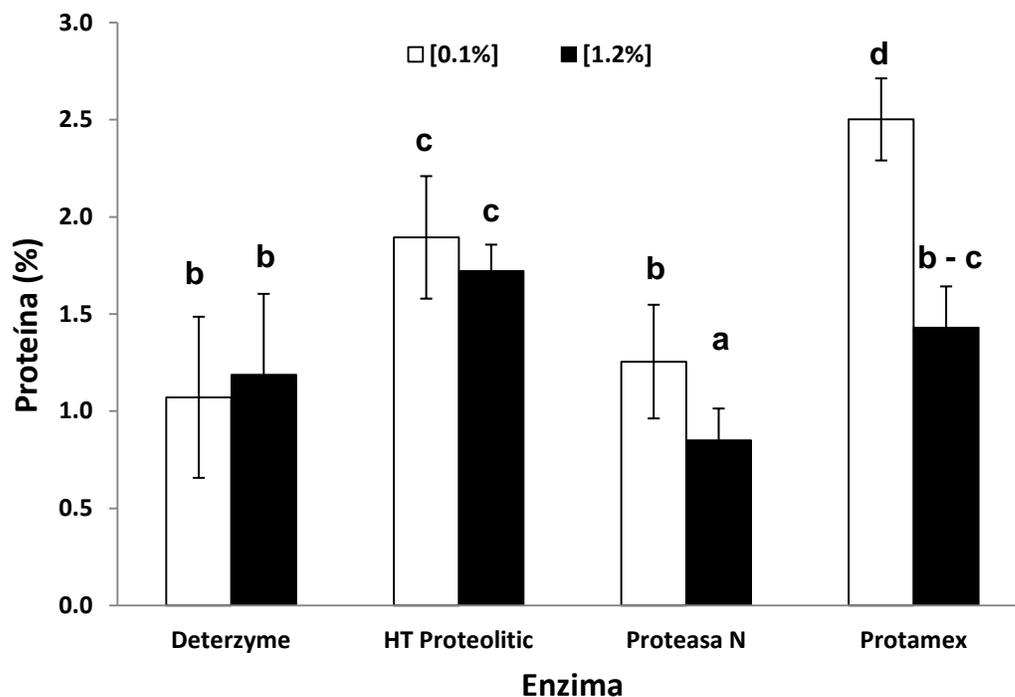


Figura 7. Efecto de las enzimas comerciales a 0.1% y 1.2% p/p sobre la QPP. Letras diferentes indican diferencia significativa entre las medias de dos determinaciones ($\alpha \leq 0.05$).

La enzima hidroliza la proteína restante que se encuentra unida covalentemente a la estructura de la QPP, principalmente proteína del tipo estromal, que no fue removida (sarcoplásmica y miofibrilar) durante el proceso de fermentación y el lavado con agua corriente. La proteína hidrolizada durante el tratamiento enzimático, es solubilizada y por

lo tanto se encuentra en el medio líquido de la reacción, la cual es retirada fácilmente llevando a cabo una filtración o una centrifugación. Para asegurar que restos de la proteína soluble no permanecieran en la fase sólida, se realizó un filtrado y posteriormente un lavado con agua desionizada.

El contenido de minerales no disminuyó con la QB obtenida después del tratamiento enzimático, manteniéndose en $23.49 \pm 0.28\%$ aproximadamente. El contenido de minerales del sustrato fue similar a lo reportado por Valdez-Peña y col., (2010) donde encontraron que durante el tratamiento enzimático del desperdicio de crustáceos no se lleva a cabo la descalcificación por la proteasa comercial utilizada (Alcalasa).

El sitio catalítico de las proteasas se encuentra rodeado por subsitios de especificidad, cada uno capaz de acomodar una cadena lateral de un residuo único de aminoácidos a partir del sustrato (Rao y col., 1998). La especificidad de las enzimas está determinada por requerimientos estrictos de pH y temperatura, que permitan la unión entre la enzima y el sustrato, los cuales deben de ser permanentes para convertir el sustrato en producto (Withaker, 1972).

Hasta el momento, no se encuentran trabajos en la literatura en donde la Proteasa N sea utilizada para la DP del desperdicio de camarón y de igual manera no se han reportado enzimas comerciales que actúen en la DP de la QPP. Basándose en estos resultados se seleccionó la enzima comercial Proteasa N para el siguiente ensayo que fue la selección de pH.

8.4.2 Efecto de pH sobre la actividad de la Proteasa N en la DP de la QPP

La Figura 8 muestra el contenido de proteína en la QB después del proceso enzimático. Todos los niveles de pH presentaron actividad, observándose valores mayores a pH 7.5, alcanzando un $99.31 \pm 0.37\%$ DP con un contenido de proteína de 0.85 ± 0.17 en la QB. Con los demás niveles de pH se alcanzaron hasta un $95.68 \pm 0.02\%$ de DP con un contenido de proteína de $1.32 \pm 0.008\%$ en la QB, estos niveles de pH no presentaron diferencias significativas entre ellos ($\alpha \leq 0.05$) pero si presentan diferencia significativa con el pH de 7.5. Potier y col., (2001), realizaron un barrido de pH para evaluar la

actividad de la Proteasa N para la síntesis de carbohidratos (principalmente sucrosa), encontrando un pH óptimo de 7.8, ya que cuando evaluaron al catalizador por encima de este pH su actividad disminuyó drásticamente.

Por lo tanto y de acuerdo a los valores obtenidos en este trabajo, se puede establecer que el pH de 7.5 es el óptimo para la actividad de la Proteasa N sobre la QPP, lo que indica que puede ser clasificada como una proteasa neutra. Las proteasas neutras bacterianas presentan una mayor actividad en un intervalo de pH (5 a 8) y son poco termoestables (Rao y col., 1998). Dado que el pH del sustrato en su estado nativo se encuentra entre 6.2 y 7, el uso de este enzima representara una ventaja, ya que no se necesitó ajustar el pH para aplicaciones futuras.

Como se observa en la Figura 8, la actividad de la Proteasa N se ve afectada cuando se manejan pH por arriba de 8 y por debajo de 6, a pH 7.5 se obtiene la mayor hidrólisis proteica con esta enzima.

La actividad de las enzimas se ve afectada a pH extremos ácidos o básicos, considerándolos como desfavorables. Un pH desfavorable puede afectar al enzima en su actividad ya sea sobre la velocidad o provocando su desnaturalización (Withaker, 1972).

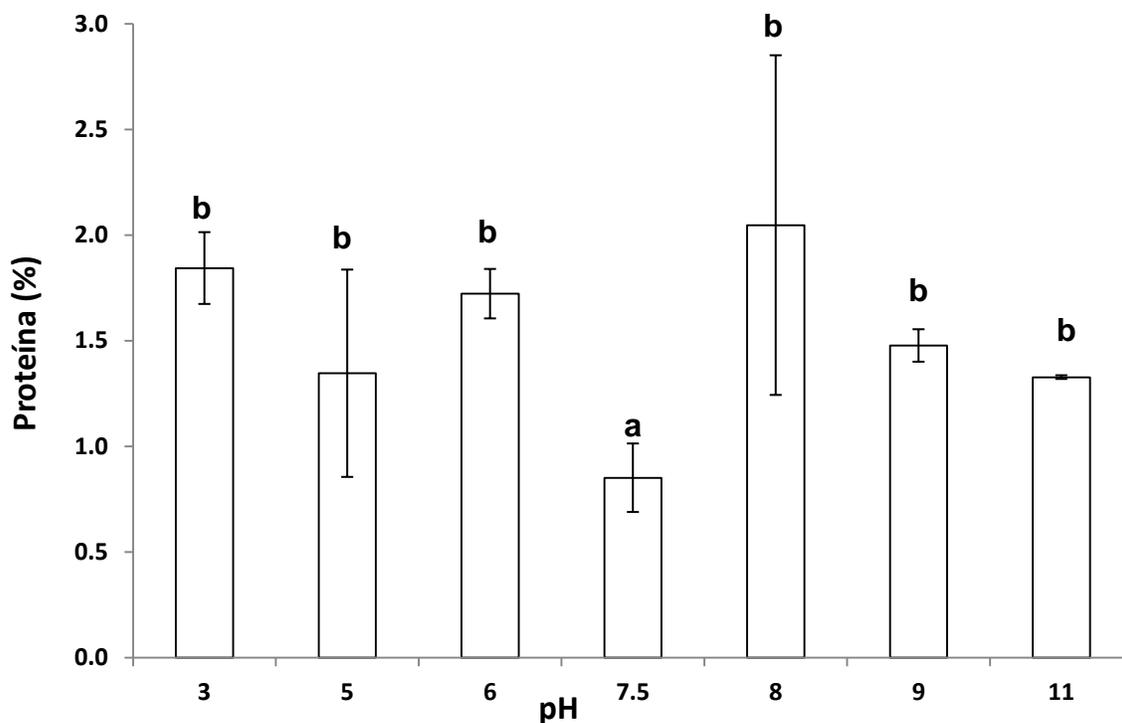


Figura 8. Efecto del pH sobre la actividad de la Proteasa N en QPP. Letras diferentes indican diferencia significativa entre las medias de dos determinaciones ($\alpha \leq 0.05$).

Basándose en estos resultados se selecciono pH 7.5 en conjunto con la Proteasa N para realizar el siguiente ensayo que fue la selección de la temperatura.

8.4.3 Efecto de la temperatura sobre la actividad de la Proteasa N en la DP de la QPP

En la Figura 9 se observa que la temperatura más adecuada para llevar a cabo la DP con la Proteasa N es 40°C, teniendo como resultado un contenido de proteína de $0.83 \pm 0.16\%$, alcanzando un $98.93 \pm 0.37\%$ de DP. El contenido de proteína para la temperatura de 30°C fue de $2.23 \pm 0.69\%$, para 50°C fue de $1.52 \pm 0.26\%$, para 60°C fue $1.01 \pm 0.40\%$ y para la de 70°C fue $1.29 \pm 0.90\%$.

En el estudio realizado por Portier y col., (2001), con un barrido de temperaturas (30, 45, 60 y 75°C) con la Proteasa N, se reportó que esta enzima tiene su mayor actividad a los 45°C y a pH de 7.8, condiciones similares a las encontradas en esta investigación.

Cheung y Li Chan., (2010), reportaron la mayor concentración de proteína soluble con Alcalasa con un pH de 8 y una temperatura de 60°C sobre desperdicio de camarón.

Los efectos de la temperatura son muy complejos y se pueden atribuir a la suma de diversas causas. Los cambios de temperatura y las temperaturas altas afectan las reacciones enzimáticas en varios puntos: a) estabilidad de la enzima, b) los valores de pH de grupos funcionales que intervienen en la reacción enzimática, c) la afinidad de enzima-sustrato; por lo que son capaces de acelerar la velocidad de separación del complejo enzima-sustrato, entre otros. Además de que es posible que se produzca una inactivación del enzima por el calor ya que con el incremento de la temperatura, la velocidad de desnaturalización aumenta más rápidamente que la velocidad de catálisis (Whitaker, 1972).

En general, los enzimas actúan muy lentamente a temperaturas de congelación y aumenta su actividad cuando la temperatura asciende hasta aproximadamente 45°C. Existen enzimas que son estables a temperaturas más altas (enzimas termoestables) (Whitaker, 1972; Fennema, 1985).

Para determinar las diferencias en el grado de hidrólisis producido por la temperatura sobre la Proteasa N, se realizó un análisis estadístico de comparación múltiple de medias por Duncan y se determinó que no existe diferencia significativa ($\alpha \leq 0.05$) entre las temperaturas de 40, 50, 60 y 70°C. Basándose en estos resultados se decidió trabajar con 40°C ya que elevar más la temperatura implicaría un mayor gasto energético.

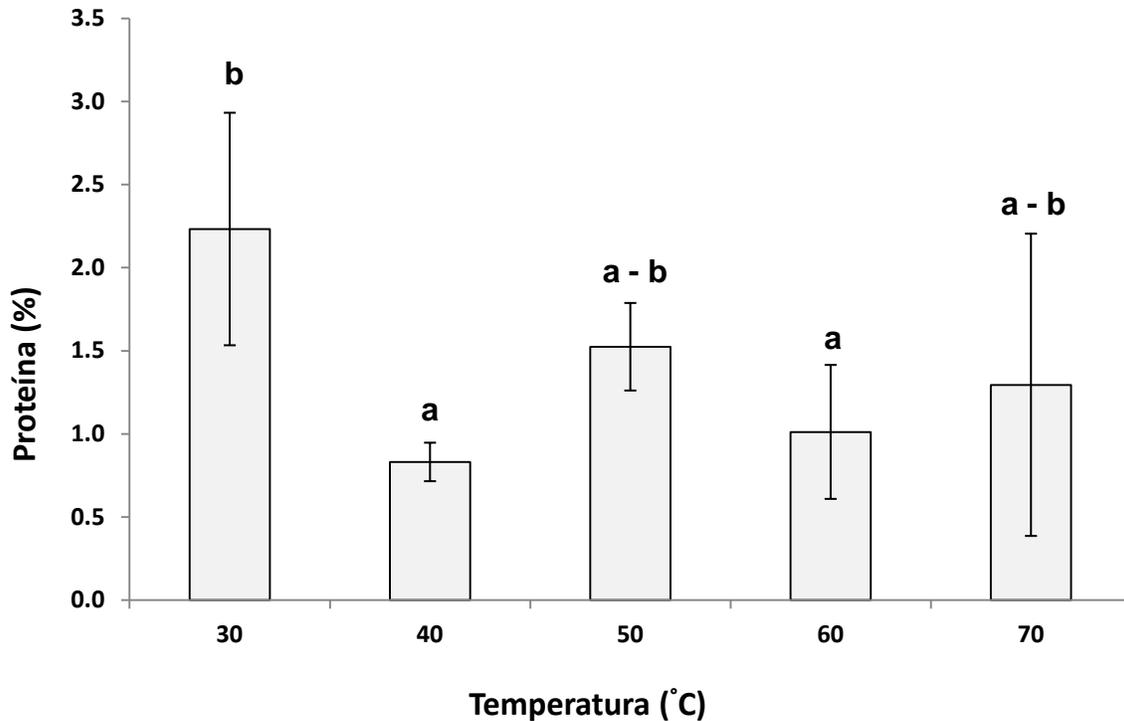


Figura 9. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la Proteasa N en quitina cruda. Letras diferentes indican diferencia significativa entre las medias de tres determinaciones ($\alpha \leq 0.05$).

8.4.4 Efecto de la concentración sobre la actividad de la Proteasa N en la DP de la QPP.

En la Figura 10 se muestra el contenido de proteína presente en la QB obtenida después de la DP enzimática a varias concentraciones. Utilizando la concentración de 0.5% (p/p) se obtuvo un contenido de proteína en la QB de $0.82 \pm 0.55\%$ alcanzando una DP del $99.17 \pm 2.26\%$, mientras que con las concentraciones restantes se alcanzó hasta un $96.7 \pm 1.30\%$ DP con un contenido de proteína en la QB de $1.01 \pm 0.40\%$. No se presentó diferencia significativa ($\alpha \leq 0.05$) entre las concentraciones.

Cheun y Li-Chan (2010) probaron cuatro diferentes concentraciones de enzima (0.2, 0.4, 0.6 y 0.8%) para la hidrólisis de proteína de camarón con enzimas comerciales (Alcalasa, Flavourzyme y Protamex), siendo Alcalasa (0.8%) la que produjo un mayor porcentaje de hidrólisis.

La concentración de la enzima es directamente proporcional a la velocidad de inicio a cualquier concentración de sustrato, esta relación afecta la velocidad a la cual el sustrato es convertido en producto. La velocidad de la enzima también se ve afectada cuando existe una limitación en la concentración del sustrato. Cuando existe un balance entre la relación enzima:sustrato, con un pH y temperatura adecuados y el amortiguador se mantiene constante, la velocidad de la enzima no se ve afectada (Whitaker, 1972).

De acuerdo a los resultados del trabajo, se obtuvo una buena hidrólisis de la proteína, sin embargo no fue completa, por lo que se recomienda una DM previa al tratamiento enzimático que pudiera incrementar la permeabilidad de la enzima y por lo tanto la penetración para lograr una mayor hidrólisis. Sin embargo el uso de ácidos para la DM de la quitina (HCl) puede cambiar la estructura y en consecuencia afectar los sitios activos de las proteasas (Valdez-Peña y col., 2010).

En este trabajo se evitó el uso de HCl y la DM fue producida por el ácido láctico producido por las BL esto podría explicar la alta, pero no completa remoción proteica de la QPP.

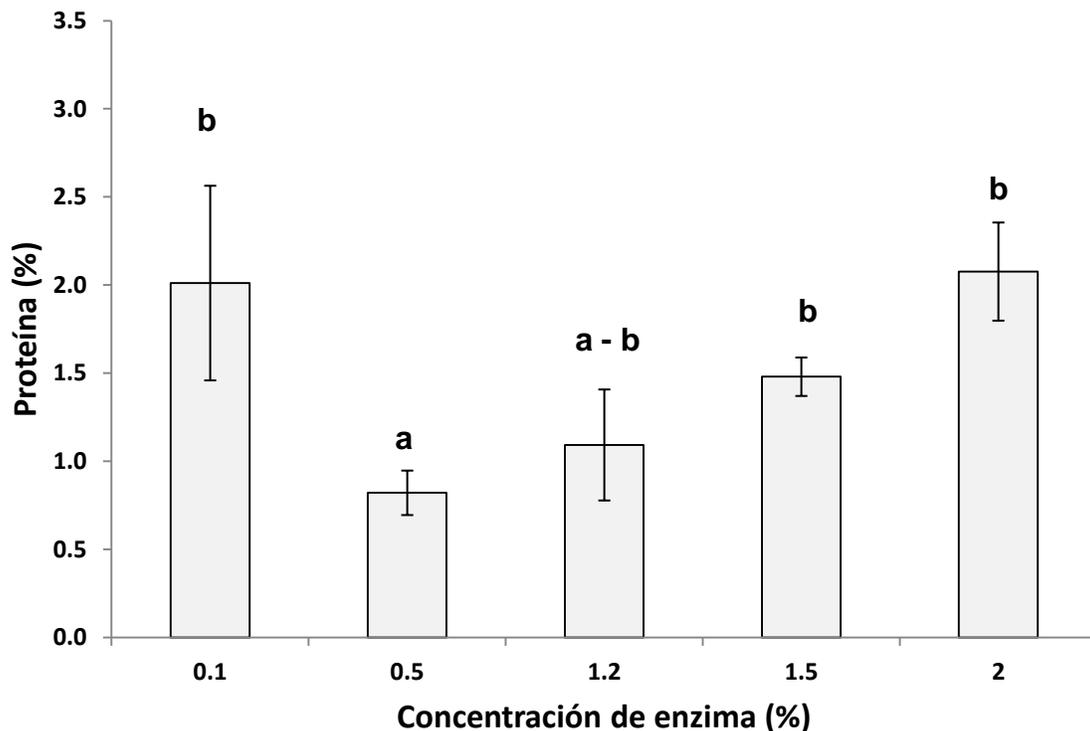


Figura 10. Efecto de la concentración de enzima sobre la actividad de la Proteasa N en QPP. Letras diferentes indican diferencia significativa entre las medias de tres determinaciones ($\alpha \leq 0.05$).

Para determinar las diferencias en el grado de hidrólisis producido por la concentración de enzima, se realizó un análisis estadístico de comparación múltiple de medias por Duncan ($\alpha \leq 0.05$) y se determinó que no hay diferencias significativas entre las concentraciones 0.5 y 1.2%. Basándose en estos resultados se decidió trabajar con la concentración de 0.5%.

8.5 Caracterización de QB, obtención de QT y su caracterización

La quitina biológica obtenida, fue desacetilada para obtener QT por el método químico, con NaOH 50% (4 h), mediante las condiciones reportadas por Juárez, (2010). Ambos productos fueron analizados químicamente y caracterizados. Los porcentajes determinados de la QB y del QT se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 11. Análisis químico proximal y caracterización de QB y QT.

	Humedad (%)	Peso seco (Kg)	Minerales		Grasa		Proteína		Solubles	DA	PM
			(%)	(Kg)	(%)	(Kg)	(%)	(Kg)	(%)		(kDa)
QB (1.64 Kg)	2.96	1.59	23.18	0.38	0.51	0.008	0.85	0.014	^A 78	^C 110.98 ± 3.49	^E 1128
QT (1.12 Kg)	4.33	1.07	19.05	0.21	0.23	0.002	0	0.0047	^B 88	^D 21.08 ± 0.40	^F 255.2

ND (No determinado). QB (Quitina biológica). QT (Quitosano). ^A (Solubles en DMAc/LiCl (5%)). ^B (Solubles en ác. acético/acetato de sodio). ^C (DA determinado por análisis elemental). ^D (DA determinado por RMN). ^{E-F} (PM determinado por viscosidad intrínseca)

La QB obtenida en este trabajo se encuentra dentro de los valores reportados por otros autores que obtienen estos biopolímeros por método químico (proteína, solubles y DA) (Tabla 12), sin embargo el contenido de minerales es alto, probablemente porque durante la DP enzimática no se llevó a cabo ningún proceso adicional para desmineralizar y sólo se llevó a cabo el producido durante FAL. Uno de los parámetros de calidad de la quitina es el contenido de minerales, el cual debe de ser menor a 0.5% (Shirai, 1999).

Tabla 12. Características de quitinas y quitosanos obtenidos por método químico.

Quitina	Minerales (%)	Solubles (%)	DA	PM (kDa)	Referencia
Sigma Chemical	2.0	ND	80.4	ND	Cho y col., 1998
Pronova Biopolimer	1.8	ND	80.4	ND	Cho y col., 1998
Pronova Biopolimer	0.3	ND	80.5	ND	Cho y col., 1998
MQ (QLL)	1.73	99.76	100	823	Juárez. 2010
MQ (QD)	0.53	98.81	100	811	Juárez. 2010

Quitosano	Minerales (%)	Solubles (%)	DA	PM (kDa)	Referencia
Sigma Chemical	0.2	ND	10.1	ND	Cho y col., 1998
Pronova Biopolimer	1.0	ND	17.0	ND	Cho y col., 1998
DuPont	0.2	ND	27.5	ND	Cho y col., 1998
MQ (Q1)	1.51	98	12.29	ND	Juárez. 2010
MQ (Q2)	0.51	98	23.82	ND	Juárez. 2010

ND (No determinado). MQ (Método químico). QLL (Quitina enjuagada con agua corriente). QD (Quitina enjuagada con agua destilada). Q1 (Quitosano 1). Q2 (Quitosano 2)

8.6 Espectro infrarrojo de QB y espectro de RMN de QT

En la Figura 11 se muestra el espectro de absorción de la QB comparada con una quitina comercial (Sigma), obteniendo una similitud del 81%. Se observan las bandas principales entre los 3000 cm^{-1} a 2850 cm^{-1} indican la presencia de metilos $-\text{CH}_3$, confirmando con la banda encontrada en 1403 cm^{-1} , en el espectro de las QB se observa la deformación de las bandas producidos en la misma frecuencia, se muestran bandas características de la amina en 1570 cm^{-1} (Marmól y col., 2004; Kasaai, 2008).

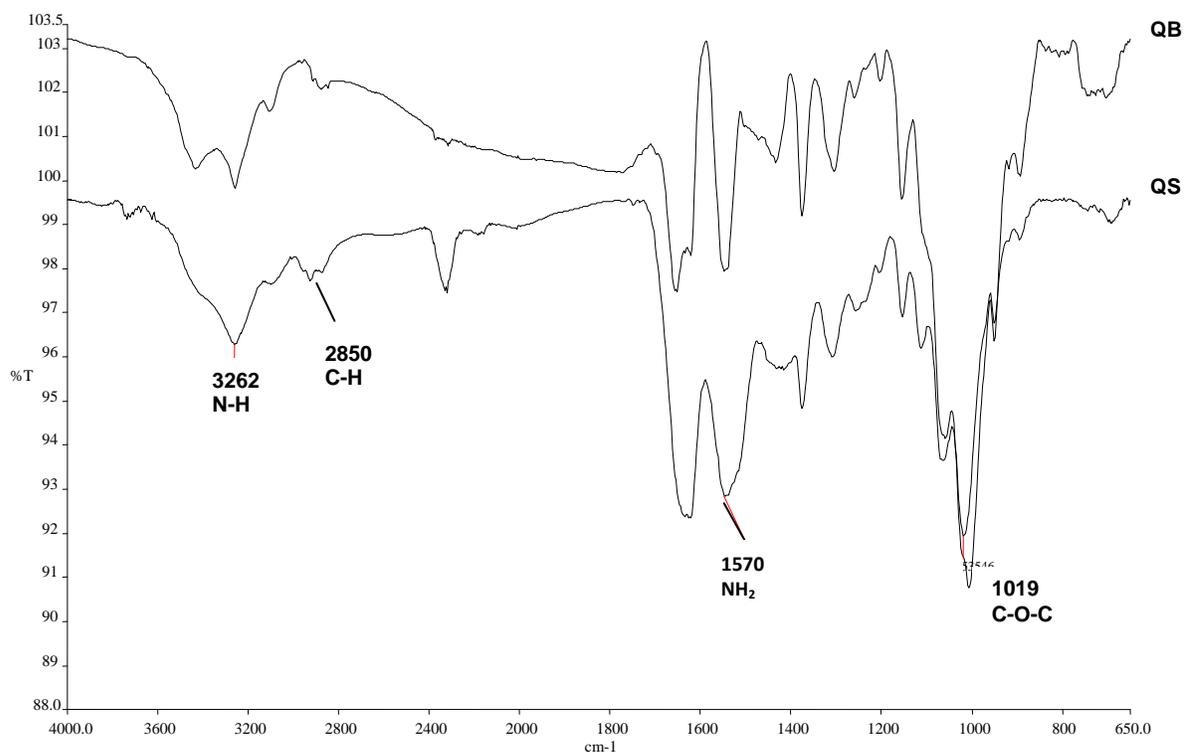


Figura 11. Espectro infrarrojo de absorción de QB y QS (quitina comercial (Sigma)).

En la Figura 12 se muestran los espectro de absorción de el QT obtenido a partir de la QB y de QTF (quitosano comercial de Fluka), se presenta una banda debida al estiramiento –OH a 3430 cm^{-1} , a 2962 cm^{-1} se evidencia el estiramiento C-H, a 1664 cm^{-1} aparece la vibración de tensión del C=O, a 1547 cm^{-1} se ve la secuencia de torsión –NH₂, a 1423 cm^{-1} la torsión –CH₂, a 1316 cm^{-1} la vibración de tensión C-N, el estiramiento simétrico C-O aparece a 1074 cm^{-1} , y el estiramiento C-O-C glucosídico se ve a las frecuencias 894, 705 y 556 cm^{-1} , los espectros son similares en un 72%.

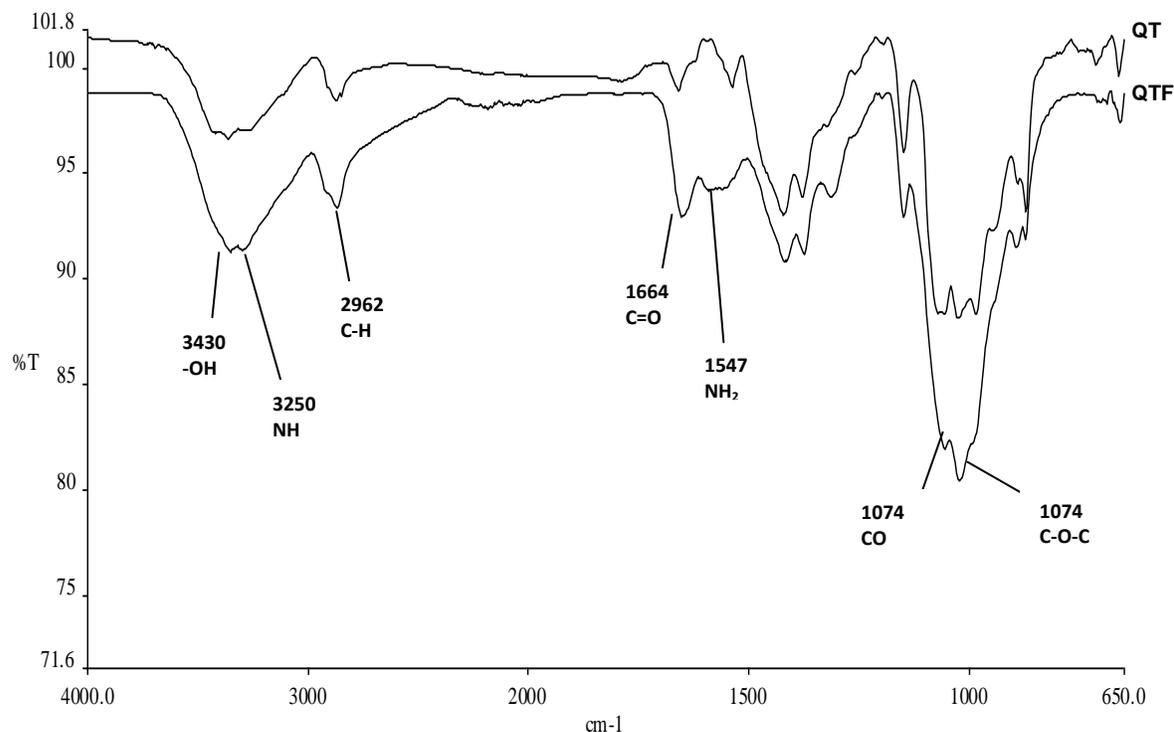


Figura 12. Espectro infrarrojo de absorción del QT obtenido a partir de la QPP y de QTF (Quitosano comercial Fluka).

En el espectro de RMN¹H para el QT obtenido a partir de la QB se evidencia una banda en 2.1 ppm, correspondientes a los protones del grupo acetamido, la señal para la fracción de D-Glucosamina aparece alrededor de 3.2 ppm, entre 3.5 y 4.2 ppm se observa un multiplete, correspondiente a los protones H3 – H6 para las fracciones de D-glucosamina y N-Acetil glucosamina. Alrededor de 4.6 ppm aparece una banda, correspondiente al protón del grupo acetamido y a 4.8 ppm se encuentra un doblete por los hidrógenos del grupo amino, los cuales se encuentra traslapados con los grupos hidroxilos (Figura 13).

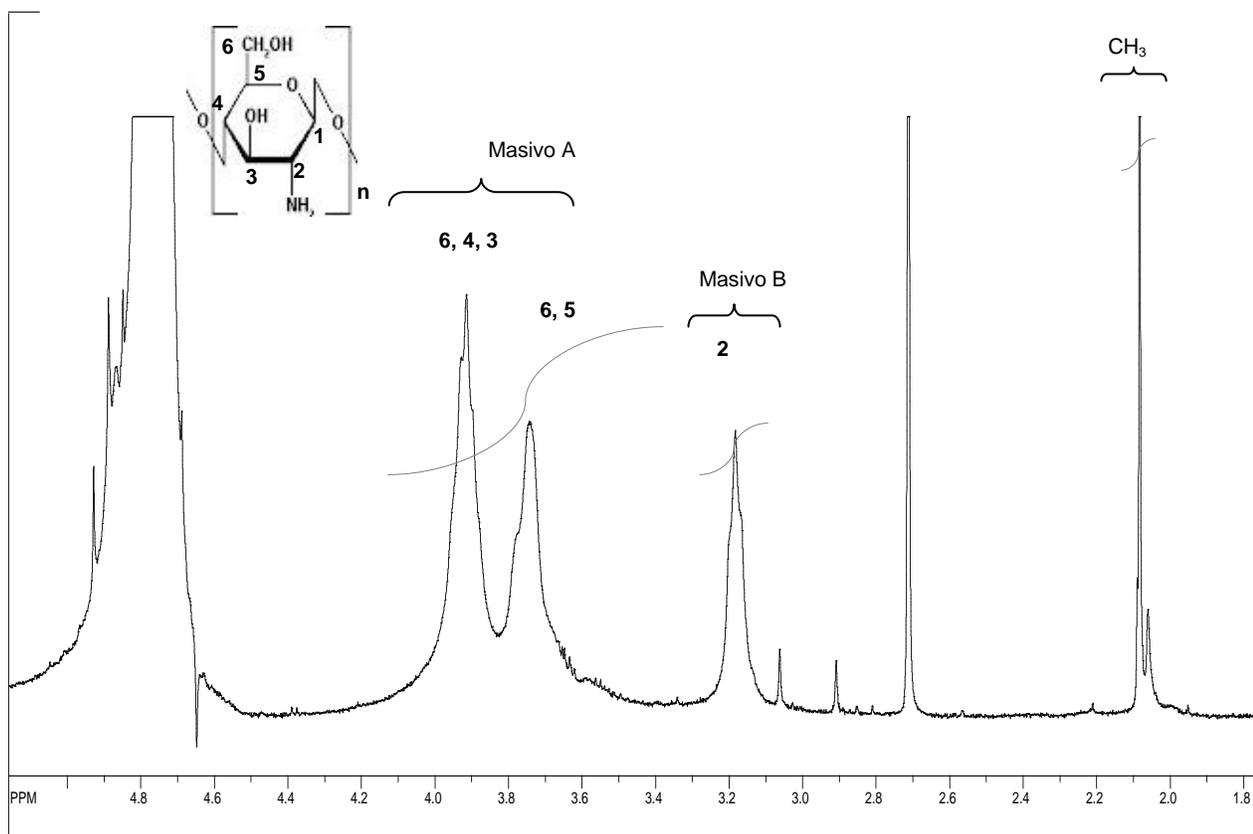


Figura 13. Espectro de RMN¹H de QT obtenido a partir de QB.

8.7 Rendimientos

En la Tabla 13, se presentan los rendimientos que se obtuvieron en este trabajo, en los diferentes procesos para la obtención de QPP, QB y QT, a partir de desperdicio de camarón. El RG (rendimiento global) del proceso fue obtenido utilizando la siguiente expresión:

$$RG = \frac{RR}{RT} * 100 \dots \dots (8)$$

Donde

RT = cantidad en gramos de la muestra con la que se comenzó el proceso.

RR = cantidad en gramos del producto final.

Tabla 13. Rendimientos de QPP, QB y QT.

Producto	^aRG (%)	^bRG (%)
DCF	38.97	38.97
QPP	14.47	17.39
QB	13.47	90.6
QT	9.13	68.74

^a (RG a partir de DC en base seca). ^b (RG a partir del producto anterior en base seca). DCF (desperdicio de camarón fermentado). QB (quitina biológica). QT (quitosano).

Cocoletzi y col., (2009), procesaron desperdicio de camarón lavado tenazmente con agua y secado por método químico (DM, DP y desacetilación), para la obtención de quitosano, reportaron un RG de 51.94%.

Mármol y col., (2004), obtuvieron quitina y quitosano por método químico, partir de desperdicio de camarón lavado y secado. Reportaron un RG de 24.06% para quitina y un 76.56% para quitosano (con respecto al desperdicio de camarón).

9. CONCLUSIONES

El proceso de FAL es un proceso adecuado para la conservación, DM y DP del desperdicio de camarón, aparte de que se pueden recuperar compuestos de valor agregado como minerales, proteína, astaxantina y su producto principal la quitina. Con este proceso se alcanzó un 82.58% de DM y un 97.79% de DP y se obtuvo QPP.

Se realizó una selección de enzimas bacterianas comerciales (Protamex, HT Proteolitic, Deterzyme y Proteasa N) para la DP enzimática de la QPP. La Proteasa N fue la enzima que hidrolizó la mayor cantidad de proteína (tipo estromal) presente en el sustrato, alcanzando un 98.41% de DP.

Se llevó a cabo una selección de las condiciones pH, temperatura y concentración de enzima en donde la actividad de la enzima Proteasa N tuviera la mayor actividad proteolítica posible. El pH 7.5 fue el más adecuado para la actividad de la Proteasa N, al igual que una temperatura de 45°C y una concentración de enzima de 0.5% (p/p). Al tomar en cuenta las condiciones seleccionadas con la Proteasa N se llevó a cabo la desproteínización enzimática dicho desperdicio obteniendo así una QB con las siguientes características: contenido de proteína de $0.85 \pm 0.16\%$, contenido de minerales de 23.18%, contenido de grasa 0.51%, un 78% de solubles en DMAc/LiCl (5%) y un DA de 100%.

Concluyendo que para obtener la estabilidad de una proteasa y su mayor actividad proteolítica se tienen que tomar en cuenta la influencia de muchos factores principalmente pH, temperatura, concentración de enzima, entre otros.

Por otra parte se llevó a cabo la obtención de un QT mediante un proceso químico de desacetilación de la quitina obtenida por un método biológico. El cual tuvo las siguientes características: un contenido de minerales del 19%, contenido de grasa de 0.23%, 0.42% de proteína, un 88% de solubles (en solución ácida), 21% DA y un PM de 222 kDa, características que son muy similares a los obtenidos por un método totalmente químico.

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que es posible obtener quitina mediante un proceso totalmente biológico, evitando el uso de ácidos y álcalis. La QB obtenida en este trabajo contiene un porcentaje muy bajo de proteína, ampliando así su área de aplicación.

10. PERSPECTIVAS

Evaluar el efecto que tiene la relación sustrato:volumen en la desproteización enzimática de la Proteasa N, ya que este también es un factor importante para el buen funcionamiento de la enzima, al igual que el efecto que genera la agitación (rpm) sobre la DP de la QPP.

Realizar un estudio en donde se evalué el efecto que tiene emplear una mezcla de enzimas comerciales como Proteasa N y Deterzyme, ya que estas fueron las enzimas que presentaron mayor porcentaje de DP en este trabajo y poder incrementar el porcentaje de DP.

Probar diferentes concentraciones de álcali, diferentes tiempos de reacción, inclusive algún método físico para la desacetilación de la QPP para la obtención de QT y poder disminuir el contenido de minerales.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. **AOAC.** 1990. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C. 13th edition.
2. **Aye K,** Stevens W. 2004. Technical note improved chitin production by pretreatment of shrimp shells. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* 79:42-425.
3. **Ayuso R,** Grishina G, Dolores Ibáñez M, Blanco C, Carrillo T, Bencharitiwong R, Sánchez S, Nowak-Wegrzyn A. 2009. Sarcoplasmic calcium-binding protein is an EF-hand-type protein identified as a new shrimp allergen. *Journal Allergy Clinic Immunology.* 124:114-120.
4. **Bénitez R,** Ibarz A, Pagan J. 2008. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquímica Clínica Biológica.* 42(2):227-236.
5. **Bisswanger H.** 2008. *Enzyme Kinetics Principles and Methods.* Editorial Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim (Alemania). pp: 51-159.
6. **Black B,** Schwartz H. 1950. The estimation of chitin and chitin nitrogen in crawfish waste and derived products. *Analyst.* 75:185-188.
7. **Cheun I,** Li-Chan E. 2010. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity and bitterness of enzymatically-produced hydrolysates of shrimp (*Pandalopsis dispar*) processing byproducts investigated by Taguchi desing. *Food Chemistry.* 122:1003-1012.
8. **Cira L,** Huerta S, Hall G, Shirai K. 2002. Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemistry.* 37:1359-1366.
9. **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 - México.
10. **Cocoletzi H,** Almanza E, Agustin O, Nava E, Cassellis E. 2009. Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficie y Materiales.* 22:57-60.
11. **Dey S,** Dora K. 2011. Optimization of the production of shrimp waste protein hydrolysate using microbial proteases adopting response surface methodology. *Journal Food Science Technology.*
12. **Duan S,** Zhuang Z, Wu W, Hong S, Zhou J. 2012. Improved production of chitin from shrimp waste by fermentation with epiphytic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers.* 89:1283-1288.
13. **Duarte de Holanda H,** Maria Netto F. 2006. Recovery of components from shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri*) processing waste by enzymatic hydrolysis. *Food Chemistry and Toxicology.* 71:C298-C303.

-
14. **Ezquerro-Brauer J**, Bringas-Alvarado L, Burgos-Hernández A, Rouzaud-Sández O. 2004. Control de la composición química y atributos de calidad de camarones cultivados. *Avances en Nutrición Acuícola* VII. 441-462.
 15. **F2103 - 01**. 2007. Standard Guide for characterization and testing of chitosan salts as starting materials intended for use in biomedical and tissue-engineered medical product applications.
 16. **F2260 – 03**. 2008. Standard test method for determining degree of deacetylation in chitosan salts by proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR) Spectroscopy¹.
 17. **Fennema O**. (1985) *Introducción a la ciencia de los alimentos*. Editorial Reverté, S.A. pp: 332-350.
 18. **Flores-Albino B**. 2011. Obtención simultánea de ácido láctico y quitina a partir de subproductos agrícolas y pesqueros mediante fermentación en medio líquido con *Lactobacillus sp. B2*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa - México.
 19. **Flores-Albino B**, Arias L, Gómez J, Castillo A, Gimeno M, Shirai K. 2012. Chitin and L(+)-lactic acid production from crab (*Callinectes bellicosus*) wastes by fermentation of *Lactobacillus sp. B2* using sugar cane molasses as carbon source.
 20. **Gildberg A**, Stenberg E. 2001. A new process for advanced utilization of shrimp waste. *Process Biochemistry*. 36:809-812.
 21. **Gimeno M**, Ramírez J, Martínez C, Pacheco N, García R, Barzana E, Shirai K. 2007. One-Solvent extraction of astaxantina from lactic acid fermented shrimp wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55:10345-10350.
 22. **González-Rábade N**, Badillo-Corona J, Arranda-Barradas J, Oliver-Salvador M. 2011. Production of plant proteases in vivo and in vitro – A review. *Biotechnology Advances*. 29:983-996.
 23. **Gueddari N**, Moerschbacher B. 2003. A bioactivity matrix for chitosans as elicitors of disease resistance reactions in wheat. *Advances in Chitin Science* 7:56-59.
 24. **Haard N**. 1992. Control of chemical composition and food quality attributes of cultured fish. *Food Research International*. 25:289-307.
 25. **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.
 26. **Juárez C**. 2010. Estudio del uso de enzimas comerciales en la preparación de quitina a partir de desperdicios de camarón. Tesis de Especialidad. Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa – México.

-
27. **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.
 28. **Kasaai M**. 2008. A review of several reported procedures to determine the degree of *N-acetylation* for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*. 71:497-508.
 29. **Kechaou E**, Dumay J, Donnay-Moreno C, Jaouen P, Gouygou J, Bergé J, 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*. 2:158-164.
 30. **Kumar R**, Muzzarelli R, Muzarelli C, Sashiwa H, Domb A. 2004. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical Reviews*. 104:6017-6084.
 31. **Kunitz M**. 1946. Crystalline soybean trypsin inhibitor. *The Journal of General Physiology*. 291-310.
 32. **Lárez C**. 2006. Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances en Química*. 1:15-21.
 33. **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.
 34. **Marmól Z**, Gutiérrez E, Páez G, Ferrer J, Rincón M. 2004. Desacetilación termoalcalina de quitina de conchas de camarón. *Multiciencias*. 4.
 35. **Niamnuy C**, Devahastin S, Soponronnarit S. 2008. Changes in protein compositions and their effects on physical changes of shrimp during boiling in salt solution. *Food Chemistry*. 108:165-175.
 36. **Nemtsev S**, Gamzazade A, Rogozhin S, Bikova V. 2002. Deacetylation of chitin under homogeneous conditions. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 38:521-526.
 37. **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.
 38. **Pacheco N**. 2010. Extracción biotecnológica de quitina para la producción de quitosanos: caracterización y aplicación. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa - México.
 39. **Pacheco N**, Larralde P, Sepulveda J, Trombotto S, Domard A, Shirai K. 2008. Evaluation of chitosans and *Pichia guilliermondii* as growth inhibitors of *Penicillium digitatum*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 43: 20-26.

-
40. **Pacheco N.** 2007. Efecto de Quitosanos y *Pichia Guillermondii* como agentes de biocontrol contra *Penicillium digitatum*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa - México.
 41. **Pacheco N,** Garnica-Gonzalez M, Gimeno M, Bárzana E, Trombotto S, David L, Shirai K. 2011. Structural caracterización of chitin and chitosan obtained by biological and chemical methods. *Biomacromolecules*. 12:3285-3290.
 42. **Plascencia-Jatomea M,** Olvera-Novoa M, Arredondo-Figueroa J, Hall G, Shirai K. 2002. Feasibility of fishmeal replacement by shrimp head silage protein hydrolysate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L) diets. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 82:753-759.
 43. **Pastor A.** 2004. Quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. Pontifica Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial. 25-71.
 44. **Peniche C.** 2006. Estudios sobre quitina y quitosana. Universidad de la Habana. Facultad de Química - Cuba.
 45. **Percot A,** Viton C, Domard A. 2003. Optimization of chitin extraction from shrimp shells. *Biomacromolecules*. 4:12-18.
 46. **Pillai C,** Paul W, Sharma C. 2009. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*. 34:641-678.
 47. **Potier P,** Bouchu A, Garganaire J, Queneau Y. 2001. Proteinase N-catalysed regioselective esterification of sucrose and other mono- and disaccharides. *Tetrahedron: Asymmetry*. 12:2409-2419.
 48. **Rabea E,** Badawy M, Stevens V, Badawy M, Smagghe, Steurbaut W. 2003. Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules*. 4:1457-1464.
 49. **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.
 50. **Rao M,** Stevens W. 2006. Fermentation of shrimp biowaste under different salt concentrations with amylolytic and non-amylolytic *Lactobacillus* strains for chitin production. *Food Technology Biotechnology*. 44:83–87.
 51. **Rao M,** Tankasale A, Ghatge M, deshapande V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and molecular Biology Reviews*. 63(3)597.
 52. **Rinaundo M.** 2008. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer International*. 57:397-430.

-
53. **Ringo E**, Gatesoupe F. 1998. Lactid acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*. 160:177-203.
 54. **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.
 55. **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 - México.
 56. **Shrinivas M**, Stevens W. 2005. Chitin production by *Lactobacillus* fermentation of shrimp biowaste in a drum reactor and its chemical conversion to chitosan. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 80:1080-1087.
 57. **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.
 58. **Sriket P**, Benjakul S, Visessanguan W, Kijroongrojana. 2007. Comparative studies en chemical composition and thermal properties of black tiger shrimp. *Food Chemistry*. 103:1199-1207.
 59. **Synowiecki J**, Al-Khateeb. 2003. Production, properties and some new Applications of chitin and its derivatives, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 43:145-171.
 60. **Tsigos I**, Martinou A, Kafetzopoulos D. 2000. Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. *Trends in Biotechnology*. 18:205-312.
 61. **Valdez-Peña A**, Espinoza-Perez J, Sandoval-Fabian G, Balagurusamy N, Hernández-Rivera A, De-la-Garza-Rodríguez I, Contreras-Esquivel J. 2010. Screening of industrial enzymes for deproteinization of shrimp head for chitin recovery. *Food Science Biotechnology*. 19:553-557.
 62. **Whitaker J**. (1972). *Principles of Enzymology for the Food Science*. Editorial Marcel Dekker, INC. pp: 287-326.

11.1 Citas electrónicas

www.novozymes.com (Septiembre 2011)

www.dms.com (Diciembre 2011)

www.enmex.com.mx (Mayo 2012)

www.sigmaaldrich.com (Mayo 2012)

www.deerland-enzymes.com (Mayo 2012)

12. ANEXO

Ensayo de actividad enzimática

Preparación de la solución de caseína 1%

1g de caseína se adicionó a 75 ml del amortiguador de fosfatos 50mM, pH 7.5. Se calentó en baño María a ebullición con agitación constante durante 20min, se ajustó el pH 7.5 (con una solución de NaOH) y se aforó a 100 ml con el mismo amortiguador.

Enzima

Se realizó una solución de 1mg/ml de enzima, disuelta en un amortiguador de fosfatos pH 7.5.

Procedimiento

75 μ L de enzima se adicionaron a 500 μ L de una solución de caseína al 1%, se incubó durante una hora a 30°C. Posteriormente se adicionó 1 ml de TCA al 5%, se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min y al sobrenadante se le determinó absorbancia a 280nm (este ensayo se realizó por quintuplicado).

Se preparó un testigo para cada enzima, en el cual los 75 μ L del extracto enzimático se adicionaron después del TCA (sin incubar) (este ensayo se realizó por triplicado).

Soluciones amortiguadoras

Se prepararon tres soluciones amortiguadoras:

Solución amortiguadora de citratos: para pH 3, 5, compuesta por ácido cítrico y fosfato dibásico.

Solución amortiguadora de fosfatos: para pH 6, 7, 7.5, 8 y 9, compuesta por ácido fosfórico y fosfato de potasio dibásico.

Solución amortiguadora de carbonatos: para pH 10 y 11, compuesta por carbonato y bicarbonato de sodio. A las tres soluciones les adicionó azida de sodio 0.01% (p/v), para evitar el crecimiento de microorganismos.