



Casa abierta al tiempo

Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

**TRATAMIENTO MICROBIANO DE RESIDUOS DE
CAMARÓN PARA OBTENCIÓN DE QUITINA Y
ASTAXANTINA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A

I.B. ROSALBA PAOLA ISLAS ENRÍQUEZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. CONCEPCIÓN KEIKO SHIRAI MATSUMOTO

ASESORES:

DRA. MARÍA EVA RODRÍGUEZ HUEZO

DR. MIQUEL GIMENO SECO

Octubre de 2010.

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465”.

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 llevo a cabo con financiamiento de CONACyT (No. 105628).

México D.F. a 8 de octubre de 2010.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la
Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

**TRATAMIENTO MICROBIANO DE RESIDUOS DE CAMARÓN PARA
OBTENCIÓN DE QUITINA Y ASTAXANTINA**
que presentó

I.B. Rosalba Paola Islas Enríquez

Comité Tutorial:



Directora de tesis:

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto
Directora, UAM-Iztapalapa

Asesores de tesis:

Dr. Miquel Gimeno Seco
Dra. María Eva Rodríguez Huevo

H. Jurado:

Dr. Miquel Gimeno Seco
Universidad Nacional Autónoma de México



Dra. María Eva Rodríguez Huevo
Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec



Dra. Neith Aracely Pacheco López
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Dr. Luis Alberto Cira Chávez
Instituto Tecnológico de Sonora



DEDICATORIAS

A Dios.

A mi familia por su amor, cariño, comprensión y apoyo en cuanta decisión he tomado, por enseñarme que la familia es lo más importante, y que a pesar de todo siempre vamos a estar para apoyarnos mutuamente. Perdón por los momentos difíciles que les he hecho pasar estando tan lejos, y por esas cosas que me he perdido en todo este tiempo por no estar al lado suyo. Siempre serán mi motivación para salir adelante. Los amo con todo mi corazón.

A la familia Patiño Mendoza por el apoyo y calidez que me han brindado. Mil gracias, Dios los bendiga.

A Armando, por cuidarme, apoyarme, quererme y estar conmigo, por todos estos días y los que vienen, te amo.

A Carlos por ser como el hermano que nunca tuve, porque siempre me has echado la mano, gracias cholo.

A mis amigos por su apoyo incondicional.

Muchas gracias a todos por estar ahí...

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Metropolitana

Al CONACyT, por el financiamiento otorgado para la realización de esta tesis.

A la Dra. Keiko Shirai por sus atinados comentarios, paciencia, y disposición para atender mis dudas, muchas gracias por todo.

A mis asesores Dr. Miquel Gimeno y Dra. Eva Rodríguez.

A mis revisores Dr. Luis Cira y Dra. Neith Pacheco.

A mis compañeros del Laboratorio de Biopolímeros: Facundo, Carmen, Ulises, Caro, Neith y Zaizy. Muchas gracias por su compañía y por todos los momentos divertidos.

Gracias a todos...

ABREVIATURAS

%R	Porcentaje de retención
AL	Ácido láctico
Astax	Astaxantina
ATT	Acidez total titulable
a_w	Actividad acuosa
BAL	Bacterias lácticas
CA	Reactor de columna agitado
CE	Reactor de columna estático
DM	Desmineralización
DMAc	Dimetilacetamida
DP	Desproteínización
FAL	Fermentación láctica
FL	Fracción líquida
FS	Fracción sólida
GA	Goma arábiga
k	Constante de acidificación
NP	Nitrógeno proteico
NQ	Nitrógeno de quitina
NT	Nitrógeno total
P_{max}	Máxima concentración del producto (ácido láctico)
TR	Reactor de tambor rotatorio
V_{max}	Velocidad máxima de acidificación

CONTENIDO

Lista de tablas.....	v
Lista de figuras.....	vi
Resumen.....	ix
Abstract.....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1 Quitina y quitosano.....	2
2.1.1 Estructura y generalidades.....	2
2.1.2 Propiedades fisicoquímicas.....	4
2.1.2.1 Solubilidad.....	4
2.1.2.2 Peso molecular.....	4
2.1.3 Aplicaciones.....	4
2.1.4 Métodos de obtención de quitina.....	5
2.1.4.1 Métodos químicos.....	6
2.1.4.2 Métodos biológicos.....	6
2.2 Astaxantina.....	8
2.2.1 Estructura y generalidades.....	8
2.2.2 Aplicaciones.....	9
2.2.3 Métodos de recuperación.....	10
2.3 Microencapsulación.....	11
2.3.1 El secado por aspersion.....	12
2.3.2 Materiales de barrera usados en secado por aspersion.....	13
2.3.2.1 Goma arábica.....	14
2.4.2.2 Maltodextrina.....	15
3. JUSTIFICACIÓN.....	17
4. OBJETIVOS.....	18
5. HIPÓTESIS.....	19
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20

6.1 Fermentación de residuos de camarón.....	20
6.1.1 Fermentaciones en frascos.....	20
6.1.1.1 Elección de nivel de fuente de carbono.....	20
6.1.1.1.1 Desperdicio.....	20
6.1.1.1.2 Fuente de carbono.....	20
6.1.1.1.3 Microorganismo.....	20
6.1.1.1.4 Fermentaciones.....	20
6.1.1.2 Análisis de muestras.....	21
6.1.1.2.1 pH y Acidez total titulable (ATT).....	21
6.1.1.2.2 Cuenta viable de BAL.....	21
6.1.1.2.3 a_w	21
6.1.1.2.4 Análisis estadístico.....	21
6.1.2 Fermentaciones en reactores.....	22
6.1.2.1 Elección de tipo de agitación en reactores en lote.....	22
6.1.2.1.1 Fermentaciones en reactores.....	22
6.1.2.2 Efecto del tipo de desperdicio en la DP.....	22
6.1.2.2.1 Residuos.....	22
6.1.2.2.2 Fermentaciones.....	22
6.1.2.3 Selección de nivel de inoculación.....	23
6.1.2.3.1 Fermentaciones.....	23
6.1.2.4 Reducción de la capacidad amortiguadora del sustrato.....	23
6.1.2.4.1 Fermentaciones.....	23
6.1.2.5 Análisis de muestras.....	23
6.1.2.5.1 pH y ATT.....	23
6.1.2.5.2 Cuenta viable de BAL.....	23
6.1.2.5.3 Determinación de porcentaje de humedad.....	23
6.1.2.5.4 Determinación del contenido de cenizas.....	24
6.1.2.5.5 Determinación de NT.....	24
6.1.2.5.6 Determinación de NP y porcentaje de proteína.....	24
6.1.2.5.7 Determinación de NQ.....	24
6.1.2.5.8 Determinación de porcentaje de DP.....	25

6.1.2.5.9 Análisis estadístico.....	25
6.1.3 Purificación de la quitina cruda.....	25
6.1.3.1 DM química.....	25
6.1.3.2 DP química.....	25
6.1.3.3 Análisis estadístico.....	26
6.1.4 Caracterización de la quitina purificada.....	26
6.1.4.1 Espectro de Infrarrojo.....	26
6.1.4.2 Determinación de peso molecular por viscosidad intrínseca.....	26
6.1.4.3 Determinación del contenido de insolubles.....	26
6.1.4.4 Análisis estadístico.....	27
6.2 Recuperación y microencapsulación de pigmentos.....	27
6.2.1 Recuperación de astaxantina de residuos de camarón.....	27
6.2.1.1 Extracción de astaxantina.....	27
6.2.1.2 Concentración de astaxantina.....	27
6.2.1.3 Cuantificación de astaxantina.....	27
6.2.1.4 Determinación del porcentaje de recuperación de astaxantina..	27
6.2.2 Microencapsulación de astaxantina.....	28
6.2.2.1 Formulaciones.....	28
6.2.2.2 Preparación de las dispersiones.....	28
6.2.2.3 Secados por aspersión.....	28
6.2.2.4 Cuantificación de astaxantina retenida.....	28
6.2.2.5 Análisis estadístico.....	29
7. RESULTADOS.....	30
7.1 Fermentación de residuos de camarón.....	30
7.1.1 Fermentaciones en frascos.....	30
7.1.1.1 Elección de nivel de fuente de carbono.....	30
7.1.2 Fermentaciones en reactores.....	34
7.1.2.1 Elección de tipo de agitación en FAL en reactores en lote.....	34
7.1.2.2 Efecto del tipo de desperdicio en la DP.....	41
7.1.2.3 Selección de nivel de inoculación.....	46
7.1.2.4 Reducción de la capacidad amortiguadora del sustrato.....	52

7.1.3 Purificación de la quitina cruda.....	54
7.1.4 Caracterización de la quitina purificada.....	56
7.2 Recuperación y microencapsulación de pigmentos.....	57
7.2.1 Recuperación de astaxantina de residuos de camarón.....	57
7.2.2 Microencapsulación de astaxantina.....	59
8. CONCLUSIONES.....	61
9. BIBLIOGRAFÍA.....	62
10. ANEXOS.....	70

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Aplicaciones de la quitina y sus derivados.....	5
Tabla 2	Análisis químico proximal de los residuos de camarón de <i>L. vannamei</i> y de la melaza.....	30
Tabla 3	Parámetros cinéticos de acidificación a de las fermentaciones con distintos niveles de melaza a 30°C estimados con el modelo de Gompertz y a_w al inicio (0 h) y final (120 h) de la fermentación.....	32
Tabla 4	Análisis químico proximal de los residuos de camarón de mezcla de especies.....	41
Tabla 5	Cantidad de AL necesario para reducir el pH del sustrato.....	51
Tabla 6	Ácido producido en la fermentación a distintos niveles de inóculo (120 h).....	51
Tabla 7	Concentración de astaxantina en extractos concentrados de quitina cruda seca y húmeda.....	58
Tabla 8	Porcentajes de retención de astaxantina a distintas temperaturas de secado por aspersión tomando como contenido de astaxantina total 240 µg/g microcápsulas.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estructura química de la quitina.....	2
Figura 2	Conversión de quitina a quitosano.....	3
Figura 3	Estructura química de la astaxantina.....	8
Figura 4	Estructura de una microcápsula.....	11
Figura 5	Visión general del proceso de microencapsulación por secado por aspersión.....	12
Figura 6	Recolección de exudados de árboles de <i>Acacia</i> para obtener goma arábiga.....	14
Figura 7	Cinética de pH y %ATT en la fermentación a 30°C del residuo de camarón utilizando como fuente de carbono 20, 30, 40 y 50% melaza (p/p).....	32
Figura 8	Cuenta viable de BAL durante la fermentación de residuos de camarón utilizando como fuente de carbono 20, 30, 40 y 50% melaza (p/p).....	33
Figura 9	Cinética de la ATT del licor en la fermentación de <i>L. vannamei</i> utilizando como fuente de carbono 20% melaza (p/p) en un reactor de CA, TR y CE.....	34
Figura 10	Cinética del pH del licor en la fermentación de <i>L. vannamei</i> utilizando como fuente de carbono 20% melaza (p/p) en un reactor de CA, TR y CE.....	35
Figura 11	ATT de la FS a 120 h de fermentación utilizando 20% melaza (p/p) en los reactores de CA, TR y CE.....	36
Figura 12	pH de la FS a 120 h de fermentación utilizando 20% melaza (p/p) en los reactores de CA, TR y CE.....	37
Figura 13	Cuenta viable de BAL en los reactores de CA, TR y CE al inicio (0 h) y término de la fermentación (120 h).....	38
Figura 14	%DP a 120 h de fermentación en los reactores de CA, TR y CE	

	utilizando 20% melaza (p/p) con <i>L. vannamei</i>	39
Figura 15	Cinéticas de ATT en la FL en los reactores de TR y CE utilizando 5% inóculo con mezcla de especies.....	42
Figura 16	Cinéticas de pH en la FL en los reactores de TR y CE utilizando 5% inóculo con mezcla de especies.....	42
Figura 17	ATT en fracciones sólidas a 120 h de fermentación utilizando 5% inóculo y mezcla de especies.....	43
Figura 18	pH en fracciones sólidas a 120 h de fermentación utilizando 5% inóculo y mezcla de especies.....	44
Figura 19	Cuenta viable de BAL al inicio (0 h) y término de la fermentación (120 h) en los reactores de TR y CE utilizando 5% inóculo con mezcla de especies.....	44
Figura 20	%DP a 120 h de fermentación en los reactores de TR y CE utilizando 5% Inóculo y mezcla de especies.....	45
Figura 21	Cinéticas de acidificación en FL en el reactor de CE utilizando 10 y 20% Inóculo y mezcla de especies.....	46
Figura 22	Cinéticas de acidificación en FL en el reactor de CE utilizando 10 y 20% Inóculo y mezcla de especies.....	47
Figura 23	ATT en fracciones sólidas a 120 h de fermentación utilizando 5, 10 y 20% Inóculo con mezcla de especies.....	48
Figura 24	pH en fracciones sólidas a 120 h de fermentación utilizando 5, 10 y 20% Inóculo con mezcla de especies.....	49
Figura 25	Cuenta viable de BAL al inicio (0 h) y término de la fermentación (120 h) en reactor de CE a 10% de inóculo y usando mezcla de especies.....	49
Figura 26	Cuenta viable de BAL al inicio (0 h) y término de la fermentación (120 h) en reactor de CE a 20% de inóculo. Mezcla de especies.	50
Figura 27	Capacidad amortiguadora del sustrato. Mezcla de especies con 20% melaza (p/p).....	50
Figura 28	%DP en reactor de CE utilizando 5, 10 y 20% Inóculo con mezcla de especies.....	51

Figura 29	Cinética de pH y ATT de fermentación de residuos de camarón utilizando 10% melaza más 5% azúcar de caña (p/p) y 10% inóculo.....	52
Figura 30	Cuenta viable de BAL al inicio (0 h) y término de la fermentación (120 h) en el reactor de CE utilizando 10% melaza más 5% azúcar de caña (p/p) y 10% inóculo.....	53
Figura 31	Efecto de la concentración de ácido en la DM de quitina cruda obtenida a 120 h de fermentación.....	54
Figura 32	Efecto de la concentración de álcali en la DP de quitina cruda obtenida a 120 h de fermentación.....	55
Figura 33	Espectro de infrarrojo de la quitina desmineralizada con HCl 0.4 M y desproteïnizada con NaOH 0.2 M.....	56

Resumen

En el presente estudio se evaluaron distintas concentraciones de melaza en FAL de cabezas de camarón de la especie *L. vannamei* en frascos siendo la idónea para el crecimiento de las BAL la de 20% (p/p) alcanzando un pH de hasta 4.7 y una ATT de 0.52 mmol/g. Este nivel de melaza se aplicó en reactores en lote con y sin agitación en donde se observó un pH final de 5 y la mayor DP de 78 % y 85 % en los reactores de TR y CE respectivamente, sin presentar diferencias significativas entre estos sistemas. Por ello se decidió probar estas dos configuraciones de reactores con otra fuente de desperdicio consistente en mezcla de especies de camarón. Los resultados indicaron diferencias en la DP ($\alpha < 0.05$) en el TR (79%) y CE (84%), donde este parámetro resultó más alto en el CE, sin embargo el pH mínimo fue de 5.2, y debido a que no se observó DM se probó con esta configuración 2 niveles adicionales de inóculo, 10 y 20%, para ver si era requerido un pH más bajo para observar la remoción de minerales. No se observaron diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) en la acidificación y el pH mínimo alcanzado fue de 5. La DP fue igual en el reactor de CE en todos los niveles de inóculo utilizados alcanzando valores de hasta 88%. Debido a que el pH no disminuyó a menos de 5 se redujo la cantidad de melaza, usando una mezcla de 5% azúcar de caña (p/p) y 10% melaza (p/p). En esta última fermentación se alcanzó un pH de 4.6 y una DP del 80% resultando que a pH bajo esta se ve desfavorecida. No se observó DM debido quizás a interferencias producidas por la melaza pues se observó la acumulación de los minerales. Es por ello que se seleccionó la quitina cruda con mayor DP, que fue aquella que utilizó mezcla de especies en el CE, 20% melaza y 5% inóculo. Para purificar esta quitina cruda fueron requeridos HCl 0.4 M y NaOH 0.2 M para la DM y DP, respectivamente. El contenido de cenizas y proteína residual de la quitina alcanzaron valores de 1% y 1.6%, respectivamente, situándose dentro de los estándares comerciales. La quitina fue caracterizada por su espectro de infrarrojo observándose las bandas características en la α -quitina. Por otro lado, la quitina purificada observó un contenido de insolubles del 83% y un peso molecular de 4523 KDa.

Al final de la fermentación se recuperaron los pigmentos con acetona (265 µg de astaxantina/g ensilado). Se utilizó quitina cruda seca y húmeda para recuperar pigmentos que fueron concentrados en un rotavapor, no se encontró astaxantina utilizando quitina seca por su termolabilidad, utilizando quitina húmeda si fueron recuperados pigmentos, alcanzando hasta 275 µg/mL en el extracto líquido. Considerando la masa total de ensilado que fue usada para extraer los pigmentos con acetona, después de la concentración tan sólo se recuperó el 34% de estos, ya que en el proceso de concentración se usaron 60°C de temperatura. El pigmento fue microencapsulado utilizando GA y tres diferentes temperaturas de secado obteniéndose el máximo porcentaje de retención (86%) al usar GA a una temperatura de 140°C.

Abstract

In this work, different concentrations of molasses were evaluated in lactic acid fermentation of shrimp heads of *L. vannamei* in flasks being suitable for the growth of lactic acid bacteria 20% molasses, reaching a pH of 4.7 and an TTA of 0.52 mmol/g. This level of molasses was applied in batch reactors with and without agitation reaching a final pH of 5. The best DP was observed in TR (78%) and CE (85%) reactors (no significant difference). It was decided to test these two configurations of reactors with another source of waste consisting in a mixture of species. There were differences in the DP in the TR (79%) and CE (84%), where this parameter was higher in CE, however the minimum pH was 5.2, and DM was not observed in this configuration, so two additional levels of inoculum, 10 and 20%, were tested to find if it was required a lower pH to observe the removal of minerals. There were no significant differences ($\alpha < 0.05$) on acidification and the minimum pH reached was 5. The DP was the same in the CE reactor at all levels of inoculums, reaching values of up to 88%. The pH did not decrease to less than 5, so it was reduced the amount of molasses, using a mixture of 5% sucrose (w/w) plus 10% (w/w) molasses. In the latter fermentation a pH of 4.6 and a DP of 80% were reached, this suggests that low pH disadvantaged DP. DM was not observed perhaps due to interference from molasses since the accumulation of minerals was observed. That is why the most deproteinized crude chitin was selected (mixture of species, CE reactor, 20% molasses and 5% inoculum). To purify the crude chitin 0.4 M HCl and 0.2 M NaOH were required for DM and DP, respectively. The residual ash and protein content of chitin reached values of 1% y 1.6%, respectively, within the commercial standards. The chitin was characterized by its infrared spectrum where the characteristic bands were observed in the α -chitin. On the other hand, purified chitin was an insoluble content of 83% and an average molecular weight of 4523 KDa.

At the end of fermentation pigments were recovered with acetone (265 μ g astaxanthin/g silage). Dry and wet crude chitins were used to recover pigments that then were concentrated in a rotary evaporator. Astaxanthin was not found by

using dry chitin due to its thermolability, but using wet chitin pigments were recovered, reaching up to 275 µg/mL in the liquid.extract. Considering the total mass of silage that was used to extract the pigments with acetone, after concentration only 34% of these was recovered, due in the process of concentration were used 60 °C of temperature. The pigment was microencapsulated using GA and three different drying temperatures. The highest retention (86%) was found using a temperature of 140 °C.

1. INTRODUCCIÓN

México reportó en 2008 una producción de 187 mil toneladas de camarón, la producción pesquera nacional ha registrado un crecimiento anual del 2.5% durante los últimos nueve años. El procesado del camarón es una actividad en la que se generan grandes cantidades de residuos que representan el 50% del peso vivo del camarón. Un aumento en la producción indica a la vez un aumento en la cantidad de residuos que suponen contaminación ambiental.

Los desperdicios de camarón constan de pigmentos, quitina, proteínas y minerales que en vez de ser desechados pueden ser aprovechados para recuperar productos de alto valor agregado y reducir la contaminación.

Un método que permite la recuperación de todos estos elementos es el ensilado, que es un proceso de fermentación que involucra el uso de bacterias lácticas. El ensilado favorece la estabilidad y recuperación de los pigmentos y que más tarde pueden ser recuperados por solventes o aceites vegetales o animales. Durante la fermentación láctica los minerales del exoesqueleto de los crustáceos, así como las proteínas, pueden ser parcialmente removidos y utilizados en alimentación animal. Este proceso resulta en una purificación parcial de la quitina que disminuye en gran medida el tratamiento químico.

Los métodos tradicionales de purificación de este biopolímero, involucran el uso de altas concentraciones de ácidos y álcalis que producen corrosión y son agresivos con el ambiente. Es por ello que la fermentación es ideal para purificar los desperdicios de crustáceos ya que prácticamente no se produce contaminación y además recuperar otros componentes de alto valor.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 QUITINA Y QUITOSANO

2.1.1 Estructura y generalidades

La quitina es un polisacárido formado por unidades de *N*-acetilglucosamina las cuales están unidas mediante enlaces β -1,4 (Figura 1), que fue identificada por primera vez en 1884. Puede pensarse en la quitina como en celulosa con un grupo hidroxilo de cada unidad de repetición reemplazado por un grupo de acetilamina sobre el C2. Esto permite un incremento de los enlaces de hidrógeno entre cadenas adyacentes, dándole al material una mayor resistencia (Peniche, 2006). Este biopolímero es sintetizado por un enorme número de organismos y es considerando el segundo biopolímero más abundante después de la celulosa. La quitina se encuentra en la naturaleza como microfibrillas cristalinas ordenadas formando componentes estructurales en el exoesqueleto de artrópodos o en las paredes celulares de hongos y levaduras. (Rinaudo, 2006).

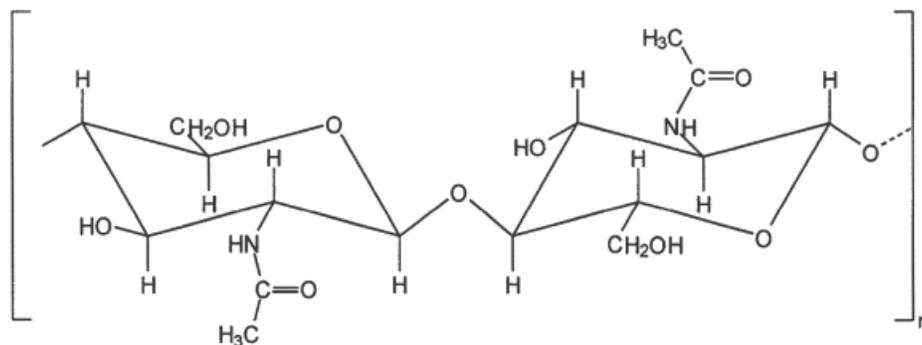


Figura 1. Estructura química de la quitina (Synowiecki y Al-Khateeb, 2003).

La quitina es un polisacárido no tóxico y biodegradable que forma una sustancia córnea y es el principal constituyente de la cutícula de insectos, arácnidos, y crustáceos, siendo estos últimos las fuentes más importantes de quitina, entre ellos el cangrejo y el camarón (Cho *et al.*, 1998).

La quitina se encuentra en dos formas alomórficas: α y β . La forma α tiene una orientación antiparalela de las microfibrillas de quitina con enlace de hidrógeno intermolecular y es la forma más abundante de quitina en la naturaleza (crustáceos, hongos), mientras que la β -quitina tiene cadenas paralelas y se encuentra en la pluma de calamares (Rocha-Pino *et al.*, 2008).

El quitosano es el derivado *N*-desacetilado de la quitina, por lo tanto el quitosano contiene una amina primaria y su unidad de repetición es la 2-amino-2-deoxi- β -D-glucosa (Figura 2). La quitina y el quitosano son comercialmente importantes debido a su alto contenido de nitrógeno (6,89%). Además son sustituyentes potenciales de algunos polímeros sintéticos debido a sus excelentes propiedades tales como biocompatibilidad, biodegradabilidad, toxicidad nula, entre otras (Parada *et al.*, 2004).

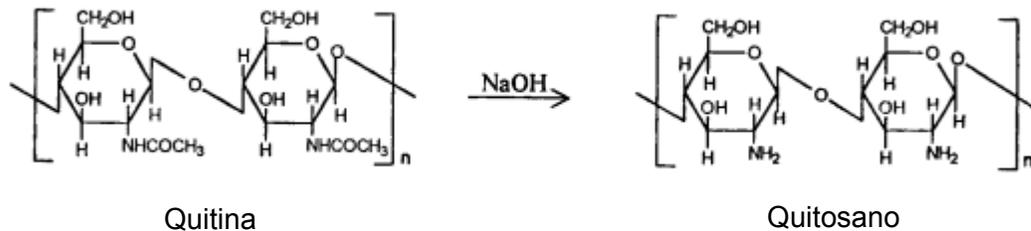


Figura 2. Conversión de quitina a quitosano (Bhardwaj *et al.*, 2000).

En la desacetilación de la quitina se adicionan altas concentraciones de NaOH. La purificación química de la quitina tiene importantes desventajas ya que se consume mucha energía y se daña al ambiente debido a las altas concentraciones de ácidos minerales y sosa cáustica (Shirai *et al.*, 2001).

Por otro lado, la calidad de la quitina influencia los parámetros fisicoquímicos del quitosano después de la desacetilación parcial, tales como el peso molecular y la viscosidad. Hoy en día, la tendencia va hacia la producción de quitina y quitosano de alta calidad para uso biomédico y farmacéutico, y por lo tanto, alternativas al método químico deben ser investigadas (Xu *et al.*, 2008).

2.1.2 Propiedades fisicoquímicas de la quitina y quitosano

2.1.2.1 Solubilidad

Para determinar las propiedades fisicoquímicas de la quitina esta debe ser solubilizada. Desafortunadamente, la quitina es insoluble en soluciones acuosas y en los solventes orgánicos comunes debido a sus fuertes enlaces intra e inter-hidrógeno. Los principales solventes son LiCl/DMF (dimetilformamida), LiCl/DMAc (dimetilacetamida), LiCl/NMP (N-metil-2-pirrolidona) y ácidos minerales concentrados, 40% NaOH o NaOH/urea. La débil solubilidad de la quitina es la razón de su uso restringido en biomedicina y biotecnología (Xu *et al.*, 2008).

El quitosano es insoluble en disolventes orgánicos puros, pero soluble (cuando el grado de acetilación es menor de 60%) en disoluciones acuosas de ácidos orgánicos debido a la presencia de grupos amino libres que al ser protonados generan repulsiones en la cadena promoviendo la solubilización. El ácido fórmico, acético, láctico, pirúvico y ácidos oxálicos con frecuencia son usados para su disolución. Los ácidos minerales como ácidos hidroclicóricos y nítricos también solubilizan al quitosano (Pacheco, 2010).

2.1.2.2 Peso molecular

El peso molecular de la quitina normalmente es mayor a 1,000 KDa y el quitosano comercial se encuentra entre 100 y 1,200 KDa. Numerosos factores influyen en el peso molecular del quitosano como las altas temperaturas, concentraciones de ácidos y álcalis, así como largos tiempos de reacción que pueden degradar y ocasionar la despolimerización de las cadenas (Ravi, 1999; Shahidi y Abuzaytoun, 2005; Pacheco, 2010).

2.1.3 Aplicaciones

Recientemente, el valor comercial de la quitina ha incrementado debido a las propiedades de sus derivados solubles (quitosano) que tienen múltiples aplicaciones en la industria química, biotecnología, agricultura, procesamiento de alimentos, cosmética, farmacéutica, veterinaria, medicina, odontología, protección ambiental, y en la industria textil y de producción del papel (Synowiecki y Al-

Khateeb, 2003; Alonso *et al.*, 2009; Martínez-Castellanos *et al.*, 2009). En la Tabla 1 se detalla un poco más sobre algunas de sus aplicaciones.

Tabla 1. Aplicaciones de la quitina y sus derivados (Synowiecki y Al-Khateeb, 2003).

Propiedades específicas	Principales aplicaciones
Bioactividad	Previene el crecimiento de microorganismos, antimicrobiano en fibras y productos textiles, material de empaque de alimentos, estimulante del sistema inmunológico, agente anticolesterolémico, promotor de pérdida de peso, anticoagulante sanguíneo, en curación de heridas.
Biodegradabilidad	Fuente de carbono en producción de proteína unicelular, empaques biodegradables, liberación controlada de drogas, agroquímicos, cosméticos, artículos de tocador.
Reactividad de grupos amino desacetilados	Inmovilización de enzimas, medio para cromatografía de afinidad y filtración en gel, retenedor de humedad, en productos para el cabello antielectrostático y protector, en formación de polielectrolitos.
Permeabilidad selectiva de membranas de quitosano y habilidad de formación de películas	Separación por membrana en medicina, biotecnología, procesamiento de alimentos, recubrimiento de productos textiles con permeabilidad de agua controlada, ajuste de la atmósfera interna de tejidos de frutos, mejoras en la afinidad superficial de colorantes ácidos, prevención de crecimiento microbiano en heridas de vegetales y frutas, producción de membranas de diálisis.
Habilidad quelante	Quelante de iones de metales pesados en aguas contaminadas, inactivación de metaloenzimas que influyen cambios indeseables en alimentos.
Capacidad de adsorción	Remoción de fenoles de aguas residuales, pintura electrostática eficiente, recuperación o separación de proteínas y otros subproductos, clarificación de jugos y bebidas.

2.1.4 MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE QUITINA

Los tres componentes principales de los caparazones de crustáceos incluyendo a la quitina son los minerales (principalmente carbonato de calcio) y proteínas. Estos tres componentes se encuentran estrechamente asociados y representan alrededor del 90% del peso seco total del caparazón (Rødde *et al.*, 2008). Estos deben ser removidos de la quitina para cumplir con sus especificaciones comerciales, para lo cual se han reportado distintos métodos.

2.1.4.1 Métodos químicos

Las principales fuentes comerciales de quitina han sido los caparazones de cangrejo y camarón. En el proceso industrial, la quitina es extraída de crustáceos mediante tratamiento ácido para disolver el carbonato de calcio (desmineralización (DM)) seguido por extracción alcalina para solubilizar las proteínas (desproteínización (DP)). En adición, un paso de decoloración es usualmente agregado para remover los pigmentos restantes y obtener un producto blanco o crema (Rinaudo, 2006).

El procedimiento químico tradicional para la producción de quitina desde residuos de camarón involucra el uso de HCl a relativamente alta concentración para la DM, seguida por un tratamiento con NaOH a relativa alta temperatura (90 °C) para conseguir la DP. Posteriormente, se realiza un paso de blanqueado con KMnO_4 aunque también se pueden usar peróxidos. (Xu *et al.*, 2008).

A pesar de que el método químico es muy eficiente, tiene el inconveniente que la purificación de la quitina requiere de energía y causa daño al ambiente por las altas concentraciones de ácido mineral y sosa cáustica (Xu *et al.*, 2008). Otra desventaja de la purificación química de la quitina, es que se produce cierto grado de despolimerización debido a las condiciones severas de tratamiento y además, los componentes proteicos resultantes no pueden ser usados como alimento animal (Shirai *et al.*, 2001; Plascencia *et al.*, 2002).

Es entonces de vital importancia la optimización de la extracción de la quitina para minimizar su degradación y al mismo tiempo bajar la cantidad de impurezas a un nivel satisfactorio para ciertas aplicaciones específicas (Rødde *et al.*, 2008).

2.1.4.2 Métodos biológicos

Mientras que el proceso químico aísla la quitina eficientemente, las proteínas y carotenoides no pueden ser recuperados. El uso de la FAL en la preservación de alimentos es bien conocido. En estas operaciones, se produce ácido láctico (AL) que reduce el pH, lo cual resulta en la inhibición del crecimiento de microorganismos no deseados. El ensilado es un proceso en el que materiales de origen biológico son almacenados anaeróbicamente. La mayoría de estos

materiales son susceptibles a descomposición por microorganismos aeróbicos debido a su alto contenido de humedad y composición química (Martin, 1996).

El ensilado de residuos de crustáceos y una producción de AL *in situ* por BAL inducen la licuefacción del residuo semisólido y se produce una disminución en el pH, así como la activación de proteasas que desproteinizan los residuos. Un efecto colateral del ensilado es la producción de AL por la fermentación de carbohidratos, que produce una DM de los residuos y una precipitación parcial de los iones de calcio como lactato de calcio (Xu *et al.*, 2008; Gimeno *et al.*, 2007). La fermentación del residuo de camarón resulta en un licor rico en proteínas, minerales y carotenoides (especialmente astaxantina) con una fracción sólida (FS) rica en quitina. La fracción líquida (FL) puede ser utilizada como suplemento de proteínas y minerales para consumo humano o alimentación animal (Shirai *et al.*, 2001; Cira *et al.*, 2002; Bhaskar *et al.*, 2007).

La utilidad de la preservación por medio de fermentación es debida a su naturaleza amigable ecológicamente comparada con los métodos de preservación que involucran ácido o bases o el secado, que son ecológicamente agresivos y económicamente inviables (Bhaskar *et al.*, 2007).

La fermentación del desperdicio para recuperar quitina reemplaza considerablemente el proceso químico (Bhaskar *et al.*, 2007), sin embargo, para producir una quitina de calidad estándar, la proteína y minerales residuales de la quitina cruda deben ser removidos mediante tratamientos suaves con álcalis y ácidos (Cira *et al.*, 2002; Sini *et al.*, 2007).

También se ha reportado el uso de proteasas para la DP de caparzones de crustáceos, que evitaría el tratamiento alcalino. Además de la aplicación de exoenzimas, bacterias proteolíticas son usadas para la DP de caparzones desmineralizados (Sini *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2008).

2.2 ASTAXANTINA

2.2.1 Estructura y generalidades

Los desperdicios de crustáceos han sido ampliamente estudiados debido a su contenido de astaxantina. La astaxantina (3,3'-dihidroxi- β,β -caroteno-4,4'-diona) (Figura 3) es un carotenoide rojo producido por el plancton marino, que da la pigmentación característica a ciertos crustáceos, peces y aves.

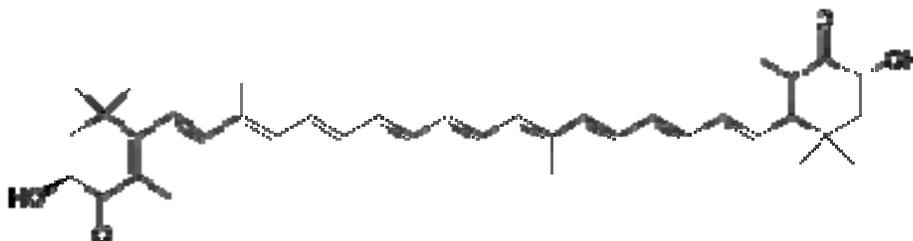


Figura 3. Estructura molecular de la astaxantina

Los camarones no pueden sintetizar de *novo* este pigmento, y es incorporado en la dieta por el consumo de algas o animales (Gimeno *et al.*, 2007). Se acumula en el exoesqueleto, unida a una proteína formando carotenoproteína, soluble en agua y que puede variar en color, desde azul a verde o café. Sólo después del calentamiento o extracción con solventes, la astaxantina adquiere el típico color rojo-anaranjado. El nivel de carotenoides en los crustáceos es bajo y cambia dependiendo de la disponibilidad de pigmentos en la dieta, tamaño del organismo, maduración y diferencias genéticas (Synowiecki y Al-Khateeb, 2003).

Este pigmento tiene varias funciones biológicas en los peces, sirve como precursor de la vitamina A, está asociada con la reproducción y el desarrollo embrionario y con la protección de las células contra daño oxidativo (Higuera-Ciapara *et al.*, 2004).

La astaxantina en crustáceos como el camarón, se encuentra libre o en asociación con otros componentes. Puede estar esterificada en uno o ambos grupos hidroxilos con diferentes ácidos grasos como el palmítico, oleico, esteárico o

linoléico. En forma libre, los grupos hidroxilos se presentan sin esterificación. También se encuentra presente en un complejo con proteínas o lipoproteínas. En el residuo de camarón, la astaxantina se encuentra principalmente en forma esterificada con ácidos grasos (monoéster y diéster), y sólo menos del 10% se encuentra libre. Como la mayor parte de la astaxantina se encuentra esterificada con ácidos grasos, se disuelve rápidamente en aceite (Handayani *et al.*, 2008).

Como la mayoría de los carotenoides, la astaxantina es una molécula altamente insaturada y de este modo, puede ser fácilmente degradada por procesos térmicos u oxidativos durante la manufactura y almacenamiento de alimentos. Esto puede causar la pérdida de sus propiedades deseables así como la producción de compuestos de aroma o sabor indeseable. Generalmente, los carotenoides se encuentran en la naturaleza como moléculas *trans* en las que todos los dobles enlaces están en configuración *trans*. También es conocido que la luz y altas temperaturas promueven la isomerización a la forma *cis*. Los isómeros *cis* de los carotenoides presentan menor aplicabilidad que sus correspondientes en la configuración *trans* (Higuera-Ciapara *et al.*, 2004).

2.2.2 Aplicaciones

La aplicación comercial más importante de la astaxantina, obtenida sintéticamente o de fuentes naturales como microalgas, levaduras o subproductos de crustáceos, es en la acuicultura donde es usada para la formulación de dietas para salmones para proveerles el típico color del músculo, que es ampliamente aceptado por los consumidores en todo el mundo y posiblemente inflencie el valor nutricional de la carne de pescado (Synowiecki y Al-Khateeb, 2003; Higuera-Ciapara *et al.*, 2004).

En la industria farmacéutica se emplea como marcador en el seguimiento de células, como agente antioxidante y antitumoral; en la industria de cosméticos como colorante y antioxidante; en la industria alimenticia como suplemento y complemento en la coloración directa e indirecta de diversos productos como en la dieta de las aves de corral con la finalidad de incrementar la coloración en la yema del huevo; en la acuicultura como fuente de pigmentación en la dieta de crustáceos y peces (fijación del colorante en el músculo de la trucha arcoiris y del

salmón) dependiendo de la etapa de desarrollo del pez, así como del estado de maduración sexual y de la forma libre o esterificada del pigmento; lo que incrementa el valor comercial de los productos a través de la bioacumulación y metabolismo de las diferentes formas de astaxantina en los músculos, piel y exoesqueleto (Ramírez, 2008).

En la nutrición humana la astaxantina ha ganado popularidad como suplemento debido a su capacidad antioxidante. Actualmente, productos de astaxantina derivada de microalgas están disponibles en el mercado y promovidos como agentes anticancerígenos y antiinflamatorios, así como inmunoestimulantes (Higuera-Ciapara *et al.*, 2004).

2.2.3 Métodos de recuperación

La extracción de astaxantina de levaduras y algas, que son por mucho las fuentes naturales del pigmento más estudiadas, usualmente incluye un pretratamiento alcalino para hidrolizar los ésteres formados de astaxantina con ácidos grasos. La adición de ácidos orgánicos o inorgánicos en el ensilado químico son métodos efectivos, así como también son procesos útiles para evitar la descomposición de los residuos de camarón; sin embargo, la baja en el pH puede degradar los carotenoides y también limitar sus aplicaciones biológicas (Gimeno *et al.*, 2007). Se ha demostrado que el ensilado por fermentación de los residuos de camarón tiene un mejor efecto en la estabilidad y extracción de los carotenoides en comparación con el ensilado ácido (Sachindra *et al.*, 2007).

Ya que la astaxantina es un pigmento no polar, han sido utilizados la acetona y el etanol así como fluidos comprimidos como disolventes para la extracción de astaxantina (Gimeno *et al.*, 2007). Han sido conducidos también estudios para extraer este compuesto del residuo de camarón por extracción usando aceites vegetales como los aceites de girasol, cacahuate, sésamo, mostaza, soya, coco, palma, salvado de arroz, hígado de bacalao (Handayani *et al.*, 2008).

2.3 MICROENCAPSULACIÓN

La microencapsulación se define como el proceso en el cual pequeñas partículas o gotas son rodeadas por un revestimiento, o embebidas en una matriz homogénea o heterogénea, dando como resultado pequeñas cápsulas con propiedades útiles (Madene *et al.*, 2006; Gharsallaoui *et al.*, 2007). También puede ser definida como una tecnología de embalaje de sólidos, líquidos o materiales gaseosos en miniatura, cápsulas selladas que pueden liberar su contenido a un ritmo controlado en condiciones específicas (Figura 4) (Desai y Park, 2005).

El sistema de barrera está diseñado para proteger al material encapsulado de factores que pueden causar su deterioro, para prevenir la interacción prematura entre el material de barrera y otros ingredientes, para limitar la pérdida de volátiles y también para permitir la liberación controlada o prolongada bajo las condiciones deseadas (Gharsallaoui *et al.*, 2007; Desai y Park, 2005).

La tecnología de microencapsulación ha sido usada en la industria alimentaria por más de 60 años. La microencapsulación en el procesamiento de alimentos incluye el recubrimiento de partículas diminutas de acidulantes, lípidos, aromas, sabores, aceites esenciales, edulcorantes, antioxidantes, colorantes, aminoácidos, vitaminas, minerales, enzimas y microorganismos, entre otros. Esas microcápsulas pueden variar de unos cuantos micrómetros a milímetros y tener diferentes formas, dependiendo de los materiales y métodos que se utilizan para prepararlas (Desai y Park, 2005).

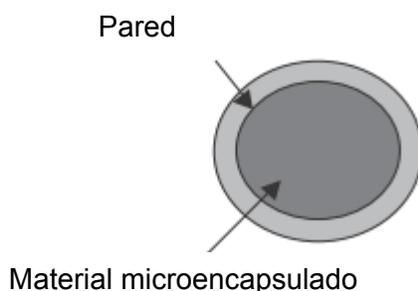


Figura 4. Estructura de una microcápsula (Madene *et al.*, 2006)

2.3.1 El secado por aspersión

El secado por aspersión es una operación unitaria en la cual un producto líquido es atomizado en una corriente de gas caliente para obtener instantáneamente un polvo. El gas es generalmente aire o más raramente un gas inerte como el nitrógeno. El líquido que se alimenta al secador puede ser una solución, emulsión o suspensión (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

La microencapsulación por secado por aspersión ha sido usado en la industria alimentaria desde 1950, para la protección de ciertos ingredientes contra la degradación/oxidación y para convertir líquidos a polvos (Gouin, 2004; Desai y Park, 2005).

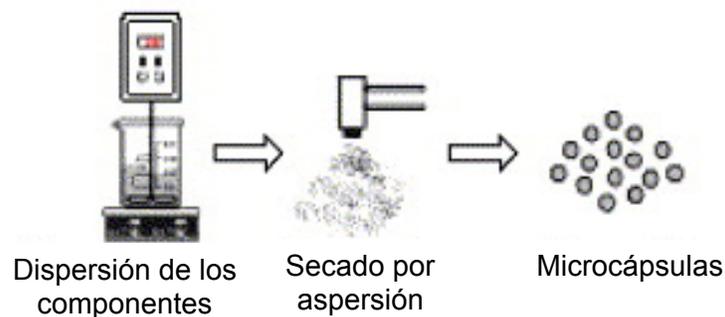


Figura 5. Visión general del proceso de microencapsulación por secado por aspersión.

El equipo necesario está disponible en el mercado y los costos de producción son menores que la mayoría de los otros métodos (Gharsallaoui *et al.*, 2007; Desai y Park, 2005). Esta tecnología ha sido aplicada en muchas áreas, incluyendo la industria alimentaria, farmacéutica, cerámica, polimérica y química (Vehring *et al.*, 2007).

Para preparar materiales para un secado por aspersión, el material de barrera es hidratado. El ingrediente a ser encapsulado es agregado al material de barrera y homogenizado o completamente mezclado en el sistema usando una técnica similar. La mezcla es homogenizada para formar pequeñas gotas del ingrediente

dentro del material de barrera. La creación de emulsiones más finas incrementa la retención del ingrediente durante el proceso de secado. La emulsión es alimentada al secador por aspersion donde es atomizada. Un flujo de aire caliente hace contacto con las partículas atomizadas y evapora el agua, produciendo una partícula seca que tienen pequeñas gotas del ingrediente adentro. Las partículas secas caen en el fondo del secador y son recolectadas (Figura 5) (Risch, 1995).

Una de las principales desventajas es que produce polvos muy finos que necesitan un procesamiento posterior, como hacerlos más fácilmente solubles si se requieren para aplicación en líquidos. Otra es que debido al calor requerido para la evaporación de agua del sistema, el secado por aspersion no es bueno para ingredientes sensibles a la temperatura (Risch, 1995).

2.3.2 Materiales de barrera usados en secado por aspersion

Como la mayoría de los procesos de microencapsulación por secado por aspersion en la industria alimentaria utilizan formulaciones acuosas, el material de barrera debe ser soluble en agua a un nivel aceptable. Los materiales de barrera típicos incluyen goma arábica, maltodextrinas, almidón hidrofóticamente modificado y mezclas de estos. Otros polisacáridos (alginato, carboximetilcelulosa, goma guar) y proteínas (proteínas de suero de leche, proteínas de soya y caseinato de sodio) pueden ser utilizados como materiales de barrera en secados por aspersion (Desai y Park, 2005; Gouin, 2004).

Los polisacáridos naturales y sus derivados representan un grupo de polímeros ampliamente usados en la industria farmacéutica y alimentaria. Estos polisacáridos son obtenidos usualmente de exudados de plantas que contienen otros azúcares además de glucosa. Las gomas naturales son preferidas a las sintéticas, debido a su no toxicidad, bajo costo y disponibilidad. (Bhardwaj *et al.*, 2000).

En las secciones 2.3.2.1 y 2.3.2.2 se abordarán algunos materiales de barrera utilizados ampliamente en microencapsulación.

2.3.2.1 Goma arábica

La goma de acacia, también llamada goma arábica (GA), es un polisacárido exudado de los árboles de *Acacia senegal* o *Acacia seyal* (Ibanoglu, 2002; Sanchez *et al.*, 2002). Es producido principalmente en las regiones subdesérticas de África incluyendo países como Sudán, Senegal, Mauritania, Mali, Camerún y Chad (Sanchez *et al.*, 2002; Williams y Phillips, 2000) (Figura 6).



Figura 6. Recolección de exudados de árboles de *Acacia* para obtener goma arábica.

Es un complejo polisacárido ligeramente ácido, de alto peso molecular tipo arabinogalactano y el menos viscoso de los polisacáridos naturales de grado alimenticio (Cozic *et al.*, 2009). Su estructura contiene alrededor de 2% de proteína (Williams y Phillips, 2000) unida covalentemente a la fracción polisacárida, esta no puede ser removida por purificación (Williams y Phillips, 2000). La fracción de carbohidrato, está compuesta por D-galactosa (~40% de residuos), L-arabinosa (~24%), L-ramnosa (~13%) y dos ácidos urónicos, responsables del carácter polianiónico de la goma, el ácido D-glucorónico (~21%) y ácido 4-O-metil-D-glucorónico (~2%). La estructura de la goma acacia es compleja y poco conocida (Sánchez *et al.*, 2002).

El componente proteico concede a la goma arábica su actividad superficial y está asociada principalmente con una fracción de alto peso molecular que representa

menos del 30% de la goma total (Ibanoglu, 2002). La goma arábica tiene un peso molecular que varía de 47,000 a 3,000,000 g/mol (Pedroza-Islas *et al.*, 1999).

Hoy en día, es utilizada principalmente como aditivo en la industria alimentaria por sus propiedades nutricionales y superficiales, en microencapsulación o procesos de coacervación, en farmacéutica (Cozic *et al.*, 2009), cosmética, también en litografía, explosivos y textiles (Sanchez *et al.*, 2002).

Una característica funcional de la goma arábica es su habilidad para actuar como emulsificante de aceites esenciales y sabores. Es sabido que el componente proteico de alto peso molecular se adsorbe preferencialmente sobre la superficie de las gotas de aceite. Es previsto que las cadenas hidrofóbicas del polipéptido adsorben y anclan las moléculas a la superficie, mientras que los bloques de carbohidratos inhiben la floculación y coalescencia a través de repulsiones electrostáticas y estéricas (Williams y Phillips, 2000),

Es la goma más ampliamente usada como material de microencapsulación (Mandene *et al.*, 2006). Se ha utilizado ampliamente goma arábica como microencapsulante por su eficiencia de microencapsulación y estabilidad, así como mezclas de maltodextrina y almidón modificado (Kanakdande *et al.*, 2007). En estos sistemas, la estabilización ocurre debido a que el polímero actúa como barrera física y permeable para la difusión del oxígeno molecular (Bustos *et al.*, 2003).

2.3.2.2 Maltodextrina

Las maltodextrinas (MD) se forman por la hidrólisis parcial del almidón de maíz con ácidos o enzimas y son suministrados como equivalentes de dextrosa (EDs), el valor de ED es una medida del grado de la hidrólisis del polímero de almidón. Ellos manifiestan la habilidad de formar matrices que es importante en la formación de sistemas de barrera (Mandene *et al.*, 2006). La maltodextrina es un polímero lineal con una masa molecular promedio de aproximadamente 1800 g/mol (Pedroza-Islas *et al.*, 1999). Las maltodextrinas son una buena elección como material de barrera debido a su bajo costo y efectividad, no aportan sabor, tienen bajas viscosidades a altas concentraciones de sólidos y están disponibles

en diferentes pesos moleculares. Esto permite crear mezclas con diferentes densidades de pared que provee protección contra la oxidación del ingrediente encapsulado (Desobry *et al.*, 1997). Es menos costosa que la goma arábica (Mandene *et al.*, 2006). Las mezclas de GA y MD son promisorias como materiales de barrera, dando viscosidades aceptables en estudios de microencapsulación por secado por aspersion (Mandene *et al.*, 2006).

Entre las principales deficiencias se encuentran la falta de capacidad de emulsificación y baja retención de compuestos volátiles (Mandene *et al.*, 2006).

3. JUSTIFICACIÓN

La actividad industrial de procesamiento de los productos de la pesca, genera una gran cantidad de residuos, que suponen a nivel mundial, un grave problema medioambiental.

En vez de ser confinados a los vertederos, los residuos de crustáceos pueden ser aprovechados para recuperar quitina y pigmentos. De esta manera la utilización del residuo tiene un doble propósito, contribuir con el medio ambiente minimizando el desperdicio y obtener productos de alto valor agregado.

Los métodos industriales de purificación de la quitina emplean sustancias indeseables como ácidos y álcalis que tienen una repercusión ambiental negativa. Es por ello que se busca usar métodos más suaves y amigables con el ambiente como los métodos biológicos que involucran el uso de microorganismos.

Los métodos reportados de FAL usan glucosa o fructosa como fuente de carbono, sin embargo el uso de melazas que es un material más económico abarataría los costos asociados al proceso. Por otra parte más allá de la simple extracción de astaxantina, el empleo del encapsulado permitirá producir productos con mayor ámbito de aplicación.

4. OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar las condiciones de tratamiento microbiano que favorezcan la DP de desperdicios de camarón para recuperar quitina y astaxantina usando melaza como fuente de carbono.

Objetivos Particulares

- Determinar las condiciones de fermentación (niveles de fuente de carbono e inóculo, agitación y tipo de desperdicio) en reactores en lote para tratamiento microbiano de los residuos de camarón.
- Caracterizar la quitina obtenida del tratamiento microbiano
- Extraer, cuantificar y microencapsular astaxantina de desperdicios de camarón fermentados.

5. HIPÓTESIS

El tratamiento biológico de los desperdicios de camarón usando melaza como fuente de carbono permitirá obtener quitinas con altos porcentajes de DP, lo que favorecerá la extracción de los pigmentos, los cuales podrán ser posteriormente microencapsulados.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 FERMENTACIÓN DE RESIDUOS DE CAMARÓN

6.1.1 FERMENTACIONES EN FRASCOS

6.1.1.1 Elección de nivel de fuente de carbono

6.1.1.1.1 Desperdicio

Se utilizaron cabezas de camarón de la especie *Litopenaeus vannamei* provenientes de granjas camaronícolas (ubicadas en el estado de Sinaloa) fueron molidos hasta un tamaño de partícula de 5 mm en un molino de carne (Torrey 32-3, México) y almacenados a -20°C hasta su utilización.

6.1.1.1.2 Fuente de carbono

Se utilizó como fuente de carbono melaza de caña de azúcar (Ingenio El Molino, Nayarit, México), que se adicionó en una proporción de 20, 30, 40 o 50% (p/p) al residuo de camarón.

6.1.1.1.3 Microorganismo

Se empleó para las fermentaciones la bacteria láctica *Lactobacillus spp.* B2 (aislada de camarones tropicales), previamente crecida en caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) durante 24 h a 30°C (Zakaria *et al.*, 1997), hasta obtener 10⁸ UFC/ml. Se inoculó al 5% (v/p) en relación al residuo de camarón (Cira *et al.* 2002).

6.1.1.1.4 Fermentaciones

Se realizaron fermentaciones en lote por duplicado, en frascos de vidrio. Las fermentaciones se realizaron a 30°C. Se muestreó cada 4 h durante las primeras 24 h y posteriormente a las 48, 72, 96 y 120 h.

6.1.1.2 Análisis de muestras

6.1.1.2.1 pH y Acidez total titulable (ATT)

El pH se midió por medio de un potenciómetro (pH 210, HANNA, Italia) a temperatura ambiente. La ATT fue determinada por titulación potenciométrica con NaOH 0.1 N hasta un pH de 8.0 en muestras diluidas con agua destilada en una relación de 1:10 (p/v) (Cira, 2000). Suponiendo que todo el ácido producido es láctico, entonces 1 ml de NaOH 0.1 N es equivalente a 0.009 g de AL (90 g/mol). El porcentaje de ácido fue calculado con la ecuación 1 y posteriormente se convirtió el porcentaje de AL a mmol/g. (Cira, 2000):

$$\%ATT = \frac{(\text{ml NaOH}) * (\text{Normalidad del NaOH}) * (0.009) * (100)}{\text{Volumen de la muestra}} \quad (1)$$

6.1.1.2.2 Cuenta viable de BAL

10 g de muestra fueron homogenizados en 90 ml de solución salina isotónica al 0.9% (p/v). Se prepararon diluciones decimales y se sembró en placas de agar MRS por duplicado, posteriormente se realizó la enumeración de colonias en las placas que presentaban entre 30 y 300 colonias. Los resultados fueron expresados en UFC/g.

6.1.1.2.3 a_w

Se utilizó un AquaLab CX-2 (Decagon, USA) que usa la técnica del espejo enfriado para determinar la actividad acuosa. Las determinaciones fueron realizadas por duplicado.

6.1.1.2.4 Análisis estadístico

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey cuando fue requerido por medio del paquete SPSS (2006). Asimismo, se realizaron ajustes de regresión no lineal mediante el modelo de Gompertz para determinar los parámetros cinéticos de acidificación por medio del paquete Curve Expert (2001) (Cira *et al.*, 2002; Pacheco *et al.*, 2009).

6.1.2 FERMENTACIONES EN REACTORES

6.1.2.1 Elección de tipo de agitación en reactores en lote

6.1.2.1.1 Fermentaciones en reactores

Se utilizaron las condiciones que presentaron una mayor acidificación establecidas en el experimento anterior en reactores en lote con y sin agitación que operaron utilizando 2 kg de residuos. Los reactores de columna (estático (CE) y agitado (CA)) consistieron en dos módulos separados entre sí por una malla de 4 mm² de área de poro, en el módulo superior se retenía el residuo sólido, mientras que en el inferior, el licor era retenido. Los reactores de tambor rotatorio (TR) consistieron en un tambor horizontal de malla del mismo tamaño que permitía la separación del líquido y donde la FS fue retenida. Se tomaron muestras de la FL cada 4 h durante las primeras 24 h y posteriormente a las 48, 72, 96 y 120 h, y de la FS al inicio (0 h) y término (120 h) de la fermentación.

6.1.2.2 Efecto del tipo de desperdicio en la DP

6.1.2.2.1 Residuos

Se utilizó una mezcla de *L. vannamei* y *L. stylirostris* procedentes de granja y captura, fueron adquiridas del mercado de mariscos La Nueva Viga (Ciudad de México). Los desperdicios fueron molidos hasta un tamaño de partícula de 5 mm en un molino de carne (Torrey 32-3, México) y almacenados a -20°C hasta su utilización.

6.1.2.2.2 Fermentaciones

Se eligieron las configuraciones de reactores y de agitación de la sección 6.1.2.1 que presentaron mejor acidificación y DP y se utilizaron en fermentaciones posteriores por duplicado.

6.1.2.3 Selección de nivel de inoculación

6.1.2.3.1 Fermentaciones

Se eligió el tipo de desperdicio del apartado anterior que presentó mejor acidificación y DP y se varió el nivel de inoculación al 5, 10 y 20%. Se aplicaron en fermentaciones por duplicado.

6.1.2.4 Reducción de la capacidad amortiguadora del sustrato

Se determinó la capacidad amortiguadora del desperdicio de camarón con el nivel seleccionado de melaza, para ello se prepararon 20 g de sustrato al que fue añadido ácido láctico al 85% (J.T. Baker) gota a gota. Se realizó una curva de titulación en donde fue calculada la cantidad de ácido láctico (mmol/g sustrato) necesaria para obtener un pH de 4.5. En base a la cantidad teórica necesaria de ácido láctico para obtener este pH, se calculó el nivel de adición de azúcar de caña para reducir la cantidad de melaza a la mitad (10% p/p) y con ello disminuir la capacidad amortiguadora del sustrato de fermentación.

6.1.2.4.1 Fermentaciones

Se realizaron fermentaciones en el reactor y nivel de inoculación seleccionados en la sección 6.1.2.3, utilizando como fuente de carbono melaza (10% p/p) más azúcar de caña (5% p/p). Las fermentaciones fueron realizadas por duplicado.

6.1.2.5 Análisis de muestras

6.1.2.5.1 pH y ATT

Se procedió como se describió en la sección 6.1.1.2.1.

6.1.2.5.2 Cuenta viable de BAL

Se realizó como se detalló en la sección 6.1.1.2.2.

6.1.2.5.3 Determinación de porcentaje de humedad

El contenido de humedad fue determinado en el camarón crudo y fracciones sólidas de la fermentación. Se pesaron de 3 a 5 g de la muestra en un crisol de

porcelana previamente a peso constante. Las muestras fueron secadas a 105°C durante 24 h y posteriormente pesadas. El porcentaje de humedad se calculó por diferencia de peso (A.O.A.C, 1990).

6.1.2.5.4 Determinación del contenido de cenizas

Las muestras secas, fueron colocadas en una mufla e incineradas a 550°C durante 12 h. El porcentaje de cenizas fue calculado por diferencia de pesos (A.O.A.C, 1990).

6.1.2.5.5 Determinación de NT

El contenido de nitrógeno fue determinado en un analizador elemental (Fisons EA 1108) a muestras sólidas previamente secadas a 105°C y pulverizadas.

6.1.2.5.6 Determinación del NP y porcentaje de proteína

El porcentaje de nitrógeno proteico fue calculado restando el nitrógeno de quitina al nitrógeno total y el porcentaje de proteína, multiplicando el nitrógeno proteico por 6.25 de acuerdo a la ecuación 2 (Cira, 2000).

$$\% \text{ Proteína} = (\text{NT} - \text{NQ}) * 6.25 \quad (2)$$

6.1.2.5.7 Determinación de NQ

El contenido de nitrógeno en la quitina fue determinado por análisis elemental a muestras purificadas químicamente mediante el método de Black y Schwartz (1950). A 2 g de quitina cruda se adicionaron 50 ml de HCl 1 N calentándose en baño de ebullición durante una hora. Posteriormente la muestra fue filtrada en papel Whatman No. 1 y se lavó con agua en ebullición hasta la neutralidad. La quitina desmineralizada fue tratada con 100 ml de NaOH al 5% (v/p) y digerida durante una hora con baño de agua hirviendo. El residuo fue filtrado y lavado con agua hasta la neutralidad y finalmente lavado dos veces con aproximadamente 15 ml de acetona (Cira, 2000).

6.1.2.5.8 Determinación de porcentaje de DP

El %DP de las muestras fermentadas fue obtenido utilizando la ecuación 3:

$$\%DP = \frac{[(X0*S0) - (XR*SR)] * 100}{X0*SR} \quad (3)$$

Donde X0 y XR son los contenidos de proteína en las muestras crudas y fermentadas, respectivamente. S0 y SR son los pesos (g) de las muestras crudas y fermentadas (Pacheco *et al.*, 2009)

6.1.2.5.9 Análisis estadístico

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey cuando fue requerido por medio del paquete SPSS (2006).

6.1.3 PURIFICACIÓN DE LA QUITINA CRUDA

Por medio de la FAL se obtuvo una quitina parcialmente purificada (quitina cruda), que fue tratada posteriormente con ácidos y álcalis para obtener un producto puro, La quitina cruda proveniente de las mejores condiciones obtenidas de la fermentación fue despigmentada (sección 6.2.1.1) y tratada con diferentes concentraciones de ácido y álcali con el fin de determinar la concentración a la cual se purifica la quitina.

6.1.3.1 DM química

A la quitina cruda despigmentada se le realizaron tratamientos de DM utilizando HCl 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 M en una relación de 1:15 (p/v), agitándose a temperatura ambiente durante 2 horas. El residuo se filtró y lavó con agua destilada. Se determinó el contenido de humedad secando a 105°C durante 24 h y posteriormente se realizó la determinación cenizas por el método descrito en la sección 6.1.2.5.4.

6.1.3.2 DP química

La quitina parcialmente purificada que se obtuvo con una condición óptima de tratamiento con ácido, fue tratada con NaOH a las concentraciones de 0.2, 0.4,

0.6, 0.8 y 1.0 M, en una relación de 1:15 (p/v), agitándose durante 2 horas. Posterior al tratamiento, se filtró y lavó la quitina con agua destilada. La quitina fue secada a 105°C durante 24 h y finalmente se determinó nitrógeno total por el método mencionado en la sección 6.1.2.5.5.

6.1.3.3 Análisis estadístico

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey cuando fue requerido por medio del paquete SPSS (2006).

6.1.4 CARACTERIZACIÓN DE LA QUITINA PURIFICADA

Se realizó la caracterización de la quitina purificada obtenida del mejor tratamiento de fermentación, para lo cual se realizaron las siguientes determinaciones:

6.1.4.1 Espectro de Infrarrojo

La quitina fue pulverizada y analizada en un espectrofotómetro de infrarrojo (Spectrum 100, Perkin Elmer, Norwalk USA.) donde los espectros fueron registrados en un intervalo de 650 a 4000 cm^{-1} .

6.1.4.2 Determinación del contenido de insolubles

El contenido de insolubles se determinó por diferencia de peso al disolver 0.02 g de quitina en 25 ml de solución de DMAc con 5% cloruro de litio (agitación durante 24 h). Posteriormente fue filtrado y llevado a peso constante, el contenido de insolubles se calculó por diferencia de peso.

6.1.4.3 Determinación de peso molecular por viscosidad intrínseca

Se disolvieron 0.02 g de quitina purificada en 25 ml de una solución de dimetilacetamida (DMAc) con 5% de cloruro de litio durante 24 h. Los parámetros se determinaron con la ecuación de Mark–Houwink-Sakurada y las constantes utilizadas a y k fueron 0.69 y $2.4 \times 10^{-4} \text{ Lg}^{-1}$, respectivamente.

6.1.4.4 Análisis estadístico

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparaciones múltiples de Duncan cuando fue requerido por medio del paquete SPSS (2006).

6.2 RECUPERACIÓN Y MICROENCAPSULACIÓN DE PIGMENTOS

6.2.1 Recuperación de astaxantina de residuos de camarón

6.2.1.1 Extracción de astaxantina

A la quitina cruda seca (secada a 45°C durante 24 h) o húmeda obtenidas al término de la fermentación (120 h) se adicionó acetona en una relación 1:15 (p/v) y se mantuvieron en agitación durante 1 h a temperatura ambiente alejadas de la luz. El extracto con acetona, fue recuperado y utilizado como se indica en la siguiente sección.

6.2.1.2 Concentración de astaxantina

El extracto con acetona se filtró con papel filtro de 30 µm y concentró en un rotavapor (BÜCHI R-205, baño de agua BÜCHI B-490, Flawil, Zuiza), a 60°C hasta que no pudieran ser percibidos restos de acetona en el concentrado, posteriormente se realizó una filtración adicional.

6.2.1.3 Cuantificación de astaxantina

Los extractos concentrados fueron analizados en un HPLC HP1100 series (Hewlett-Packard) equipado con un automuestreador/inyector y un detector de arreglo de diodos (DAD). Se utilizó una columna X-terra RP18 (C18), 150 mm (Waters, Inc.). Se usó una fase móvil consistente en Metanol:Acetonitrilo:Acetato de etilo:Agua en una proporción de 80:10:5:5. El flujo usado fue de 1 ml/min y una longitud de onda de 470 nm a 25°C (Gimeno *et al.*, 2007).

6.2.1.4 Determinación del porcentaje de recuperación de astaxantina

Se calculó el porcentaje de recuperación de astaxantina en base a la cantidad total de pigmentos del desperdicio de camarón que se usó para la extracción con

acetona y el obtenido después de la concentración (considerando las masas del residuo fermentado así como del concentrado obtenido).

6.2.2 Microencapsulación de astaxantina

6.2.2.1 Formulaciones

El extracto conteniendo 275 µg de astaxantina/mL fue dispersado y posteriormente microencapsulado usando como material de pared, goma arábiga (GA) (*Acacia senegal*) proporcionada por Sigma-Aldrich. Todas las formulaciones se prepararon con un 20% de biopolímero, un 22% de sólidos totales y una relación de biopolímero a extracto de 1:1, para obtener microcápsulas con un contenido teórico de 240 µg de astaxantina/g de polvo.

6.2.2.2 Preparación de las dispersiones

Los biopolímeros fueron hidratados en agua y dispersados en un homogenizador Silverson L4R (Silverson Machines Ltd., Waterside, Chesham, Buckinghamshire, England) donde posteriormente se adicionó gota a gota el extracto conteniendo la astaxantina y homogenizando a una velocidad de 7200 rpm durante 6 minutos con un baño de hielo.

6.2.2.3 Secados por aspersión

Las dispersiones fueron entonces secadas en un mini-secador por aspersión (model 190, Büchi, Flawil, Switzerland), las formulaciones fueron secadas a 100, 120 y 140°C.

6.2.2.4 Cuantificación de astaxantina retenida

Para determinar este parámetro 0.05 g de microcápsulas fueron colocadas en viales tipo eppendorf, se adicionó 1 ml de fase móvil, se mezclaron durante 1 min en vórtex y posteriormente se sonicaron durante 20 min para favorecer la extracción. Se centrifugó a 14000 rpm durante 15 min y posteriormente se filtraron con una membrana de 0.45 µm, la concentración del pigmento se determinó de

acuerdo a la sección 6.2.1.3. El porcentaje de retención (%R) se calculó de acuerdo la ecuación 4.

$$\% \text{Retención} = \left(\frac{\text{Astaxantina total}}{\text{Astaxantina teórica}} \right) * 100 \quad (4)$$

donde la astaxantina teórica es la concentración conocida del pigmento que se adicionó a la dispersión y la astaxantina total es la determinada después del secado por aspersion, ambas concentraciones expresadas por gramo de microcápsulas en base seca.

6.2.2.5 Análisis estadístico

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey cuando fue requerido por medio del paquete SPSS (2006).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 FERMENTACIÓN DE RESIDUOS DE CAMARÓN

7.1.1 FERMENTACIONES EN FRASCOS

7.1.1.1 Elección de nivel de fuente de carbono

Los residuos de alimentos de origen animal generalmente presentan altos niveles de proteína y bajos niveles de carbohidratos. Sin embargo, los procesos microbianos requieren generalmente de carbohidratos como fuente de energía (Martin, 1996).

En este trabajo se evaluó la FAL de los residuos de camarón con diversos niveles de melaza como fuente de carbono (20, 30, 40 y 50% (p/p)). En la Tabla 2 se muestra el análisis químico proximal de los sustratos utilizados. La humedad del desperdicio de camarón crudo se encuentra dentro de lo reportado en la bibliografía, que oscila entre el 70-81% (Cira *et al.*, 2002; Bhaskar *et al.*, 2007; Rao *et al.*, 2000), el contenido de quitina entre 14-30% (base seca), el porcentaje en peso de proteína y minerales puede ser de hasta 40 y 35% respectivamente (Pacheco *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2008). El pH del residuo de camarón es ligeramente alcalino con un pH de 7.6 (pH 7.5–8.6) (Bhaskar *et al.*, 2007; Rao *et al.*, 2000; Rao y Stevens 2005).

Tabla 2. Análisis químico proximal de los residuos de camarón de *L. vannamei* y de la melaza.

Determinación	<i>L. vannamei</i>	Melaza
%Humedad	75.55±0.83	27.15±0.23
%Cenizas	21.42±0.68	13.03±0.13
% Proteína	32.25±0.49	4.25±0.17
% Quitina	28.10±0.31	ND
%Azúcares totales	ND	57.03±13.74

ND no determinado

La Figura 7 muestra la cinética de la fermentación de residuos de camarón con diferentes niveles de melaza, mismos que se indican en la figura hasta las 120 h. Los niveles de melaza del 30, 40 y 50% mostraron acidificaciones alrededor de 0.35 mmol/g y pH superior a 5, sin embargo, una mayor acidificación fue observada usando el nivel de 20% obteniéndose valores de 0.52 mmol/g de ATT y un pH de 4.76. No se observó una disminución importante del pH durante las primeras 24 h como lo reportado en fermentaciones en frascos por Cira *et al.* (2000) y Shirai (1999), que utilizaron el mismo inóculo y nivel de adición usando como fuente de carbono 10% (p/p) azúcar de caña y 10% (p/p) glucosa, respectivamente. Lo anterior significa que la velocidad de acidificación es más lenta usando melaza, esto se observa en los parámetros cinéticos de acidificación (V_{max} y k) que fueron estimados con el modelo de Gompertz y se muestran en la Tabla 3. En la mejor condición (20% melaza), se obtuvieron valores de P_{max} de 0.54, k de 0.0208 y una V_{max} de 0.004. Cira *et al.* (2002) obtienen una P_{max} de 0.47, k de 0.04 y V_{max} de 0.007, con *Lactobacillus spp.* B2. Sin embargo, el valor real de producto máximo reportado en este último trabajo es de 0.52 mmol/g a 96 h, por lo que utilizando melaza al 20% se obtienen valores similares de acidificación pero a tiempos de FAL más largos (120 h).

La diferencia en la velocidad de acidificación puede deberse a que la a_w inicial es baja comparada con lo reportado anteriormente (Shirai *et al.*, 2001; Cira, *et al.* 2000), cuyos valores iniciales en de a_w fueron de 0.97 y 0.989, respectivamente. En el presente trabajo, se observaron valores iniciales de a_w entre 0.956-0.937 (Tabla 3), debido al altos niveles de melaza adicionados. La producción de ácido (determinada como ATT, expresada como AL) es una media indirecta del crecimiento de las BAL, entonces era de esperarse que un nivel alto de adición de melaza afectara al crecimiento tal como se confirma en la Figura 8, donde puede observarse que a niveles de melaza del 20 y 30% se presenta un crecimiento de BAL similar, mientras que a 40% se evidencia un crecimiento más bajo y a 50% éste es prácticamente constante durante 48 h. Esta baja en el crecimiento a

medida que aumenta la concentración de melaza se explica porque entre más solutos se adicionen al medio, más disminuye la a_w (Tabla 3).

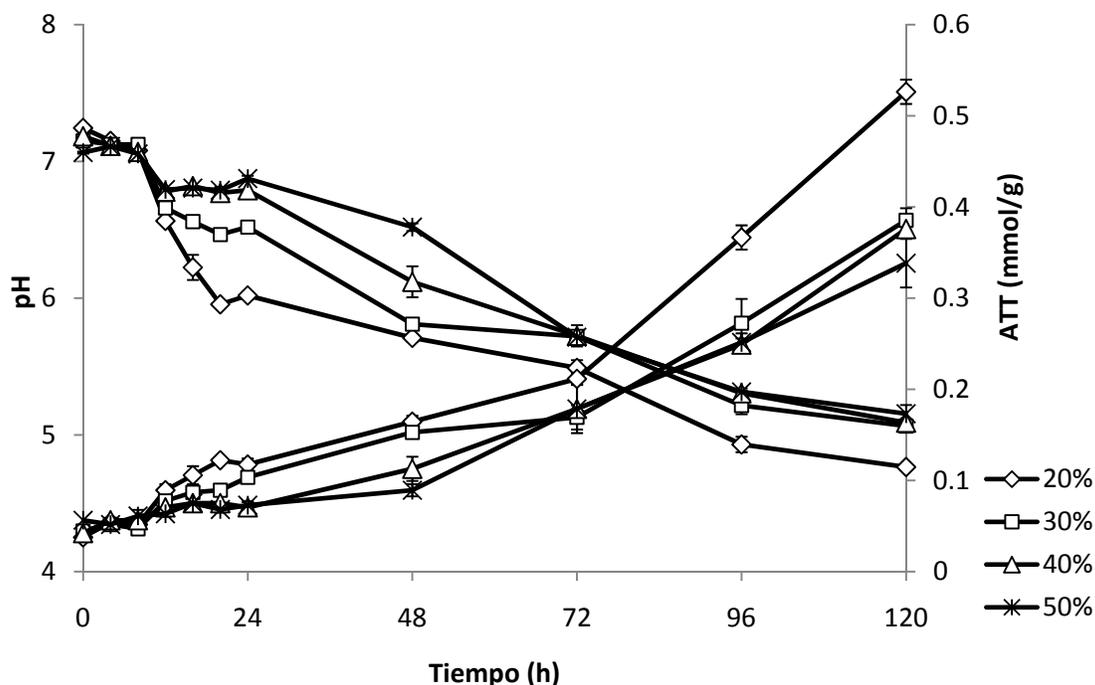


Figura 7. Cinética de pH y %ATT en la fermentación a 30°C del residuo de camarón utilizando como fuente de carbono 20, 30, 40 y 50% melaza (p/p). pH, líneas descendentes. ATT, líneas ascendentes.

Tabla 3. Parámetros cinéticos de acidificación de las fermentaciones con distintos niveles de melaza a 30°C estimados con el modelo de Gompertz y a_w al inicio (0 h) y final (120 h) de la fermentación.

Nivel de melaza (p/p)	P_{max} (mmol/g)	k (h^{-1})	V_{max} (mmol/g h)	pH 120 h	ATT (mmol/g) 120 h	a_w 0 h	a_w 120 h
20%	0.5487	0.02081	0.00420	4.765	0.526	0.959 ^a	0.946 ^c
30%	0.4007	0.02034	0.00300	5.065	0.385	0.953 ^b	0.948 ^c
40%	0.3925	0.02026	0.00292	5.09	0.376	0.9465 ^c	0.937 ^e
50%	0.3527	0.02056	0.00266	5.155	0.338	0.943 ^d	0.94 ^e

$R \geq 0.98$. Distintas letras indican diferencia significativa (Tukey $\alpha < 0.05$).

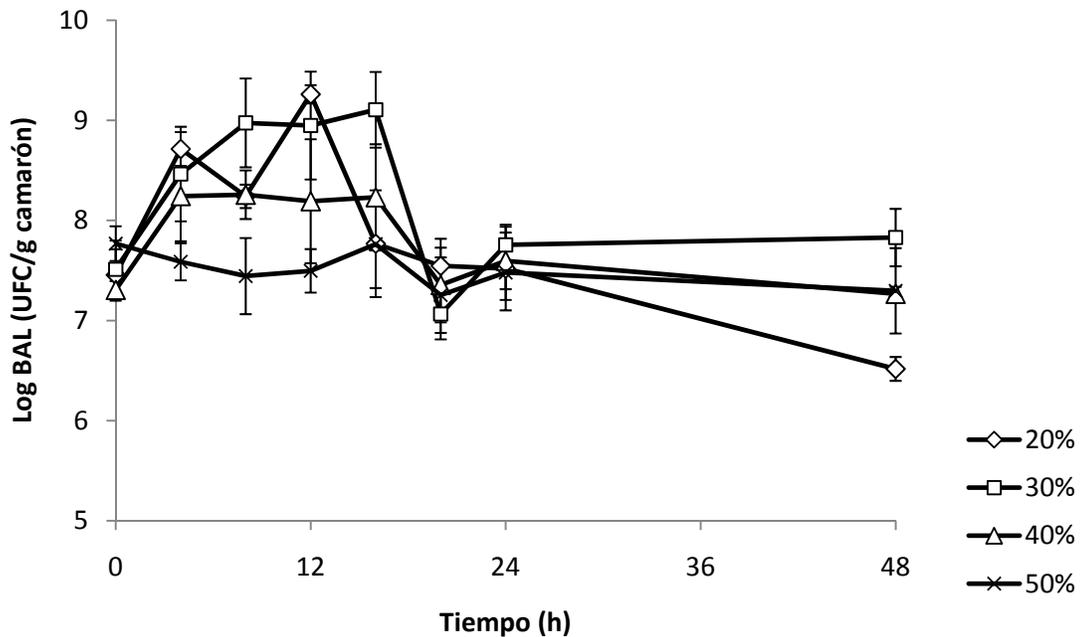


Figura 8. Cuenta viable de BAL durante la fermentación de residuos de camarón utilizando como fuente de carbono 20, 30, 40 y 50% melaza (p/p).

El crecimiento bacteriano se ve afectado conforme la a_w desciende, las bacterias crecen en a_w altas, entre 0.92 y 0.99, favoreciéndose el crecimiento entre más cerca se encuentre a su valor óptimo de a_w (Scott, 1957). Se ha reportado que actividad acuosa límite para el crecimiento de bacterias del género *Lactobacillus* es 0.90 (Brown, 1976). Kask *et al.* (2003) encontraron que *L. paracasei* y *L. danicus* crecieron en medio MRS suplementado con diversas concentraciones de glicerol en a_w entre 0.96-0.99, sin embargo, el crecimiento de *L. curvatus* a una a_w de 0.96 fue 30% menor que a una de 0.99, su crecimiento fue significativamente inhibido a una a_w de 0.93 y no detectado a 0.89. *L. paracasei* fue capaz de crecer incluso a una a_w de 0.90, sin embargo su fase lag fue de 5 a 6 veces más larga a 0.90 que a 0.99.

Los resultados experimentales indican que el nivel de 20% de melaza provee la a_w más alta, por ello que en esta condición se observó la mayor acidificación. En la Tabla 3 también se muestra el cambio en la a_w al inicio y término de la

fermentación, observándose cambios significativos ($\alpha < 0.05$) en los cuatro niveles de melaza utilizados. Esta diferencia puede deberse a que los frascos utilizados no son herméticos permitiendo pérdidas de humedad, así como por la ruptura de moléculas como las proteínas en moléculas más pequeñas que se agregan al sistema como solutos (Shirai *et al.*, 2001). El nivel de 20% de melaza fue seleccionado por obtener la más alta acidificación y el pH más bajo, y fue evaluado *a posteriori* en reactores en lote.

7.1.2 FERMENTACIONES EN REACTORES

7.1.2.1 Efecto del tipo de agitación en FAL en reactores en lote

Se evaluaron las fermentaciones en distintas configuraciones de reactores en lote (2 kg) con la concentración de melaza de 20%. En las Figuras 9 y 10 se muestran la ATT y pH del licor durante el transcurso de la fermentación en un reactor CA, reactor TR y reactor CE, respectivamente.

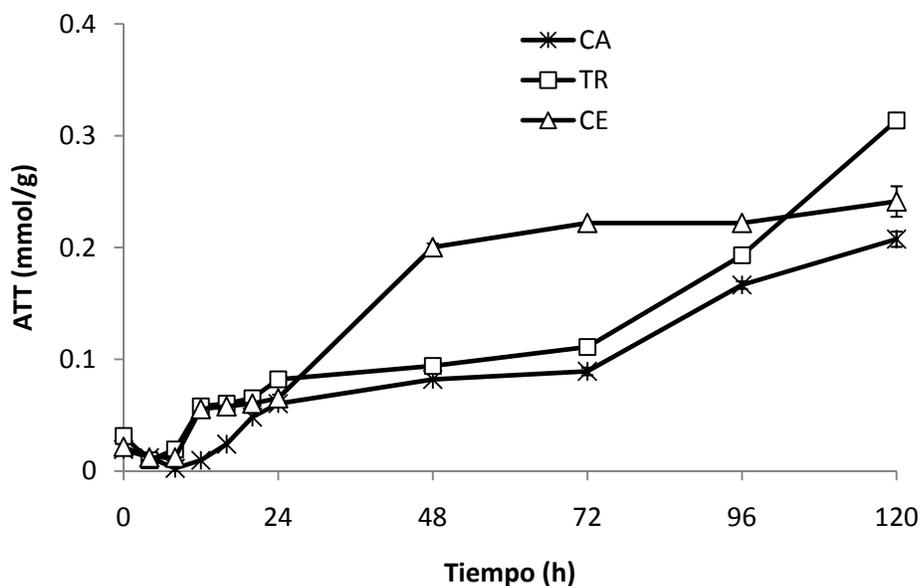


Figura 9. Cinética de la ATT del licor en la fermentación de *L. vannamei* utilizando como fuente de carbono 20% melaza (p/p) en un reactor de CA, TR y CE.

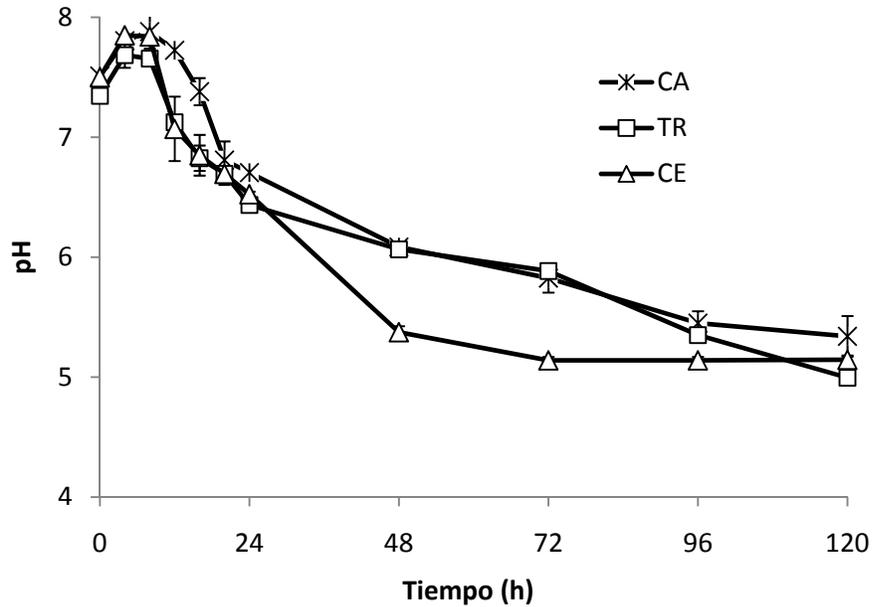


Figura 10. Cinética del pH del licor en la fermentación de *L. vannamei* utilizando como fuente de carbono 20% melaza (p/p) en un reactor de CA, TR y CE.

En el reactor de CE se produjo la reducción más importante de pH en la FL, a las 48 h de fermentación. Mientras que el pH mínimo se obtuvo a las 72 h, alcanzando un valor de 5 que fue estable hasta las 120 h. Por su parte, en los sistemas de TR y CA, el pH se redujo a su valor mínimo (pH 5) hasta el quinto día de fermentación. Se evidenció en el licor (después de 120 h de fermentación) de los reactores CE y CA casi la misma acidificación (alrededor de 0.22 mmol/g), encontrándose la más alta en el de TR (alrededor de 0.35 mmol/g). Esto puede ser debido a que en el reactor TR, al ser un reactor horizontal, la lixiviación fue más rápida puesto que hubo menor empaquetamiento que en los reactores de columna, reteniéndose menor tiempo el AL producido, además, como el licor era retirado cada 24 h (a partir del primer día de fermentación) durante este tiempo pudieron seguir creciendo las BAL, aumentando la concentración de ácido en el mismo. Sin embargo, la cantidad de ácido que es verdaderamente relevante en la purificación de los desperdicios de camarón es la de la FS, en que se encuentra la quitina. En las Figuras 11 y 12 se muestran la ATT y pH, respectivamente, en la FS a 120 h de fermentación, encontrándose que en el CE, se obtiene en este

tiempo la mayor acidificación (alrededor del 0.45 mmol/g), seguido por el TR (0.35 mmol/g) y el CA (0.2 mmol/g). Esta diferencia entre los valores del líquido y el sólido en el CE, nos indican que la mayor parte del ácido producido se retiene en la FS, y el hecho de que no sea agitado contribuye a esta observación experimental. La agitación sin embargo en los casos de los reactores TR y CA podría explicar el hecho de que se encontró la misma acidificación tanto en el sólido como en el líquido. Esto nos indica que la agitación contribuye a una más rápida remoción del ácido, cabe mencionar que en el TR también influye su configuración horizontal, como se mencionó anteriormente. Además, en el caso del CA, el oxígeno tuvo una influencia en la baja acidificación, ya que las BAL son preferentemente anaerobias.

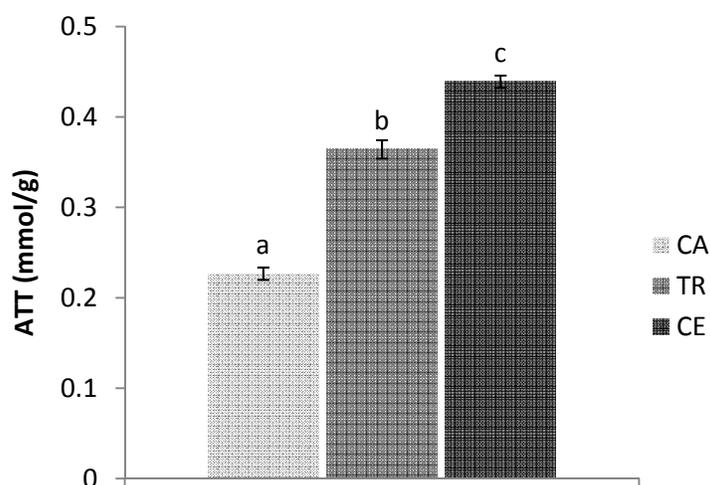


Figura 11. ATT de la FS a 120 h de fermentación utilizando 20% melaza (p/p) en los reactores de CA, TR y CE. Distintas letras indican diferencias significativas (Tukey $\alpha \leq 0.05$).

Cira *et al.*, (2002) reportaron el uso de un reactor de CE en la fermentación de desperdicios de camarón durante 90 días utilizando 10% azúcar de caña y 5% de *Lactobacillus spp* B2 (v/p) donde el pH en 2 días bajaba a 4.9 en la FS y la ATT alcanzaba los 0.27 mmol/g y eventualmente un pH de 4.2 y una acidez de 0.5 mmol/g. En otro trabajo realizado por Pacheco (2010) en que se utilizó un reactor

de CE utilizando las mismas condiciones que Cira *et al.* reportaron una disminución del pH de la FL de 8 a 4.3 en 96 h, sin embargo, en la FS el mínimo pH alcanzado fue de 6. En el presente trabajo, se mejoró este último resultado alcanzándose un pH de 5 en el sólido del CE, no observándose una mayor reducción debido a la alta capacidad amortiguadora del sustrato. Esto puede ser atribuido a que la melaza contiene un alto contenido de minerales (Tabla 2), que hacen que se requiera una mayor cantidad de ácido para bajar el pH. Zakaria *et al.* (1997) reportaron el uso de reactores de TR en la fermentación de desperdicios de crustáceos. Observaron la reducción más importante del pH en 24 h en la FL, y se alcanzó un pH mínimo de 5 en 48 h, pero ellos encontraron un incremento en el pH después de 48 h, atribuido a la capacidad amortiguadora del calcio solubilizado y a que durante la fermentación ocurre la proteólisis y el amonio es liberado, debido a la utilización de los aminoácidos por las bacterias (Sini *et al.*, 2007).

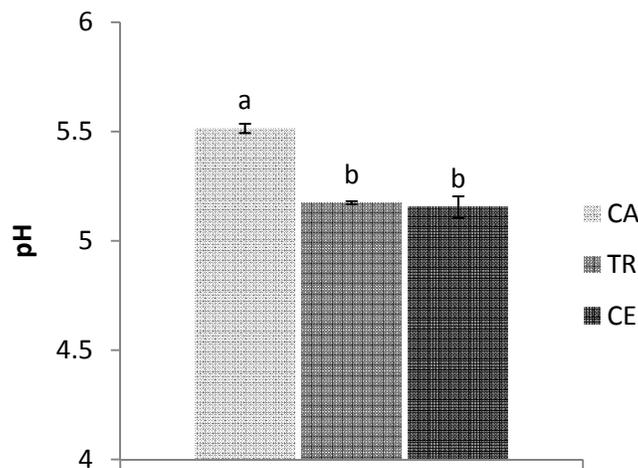


Figura 12. pH de la FS a 120 h de fermentación utilizando 20% melaza (p/p) en los reactores de CA, TR y CE. Distintas letras indican diferencia significativa (Tukey $\alpha \leq 0.05$).

En la Figura 13 se muestra la cuenta viable de BAL, al inicio y término de las fermentaciones (120 h) en los tres sistemas usados, donde se puede observar que en todos los casos las BAL se mantienen constantes. A valores de pH entre 4 y 5,

las BAL son más competitivas que la mayoría de los microorganismos de la descomposición y su uso en fermentaciones de alimentos se basa generalmente en esta propiedad ya que pueden tolerar pH por debajo de 4.5 (Cira *et al.*, 2000). En ninguna de las fermentaciones llevadas a cabo se observaron signos de descomposición como el mal olor. La adición de melaza hizo que el ensilado adquiriera incluso un olor relativamente agradable, lo que es un punto a favor en el uso de esta fuente de carbono. Una ventaja de usar estas configuraciones de reactores es que permite la separación de proteínas y minerales (Zakaria *et al.*, 1997, Cira *et al.*, 2002, Pacheco *et al.*, 2009). La agitación es un factor importante en mantener un ambiente en que se promueva el crecimiento. La agitación sirve para que la FS y líquida entren en contacto; esto es particularmente importante durante etapas tempranas de la fermentación cuando el volumen del licor es relativamente bajo. Un buen contacto del sólido con el líquido es esencial para promover la solubilización del calcio y la consecuente evolución del CO₂ para generar una atmósfera que favorecería a las BAL e inhibiría a los microorganismos de la descomposición (Zakaria *et al.*, 1997).

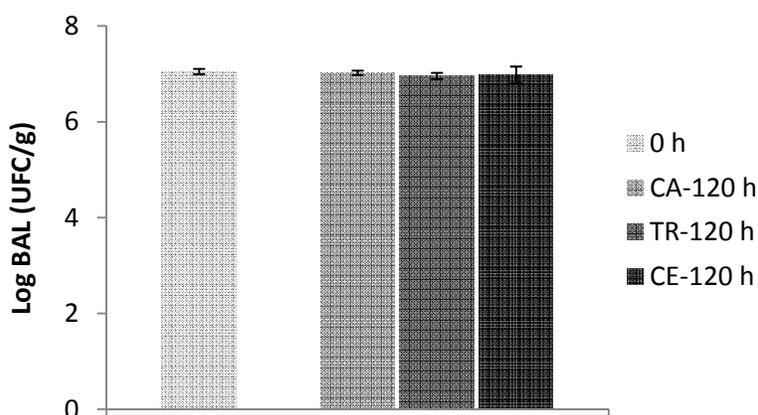


Figura 13. Cuenta viable de BAL en los reactores de CA, TR y CE al inicio (0 h) y término de la fermentación (120 h).

En los 3 sistemas empleados se evaluó la DP (Figura 14) encontrándose la máxima DP en el CE de 85%, en el TR de 78%, y en el CA del 58%. Cabe

mencionar que la DP del desperdicio de camarón ocurre debido a la licuefacción de las proteínas debido a la actividad proteolítica de las BAL y a las proteasas endógenas del desperdicio (Bhaskar *et al.*, 2007). La DP obtenida en el TR (78%) coincide con Zakaria *et al.*, (1997) quienes reportaron en un TR con malla de 1 mm una DP de residuos de *Nephrops norvegicus* del 77% en 6 días de fermentación (10% glucosa (p/p) y 10% *L. paracasei* A3 (v/p)) y donde el pH observado fue igual al obtenido en el presente trabajo (pH 5). Este también afecta la DP ya que se han encontrado proteasas en los sistemas digestivos de decápodos que muestran un amplio rango de pH (5-8), sin embargo, se ha reportado que la proteólisis es más eficiente a pH alto (Rao *et al.*, 2000). Otro reporte de un reactor de TR por Rao y Stevens (2005) utilizan ácido acético glacial para mantener el pH inicial en 6 (10% inóculo *L. plantarum* y 5% glucosa), ellos obtienen una DP de cabezas de camarón del 83%, y de cáscaras de camarón del 66%.

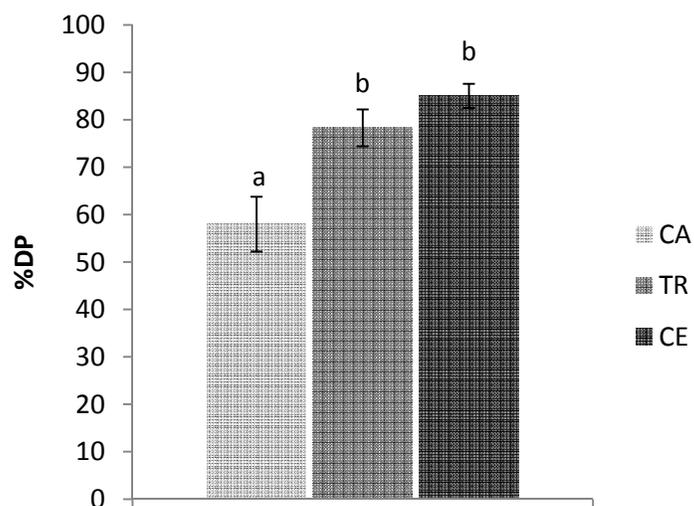


Figura 14. %DP a 120 h de fermentación en los reactores de CA, TR y CE utilizando 20% melaza (p/p) con *L. vannamei*. Distintas letras indican diferencia significativa (Tukey $\alpha \leq 0.05$).

En reactores en columna, Cira *et al.*, (2002) encontraron una remoción de proteínas del 87%, utilizando 10% azúcar de caña, 5% inóculo (*L. spp* B2, 5% (v/p)) y 96 h de fermentación a 30°C. Por su parte, Pacheco *et al.*, (2009)

obtuvieron una DP máxima del 91% en desperdicios de *Litopenaeus vannamei* en las mismas condiciones, exceptuando que usó 35°C y un reactor de columna con malla de poro más grande (4 mm), que favoreció la separación de proteínas del desperdicio, con ello que se alcanzara mayor DP. La utilización de una malla con tamaño de poro más grande (4 mm) favorece la DP de los desperdicios de camarón (Pacheco *et al.*, 2009), por lo que es de suponer que la DP debió haber sido más alta en el presente trabajo, sin embargo la DP no sólo depende de la lixiviación y el pH, sino del tipo de residuo usado, así como de la especie en cuestión.

Se ha reportado la adición de ácidos para ajustar el pH inicial del medio. Rao *et al.*, (2000) obtuvieron una máxima DP de desperdicios de camarón del 88% manteniendo un pH de 6 con ácido acético, 5% glucosa y 10% *Lactobacillus plantarum* 541 (v/p). También existen reportes de fermentación en medio líquido, Xu *et al.* (2008) encontraron una DP del 97% para residuos de *Penaeus monodon* y del 90% para *Crangon crangon* por medio de una fermentación en 2 etapas, primero la DP por el cultivo GM (con alta actividad proteolítica) y posteriormente por *L. casei* MRS1. También se han empleado cofermentaciones de *Serratia marcescens* FS-3 y *Lactobacillus paracasei* KCTC-3074 para extracción de quitina de residuos de cangrejo, (52.6%), así como fermentaciones sucesivas con ambos microorganismos, (68.9%) alcanzando bajos niveles de DP (Jung *et al.*, 2006 y 2007). En el trabajo de Sini *et al.*, (2007), la proteólisis se atribuyó a la actividad de las proteasas neutras de *B. subtilis*, donde la óptima actividad ocurre a pH 6 y 30°C, alcanzando una DP del 84% a 14 días de fermentación. Bhaskar *et al.*, (2007), obtuvieron una DP del 97.9% (alcanzada a 72 h) en residuos de camarón a los que se agregó agua destilada en relación 1:1 (p/v) usando 5% de *Pediococcus acidolactici* CFR2182 (v/p) y 15% glucosa (p/p).

La alta DP indica la utilidad de las bacterias en la DP del residuo de camarón. Algunos autores (Rao *et al.*, 2000) usan ácidos para bajar el pH al inicio de la fermentación y prevenir la descomposición, sin embargo, estudios en que éste no

fue ajustado (Pacheco *et al.*, 2009; Cira *et al.*, 2002; Bhaskar *et al.*, 2007), no presentaron evidencias de descomposición, además, la proteólisis es más eficiente a pH alto, por lo que conviene no ajustarlo al inicio de la fermentación (Rao *et al.*, 2000).

Debido a la baja DP y ATT se descartó el uso futuro del reactor de CA, y como no se encontró diferencia significativa en el %DP en los reactores de TR y CE se decidió continuar con los siguientes experimentos usando ambos, a pesar de ser más baja la ATT para el reactor de TR (Figura 11).

7.1.2.2 Efecto del tipo de desperdicio en la DP

Se probó la DP utilizando otro tipo de desperdicio, que es una mezcla de las especies *Litopenaeus vannamei* y *L. stylirostris*, en la Tabla 4 se muestra el químico proximal del desperdicio.

Tabla 4. Análisis químico proximal de los residuos de camarón de mezcla de especies.

Determinación	Mezcla <i>L. vannamei</i> y <i>L. stylirostris</i>
%Humedad	80.16±0.07
%Cenizas	18.97±0.01
% Proteína	52.57±0.46
% Quitina	12.73±0.92

En la Figuras 15 y 16 se muestran la cinética del ATT y pH, respectivamente, de la FL en los reactores de TR y CE utilizando mezcla de especies. En cuanto a la ATT del licor, en el TR se obtuvo la máxima acidificación a las 72 h y en el CE a las 24 h, manteniéndose constante en ambos casos hasta las 120 h con una ATT de alrededor de 0.2 mmol/g. La caída más importante del pH en la FL se observó

dentro de las primeras 24 h para ambos sistemas, manteniéndose relativamente constante hasta las 120 h (pH 5.2).

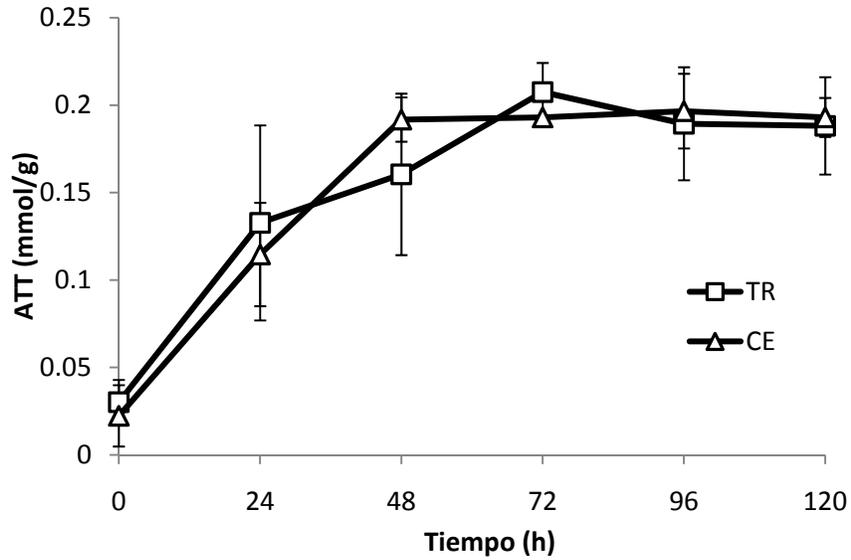


Figura 15. Cinéticas de ATT en la FL en los reactores de TR y CE utilizando 5% inóculo con mezcla de especies.

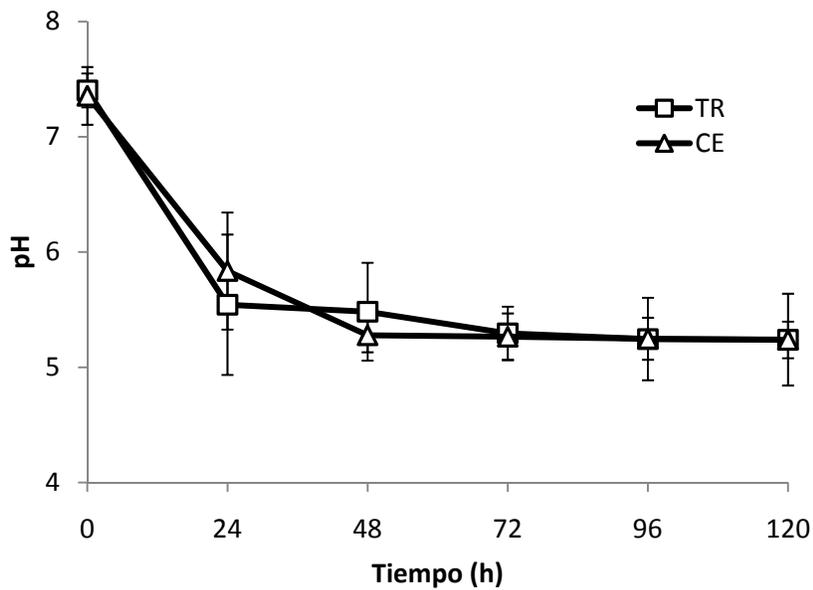


Figura 16. Cinéticas de pH en la FL en los reactores de TR y CE utilizando 5% inóculo con mezcla de especies.

En la FS el pH final utilizando mezcla de especies (Figura 18) (pH 5.2) es similar a *L. vannamei* (de 5.1, Figura 12) después de 120 h de fermentación indistintamente del tipo de reactor que se empleó. Utilizando cualquiera de los dos desperdicios se observan diferencias en la acidificación de la FS a las 120 h de fermentación siendo más alta en el CE que en el TR (Figura 17 para mezcla de especies y Figura 11 para *L. vannamei*). Esto puede deberse a que la configuración del CE permite mayor empaquetamiento del desperdicio, de modo que el ácido se retiene más que utilizando un reactor horizontal como el TR.

La cuenta viable de BAL en TR y CE con mezcla de especies se muestra en la Figura 19, donde se observa prácticamente el mismo comportamiento en ellos, las BAL se mantienen en el mismo orden de magnitud, Se ha reportado que para que un ensilado sea exitoso deben obtenerse valores de pH por debajo de 4.5, que permite inhibir el comportamiento de microorganismos nocivos (Ramírez, 2009).

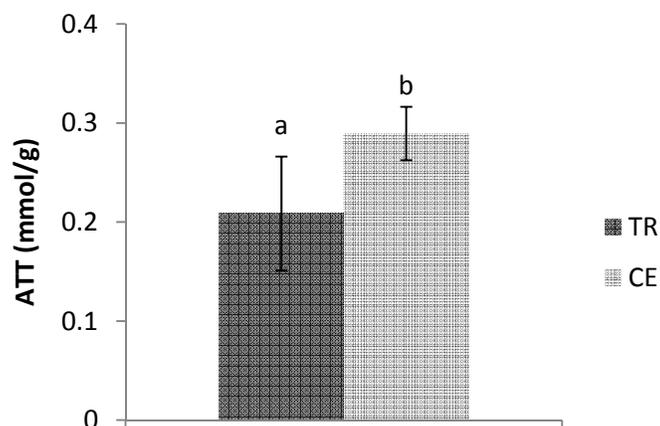


Figura 17. ATT en fracciones sólidas a 120 h de fermentación utilizando 5% inóculo y mezcla de especies. Distintas letras indican diferencia significativa (ANOVA $\alpha \leq 0.05$).

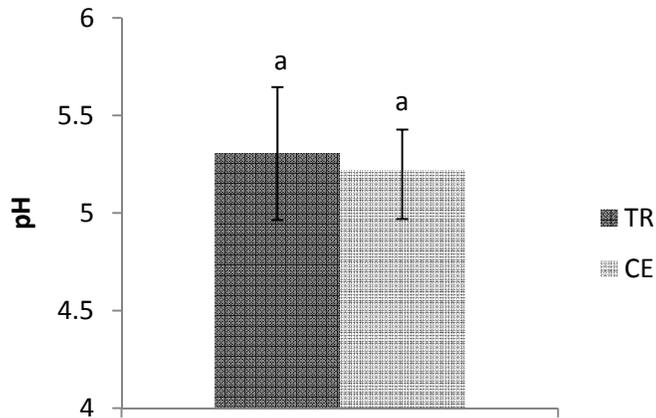


Figura 18. pH en fracciones sólidas a 120 h de fermentación utilizando 5% inóculo y mezcla de especies. Distintas letras indican diferencia significativa (ANOVA $\alpha \leq 0.05$).

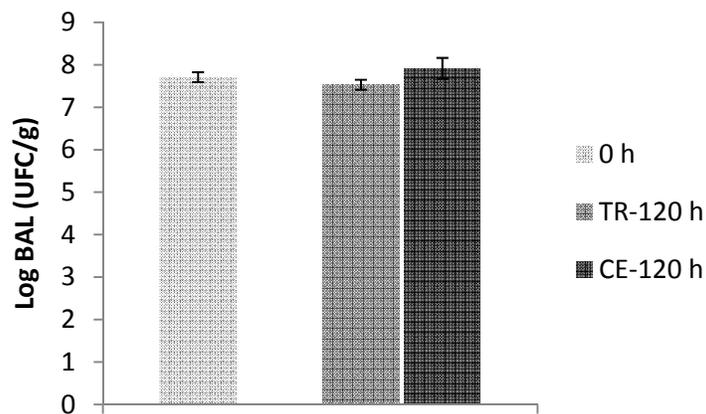


Figura 19. Cuenta viable de BAL al inicio (0 h) y término de la fermentación (120 h) en los reactores de TR y CE utilizando 5% inóculo con mezcla de especies.

Se observaron diferencias significativas en la DP (ANOVA $\alpha \leq 0.05$), siendo mayor en el reactor de columna (85%) que en el de tambor rotatorio (79%) (Figura 20). La DP es igual con respecto a las fermentaciones realizadas con *L. vannamei* (Figura 14) en cada sistema, esto puede deberse a que las muchas enzimas

digestivas como la tripsina, catepsina, colagenasa, quimiotripsina y elastasa proteasas presentes en el hepatopáncreas del camarón actúan en un amplio rango de pH entre 5-8 (Pacheco *et al.*, 2009). En trabajos previos utilizando reactores de columna, Pacheco *et al.* (2009) alcanzaron una DP del 91% utilizando una mezcla de especies de camarón (*L. vannamei*, *L. stylostris* y *L. setiferus*), y bajo las mismas condiciones (sacarosa 10% p/p, *Lactobacillus spp.* B2 5% v/p) una del 94% utilizando *L. vannamei* (Pacheco, 2010), encontrándose diferencias entre especies. Sin embargo, estas pueden atribuirse al pH ya que en el sólido el mínimo alcanzado fue de 6 a las 96 h y permaneciendo constante hasta las 144 h. En este último reporte se encontró que la actividad proteolítica era mayor a pH 7 (600 mUA) que a pH 6 (430 mUA) dentro de las primeras 48 h, sin embargo, a partir de las 72, ambas mostraron alrededor de 350 mUA. Esto reafirma que la DP se favorece más a pH alto.

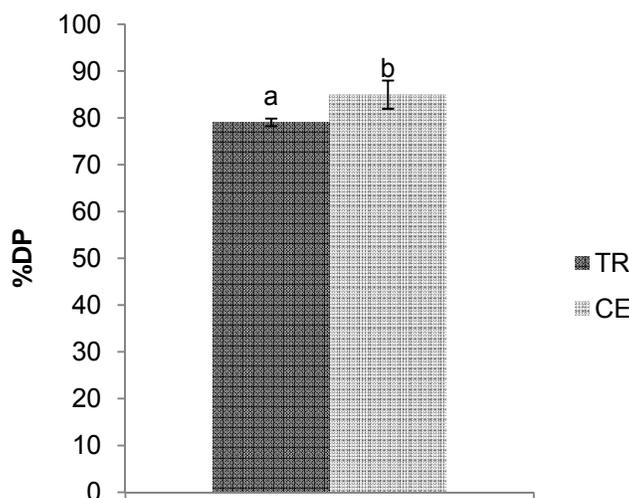


Figura 20. %DP a 120 h de fermentación en los reactores de TR y CE utilizando 5% Inóculo y mezcla de especies. Distintas letras indican diferencia significativa (ANOVA $\alpha \leq 0.05$).

El hecho de que la DP sea más alta en el CE que en el TR puede atribuirse a que el CE permite una lixiviación más lenta por su configuración, permitiendo que las

BAL así como enzimas proteolíticas propias del camarón permanezcan mayor tiempo en contacto con el residuo. Debido a que se encontró mayor DP en el reactor de CE (y a que el uso del reactor de TR genera un costo por la energía requerida) utilizando mezcla de especies, se eligió esta configuración de reactor y tipo de residuo para los siguientes experimentos.

7.1.2.3 Selección de nivel de inoculación

La Figura 21 muestra las cinéticas de acidificación en el reactor de columna estático utilizando mezcla de especies con 10 y 20% de inóculo en la que se observa una acidificación más rápida y más alta utilizando 20% inóculo. En la Figura 22 se observa que cuando se aumenta al 20% el inóculo, obtenemos un pH de 5 en la FL desde el primer día de fermentación.

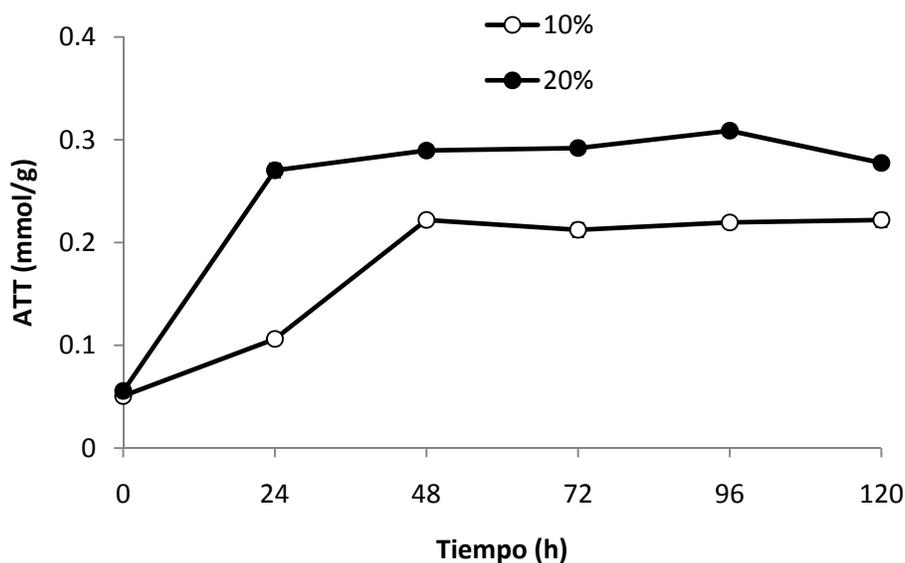


Figura 21. Cinéticas de acidificación en FL en el reactor de CE utilizando 10 y 20% Inóculo y mezcla de especies.

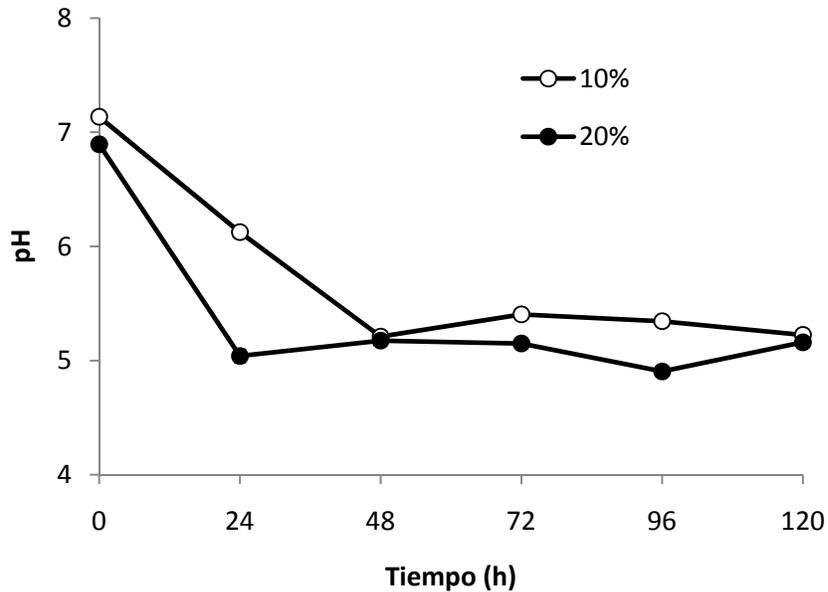


Figura 22. Cinéticas de acidificación en FL en el reactor de CE utilizando 10 y 20% Inóculo y mezcla de especies.

Por su parte, en la FS (Figura 23) se observan ATT de alrededor de 0.4 mmol/g, no encontrándose diferencia significativa (Tukey ($\alpha \leq 0.05$)) en los niveles de 10 y 20% de inóculo, pero sí en 5% que resultó más baja. En el caso del pH (Figura 24), los niveles de 10 y 20% producen la misma disminución (pH 5) a diferencia del de 5% (pH 5.5). Utilizando 10% inóculo, las BAL aumentaron un orden de magnitud (Figura 25), y al usar 20% se observa una disminución de casi dos órdenes de magnitud (Figura 26), esto puede deberse a que al tener el doble de concentración del inóculo, podrían haber agotado la fuente de carbono más rápido. Por los resultados obtenidos vemos que al aumentar el nivel de inóculo a 20% no se garantiza la disminución del pH por debajo de 5. Esto se explica por la capacidad amortiguadora del sustrato (Figura 27). En la Tabla 5 se muestra que para reducir el pH a 4.5, se requieren 0.68 mmol/g de AL mientras que la Tabla 6 muestra lo que se produce con los distintos niveles de inoculación. Esta comparación nos indica que necesitaríamos prácticamente el doble de ácido de lo que se produjo experimentalmente. Esta alta capacidad amortiguadora se debe a

la interacción entre minerales y proteínas, en este sentido la melaza tiene un alto porcentaje de cenizas (Tabla 2), que aumenta el efecto buffer.

En la Figura 28 se muestran los porcentajes de DP obtenidos con los distintos niveles de inóculo no observándose diferencias significativas entre niveles de inoculación, descartándose efectos importantes en la actividad proteolítica y cantidad de BAL adicionadas al residuo en la DP. Según reportes, la DP no es muy efectiva utilizando BAL, con eficiencias del 40 al 85% (Xu *et al.*, 2008), sin embargo, en algunos casos se han alcanzado niveles más altos, 91% (Pacheco *et al.*, 2009), 94% (Pacheco, 2010). En el presente estudio se ha superado lo reportado por Zakaria *et al.* (1997) y Jung *et al.* (2007) y alcanza los niveles reportados por Cira *et al.* (2002). En todas las fermentaciones anteriores no se observó DM. Debido a que aumentando el nivel de inóculo no se evidenció una mejora en la DP pero si en la acidificación observada, se seleccionó el nivel de inóculo del 10% para los siguientes experimentos de reducción de capacidad amortiguadora del sustrato, para probar si la falta de DM se debía a que era requerido un pH más bajo.

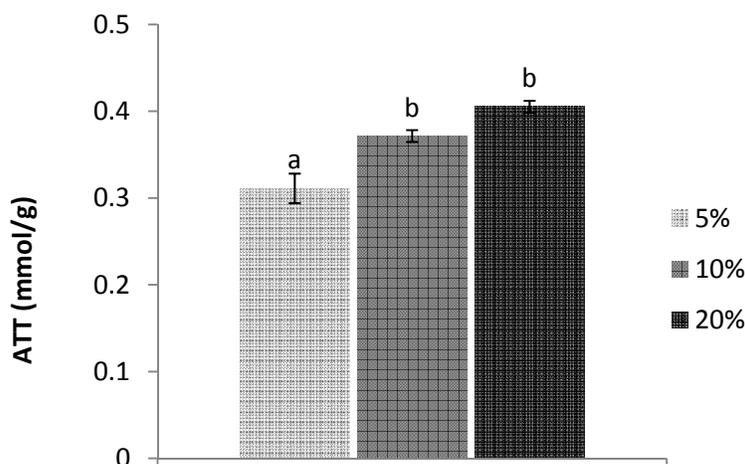


Figura 23. ATT en fracciones sólidas a 120 h de fermentación utilizando 5, 10 y 20% Inóculo con mezcla de especies. Distintas letras indican diferencia significativa (Tukey $\alpha \leq 0.05$).

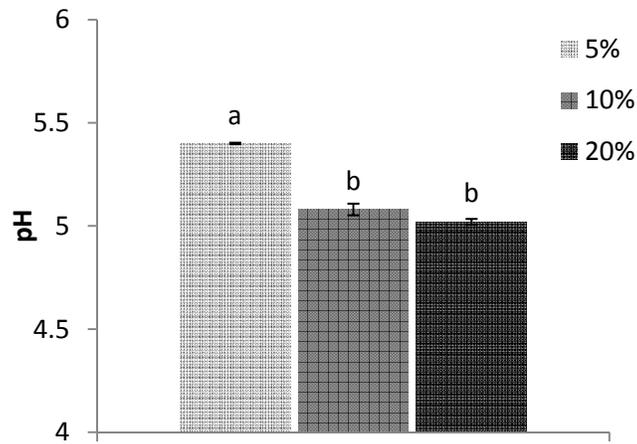


Figura 24. pH en fracciones sólidas a 120 h de fermentación utilizando 5, 10 y 20% Inóculo con mezcla de especies. Distintas letras indican diferencia significativa (Tukey $\alpha \leq 0.05$).

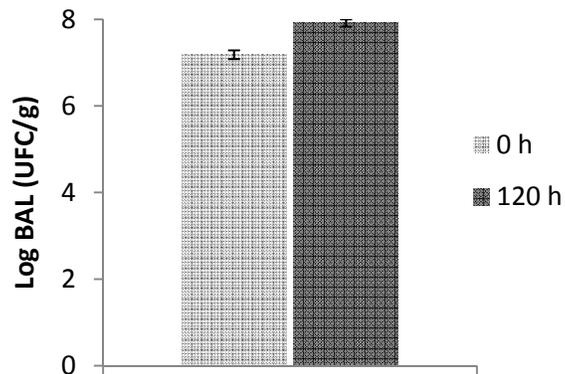


Figura 25. Cuenta viable de BAL al inicio (0 h) y término de la fermentación (120 h) en reactor de CE a 10% de inóculo y usando mezcla de especies.

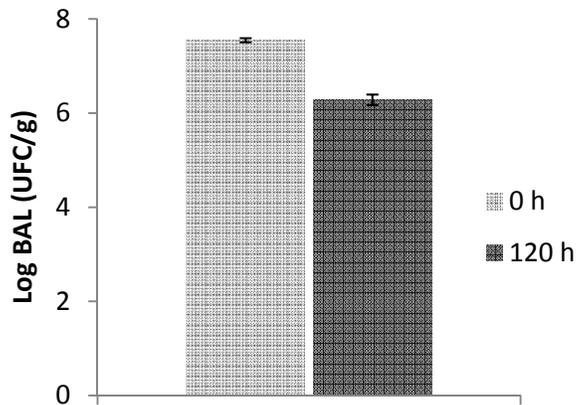


Figura 26. Cuenta viable de BAL al inicio (0 h) y término de la fermentación (120 h) en reactor de CE a 20% de inóculo. Mezcla de especies.

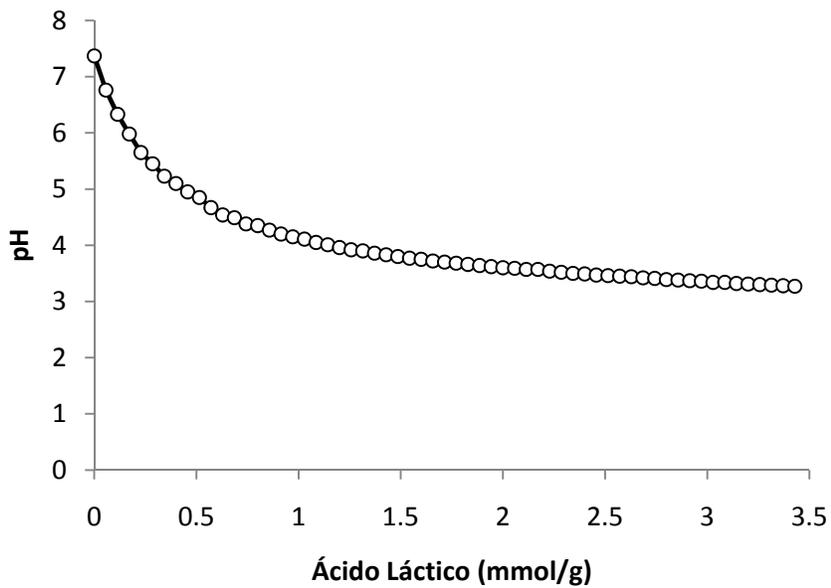


Figura 27. Capacidad amortiguadora del sustratos. Mezcla de especies con 20% melaza (p/p).

Tabla 5. Cantidad de AL necesario para reducir el pH del sustrato.

pH	mmol/g
4.5	0.685

Tabla 6. Ácido producido en la fermentación a distintos niveles de inóculo (120 h).

% Inóculo	mmol/g
5%	0.311 ^a
10%	0.371 ^b
20%	0.405 ^b

Diferentes letras indican diferencia significativa (Tukey $\alpha \leq 0.05$).

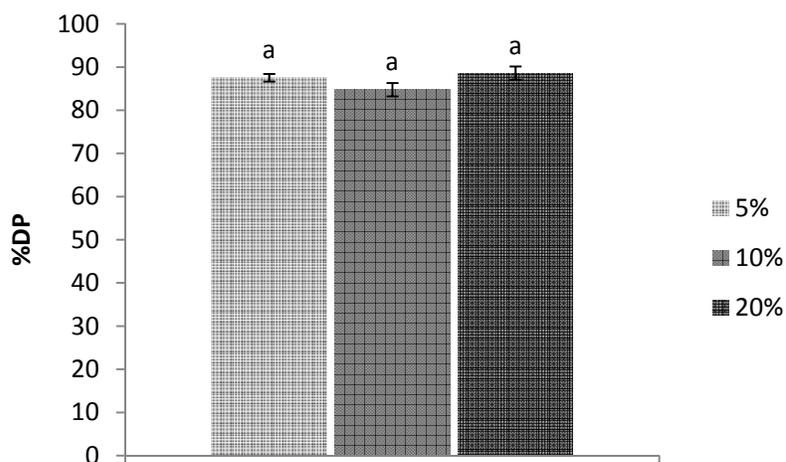


Figura 28. Porcentaje de DP en reactor de CE utilizando 5, 10 y 20% Inóculo con mezcla de especies. Distintas letras indican diferencia significativa (Tukey $\alpha \leq 0.05$).

7.1.2.4 Reducción de la capacidad amortiguadora del sustrato

Una vez seleccionada la configuración de reactor de CE y 10% inóculo se redujo el nivel de adición de melaza para ver si disminuía el efecto amortiguador y se conseguía bajar el pH y observar DM. Se decidió hacer una prueba reduciendo el nivel de melaza a la mitad (10% (p/p)) y se completó el 10% faltante (que tiene alrededor de la mitad de azúcares totales (Tabla 2)) con 5% (p/p) azúcar de caña. La cinética de acidificación bajo estas condiciones se indica en la Figura 29. En esta fermentación, se observó un pH final en el sólido de 4.6, más bajo que cualquiera de los reactores que utilizaron 20% melaza, esto evidencia el efecto amortiguador de la melaza y el residuo de camarón. Puede observarse en la figura que durante las primeras 24 h se da la disminución más importante del pH en la FL, y que ésta se mantiene constante a partir de las 48 h. Las BAL descendieron un orden de magnitud (Figura 30), similar a lo ocurrido en la fermentación con 20% inóculo (Figura 26).

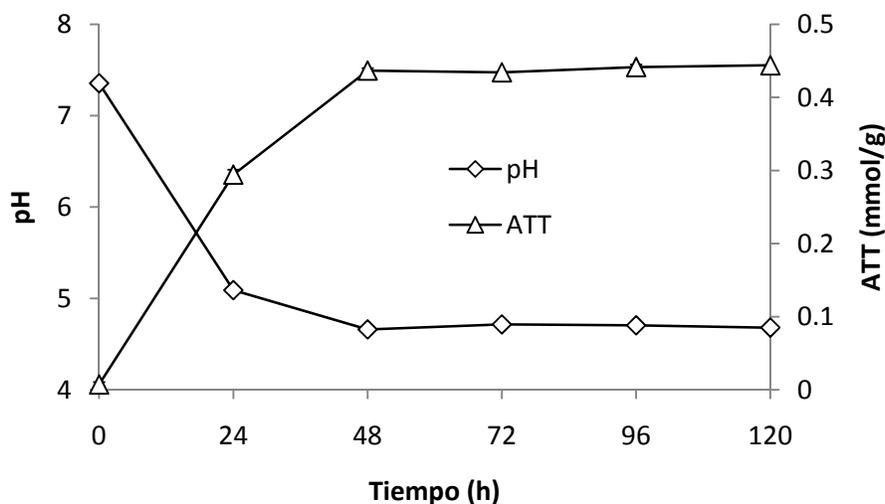


Figura 29. Cinética de pH y ATT de fermentación de residuos de camarón utilizando 10% melaza más 5% azúcar de caña (p/p) y 10% inóculo

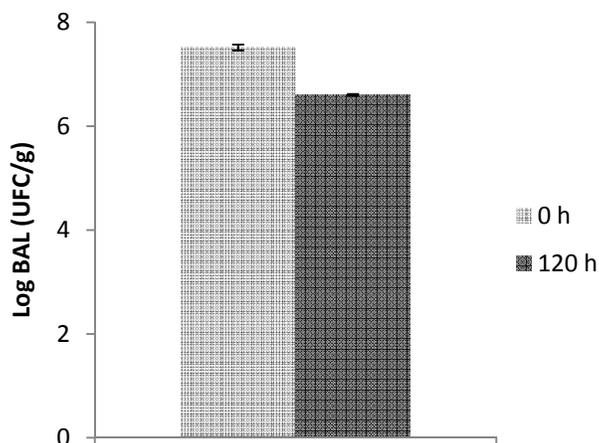


Figura 30. Cuenta viable de BAL al inicio (0 h) y término de la fermentación (120 h) en el reactor de CE utilizando 10% melaza más 5% azúcar de caña (p/p) y 10% inóculo.

En este experimento no se observó una reducción en el contenido de cenizas al término de la fermentación a pesar de haberse alcanzado un pH más bajo. Pudiera ser que la melaza haya causado interferencias en la DM debido a que parece mostrar una capacidad quelante (Basso *et al.*, 2004), de modo que se retuvieran las cenizas en el reactor provocando una acumulación. Otra hipótesis es que el tiempo de retención del ácido en el reactor no fue suficiente para removiera el carbonato de calcio dado que la lixiviación en el reactor es rápida.

Se alcanzó una DP del 80.9%, que fue más baja comparada con los experimentos previos en reactores de CE, esto se debe a que el pH alcanzado fue más bajo que en las fermentaciones que alcanzaron mayor %DP, y las proteasas actúan a pH más neutro como se ha mencionado con anterioridad (Cira *et al.*, 2002). Como no se observó DM, entonces se seleccionó la quitina con la DP más alta para los experimentos de purificación y caracterización. Se utilizó aquella que utilizó mezcla de especies, CE, 20% melaza y se seleccionó 5% inóculo porque el aumentar el nivel de este no mejoró la DP y no tiene caso hacer más costoso el proceso innecesariamente.

7.1.3 PURIFICACIÓN DE LA QUITINA CRUDA

La quitina cruda proveniente de la fermentación que presentó mayor DP (Mezcla de especies utilizando CE, 20% melaza y 5% inóculo) fue sometida a tratamiento con distintas concentraciones de ácido para su DM. La Figura 31 muestra el porcentaje de cenizas obtenido en la quitina cruda y después del tratamiento ácido. Aquí se observa que existen diferencias significativas en los tratamientos. Utilizando las concentraciones de HCl de 0.4 a 1 M se obtiene alrededor del 1% de cenizas, el porcentaje mínimo alcanzado, que está dentro de los estándares comerciales. El hecho de requerirse una concentración baja (0.4 M) de ácido para purificar la quitina cruda indica que la DM si tiene lugar durante la fermentación, y que los minerales pudieran ser retenidos en el medio por la melaza evitando que sean arrastrados por el licor que se produce por la lixiviación.

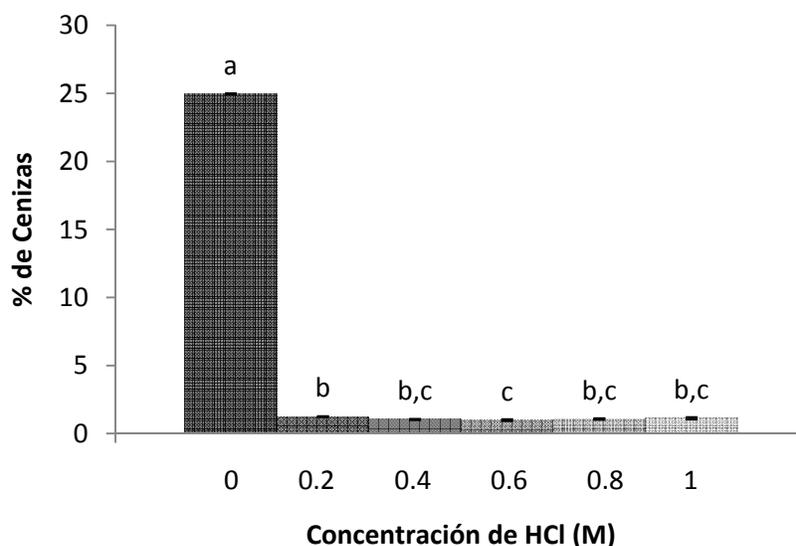


Figura 31. Efecto de la concentración de ácido clorhídrico en la DM de quitina cruda obtenida a 120 h de fermentación. Distintas letras indican diferencia significativa (Tukey $\alpha \leq 0.05$).

Una vez desmineralizada con HCl 0.4 M, la quitina fue desproteinizada con diversas concentraciones de NaOH, tal como lo indica la Figura 32. No se observaron diferencias significativas utilizando NaOH desde 0.2 hasta 1 M, en

donde el contenido de proteína residual se encuentra en 1.6%, dentro de los límites comerciales (<2%).

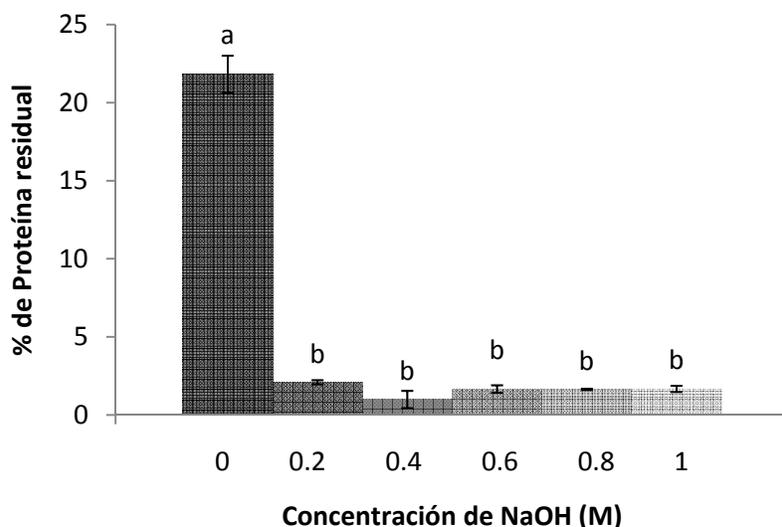


Figura 32. Efecto de la concentración de álcali en la DP de quitina cruda obtenida a 120 h de fermentación. Distintas letras indican diferencia significativa (Tukey $\alpha \leq 0.05$).

Se observó tal como lo reportado por Cira *et al.* (2002) que al aumentar la concentración de HCl o NaOH no mejora la DM ni la DP. En el presente trabajo se requiere la misma cantidad de ácido y la mitad de álcali que la utilizada por estos autores (Cira *et al.*, 2002), quienes reportaron concentraciones de HCl 0.4 M y de NaOH 0.4 M para desmineralizar y desproteínizar desperdicios de camarón obteniendo valores de proteína residual de 1.7% y 1% de calcio. No *et al.* (1989) y Shahidi y Synowiecki (1991) encontraron que las concentraciones óptimas de ácido y álcali fueron 1-1.5 N y 1.75 N, respectivamente. Sini *et al.* (2007) reportan una concentración de HCl de 0.8 M en que se obtuvo 0.85% de cenizas y una concentración de NaOH de 0.6 M en que se obtuvo 0.81% de proteína residual. Las concentraciones obtenidas en el presente trabajo también mejoran a las reportadas por los autores antes mencionados. Se ha reportado que las concentraciones óptimas de ácido y álcali requeridas dependen de la proteína

residual y contenido de cenizas, y esto va a depender del tipo de desperdicio, tipo de iniciador, tiempo de fermentación, etc. (Sini *et al.*, 2007).

7.1.4 CARACTERIZACIÓN DE LA QUITINA PURIFICADA

Una vez purificada la quitina con HCl 0.4 M y NaOH 0.2 M, se procedió a caracterizarla por su espectro de infrarrojo, solubilidad y peso molecular por viscosidad intrínseca.

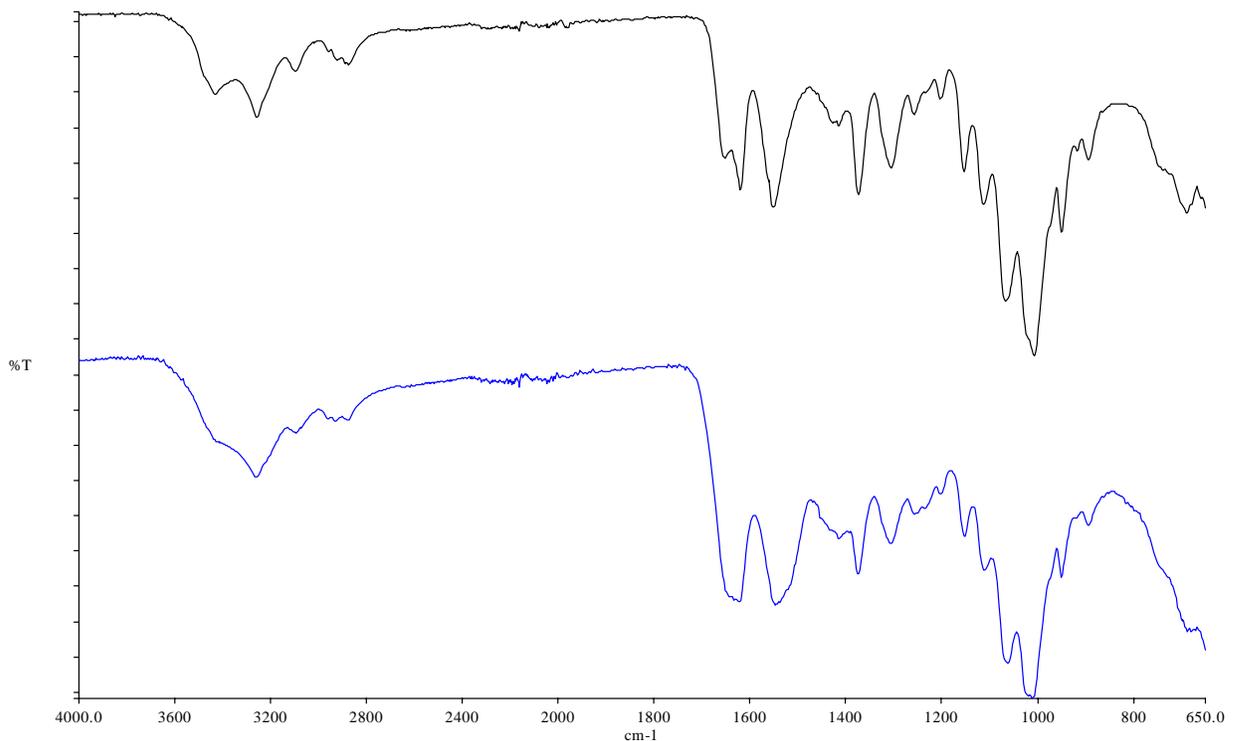


Figura 33. Espectro de infrarrojo de la quitina desmineralizada con HCl 0.4 M y desproteinizada con NaOH 0.2 M contra el de α -quitina comercial (cangrejo).
Quitina purificada (negro), quitina comercial (azul).

El espectro de infrarrojo de una α -quitina comercial de cangrejo vs. la quitina purificada se muestra en la Figura 33. El estiramiento de la región de C=O de la fracción de amida se da entre 1600 y 1500 cm^{-1} . En la α -quitina la banda I de amida se divide a 1656 y 1621 cm^{-1} , por su parte la amida II para α -quitina es única y se encuentra a alrededor de 1556 cm^{-1} (Rinaudo, 2006). De 3200 a 3500

cm^{-1} se observan las bandas características de la α -quitina, correspondientes al estiramiento de $-\text{NH}$ y $-\text{OH}$, a 2920 cm^{-1} el $-\text{CH}$ alifático y a $1150\text{-}1029 \text{ cm}^{-1}$ el pico de piranosa (Shirai, 1999). La quitina purificada observó las bandas antes mencionadas, que son características de la α -quitina.

El contenido de insolubles en la quitina se encontró del 83% y se obtuvo una quitina purificada de alto peso molecular (4523 KDa), según reportes (Ravi *et al.*, 1999; Shahidi y Abuzaytoun, 2005) la quitina normalmente presenta un peso molecular superior de 1000 KDa. Pillai *et al.* (2009) reporta que el peso molecular promedio de la quitina es de 1.03 a 2.5×10^6 . Lo anterior se traduce en que este proceso biológico-químico aparentemente no causa la despolimerización de la quitina, de modo que puede ser utilizada para obtener un quitosano de mayor peso molecular que al utilizar una quitina solamente aislada por métodos químicos.

7.2 RECUPERACIÓN Y MICROENCAPSULACIÓN DE PIGMENTOS

7.2.1 Recuperación de astaxantina de residuos de camarón

Los pigmentos fueron extraídos del residuo de camarón fermentado en el reactor de CE que utilizó mezcla de especies y sólo melaza como fuente de carbono y que alcanzó una DP del 84%. Se determinó una concentración de astaxantina en el residuo fermentado, de $265 \pm 11.29 \mu\text{g/g}$ (base seca). Se ha reportado que el ensilado por fermentación de los residuos de camarón tiene un efecto en la estabilidad y recuperación de los carotenoides (Sachindra *et al.* 2007) obtuvieron una recuperación de carotenoides de residuos de camarón no fermentados de $32.2 \mu\text{g/g}$, y posterior a 75 días de fermentación de $41.85 \mu\text{g/g}$. Gimeno *et al.* (2007) obtuvieron $115 \mu\text{g/g}$ de residuos de camarón fermentados y alrededor de $25 \mu\text{g/g}$ cuando no fueron fermentados. La razón por la cual se encuentra más astaxantina en residuos fermentados y puede deberse a dos causas, la primera, a que el ensilado con ácido producido por BAL aumenta la estabilidad de los carotenoides, por promoverse en un ambiente reductor. La otra razón es que

durante la fermentación se observa hidrólisis proteica lo que facilita la extracción de astaxantina libre (Gimeno *et al.*, 2007).

La Tabla 7 muestra la concentración de astaxantina en el extracto después de concentrado. No se detectó astaxantina utilizando quitina cruda seca, pero sí cuando se utilizó la quitina cruda húmeda. Esto coincide con Gimeno *et al.* (2007), quienes reportan la reducción importante en la recuperación de astaxantina de residuos de camarón fermentado húmedo y secado a 40 °C. Cuando usaron residuos húmedos alcanzaron hasta 115.5 µg/g y con los secados 21 µg/g, debido a la degradación por el tratamiento térmico. En el presente trabajo se usaron crudos que fueron secados a 45°C, más el tratamiento de concentración, lo cual propició la degradación del pigmento.

A pesar de que si se recuperó astaxantina utilizando quitina cruda húmeda, de la cantidad total empleada de pigmentos (considerando la masa de residuo fermentado) utilizando como método de concentración vacío con baño térmico (60 °C) durante aproximadamente 5 h, esos 275 µg/ml representan una recuperación de tan sólo el 34%, mientras que el 66% restante no se determinó posiblemente por la temperatura empleada durante la concentración (Gimeno *et al.*, 2007). El baño térmico se probó debido al bajo costo comparado con métodos como la liofilización, que aumentan en gran medida el costo de la recuperación de los pigmentos, sin embargo no se recomienda su uso debido a las altas pérdidas que involucra.

Tabla 7. Concentración de astaxantina en extractos concentrados de quitina cruda seca y húmeda.

Quitina cruda seca Concentración (µg astax/ml)	Quitina cruda húmeda Concentración (µg astax/ml)
N.D.	275.37±13.94

7.2.2 Microencapsulación de astaxantina

Debido a su alta inestabilidad intrínseca, los carotenoides no suelen ser manejados en su forma cristalina, pero si en dispersiones estabilizadas o en microcápsulas. Los métodos usados en la producción de microcápsulas están basados en la preparación de dispersiones entre el carotenoide y la matriz encapsulante, seguidos por secados por aspersion de dichas dispersiones (Higuera-Ciapara *et al.*, 2004). La retención y protección de un producto microencapsulado están relacionados a la porosidad y el grado de integridad de las microcápsulas (Finotelli *et al.*, 2005)

En la Tabla 8 se muestran las formulaciones (concentración de sólidos 22.5% en todos los casos) utilizadas para la microencapsulación de astaxantina mediante secado por aspersion, las temperaturas de operación usadas así como los porcentajes de retención obtenidos de cada tratamiento.

Tabla 8. Porcentajes de retención de astaxantina con GA a distintas temperaturas de secado por aspersion tomando como contenido teórico de astaxantina total 240 µg/g microcápsulas. (GA: goma arábica; Astax: astaxantina).

Temperatura de secado (°C)	Temperatura de salida (°C)	Formulación	Astaxantina total (µg/g cápsulas)	%R
100	65	GA:Astax:Agua 20:20:60	165.88	68.98±1.22 ^a
120	75	GA:Astax:Agua 20:20:60	184.88	76.88±0.98 ^b
140	90	GA:Astax:Agua 20:20:60	207.73	86.39±3.02 ^c

Se encontraron diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) en los tres tratamientos realizados. El porcentaje de retención más alto (86%) fue obtenido utilizando como material de pared GA a una temperatura de secado de 140°C. En la tabla 8

podemos observar que conforme aumenta la temperatura, el porcentaje de retención del pigmento aumenta, esto se debe a que la astaxantina queda mejor adsorbida en la matriz biopolimérica a 140°C que a 120 o a 100 °C debido a que a mayores temperaturas existe una mayor consolidación de la estructura. Bajas temperaturas de operación inducen un lento proceso de secado que conduce a una pobre consolidación de la matriz polimérica (Rodríguez *et al.*, 2007).

En la literatura no existen reportes sobre la microencapsulación de astaxantina por secado por aspersion, sin embargo se ha encontrado que altas temperaturas de secado proveen altas retenciones de carotenoides. Rodríguez *et al.*, en 2004 utilizando emulsiones múltiples microencapsularon carotenoides de chile rojo mediante secado por aspersion a 170°C con mezclas de GA, goma de mezquite y MD, (17, 66 y 17%, respectivamente) a un 35% de sólidos, obteniendo retenciones similares a las obtenidas en el presente trabajo, de hasta el 85% (temperatura de salida 80°C). Estos autores obtuvieron además que una alta concentración de sólidos (35%) mejoraba la eficiencia de microencapsulación, sin embargo mostraban una cinética de degradación más alta que aquellos con menor concentración de sólidos (25%). En 1997, Desobry *et al.* probaron la microencapsulación con maltodextrina de β -caroteno por secado por aspersion a 170°C. Ellos encontraron retenciones similares, del 89% de β -caroteno después del proceso de microencapsulación. Alrededor del 80% del β -caroteno se degradó en 7 semanas a 45°C o en 12 semanas a 35°C. Beristain *et al.*, en 2002, encontraron una retención de carotenoides de oleorresina de cempasúchitl del 95% utilizando goma arábica en una relación carotenoides:GA de 1:20 utilizando una temperatura de secado de 170°C. Shu *et al.*, (2006), realizaron la microencapsulación mediante la preparación de emulsiones de licopeno con gelatina y sacarosa a través de secado por aspersion. Para su mejor condición, secando a 190°C. El licopeno presentó cierta isomerización pero buena estabilidad. Se observó una ligera pérdida después del proceso de secado, por lo que su retención estuvo cerca del 100%.

8. CONCLUSIONES

La FAL es un proceso útil para la recuperación de quitina y pigmentos, entre otros componentes. Una de sus ventajas es que generalmente no requiere energía para llevarse a cabo. El mayor costo que involucra la FAL en desperdicios de crustáceos es la fuente de carbono. En este trabajo se presentó la alternativa de utilizar una fuente de carbono económica para la purificación biotecnológica de la quitina como fue el uso de melaza. El nivel de adición de esta fuente juega un importante papel en la producción de AL. Al ser un sistema heterogéneo, la agitación es un factor importante para mantener condiciones más homogéneas dentro del reactor, sin embargo, el oxígeno afecta directamente el crecimiento de las BAL, por ello que el tipo de agitación sea un detalle a tener en cuenta. La configuración de los reactores influye en la acidificación y DP de los desperdicios. Los reactores que proveen mayor empaquetamiento promueven la retención del ácido provocando una lixiviación más lenta, que permite la separación de proteínas durante un periodo de tiempo largo permitiendo que la proteólisis continúe. Asimismo, la capacidad amortiguadora de los sustratos es importante en la disminución del pH aceptable, la melaza provee un efecto amortiguador adicional debido al alto contenido de minerales que contiene, esto pudo a su vez favorecer la actividad de proteasas endógenas. La disminución de su nivel de adición al desperdicio y con otra fuente de carbono económica es algo que se recomienda probar.

El ensilado tiene un efecto positivo en la recuperación y estabilidad de los pigmentos del camarón permitiendo su fácil recuperación con disolventes o aceites vegetales. Los carotenoides son compuestos muy sensibles que en la industria son generalmente estabilizados para evitar su oxidación. Una alternativa es la microencapsulación utilizando gomas económicas que provean altas eficiencias de microencapsulación y favorezcan con ello la vida de anaquel de estos compuestos.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Alonso D., Gimeno M., Olayo R., Vázquez-Torres H., Sepúlveda-Sánchez J.D., Shirai K. 2009. Cross-linking Chitosan into UV-irradiated Cellulose Fibers for the Preparation of Antimicrobial-finished Textiles. *Carbohydrate Polymers*, 77(3):536–543.
- A.O.A.C. 1990. *Methods of Analysis* (15th ed.). Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC.
- Basso L., de Amorim H., de Oliveira A., Lopes M. 2008. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Research*, 8:1155–1163.
- Beristain C.I., Ocejó I., Vernon-Carter E.J. 2002. Microencapsulation of aztec marigold (*Tagetes erecta*) carotenoids with gum arabic. Annual Meeting and Food Expo.
- Bhardwaj T., Kanwar M., Lal R. Gupta A. 2000. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 26(10):1025–1038.
- Bhaskar N., Suresh P.V., Sakhare P.Z., Sachindra N.M. 2007. Shrimp biowaste fermentation with *Pediococcus acidolactici* CFR2182: Optimization of fermentation conditions by response surface methodology and effect of optimized conditions on deproteination/demineralization and carotenoid recovery. *Enzyme and Microbial Technology*, 40:1427–1434.
- Black, M.M., Schwartz, A.M., 1950. The estimation of chitin and chitin nitrogen in crawfish waste and derived products. *Analyst*, 75:185–189.
- Brown A.D. 1976. Microbial water stress. *Bacteriological Reviews*, 40(4):803–846.

- Bustos R., Romo L., Yáñez K., Díaz G., Romo C. 2003. Oxidative stability of carotenoid pigments and polyunsaturated fatty acids in microparticulate diets containing krill oil for nutrition of marine fish larvae. *Journal of Food Engineering*, 56:289–293.
- Cira L. A. 2000. Escalamiento de un proceso para la recuperación de quitina a partir de desechos de camarón. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Cira L. A., Huerta S., Hall, G. M., Shirai K. 2002. Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemistry*, 37:1359–1366.
- Cozic C., Picton L., Garda M.R., Marlhoux F., Le Cerf D. 2009. Analysis of arabic gum: Study of degradation and water desorption processes. *Food Hydrocolloids*, 23:1930–1934.
- Cho Y. I., No H. K., Meyers S. P. 1998. Physicochemical Characteristics and Functional Properties of Various Commercial Chitin and Chitosan Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46:3839–3843.
- Desai K. y Park H. 2005. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying Technology*, 23:1361–1394.
- Desobry S., Netto F., Labuza T. 1997. Comparison of Spray-drying, Drum-drying and Freeze-drying for β -Carotene Encapsulation and Preservation. *Journal of Food Science*, 62(6):1158–1162.
- Finotelli P., Rocha-Leão M. 2005. Microencapsulation of ascorbic acid in maltodextrin and capsul using spray-drying. Segundo Congreso Mercosur en Ingeniería Química.
(Ver http://www.enpromer2005.eq.ufri.br/nukleo/pdfs/0022_aa.pdf).

- Gharsallaoui A., Roudaut G., Chambin O., Voilley A., Saurel R. 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40:1107–1121.
- Gimeno M., Ramírez-Hernández J. Y., Martínez-Ibarra C., Pacheco N., García-Arrazola R., Bárzana E., Shirai K.. 2007. One-Solvent Extraction of Astaxanthin from Lactic Acid Fermented Shrimp Wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55:10345–10350.
- Gouin S. 2004. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science and Technology*, 15:330–347.
- Handayani A., Indraswati S. N., Ismadji S. 2008. Extraction of astaxanthin from giant tiger (*Panaeus monodon*) shrimp waste using palm oil: Studies of extraction kinetics and thermodynamic. *Bioresource Technology*, 99:4414–4419.
- Higuera-Ciapara I., Felix-Valenzuela L., Goycoolea F.M., Argüelles-Monal W. 2004. Microencapsulation of astaxanthin in a chitosan matrix. *Carbohydrate Polymers*, 56:41–45.
- Ibanoglu E. 2002. Rheological behaviour of whey protein stabilized emulsions in the presence of gum arabic. *Journal of Food Engineering*, 52:273–277.
- Jung W. J., Jo G. H., Kuk J. H., Kim K. Y., Park R. D. 2006. Extraction of chitin from red crab shell waste by cofermentation with *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* KCTC-3074 and *Serratia marcescens* FS-3. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71:234–237.
- Jung W. J., Jo G. H., Kuk J. H., Kim Y. J., Oh K. T., Park R.D. 2007. Production of chitin from red crab shell waste by successive fermentation with

Lactobacillus paracasei KCTC-3074 and *Serratia marcescens* FS-3. Carbohydrate Polymers, 68:746–750.

Kanakdande D., Bhosale R., Singhal R. S. 2007. Stability of cumin oleoresin microencapsulated in different combination of gum arabic, maltodextrin and modified starch. Carbohydrate Polymers, 67:536–541.

Kask S., Adamberg K., Orłowski A., Vogensen F.K., Møller P.L., Ardo Y., Paalme T. 2003. Physiological properties of *Lactobacillus paracasei*, *L. danicus* and *L. curvatus* strains isolated from Estonian semi-hard cheese. Food Research International, 36:1037–1046.

Loksuwan J. 2007. Characteristics of microencapsulated b-carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin. Food Hydrocolloids 21:928–935.

Madene A., Jacquot M., Scher J., Desobry S. 2006. Flavour encapsulation and controlled release—a review. International Journal of Food Science and Technology, 41:1–21.

Martinez-Castellanos G., Shirai K., Pelayo-Zaldivar C., Perez-Flores L. J., Sepulveda-Sanchez J. 2009. Effect of *Lactobacillus plantarum* and chitosan in the reduction of browning of pericarp Rambutan (*Nephelium lappaceum*). Food Microbiology, 26:44–449.

Pacheco N., Garnica-González M., Ramírez-Hernández J. Y., Flores-Albino B., Gimeno M., Bárzana E., Shirai K. 2009. Effect of temperature on chitin and astaxanthin recoveries from shrimp waste. Bioresource Technology, 100:2849-2854.

- Pacheco N. 2010. Extracción biotecnológica de quitina para la producción de quitosanos: caracterización y aplicación. Tesis de Doctorado en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Parada L.G., Crespín G.D., Miranda R., Katime I. 2004. Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar y valoración potenciométrica. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, Vol 5:1.
- Pedroza-Islas R., Vernon-Carter E.J., Durán-Domínguez C., Trejo-Martínez S. 1999. Using biopolymer blends for shrimp feedstuff microencapsulation I. Microcapsule particle size, morphology and microstructure. *Food Research International* 32:367–374.
- Peniche C. A. 2006. Estudios sobre quitina y quitosana. Tesis doctoral, Universidad de La Habana, Facultad de Química.
- Pérez-Alonso C., Báez-González J., Beristain C., Vernon-Carter E., Vizcarra-Mendoza M.G. 2003. Estimation of the activation energy of carbohydrate polymers blends as selection criteria for their use as wall material for spray-dried microcapsules. *Carbohydrate Polymers* 53:197–203.
- Pillai C., Paul W., Sharma C. 2009. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, 34:641–678.
- Plascencia-Jatomea M., Olvera-Novoa M. A., Arredondo-Figueroa J. L., Hall G. M., 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.
- Ramírez J. 2008. Extracción y cuantificación de astaxantina de desechos de camarón fermentados. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

- Ramírez J. C. 2009. Aprovechamiento de fauna de acompañamiento del camarón y subproductos pesqueros mediante la elaboración de ensilado de pescado. Tesis de Doctorado en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Rao, M.S., Muñoz, J., Stevens, W.F., 2000. Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54:808–813.
- Rinaudo M. 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31:603–632.
- Risch, S. 1995. In *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients*; ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC.
- Rocha-Pino Z., Shirai K., Arias L., Vázquez-Torres H. 2008. Efecto de la calidad del agua y tamaño de partícula en la producción de quitosano a partir de β -quitina extraída de desperdicios de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 7(3):299–307.
- Rodríguez-Huezo M., Pedroza-Islas R., Prado-Barragán L., Beristain C., Vernon-Carter E. 2004. Microencapsulation by Spray Drying of Multiple Emulsions Containing Carotenoids. *Journal of Food Science*, 69(7):352–359.
- Rodríguez-Huezo M. E., Durán-Lugo R., Prado-Barragán L. A., Cruz-Sosa F., Lobato-Calleros C., Alvarez-Ramírez J., Vernon-Carter E. J. 2007. Pre-selection of protective colloids for enhanced viability of *Bifidobacterium bifidum* following spray-drying and storage, and evaluation of aguamiel as thermoprotective prebiotic. *Food Research International* 40:1299–1306.

- Rødde R.H., Einbu A., Varum K.M. 2008. A seasonal study of the chemical composition and chitin quality of shrimp shells obtained from northern shrimp (*Pandalus borealis*). *Carbohydrate Polymers*, 71:388–393.
- Sachindra N. M., Bhaskar N., Siddegowda G. S., Sathisha A.D., Suresh P.V. 2007. Recovery of carotenoids from ensilaged shrimp waste. *Bioresource Technology*, 98:1642–1646.
- Sanchez C., Renard D., Robert P., Schmitt C., Lefebvre J. 2002. Structure and rheological properties of acacia gum dispersions. *Food Hydrocolloids*, 16:257–267.
- Shahidi F., Synowiecki J. 1991. Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoectes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 39:1527–1532.
- Shirai K. 1999. Utilización de desperdicios de camarón para recuperación de quitina, proteínas y pigmentos por vía microbiana. Tesis doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Shirai K., Guerrero I., Huerta S., Saucedo G., Castillo A., González R., Hall G. M. 2001. Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation. *Enzyme and Microbial Technology*, 28:446–452.
- Shu B., Yu W., Zhao Y., Liu X. 2006. Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. *Journal of Food Engineering*, 76:664–669.

- Sini T.K., Santhosh S., Mathew P.T. 2007. Study on the production of chitin and chitosan from shrimp shell by using *Bacillus subtilis* fermentation. Carbohydrate Research, 342:2423–2429.
- Synowiecki J., Al-Khateeb N. 2003. Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 43(2):145–171.
- Vehring R., Foss W.R., Lechuga-Ballesteros D. 2007. Particle formation in spray drying. Aerosol Science, 38:728–746.
- Williams P.A. y Phillips G.O., 2000. Handbook of hydrocolloids. Woodhead Publishing Limited.
- Xu Y., Gallert C., Winter J. 2008. Chitin purification from shrimp wastes by microbial deproteination and decalcification. Applied Microbiology and Biotechnology, 79:687–697.
- Zakaria Z, Hall M, Shama G. 1998. Lactic acid fermentation of scampi waste in a rotating horizontal bioreactor for chitin recovery. Process Biochemistry, 33(1):1–6.

10. ANEXOS

ANEXO 1

Actividad acuosa en los niveles de melaza de 20, 30, 40 y 50% (p/p) utilizados en la fermentación en frascos al inicio y término de la fermentación.

ANOVA

Aw

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	0.001	7	0.000	133.664	0.000
Intra-grupos	0.000	24	0.000		
Total	0.001	31			

Prueba de Tukey

Aw

Mel	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
40-120	4		0.9375			
50-120	4		0.9400			
50-0	4			0.9430		
20-120	4				0.9460	
40-0	4				0.9465	
30-120	4				0.9483	
30-0	4					0.9538
20-0	4					0.9593
Sig.		0.122	1.000	0.208	1.000	1.000

ANEXO 2

Análisis de varianza y prueba de Tukey del %DP utilizando *Litopenaeus vannamei* en los reactores de CA, TR y CE.

ANOVA

%DP

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	792.883	2	396.441	21.600	0.017
Intra-grupos	55.063	3	18.354		
Total	847.945	5			

Prueba de Tukey

Reactor	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		2	1
CA	2	58.0107	
TR	2		78.3209
CE	2		85.0561
Sig.		1.000	0.380

ANEXO 3

Análisis de varianza del %DP utilizando mezcla de especies en los reactores de TR y CE.

ANOVA

%DP

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	70.271	1	70.271	14.406	0.009
Intra-grupos	29.267	6	4.878		
Total	99.537	7			

ANEXO 4

Análisis de varianza del %DP en los reactores de TR utilizando *L. vannamei* o mezcla de especies.

ANOVA

%DP

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	0.745	1	0.745	0.174	0.698
Intra-grupos	17.096	4	4.274		
Total	17.841	5			

ANEXO 5

Análisis de varianza del %DP en los reactores de CE utilizando *L. vannamei* o mezcla de especies.

ANOVA

%DP

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	0.006	1	0.006	0.001	0.981
Intra-grupos	33.848	4	8.462		
Total	33.854	5			

ANEXO 6

Análisis de varianza del %DP en el reactor de CE con 10 y 20% inóculo utilizando mezcla de especies.

ANOVA

%DP

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	14.714	1	14.714	6.143	0.131
Intra-grupos	4.791	2	2.395		
Total	19.504	3			

ANEXO 7

Análisis de varianza del %DP usando mezcla de especies en el reactor de CE con 5, 10 y 20% inóculo.

ANOVA

%DP					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	15.663	2	7.832	4.217	0.134
Intra-grupos	5.572	3	1.857		
Total	21.235	5			

ANEXO 8

Análisis de varianza y prueba de Tukey de los porcentajes de cenizas en la quitina cruda desmineralizada con las concentraciones de HCl de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 M.

ANOVA

%Cenizas					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	950.311	5	190.062	66657.421	0.000
Intra-grupos	0.017	6	0.003		
Total	950.328	11			

Prueba de Tukey

%Cenizas				
HCl	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		2	3	1
0.60	2	0.9996		
0.40	2	1.0466	1.0466	
0.80	2	1.0774	1.0774	
1.00	2	1.1309	1.1309	
0.20	2		1.2529	
0.00	2			24.9791
Sig.		0.268	0.057	1.000

ANEXO 9

Análisis de varianza y prueba de Tukey de los porcentajes de cenizas en la quitina
cruda desmineralizada con las concentraciones de NaOH de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1
M.

ANOVA

%Proteína residual

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	682.360	5	136.472	449.541	0.000
Intra-grupos	1.821	6	0.304		
Total	684.182	11			

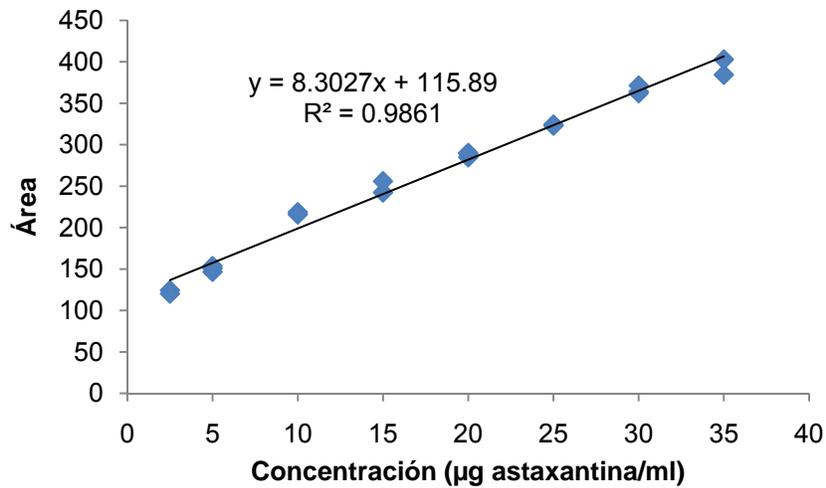
Prueba de Tukey

%Proteína residual

NaOH	N	Subconjunto para alfa = .05	
		2	1
0.40	2	0.9906	
0.80	2	1.6375	
0.60	2	1.6594	
1.00	2	1.6656	
0.20	2	2.0938	
0.00	2		21.8249
Sig.		0.433	1.000

ANEXO 10

Curva de calibración de astaxantina.



ANEXO 11

Análisis de varianza del contenido de astaxantina en residuos de camarón fermentados y no fermentados.

ANOVA

Astaxantina

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2214.410	1	2214.410	26.518	0.036
Intra-grupos	167.014	2	83.507		
Total	2381.424	3			