

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA



Casa abierta al tiempo
C. B. S.

**ESCALAMIENTO DE UN PROCESO PARA LA
RECUPERACIÓN DE QUITINA A PARTIR DE DESECHOS DE
CAMARÓN**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

LUIS ALBERTO CIRA CHÁVEZ

Julio del 2000

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

“El Posgrado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana esta incluido en el Padrón de Excelencia del CONACyT y además cuenta con el apoyo del mismo Consejo, con el convenio **PFP-20-93**”

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa
aprobó la idónea comunicación de resultados que presentó:

Luis Alberto Cira Chávez

El día 24 de Julio del año del 2000

Comité Tutorial:

Tutor: Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto

Asesor: Dra. Isabel Guerrero Legarreta

Asesor: Dr. Sergio Huerta Ochoa

Sinodal: Dr. Carlos Regalado González

Sinodal: Dr. Francisco M. Goycoolea Valencia

Lectora de la tesis: Dra. Claudia Patricia Larralde Corona

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DEDICATORIAS

A ustedes Adelaido y María Luisa, mis queridos padres, que con su cariño, su ejemplo y su dedicación hicieron de mi un hombre de bien.

A ustedes por darme la vida y enseñarme a valorarla, por esas palabras de aliento que me ayudaron a superar los momentos difíciles, por el apoyo que siempre me brindaron y por celebrar mis éxitos.

A ti Lalo, que desafortunadamente el destino no quiso que llegaras a contemplar esta etapa de mi vida, pero que sé, donde sea que estés, te sentirás orgulloso de que haya alcanzado mis aspiraciones.

U
20/08/2020

AGRADECIMIENTOS

A mis hermanos, Mirna, Omar y Juan Carlos, por todos los bellos momentos compartidos que nos han ayudado a engrandecer nuestra unión.

Al H. Jurado que evaluó la defensa de mí trabajo.

A la Dra. Keiko Shirai por su gran amistad y sus acertados consejos, por enseñarme que con trabajo y constancia se logran alcanzar las metas establecidas; Gracias Keiko por tu confianza y por creer en mí.

Al Dr. Sergio Huerta Ochoa por asesorarme durante la realización de este trabajo, por su ayuda y sugerencias.

A la Dra. Isabel Guerrero por el apoyo brindado.

A la Dra. Patricia Larralde por su disposición al revisar esta tesis y quien con sus sugerencias ayudó a la culminación de este trabajo.

A los Doctores Carlos Regalado y Francisco Goycoolea por el interés que tuvieron en la revisión de este trabajo, así como por sus importantes y atinados comentarios.

A mis compañeros de laboratorio, Maribel, Raquel, Silvia, Baci, Lulú, Edith, Hugo, Roberto, Ernesto, Yoyi, Octavio Dublan, Alfonso, Octavio Chávez y Marcelo, por su amistad y compañía.

A Maribel y Hugo, por sus palabras de aliento en esos momentos difíciles, por su confianza y por su gran amistad.

A René, a quien quiero como a un hermano, por su gran amistad, su confianza y por estar junto a mí en los grandes momentos.

A Octavio Loera por su amistad y sus consejos.

A mis tías Micaela y Concepción por su gran cariño.

A mis primos Harabey, Roberto, Janeth, Ulises y Erika por los bellos momentos que hemos compartido.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el financiamiento otorgado para la realización de esta tesis.

CONTENIDO

	Pág.
Lista de tablas.....	iv
Lista de figuras.....	vi
Resumen.....	ix
I. Introducción.....	xi
II. Revisión bibliográfica.....	1
2.1 Desechos de crustáceos.....	1
2.1.1 Composición.....	1
2.2 Quitina y quitosano.....	3
2.2.1 Generalidades y fuentes de obtención.....	3
2.2.2 Estructura y propiedades.....	4
2.2.3 Usos.....	6
2.2.3.1 Alimentos.....	6
2.2.3.2 Medicina.....	7
2.2.3.3 Cosmetología.....	7
2.2.3.4 Agricultura.....	7
2.2.3.5 Biotecnología.....	8
2.2.3.6 Tratamiento de aguas residuales.....	8
2.2.3.7 Otros usos.....	9
2.2.4 Preparación de la quitina y quitosano.....	9
2.2.4.1 Aislamiento de quitina.....	10
2.2.4.2 Caracterización de la quitina.....	16
2.3 Fermentación ácido láctica.....	19
2.3.1 Bacterias ácido lácticas (BAL).....	19
2.3.1.1 Clasificación.....	19
2.3.1.2 Metabolismo de las bacterias ácido lácticas.....	20

2.3.2 Productos de la fermentación.....	20
2.3.2.1 Ácidos orgánicos.....	20
2.3.2.2 Peróxido de hidrógeno.....	21
2.3.2.3 Diacetilo.....	21
2.3.2.4 Bacteriocinas.....	21
2.3.3 Condiciones para la fermentación ácido láctica.....	21
2.4 Ensilado de pescado.....	25
2.4.1 Definición.....	25
2.4.2 Historia.....	25
2.4.3 El proceso bioquímico.....	26
2.4.3.1 El papel del ácido.....	26
2.4.3.2 Proteólisis.....	27
2.5 Fermentación ácido láctica de desechos de camarón.....	28
2.6 Fermentación en medio sólido (FMS).....	28
2.6.1 Definición.....	28
2.6.2 Ventajas e inconvenientes de la FMS.....	29
2.6.3 Aplicaciones de la FMS.....	30
2.6.4 Fundamentos de escalamiento en FMS.....	30
2.6.5 Tipos de reactores utilizados en FMS llevados a escala importante.....	31
2.6.5.1 Prototipos a nivel laboratorio.....	31
III. Justificación.....	36
IV Objetivos.....	37
V. Material y Métodos.....	38
5.1 Selección de la fuente de carbono y nivel de iniciador.....	38
5.1.1 Material.....	38
5.1.2 Microorganismo.....	38
5.1.3 Fuente de carbono y nivel de iniciador.....	38
5.1.4 Condiciones de la fermentación.....	38
5.1.5 Análisis químicos.....	39
5.1.5.1 Determinación de pH y acidez total titulable (ATT).....	39

5.1.5.2 Contenido de ácidos orgánicos por HPLC.....	39
5.2 Fermentación en reactor de columna a 2 kilogramos.....	39
5.2.1 Preparación del inoculo.....	40
5.2.2 Preparación del desecho de camarón.....	40
5.2.3 Condiciones de la fermentación.....	41
5.2.4 Fermentación a 30 kilogramos.....	41
5.3 Purificación de la quitina cruda.....	41
5.3.1 Tratamiento ácido.....	42
5.3.2 Tratamiento alcalino.....	42
5.4 Análisis químico de las muestra.....	42
5.4.1 Determinación del contenido de calcio.....	42
5.4.2 Determinación del nitrógeno total (NT) por el método de Kjeldahl.....	42
5.4.3 Nitrógeno proteico (NP).....	43
5.4.4 Nitrógeno de quitina (NQ).....	43
5.4.5 Análisis elemental: Carbono hidrógeno y Nitrógeno.....	44
5.4.6 Determinación de azúcares totales.....	44
5.4.7 Determinación del contenido de humedad.....	44
5.4.8 Determinación de la actividad de agua.....	44
5.4.9 Análisis estadístico.....	45
VI Resultados y Discusión.....	46
6.1 Selección de la fuente de carbono y nivel de iniciador.....	46
6.2 Escalamiento de la fermentación láctica.....	56
6.3 Aislamiento de quitina por métodos químicos después de la fermentación.....	63
VII Conclusiones.....	68
VIII Bibliografías.....	69
IX Anexos.....	80

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Composición del camarón, 100 g de porción comestible y del cefalotórax, % base seca.....	2
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de la quitina y quitosano.....	5
Tabla 3. Propiedades catiónicas del quitosano.....	6
Tabla 4. Propiedades de importancia industrial de la quitina y quitosano.....	7
Tabla 5. Condiciones empleadas para la desproteínización en la preparación de diversas quitinas.....	12
Tabla 6. Condiciones empleadas para la desmineralización en la preparación de diversas quitinas.....	14
Tabla 7. Condiciones usadas para la decoloración de la quitina.....	15
Tabla 8. Caracterización de la quitina.....	16
Tabla 9. Dimensiones del reactor de columna.....	40
Tabla 10. Simulación cinética de la producción de ácido láctico por el modelo de Gompertz en la fermentación láctica de cabezas de camarón a diferentes niveles de inoculación con <i>Lactobacillus sp.</i> Cepa B2.....	55
Tabla 11. Análisis químico proximal del ensilado de cabezas de camarón obtenidas a diferentes tiempos de fermentación.....	57
Tabla 12. Análisis elemental de muestras de ensilado a diferentes tiempos de fermentación, muestras de quitina y quitosano y estándares comerciales, así como valores teóricos.....	64
Tabla 13. Análisis de varianza para la acidez total titulable (ATT) de ensilados de cabezas de camarón <i>Penaeus sp.</i> (SAS, 1989).	81
Tabla 14. Análisis de varianza. Fuentes de variación y sus interacciones (SAS,1989).....	81

Tabla 15.	Comparación de medias de acidez total titulable por la prueba de Duncan en las diferentes fuentes de variación.....	82
Tabla 16.	Análisis de varianza para pH de ensilados de cabezas de camarón <i>Penaeus sp.</i> (SAS, 1989).....	82
Tabla 17.	Análisis de varianza. Fuentes de variación y sus interacciones (SAS, 1989).....	83
Tabla 18.	Comparación de medias de pH por la prueba de Duncan en las diferentes fuentes de variación.....	83

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura química del la quitina, quitosano y celulosa.....	4
Figura 2. Diagrama simplificado para la producción de quitina y quitosano.....	10
Figura 3. Reactor tipo koji.....	33
Figura 4. Biorreactor de tambor rotatorio.....	34
Figura 5. Biorreactor de agitación horizontal.....	34
Figura 6. Reactor de columna.....	35
Figura 7. Reactor de columna para fermentación en sólido.....	41
Figura 8. Fermentación láctica de cabezas de camarón con 10 % de azúcar de caña y diferentes concentraciones de <i>Lactobacillus sp.</i>	47
Figura 9. Fermentación láctica de cabezas de camarón con 20 % de azúcar de caña y diferentes concentraciones de <i>Lactobacillus sp.</i>	48
Figura 10. Fermentación láctica de cabezas de camarón con 10 % de lactosa y diferentes concentraciones de <i>Lactobacillus sp.</i>	48
Figura 11. Fermentación láctica de cabezas de camarón con 20 % de lactosa y diferentes concentraciones de <i>Lactobacillus sp.</i>	49
Figura 12. Fermentación láctica de cabezas de camarón con 10 % de suero de leche y diferentes concentraciones de <i>Lactobacillus sp.</i>	49
Figura 13. Fermentación láctica de cabezas de camarón con 20 % de suero de leche y diferentes concentraciones de <i>Lactobacillus sp.</i>	50
Figura 14. Concentración de ácidos orgánicos producidos durante la fermentación láctica de cabezas de camarón con 10% de azúcar de caña y 5 % de <i>Lactobacillus sp.</i>	52

Figura 15.	Influencia del nivel de inoculación (% v/p) de <i>Lactobacillus</i> cepa B2 sobre la formación de ácido láctico en la fermentación de cabezas de camarón con 20 % (p/p) de suero de leche.....	52
Figura 16.	Influencia del nivel de inoculación (% v/p) de <i>Lactobacillus</i> cepa B2 sobre la formación de ácido láctico en la fermentación de cabezas de camarón con 20 % (p/p) de suero de leche.....	53
Figura 17.	Influencia del nivel de inoculación (% v/p) de <i>Lactobacillus</i> cepa B2 sobre la formación de ácido láctico en la fermentación de cabezas de camarón con 20 % (p/p) de suero de leche.....	53
Figura 18.	Influencia del nivel de inoculación (% v/p) de <i>Lactobacillus</i> cepa B2 sobre la formación de ácido láctico en la fermentación de cabezas de camarón con 20 % (p/p) de suero de leche.....	54
Figura 19.	Influencia del nivel de inoculación (% v/p) de <i>Lactobacillus</i> cepa B2 sobre la formación de ácido láctico en la fermentación de cabezas de camarón con 20 % (p/p) de suero de leche.....	54
Figura 20.	Influencia del nivel de inoculación (% v/p) de <i>Lactobacillus</i> cepa B2 sobre la formación de ácido láctico en la fermentación de cabezas de camarón con 20 % (p/p) de suero de leche.....	56
Figura 21.	Evolución del pH y producción de ácido en el reactor de columna (2 kg) durante la fermentación con 10% (p/p) de azúcar de caña y 5% (v/p) de <i>Lactobacillus</i> sp.....	58
Figura 22.	Contenido de calcio determinado durante la fermentación láctica de desechos de camarón con 10% (p/p) de azúcar de caña y 5% (v/p) de <i>Lactobacillus</i> sp.....	59
Figura 23.	Cambios en el contenido de proteína en el sólido durante la fermentación de desechos de camarón con 10% (p/p) de azúcar de caña y 5% (v/p) de <i>Lactobacillus</i> sp.....	61
Figura 24.	Utilización de azúcar de caña y producción de ácido láctico por <i>Lactobacillus</i> sp. en la fermentación láctica realizada con 10% (p/p) del carbohidrato y 5% (v/p) de inóculo.....	62
Figura 25.	Efecto de la concentración de HCl sobre el contenido de calcio de la quitina cruda obtenida por fermentación láctica. Histogramas con la misma letra son estadísticamente iguales entre tratamientos ($P < 0.05$).....	65

Figura 26.	Efecto de la concentración de NaOH sobre el contenido de proteínas en la quitina obtenida por fermentación láctica. Puntos con la misma letra son estadísticamente iguales entre tratamientos ($P < 0.05$).....	66
Figura 27.	Curva estándar para determinar azúcares totales.....	80
Figura 28.	Curva estándar para ácido acético.....	84
Figura 29.	Curva estándar para ácido láctico.....	85
Figura 30.	Curva estándar para determinar calcio (CaCO_3).....	86

Resumen

La fermentación láctica es un proceso adecuado para la conservación del desecho de camarón, siendo económicamente atractivo, debido a que no tiene requerimientos altos de energía y se puede emplear equipo de bajo costo. Además, puede realizarse en regiones aledañas a las granjas camaronícolas o en altamar. En el presente trabajo se realizó el escalamiento de un proceso para la recuperación de quitina a partir de desechos de camarón.

Para tal propósito primeramente se establecieron las condiciones de fermentación, evaluando al azúcar de caña, lactosa y suero de leche, así como dos niveles de inoculación utilizando *Lactobacillus sp.* cepa B2. Las condiciones con las que se obtuvo una reducción del pH en menor tiempo fueron 10 % (p/p) de azúcar de caña y 5 % (v/p) de inoculación, alcanzando un valor de 4.5 en 48 horas y una acidez total titulable (ATT) de 2.5 %. La fermentación siguió un patrón homoláctico, ya que el principal producto fue el ácido láctico.

Establecidas las condiciones de fermentación, el proceso se escaló a 2 y 30 kilogramos en un reactor de columna para fermentación en estado sólido. El ensilado permaneció estable por 83 días, tiempo durante el cual no se observó cambios aparentes de descomposición.

La actividad de agua tendió a disminuir durante el proceso de ensilaje, de un valor inicial de 0.97 a 0.94 después de los seis días, pudiendo inhibir a los microorganismos que causan descomposición, así como bacterias lácticas heterofermentativas que son más sensibles a bajas actividades de agua.

Por otra parte, a los seis días de fermentación se obtuvieron los mayores porcentajes de remoción tanto de proteínas como de calcio, siendo estos del 90 y 83% respectivamente. Además, el residuo sólido obtenido presentó un contenido de quitina del 23.2%, que es aproximadamente el doble del contenido inicial (13.1 %).

Al ser tratado el residuo con varias concentraciones de ácido y álcali, se observó que a alrededor de 0.4 y 0.5 M se obtienen la más baja disminución en el contenido de proteína y calcio, respectivamente, y un aumento en la concentración de los químicos no mejoró la separación. Por lo tanto, el ensilaje fue capaz de reducir entre un 60 y 80 % las cantidades de químicos empleados para la purificación de la quitina al ser comparado contra las condiciones reportadas en la literatura.

I. INTRODUCCIÓN

El aumento en la distribución y consumo de mariscos en años recientes conlleva un aumento en la cantidad de desechos producidos. La composición de estos desechos varía con la especie pero en general contienen: quitina, proteínas, sales minerales, pigmentos y lípidos. La quitina, además de formar parte de la estructura de crustáceos y artrópodos, está presente en la pared celular de hongos y levaduras; es el segundo polímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa. En las cutículas de los crustáceos, la quitina se encuentra fuertemente asociada con sales inorgánicas, tales como carbonatos de calcio, proteínas, pigmentos y lípidos. De ahí que el proceso convencional utilizado en la industria para la obtención de quitina, a partir de esqueletos de crustáceos, consiste en una desproteínización con álcali, seguida con una desmineralización con ácidos diluidos y finalmente, la eliminación de lípidos con solventes orgánicos.

Los métodos convencionales empleados para la obtención de la quitina requieren el consumo de grandes cantidades de reactivos y agua, se producen grandes volúmenes de efluentes, los cuales al ser tratados elevan los costos de producción y causan daños ambientales.

En la actualidad se han buscado alternativas para el procesamiento de los desechos y de esta manera se ha empleado a la fermentación láctica para un aprovechamiento integral del desecho, que además de purificar parcialmente a la quitina, permite la recuperación de otros compuesto de alto valor agregado presentes en el desecho, tales como proteínas, pigmentos y lípidos.

Todo proceso innovador empieza con investigación a nivel laboratorio y si éste tiene éxito, termina en la planta de producción siendo el escalamiento el paso intermedio entre el laboratorio y la planta de producción. Con base a lo anterior, el presente trabajo está encaminado a establecer las condiciones de fermentación como pasos preliminares en el escalamiento de un proceso para la recuperación de quitina a partir de desechos de camarón.

II. Revisión Bibliográfica

La captura de camarón está entre las actividades pesqueras más antiguas del país. Durante 1998 fueron capturados alrededor de 80 mil toneladas de camarón en los litorales del Golfo de México y del Pacífico (SEMARNAP, 1998). De todo el camarón que se produce en el país, aproximadamente el 30% proviene de la camaronicultura, cantidad que le permite a México estar entre los primeros 15 productores de camarón de granja a escala mundial y el tercero en América Latina (Cañipa y Duran, 1997).

El camarón es un crustáceo decápodo, macruro, de tamaño y color variable. Su cuerpo es algo encorvado y está dividido en dos partes, cefalotórax y abdomen, comercialmente conocidos como cabeza y cola, respectivamente. El cefalotórax es una combinación de cabeza y tronco en una sola unidad, está cubierto por un caparazón, que contiene a la cabeza, los órganos vitales, tres pares de patas prensoras y dos caminadoras. Es un alimento excepcionalmente nutritivo, con alto contenido de proteínas (Cañipa y Duran, 1997).

2.1 Desechos de crustáceos

Debe mencionarse que sólo el 50 % del animal es comestible y que el restante está constituido por el cefalotórax, que no es comestible. Esto da idea de los grandes volúmenes de desechos que se producen en México. Si estos desechos no son aprovechados, se convierten en contaminantes, tanto en altamar durante la captura, como en tierra en las granjas camaronícolas.

2.1.1 Composición

La riqueza del cefalotórax de camarón en lo que respecta a varios de sus componentes (quitina, proteína y pigmentos), lo convierte en una fuente susceptible de ser procesada para obtener subproductos útiles en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica (Knorr, 1991). En la tabla I se presenta la composición química del camarón y de la cabeza de camarón.

Tabla I. Composición de la porción comestible y del cefalotórax de camarón.

Composición	Parte comestible ^{a,b}	Cefalotórax ^{a,c}
Agua (g)	78.2	----
Proteína (g)	18.1	47.7
Grasa (g)	0.8	4.63
Carbohidratos (g)	1.5	2.47
Cenizas	N. D.	19.35
Fibra cruda	N. D.	26.86
Calcio (mg)	63.0	N. D.

^abase seca

N.D.: no determinado

^bFuente: Cherley, (1987).^cFuente: Agricultural Handbook, (1975).

La fracción correspondiente a la fibra, está aportada por el biopolisacárido llamado quitina, utilizado cada vez en un número de aplicaciones utilizado en la industria, especialmente alimentaria y farmacéutica. Países como Japón y Estados Unidos, producen grandes cantidades de esta sustancia y sus derivados, exportándolos a los demás países (Mathur y Narang *et al.*, 1990).

El quitosano es el derivado más importante de la quitina, su obtención comercial se realiza mediante una desacetilación alcalina con NaOH a temperaturas de ebullición.

La secuencia de aminoácidos que conforman a las proteínas del cefalotórax de camarón incluye a todos los aminoácidos esenciales y constituyen aproximadamente el 50% del peso seco. Estas proteínas son empleadas como una fuente alimenticia y como formulación para preparar medios de cultivo para microorganismos (Cañipa y Duran, 1997).

Las sales minerales, principalmente fosfatos y carbonatos de calcio constituyen el segundo componente más abundante en el cefalotórax, se encuentran asociados a la quitina y proteínas otorgándole una dureza característica al exoesqueleto. Para removerlas, se han utilizado diversos disolventes entre los que pueden mencionar al ácido clorhídrico y acético (Cañipa y Duran, 1997).

2.2 Quitina y quitosano

La quitina es un biopolímero parecido a la celulosa, el cual se encuentra distribuido ampliamente en la naturaleza, especialmente en invertebrados marinos, insectos, hongos y levaduras (Austin *et al.*, 1981). La quitina y su forma desacetilada, el quitosano, tienen un gran interés en vista de sus nuevas aplicaciones. El uso de estos dos polímeros funcionales, particularmente el quitosano, tiene un amplio rango de aplicaciones en diversas áreas científicas, incluyendo aplicaciones en industrias biomédicas, de alimentos y químicas (Knorr, 1984; Muzzarelli, 1985; Rha *et al.*, 1984; Sandford y Hutchings, 1989).

2.2.1 Generalidades y fuentes de obtención

La quitina es, por mucho, el componente de mayor importancia en el cefalotórax de camarón. Fue descrita por primera vez en 1811 por H. Braconnot, al estudiar la composición de hongos como *Agaricus volvaceus* con álcali, aislando una sustancia nitrogenada a la cual llamó "fungina". En 1823, A. Odier descubrió la misma sustancia en unos insectos, dándole el nombre de quitina (palabra derivada del griego que significa túnica o envoltura). Posteriormente, se encontró que ambas sustancias eran las mismas y que se encontraban en otros organismos como levaduras, hongos y algunos crustáceos, siendo estos últimos, su fuente principal. Sin embargo, fue hasta 1878 cuando se indicó que estaba compuesta por glucosamina y ácido acético, estableciéndose hasta 1943 que la quitina es un polisacárido acetilado de la glucosamina (Muzzarelli, 1978).

El quitosano fue descubierto en 1859 por Rouget al hervir quitina con KOH, convirtiéndose en una sustancia soluble en ácidos orgánicos. Le llamó quitina modificada. El quitosano es obtenido comercialmente mediante una desacetilación alcalina de la quitina (Muzzarelli, 1978). Se han propuesto muchos métodos, pero el más reportado es cuando la quitina es sometida a la acción del NaOH al 50% a temperatura de ebullición y por un período de 3 horas. La calidad del quitosano es determinada por las condiciones de desacetilación empleadas (Muzzarelli, 1978; Wu y Bough 1978).

2.2.2 Estructura y propiedades

Químicamente, la quitina es un polímero formado por unidades $\beta(1,4)$ -2-acetamido-2-deoxi-D-glucosa (o N-acetilglucosamina). La estructura es muy similar a la de la celulosa, excepto que los grupos hidroxilos del C2 han sido reemplazados por los grupos acetamido (No y Meyers, 1995). En la figura 1 se presenta las estructuras de la quitina, quitosano y celulosa.

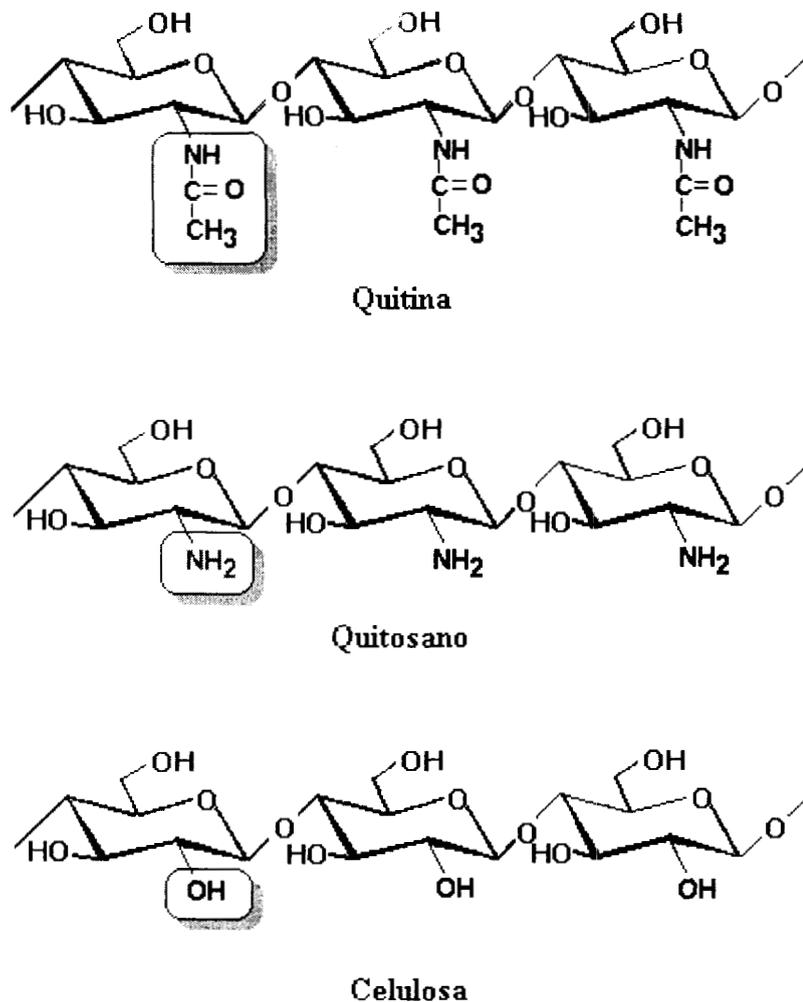


Figura 1. Estructuras químicas de la quitina, quitosano y celulosa.

La quitina se presenta en tres formas polimórficas: alfa, beta y gama, que difieren en el arreglo de las cadenas moleculares. La alfa quitina presenta cadenas no paralelas y es la más compacta y cristalina. La beta presenta cadenas paralelas y es la más vulnerable. La gama quitina presenta dos cadenas arriba y una abajo siendo la menos abundante. La explicación en cuanto a la cristalinidad y tratamiento térmico, se debe a los puentes de hidrógeno que se forman entre cadenas (Muzzarelli, 1978).

La quitina es un sólido de color blanco translúcido, prácticamente insoluble en agua, ácidos diluidos, álcalis y solventes orgánicos; los ácidos inorgánicos concentrados la degradan. La quitina y quitosano sufren degradación a altas temperaturas; no soportan temperaturas mayores a 100-120 °C. La descomposición térmica de la N-acetil-D-glucosamina, alcanza su valor máximo alrededor de los 200 °C. Las propiedades de la quitina varían con la fuente y el método de preparación (Austin *et al.*, 1981). En la tabla II se muestran algunas propiedades físico-químicas de la quitina y quitosano.

Tabla II. Propiedades físico-químicas de la quitina y quitosano

Características	Quitina	Quitosano
Composición ideal	$(C_6H_{13}O_5N)_n$	$(C_6H_{11}O_4N)_n$
Contenido de nitrógeno (%)	6-7	7-9.5
Humedad (%)	2-10	2-10
Desacetilación (%)	10	60-80
Peso molecular (daltones)	1.96×10^6	$0.7-1.5 \times 10^6$
Viscosidad (cP)	Insoluble	250-2500

Fuente: Mathur y Narang, (1990).

El quitosano es soluble en soluciones acuosas de ácidos orgánicos e inorgánicos al igual que en soluciones alcohólicas ácidas. Es insoluble en agua, soluciones alcalinas y solventes orgánicos puros. Es muy estable y poco sensible a la humedad; se descompone a temperaturas mayores de 185 °C. La viscosidad que presenta en soluciones de ácido acético es dependiente del tiempo de tratamiento para su desacetilación (Muzzarelli, 1978; Pelletier *et al.*, 1990). Las características del quitosano dependen de los grupos acetilos residuales, así como de los

reactivos, concentraciones, tiempo y temperatura empleados durante su fabricación (Bough *et al.*, 1978). En la tabla III se presentan las propiedades catiónicas del quitosano cuando se encuentra solubilizado en medio ácido diluido.

Tabla III. Propiedades catiónicas del quitosano

• Polielectrolito lineal
• Alta densidad de carga
• Excelente agente floculante
• Adherencia a superficies cargadas negativamente
• Afinidad con proteínas estructurales
• Agente quelante iónico de metales

Fuente: Sandford y Hutching, (1989)

2.2.3 Usos

2.2.3.1 Alimentos

La quitina y quitosano son agentes para tratar sistemas acuosos, esto incluye la reducción de sólidos totales, recuperación de proteínas, purificación de bebidas (agua, jugo, cerveza, vinos, etc.) y remoción de sustancias indeseables tales como metales pesados, plaguicidas, etc. (Bough y Landes, 1978; Knorr, 1984, 1991). Además de reducir la turbidez y la cuenta microbiana al ser utilizado para tratar jugo de manzana inoculado con bacterias gram positivas y negativas (Soto *et al.*, 1989; Popper y Knorr, 1990). La agencia de protección ambiental de Estados Unidos (EPA), aprobó el uso de quitosano para la purificación de agua potable hasta una concentración máxima recomendada de 10 mg/l (Knorr, 1984). En la tabla IV están las propiedades de importancia industrial de la quitina y quitosano.

Gracias a sus propiedades funcionales controlan la textura, la estabilidad, el flujo de otros ingredientes, dan volumen, controlan la viscosidad e incrementan el contenido de fibra dietética (Knorr, 1984). Dado a que la quitina y quitosano no se absorben, han sido empleados como acarreadores de enzimas, células, pigmentos, sabores y nutrimentos. También como medios de encapsulamiento que permiten la liberación controlada de ingredientes

concentrados, sabores, nutrimentos, agentes antimicrobianos y sustancias agroquímicas (Knorr, 1983; 1984). La actividad anticolesterolémica detectada en el quitosano, ha permitido su incorporación como ingrediente en algunos alimentos como galletas y pastas dietéticas. Además alarga la vida de anaquel de algunos frutos frescos, como las fresas, los pepinos, los pimientos, etc., cuando éstos son recubiertos con una película de quitosano (Hirano, 1989).

Tabla IV. Propiedades de importancia industrial de la quitina y quitosano

● Sustratos de alta abundancia
● Recursos naturales biológicamente renovables
● Biodegradables y no contaminantes al medio ambiente
● Biopolímeros (aminopolisacáridos)
● Baja toxicidad (LD ₅₀ 16 g/kg de peso en ratones)
● Biológicamente funcionales
● Aptos para la manufactura de geles, fibras, coloides, películas, etc.
● Contienen grupos amino e hidroxilo, químicamente modificables

Fuente: Hirano, (1989)

2.2.3.2 Medicina

Propiedades importantes del quitosano, como su biocompatibilidad, ausencia de toxicidad, capacidad para absorber líquidos, formación de películas y unión selectiva a ciertos lípidos como el colesterol, le han permitido tener grandes aplicaciones en el área de la medicina. Se puede mencionar su capacidad como cicatrizante, hemostático, anticolesterolémico y formador de sistemas para la liberación controlada de fármacos. También se ha utilizado en la elaboración de hilos de sutura y la fabricación de lentes de contacto (Sandford y Hutching, 1989). En Japón, se ha probado con éxito la implantación de piel artificial hecha a partir de quitosano y colágeno (Hirano, 1989). Se puede usar para producir "sucedáneos" del plasma sanguíneo evitando problemas de transmisión de enfermedades como el SIDA y hepatitis B.

2.2.3.3 Cosmetología

En esta industria, la quitina, quitosano y sus derivados, se utilizan para la elaboración de cosméticos dérmicos, capilares y pastas dentales, gracias a su biocompatibilidad y ausencia de toxicidad. El quitosano despolimerizado es utilizado como ingrediente en champúes, enjuagues y tónicos capilares; su uso es debido a que su solución acuosa es viscosa, forma películas, retiene la humedad y da suavidad al cabello (Hirano, 1989; Sandford y Hutching, 1989).

2.2.3.4 Agricultura

El quitosano tiene la aprobación de la EPA para ser usado como recubrimiento de semillas. Esta técnica permite mejorar la producción en el campo ya que incrementa su viabilidad. También ha sido aprobado como un agente floculante para recuperar residuos proteínicos en plantas elaboradoras de alimentos. Actualmente se trata de aplicar el quitosano en la elaboración de productos que permitan la liberación controlada de plaguicidas y herbicidas. El quitosano puede ser adicionado a los cultivos para estimular el crecimiento de cierto tipo de microorganismos benéficos para la agricultura (Sandford y Hutching, 1989). Además tiene efectos antimicrobianos que pueden ser empleados en el empaque de vegetales y frutas altamente perecederos para alargar su vida de anaquel (Hirano, 1989).

2.2.3.5 Biotecnología

Debido a su naturaleza no tóxica, biocompatibilidad, versatilidad y propiedades únicas, el quitosano se utiliza comercialmente para inmovilizar enzimas y células (Sandford y Hutching, 1989). Otros usos en este campo se dan en la aplicación de estos polímeros en la remoción de sustancias indeseables (células, enzimas, iones) presentes en los desechos industriales. El quitosano se usa ampliamente para recuperar biomasa y nutrimentos en la industria alimentaria que incluyen vegetales, cárnicos, camarón y leche (Knorr, 1984).

2.2.3.6 Tratamiento de aguas residuales

Esta es una de sus principales aplicaciones. El quitosano es un floculante natural que reacciona con polímeros aniónicos para formar complejos polielectrolitos que precipitan y pueden ser prensados, semihidratados y destruidos o aprovechados dependiendo del producto (Sandford y

Hutching, 1989). También ayuda a remover algunos metales como mercurio, cobre, etc., que causan daño a la agricultura (No y Meyer, 1989). El uso del quitosano para recuperar compuestos orgánicos provenientes de los residuos de la industria pesquera significa una total integración del proceso, pudiendo generar sólidos coagulados con un uso adicional como aditivos (sabores y colores) o como alimento para animales (No y Meyers, 1989).

2.2.3.7 Otros usos

El quitosano ha sido probado en otras áreas como en la industria del papel (Muzzarelli, 1978), en cromatografía (Iwata y Nakabayashi, 1974), en alimentación animal como favorecedor del crecimiento de bifidobacterias que permitan la tolerancia a la lactosa (Austin *et al.*, 1981).

2.2.4 Preparación de quitina y quitosano

Una gran diversidad de procedimientos han sido desarrollados en los últimos años para la preparación de la quitina y quitosano. Algunos de estos forman las bases de los procesos químicos industriales para la producción de quitosano a partir de desechos de crustáceos. Estos últimos como cangrejo, camarón y langosta, son las fuentes más ricas de quitina (aproximadamente 20-30 % en base seca) así como las principales fuentes disponibles para soportar la producción industrial (Johnson y Peniston, 1982). La producción anual a nivel mundial de desechos de crustáceos, en base seca, fue estimada en 1.44 millones de toneladas métricas (Knorr, 1991).

Los desechos de crustáceos consisten principalmente de proteínas (30 - 40%), carbonato de calcio (y fosfato de calcio) (30-50%), y quitina (20-30%). Estas proporciones varían con las especies y con la estación (Green y Kramer, 1984). De ahí que, el método de preparación de quitina/quitosano varíe con la composición del desecho recibido. Las características físicas y químicas de la quitina y quitosano por consiguiente pueden variar con la especie y métodos de preparación (Brine y Austin, 1981a). Estudios realizados con desechos de crustáceos demostraron claramente que las propiedades específicas de estos productos, tales como peso molecular y grado de desacetilación, varían con las diferentes condiciones de proceso tales como tipo y fuerza de las soluciones ácida y alcalina, temperatura de reacción y condiciones atmosféricas (Brine y Austin, 1981a; Wu y Bough, 1978).

2.2.4.1 Aislamiento de quitina

La obtención de la quitina a partir de los desechos de crustáceos consiste de dos pasos básicos: (1) **desproteínezación**, y (2) **desmineralización**. Estos pasos también pueden ser realizados en forma inversa. Sin embargo, si la recuperación de la proteína es el objetivo, se prefiere su extracción antes de la desmineralización para maximizar el rendimiento y la calidad de la proteína (Johnson y Peniston, 1982). Un diagrama de flujo simplificado del procesado de la quitina está representado en la figura 2.

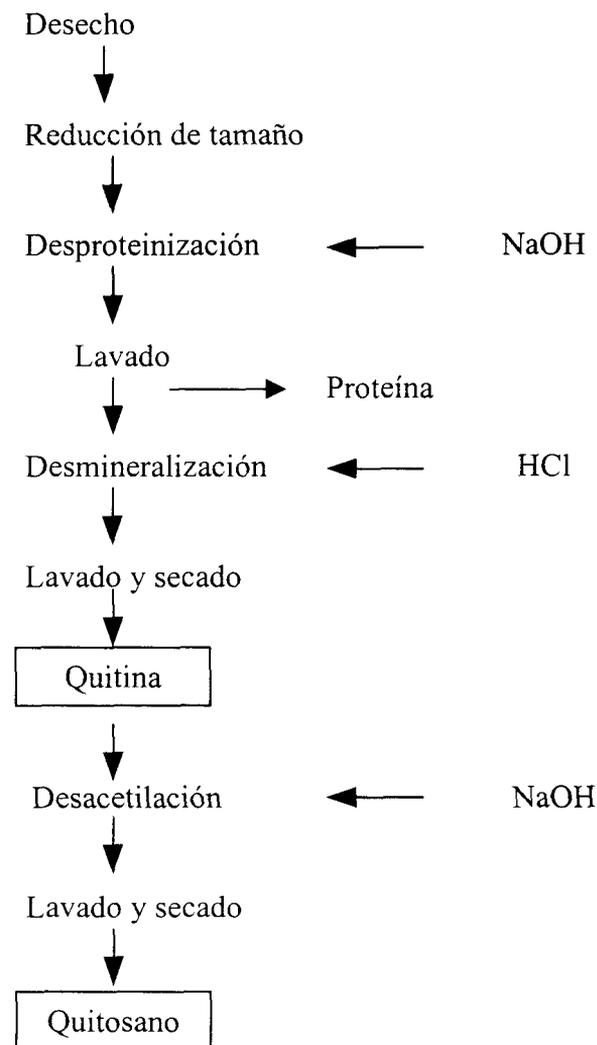


Figura 2. Diagrama para la producción de quitina y quitosano.

Desproteización

Para llevar a cabo la desproteización, el desecho usualmente es molido y tratado con una solución hidróxido de sodio diluido (1 - 10%) a temperatura elevada (65 - 100°C) para disolver la proteína presente (tabla V). Estas condiciones varían dependiendo de la especie de crustáceo, por ejemplo, Hackman (1954) extrajo proteínas de cáscara de langosta con NaOH 1N a 100°C. Anderson *et al.*, (1978) trataron krill del antártico con 3.5% NaOH a 90-95°C y Bough *et al.*, (1978) desproteizó cáscaras de camarón con 3% de NaOH a 100°C. No *et al.*, (1989) extrajeron proteínas de desechos de langostinos con 3.5% de NaOH a 65°C. Una mayor desproteización puede ser lograda variando las cantidades de álcali; como Shahidi y Synowiecki (1991) quienes utilizaron KOH al 1% para camarones y 2% KOH para cangrejos a 90°C.

Existen otros métodos como los de Whistler y BeMiller (1962) y Brzeski (1982) quienes realizan la desproteización con 10% de NaOH a temperatura ambiente, y con 3.5% de NaOH a 25°C, respectivamente. Otro ejemplo es el trabajo de Cosio *et al.*, (1982) en el cual la desproteización fue completada a pH de 11.5 y 30°C.

Los tiempos de reacción usualmente están entre los rangos de 0.5 a 12 horas dependiendo de los métodos de preparación (tabla V). Prolongados tratamientos alcalinos bajo severas condiciones pueden causar despolimerización y desacetilación. En el método de Sannan *et al.*, (1976), la desproteización fue realizada mediante tratamientos de 6 horas (tres veces), por 12 horas y una hora con NaOH 1N a 100°C que puede dar desacetilación y fragmentación de la quitina nativa. En un estudio sobre el tiempo de extracción de desecho de cangrejo (2% KOH) y camarón (1% KOH) a 90°C y una relación sólido líquido de 1:20 (p/v) Shahidi y Synowiecki (1991) encontraron que el período mínimo de una hora fue necesario para extraer más del 90% de las proteínas. Un período de 2 horas fue requerido para remover el total de las proteínas presentes en el caparazón. Estos autores también observaron que un aumento en la relación peso del desecho por solución de KOH arriba de 1:4 (p/v), tiene sólo un menor efecto sobre la eficiencia de la desproteización de los desechos. Sin embargo, relativamente altas relaciones

de sólidos-líquido (álcali), 1:10 o más, fueron usadas usualmente para obtener uniformidad en la reacción con agitación apropiada.

Tabla V. Condiciones usadas para la desproteinización en la preparación de quitina.

Desproteinización					
Fuente	Alcali conc.		Temperatura (°C)	Tiempo (hr)	Relación (p/v)
Langosta	1N	NaOH	100	12 x 5*	1:5.5
	5%	NaOH	80-85	0.5 x 2*	-
	10%	NaOH	ambiente	72 ^a	-
	10%	NaOH	100	2.5	1:50
Krill	3.5%	NaOH	90-95	2	1:10
	3.5%	NaOH	25	2	-
	3.0%	KOH	95	2	1:10
Camarón	3%	NaOH	100	1	-
	1%	NaOH	65	1	1:10
	1%	KOH	90	2	1:20
	4%	NaOH	100	1	-
	pH 11.5		30	1	1:30
Cangrejo	1N	NaOH	80	3 x 2*	-
	2%	KOH	90	2	1:20
	1N	NaOH	50	6	-
	5%	NaOH	90	2	-
Camarón	5%	NaOH	Reflujo	2	1:15-20
	5%	NaOH	100	0.5	1:1
	0.5%	NaOH	100	0.5	2:3
Calamar	1N	NaOH	100	10-12	-
	2M	NaOH	Ambiente	T. noche	1:10
	2M	NaOH	100	4**	1:10

* tiempo de repetición del tratamiento alcalino

**Segunda extracción

^a Solución fresca de NaOH fue usada para remojar cada día

^b Cuando el quitosano es producto final

Fuente: No y Meyers, (1995).

Shimahara *et al.*, (1982), Takeda y Abe (1962), y Takeda y Katsuura (1964) lograron remover las proteínas por digestión enzimática para la producción de quitina que ha sido desacetilada lo menos posible. Las enzimas comercialmente disponibles a partir de plantas y animales también han sido usadas (Muzzarelli, 1973). Por ejemplo, Bough *et al.*, (1978) extrajeron proteínas de camarón con Rhozyme-62 concentrado a 60°C por 6 horas a pH de 7. Mientras

estos tratamientos aparentemente no modifican la quitina, la remoción completa de las proteínas no fue posible. Broussignac (1968) sugiere que cuando la quitina no es el producto final deseable, sino un paso intermedio en el proceso de producción de quitosano, el tratamiento enzimático puede ser reemplazado por el tratamiento alcalino a altas temperaturas.

Cuando la recuperación de proteínas es deseable, el pH de la solución acuosa es reducida al punto isoeléctrico de la proteína para su precipitación (Green y Mattick, 1979). La proteína recuperada puede ser usada como un aditivo para alimentación de ganado, de esta manera resulta un decremento en el costo de manufacturación de quitina (Johnson y Peniston, 1982).

Desmineralización.

La desmineralización es convencionalmente realizada con ácido clorhídrico diluido (arriba del 10%) a temperatura ambiente para disolver el carbonato de calcio como cloruro de calcio (tabla VI). Entre tales métodos están los de Hackman (1954), Anderson *et al.*, (1978), Bough *et al.*, (1978), y No *et al.*, (1989).

Excepciones a estos últimos están los métodos de Horowitz *et al.*, (1957) y Synowiecki *et al.*, (1981) donde la desmineralización fue realizada con 90% de ácido fórmico y 22% de HCl, respectivamente, a temperatura ambiente. Los trabajos de Whistler y BeMiller (1962) en los cuales la desmineralización fue realizada en 37 % de HCl a - 20°C han sido citados también.

Algunos de los métodos antes mencionados, son tratamientos drásticos que pueden causar modificaciones, tales como despolimerización y desacetilación de la quitina nativa (Foster y Webber, 1961). Para evitar esto, ciertos métodos han sido desarrollados usando ácidos débiles para minimizar la degradación. De esta manera, Austin *et al.*, (1981) usaron ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) para la descalcificación, mientras Foster y Hackman (1957) emplearon EDTA tanto para descalcificación como para desproteinización de desechos de cangrejo a pH controlado. La aplicación de ácido acético para descalcificación ha sido descrita por Brine y Austin (1981a). El proceso con ácido sulfúrico ha sido estudiado por Peniston y Johnson (1978).

Tabla VI. Condiciones usadas para la desmineralización en la preparación de varias quitinas.

Desmineralización				
Fuente	HCl conc.	Temperatura (°C)	Tiempo (hr)	Relación (p/v)
Langosta	2N	ambiente	5	1:9
	2N	0	48	1:5.5
	5%	70	2 x 2*	-
	37%	-20	4	-
	90% Fórmico	ambiente	18	1:10
Krill	0.6N	ambiente	2	1:22
	3.5%	20	1.5	1:4
	22%	ambiente	2	1:10
Camarón	1 N	ambiente	0.5	3x***
	0.5 N	ambiente	-	1:11
	2.5%	20	1	1:10
	5%	ambiente	-	-
	8%	30	8	1:10
Cangrejo	1N	ambiente	12 x 2*	-
	2.5%	20	1	1:10
	1N	20	3	-
	5%	ambiente	24	-
Calamar	2N	10	12	exceso
	1M	Ambiente	T. noche	1:10

* tiempo de repetición del tratamiento alcalino

** segunda extracción

***tres veces exceso para la cantidad estequiometrica de carbonato de calcio en las cáscaras secas.

Fuente: No y Meyers, (1995).

Decoloración

Los tratamientos ácidos y alcalinos producen un producto quitinoso coloreado. Cuando el producto blanqueado es deseado, los pigmentos pueden ser removidos con reactivos (ver Tabla VII). Estos incluyen etanol y éter (Hackman, 1954), soluciones de hipoclorito de sodio frío, conteniendo 0.55 de clorina disponible (Blumberg *et al.*, 1951), acetona absoluta (Kamasastri y Prabhu, 1961; Mima *et al.*, 1983), cloroformo, (Anderson *et al.*, 1978), peróxido de hidrógeno (Brine y Austin, 1981a; Moorjani *et al.*, 1975), acetato de etilo, (Brzeski, 1982), o acetona seguida por una solución de hipoclorito de sodio (No *et al.*, 1989). Por ejemplo Hackman (1954) obtuvo una quitina de langosta color crema por lavado con etanol y éter. No *et al.*, (1989) prepararon quitina de color blanco a partir cangrejo de río por

extracción con acetona seguido por blanqueado con una solución de hipoclorito de sodio al 0.315%. El color de la quitina varía de un blanco hasta un color amarillo intenso.

Tabla VII. Condiciones usadas para la decoloración de la quitina.

Decoloración				
Fuente	Reactivo	Temperatura (°C)	Tiempo (hr)	Relación (p/v)
Langosta	Etanol + eter	Ambiente	Lavado	-
	NaOCl	Frío	-	-
	Etanol + acetona	Ambiente	Lavado	-
Krill	Cloroformo	-	-	-
	Acetato de etilo	30	30	1:4
Camarón	Acetona	-	-	-
Cangrejo	Acetona	Reflujo	-	-
	Acetona	-	-	-
	3% H ₂ O ₂	-	-	-
	H ₂ O ₂ ácido	Frío	360	1:20
Camarón	Acetona	Reflujo	45	1:15-20
	0.5% H ₂ O ₂	ambiente	T. noche	-
	NaOCl	Frío	30	-

Fuente: No y Meyers, (1995).

Efecto del tamaño de partícula y materias primas.

El efecto del tamaño de partícula sobre la desproteínización y desmineralización de la quitina ha sido investigado para comparar la eficiencia de la desproteínización. De acuerdo a Cosio *et al.*, (1982), la reducción en el tamaño de los desechos de camarón en malla 8-20 produce solamente el 65% de la desproteínización lograda en malla 20-60, mientras una reducción más grande en malla, 60-100, aumenta la desproteínización en un 13% por arriba de la lograda en la malla 20-60. Sin embargo, Blumberg *et al.*, (1951) observaron que la quitina a tres diferentes tamaños, no mostraron diferencias significativas en el contenido de nitrógeno y cenizas. Comparando la quitina de cangrejo de río con las de harinas de cangrejo, no se observaron diferencias significativas en el contenido de nitrógeno, pero sí en el contenido de cenizas, 0.1-0.2 y 0.7%, respectivamente (No *et al.*, 1989).

2.2.4.2 Caracterización de la quitina

La quitina muestra considerable variación en sus propiedades químicas y físicas debido a los diferentes métodos de preparación y de la variedad de especie. La tabla VIII resume las características de quitinas reportadas en la literatura.

Tabla VIII. Caracterización de la quitina.

Especificación	Descripción	Especificación	Descripción
Nitrógeno (%)	7.01 ^a 6.14-6.96 6.29, 6.42 6.8 6.61, 6.73 7.1 6.95 6.7-8.3 ^a	Desacetilación (%)	7.5 42-58 13-14 0.08
Grasa (%)	ND ^b 5.1 0.1-0.2	Solubilidad (%) ^c	26.4 28-99 30-92
Cenizas (%)	0.1 < 0.17 0.4 0.9, 0.10 0.0 0.17, 0.62 0.06 0.15 0.6, 4.0	Color	Blanco Blanco cremoso-Amarillo claro Extremadamente amarillo
Grado de acetilación (%) ^c	19.6 15.9-19.7 13.8-20.7 ^a	Peso molecular	0.4 x 10 ^{6d} 0.56-1.96 x 10 ^{6c} 0.4-1.8 x 10 ^{6c}

^aCalculado en base seca y libre de cenizas

^bND = no detectado

^cMedido en N, N-Dimetilacetamida contenido en 5% de LiCl (DMAc-5% LiCl)

^dMedido en ácido fórmico anhidrido.

Fuente: No y Meyers, (1995).

Contenido de nitrógeno

La quitina naturalmente se encuentra unida a proteínas. Algunas de éstas pueden ser extraídas por métodos suaves, pero una pequeña porción no es extraída con facilidad, indicando la existencia de enlaces covalentes con la quitina (Attwood y Zola, 1967). Evidencias experimentales de enlaces covalentes entre la quitina y las proteínas en caparazones de

crustáceos han sido obtenidas por diversos autores (Attwood y Zola, 1967; Austin *et al.*, 1981; Brine y Austin, 1981b; Foster y Hackman, 1957; Hackman, 1960; Herzog *et al.*, 1975; No *et al.*, 1989; Rutherford y Austin, 1978). De esta manera, se dificulta la preparación de muestras puras de quitina sin proteínas residuales.

Rutherford y Austin (1978) observaron que valores de nitrógenos más alto que el teórico de 6.9 % es indicio de desacetilación o remoción incompleta de proteína, mientras valores bajos son indicativos de deaminación hidrolítica o contaminación del producto.

Grado de acetilación

La desacetilación parcial de la quitina ocurre naturalmente o durante la preparación. Giels *et al.*, (1958) reportan que la quitina natural de langosta tiene una glucosamina residual por cada 7 grupos de N-acetilglucosamina (NAG), dando una desacetilación del 12.5%. Neville (1975) indica que el grado de desacetilación puede variar con la especie de 1 en 3 a 1 en 10 unidades de NAG.

Brine y Austin (1981a) y Rutherford y Austin (1978) reportan variaciones en el grado de acetilación (15.9-19.7% y 13.8-20.7%, respectivamente) de quitina con especies y métodos de preparación. El grado de acetilación (19.6%) de la quitina de cangrejo de río indica que ha sido parcialmente desacetilada a 7.5%, naturalmente o durante la preparación, basado en el valor teórico de acetilación para la quitina de 21.2% (No *et al.*, 1989). Valores relativamente altos de acetilación son indicativos de que fueron empleados tratamientos alcalinos suaves. Sin embargo, un alto grado de desacetilación (42-58%) en la quitina de krill fue reportado por Brzeski (1982), aunque el tratamiento alcalino fue relativamente suave.

La β -quitina aislada de la pluma de calamar es probablemente más susceptible a la desacetilación alcalina que la α -quitina. Por lo tanto, una considerable desacetilación puede llevarse a cabo si es tratada de forma similar a la α -quitina (Kurita *et al.*, 1993).

Peso molecular

Las quitinas preparadas a partir de cangrejos rojos y azules muestran variación en su peso molecular, el cual al parecer está relacionado al método de descalcificación (Brine y Austin, 1981a). La máxima depolimerización ocurre cuando el ácido clorhídrico es usado para la descalcificación, seguido por ácido acético y sulfúrico. Una mínima degradación ocurre cuando el proceso de descalcificación es realizado con EDTA. También hay variabilidad entre especies en el peso molecular de las muestras preparadas por cualquier método de descalcificación. El peso molecular promedio reporta rangos entre 0.4 a 1.96×10^6 Da (Brine y Austin, 1981a; Cho y Lee, 1980; Rutherford y Austin, 1978).

Solubilidad

La quitina es insoluble en agua, en soluciones salinas diluidas, y en la mayoría de los solventes orgánicos. Es depolimerizada por ácidos minerales fuertes, pero es parcialmente soluble en mezclas de dimetilacetamida (Dmac) y cloruro de litio (LiCl). Brine y Austin (1981a) reportan variaciones en la solubilidad (28-99%) de la quitina, la cual es relativa a la especie y a los métodos de preparación. Estos autores notaron que valores bajos de solubilidad sugieren una incompleta remoción de las proteínas, y que el peso molecular y el contenido de acetilos no son factores que determinan la solubilidad de quitina en 5% de LiCl-DMac.

Rotación óptica

Se sabe que la quitina natural contiene todas sus uniones β -glucosídicos a lo largo de la cadena del polímero (Carlstrom, 1962) y se ha demostrado que tiene una rotación óptica negativa. Brine y Austin (1981a) encontraron que todas las quitinas preparadas a partir de cangrejo, las cuales fueron sometidas a tratamientos ácidos, tenían una rotación óptica positiva, la cual cambiaba a negativa con el tiempo en una solución al 5% de LiCl-DMac. Esto indica que los cambios conformativos en la molécula ocurren durante el proceso de purificación, el cual es parcialmente menor que en la solución de LiCl-Dmac (Brine y Austin, 1981a; Rutherford y Austin, 1978). Por lo anterior es claro que la rotación óptica de la quitina es una función de los métodos de preparación así como de la especie a partir de la cual fue obtenida.

2.3 Fermentación ácido láctica

La fermentación ácido láctica es uno de los métodos de preservación de alimentos más antiguos que se han utilizado. Diversas culturas alrededor del mundo la han empleado para mejorar la calidad de almacenamiento, la palatabilidad y el valor nutritivo de alimentos perecederos tales como la leche, vegetales, carne, pescado, legumbres y cereales. Los organismos que producen este tipo de fermentación, las bacterias ácido lácticas, han tenido un importante papel en la preservación de los alimentos, previniendo su descomposición (Axelsson, 1993).

2.3.1 Bacterias ácido lácticas (BAL)

Las BAL son un grupo de organismos en forma de cocos o bacilos, Gram-positivos, no esporulados, microaerófilos, los cuales producen ácido láctico como principal producto durante la fermentación de carbohidratos (Axelsson, 1993). Están generalmente asociadas con ambientes ricos en carbohidratos, tales como diversos productos alimenticios (productos lácteos, carnes y vegetales fermentados, frutas, ensilados y bebidas) pero algunas también son miembros de la flora normal del tracto intestinal, respiratorio y genital de humanos y animales. No requieren de oxígeno para crecer, son resistentes a la inhibición por dióxido de carbono, nitritos y el humo, son capaces de crecer a concentraciones relativamente altas de sal y pueden tolerar valores de pH más bajos que las bacterias Gram-negativas (Zakaria, 1997).

2.3.1.1 Clasificación

La clasificación de las BAL se basa grandemente en la morfología, modo de fermentación de la glucosa, crecimiento a diferentes temperaturas, producción de ácidos orgánicos, etanol y CO₂, habilidad para crecer a altas concentraciones de sal y tolerancia al ácido o álcali. Las BAL comprenden los siguientes géneros (Axelsson, 1993; Zakaria, 1997): *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus sensu stricto*, *Vagococcus*, *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Aerococcus* y *Leuconostoc*.

2.3.1.2 Metabolismo de las bacterias ácido lácticas

Las BAL tienen una gran capacidad para fermentar carbohidratos por medio de diversas rutas metabólicas, principalmente para la obtención de energía, y en el proceso generar ácidos débiles como productos hacia el medio ambiente (Zakaria, 1997). Sin embargo, las BAL son capaces de adaptarse a diversas condiciones, cambiando su metabolismo y de esta manera generar diferentes productos metabólicos (Axelsson, 1993). Los niveles y proporciones relativas de estos productos, los cuales se acumulan en el medio ambiente microbiano dependen de la especie de microorganismo involucrado, la composición química del medio y de las condiciones físicas que prevalecen durante el proceso de fermentación (Lindgren y Dobrogosz, 1990).

Se pueden distinguir dos principales rutas metabólicas en las bacterias ácido lácticas. La Glucólisis (ruta metabólica de Embden-Meyerhof) resulta casi exclusivamente en la producción de ácido láctico como producto final bajo condiciones estándares, y el metabolismo es referido como fermentación homoláctica. La otra ruta principal, conocida como 6-fosfogluconato/fosfocetolasa, resulta en cantidades significantes de otros productos, tales como etanol, ácido acético y CO₂ además de ácido láctico, y el metabolismo es referido a fermentación heteroláctica (Axelsson, 1993).

En teoría, de la fermentación homoláctica de la glucosa resulta dos moles de ácido láctico y una ganancia neta de dos ATP por mol de glucosa consumido. La fermentación heteroláctica da un mol de ácido láctico, etanol y CO₂ y un mol de ATP por mol de glucosa consumido. De esta manera, la producción de dióxido de carbono es una característica típica de la BAL heterofermentativas. Otras rutas menores son también utilizadas por ciertas especies para la producción de diacetilo, acetoina y peróxido de hidrógeno (Axelsson, 1993).

2.3.2 Productos de la fermentación

2.3.2.1 Ácidos orgánicos.

El principal producto de la fermentación de las BAL es el ácido láctico, el cual es primariamente responsable de la disminución del pH. Además del ácido láctico, otros ácidos orgánicos también son formados, por ejemplo ácido acético, fórmico y succínico. Las altas

cantidades de ácidos débiles producidos reducen el pH del medio considerablemente e inhiben o reducen el crecimiento de muchas bacterias, incluyendo aquellas que causan descomposición de los alimentos y los patógenos (Mayra-Makinen y Bigret, 1993).

2.3.2.2 Peróxido de hidrógeno.

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es generado por diferentes mecanismos durante el crecimiento ciertos lactobacilos (Mayra-Makinen y Bigret, 1993). Muchos microorganismos, incluyendo a las bacterias lácticas, producen H_2O_2 como un mecanismo de protección contra los efectos tóxicos del oxígeno (Daeschel y Penner, 1992). El H_2O_2 es un efectivo agente antimicrobiano en virtud de ser un potente oxidante. Se cree que el efecto inhibitorio es debido a la formación de radicales hidroxilos los cuales son muy activos; éstos compuestos reaccionan con los componentes esenciales de la célula ocasionándole daños (Daeschel y Penner, 1992).

2.3.2.3 Diacetilo

La fermentación del citrato produce diacetilo (2,3 butadieno), el cual confiere un sabor a mantequilla en ciertos productos (Ray, 1992). Éste compuesto es grandemente conocido por su capacidad inhibitoria Jay (1996) reporta que 200 $\mu\text{g/ml}$ de diacetilo inhiben a levaduras y bacteria Gram-negativas.

2.3.2.4 Bacteriocinas.

Las bacteriocinas son proteínas producidas bacteriológicamente que tienen un efecto letal sobre otras bacterias, que a menudo están relacionadas cercanamente (Earnshaw, 1992). Se ha encontrado que las BAL producen una variedad de tales compuestos, muchos de los cuales han sido aislados y caracterizados (Vuyst y Vandamme, 1994b).

2.3.3 Condiciones para la fermentación ácido láctica.

La preservación de los alimentos en condiciones sanas y seguras por fermentación ácido láctica dependen del rápido crecimiento y de la producción de ácido por las bacterias lácticas y de la supresión de los microorganismos competidores por medio de valores de pH bajos,

ácidos orgánicos débiles y en algunos casos de otros factores antimicrobianos. La mayor influencia sobre el crecimiento de bacterias ácido lácticas, el ritmo en el cual el valor de pH de la fermentación declina, y los competidores suprimidos son: i) disponibilidad de carbohidratos fermentables; ii) disponibilidad de factores orgánicos de crecimiento; iii) anaerobiosis; iv) temperatura; v) concentración de ácidos orgánicos y valor de pH; vi) concentración de dióxido de carbono; vii) producción de otros compuestos inhibitorios; viii) capacidad amortiguadora del sustrato; ix) número inicial de bacterias ácido lácticas; y x) número inicial de microorganismos competidores. Cada uno de estos factores son discutidos a continuación:

Fuente de carbohidratos. Debido a que la carne de pescado es muy baja en carbohidratos libres, es necesario adicionarlos a fin de lograr una buena producción de ácidos.

Mientras las bacterias ácido lácticas requieren carbohidratos fermentables para ser capaces de crecer, algunas son capaces de generar energía a partir de aminoácidos tales como la L-arginina en presencia de pequeñas cantidades de glucosa.

Factores orgánicos de crecimiento. Las vitaminas, aminoácidos y otros factores orgánicos de crecimiento son requeridos para el crecimiento de las bacterias lácticas derivadas a partir de los tejidos del pescado y están aparentemente disponibles en cantidades adecuadas (Owens y Mendoza, 1985).

Condiciones anaeróbicas. La eliminación del oxígeno es un factor importante en la reducción del crecimiento de microorganismos aerobios obligados durante las etapas iniciales de la fermentación, antes de que las condiciones ácidas sean establecidas. El mantenimiento de las condiciones anaeróbicas especialmente en la superficie del producto final de la fermentación, es necesario para excluir el crecimiento de hongos y levaduras, ya que estos son capaces de tolerar las condiciones ácidas y su crecimiento puede dirigirse al agotamiento de los ácidos orgánicos y consecuentemente al aumento del pH, con serias implicaciones para el mantenimiento de la calidad y seguridad del producto (Owens y Mendoza, 1985).

Temperatura. La temperatura puede tener una considerable influencia sobre la composición de las poblaciones microbianas. Ciertamente, las altas temperaturas ambientales promueven el rápido crecimiento de todas las clases de microorganismos, incluyendo microorganismos patógenos y de descomposición, así como de las bacterias ácido lácticas.

Concentración de ácidos orgánicos y valor de pH. El crecimiento de bacterias lácticas está necesariamente acompañada por la secreción de ácido láctico y, en algunas circunstancias, de ácido acético (Kandler, 1983) y una consecuente disminución del pH en el medio. De ahí que las bacterias lácticas sean excepcionalmente tolerantes entre las bacterias a bajos valores de pH en presencia de ácidos orgánicos débiles, azúcar y ambientes ricos en nutrientes. La toxicidad de los ácidos débiles está relacionada con la concentración de moléculas del ácido no disociado, la cual es una función de la concentración total del ácido, su pKa y el valor de pH del sistema. Para una efectiva inhibición de las bacterias patógenas y de descomposición, es importante que el valor de pH en la fermentación disminuya tan rápido como sea posible a niveles en los cuales una proporción significativa del ácido esté presente en forma no disociada. Como el ácido láctico tiene un pKa de 3.87, la inhibición será importantes a valores de pH por debajo de 4.9 (Owens y Mendoza, 1985).

Concentración de dióxido de carbono. Se ha sugerido que la tolerancia a altas concentraciones de dióxido de carbono es un factor decisivo para la proliferación de las bacterias lácticas. La mayoría de las otras bacterias son sustancialmente menos tolerantes. De esta manera la producción temprana de dióxido de carbono en la fermentación puede ser un factor en la rápida supresión de las bacterias patógenas y de descomposición (Owens y Mendoza, 1985).

Producción de otros compuestos inhibitorios. Algunas bacterias lácticas producen compuestos al mismo tiempo que el ácido láctico, acético y dióxido de carbono, que son antagónicos hacia los organismos competidores. Mientras el papel de algunos metabolitos tales como la nisina, en la ecología de los microorganismos, está relativamente bien establecido (Hurst, 1981), la significancia de muchos otros compuestos producidos por diversas bacterias lácticas es mucho menos claro. Sin embargo, es posible que algunos de

estos compuestos puedan ser importantes para restringir algunos competidores bajo ciertas condiciones.

Capacidad amortiguadora del sustrato. La conservación de alimentos por fermentación láctica depende del rápido establecimiento de las condiciones ácidas de tal manera que los organismos de descomposición no tengan tiempo de crecer significativamente (Owens y Mendoza, 1985).

Los alimentos con baja capacidad amortiguadora, tales como la mayoría de los vegetales, tendrán valores de pH bajos más rápidamente por una cantidad relativamente pequeña de crecimiento y producción de ácido. Los alimentos proteicos, con mucho más capacidad amortiguadora, requerirán mucho más cantidad de crecimiento y producción de ácido para presentar la misma caída en el valor de pH.

Número inicial de bacterias lácticas. Las fermentaciones tradicionales dependen de los microorganismos que se encuentran naturalmente en el sustrato o en el equipo de preparación como una fuente de inóculo, seguido por la provisión de condiciones adecuadas para la proliferación del tipo deseado. La inoculación de un gran número del tipo deseado de bacterias lácticas y de la fuente de carbono asegurará una rápida acidificación (Owens y Mendoza, 1985).

Número inicial de microorganismo competidores. Entre más grande sea el número inicial de microorganismos de descomposición o patógenos, más grande será la probabilidad de que causen cambios indeseables o se produzcan poblaciones toxigénicas antes de que su multiplicación sea suprimida por las bacterias lácticas (Owens y Mendoza, 1985).

2.4 Ensilado de pescado

2.4.1 Definición

El ensilado de pescado es el producto líquido formado del pescado entero o partes de éste, preservado en condiciones ácidas, por la acción de enzimas proteolíticas presentes en él (Hall, *et al.*, 1985).

Son reconocidos dos tipos de ensilados, definido por el método de acidificación. El ensilado fermentado es preservado por ácido láctico, producido *in situ* por bacterias ácido lácticas a partir de una fuente de carbohidratos tales como la malta, cereales, melaza o tapioca. Las bacterias pueden encontrarse naturalmente en el pescado o en la fuente de carbono, pero los mejores resultados son logrados con un cultivo iniciador. La producción de ácido láctico debe de reducir el pH de la mezcla alrededor de 4.5 y éste, en conjunto con los antibióticos producidos por ciertas bacterias lácticas previenen el crecimiento de organismos de descomposición (Hall, 1983).

El otro tipo, comprende los ensilados ácidos, en los que el pescado es preservado por la adición de ácidos orgánicos y/o inorgánicos, los cuales bajan el pH suficientemente para prevenir el crecimiento de organismos de descomposición. Los ácidos clorhídrico, sulfúrico, fórmico y propiónico han sido usados, ya sea por separado o en combinación.

Cualquiera que sea el método de producción los principios son los mismos: el pescado es molido o picado, los carbohidratos/iniciador o ácido son adicionados y mezclados totalmente, permitiendo que ocurra la auto digestión (conocida como autólisis). Ambos tipos de ensilados pueden ser incluidos en las dietas de animales ya sea en estado húmedo o seco (Hall, 1983).

2.4.2 Historia

El término ensilado es comúnmente aplicado a la preservación de los forrajes verdes por medio de ácidos. La técnica concerniente fue desarrollada hace 60 años por Virtanen quien usó una mezcla de ácido clorhídrico y sulfúrico. El método fue extendido a pescado y Edin (1940)

desarrolló una fórmula para calcular la cantidad de ácidos requeridos en base al contenido de cenizas y proteínas de la materia prima (Gildberg y Raa, 1977).

2.4.3 El proceso bioquímico

2.4.3.1 El papel del ácido

La función principal del ácido es la de preservar la materia prima de bacterias de descomposición y patógenos, mientras la autólisis se lleva a cabo. Debido a que el ensilado es incluido en la alimentación animal, es de vital importancia la supresión de patógenos tales como los géneros *Salmonella* y *Clostridium*.

El efecto bacteriostático de los ácidos inorgánicos es debido a la reducción del pH y es necesario un pH de 2 para una adecuada protección (Edin, 1940). Aunque los ácidos inorgánicos son baratos y ampliamente disponibles, son corrosivos. También el contenido de cenizas y proteínas del pescado tiene un efecto amortiguador, el cual aumenta la cantidad de ácido requerido para lograr valores de pH bajos. La neutralización del ensilado es necesaria antes de su uso como alimento y esto es complicado y nutricionalmente indeseable.

Los ácidos orgánicos, propiónico y fórmico, tienen un efecto dual por su habilidad para disminuir el pH y su efecto antibacteriano. Los ácidos orgánicos sin disociar pueden pasar a través de la membrana mientras los iones hidrógeno no. Una vez dentro de la célula, la cual puede mantener un pH neutro incluso en condiciones ácidas, el ácido disociado reduce el pH y se acumulan aniones específicos del ácido. Ambas condiciones cuentan para el efecto antibacteriano de los ácidos orgánicos. El ion acetato puede ser metabolizado por la célula, por lo que tiene una pobre acción antibacterial comparado con el ácido fórmico y propiónico (Gildberg y Raa, 1982).

El efecto antibacteriano de un ácido orgánico debe ser esperado en aumento a medida que el pH cae por debajo del pKa del ácido, ya que por debajo de estos valores más del 50% de las moléculas del ácido están en forma no disociada. De esta manera, el ácido propiónico (pKa 4.86) formará ensilados más estables a valores de pH más altos que el ácido fórmico (pKa 3.75).

Los ácidos orgánicos tienen la ventaja de preservar el ensilado a valores de pH más altos que los inorgánicos y no requieren ser neutralizados, pero son más caros y tan corrosivos como los inorgánicos.

La combinación de ácidos orgánicos e inorgánicos puede reducir el costo si el ácido inorgánico es usado para reducir el pH a tal punto que el ácido orgánico este en su forma no disociada.

2.4.3.2 Proteolisis

El proceso característico de ensilaje es la digestión misma (autolisis) del pescado por las enzimas proteolíticas que se encuentran naturalmente en él. La actividad proteolítica deriva de la cabeza y de las vísceras, y esta naturaleza enzimática es demostrada por el hecho de que al cocer una mezcla de pescado preservada en ácido ésta no se licúa (Backhoff, 1976). Como con todos los procesos enzimáticos, el pH, la temperatura y las condiciones fisiológicas afectan la actividad proteolítica de las enzimas. La materia prima debe de mantenerse en refrigeración y físicamente intacta hasta antes de la preparación del ensilado, para evitar la inactivación de las enzimas. La congelación aparentemente no afecta el grado de licuefacción logrado (Gildberg y Raa, 1977).

El principal resultado de la autolisis es el aumento de la licuefacción del ensilado, fácilmente medible por la caída en la viscosidad (Tatterson y Windsor, 1974) o por incremento en la fase acuosa en comparación con la fase sólida después de la centrifugación (Backhoff, 1976). Un análisis de las fases producidas por centrifugación revelan la naturaleza de los productos de autolisis. El ensilado típicamente produce una capa de lípidos, una fase acuosa libre de lípidos y rica en proteínas, y una fase sólida o sedimento, compuesto de la proteína sin digerir y la mayoría de los lípidos de la materia prima (Gildberg y Raa, 1977).

La composición de la materia prima es importante, debido a que el ensilado hecho a partir de las vísceras se licúa más fácilmente que el ensilado hecho con todo el pescado, mientras que

este último se licúa más fácilmente si hay una alta cantidad de carne con relación al esqueleto. La concentración y naturaleza de las proteasas afectará el grado de proteolisis logrado.

2.5 Fermentación ácido láctica de desechos de camarón.

Los desechos de crustáceos están compuestos principalmente por las cabezas y las tenazas, las cuales son ricas en quitina y proteínas, además de contener una cantidad considerable de CaCO_3 . Las cabezas contienen muchas enzimas, las cuales son útiles si el desecho es mantenido en buen estado de preservación. Usualmente estos desechos son descartados o convertidos en harinas y usados en la elaboración de dietas para ganado y acuicultura (Meyers y Benjamin, 1987).

La adopción de la fermentación ácido láctica para la purificación de la quitina es un ejemplo único de la aplicación de éste proceso. Esto es debido a que la producción de ácido tiene un doble efecto sobre el sustrato: el de conservar el desecho por la disminución del pH, y el de disolver el carbonato de calcio, de esta manera se logra un cierto grado de purificación de la quitina. Las condiciones ácidas también promueven la degradación del material proteínico del desecho por las enzimas nativas, formando un licor rico en proteínas (Hall y De Silva, 1994). La remoción de proteína y minerales representan los dos principales procesos involucrados en la purificación tradicional de la quitina a nivel industrial (Simpson *et al.*, 1994). Estos procesos utilizan grandes cantidades de ácido y de álcali, los cuales son descartados como efluentes del proceso. Es de imaginarse que con el uso de la fermentación láctica es posible reducir el uso de grandes cantidades de químicos corrosivos, además se pueden recuperar bioproductos como proteínas y pigmentos.

2.6 Fermentación en medio sólido.

2.6.1 Definición.

La fermentación en medio sólido (FMS) es definida como el crecimiento de microorganismos en materiales sólidos en ausencia de agua libre, simulando las reacciones de fermentación que se llevan a cabo en la naturaleza (Lonsane *et al.*, 1985). El sustrato sin embargo puede

contener suficiente humedad para favorecer el crecimiento microbiano y la cual existe en forma absorbida dentro de la matriz sólida (Ashok, 1992).

Estos procesos fueron usados ampliamente desde tiempos ancestrales en los países de Oriente, Asia y África para la producción de alimentos fermentados, cultivos iniciadores, hongos, masas fermentadas. etc. (Lonsane *et al.*, 1992).

Los sustratos comúnmente usados en la FMS pueden ser clasificados en tres categorías (Durand *et al.*, 1996): a) **Materiales orgánicos** los cuales son polímeros insolubles o ligeramente solubles en agua. Estos incluyen plantas y productos de origen animal, con alto contenido de carbohidratos y/o proteínas (Aidoo *et al.*, 1982), pero los sustratos mayormente utilizados son principalmente de origen vegetal; b) **Materiales de origen mineral** que incluyen perlita, gránulos de arcilla, etc. En estos casos, los materiales solamente actúan como soporte, y tienen que ser alimentados con soluciones nutritivas; y c) **Materiales sintéticos** tales como espumas de poliuretano (esponjas) que actúan solamente como soporte y necesitan ser humedecidos por sustratos líquidos para permitir el crecimiento de los microorganismos.

Los desechos del camarón pueden ser empleados en la FMS como soporte para el microorganismo y actuar como fuente de nitrógeno, minerales, agua y otros nutrientes (Suresh y Chandrasekaran, 1998). Estos procesos tecnológicos son de bajo costo, particularmente adecuado para las necesidades de países en desarrollo (Tengerdy, 1992).

2.6.2 Ventaja e inconvenientes de la FMS

La comparación entre los cultivos sólidos y sumergidos a sido a menudo tema de discusión por muchos autores (Hesseltine, 1977; Lonsane *et al.*, 1985):

Ventajas:

- Simplicidad del medio de cultivo, con frecuencia sólo basta agregar agua.
- Disminución de contaminaciones debido a la baja humedad del cultivo.
- Disminución de los efluentes líquidos a tratar.
- Condiciones de cultivo de la FMS próximas de aquellas de los medios naturales.
- Para las fermentaciones tradicionales la microflora del soporte sirve de inóculo.

- Facilidad de aireación debido a la porosidad del material.
- Utilización directa de los sólidos fermentados.
- Menor volumen de fermentado que en cultivo líquido, por unidad de sustrato.

Inconvenientes:

- El principal inconveniente es el riesgo de una elevación excesiva de la temperatura.
- Dificultad de regulación de los parámetros de cultivo.
- Pretratamiento de las materias primas y soportes.
- Problema de pérdida de humedad para las fermentaciones de larga duración.
- Necesidad de inoculación cuando no se utiliza la microflora natural.
- Manejo de materiales heterogéneos.

2.6.3 Aplicaciones de la FMS

La diversidad de aplicaciones industriales de la FMS se encuentra en las siguientes áreas: alimentos fermentados, producción de enzimas, metabolitos secundarios, ácidos orgánicos, producción de alcohol, producción de esporas, composteo, ensilado, etc.

2.6.4 Fundamentos de escalamiento en FMS

Todo proceso empieza con la investigación en el laboratorio, y si esta es exitosa, termina en la planta de producción. En este proceso se presentaran diversas dificultades que deben resolverse si se desea que la extrapolación sea exitosa.

El desarrollo de procesos modernos de fermentación involucra varias etapas: a) aislamiento, escrutinio y selección del microorganismo apropiado; b) optimización de parámetros fisicoquímicos y nutricionales, así como la estandarización de las operaciones unitarias de proceso a escala laboratorio; c) estudios de escalamiento y, si es necesario, el diseño, proyección y establecimiento de la planta piloto; d) generación de datos de ingeniería y diseño; e) construcción y resolución de problemas en la operación de la planta. Por lo tanto el escalamiento es el eslabón en la transferencia del proceso a escala laboratorio y la producción a escala comercial (Lonsane *et al.*, 1992).

El escalamiento se define como el conjunto de técnicas que conducen a predecir, con un riesgo mínimo, las condiciones bajo las cuales debe de operar un equipo a cualquier otra escala, mayor o menor, con base a resultados experimentales en la escala disponible.

Con frecuencia el escalamiento se confunde con el simple cambio del laboratorio a una escala de operación mayor. En ocasiones los resultados obtenidos son iguales y hasta incluso mejores en la planta piloto que en el laboratorio. Sin embargo la ausencia de criterios científicos limita considerablemente el cambio a otra escala y no permite ir a niveles de operación mayores (scale up) ni regresar a niveles menores (scale down).

El objetivo final del escalamiento es el de reproducir los resultados experimentales de la escala disponible en la escala que se pretende, respetando un factor de escala, un principio inviolable de similitud y con base a un criterio idéntico en las dos escalas.

El escalamiento es importante tanto en la transferencia de resultados en las diferentes etapas como en el diseño de fermentadores.

2.6.5 Tipos de reactores utilizados en FMS llevados a escala importante.

A fin de definir el equipo a utilizar, la naturaleza de la matriz sólida utilizada no debe de ser considerada solamente en términos de fuente de nutrientes para el microorganismo, sino también como parámetros físicos: configuración geométrica de la matriz sólida, granulometría, porosidad, capacidad de retención de agua, resistencia a la compresión y agitación (Durand *et al.*, 1996). Por lo tanto, la elección del reactor depende del tipo de microorganismo involucrado, la estructura de la matriz usada, las condiciones ambientales para el proceso y el tipo de uso que se le dará (investigación, aplicaciones industriales, etc.)

2.6.5.1 Prototipos a nivel laboratorio

Tal como en la fermentación sumergida, el diseño de reactores es un factor importante el cual determina la eficiencia del proceso de FMS. Aunque ha sido reportada una gran mecanización y automatización (principalmente en Japón) muy poca información esta disponible en la

literatura (Lonsane *et al.*, 1985) y, desafortunadamente, el diseño de reactores para FMS ha sido, a la fecha, enteramente empírico (Cannel y Moo-Young, 1980).

Existe un amplio rango de variaciones individuales en el diseño de reactores los cuales han sido usados tanto a nivel laboratorio como a escala industrial. La gran mayoría de estos reactores no pueden realmente funcionar en condiciones asépticas, las cuales restringen las áreas de aplicaciones comparadas con los reactores de fermentación sumergida. Entre los diferentes reactores descritos, se pueden distinguir tres grupos básicos, basados en el régimen de mezclado y el modo de aireación usado: i) biorreactores de charolas, ii) biorreactores de tambor y iii) biorreactores de lecho empacado o columna (Cannel y Moo-Young, 1980; Aidoo *et al.*, 1982).

i) El primer tipo se trata de los fermentadores de charolas (Ghildyal *et al.*, 1981) de contención de bolsas usando una película microporosa. Todos estos reactores son muy simples, sin aireación forzada y usualmente sin mezclado. Solamente una delgada capa de sustrato sólido puede ser usada para evitar sobrecalentamiento y para mantener las condiciones aeróbicas. Las charolas son colocadas en un cuarto con temperatura y humedad relativa controlada (Pandey, 1991). En la industria, el más representativo es el reactor tipo koji, como se muestra en la figura 3.

ii) El segundo tipo es representado por los reactores de tambor los cuales difieren por los medios usados para el movimiento del medio sólido. Esencialmente se encuentran dos modelos:

Reactores rotatorios. Este tipo, es mostrado en la figura 4, están basados en el uso de un contenedor en forma de tambor con diferentes variantes como botellas Rollacell (Silman, 1980), aparatos rotatorios con o sin deflectores, paletas en los lados, mezcladoras de cemento (Kargi y Curme, 1985; Helsseltine, 1977).

El reactor es inmóvil y diferentes dispositivos de agitación aseguran el mezclado del medio sólido (figura 5). El sistema de agitación puede ser por tornillos (Durand y Chereau, 1988), rastrillos en el caso de utilizar amasadoras de panadería, barrenos (Durand *et al.*, 1996).

Para todos estos reactores, la agitación y rotación puede ser ocasional o continua, dependiendo del modo de aireación y la altura de la capa de cultivo. Usualmente, el control de la temperatura es difícil y es necesario un mezclado continuo, lo cual puede causar daño al microorganismo o a la estructura del sustrato (Pandey, 1991).

iii) El último tipo es el biorreactor de columna empacada con aireación forzada a través de la capa de cultivo. Muchas variaciones de éste diseño son posibles. Para uso de laboratorio, éstos reactores (figura 6) son típicamente columnas cilíndricas de vidrio o plástico (Raimbault y Alazard, 1980). La regulación de la temperatura es realizada por el uso de chaquetas con agua o por la colocación de las columnas en baños de agua (Saucedo-Castañeda *et al.*, 1990). Estas pueden ser ventajosas para unos estudios como selección de sepas, pero rápidamente son inadecuados cuando el control y regulación de algunos parámetros necesitan ser investigados y para estudios de escalamiento (Lonsane *et al.*, 1992).

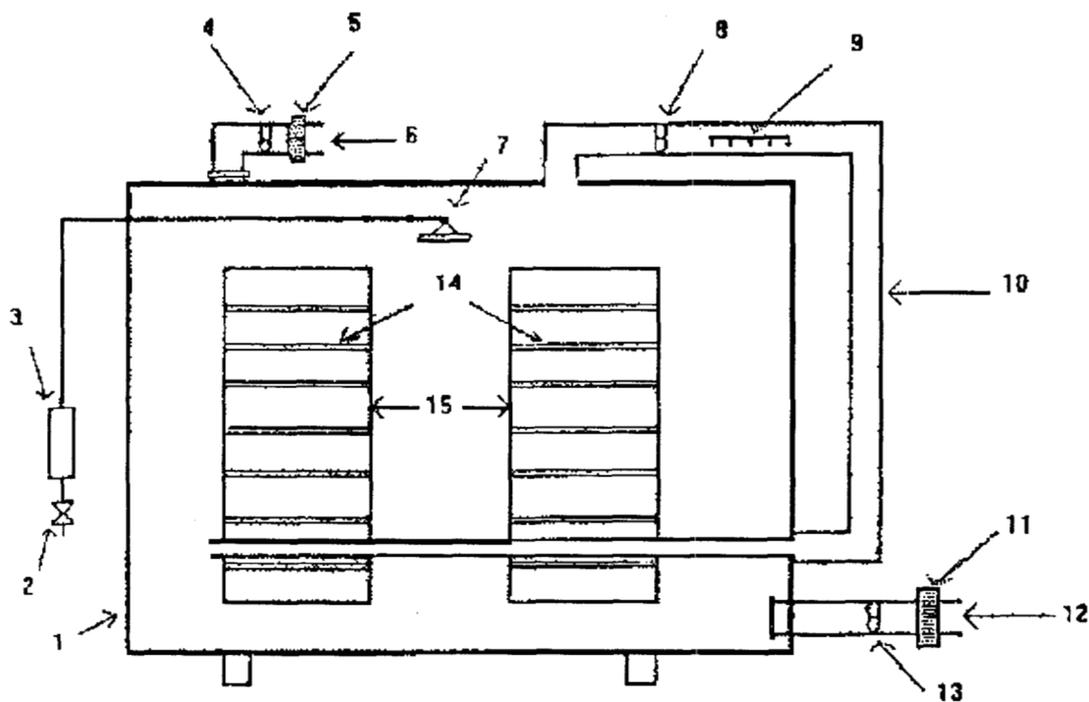


Figura 3. Reactor tipo koji. (1) Cámara Koji, (2) Válvula de agua, (3) tubo UV, (5) filtro, (6) salida de aire, (7) humidificador, (9) calentador de aire, (10) recirculación de aire, (11) filtro de aire, (12) entrada de aire, (4, 8, 13) ventilador de aire, (14) charolas, (15) sujetador de charolas. Fuente: Durand *et al.*, (1996).

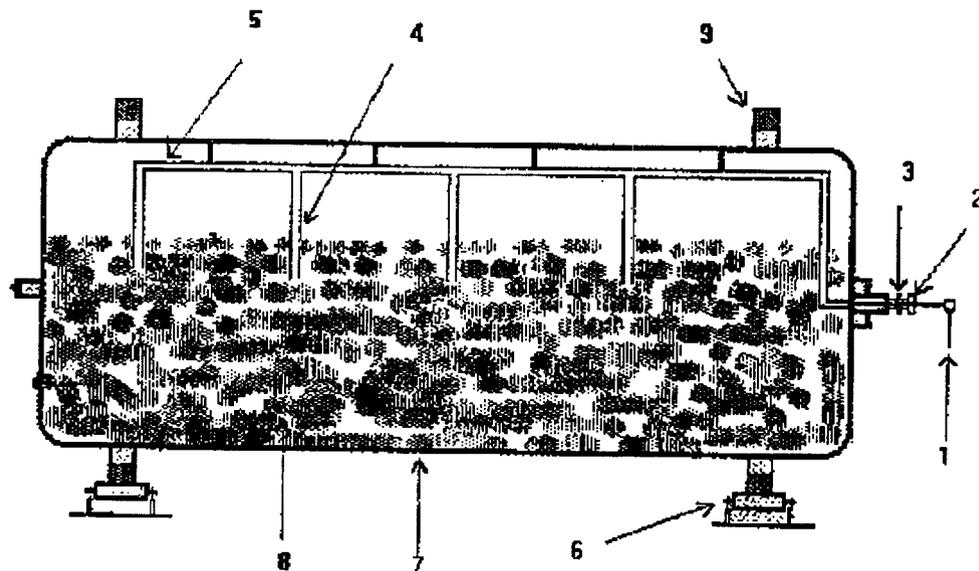


Figura 4. Reactor de tambor rotatorio. (1) entrada de aire, (2) unión rotatoria, (3) acoplador, (4) boquillas de aire, (5) línea de aire, (6) rodillos, (7) tambor rotatorio, (8) medio sólido, (9) anillo. Fuente: Durand *et al.*, (1996).

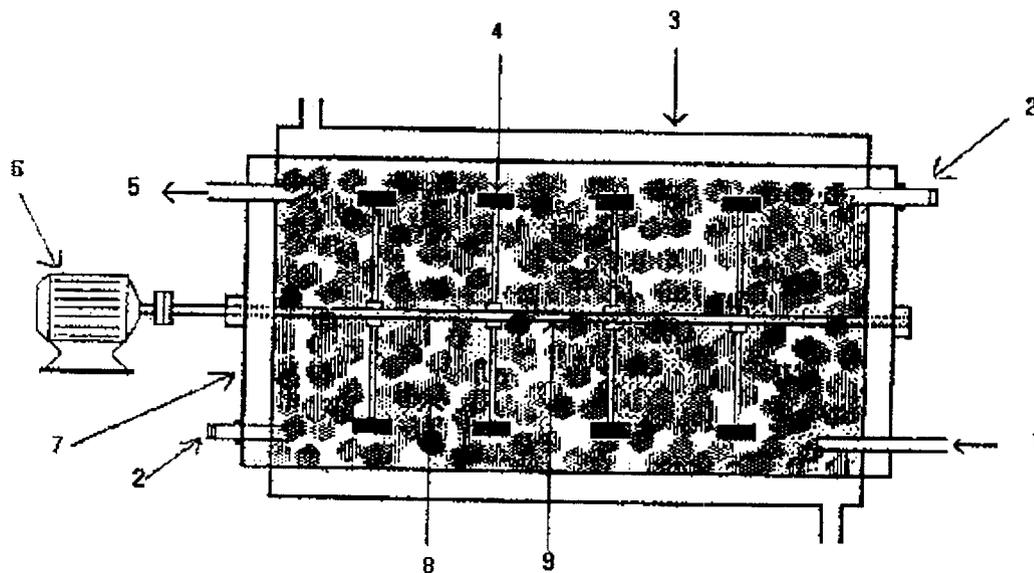


Figura 5. Reactor de agitación horizontal. (1) entrada de aire, (2) sondas, (3) chaqueta de agua, (4) paletas, (5) salida de aire, (6) motor de agitación, (7) reactor, (8) medio sólido, (9) flecha de agitación. Fuente: Durand *et al.*, (1996).

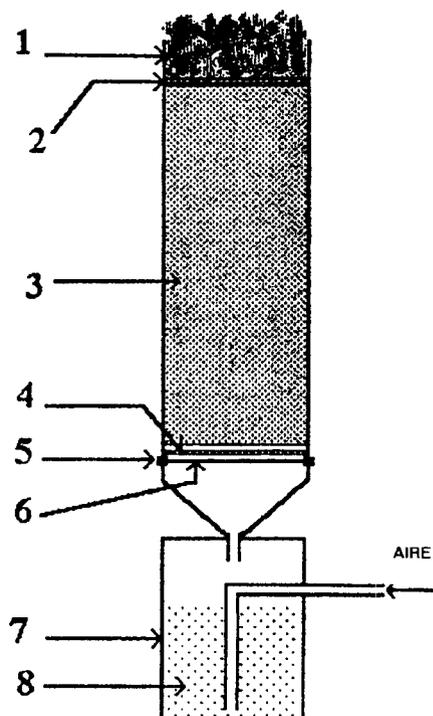


Figura 6. Reactor de columna. (1) algodón de lana, (2) disco de papel filtro, (3) medio sólido, (4) fibra de vidrio, (5) abrazadera, (6) malla de acero inoxidable, (7) humidificador, (8) agua. Fuente: Durand *et al.*, (1996).

III. Justificación

La producción de crustáceos, apoyada fuertemente por el crecimiento de la acuicultura, es cada vez mayor en países en desarrollo. Sin embargo, en la actualidad no se aplica un manejo efectivo de los desechos sólidos que genera esta industria, calculados en alrededor del 50% de la producción. La descarga de estos desechos a las zonas aledañas a las granjas de cultivo y en altamar representan un serio problema por su potencial contaminante. En contraste, estos desechos pueden considerarse como materia prima para la obtención de productos comerciales de alto valor agregado, tales como: quitina, quitosano, pigmentos y proteínas. Algunos de estos productos pueden alcanzar altos precios en el mercado, como es el quitosano. Estos materiales, en especial el quitosano, ha despertado un gran interés por sus aplicaciones potenciales en áreas muy diversas, como en el campo de tratamiento de aguas residuales, en biotecnología y biomedicina.

Comercialmente, los desechos de crustáceos son usados esencialmente para la extracción y aislamiento de quitina y su derivado el quitosano, por el tratamiento tradicional ácido-alcalino. Este procedimiento no sólo requiere disponer de altas concentraciones de químicos (ácidos y álcalis), sino también un alto consumo de energía (temperatura de 90°C) para la etapa de desproteínización. Aparte de las desventajas ambientales y económicas del tratamiento tradicional, el proceso no permite la recuperación de otros productos de valor agregado, tales como proteasas y pigmentos presentes en el desecho.

Se ha propuesto a la fermentación ácido láctica (ensilado) como una alternativa para la recuperación de quitina, debido a que se puede llevar a cabo a bajos costos de inversión y en lugares en donde no se cuenta con infraestructura. Además, se le puede dar un uso integral, ya que por presentar un adecuado valor nutricional puede ser empleada para la alimentación animal, además de permitir la separación de los pigmentos (astaxantinas), y proteasas endógenas.

IV. Objetivos

Objetivo General

Establecer las condiciones de fermentación para el escalamiento de un proceso de fermentación láctica y la recuperación de quitina a partir de desechos de camarón (*Penaeus sp*).

Objetivos específicos

- Evaluar el uso del azúcar de caña, lactosa y suero de leche como posibles fuentes de carbono en la fermentación láctica.
 - Establecer las condiciones de fermentación del proceso, tales como: concentración de la fuente de carbono y nivel de inóculo.
 - Determinar el patrón fermentativo que presenta el proceso de fermentación láctica.
 - Evaluar la fermentación láctica en un reactor de columna con capacidad de dos kilogramos.
 - Establecer el tiempo de fermentación con respecto al grado de desproteínización y desmineralización del desecho de camarón.
 - Determinar el grado de desproteínización y descalcificación del desecho durante la fermentación láctica.
 - Evaluar la fermentación láctica en un reactor de columna con capacidad de 30 Kg.
 - Purificar la quitina cruda obtenida de la fermentación por medio de tratamientos químicos.
 - Determinar de la estabilidad del desecho a diferentes tiempos de fermentación.
-

V. Materiales y Métodos

La parte experimental de la investigación se dividió en dos etapas. En la primera fue seleccionada la fuente de carbono, el nivel de iniciador y determinado el patrón fermentativo. En la etapa 2 se escaló el proceso a 2 y 30 kg en un reactor de columna para fermentación sólida.

5.1 Selección de la fuente de carbono y nivel de iniciador

5.1.1 Materiales

El desecho consistió en cabezas de camarón del género *Penaeus*, adquiridas en la Central de Abastos La Viga de la Ciudad de México. Dicho desperdicio fue molido en un molino para carne marca Sanitary cedazo 1/8 plg. y almacenado bajo congelación hasta su posterior utilización (- 10°C).

5.1.2 Microorganismos

El microorganismo utilizado fue una cepa de bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus* sp. (B2) (Zakaria *et al.*, 1998) que fue aislada de camarones tropicales. Se inoculó en medio APT (Difco) e incubó durante 24 horas a 30°C hasta alcanzar una densidad óptica entre 2 y 2.4.

5.1.3 Fuente de carbono y nivel de iniciador

Se utilizaron como fuentes de carbono en la fermentación el azúcar de caña (Azúcar, México), la lactosa grado alimenticio (J.T. Baker, México) y el suero de leche en polvo con una acidez total titulable y pH antes del secado de 1.2 a 1.7 g/l y 6.4-6.3, respectivamente (KemFuds S.A. México). Las concentraciones de la fuente de carbono evaluadas fueron de 10 y 20 % (p/p) respectivamente. Los niveles de iniciador evaluados fueron de 5 y 10% (v/p) para todas las fuentes de carbono.

5.1.4 Condiciones de la fermentación.

El desecho de camarón (previamente descongelado) se mezcló con las cantidades requeridas de la fuente de carbono y nivel de iniciador. Se incubó a 30°C durante 4 días. Las muestras fueron tomadas a intervalos de 24 horas determinando pH, acidez total titulable (ATT) y ácidos orgánicos. Se realizó un análisis estadístico para determinar si hubo influencia de la concentración de la fuente de carbono y nivel de iniciador; las variables de respuesta fueron pH y ATT expresada como ácido láctico.

5.1.5 Análisis químicos.

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

El pH se determinó directamente en la muestra utilizando un potenciómetro (Conductronic pH 20) a temperatura ambiente (25°C). La ATT fue determinada por titulación potenciométrica con NaOH 0.1N hasta un pH final de 8.0 (Zakaria, 1997). Para tal efecto, las muestras fueron diluidas 1:10 (p/v) en agua destilada y agitadas con una barra magnética. Asumiendo que todo el ácido producido es láctico, entonces 1.0 ml de NaOH 0.1N es equivalente a 0.009 g de ácido láctico (90 g/mol). Por lo tanto el porcentaje de ácido es calculado como:

$$\% \text{ ATT} = \frac{(\text{Volumen del titulante})(0.009)(100)(\text{N de álcali})}{\text{Volumen de la muestra}}$$

5.1.5.2 Contenido de ácidos orgánicos por HPLC

Las muestras analizadas fueron diluidas 1:10 (p/v) con agua desionizada y centrifugadas a 4400 rpm en una centrifuga refrigerada (MP4/MPAR, Fulsom, Ca. E.U.). Posteriormente los sobrenadantes fueron filtrados en membranas Millipore con un tamaño de poro de 0.45µm. Los productos de la fermentación, ácido láctico y acético, fueron analizados por cromatografía líquida de alta resolución en un cromatógrafo Waters 600S, utilizando una columna sh1011 para azúcares a una temperatura de 50°C con una fase móvil de H₂SO₄ 0.01N, empleando un detector UV de arreglo de diodos modelo 994.

5.2 Fermentación en reactor de columna a 2Kg

El reactor de columna utilizado se muestra en la figura 7. Este reactor comprende de dos módulos construidos en acero inoxidable. El módulo superior es utilizado para la deposición del desecho a fermentar, y el de la parte inferior se utiliza para la recolección del licor producido. Así mismo posee entradas para la colocación de termopares y salidas para gas y muestreo. Las dimensiones de los reactores utilizados se muestran en la tabla IX.

Tabla IX. Dimensiones del reactor de columna.

Tipo de reactor	Dimensiones (cm)		Volumen (l)		Carga de desecho húmedo de camarón (kg)
	Longitud	Diámetro	Total	Trabajo	
Mediano	30.9	10.8	2.831	2.198	2.0
Grande	424.5	20.4	138.74	133.84	30.0

5.2.1 Preparación del inóculo.

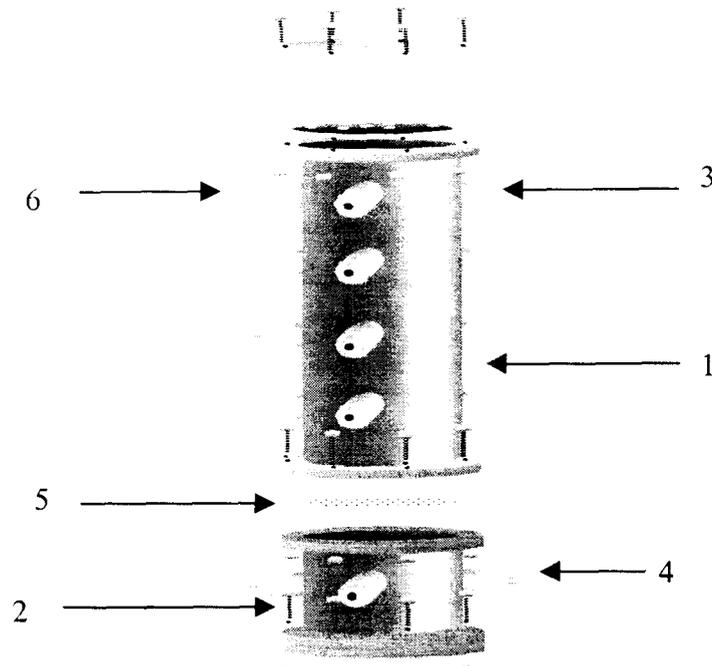
El microorganismo utilizado en todas las fermentaciones fue *Lactobacillus sp*, cepa B2. Para preparar el cultivo iniciador, una pequeña porción del microorganismo fue tomada por medio de una asa bacteriológica y se inoculó en caldo APT, incubándose a 30°C durante 24 horas.

5.2.2 Preparación del desecho de camarón

Todo el desecho utilizado se preparo como se indica en la sección 5.1.1 (pág. 38)

5.2.3 Condiciones de la fermentación

Basándose en las condiciones seleccionadas en la sección anterior, la fermentación se realizó de la siguiente manera. El desecho molido fue mezclado con 10% de azúcar de caña (p/p) y 5 % de iniciador (v/p). La mezcla semi-sólida fue transferida al reactor, el cual se colocó en un cuarto con temperatura controlada a 30°C. Fueron realizadas varias fermentaciones con el fin de determinar el tiempo al cual se obtienen los mayores porcentajes de remoción de proteínas y de calcio. Para tal efecto se tomaron tiempos al azar de 0, 2, 4, 6, 11, 21, 56 y 83 días.



225554

Figura 7. Reactor de columna para fermentación en sólido. (1) Medio sólido; (2) Medio líquido; (3) salida de gas; (4) salida de licor; (5) filtro; (6) Termopar.

Pequeñas alícuotas del licor producido durante la fermentación fueron tomadas para determinar pH y ATT inmediatamente después del muestreo. Otras muestras de licor fueron tomadas para la determinación de Ca, azúcares totales y humedad. El peso total del licor tomado durante la fermentación se tomó en cuenta para realizar un balance de masa. Al final de la fermentación el licor fue purgado del reactor y pesado. Se analizó Ca, azúcares totales y humedad. El peso total del licor fue calculado por la suma del peso del licor de las muestras más el peso final del licor en el reactor. El sedimento removido del reactor fue pesado y se le determinó nitrógeno total (NT), nitrógeno de quitina (NQ), calcio, humedad y azúcares totales.

5.2.4 Fermentación a 30 kg

Habiendo determinado el tiempo al cual se obtienen los mayores porcentajes de remoción de proteínas y calcio, se procedió a realizar una fermentación a una escala de 30 kg. La

metodología seguida fue la misma que en sección anterior. Se utilizó el mismo tipo de reactor, únicamente hubo variación en la altura y el diámetro, ver Tabla IX.

5.3 Purificación de la quitina cruda

Por medio de la fermentación ácido láctica se obtiene una quitina parcialmente purificada (“quitina cruda”), la cual debe de ser tratada por métodos convencionales para obtener un producto puro. Para esto, la quitina cruda fue tratada con diferentes concentraciones de ácido y álcali con el fin de estimar la concentración a la cual se obtiene la quitina pura.

5.3.1 Tratamiento ácido

Efecto de la concentración del HCl. La quitina cruda fue tratada con HCl a diferentes concentraciones (0.2-1M) en una proporción de 1:15 (p/v), agitándose continuamente a temperatura ambiente por 2 horas. El residuo fue filtrado, lavado con agua destilada y secado a 105°C por 4 horas antes de determinar contenido de calcio por el método descrito en la sección 5.4.1.

5.3.2 Tratamiento alcalino

Efecto de la concentración de NaOH. La quitina parcialmente purificada que se obtuvo por las condiciones óptimas del tratamiento ácido, fue tratada con NaOH a las concentraciones de 0.2, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8 y 1.0 M, en una proporción de 1:15 (p/v), las muestras fueron agitadas durante dos horas a una temperatura de 25°C. Al final del tratamiento el residuo fue filtrado, lavado y secado para posteriormente determinar nitrógeno total.

5.4 Análisis químicos de las muestras.

5.4.1 Determinación del contenido de calcio

Las muestra secas fueron carbonizadas en un mechero y colocadas en una mufla a 550°C durante 4 horas o hasta que las cenizas estuvieran totalmente blancas. Después de ser enfriadas, se humedecieron con agua desionizada y se les adicionaron 5 ml de HCl diluido (1:1 v/v). Las muestra fueron colocadas en baño de ebullición hasta sequedad, se les adicionaron 5 ml de HNO₃ y 5 ml de agua desionizada, se filtraron y diluyeron hasta un volumen de 50 ml.

Estas soluciones posteriormente fueron diluidas (1-4 ppm ca) y se les determinó absorbancia a 422 nm en una espectrofotómetro de absorción atómica.

$$\% \text{ Ca (p/p)} = \left(\frac{\text{Concentración (g/ml)}}{1000 \times 1000} \right) \times \left(\frac{50 (\text{dilución})}{\text{peso de la muestra}} \right) \times 100$$

5.4.2 Determinación de nitrógeno total (NT) por el método de Kjeldahl

El método de Kjeldahl para determinar NT involucra primero el calentamiento de la muestra con H_2SO_4 (digestión). La reacción causa que el nitrógeno sea convertido a sulfato de amonio. Este último en presencia de NaOH es convertido a amonio el cual es destilado en exceso de ácido bórico y estimado por titulación.

Digestión. La determinación del nitrógeno total en las muestras se realizó en un sistema micro Kjeldahl (Labconco, Missouri, U.S.A.). Aproximadamente 0.1 g de la muestra seca fue pesada y transferida a los matraces de digestión, se les adicionó 0.5g de una mezcla catalizadora y 5 ml de H_2SO_4 concentrado. Posteriormente se digirieron hasta que estuvieran de un color verde claro (aprox. 45 min), se dejaron enfriar y se transfirieron a la unidad de destilación.

Destilación. La muestra digerida fue colocada en la unidad de destilación (Labconco), se le adicionaron lentamente 15 ml de agua destilada y aproximadamente 20 ml de NaOH (al 40%) o hasta que la solución se tornara negra, indicativo de neutralidad. El destilado fue colectado en 10 ml de ácido bórico al 4% conteniendo rojo de metilo y verde bromocresol como indicador. El destilado fue titulado con H_2SO_4 0.1N hasta un color rosa. El blanco fue determinado siguiendo el mismo procedimiento pero sin muestra. El porcentaje de nitrógeno fue calculado como:

$$\% \text{ NT} = \frac{(0.14) (\text{ml de ácido gastado muestra} - \text{ml de ácido gastado blanco}) (100)}{\text{peso de la muestra (g)}}$$

5.4.3 Nitrógeno proteico (NP)

El porcentaje de nitrógeno proteico fue calculado restando el nitrógeno de quitina al nitrógeno total y multiplicando el nitrógeno proteico por 6.25.

5.4.4 Nitrógeno de quitina (NQ)

El nitrógeno de quitina fue determinado por el método de Kjeldahl, pero después de que la muestra fue tratada con ácido y álcali (Black y Schwartz, 1950). Se colocaron 2 g de quitina cruda en un vaso de precipitado de 250 ml y se adicionaron 50 ml de HCl 1 N calentándose en baño de ebullición durante una hora. Al final del período la muestra fue filtrada en papel Whatman No. 1 y se lavó con agua hirviendo hasta la neutralidad. Posteriormente al residuo se le adicionaron 100 ml de una solución de NaOH al 5% (p/v) y fue digerido durante una hora en baño de agua hirviendo. El residuo fue filtrado y lavado con agua hasta neutralidad y finalmente se lavó dos veces con aproximadamente 15 ml de acetona. El nitrógeno total fue determina por el método de kjeldahl, sección 5.4.2 (pág. 46)

5.4.5 Análisis elemental: Carbono, Hidrógeno y Nitrógeno

Las fracciones sólidas obtenidas de la fermentación fueron secadas a 105°C y pulverizadas en un mortero para asegurar su homogeneidad. Se analizaron muestras de entre 1.5 y 2.5 mg en un analizador elemental (Perkin Elmer II 2400, E. U.), determinando contenido de carbono, hidrógeno y nitrógeno (Robers, 1992).

5.4.6 Determinación de azúcares totales.

Los azúcares totales presentes en la muestra fueron cuantificados por el método del fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al*, 1956). Un mililitro de la solución que contiene entre 10 y 70 mg de azúcar es transferido en un tubo, y 1.0 ml de fenol al 5% es adicionado. Después de homogeneizar la muestra, son adicionados rápidamente 5 ml de H₂SO₄ al 98% y se agita vigorosamente. La solución colorida es leída a 490 nm. El color es estable por varias horas y las lecturas pueden hacerse después si es necesario. El contenido de azúcares totales fue cuantificado por interpolación en una curva estándar previamente construida para sacarosa.

5.4.7 Determinación del contenido de humedad.

El contenido de humedad fue determinado en el camarón fresco y las fracciones sólidas obtenidas de la fermentación. Se pesó de 1 a 2 g de la muestra en una cápsula de porcelana con peso constante. Las muestras fueron secadas a 105°C durante 12 horas, se dejaron enfriar para posteriormente ser pesadas. El contenido de humedad se calculó por diferencia de peso (A.O.A.C.)

5.4.8 Determinación de actividad de agua (A_w).

La actividad de agua fue determinada por la técnica de espejo frío (punto de condensación) utilizando un sistema de audición de agua Decagon CX-1 (Pullman, Washington, U.S.A).

5.4.9 Análisis estadístico

Los resultados fueron sometidos a un análisis estadístico por medio de una prueba de ANOVA, así como una comparación múltiple de medias por la prueba de Duncan para determinar si hubo o no diferencias significativas entre los tratamientos. Además se realizó un ajuste de regresión no lineal para el modelo logístico de Gompertz. Para estos análisis se utilizó el paquete estadístico STATISTICA, 1998.

VI. Resultados y Discusión

6.1 Selección de la fuente de carbono y nivel de iniciador.

Para un buen de ensilado del camarón se deben tomar en cuenta diversos factores, tales como el tipo y la cantidad de fuente de carbono, la temperatura, el pH inicial del desecho y durante la fermentación, así como el tipo de microorganismo y nivel de inoculación (Rao *et al.*, 1996). Como el desecho de camarón es pobre en carbohidratos fermentables es necesario adicionarles una fuente de energía como la glucosa, lactosa, yuca, malta, arroz o suero de leche para lograr el crecimiento de las BAL (Hall y De Silva, 1994; Shirai, 1999; Fagbenro, 1996; Van Wyk y Heydenrych, 1985). Diversos autores han reportado que la cantidad inicial del carbohidrato es un factor crítico para la fermentación ácido láctica de los desechos de camarón (Shirai *et al.*, 1996; Levin, 1994). A concentraciones más bajas del 5% el ensilado de pescado y camarón no es bien preservado, por ejemplo, a una concentración del 3.8% de la fuente de carbono se observa descomposición del pescado después de dos semanas (Van Wyk y Heydenrych, 1985). Comportamientos similares fueron observados al fermentar desechos de camarón con glucosa, incluso hasta niveles del 7.5% la fermentación no disminuyó el pH por debajo de 5.6 (Shirai, 1999). Con base a los resultados anteriores la concentración mínima empleada de fuente de carbono fue de 10% en base húmeda.

Se evaluó el azúcar de caña, la lactosa y el suero de leche como posibles fuentes de carbono en la fermentación láctica. Las concentraciones empleadas fueron 10 y 20% (p/p base húmeda), así mismo se emplearon dos niveles de inoculación con *Lactobacillus sp.* (B2): 5 y 10% (v/p base húmeda).

Se realizó un análisis estadístico utilizado al pH y el porcentaje de acidez total titulable (ATT) como variables de respuesta para la elección de la fuente de carbono y concentración de ésta, así como el nivel de inoculación. El análisis mostró que hay diferencias significativas entre las fuentes de carbono empleadas, de las cuales, la que presentó la media más alta de producción de ácido fue el azúcar de caña al 10% y un nivel de iniciador del 5%. Los resultados de la variación de pH y ATT (expresada como ácido láctico) son mostrados de la figura 8 a la 13.

En las fermentaciones con 10 y 20% (p/p) base húmeda de azúcar de caña (figuras 8 y 9), se observa que el pH disminuye considerablemente durante las primeras 24 horas, llegando a un valor mínimo a las 48 horas, para posteriormente permanecer casi constante hasta las 96 horas; conductas similares fueron reportadas por Shirai (1999), quien menciona que dicho efecto es debido a un proceso de inhibición por producto, en donde los iones hidrógeno formados por la ionización del ácido láctico provocan un descenso del pH, inhibiendo a los microorganismos fermentativos y de esta manera la acidificación es detenida. Sin embargo, una producción ligera de ácido puede continuar, de tal forma que los compuestos básicos (amonio, aminas, etc.) formados continuamente en el ensilado interactúen con los iones hidrógeno manteniendo el pH constante.

Por otra parte, la mayor acidificación fue alcanzada a las 96 horas con valores de 4.5 %, expresada como ácido láctico. Esta alta concentración de ácido es debida a la alta capacidad amortiguadora del sustrato, ya que es rico en proteínas y minerales. Por lo tanto, grandes cantidades de ácido son requeridas para disminuir el pH por debajo de 4.5 (Raa y Gilberg, 1982). No se presentaron diferencias significativas en la producción de ácido al aumentar la concentración del azúcar de caña (20%) ni el nivel de inoculación.

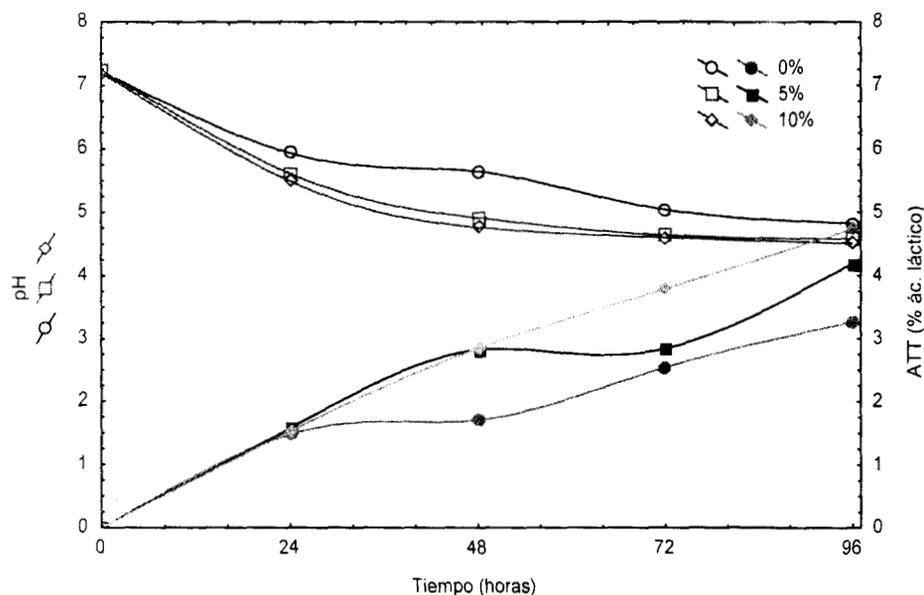


Figura 8. Evaluación de la fermentación láctica de cabezas de camarón con 10% (p/p) de azúcar de caña y diferentes concentraciones de *Lactobacillus sp.* (según leyenda)

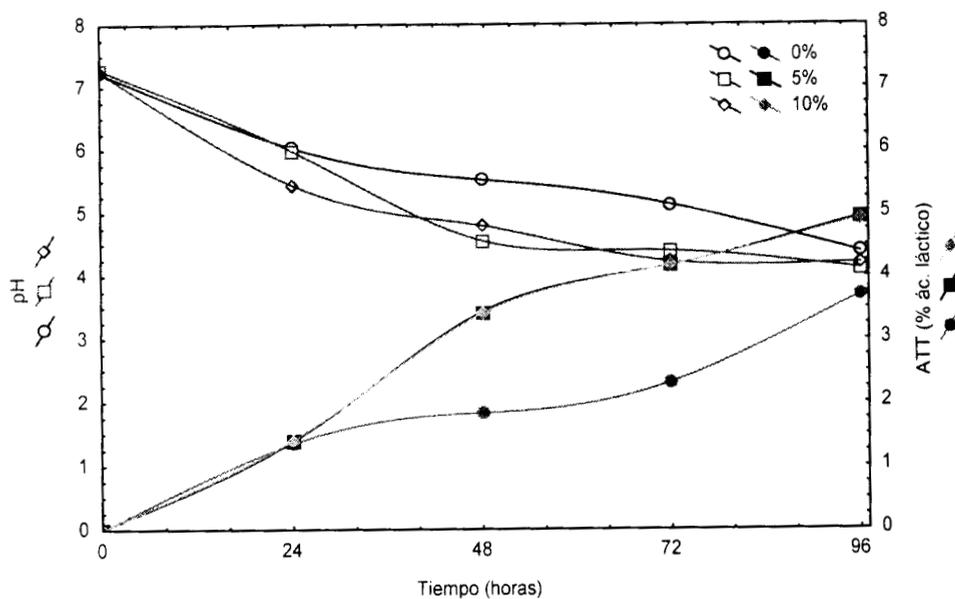


Figura 9. Evaluación de la fermentación láctica de cabezas de camarón con 20% (p/p) de azúcar de caña y diferentes concentraciones de *Lactobacillus sp.*

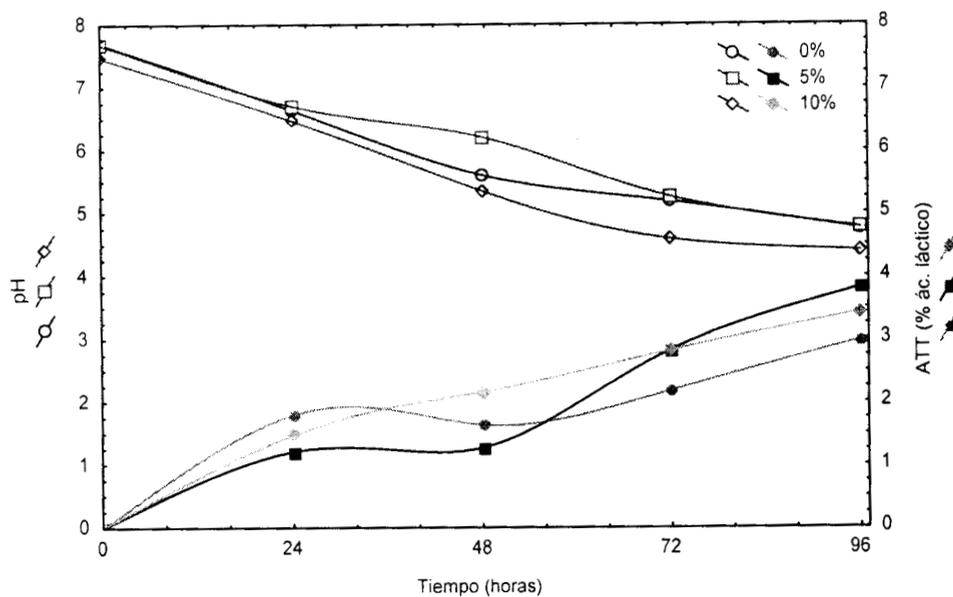


Figura 10. Evaluación de la fermentación láctica de cabezas de camarón con 10% (p/p) de lactosa y diferentes concentraciones de *Lactobacillus sp.*

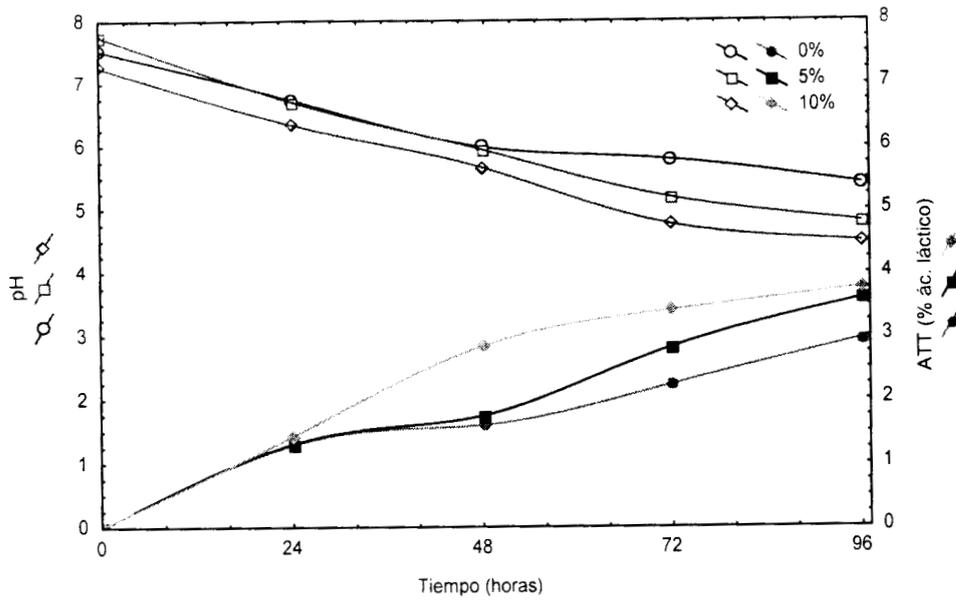


Figura 11. Evaluación de la Fermentación láctica de cabezas de camarón con 20% (p/p) de lactosa y diferentes concentraciones de *Lactobacillus sp.*

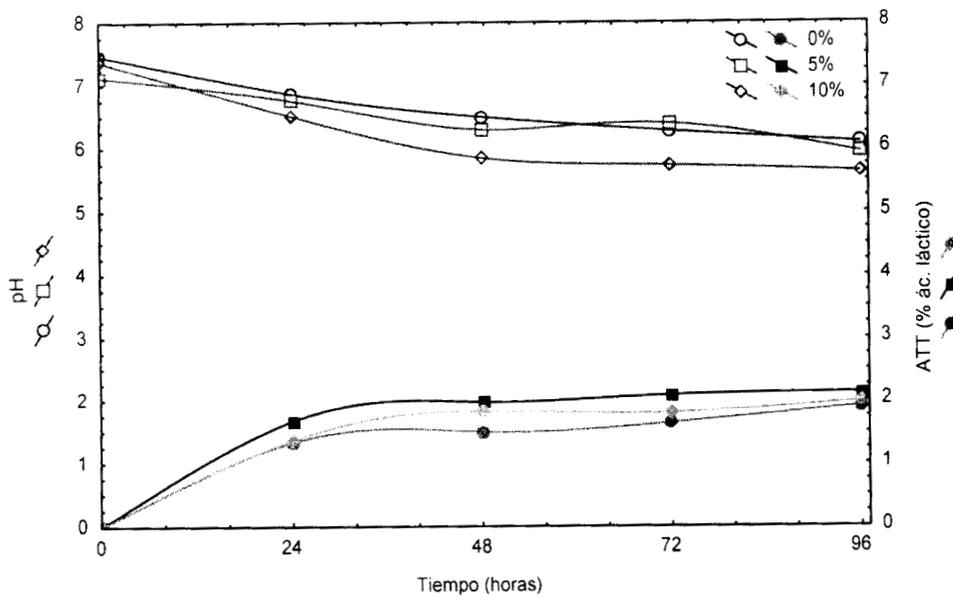


Figura 12. Evaluación de la fermentación láctica de cabezas de camarón con 10% (p/p) suero de leche y diferentes concentraciones de *Lactobacillus sp.*

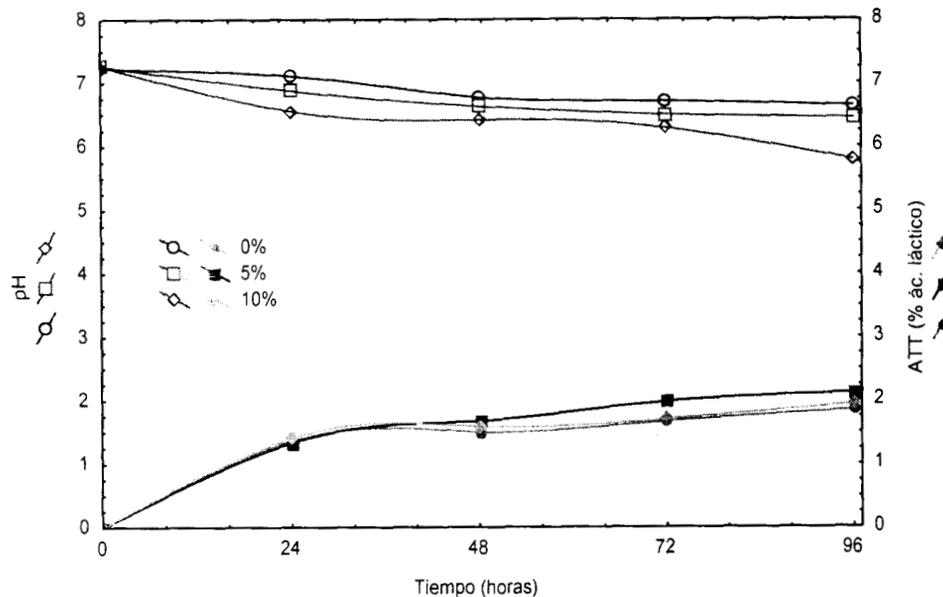


Figura 13. Evaluación de la fermentación láctica de cabezas de camarón con 20% (p/p) de suero de leche y diferentes concentraciones de *Lactobacillus sp.*

En las fermentaciones realizadas con lactosa como fuente de carbono (figuras 10 y 11) se presentó un comportamiento similar a las realizadas con azúcar de caña, sin embargo se observó una fase de retardo más larga, de ahí que la disminución del pH se llevara a cabo en mayor tiempo.

De las tres fuentes de carbono empleadas, el suero de leche fue en la que se observó una disminución de pH en mayor tiempo (figura 12 y 13), esto posiblemente es debido a que el suero de leche contenía aproximadamente 30% de proteínas dando como resultado el aumento de la capacidad amortiguadora del sustrato, y por consiguiente una mayor cantidad de ácido es requerida para lograr la disminución del pH. Por otra parte, esto no indica que sea un sustrato inadecuado para la fermentación láctica, ya que es rico en lactosa y fácilmente fermentable por las bacterias lácticas. Sin embargo su uso se ve limitado debido a que el pH disminuye

lentamente dando oportunidad a que los microorganismos de descomposición se desarrollen y ocasionen cambios aparentes en la fermentación, tales como desarrollo de compuestos responsables de mal olor (Van Wyk y Heydenrych, 1985).

Cinética de acidificación.

La simulación cinética en fermentaciones lácticas es un factor muy importante y puede ser usada como guía para un mejor control de los reactores. El modelo de Gompertz (Draper y Smith, 1981) presenta una alternativa para este análisis cuando sólo se dispone de datos de producción de ácido láctico. Esto ha sido aplicado para el modelamiento de cinéticas de acidogénesis en fermentaciones ácido lácticas utilizando estiércol de vaca como inóculo (Saucedo-Castañeda y Gómez, 1989) y en ensilados de yuca (Saucedo-Castañeda *et al* 1990; Meraz *et al.*, 1992).

Para evaluar el efecto del nivel de inoculación sobre la cinética de acidificación los datos de producto-tiempo fueron ajustados en la forma integrada del Modelo de Gompertz (Draper y Smith, 1981):

$$P = P_{max} \exp\{-b \exp(-kt)\} \quad (1)$$

Donde P es la concentración de ácido láctico, P_{max} es la máxima concentración del producto, b es una constante relacionada con las condiciones iniciales, t es el tiempo y k es la constante de acidificación. Los parámetros fueron estimados por comparación de los datos observados menos los datos calculados por el algoritmo de Marquardt, el cual minimiza la suma de cuadrados en modelos no lineales.

225554

El efecto del nivel de inoculación sobre la cinética de formación de ácido láctico es mostrado de la figura 14 a la 19, en donde se puede apreciar que en aquellas fermentaciones que fueron inoculadas con las cepas de *Lactobacillus* y realizadas con azúcar de caña y lactosa como fuente de carbono, se observa que la producción de ácido láctico aumenta rápidamente durante los dos primeros días de fermentación, no siendo así para las fermentaciones en las que se empleó suero de leche.

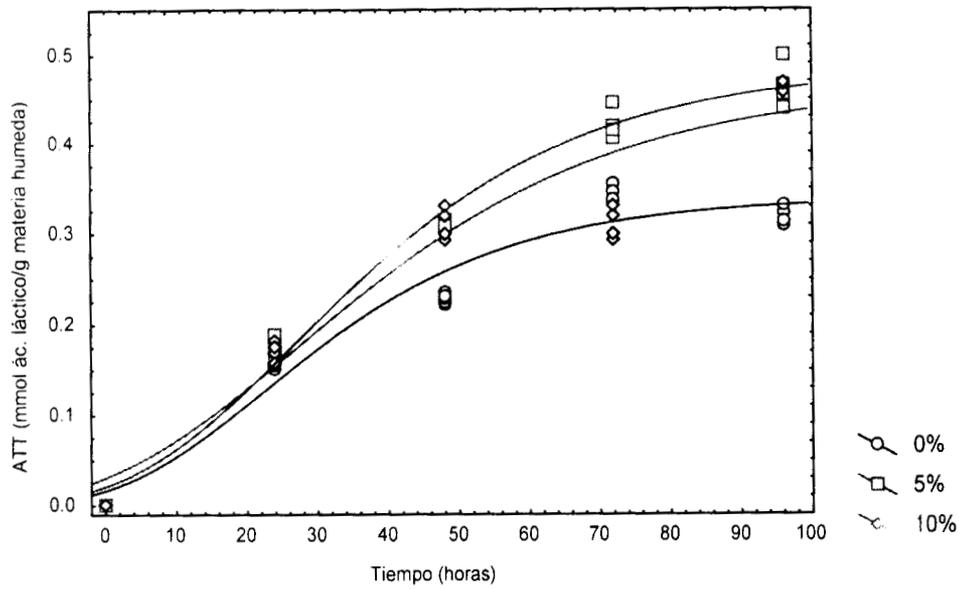


Figura 14. Influencia del nivel de inoculación (% v/p) de *Lactobacillus* cepa B2 sobre la formación de ácido láctico en la fermentación de cabezas de camarón con 10 % (p/p) de azúcar de caña.

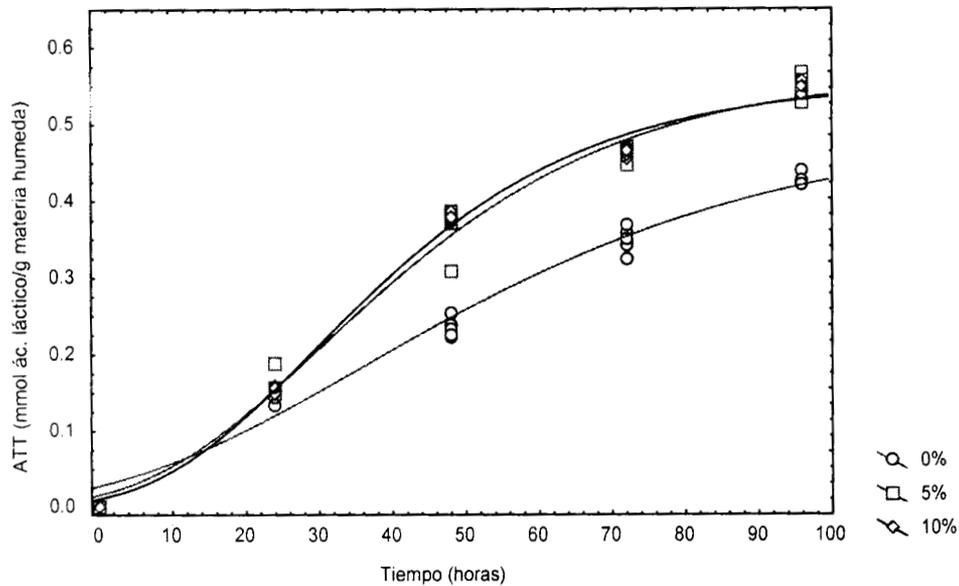


Figura 15. Influencia del nivel de inoculación (% v/p) de *Lactobacillus* cepa B2 sobre la formación de ácido láctico en la fermentación de cabezas de camarón con 20 % (p/p) de azúcar de caña.

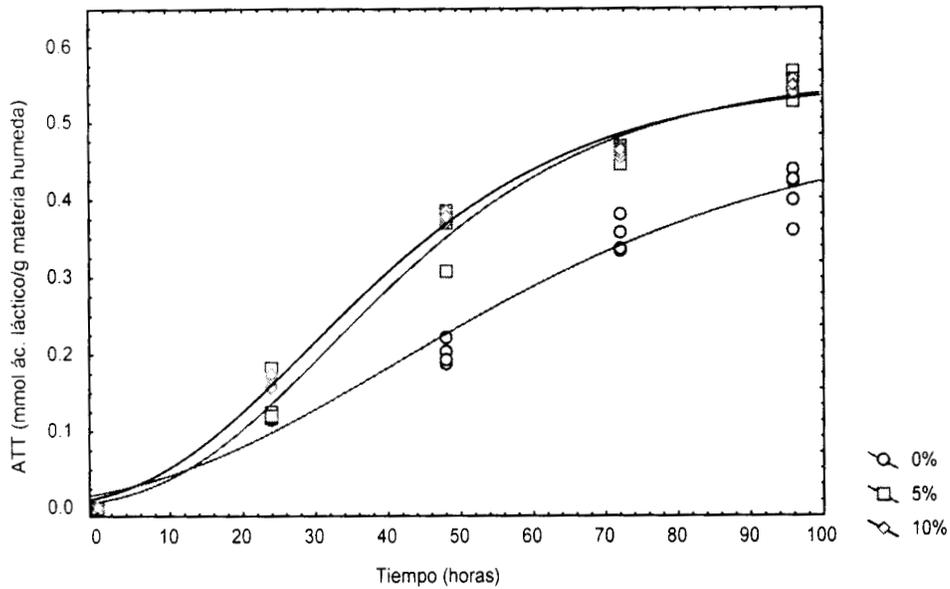


Figura 16. Influencia del nivel de inoculación (% v/p) de *Lactobacillus* cepa B2 sobre la formación de ácido láctico en la fermentación de cabezas de camarón con 10 % (p/p) de lactosa.

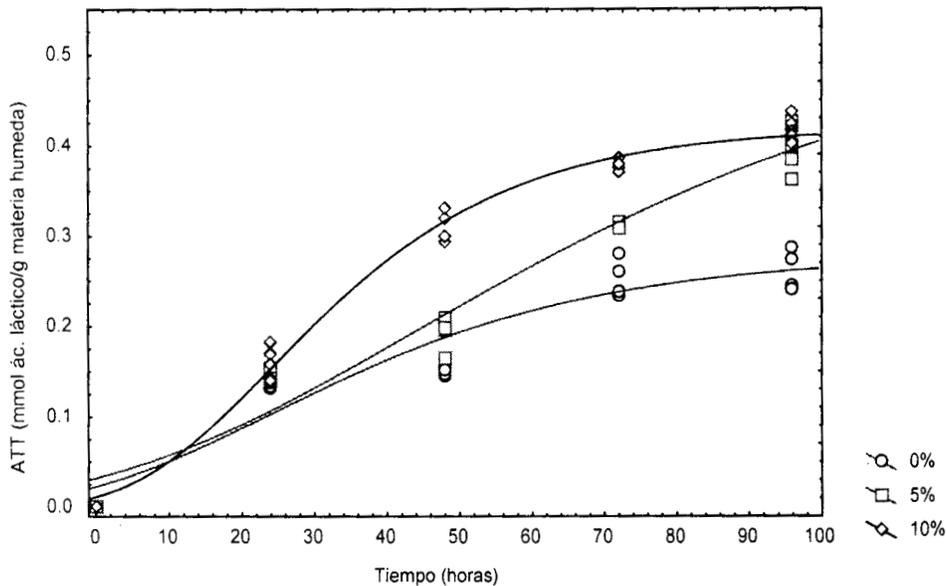


Figura 17. Influencia del nivel de inoculación (% v/p) de *Lactobacillus* cepa B2 sobre la formación de ácido láctico en la fermentación de cabezas de camarón con 20 % (p/p) de lactosa.

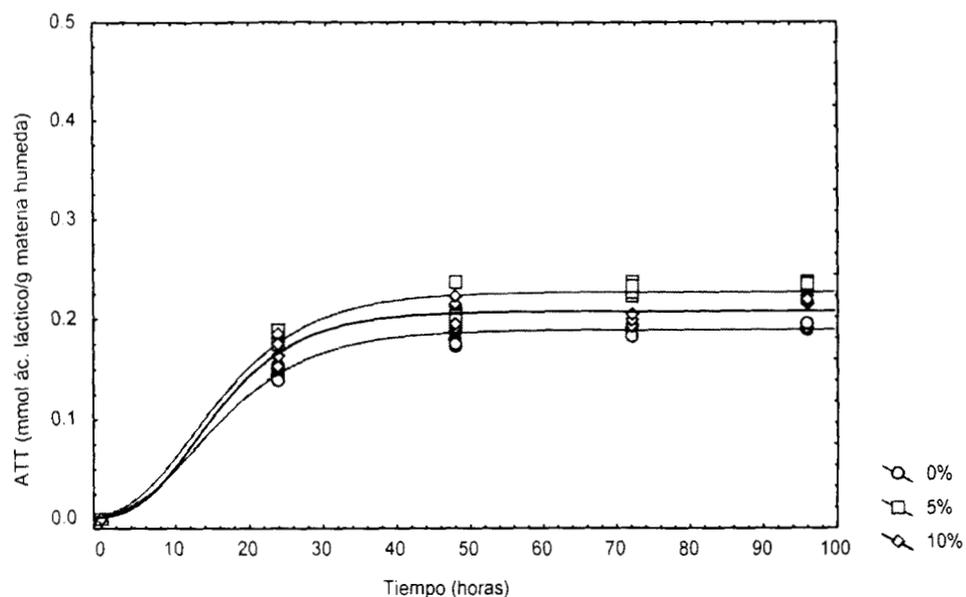


Figura 18. Influencia del nivel de inoculación (% v/p) de *Lactobacillus* cepa B2 sobre la formación de ácido láctico en la fermentación de cabezas de camarón con 10 % (p/p) de suero de leche.

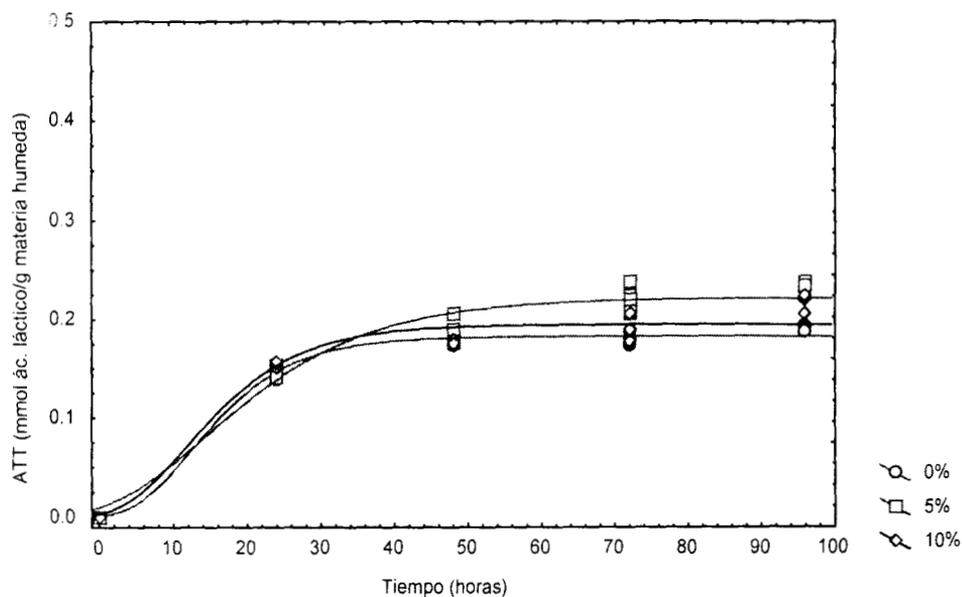


Figura 19. Influencia del nivel de inoculación (% v/p) de *Lactobacillus* cepa B2 sobre la formación de ácido láctico en la fermentación de cabezas de camarón con 20 % (p/p) de suero de leche.

En la tabla X se muestran los resultados de simulación en donde se puede observar que los valores de b disminuyen a medida que el nivel de inoculación es aumentado, a diferencia de esto, los valores de la constante de acidificación aumentan, lo cual nos indica que con el empleo de cultivos iniciadores el proceso de acidificación es mejorado. Por otra parte, los valores más altos para la constante de acidificación fueron encontrados en las fermentaciones donde se utilizó suero de leche como fuente de carbono, sin embargo, fue en estas en donde se obtuvo una menor producción de ácido láctico, esto posiblemente se deba a que en estas fermentaciones la producción de ácido llega a la fase estacionaria en menor tiempo comparadas con aquellas en donde se empleo azúcar de caña y lactosa como fuente de carbono.

Tabla X. Simulación de la producción de ácido láctico por el modelo de Gompertz en la fermentación láctica de cabezas de camarón a diferentes niveles de inoculación con *Lactobacillus sp. cepa B2*.

Fuente de carbono (% p/p)	Nivel de inóculo (% v/v)	Pmax ATT (mmol/g)	b	k (h ⁻¹)	Coefficiente de correlación (r)
Azúcar de caña 10%	0%	0.332	3.28	0.020	0.99
	5%	0.484	3.14	0.043	0.99
	10%	0.478	3.17	0.043	0.99
Azúcar de caña 20%	0%	0.495	2.88	0.029	0.99
	5%	0.567	3.58	0.042	0.99
	10%	0.554	3.94	0.047	0.99
Lactosa 10%	0%	0.533	3.21	0.026	0.99
	5%	0.562	4.27	0.045	0.99
	10%	0.555	3.75	0.046	0.99
Lactosa 20%	0%	0.238	3.97	0.079	0.99
	5%	0.485	3.24	0.028	0.99
	10%	0.418	3.60	0.023	0.99
S. leche 10%	0%	0.189	5.35	0.116	0.99
	5%	0.230	4.71	0.120	0.99
	10%	0.208	5.20	0.131	0.99
S. leche 20%	0%	0.182	5.13	0.131	0.99
	5%	0.223	3.54	0.086	0.99
	10%	0.194	4.08	0.118	0.99

Patrón fermentativo.

En la figura 20 se muestra la concentración de ácidos orgánicos producidos durante la fermentación láctica de las cabezas de camarón con 10% (p/p) de azúcar de caña y 5 % (v/p) de iniciador, en donde se puede apreciar que el principal producto de la fermentación fue el ácido láctico, esto nos indica que con el empleo de cultivos iniciadores es posible modificar el patrón fermentativo de heteroláctico a homoláctico. Resultados similares fueron obtenidos por Shirai, (1996) al fermentar desechos de camarón con 10% de glucosa y 5% del iniciador. Este cambio en el patrón fermentativo es debido principalmente a que la mayoría de las bacterias de descomposición, así como las patógenas son inhibidas por la disminución del pH, competición por los nutrientes y por la producción de gas, el cual desplaza al oxígeno necesario para el crecimiento de los microorganismos aerobios.

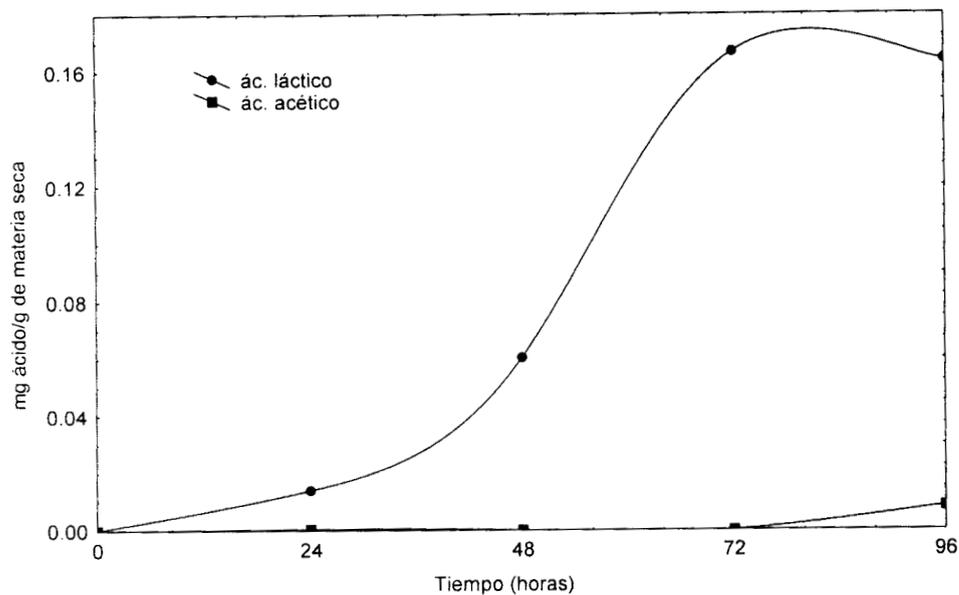


Figura 20. Concentración de ácidos orgánicos producidos durante la fermentación láctica de cabezas de camarón con 10% (p/p) de azúcar de caña y 5% (v/p) de *Lactobacillus sp.*

6.2 Escalamiento de la fermentación láctica a 2 y 30 Kg.

La composición química proximal del camarón y las fracciones sólidas de quitina cruda obtenidas después de la fermentación se muestran en la tabla XI. Meyers (1986) reportó la

composición del ensilado de cabezas de camarón, el cual está en un rango similar al determinado en este trabajo. Sin embargo, la variabilidad puede ser explicada por el método de procesamiento empleado, el área geográfica y la especie empleada (No y Meyers, 1995). Los resultados muestran que el contenido de humedad disminuye ligeramente durante los dos primeros días de fermentación. Esto se explica por el hecho de que a medida que el licor es producido, éste es separado de la fracción sólida, así como por posibles pérdidas por evaporación.

El contenido de nitrógeno tiende a disminuir durante la fermentación debido a la hidrólisis de las proteínas llevada a cabo principalmente por las enzimas presentes en el desecho (Zakaria *et al* 1998). Sin embargo, al final de la fermentación el contenido de nitrógeno aumenta ligeramente, esto puede deberse a la formación de biomasa microbiana, ya que las bacterias ácido lácticas aumentan durante el proceso (Martín y Bemister, 1994).

Tabla XI. Análisis químico proximal del ensilado de cabezas de camarón obtenidos a diferentes tiempos de fermentación en reactor de dos kilogramos..

Tiempo de fermentación (días)	Análisis					
	Humedad (%)	Nitrógeno total (%)	Calcio (%)	Cenizas (%)	pH	ATT (%)
0	75.4	9.0	14.6	23.9	7.25	0
2	70.5	7.0	10.1	19.5	4.91	2.8
6	66.7	6.3	6.3	8.6	4.30	4.1
21	68.3	6.4	6.2	9.3	4.20	4.1
60	68.1	5.9	5.1	10.7	4.20	4.7
83	68.6	6.6	5.9	9.5	4.22	4.5

Por otra parte, se observó una disminución considerable en el contenido de calcio y cenizas durante el proceso de fermentación, esto es debido a la solubilización que sufren al reaccionar con el ácido producido.

El proceso de ensilado de camarón fue escalado en un reactor con capacidad de 2 kg, la fermentación fue monitoreada durante 83 días, determinando ATT, pH, proteína y calcio en el sólido. Aproximadamente el 41%, 52% y 7% correspondieron a las fracciones sólida, líquida y pérdida de materia respectivamente, esta última debida a la manipulación, producción de gas y pérdida de humedad. Después del segundo día de fermentación se alcanzó un pH de 4.6 permaneciendo casi constante por los 83 días (Figura 21). Por otra parte la ATT aumento de 2.8% a las 48 horas hasta un valor de 4.1% a partir de 6 día.

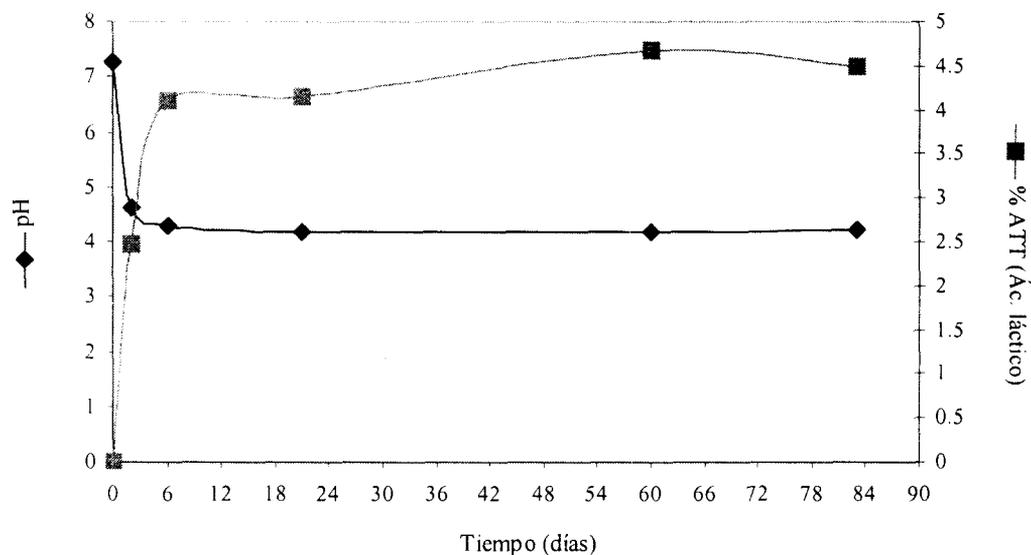


Figura 21. Evolución del pH y producción de ácido láctico en el reactor de columna (2 kg) durante la fermentación con 10% (p/p) de azúcar de caña y 5% (v/p) de *Lactobacillus sp.*

Diversos autores han reportado aumentos de pH después de las 48 horas, entre éstos están los trabajos realizados por Zakaria *et al*, (1998) quien al realizar fermentaciones con glucosa de desechos de crustáceos observó aumento del pH, esto no solamente pudo deberse a los productos resultantes de la proteólisis tales como aminas básicas, peptidos y amoniaco, sino también al aumento de la capacidad amortiguadora por disolución del carbonato de calcio presente en el desecho. Por otra parte ciertas bacterias y levaduras pueden consumir ácido

láctico cuando en el medio no se encuentra disponible una fuente de carbono, provocando con esto un aumento en el pH y con esto permitir que la putrefacción se lleve a cabo (Van Wyk y Heydenrych, 1985).

Aunque la producción de ácido y disminución del pH están cercanamente relacionados con la capacidad amortiguadora del sustrato, la neutralización del ácido no fue observada en este trabajo, lo cual puede ser explicado por la remoción de calcio hacia la fracción líquida. En la figura 22 es mostrado el contenido de calcio en el licor, el cual aumenta a medida que la acidez aumenta.

Al sexto día de la fermentación, se logró la máxima remoción de calcio en el sólido, la cual fue del 82.5%, esta alta remoción se ve reflejada con la producción de ácido, la cual a partir del sexto día permaneció constante (Figura 21).

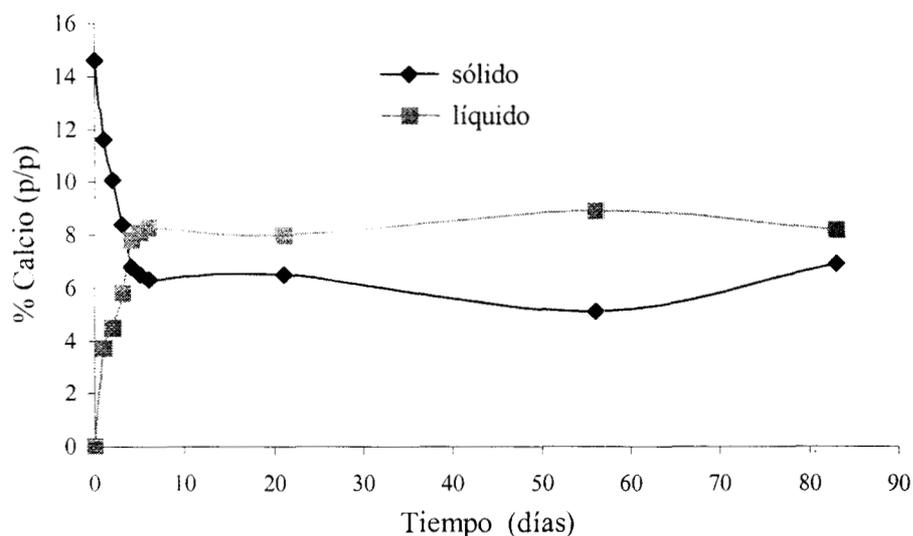


Figura 22. Contenido de calcio determinado durante la fermentación láctica de desechos de camarón adicionado 10% (p/p) de azúcar de caña 5% (v/p) de *Lactobacillus sp.* en reactor de columna (2 kg.).

Después de los 20 días de fermentación se observó en el sólido la formación de pequeños gránulos de minerales corroborando con esto que el calcio fue solubilizado por el ácido producido.

Todos los organismos vivos requieren de cierto valor mínimo de actividad de agua (A_w) para llevar a cabo su actividad biológica, y la que requieren *Pseudomonas sp.* y *Acinetobacter sp.* son de 0.97 y 0.96 respectivamente (Jay, 1996). En general los hongos requieren de bajas actividades de agua, seguidos por las levaduras y por último las bacterias, las cuales son las más exigentes en lo que respecta a A_w .

Las BAL también pueden llegar a ser afectadas por la A_w , por lo tanto la reducción de la actividad de agua puede contribuir a la selección de una microflora láctica. Los mínimos valores de A_w para el crecimiento varían considerablemente entre grupos, siendo más baja para especies de *Lactobacillus*, por ejemplo *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus sake* se adaptan a nichos ecológicos especiales con $A_w < 0.93$ (Lücke, 1995). La actividad de agua fue un importante factor debido a que se logró un decremento durante el ensilaje, de 0.97 al inicio de la fermentación a 0.94 después de 6 días, inhibiendo algunos microorganismos de descomposición, así como BAL heterofermentativas que son más sensibles a bajas A_w , tales como especies de *Leuconostoc* (Lücke, 1995).

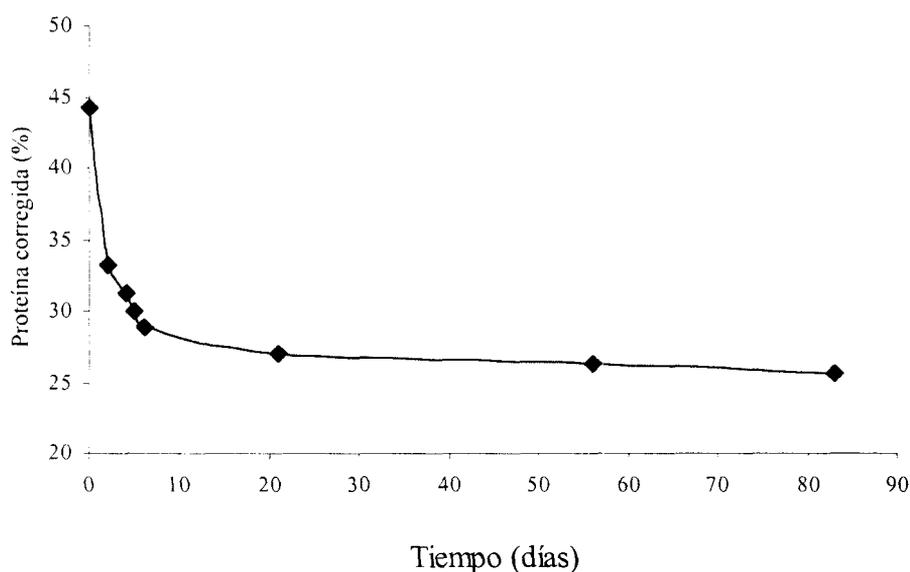
A valores de pH entre 4 y 5, las BAL son más competitivas que la mayoría de los microorganismos de descomposición, y su uso en fermentaciones de alimentos se basa grandemente en esta propiedad ya que pueden tolerar valores de pH por debajo de 4.5 (Lücke, 1995). Esos factores no afectan la realización de la fermentación y el pH fue mantenido estable durante tres meses sin incremento de éste.

Estudios previos han reportado actividad proteolítica en ensilado de camarón, estas enzimas actúan sobre el desecho librando a la quitina de proteínas y pigmentos (Shirai *et al.*, 1996; Simpson y Haard, 1985). La remoción de proteínas durante la fermentación del desecho es mostrada en la figura 23, el máximo grado de desproteínización logrado fue del 90% a los seis días.

El grado de desproteínización de la quitina en este trabajo se asemeja al reportado por Zakaria *et al.* (1998) en un reactor rotatorio con desecho de camarón, mientras que en el ensilaje

realizado en frascos por Shirai (1999) solamente se logró un 76%. La diferencia puede ser explicada por la separación de las fracciones en ambos reactores, evitando la reabsorción en el sólido.

La capacidad inicial del reactor fue de 2 kg y posteriormente se incremento a 30 kg (tabla IX). El criterio de escalamiento empleado fue mantener similitud geométrica para lograr la reducción de pH y la producción de ácido (figura 21). El tiempo final de fermentación para el siguiente tamaño (30 kg) fue determinado a los 6 días, debido a que en este tiempo fue obtenido el mayor grado de desproteínización y desmineralización. Los reactores de 2 y 30 kg tuvieron la misma magnitud en pH y evolución de ácido. La habilidad para mantener los mismos resultados en ambos fermentadores, a pesar del incremento en el diámetro y la altura del reactor de columna fue exitosamente aplicado por Saucedo-Castañeda *et al.*, (1992).



225554

Figura 23. Cambios en el contenido de proteína en el sólido durante la fermentación de desechos de camarón con 10% (p/p) de azúcar de caña y 5% (v/p) de *Lactobacillus sp.*

El la figura 24 se presenta el contenido de azúcares totales con respecto a la producción de ácido láctico en el reactor estático, en donde claramente se puede observar que durante las

primeras horas de la fermentación la mayor parte del azúcar es solubilizada y arrastrada hacia la fracción líquida, lo cual puede ser considerado como una limitante para el crecimiento de las BAL, sin embargo este fenómeno también ha sido reportado en reactores dinámicos (Zakaria *et al* 1998). A medida que la fuente de carbono es metabolizada, la concentración de ácido láctico aumenta, la cual llega a un máximo alrededor del tercer día de fermentación (60 mg/g de materia fresca), para posteriormente estabilizarse durante el resto de la fermentación.

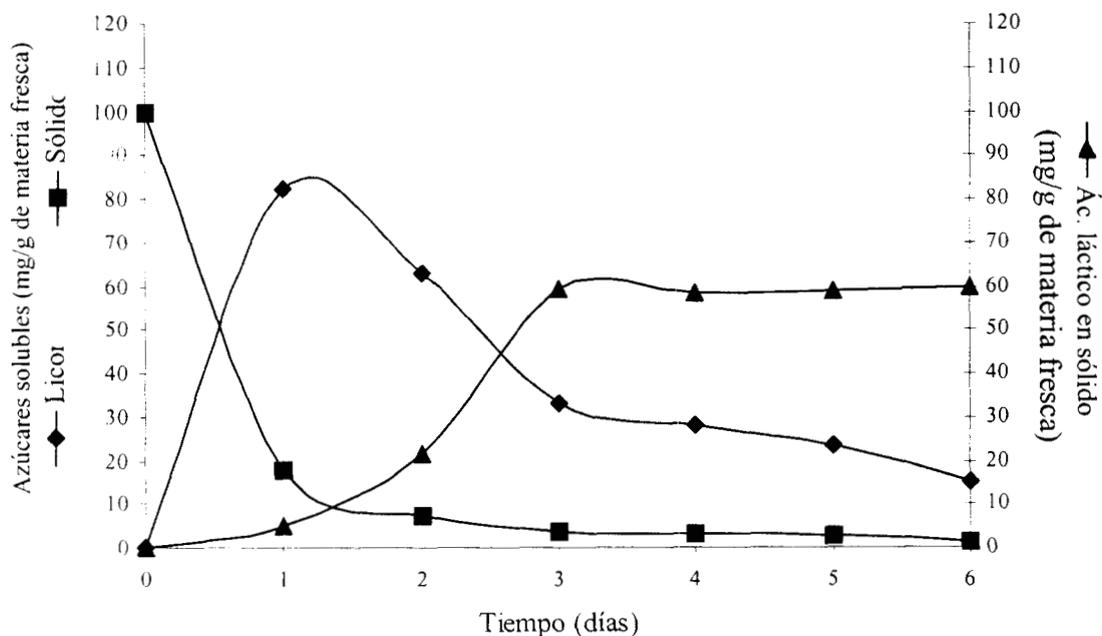


Figura 24. Utilización de azúcar de caña y producción de ácido láctico por *Lactobacillus sp.* en la fermentación láctica realizada con 10% (p/p) del carbohidrato y 5% (v/p) de inóculo.

La acidificación es un factor importante para la supresión del crecimiento de microorganismos de descomposición. Adicionalmente, las BAL producen compuestos antimicrobianos, tales como peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, acetoína y bacteriocinas.

La producción de dióxido de carbono es también una ventaja adicional para la preservación del desecho, ya que ha sido reconocido por sus propiedades antagónicas en contra de los organismos de descomposición (Jay, 1996). Se ha reportado que las bacterias Gram negativas son más sensibles que las Gram positivas, con *Pseudomonas* como las más sensibles y BAL y anaerobias como las más resistentes (Jay, 1996). El dióxido de carbono ha sido usado sólo o en combinación con otros gases en carnes envasadas al vacío como preservativo (Woolford,

1985). Las actividades inhibitorias son debidas a la formación de un medio ambiente anaerobio por reemplazo del oxígeno molecular, el pH intra y extracelular decrece provocando un efecto destructivo sobre la membrana celular (Eklund, 1984).

Otras limitaciones observadas en el reactor de columna fueron el gradiente de temperatura y las diferencias en el medio ambiente gaseoso. Sin embargo, estos factores no afectaron el proceso de fermentación, ya que las bacterias lácticas son anaerobias facultativas y el reactor fue colocado en un cuarto de temperatura controlada a fin de evitar la acumulación de calor metabólico.

La realización del ensilado en este trabajo fue sin ningún tratamiento previo de esterilización, y aunque la duración del proceso fue de tres meses, no se observó descomposición, debido principalmente a la baja A_w , pH del sustrato y bajas cantidades de oxígeno en el reactor.

En la naturaleza, la quitina se encuentra asociada a proteínas, algunas de las cuales no pueden ser eliminadas por métodos suaves, y que permanecen unidas a la quitina, sugiriendo la unión covalente con éste polímero. Austin *et al.*, (1981) y No *et al.*, (1989) han obtenido evidencia de la existencia de enlaces covalentes entre la quitina y las proteínas en caparazones de crustáceos. En la tabla XII se presenta el contenido de nitrógeno de diversas muestras obtenidas por fermentación láctica, así como quitina, quitosano y estándares comerciales; en donde podemos observar que las muestras obtenidas a los seis días de fermentación presentaron valores cercanos al teórico de 6.9 % para la quitina pura. Sin embargo, este valor es ligeramente menor. Rutherford y Austin (1978) mencionan que un valor de nitrógeno más alto al teórico es un indicio de desacetilación o remoción incompleta de proteínas, mientras que bajos valores indican deaminación hidrolítica o contaminación del producto.

6.3 Aislamiento de quitina por métodos químicos después de la fermentación.

Los métodos químicos empleados para la extracción de la quitina a partir de los desechos de camarón son simples, pero requieren de grandes volúmenes de ácido y álcali, los cuales a su vez generan grandes volúmenes de efluentes acuosos. Por lo cual se han propuesto vías

alternas para reducir o eliminar el uso de químicos (Hall y De Silva, 1994; Healy *et al*, 1994). El contenido de quitina en el desecho fresco y en la fracción sólida obtenida a los seis días de fermentación fue de 13.1 y 23.2 % respectivamente. Como resultado de la fermentación, el contenido de quitina aumentó aproximadamente al doble del contenido inicial en el desecho.

A diferencia de los métodos químicos, la quitina purificada por el proceso de ensilaje, todavía contiene cierta cantidad de proteína y calcio (tabla XI), los cuales deben de ser eliminados con el fin de obtener un producto altamente purificado. Normalmente, la quitina pura contiene menos del 1 % de calcio y 6.9 % de nitrógeno (No *et al*, 1989).

Tabla XII. Análisis elemental de muestras de ensilado a diferentes tiempos de fermentación, quitina (reactor 2 kg), quitosano y estándares comerciales, así como valores teóricos.

Tiempo de fermentación (días)	% carbono	%hidrógeno	% nitrógeno
0	38.81	6.09	9.04
2	38.25	5.89	6.99
5	36.53	5.86	6.56
6	36.38	5.83	6.31
21	38.25	5.89	6.36
60	35.55	6.07	5.87
83	33.10	5.59	6.64
Quitina	49.82	6.76	6.73
Quitosano	43.45	6.94	7.32
Estándares			
Quitina (Sigma C-7170) ^a	44.32	6.61	6.47
Quitina valores teóricos ^a	45.28	6.65	6.90
Quitosano (Sigma C-3646) ^a	42.38	6.80	7.85
Quitosano (Fluka 22742) ^a	40.69	7.19	7.36

(a) valores obtenidos por Shirai, 1999

Después del proceso de ensilado, la quitina cruda fue sometida a una serie de tratamientos ácidos y alcalinos para realizar una purificación total con el fin de obtener un producto que se asemejara a los comerciales.

La desmineralización fue seguida por la determinación de calcio en la quitina aislada. En la figura 25 se muestra el efecto que presenta la concentración de HCl sobre el contenido de calcio en la quitina cruda, donde se puede observar que hubo diferencias significativas entre los tratamientos. Las concentraciones de 0.4 a 1.0 M resultaron ser estadísticamente iguales. Los porcentajes de calcio obtenidos después del tratamiento fueron menores de 1 %, el cual está dentro de los valores reportados por No *et al*, (1989).

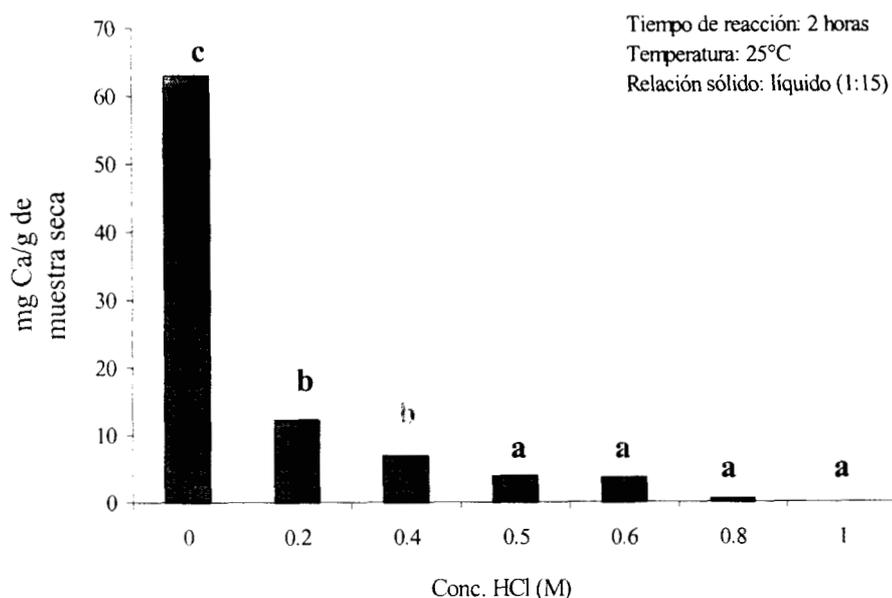


Figura 25. Efecto de la concentración de HCl sobre el contenido de calcio de la quitina cruda obtenida por fermentación láctica. Histogramas con la misma letra son estadísticamente iguales entre tratamientos ($P < 0.05$).

Por otra parte, en la figura 26 se muestra el efecto que presentó la concentración de NaOH sobre el contenido de proteína en la quitina cruda. Los resultados muestran que las concentraciones desde 0.4 a 1.0 % de NaOH no presentaron diferencias significativas, siendo estadísticamente iguales. El contenido mínimo de proteína logrado fue de aproximadamente 1.7 %. Estos valores son más bajos (5%) que aquellos reportados por Chang y Tsai, 1997, y ligeramente más bajos (2.1 y 2.3%) que los obtenidos por Shahidi y Synowiecki (1991) para camarón rosa. Estudios realizados por Austin *et al.* (1981) reportan contenidos de proteína que van desde 0.4 hasta 5.6% para diferentes especies de crustáceos. Las diferencias entre los resultados pueden deberse a que la composición química varía entre las especies, a la

naturaleza de los complejos quitina-proteína, o al procedimiento de purificación. Sin embargo, el procedimiento analítico utilizado en la determinación del contenido de proteína también puede contribuir a las diferencias. Austin *et al.* (1981) reportan que algunos enlaces covalentes solamente pueden ser removidos después de fraccionar los complejos quitina-proteína con NaOH 1N a 100°C durante 48 horas. Sin embargo, Brine (1982) observó que una considerable fracción de proteínas que permanecían unidas a la quitina incluso después de tratamientos prolongados.

El aumento en la concentración de HCl o NaOH no provoca una mejoría en la desmineralización y deproteinización. Comportamientos similares fueron también encontrados por Shahidi y Synowiecki (1991). La quitina cruda tratada con ácido y álcali alrededor de 0.4 M, muestra la disminución más baja de esos compuestos en el sólido. Reportes de trabajos previos muestran que las concentraciones óptimas de ácidos y álcalis fueron 1.0-1.5N y 1.75 N, respectivamente (No *et al.*, 1989; Shahidi y Synowiecki, 1991). El ensilaje fue capaz de reducir la cantidad de químicos para la purificación de la quitina entre un 60-80% en comparación con las condiciones reportadas.

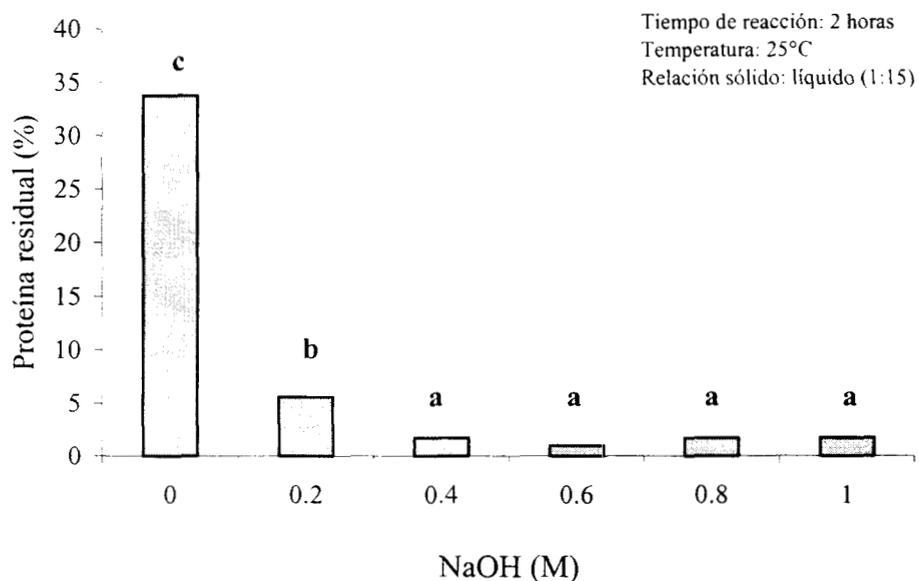


Figura 26. Efecto de la concentración de NaOH sobre el contenido de proteínas en la quitina obtenida por fermentación láctica. Puntos con la misma letra son estadísticamente iguales entre tratamientos ($P < 0.05$).

VII. Conclusiones

La fermentación láctica es un proceso adecuado para la conservación del desecho, siendo posible el empleo de fuentes de carbono económicas que permitan el escalamiento en regiones aledañas a las granjas camaronícolas o en altamar. Además, el proceso es económicamente atractivo, debido a que tiene bajos requerimientos de energía y equipo de bajo costo.

Es importante tomar en cuenta la calidad de la materia prima, ya que de ésta va a depender el éxito o fracaso del proceso. Así, entre más fresco sea el desecho de camarón mejor será la calidad del ensilado producido.

En el presente trabajo se empleó al azúcar de caña, lactosa y suero de leche como posibles fuentes de carbono en la fermentación láctica de los desechos de camarón, de las cuales el azúcar de caña a una concentración del 10 % (p/p) fue la más apropiada para la reducción del pH hasta un valor de 4.5 y una acidez total titulable de 2.4 % dentro de las primeras 48 horas de fermentación. Además, debido a las grandes cantidades de minerales presentes en el desecho, se requieren concentraciones elevadas de ácido para lograr disminuir el pH. Es claro que no solamente el tipo de carbohidrato usado, sino también el nivel total de la fuente de carbono es de relevancia en el proceso fermentativo.

Por otra parte, se observó que no hubo diferencias significativas entre el 5 y 10 % de inoculación empleados, siendo el nivel al 5 % el más adecuado para escalar el proceso de fermentación por ser más económico. Además, el patrón fermentativo fue establecido como homoláctico, permitiendo una mejor conservación del desecho.

El empleo del reactor de columna fue un modelo adecuado para realizar el escalamiento de la fermentación ácido láctica a 2 y 30 kilogramos. A los seis días de fermentación se obtuvieron los mayores porcentajes de desproteinización y desmineralización, los cuales fueron de 89 y 83%, respectivamente.

Además se logró estabilizar el desecho por 83 días, tiempo durante el cual no fueron observados cambios aparentes de descomposición.

Se observó que a las concentraciones de 0.4 y 0.5 M de ácido y álcali, respectivamente, se obtuvieron los decrementos más grandes de proteínas y minerales. Esto nos demuestra que la fermentación es capaz de reducir las cantidades de químicos empleados en la purificación de la quitina de un 60 a 80% con respecto a las concentraciones óptimas de ácido y álcali reportadas por No *et al* en 1989 y por Shahidi y Synowiecki en 1991, las cuales fueron de 1.0 a 1.5 N y 1.75N, respectivamente.

VIII. Bibliografía

- Agricultural Handbook, 1975. Composition of foods. U. S. Dept. of Agriculture, 8. Washington, D. C. EEUUA.
- Aidoo. K. E., R. Henry y B. J. B. Wood, 1982. Solid state fermentation, *Advances of Applied Microbiology*, 28, 201-237.
- Anderson, C. G.; De Pablo, N.; Romo, C. R. Antarctic krill (*Euphausia superba*) as a source of chitin and chitosan. In *Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan*; Muzzarelli, R. A. A., Pariser, E. R., Eds.; MIT Sea Grant Program: Cambridge, MA, 1978. pp 54-63.
- Attwood, M.M. y Zola, H. 1967. The association between chitin and protein in some chitin's tissues. *Comp. Biochemistry and Physiology*, 20: 993.
- Ashok, P. 1992. Recent process developments in solid state fermentation, *Process Biochemistry*, 27: 109-117.
- Austin, P.R., Brine, C.J., Castle, J. y Zikakis, J. 1981. *Chitin: New Facets of Research*. *Science*, 212; 749-753.
- Axelsson, L. 1993. "Lactic acid bacteria: Classification and Physiology". In *Lactic Acid Bacteria* (ed. Salminen, S. And Wright A. von) Marcel Dekker, New Yorkk, Basel & Hong Kong, 1-63.
- Backhoff, H. P. 1976. Some chemical changes in fish silage. *Journal of Food Technology*, 11, 353-363.
- Black, M.M. y Schwartz 1950. The estimation of chitin and chitin nitrogen in crawfish waste and derived products, *Analyst*, 75, 185.
- Blumberg, R., Southall, C.L., Van Rensburg. N.J. y Volckman. O. B. 1951. A study of chitin production from processing waste. *Journal of the Science Food and Agriculture*. 2: 571.
- Bough, W., Wu, C. y Perkins, B. 1978. Influence of manufacturing variables on the characteristics and effectiveness of chitosan products. Chemical composition, viscosity and molecular weight distribution of chitosan products. *Biotechnology and Bioengineering.*, 20: 1945-1955.
-

-
- Bough, W.A y Landes, R. 1978. Citado en "Use of chitinous polymers in food". Knorr, D. Food Technology, 38 (1): 85-97 (1984).
- Brine, C. J. 1982. Chitin-protein interactions. En Chang, K. L. y Tsai, G. 1997. Response surface optimization and kinetics of isolating chitin from pink shrimp (*Solenocera melantho*) shell waste. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 45: 1900-1904.
- Brine, C. J.; Austin, P. R. 1981a. Chitin variability with species and method of preparation. Compendium of Biochemistry and Physiology, 70B, 283-286.
- Brine, C. J.; Austin, P. R. 1981b. Chitin isolates: Species variation in residual amino acids. Compendium of Biochemistry and Physiology, 70B: 173.
- Broussignac, P. 1968. Chitosan, a natural polymer no well known by the industry. Chim. Ind. Genie. Chim. 99: 1241. En Preparation y characterization of Chitin y Chitosan-- A Review. No, H. y Meyers, S. (1995) Journal of aquatic food product technology, vol. 4 (2).
- Brzeski, M.M. 1982. Concept of chitin/chitosan isolation of Antarctic krill (*Euphausia superba*) shell on the technical scale. En Proceeding of the second International Conference on chitin and chitosan. S. Hirano y S. Tokura, eds. P. 15. The Japan Society on chitin on chitosan, Sapporo, Japan.
- Cannel, E y Moo-Young, M. 1980. Solid state fermentation systems. Process Biochemistry, Agosto-Septiembre, 24-28.
- Cañipa, A. J. y Duran, C. 1997. Reaprovechamiento del Cefalotórax de Camarón, un proyecto exitoso. Industria Alimentaría, 10-17.
- Carlstrom, D. 1962. Polysaccharide chain of chitin. Biochim. Biophys. Acta 59: 361. En Preparation y characterization of Chitin y Chitosan-- A Review. No, H. y Meyers, S. 1995. Journal of aquatic food product technology, vol. 4 (2).
- Chang, K. L. y Tsai, G. 1997. Response surface optimization and kinetics of isolating chitin from pink shrimp (*Solenocera melantho*) shell waste. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 45: 1900-1904.
- Cherley, H. 1987. Tecnología de alimentos. Limusa, p. 603. México, D.F. México
- Cho, I.W. y Lee, Y.C. 1980. A potential source of ocean chitin its film properties. International Journal of Biological Macromolecular. 2: 52.
-

-
- Cosio, I.G., Fisher, R.A. y Carrod, P.A. 1982. Bioconservation of shellfish waste: Waste pre-treatment, enzyme production, process design, and economic analysis. *Journal of food Science*. 47: 901.
- Daeschel, M.A. y M.H. Penner, 1992. Hydrogen peroxide, lactoperoxidase systems, and reuterin. En Zakaria, Z. 1997. Lactic acid purification of chitin from prawn waste, using a horizontal rotating bioreactor. Tesis de doctorado, Universidad de Loughborough, Gran Bretaña.
- Draper N. R., Smith H. 1981. *Applied Regression Analysis* (2nd edn). John Wiley, New York.
- Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.& Smith, F. 1956. Colourimetric method for determination of sugars and related sugars. *Analytical Chemistry*. 28:350-356
- Durand, A. y Chereau, D. 1988. A new pilot reactor for solid-state fermentation: application to the protein enrichment of sugar beet pulp. *Biotechnology and Bioengineering*, 31, 476-486.
- Durand, A., Renaud, R., Maratray, J., Almanza, S. Y Díez, M. 1996. INRA-Dijon Reactor of solid state Fermentation: Designs and applications. *Journal of Scientific & Industrial Research*. (55) May-June. Pp 317-332.
- Earnshaw, R.G. 1992. The antimicrobial action of lactic acid bacteria: natural food preservation system. En *Lactic Acid Bacteria in Health and Disease* (ed. Wood, B.J.B.) Elsevier Applied Science, London, New York, 211-215.
- Edin, H. 1940. *Nord. Jordbr. Forsk*, 22, 142-158. En Hall, G. M. 1983. Silage from tropical fish. Tesis Doctoral. Universidad de Nottingham. Gran Bretaña.
- Evers, D.J., & Carrol, D.J. 1998. Ensiling salt-preserved shrimp waste with grass straw and molasses. *Animal Feed Science and Technology*. 71(3-4):241-249.
- Fagbenro, O.A. 1996. Preparation, properties and preservation of lactic acid fermented shrimp heads. *Food Research International*. 29(7): 595-599.
- Foster, A.B. y Hackman, R.H. 1957. Application of ethylenediamine tetraacetic acid in the isolation of crustacean chitin. *Nature*. 180: 40. En *Preparation y characterization of Chitin y Chitosan-- A Review*. No, H. y Meyers, S. (1995) *Journal of aquatic food product technology*, vol. 4 (2).
-

-
- Foster, A.B. y Webber, J.M. 1961. Chitin. *Advances in Carbohydrate chemistry*. 15: 371. En *Preparation y characterization of Chitin y Chitosan-- A Review*. No. H. y Meyers, S. (1995) *Journal of aquatic food product technology*, vol. 4 (2).
- Ghildyal, N. P. Ramakrishna, S. V. Nirmala, Devi P., Lonsane, B. K. y Asthana H. N. 1981. *Journal of Science and Technology*. 18: 248.
- Giels, C.H., Hasan, A.S., Laidlaw, M. Y Subramarion. R.V.R. 1958. Some observations on the constitution of chitin and on its absorption of inorganic and organic acids from aqueous solutions. *Soc Dyers and Colourists*. 74:647. En *Preparation y characterization of Chitin y Chitosan-- A Review*. No, H. y Meyers, S. 1995. *Journal of aquatic food product technology*, vol. 4 (2).
- Green, J.H. y Kramer, A. 1984. *Fishery waste management*. P.214. AVI Publishing Co., Westport, CT. En *Preparation y characterization of Chitin y Chitosan-- A Review*. No, H. y Meyers, S. 1995. *Journal of aquatic food product technology*, vol. 4 (2).
- Green, J.H. y Mattick, J. F. 1979. *Fishery wastes management*. Ch. 10 p. 202. AVI Publishing Co., Westport, CT. En *Preparation y characterization of Chitin y Chitosan-- A Review*. No, H. y Meyers, S. (1995) *Journal of aquatic food product technology*, vol. 4 (2).
- Gildberg, A. y Raa, J. 1977. Properties of a propionic/formic acid preserved silage of cod viscera. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28,647-653.
- Hackman, R.H. 1954. Studies of chitin. I. Enzymatic degradation of chitin and chitin esters. *Aust. J. Biol. Sci.* 7: 168.
- Hackman, R.H. 1960. Studies of chitin. IV. The occurrence of complexes in which chitin and protein are covalently linked. *Aust. J. Biol. Sci.* 13: 568.
- Hall, G. M. 1983. *Silage from tropical fish*. Tesis Doctoral. Universidad de Nottingham. Gran Bretaña.
- Hall, G. M., Keeble, D., Ledward, A. y Lawrie, R. A. 1985. *Silage from tropical fish 1. Proteolysis*. *Journal of Food Technology*. 20: 561-572.
- Hall, G. M. y De Silva, S. 1994. *Shrimp waste ensilation*. *Infofish International*. 2/94, 27-30.
- Healy, M. G., Romo, C. R. y Bustos, R 1994. *Bioconversion of marine crustacean shell waste*. *Resource, Conservation and Recycling*, 11: 139-147.
- Herzog, K.H., Grobmann, H. y Lieflander, M 1975. The chemistry of a chitin-protein from crayfish (*Astacus fluviatilis*). *Hoppe-Seiler's Z. Physiology and chemistry*. 356: 1067.
-

-
- Hesseltine, C. W. 1977. Solid State Fermentation, *Process Biochemistry*, 11:29
- Hirano, S. 1989. Production and applications of chitin and chitosan in Japan. En *Proceeding 4th Conference on chitin and chitosan*. Skjak-Braeks, G.; Anthosen, T. y Sandford, eds. Agosto 22-24. Pp. 51-59. Trondheim, Noruega.
- Horowitz, S.T., Roseman, S., y Blumental, H.J. 1957. Preparation of glucosamine oligosaccharides. 1. Separation. *J. Am. Chem. Soc.* 79: 5046. En *Preparation y characterization of Chitin y Chitosan-- A Review*. No, H. y Meyers, S. (1995) *Journal of aquatic food product technology*, vol. 4 (2).
- Hurst, A. 1981. Nisin. *Advances in Applied Microbiology*. 27: 85-123.
- Iwatta, S. y Nakabayashi, T. 1974. Method for elimination of colouring substances. Citado en: Muzzarelli, R. 1978. *Chitin*, Pergamon Press. P. 183. Londres, Inglaterra.
- Jay, J.M. 1996. *Modern Food Microbiology*. Fifth Edition. Chapman and Hall. New York. Pp. 44-48, 126-127.
- Johnson, E. L.; Peniston, Q. P. Utilization of shellfish waste for chitin and chitosan production. En *Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products*; Martin, R. E., Flick, G. J., Hebard, C. E., Ward, D. R., Eds.; AVI Publishing: Westport, CT, 1982; pp 415-422.
- Kamasastri, P.V. y Prabhu, P.V. 1961. Preparation of chitosan and glucosamine from prawn shell waste. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 20D: 446
- Kandler, O. 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antoine Van Leeuwenhoek*. 49: 209-224.
- Kargi, F. y Curme, J. A. 1985. *Biotechnology and Bioengineering* (27) 1122.
- Knorr, D. 1982. Functional properties of chitin and chitosan. *Journal of Food Science.*, 47, 593-595.
- Knorr, D. 1984. Use of chitinous polymers in foods. A challenge for food research and development. *Food Technology.*, 38,85-97.
- Knorr, D. 1983. Dye binding properties of chitin and chitosan. *Journal of Food Science*. 48,36-37, 41.
- Knorr, D. 1991. Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. *Food Technology*, 45, 114-122.
-

-
- Kurita, K. Tomita, K., Tada, T., Ishii, S., Nishimura, S.I. y Shimoda, K. 1993. Squid chitin as a potential alternative chitin source: Deacetylation behaviour and characteristic properties. *Journal of Polymers Science: Part A: Polymer Chemistry*, 31, 485.
- Levin, R.E. 1994. Lactic acid and propionic acid fermentations of fish hydrolyzates. In: *Fisheries Processing*, (edited by A.M. Martin). Pp. 273-310. Chapman and Hall, London.
- Lindgren, S. y Dobrogosz, W. 1990. "Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations." *FEMS Microbiologicals reviews*, 87, 149-164. En *Lactic acid purification of chitin from prawn waste using a horizontal rotating bioreactor*. Zainoha Zakaria. Doctoral Thesis. Loughborough University. 1997
- Lonsane, B.K., N.P. Ghildyal, S. Budiartman y S. V. Ramakrishna. 1985. Review: Engineering aspects of solid state fermentation. *Enzyme Microbiology and technology*, 7, 258-265.
- Lonsane, K.B., Castañeda, G.S., Raimbault, M., Roussos, S., Viniegra, G., Ghildyal, N.P., Ramakrishna, M. Y Krishnaiah, M.M. 1992. Scale-up strategies for solid state fermentation systems. *Process Biochemistry*, 27:259-273.
- Lücke, F.K. 1995. Indigenous lactic acid bacteria of various food commodities and factors affecting their growth and survival. In: *Lactic Acid Bacteria. Current Advances in Metabolism Genetics and Applications*. (edited by Bozoglu, T.F. and Ray, B.). Springer-Verlag. Germany. Pp. 253-259.
- Martín, A. M. y Bemister, P. L. 1994. Anaerobic Fermentation processing of Fisheries Waste. *Waste Management of Research*. 12, 05-08.
- Mathur, N.K. y Narangn, C. K. 1990. Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals, *Journal of Chemistry Education*. 67 (11). 938-942.
- Mayra-Makinen, A. y M. Bigret, 1993. "Industrial use and production of lactic acid bacteria." En *Lactic Acid Bacteria* (ed. Salminen, S. And Wright A. von) Marcel Dekker, New York, Basel & Hong Kong, 65-97.
- Meraz, M., Shirai, K., Larralde, P. y Revah, S. 1992. Studies of the bacterial acidification process of Cassava (*Manihot esculenta*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 60: 457-463.
- Meyers, S.P. 1986. Utilisation of shrimp processing wastes. *INFOFISH Marketing Digest No.* 4/86:18-19.

-
- Meyers, S.P. y G. Benjamin 1987. Feeding values of crustacean wastes can be improved through proper ensilage treatment. *Foodstuff*, March 30, 12.
- Mima, S., Miya, M., Iwamoto, R. Y Yoshikawa, S. 1983. Highly deacetylated chitosan and its properties, *Journal implicated of polymers Science*, 28: 1909.
- Moorjani, M.N., Achutha, V. y Khasim, D.I. 1975. Parameters affecting the viscosity of chitosan of prawn waste. *Journal of Food Science and Technology*, 12: 187.
- Muzzarelli, R.A.A 1973. Natural chelating polymers. Pergamon Press, Oxford. En *Preparation and characterization of chitin and chitosan. A Review Journal of aquatic food product technology*, vol. 4 (2).
- Muzzarelli, R.A.A. 1978. Chitin, Pergamon Press, Londres, Inglaterra.
- Muzzarelli, R.A.A. 1985. Chitin. Ch. 6. En *Preparation and characterization of chitin and chitosan. A Review Journal of aquatic food product technology*, vol. 4 (2).
- Neville, A.C. 1975 *Biology of tha Arthropod cuticle*, p. 448. Springer Publ.Co., New York. . En *Preparation and characterization of chitin and chitosan. A Review Journal of aquatic food product technology*, vol. 4 (2).
- No, H., Meyers, S.P. y Lee, K.S. 1989. Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste. *Journal of Agriculture and food chemistry*. 37: 575-579.
- No, H. y Meyers, S. 1989. Crawfish chitosan as a coagulant in recovery of organic compounds from seafood processing streams. *Journal of Agriculture and food chemistry*. 37: 580-583.
- No, H. y Meyers, S. 1995. Preparation y characterization of Chitin y Chitosan-- A Review. *Journal of aquatic food product technology*, vol. 4 (2).
- Owens, J. D. y Mendoza, L. S. 1985. Enzimically hydrolysed and bacterially fermented fishery products. *Journal of Food technology*. 20: 273-293.
- Pandey, A. 1991. Aspects of fermenter design for solid-state fermentations. *Process Biochemistry* 26:355-361.
- Pelletier, A., Lemire, I., Sygush, J., Chornet, E. y Overed, R.P. 1990. Chitin/ chitosan transformation by thermo-mechano-chemical treatment including characterization by enzymatic depolymerization. *Biotechnology and bioengineering*. 36: 310.
- Peniston, Q.P. y Johnson, E.L. 1978. Process for demineralization of crustacean shells. U.S. patent 4,066,735.
-

-
- Popper, L. y Knorr, D. 1990. Application of high-pressure homogenisation for food preservation. *Food Technology*, 44 (7): 84-88.
- Raa, J. & Gildberg, A. 1982. Fish silage: A review. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 16:383-419.
- Raimbault, M. Y Alazard, D. 1980, *European Journal Application of Microbiology and Biotechnology*, (9) 199.
- Rao, M.S.; Yu, P.; Stevens, W.F.; Chandkrachang, S.; Kungsuwan, A. & Hall, G.M. 1996. Drum reactor for extraction of chitin from shrimp waste using lactic acid bacteria. *Proceedings of 2nd Asia Pacific Chitin Symposium*. Pp. 63-67.
- Ray, B. 1992. Diacetyl of lactic acid bacteria as a food preservative. En Zakaria, Z. 1997. Lactic acid purification of chitin from prawn waste, using a horizontal rotating bioreactor. Tesis de doctorado, Universidad de Loughborough, Gran Bretaña.
- Rha, C.K., Rodriguez-Sánchez, D. Y Kienzle-Sterzer, C. 1984. Novel applications of chitosan. . En *Preparation and characterization of chitin and chitosan. A Review Journal of aquatic food product technology*, vol. 4 (2).
- Roberts, L. A. F. 1992. *Chitin Chemistry*. MacMillan Press, Londres.
- Rutherford, F.A. y Austin, P.R. 1978. Marine chitin properties and solvents. En *Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan*; Muzzarelli, R. A. A., Paris-er, E. R., Eds.; MIT Sea Grant Program: Cambridge, MA.
- Sandford, P.A. y Hutchings, G.P. 1989. Chitosan --A natural, cationic biopolymer-- Commercial applications. En *Preparation y characterization of Chitin y Chitosan-- A Review*. No, H. y Meyers, S. 1995. *Journal of aquatic food product technology*, vol. 4 (2).
- Sannan, T., Kurita, K. y Iwakura, Y. 1976. Studies of chitin. 2. Effects of deacetylation on solubility. *Makromolekular chemistry*. 177: 3589
- Saucedo-Castañeda, G y Gómez, J. 1989. The effect of glucose and ammonium sulfate on kinetic acidification by heterogeneous mixed culture. *Biotechnology letters*. Vol. 11 (2) 121-124.
- Saucedo-Castañeda, G.; Gutierrez-Rojas, M.; Bacquet, G.; Raimbault, M y Viniegra-Gonzalez, G. 1990. Heat transfer simulation in solid substrate fermentation *Biotechnology and Bioengineering*. (35) 802-808.
-

-
- Saucedo-Castañeda, G.; Lonsane, B.K.; Krishnaiah, M.M.; Navarro, J.M.; Roussos, S. & Raimbault, M. 1992. Maintenance of heat and water balances as a scale up criterion for the production of ethanol by *Schwanniomyces castellii* in a solid state fermentation system. *Process Biochemistry* 97-107.
- SEMARNAP (Secretaría del medio ambiente, recursos naturales y pesca). 1998. Anuario estadístico de pesca. México, D. F.
- Shahidi, F. y Synowiecki, J. 1991. Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chi-noecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 39, 1527-1532.
- Shimahara, K., Ohkouchi, K. y Ikeda, M. 1982. A new isolation method of crustacean chitin using a proteolytic bacterium, *Pseudomonas maltophilia*. En *Preparation and characterization of chitin and chitosan. A Review Journal of aquatic food product technology*, vol. 4 (2).
- Shirai, K. 1999. Utilisation of shrimp wastes for chitin, protein and pigments recovery by microbial route. PhD. Thesis. Universidad Autonoma Metropolitana. Mexico City, Mexico
- Shirai, K.; Guerrero, I.; Huerta, S.; Saucedo, G. & Hall, G. M. 1996. Fermentación láctica de cabeza de camarón (*Penaeus spp.*). *Advances in Chemical Engineering*. Mexico.
- Simpson, B.K. & Haard, N.F. 1985. The use of proteolytic enzymes to extract the carotenoproteins from shrimp wastes. *Journal of Applied Biochemistry*. 7:212-222.
- Simpson, B.K., N. Gagne y M.V. Simpson, 1994. Bioprocessing of chitin and chitosan. En *Fisheries Processing: Biotechnological Applications* (ed. A.M. Martin) Chapman and Hall, London, 162-170.
- Soto, N.V., Miller, H. y Knorr, D. 1989. Effects of chitosan treatments on the clarity and color of apple juice. *Journal of Food Science*, 54: 495.
- Suresh, P.V. y Chandrasekaran, M. 1998. Utilization of prawn waste for chitinase production by the marine fungus *Beauveria bassiana* by solid state fermentation. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 1995 (14) 655-660.
- Synowiecki, J., Sikorski, Z.E., y Naczka, M. 1981. Immobilization of invertase on krill chitin. *Biotechnology and Bioengineering*. 23: 231
-

-
- Takeda, M. y Abe, E. 1962. Isolation of crustacean chitin. Decalcification by disodium ethylenediaminetetracetate and enzymic hydrolysis of incidental proteins. *Norishio Suisan Koshusho Kenkyu Hokoku*. 11:339. En *Preparation and characterization of chitin and chitosan. A Review Journal of aquatic food product technology*, vol. 4 (2).
- Takeda, M. y Katsuura, H. 1964. Purification of king crab. *Norishio Suisan Koshusho Kenkyu Hokoku*. 13: 109. En *Preparation and characterization of chitin and chitosan. A Review Journal of aquatic food product technology*, vol. 4 (2).
- Tatterson, I.N. y Windsor, M.L. 1974. Fish Silage, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 25, 369-379.
- Tengerdy, R.P. 1992. Solid state fermentation of lignocellulose. En *solid substrate cultivation*, eds Doelle, H.W., Mitchell, D.A. y Rolz, C.E., pp. 269-282. London: Elsevier Applied Science.
- Van Wyk, H. J. & Heydenrych, C. M. S. 1985. The production of naturally fermented fish silage using various lactobacilli and different carbohydrate sources. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 36: 1093-1103.
- Vuyst, L.De. y E.J. Vandamme 1994b. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. En *Bacteriocins of lactic Lactic Acid Bacteria* (ed. Vuyst, L.De. y Vandamme, E.J.) Blackie Academic & Professional, London, 91-143.
- Whistler, R. S. y BeMiller, J. N. 1962. Chitin. En *Preparation and characterization of chitin and chitosan. A Review Journal of aquatic food product technology*, vol. 4 (2).
- Woolford, M. K. 1985. The silage fermentation. En *Microbiology of Fermented Food* (ed, Wood, B.J.B.) Elsevier Applied science, London, 85-113.
- Wu, A. C. M. y Bough, W. A. A study of variables in the chitosan manufacturing process in relation to molecular-weight distribution, chemical characteristics and waste-treatment effectiveness. In *Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan*; Muzzarelli, R. A. A., Paris-er, E. R., Eds.; MIT Sea Grant Program: Cambridge, MA, 1978. pp 88-102.
- Zakaria, Z. 1997. Lactic acid purification of chitin from prawn waste, using a horizontal rotating bioreactor. Tesis Doctoral, Universidad de Loughborough, Gran Bretaña.
- 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.
-

Anexo 1

Determinación de carbohidratos totales (Método Fenol-Sulfúrico)

Todos los azúcares se deshidratan con ácido sulfúrico concentrado formando furfurales o alguno de sus derivados, los que a su vez se condensan con fenoles presentes en la mezcla de reacción para dar compuestos de coloración naranja amarillento cuya intensidad se mide espectrofotométricamente.

Reactivos

- Fenol 5%. Pesar 5 gramos de fenol (cristales) fundirlos cuidadosamente a 50°C y aforar a 100 ml con agua destilada (Coloración ligeramente amarillenta).
- H₂SO₄ concentrado
- Solución estándar de azúcar 0.1 mg/ml (100 µg/ml). Pesar 100 mg de azúcar, disolverla en agua destila y llevarla a un volumen de 1000 ml.

Curva estándar:

A partir de la solución estándar (100 µg/ml) de azúcar, proseguir como se indica a continuación:

Volumen del estándar (ml)	Volumen de agua (ml)	µg del estándar
0.00	1.0	0
0.20	0.8	20
0.40	0.6	40
0.60	0.4	60
0.80	0.2	80
1.00	0.0	100

A cada tubo se le adicionó 1.0 ml de fenol a 5% e inmediatamente se agregó cuidadosamente 5 ml de H_2SO_4 concentrado. Se mezcló perfectamente y se dejó reposar aproximadamente 10 minutos. La absorbancia fue medida a 490 nm.

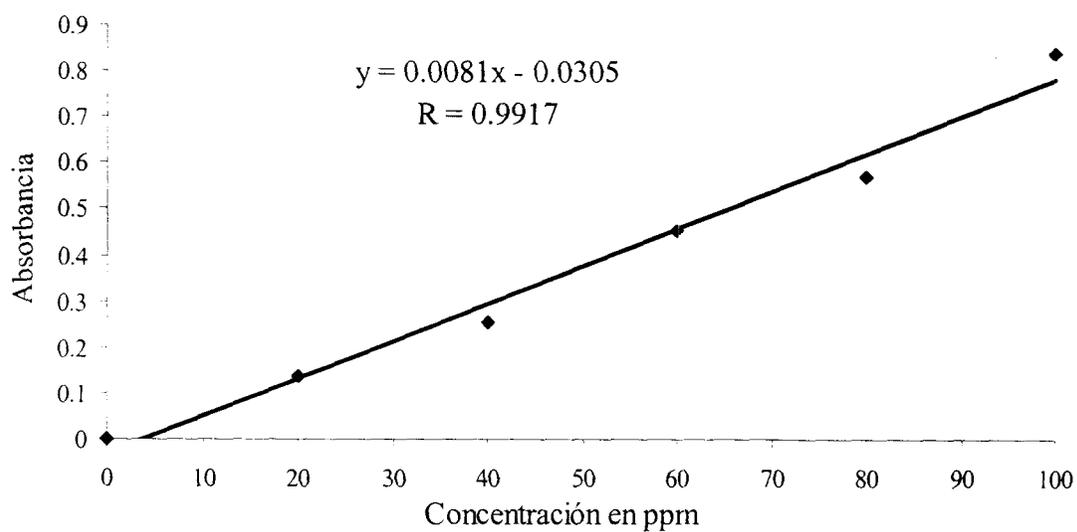


Figura 27. Curva estándar para determinar azúcares totales.

Anexo 2

Fermentación láctica.

Análisis de variancia para la determinación de la fuente de carbono, concentración de la fuente de carbono y nivel de inoculación.

Tabla 13. Análisis de variancia para la acidez total titulable (ATT) de ensilados de cabezas de camarón *Penaeus sp.* (SAS, 1989).

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media Cuadrada	Pr>F
Modelo	8	323.47231216	40.4340390	0.0001
Error	349	113.57629855	0.32543352	
Total corregido	357	437.04861117		
R-Cuadrada	Coefficiente de Variación	Media del error (MSE)	Media ATT	
0.740129	24.077750	0.57046781	2.36927374	

Tabla 14. Análisis de variancia. Fuentes de variación y sus interacciones (SAS, 1989).

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media Cuadrada	Pr>F
Carbohidrato	2	97.8342035	48.9171017	0.0001
Concentración de carbohidrato	1	2.5272270	2.5272270	0.0056
Inoculo	2	19.4132265	9.7066133	0.0001
Tiempo	3	203.6976556	67.8992185	0.0001

Tabla 15. Comparación de medias de acidez total titulable por la prueba de Duncan en las diferentes fuentes de variación.

Carbohidrato	Media	Grupo de Duncan
Sacarosa	3.0130	A
Lactosa	2.3749	B
Suero de leche	1.7307	C
Concentración del carbohidrato	Media	Grupo de Duncan
20%	2.4538	A
10%	2.2857	A
Concentración del inoculo	Media	Grupo de Duncan
10%	2.5613	A
5%	2.5020	A
0%	2.0390	B
Tiempo	Media	Grupo de Duncan
96	3.5180	A
72	2.6288	B
48	2.0714	C
24	1.4456	D

A, B, C, D: Medias con la misma letra son estadísticamente iguales

Tabla 16. Análisis de varianza para pH de ensilados de cabezas de camarón *Penaeus* sp.. (SAS, 1989).

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media Cuadrada	Pr>F
Modelo	9	419.34879260	49.5943102	0.0001
Error	440	59.99321540	0.13634822	
Total corregido	449	479.34200800		
R-Cuadrada	Coefficiente de Variación	Media del error (MSE)	Media pH	
0.874843	6.1704067	0.36925359	5.98426667	

Tabla 17. Análisis de varianza. Fuentes de variación y sus interacciones (SAS, 1989).

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media Cuadrada	Pr>F
Carbohidrato	2	104.411944	52.205972	0.0001
Concentración de carbohidrato	1	0.745648	0.745648	0.0198
Inoculo	2	14.139213	7.069607	0.0001
Tiempo	4	300.051988	75.012997	0.0001

Tabla 18. Comparación de medias de pH por la prueba de Duncan en las diferentes fuentes de variación.

Carbohidrato	Media	Grupo de Duncan
Sacarosa	5.3936	A
Lactosa	5.9978	B
Suero de leche	6.5694	C
Concentración del carbohidrato	Media	Grupo de Duncan
20 %	6.0253	A
10 %	5.9439	B
Concentración del inoculo	Media	Grupo de Duncan
0%	6.1998	A
5%	5.9866	B
10%	5.7649	C
Tiempo (Horas)	Media	Grupo de Duncan
0	7.3684	A
24	6.3776	B
48	5.7560	C
72	5.3558	D
96	5.0817	E

A, B, C, D y E: Medias con la misma letra son estadísticamente iguales

Anexo 3

Curvas estándares de ácido láctico y ácido acético.

Para la obtención las curvas estándares de ácido láctico y acético, se utilizaron concentraciones de 0, 0.25, 0.5 y 1.0 mg/ml de cada uno y se analizaron por HPLC en las condiciones mencionadas en la metodología. En las figuras 22 y 23 se muestran las curvas obtenidas para cada ácido.

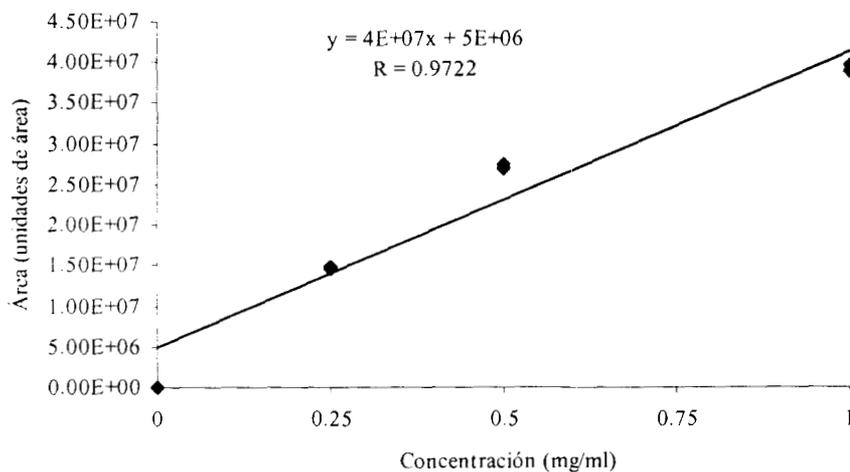


Figura 28. Curva estándar para ácido acético.

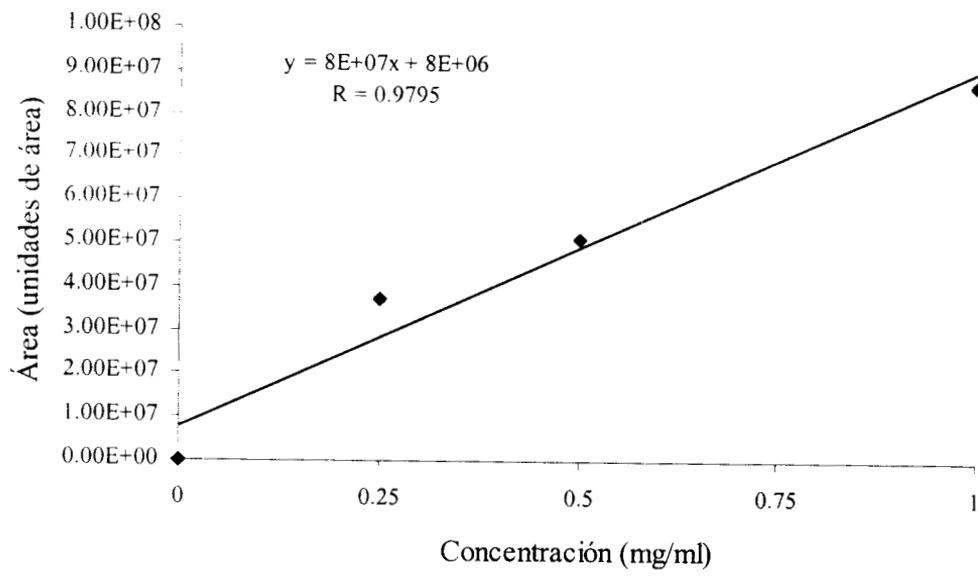


Figura 29. Curva estándar para ácido láctico.

Anexo 4

Curva estándar de calcio (CaCO₃)

Para la realización de la curva estándar de calcio se utilizaron concentraciones de 0 a 4 partes por millón de carbonato de calcio, el cual fue determinado como se menciona en la metodología por espectrofotometría de absorción atómica a 422 nm. En la figura 24 es mostrada la curva estándar de calcio (CaCO₃).

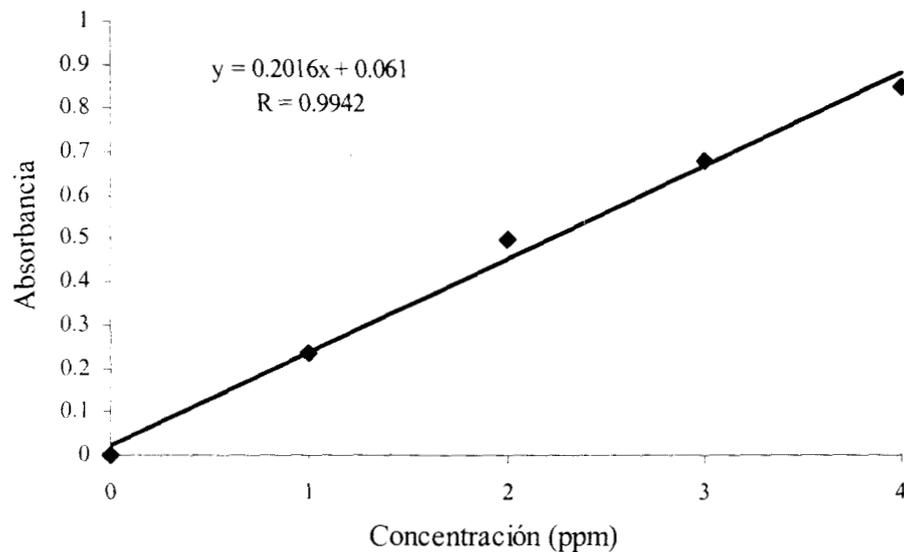


Figura 30. Curva estándar para determinar calcio (CaCO₃)