XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

I
256

84935

XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA



Iztapalapa

Utilización de desperdicios de camarón para recuperación de quitina, proteínas y pigmentos por vía microbiana

T E S I S
que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Biológicas
P R E S E N T A

Shirai Matsumoto Concepción Keiko

1999

XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

"El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana esta incluido en el Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio número PFP-200-93"

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó

M.en B. Concepción Keiko Shirai Matsumoto

El día 29 de abril del año de 1999

Comité Tutorial:

Tutor: Dra. Isabel Guerrero-Legarreta

Asesor: Dr. Sergio Huerta-Ochoa

Asesor: Dr. Gerardo Saucedo-Castañeda

Sinodal: Dr. Ramón Cruz Camarillo

Sinodal: Dr. Sergio Revah Moiseev

Quisiera agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de estudios otorgada para la realización de esta tesis; y a la Universidad Autónoma Metropolitana. Asimismo al apoyo brindado por el Consejo Británico para la realización de una estancia de investigación en la Universidad de Loughborough, Reino Unido para realizar parte del trabajo experimental.

CONTENIDO

Agradecimientos

Resumen

Página

Indice i

Indice de tablas vi

Indice de figuras xiii

I. Revisión Bibliográfica

I.1. Visión general del cultivo y captura de camarón en México 1
I.1.1 Sistemas de producción de camarón 2
Captura 2
Acuicultura 4
I.1.2. Captura de camarón 4
Costa del Pacífico 4
Costa del Atlántico 5
I.1.3. Especies de camarones en México 5
I.1.4. Manejo de camarón post captura 7
I.1.5. Composición de desechos de crustáceos y destino 8
I.1.6. Calidad microbiológica del camarón 9
I.2. Quitina y Quitosana 12
I.2.1. Ocurrencia y Estructura 12
I.2.2. Procesos de obtención 16
I.2.3. Propiedades 19
Quitina 19
Quitosana 21
I.2.4. Aplicaciones 21
Alimentos 22
Ambiental 23
Cosmetología 23
Otras aplicaciones 24
I.2.5. Métodos de determinación 24
I.2.6. Determinación del grado de acetilación 28

I.3. Proteasas 32
I.3.1. Proteasas de animales marinos 33
Proteasas serínicas. Tipo Tripsina 34
Proteasas cisteínicas o tiolproteasas. Tipo Catepsina. 35
Metaloproteasas. Colagenasas 35
I.3.2. Proteasas en camarón 36
I.3.3. Aplicaciones 38

I.4. Pigmentos Carotenoides 39
I.4.1. Ocurrencia 39
I.4.2. Factores que afectan la extracción y análisis 40
Oxidación 40
Luz y calor 41
Acidos y alcalis 41
Pureza de solventes, adsorbentes y reactivos 42
I.4.3. Métodos de extracción 42
I.4.4. Determinaciones cuantitativas 43
Espectrofotometria 43
Cromatografia de liquidos por alta resolucion (HPLC) 44
I.5. Bacterias lácticas 44
I.5.1. Concepto 44
I.5.2. Desarrollo de los cultivos Iniciadores 45
Tipos de cultivos iniciadores 46
I.5.3. Propiedades antagónicas 46
Peróxido de hidrógeno 47
Sistema lactoperoxidasa antimicrobiano 47
Diacetilo(2,3-butadiona) 48
Bacteriocinas 48
Reuterina 49
I.5.4. Características fermentativas 49
I.5.5. Actividad Proteolítica 50
I.5.6. Bacterias lácticas aisladas en organismos marinos 52
I.5.7. Ensilados 55
Definición 55
Ensilado químico 55
Ensilado fermentado 55

II. Justificación del proyecto 57

III. Antecedentes del proyecto 59

IV.Objetivos 59
Objetivos Generales 59
Objetivos Particulares 60

V. Materiales y Métodos 61
V.1. **Fermentación láctica** 61
V.1.1. Materiales 61
V.1.2. Microorganismos 61
V.1.3. Selección del iniciador 63
V.1.4. Concentración de glucosa y nivel de inóculo para el iniciador seleccionado 63
V.1.5. Análisis químicos 64
Acidez 64
Contenido de glucosa por método de Azúcares reductores 64
Contenido de glucosa, ácidos orgánicos y etanol por HPLC 65
V.1.6. Determinación de la microflora 65

V.2. **Recuperación de productos** 66

V.2. **Purificación parcial de proteasas.** 66
V.2.1. Materiales 66
V.2.2. Actividad proteolítica 66
V.2.3. Determinación de proteína 66
V.2.4. Ultrafiltración 67
V.2.5. Filtración en gel a baja presión 68
V.3. **Extracción de quitina** 70
V.3.1. Materiales 70
V.3.2. Extracción de quitina 70
Extracción de Pigmentos 70
Desmineralización 71
Desproteinización química 71
Desproteinización enzimática 72
Blanqueado 72
V.3.3. Análisis de muestras 73
Determinación de humedad 73
Contenido de calcio 73
Contenido de proteína 74
Proteína soluble 74
Nitrógeno total 74
Nitrógeno proteico 75
Análisis elemental: Carbono, Hidrógeno y Nitrógeno 75
V.3.4. Grado de acetilación 76

VI. Resultados y Discusión 77
VI.1. **Fermentación láctica** 77
VI.1.1. Selección del iniciador 77
pH 79
Acidez Total Titulable
(ATT % expresado como ácido láctico) 79
Acido láctico 80
Actividad de agua (a_w) 81

VI.1.2. Concentración de glucosa
y nivel de inoculación 83
VI.1.2.1. Análisis de varianza 89
VI.1.2.2. Modelos de regresión lineal.
Superficies de respuesta 91
VI.1.2.3. Modelos de regresión no lineal 95
Consideraciones teóricas 96
Efecto de la inoculación
sobre la producción de ácido láctico
predicha por el modelo de Gompertz. 97
VI.1 3. Relación pH y acidez producida 101
VI.1.4. Determinación del patrón fermentativo 103
VI.1.7. Evolución de la microflora 104

VI.2. **Recuperación de productos** 111
VI.2.1. **Purificación parcial de proteasas.** 111
VI.2.1.1. Métodos de concentración 111
Precipitación con etanol 113
Precipitación con sulfato de amonio 113
Liofilización/ultrafiltración 115
VI.2.1.2.Determinación del peso molecular
de las fracciones de ultrafiltración. 119

VI.2.2. **Extracción de Quitina y Pigmentos.** 125
VI.2.2.1. Separación del sólido después
de la fermentación 125
VI.2.2.2. Extracción de Pigmentos 127
VI.2.2.3. Desmineralización 129
VI.2.2.3.1. Desmineralización durante la
fermentación 130
VI.2.2.3.2. Desmineralización con
ácido clorhídrico 131

VI.2.2.4. Desproteinización 132
VI.2.2.4.1. Desproteinización durante la fermentación 133
VI.2.2.4.2. Desproteinización enzimática 133
Determinación del tiempo de reacción enzimática 134
Uso de otras enzimas 136
Desproteinización de residuos quitinosos 137
VI.2.2.4.3. Desproteinización química 147
Nitrógeno total en las etapas del proceso 147
Análisis Elemental 150
Análisis de espectros de infrarrojo 151
Grado de acetilación 155
VII. Conclusiones 157
VIII. Recomendaciones 160
IX. Referencias 162
Apéndices

Indice de Tablas

I. Revisión Bibliográfica

Página

Tabla I.1. Principales países productores de camarón (toneladas métricas). 2

Tabla I.2. Especies de camarones producidos o capturados en México. 6

Tabla I.3. Composición aproximada de diferentes especies y tipo de desechos de crustáceos y harina de pescado (Porcentaje en base seca). 8

Tabla I.4. Contenido de quitina en crustáceos, insectos, moluscos y hongos. 14

Tabla I.5. Características y tipos de enzimas en crustáceos reportadas en la literatura. 37

Tabla I.6. Métodos de extracción reportados para la extracción de pigmentos. 42

V. Materiales y Métodos

V.1. Fermentación láctica

Tabla V.I. Microorganismos iniciadores probados en fermentación láctica de camarón. 62

Tabla V.2. Características generales de membranas de ultrafiltracion utilizadas (Harris, 1989). 67

VI. Resultados y Discusiones

VI.1. Fermentación láctica del desecho de camarón

Tabla VI.1. pH, ATT(%), a_w, glucosa y productos de fermentación (HPLC) determinados en desecho de camarón fermentado 48 horas a 30°C, utilizando diferentes iniciadores (10^8 ufc/ml). 78

Tabla VI.2. Modelos ajustados para las superficies de respuesta, que predicen la producción de ácido láctico (%ATT) con diferentes concentraciones iniciales de glucosa durante la fermentación. 94

Tabla VI.3. Resultados del ajuste de la producción de ácido observada en el modelo de Gompertz en ensilado de camarón a diferentes niveles de inoculación de *Lactobacillus sp* (B2). 99

Tabla VI.4. Parámetros estimados para el modelo mecanistico, correlación pH y ATT (ecuación 4). 101

Tabla VI.5. Productos finales de fermentación después de 48 horas: ácido láctico, acético, etanol y glucosa determinadas por HPLC, con 10 % de glucosa y *Lactobacillus sp.* B2 como iniciador. 103

Tabla VI.6. Tabla de purificación de los extractos crudos obtenidos del licor de la fermentación a 70 y 80 % de saturación de sulfato de amonio. Actividades proteolíticas en caseína a pH 7. 115

Tabla VI.7. Actividad en las fracciones obtenidas durante la ultrafiltración del licor de la fermentación, utilizándose como sustrato hemoglobina a pH 2. 116

Tabla VI.8. Actividad detectada en las fracciones obtenidas durante la ultrafiltración del licor de la fermentación, utilizándose como sustrato caseína pH 7. 117

Tabla VI.9. Contenido y balance de proteína en las diferentes fracciones de ensilado de camarón obtenidas por ultrafiltración. 118

Tabla VI.10. Pesos y contenido de humedad de las diferentes fracciones. 125

Tabla VI.11. Análisis aproximado en base seca del desecho inicial, sólido y licor obtenidos después de la fermentación. 131

Tabla VI.12. Contenido de calcio y quitina en base seca a partir del desecho sin fermentar y sólido (después de la fermentación). 131

Tabla VI.13. Contenido de Proteína en base seca a partir del desecho sin fermentar, sólido y licor (después de la fermentación) así como porcentaje de proteína removida. 133

Tabla VI.14. Condiciones del medio de desproteinización enzimática de desecho de camarón fermentado y sin fermentar. 136

Tabla VI.15. Proteína soluble obtenida después de diferentes tratamientos sobre desechos desmineralizados y sin fermentar. 140

Tabla VI.16. Proteína soluble obtenida después de diferentes tratamientos sobre desechos desmineralizados y fermentados. 140

Tabla VI.17. Análisis elemental de muestras sin fermentar de desproteinización enzimática. 144

Tabla VI.18. Ànálisis elemental de muestras fermentadas de desproteinización enzimática. 145

Tabla VI.19. Absorbencias a 3425 y 1652 cm^{-1}, picos característicos de pigmentos (Muriana y col., 1993) para desechos sin fermentar, tratamiento enzimático después de 48 horas (Figura VI.25, espectro FTIR). 146

Tabla VI.20. Absorbencias a 3425 y 1652 cm^{-1}, picos característicos de pigmentos (Muriana y col., 1993) para desechos fermentados, tratamiento enzimático después de 48 horas (Figura VI.25, espectro FTIR). 147

Tabla VI.21. Análisis elemental de muestras de *Penaeus monodon*, con diferentes tratamientos y estándares comerciales de quitina y quitosano, así como valores teóricos. 150

Tabla VI.22. Grado de N-acetilación de acuerdo a la relación de absorbencias A_{1655}/ A_{3450} de las quitinas obtenidas así como estándares comerciales. 156

APENDICE I

Tabla AI1. Ecuación de la curva de densidad óptica (D.O.) contra peso seco (g/l).

177

APENDICE II

Tabla AII1. Análisis de varianza del modelo para explicar la producción de ácido (ATT) de ensilados fermentados de camarón. Fuentes de variación: glucosa (5, 7.5, 10 y 15% p/p), inóculo (0, 5, 10 y 20% v/p) y tiempo (0,4,8, 24 y 48 horas) (SAS, 1989).

180

Tabla AII2. Ecuaciones de las curvas estándares de glucosa, ácido láctico, acético y etanol por HPLC.

181

APENDICE III

Tabla AIII1. Análisis de varianza del modelo para elegir la membrana de ultrafiltración con mayor retención de proteasas, es decir, retenidos con actividad en hemoglobina pH 2. Membranas con diferentes cortes moleculares: 2, 10, 50 y 300 kDa (SAS, 1989).

182

Tabla AIII2. Pruebas de Duncan, comparación de medias de actividad específica en membranas de ultrafiltración, retenidos con actividad en hemoglobina pH 2. (SAS, 1989).

182

Tabla AIII3. Análisis de varianza del modelo para elegir la membrana de ultrafiltración. Permeados con actividad en hemoglobina pH 2. Membranas con diferentes cortes moleculares: 2, 10, 50 y 300 kDa (SAS, 1989). 183

Tabla AIII4. Pruebas de Duncan, comparación de medias de actividad específica en membranas de ultrafiltración, permeados con actividad en hemoglobina pH 2. (SAS, 1989). 183

Tabla AIII5. Análisis de varianza del modelo para elegir la membrana de ultrafiltración con mayor retención de proteasas, es decir, retenidos con actividad en caseína pH 7. Membranas con diferentes cortes moleculares: 2, 10, 50 y 300 kDa (SAS, 1989). 184

Tabla AIII6. Pruebas de Duncan, comparación de medias de actividad especifica en membranas de ultrafiltración, retenidos con actividad en caseína pH 7. (SAS, 1989). 184

Tabla AIII7. Análisis de varianza del modelo para elegir la membrana de ultrafiltración. Permeados con actividad en caseína pH 7. Membranas con diferentes cortes moleculares: 2, 10, 50 y 300 kDa (SAS, 1989). 185

Tabla AIII8. Pruebas de Duncan, comparación de medias de actividad específica en membranas de ultrafiltración, permeados con actividad en caseína pH 7. (SAS, 1989). 185

Tabla AIII9. Proteínas con peso molecular conocido utilizadas para la curva de calibración mediante cromatografía de filtración en gel. 186

APENDICE IV

Tabla AIV1. Análisis de varianza del modelo comparando solventes para la extracción de pigmentos en muestras fermentadas y sin fermentar, variable de respuesta concentración de pigmento. (SAS, 1989). 192

Tabla AIV2. Pruebas de Duncan, comparación de medias de concentración de pigmento con diferentes solventes. (SAS, 1989). 192

Tabla AIV3. Pruebas de Duncan, comparación de medias de concentración de pigmento con muestras fermentadas y sin fermentar. (SAS, 1989). 192

Tabla AIV4. Análisis de varianza del modelo comparando el uso de enzimas (proteasas de camarón; mezcla de Neutrasa, Savinasa, Pronasa y Alcalasa; tripsina y sin enzimas(Control)) en muestras fermentadas y sin fermentar, tiempo 0, 24 y 48 horas de reacción, variable de respuesta concentración de proteína en los medios de reacción enzimática. (SAS, 1989). 194

Tabla AIV5. Pruebas de Duncan, comparación de medias de concentración de proteína en medios de reacción enzimática de muestras de camarón. (SAS, 1989). 194

Tabla AIV6. Pruebas de Duncan, comparación de medias de concentración de proteína en medios de reacción enzimática de diferentes enzimas. (SAS, 1989). 195

Tabla AIV7. Pruebas de Duncan, comparación de medias de concentración de proteína en medios de reacción enzimática de diferentes tiempos (SAS, 1989). 195

Tabla AIV8. Análisis de varianza del modelo comparando el uso de enzimas (proteasas de camarón; mezcla de Neutrasa, Savinasa, Pronasa y Alcalasa; tripsina y sin enzimas(Control)) en muestras fermentadas y sin fermentar, tiempo 0, 24 y 48 horas de reacción, variable de respuesta nitrógeno total en los sólidos después de la reacción enzimática. (SAS, 1989). 196

Tabla AIV9. Pruebas de Duncan, comparación de medias de nitrógeno total en residuos de muestras de camarón. (SAS, 1989). 196

Tabla AIV10. Pruebas de Duncan, comparación de medias de nitrógeno total en residuos de muestras de camarón con diferentes enzimas. (SAS, 1989).

197

Tabla AIV11. Pruebas de Duncan, comparación de medias de nitrógeno total en residuos de muestras de camarón a diferentes tiempos (SAS, 1989).

197

Indice de Figuras

I. Revisión Bibliográfica

Página

Figura I.1. Producción de camarón en México1952-1997 (hasta Septiembre). 3

Figura I.2. a) Quitina; b) Quitosana. 12

Figura I.3. Proceso convencional para la obtención de quitina y quitosana. 17

Figura I.4. Aplicaciones y distribución del mercado de las enzimas (Dziezak,1991). 32

Figura I.5. Principales rutas de fermentación de carbohidratos por parte de las bacterias lácticas. 51

Figura I.6. Representación esquemática de la posible localización de proteínasas y peptidasas en bacterias lácticas (Law y Kolstad, 1983). 52

V. Materiales y Métodos

V.1. Fermentación láctica

Figura V.1. Diagrama de flujo seguido para el aislamiento y purificación parcial de proteasas a partir de desperdicio de camarón. 69

VI. Resultados y Discusiones

VI.1. Fermentación láctica del desecho de camarón

Figura VI.1. Efecto del tiempo de cultivo e iniciador sobre la actividad de agua en fermentaciones de cabeza de camarón con 10 % de glucosa (p/p, base húmeda) a 30°C. 82

Figura VI.2. Fermentaciones de desecho de camarón adicionados con glucosa 5 % (p/p base húmeda) y diferentes concentraciones de inóculo *Lactobacillus sp* (B2). pH, glucosa

(azúcares reductores), %acidez total titulable determinados a diferentes tiempos de fermentación. Niveles de inoculación (% v/p): ◆ 0, ● 5, ▲10 y ✕20.

84

Figura VI.3. Fermentaciones de desecho de camarón adicionados con glucosa 7.5 % (p/p base húmeda) y diferentes concentraciones de inóculo *Lactobacillus sp* (B2). pH, glucosa (azúcares reductores), %acidez total titulable determinados a diferentes tiempos de fermentación. Niveles de inoculación (% v/p): ◆ 0, ● 5, ▲10 y ✕20.

85

Figura VI 4. Fermentaciones de desecho de camarón adicionados con glucosa 10 % (p/p base húmeda) y diferentes concentraciones de inóculo *Lactobacillus sp* (B2). pH, glucosa (azúcares reductores), %acidez total titulable determinados a diferentes tiempos de fermentación. Niveles de inoculación (% v/p): ◆ 0, ● 5, ▲10 y ✕20.

86

Figura VI.5. Fermentaciones de desecho de camarón adicionados con glucosa 15 % (p/p base húmeda) y diferentes concentraciones de inóculo Lactobacillus sp (B2). pH, glucosa (azúcares reductores), %acidez total titulable determinados a diferentes tiempos de fermentación. Niveles de inoculación (% v/p): ◆ 0, ● 5, ▲10 y ✕20.

87

Figura VI.6. Producción de ácido láctico a diferentes condiciones de glucosa y tiempo en ensilados de camarón. (A) sin inóculo (control); (B) 5% (v/p base húmeda) *Lactobacillus sp.* (B2).

92

Figura VI.6. Producción de ácido láctico a diferentes condiciones de glucosa y tiempo en ensilados de camarón. (A) 10% (v/p base húmeda); (B) 20% (v/p base húmeda) *Lactobacillus sp.* (B2).

93

Figura V1.8. Efecto de los niveles de inoculación de *Lactobacillus sp.* sobre la producción de ácido láctico, determinados por acidez total titulable, en fermentaciones de camarón con 10% p/p base húmeda (365.5 gkg^{-1} base seca) de glucosa.

98

Figura V1.9. Efecto de los niveles de inoculación de *Lactobacillus sp.* sobre el consumo de glucosa (365.5 gkg^{-1} base seca), determinado por HPLC, en fermentaciones de camarón. 100

Figura VI.10. Correlación de pH y acidez total titulable (% ácido láctico) en ensilado de camarón con diferentes concentraciones de glucosa: 5, 7.5, 10 y 15 % (p/p base húmeda); niveles de inoculación de 0, 5, 10 y 20 % (v/p base húmeda).

102

Figura VI.11. Cuenta de mesófilos, coliformes y bacterias lácticas durante la fermentación láctica de desechos de camarón sin inocular y con 10% p/p base húmeda de glucosa.

106

Figura VI.12. Cuenta de mesófilos, coliformes y bacterias lácticas durante la fermentación láctica de desechos de camarón con 5% de inoculo y con 10% p/p base húmeda de glucosa. 107

Figura VI.13. Diagrama de flujo seguido para la concentración de las proteasas de la fracción soluble del ensilado de camarón (Pp. Precipitación). 112

Figura VI. 14. Actividad específica a diferentes porcentajes de saturación de sulfato de amonio, del licor obtenido de la fermentación láctica de cabeza de camarón.

114

Figura VI.15. Cromatograma de filtración en gel de las fracciones obtenidas de la ultrafiltración con membrana de 10kDa de corte de peso molecular, y citocromo C.

120

Figura VI.16. Distribución por peso molecular de las proteínas de las fracciones de ultrafiltración con membrana de corte molecular de 10 kDa (YM10).

121

Figura VI.17. Cromatografía de filtración en gel del concentrado de la membrana de MWCO de 10 kDa. Actividad especifica sobre caseína a pH 7 y hemoglobina pH 2.

123

Figura VI.18.Diagrama de flujo del procedimiento general para extraer quitina, quitosano pigmentos del desecho de camarón fermentado y sin fermentar.

126

Figura VI.19. Contenido de pigmentos (μg/g), en los sistemas de solventes empleados en muestras de camarón fermentado y sin fermentar.

129

Figura VI.20. Hidrólisis de proteína durante el tratamiento con tripsina en el sólido, determinando proteína soluble en el medio de reacción a través del tiempo.

135

Figura VI.21. Proteína soluble liberada (Peterson, 1977) determinados en los medios de reacción enzimática y química de los desechos sin fermentar desmineralizados.

137

Figura VI.22. Proteína soluble liberada (Peterson, 1977) determinados en los medios de reacción enzimática y química de los desechos fermentados y desmineralizados.

138

Figura VI.23. Nitrógeno total por Kjehldal (Pearson, 1981) determinado en los sólidos después de la reacción enzimática y química de los desechos sin fermentar desmineralizados. 142

Figura VI.24. Nitrógeno total por Kjehldal (Pearson, 1981) determinado en los sólidos después de la reacción enzimática y química de los desechos fermentados y desmineralizados. 143

Figura VI.25. Espectros FTIR para desechos sin fermentar, tratamiento enzimático después de 48 horas. 145

Figura VI.26. Espectros FTIR para desechos fermentados, tratamiento enzimático después de 48 horas. 146

Figura VI.27. Nitrógeno total por Kjehldal (Pearson, 1981) determinado en los sólidos sin fermentar después del proceso químico. 148

Figura VI.28. Nitrógeno total por Kjehldal (Pearson, 1981) determinado en los sólidos fermentados después del proceso químico. 149

Figura VI.29. Espectros FTIR para proceso químico de desecho sin fermentar a)inicial, b)después de extracción de pigmentos y desmineralización, c)después de desproteinización, d) blanqueado, e) quitina comercial (Sigma). 152

Figura VI.30. Espectros FTIR para proceso químico de desechos fermentados a)inicial, b)después de extracción de pigmentos y desmineralización, c)después de desproteinización, d) blanqueado, e) quitina comercial (Sigma). 153

Figura VI.31. Espectros FTIR para a) quitina comercial (Sigma), b)quitosano (Fluka). 154

APENDICE I

Figura AI1. Logaritmo de cuenta viable y cambios de absorbencia (540 nm) de *Lactobacillus sp.* (B2) en medio APT a 30°C 177

Figura AI2. Curva estándar de seroalbúmina bovina analizada por el método de Lowry-Peterson. 179

APENDICE III.

Figura AIII1. Curva de calibración para determinación de peso molecular por cromatografía de filtración en gel. 187

Figura AIII.2. Cromatograma de ovoalbumina y citocromo C, tiempos de retención (min) de 58.95 y 74.67 respectivamente. 188

Figura AIII.3. Cromatograma de triptofano y tirosina, tiempos de retención (min) de 101 y 122 respectivamente. 189

Figura AIII.4. Cromatograma de azul dextran, seroalbúmina bovina y citocromo C, tiempos de retención (min) de 36.56, 54.14 y 74.67 respectivamente. 190

Figura AIII.5. Cromatograma de Azul dextran (1), Lactato deshidrogenasa (2), Seroalbúmina bovina (3), Ovoalbúmina (4), Citocromo C (5), Triptofano (6) y Tirosina (7), tiempos de retención (min) de 35, 62, 54.60, 55.03, 74, 101 y 122 respectivamente. 191

APENDICE IV

Figura AIV1. Curva de calibración de calcio (carbonato de calcio) por absorción atómica 193

Resumen

La fermentación láctica ha sido utilizada desde tiempos inmemoriales para aumentar la vida de anaquel de los alimentos, debido principalmente a la producción de ácidos orgánicos y compuestos con actividad antimicrobiana. En la presente tesis se estudió el uso de la fermentación láctica del desecho de camarón para la recuperación de productos de alto valor agregado, tales como quitina, pigmentos y proteasas.

En una primera etapa se establecieron las condiciones de la fermentación mediante la selección del iniciador, probando dos cultivos comerciales de Christian Hansen: Floracarn SL (*Lactobacillus pentosus* y *Staphylococcus carnosus*) y LP-1 (*Lactobacillus pentosus*), así como cepas aisladas de camarones tropicales identificadas como *Lactobacillus casei* (A3) y *Lactobacillus sp.* (B2). La cepa B2 y *Lactobacillus pentosus* produjeron concentraciones más altas de ácido láctico, aunque en las fermentaciones con *Lb. pentosus* se detectaron bajas concentraciones de ácido acético, de ahí que la cepa B2 fuera elegida para la determinación de las concentraciones de la fuente de carbono (glucosa) y nivel de inoculación.

Las concentraciones de glucosa e inóculo con las que se obtuvieron mejores resultados fueron 10% (p/p base húmeda) y 5% (v/p base húmeda), respectivamente. Para la elección de las condiciones antes mencionadas se realizaron análisis estadístico de varianza así como superficies de respuesta.

El uso de iniciador y la concentración inicial de glucosa fueron factores determinantes en la fermentación láctica de desechos de camarón. En este sentido, altas concentraciones de glucosa e iniciador redujeron el tiempo de fermentación, e incrementaron la concentración del ácido láctico producido. La inoculación modificó el patrón fermentativo de hetero a homoláctico.

La microflora mostró una reducción inicial de enterobacterias, sin embargo después de 8 horas la cuenta de coliformes aumentó, mientras que la de bacterias lácticas fue constante durante todo el tiempo de fermentación y solo hacia el final del cultivo disminuyó.

La segunda etapa consistió en el aislamiento de los productos: proteasas, quitina y pigmentos, a partir del ensilado obtenido después de 48 horas. Se separaron dos fracciones una sólida y otra líquida, las cuales fueron de un 55 a 60% y de 40 a 45 % del peso original en base húmeda, respectivamente. El sólido o sedimento consistió principalmente de quitina, proteína, pigmentos y minerales, en un 21.23, 21.73, 0.0123 y 8.21% (p/p base seca) respectivamente.

La purificación parcial de las proteasas a partir del ensilado fue llevada a cabo mediante ultrafiltración y cromatografía de permeación en gel (GPC). La fracción soluble de la fermentación fue filtrada y centrifugada, y el líquido liofilizado para su almacenamiento.

Posteriormente el polvo fue resuspendido y ultrafiltrado, su concentración y fraccionamiento fueron hechos probando diferentes membranas de 300, 50, 10 y 2 kDa. Las concentraciones de proteína y actividad proteolítica en caseína pH 7 y hemoglobina pH 2, fueron determinadas en el permeado y retenido de cada ultrafiltración realizada, observándose que había una mayor concentración de proteínas con actividad utilizando membranas de 2 y 10 kDa, no encontrándose diferencias significativas entre éstas. Sin embargo con la membrana de 2 kDa el proceso era muy lento, por lo que se eligió el retenido obtenido con la de 10 kDa.

Las fracciones de la ultrafiltración mostraron actividad en condiciones ácidas y alcalinas. El peso molecular de las fracciones con actividad fue determinado mediante GPC, correspondiendo a 13, 26 y 56 kDa; la actividad específica fue mayor a pH neutro que a ácido.

El retenido que fue la fracción que presentó mayor actividad fue aplicada en una etapa subsecuente para la desproteinización de quitina.

Por vía fermentativa se removió un 75.7 % de proteína y 65.80 % de calcio de la quitina cruda (sedimento). Posteriormente, se realizaron tratamientos químicos para llevar a cabo despigmentación, desmineralización y desproteinización, para este último tratamiento se probaron proteasas comerciales y proteasas aisladas del camarón (retenido).

Para la desproteinización enzimática se procedió a determinar el tiempo de reacción con tripsina bovina comercial durante 96 horas, encontrándose un aumento en la proteína soluble durante las primeras 48 horas, y después de ese tiempo la concentración de proteína soluble se mantuvo estable. Por lo que se fijó un tiempo de 48 horas para estudios con las otras enzimas, proteasas de camarón, mezcla de enzimas: Savinasa, Neutrasa, Alcalasa y Esperasa (Novo, Copenhague, Dinamarca).

Asimismo para comparar fueron obtenidas quitinas a partir del desecho sin fermentar y se analizaron productos comerciales.

Análisis elemental y espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier fueron empleadas para caracterizar las quitinas obtenidas. Los resultados indicaron que los productos de la fermentación láctica fueron similares a los producidos por métodos tradicionales.

ABSTRACT

Ensilation of prawn waste allows the recovery of added value products such as chitin, pigments and proteins, which could be used for animal feed, and other applications. Ensilation is defined as a conservation process in which acids, added or produced, inhibit the growth of pathogen microorganisms. In a fermented silage acid is produced *in situ* by lactic acid bacteria, using carbohydrate sources.

In this study the fermentation conditions and selection of microorganism were determined based on acid production, glucose concentration as carbohydrate source, and inoculum level. Afterwards the fermentation pattern was determined.

From the various lactic acid bacteria tested, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus sp.* (B2) were the best acid-producing microorganisms. However small quantities of acetic acid were detected in samples inoculated with *Lactobacillus pentosus,* therefore B2 was chosen for the determination of glucose and inoculum levels; the best results were obtained at 10% (w/w w.b.) and 5% (v/w w.b.), respectively.

The use of starters and the initial glucose concentration were critical factors in prawn head fermentation. High initial glucose and starter concentrations reduced fermentation time and increased the amount of lactic acid produced. Inoculation modified the fermentation from heterofermentative to homofermentative.

There was an initial reduction of enterobacteria, but after 8 hours of fermentation coliform counts increased whereas lactic acid bacteria counts were constant during most of the fermentation time, and decreased at the end.

The above described conditions produced a stable silage, with two fractions: solid and liquid. The next stage was the recovery of products: partial purification of proteases was done from the liquid by means of ultrafiltration and gel permeation chromatography. Molecular weight proteases ranged at 13, 26 and 56 kDa, specific activity was higher at pH 7 than 2.

Finally the chitin and pigments were extracted from the solid, 21 and 0.012 % (w/w wet basis), respectively. Chitin was isolated from the silage solid after demineralisation with hydrochloric acid and deproteination with alkali. Enzymatic deproteination was carried out using commercial proteases (Alcalase, Pronase, Savinase and Esperase) and proteases from the fermented prawn waste. Chitin FTIR spectra and elemental analysis were comparable with commercial products.

Keywords: prawn wastes, lactic acid fermentation, chitin, Lactobacillus, proteases, pigments, protein, silage.

R ESUMEN

El ensilado de camarón permite la recuperación de productos con valor agregado tales como quitina, pigmentos y proteínas, los cuales pueden ser utilizados para alimentación y diversas áreas de la industria. El ensilado se define como un proceso de conservación en el cual ácidos producidos o adicionados, inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos. En un ensilado fermentado el ácido es producido *in situ* por bacterias lácticas, que utilizan carbohidratos.

En este estudio las condiciones y selección de microorganismos fueron determinados con base a la producción de ácido, concentración de glucosa, y nivel de inoculación. Posteriormente el patrón fermentativo fue determinado.

Las diferentes bacterias lácticas probadas, *Lactobacillus pentosus* y *Lactobacillus sp.* (B2) fueron los microorganismos que mayor cantidad de ácido produjeron. Sin embargo pequeñas cantidades de ácido acético fueron detectadas en muestras inoculadas con *Lactobacillus pentosus*, de ahí que la cepa B2 fue escogida para la determinación de la concentración de glucosa y niveles de inoculación; los mejores resultados fueron con 10% (p/p base húmeda) y 5% (v/p base húmeda), respectivamente.

El uso de iniciadores y la concentración inicial de glucosa fueron factores determinantes en la fermentación de desechos de camarón. Altas concentraciones iniciales de glucosa e iniciadores redujeron el tiempo de fermentación e incrementaron la cantidad de ácido láctico producido. La inoculación modificó la fermentación de un patrón heterofermentativo a homofermentativo. Reducción inicial de enterobacterias fue observada, sin embargo después de 8 horas de

fermentación la cuenta aumento mientras que las cuentas de bacterias lácticas fueron constantes y descendieron hacia el final.

Las condiciones anteriormente descritas, 10% (p/p base húmeda) de glucosa y 5% (v/p base húmeda) de *Lactobacillus sp* (B2), produjeron un ensilado estable a temperatura ambiente, del cual se separaron dos fracciones:sólida y líquida.

La siguiente etapa fue la recuperación de productos a partir de estas fracciones:

Del licor obtenido se purificaron parcialmente proteasas mediante ultrafiltración y cromatografía de permeación en gel. El intervalo de pesos moleculares de proteasas se encontraron a 13, 26 y 56 kDa, la actividad específica más alta fue a pH neutro (7) que a ácido (2).

Finalmente quitina y pigmentos fueron extraidos a partir del sólido, 21 y 0.012 % (p/p base húmeda), respectivamente. La quitina aislada del ensilado después de la desmineralización con ácido clorhídrico y desproteinización con alcalí. La desproteinización enzimática fue llevada a cabo utilizando proteasas comerciales (Alcalasa, Pronasa, Savinasa y Esperasa) y proteasas del ensilado (retenido de la ultrafiltración). Los espectros de infrarojo y análisis elemental fueron comparables con productos comerciales.

Palabras claves: desechos de camarón, fermentación ácido láctica, quitina, Lactobacillus, proteasas, pigmentos, proteínas, ensilado.

I. Revisión Bibliográfica

La primera parte de este capítulo de revisión bibliográfica presenta la situación general del camarón, sistemas de producción, lugares de captura, especies de camarón en México, su manejos post captura, así como la microflora de mayor ocurrencia en estos alimentos La intención fue mostrar al lector, la importancia de la utilización de los desechos de camarón, por ser México productor y exportador de este alimento.

La segunda parte revisa algunos de los productos que pueden ser obtenidos, a partir de los desechos de camarón. Así pues se definen como compuestos recuperables quitina, quitosano, proteasas y pigmentos; revisandose las fuentes, estructura, propiedades y aplicaciones

I.1. Visión general del cultivo y captura de camarón en México

El cultivo de camarón a nivel mundial se ha incrementado en forma constante desde la mitad de los sesentas. Así, en 1972 se alcanzó un total de 1.2 millones de tons en peso vivo; en 1981 esta cifra se encontraba alrededor de 1.7 millones de tons. Para 1992, la captura mundial de camarón se vio incrementada por encima de 3 millones de tons (De Silva, 1998).

La captura y cultivo de camarón de los 20 principales países productores se muestra en la Tabla I.1. México ocupa el doceavo lugar, con un 2 a 3 % de la producción global de los países enlistados (INFOFISH,1993).

Tabla I.1. Principales países productores de camarón (tons métricas)

País	1988	1989	1990	1991	1992
China	583,825	502,355	532,154	534,208	544,807
Indonesia	229,938	239,572	249,899	286,433	321,494
Tailandia	164,552	203,130	224,357	289,862	302,100
India	216,349	226,119	245,062	300,474	280,139
E.U.A.	150,771	161,613	158,963	146,887	154,537
Filipinas	79,120	82,773	86,993	84,870	118,796
Ecuador	82,580	78,416	84,723	118,886	113,137
Vietnam	65,000	70,000	75,000	80,000	88,000
Groenlandia	60,019	62,692	73,715	73,110	81,916
Malasia	72,861	72,900	72,900	71,340	73,510
República de Corea	49,871	72,976	60,498	55,778	67,109
México	73,200	74,804	62,299	70,580	66,215
Noruega	42,169	56,084	62,700	47,772	48,812
Islandia	29,367	26,785	29,749	38,209	46,910
Japón	49,399	45,000	44,798	43,045	46,104
Brasil	46,610	48,236	50,464	42,310	44,019
Canadá	40,861	39,762	39,071	44,333	42,663
Pakistán	29,447	23,492	27,921	32,060	26,526
Argentina	18,138	11,857	10,049	8,367	24,777
Australia	22,600	27,875	22,429	27,862	23,866
Total	2,151,378	2,525,538	2,601,412	2,808,273	2,912,494

Fuente: INFOFISH, Asia-wide shrimp Agro-Industry sector study, 1989-93.

I.1.1. Sistemas de producción de camarón

Captura

México fue el primer país Latinoamericano en iniciar la pesca de camarón en forma comercial. La captura continúa siendo la más alta en Latinoamérica y está en segundo lugar en América después de Estados Unidos.

La producción de camarón en México alcanzó 85,901 tons en 1996, después de un período de declinación a inicios de los noventas (Figura I.1.). Las causas de este descenso no estan bien definidas, pero posiblemente se debió principalmente a factores como temperatura, descenso de las precipitaciones pluviales, incremento en el uso de pesticidas y las pérdidas de cieno.

Otros hechos negativos fueron las condiciones precarias en las que se encontraba la flota pesquera, la mala administración en las cooperativas y la captura ilegal por parte de pescadores furtivos (Departamento de Comercio. Servicios Oceánicos y Atmósfericos. 1992. Estados Unidos de América).

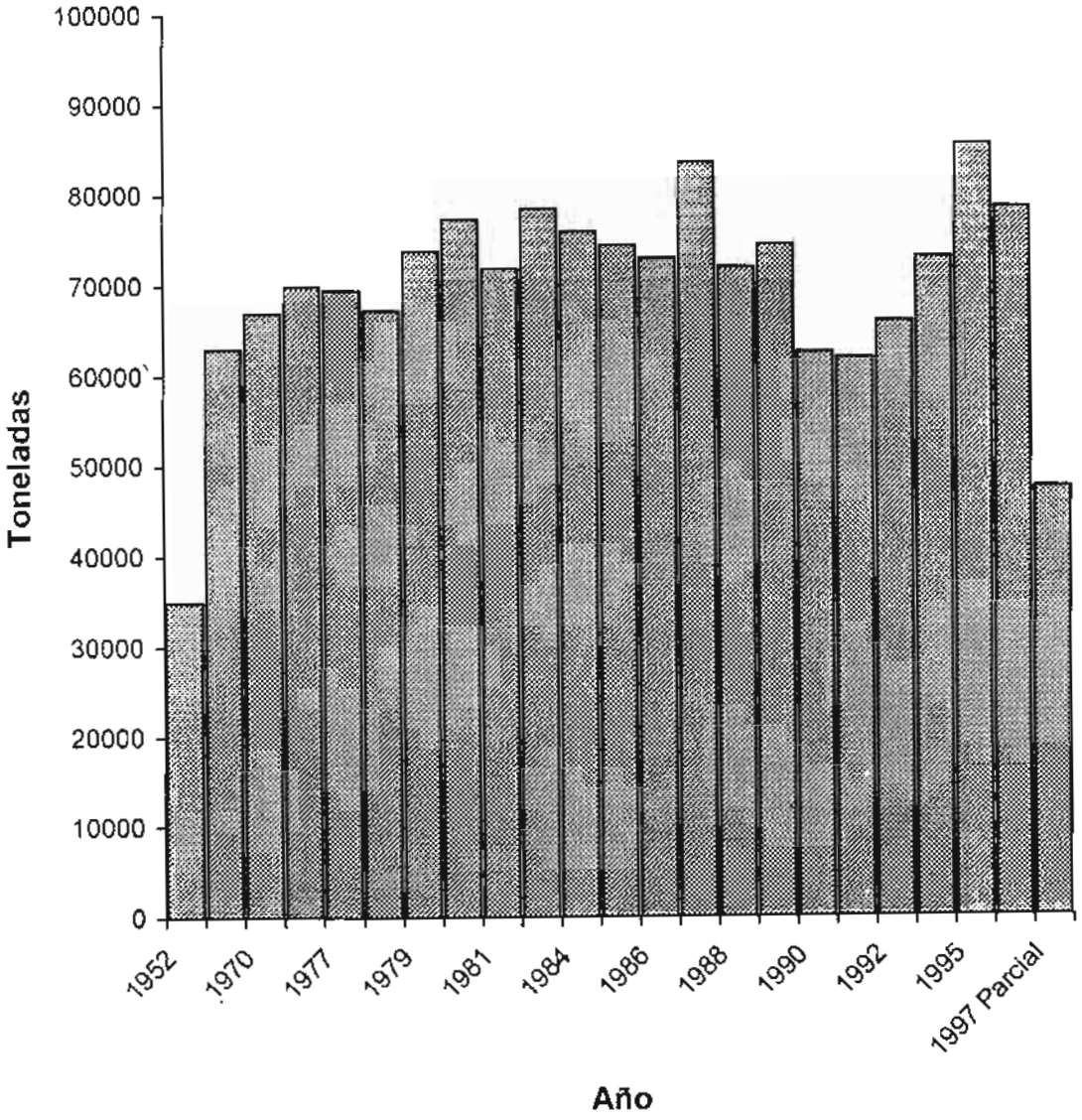


Figura I.1. Producción de camarón en México 1952-1997 (hasta Septiembre).
Fuente: SEMARNAP. Dirección General de Política y Fomento Pesquero.
Dirección de Estadística y Registro Pesquero.

Acuicultura

El gobierno de México inició un gran proyecto de desarrollo para la acuicultura desde los inicios de 1970 Se hicieron inversiones importantes de fondos públicos para la expansión de esta nueva industria, con el objetivo inicial de incrementar la producción de especies para la alimentación humana. Dentro de las políticas del gobierno para impulsar la acuicultura estuvieron la inauguración de instituciones de investigación, el patrocinio de proyectos en un gran número de universidades y el entrenamiento de técnicos en el área.

El camarón ha adquirido durante los últimos años un papel importante, siendo la segunda especie en términos de cantidad, pero la primera en cuanto al valor económico. El análisis del mercado nacional es difícil por carecerse de estadísticas confiables, en gran parte debido al contrabando por parte de pescadores furtivos, el cual se calcula que es alrededor de un 25 a 50% de la cantidad reportada oficialmente.

El mercado de camarón se expandió durante los ochenta a Europa, sin embargo Estados Unidos y Japón siguen siendo los principales clientes.

I.1.2. Captura de camarón

La captura de camarón en México es llevada a cabo en estuarios, cerca de las costas y en aguas costeras superficiales. Los pescadores mexicanos rara vez pescan a más de 40 km de la playa con la excepción de algunos lugares en el Atlántico, en los estados de Campeche y Yucatán.

Costa del Pacífico

La más importante zona de pesca de camarón es la costa norte del Pacífico en el golfo de California, la costa de Sonora y Sinaloa. Normalmente cerca del 60 al 70 % de la pesca de

camarón es llevada a cabo en esta área.

Estos estados tienen sistema de estuarios, lagunas, pantanos salinos y bahías, especialmente a lo largo de la costa central y sur. Los estuarios proveen un ambiente ideal para el desarrollo de larvas de camarón. En el verano las abundantes precipitaciones lavan nutrientes en los estuarios, apoyando el desarrollo de camarones jóvenes. Al final de Septiembre u Octubre los animales jóvenes comienzan a madurar y migrar fuera de la costa.

Costa del Atlántico

Existen dos pesquerías principales de camarón en el Golfo de México, la más importante de estas está en Ciudad del Carmen (Campeche), otra más pequeña que se encuentra al norte del Golfo hacia Tampico y Matamoros (Tamaulipas). Hacia la costa nordeste de la península de Yucatán se localiza una pesquera de camarón roca, esta última es de menor importancia.

La combinación de aguas poco profundas, un fondo lodoso-arenoso y la cercanía del hábitat de desarrollo de las larvas, hacen del banco de Campeche una de las áreas importantes de pesca de camarón. Los manglares y bahías a lo largo de la costa oeste de la península de Yucatán sirven como la principal área para el desarrollo de larvas de camarón rosado.

I.1.3. Especies de camarones en México.

La especie más importante capturada en la costa del Pacífico es posiblemente el camarón café (*Penaeus californiensis*), en tanto que en el Golfo de México y en el de Campeche es el rosado (*P. duorarum*); mientras que en Veracruz/Tamaulipas es el camarón café (*P. aztecus*). En las islas del Caribe mexicano se captura al camarón rosa manchado (*P. brasiliensis*) y roca (*Sicyonia brevirostris*).

Las especies marinas de importancia son: *P. californiensis, P. stylrostris, P. vanamei, P. brevirostris, P. duorarum, P.aztecus, P. brasiliensis, P. duorarum, P. setiferus* y *Sicyonia brevirostris.* La especie de agua dulce de mayor importancia es *Macrobrachium rosenbergii*, la cual es importada a México. Las variedades de camarones capturados en México se muestran en la Tabla I.2.

Tabla I.2. Especies de camarones producidos o capturados en México.

Nombres Científicos	Especies* Nombres en Inglés	Especies* Nombres en Español
Marinas		
Peneaus sp.	Penaeids/Shrimp	Penidios/Camarón
aztecus	Northern brown	Café norteño/café
brasiliensis	Redspotted	Rosado con manchas/café/moreno
brevirostris	Crystal	Cristal
californiensis	Yellowleg	Patiamarillo/café/kaki
duorarum	Northern pink	Rosado norteño/rosado
occidentalis	Western white	Blanco del Pacífico/blando
robustus	Pink	Rosado norteño
setiferus	Northern white	Blanco norteño/blanco
stylirostris	Blue	Azul
vannamei	Whiteleg	Patiblanco/blanco
Hymemopeneus robustus	ND	Rojo
Pleoticus robustus	Royal red	Rojo real
Sicyonia sp.		
brevirostris	Roca	De piedra/de roca
Penicillata	ND	Japonés
Trachipenaeus sp.		
faoea	Indio	Fijador indio/zebra
kroyeri	ND	Sintético
similis	Yellow roughneck	Fijador amarillo/botalón
Xiphopenaeus sp.	Seabobs	
kroyeri	Atlantic	Siete barbas
riveti	Pacific	Botalón/siete barbas
Agua dulce		
Macrobrachium sp.	Freshwater prawn	Langostino
acanthurus	ND	Prieto
americanum	ND	De agua dulce
carcinus	ND	Camarón de río
tenellum	ND	Charal

* Nombres en inglés y español establecidos por la FAO. ND No disponible. Fuentes: FAO, Species catalogue: Volume 1-Shrimps and Prawns of the World, Rome 1980; FAO, "Lista preliminar de especies acuáticas autóctonas cultivadas o en experimentación para su cultivo en América Latina", Circular de Pesca (FIP/C846), Diciembre 1991, NMFS, ad Ocean Garden Products, Comportamiento del mercado de camarón, Agosto-Septiembre 1991.

I.1.4. Manejo de camarón postcaptura

Los requerimientos de los productos varían considerablemente de mercado a mercado, los camarones son comercializados principalmente en forma congelada en bloques, individuales congelados rápidamente (IQF) o semi-IQF. Los productos congelados son los más populares para comercializar, pueden ser consumidos directamente o bien ser materia prima para otros alimentos. El enlatado y la fermentación son utilizados para preservar el producto en algunos países. El camarón enlatado es principalmente descabezado, cocido y pelado, mientras que los productos fermentados, tales como pastas y salsas, son elaborados a partir de camarones pequeños debido a razones económicas. Las otras formas comerciales son camarones secos y enteros (Departamento de Comercio y Servicios Nacionales Oceánicos y Atmosféricos de los Estados Unidos, 1992).

Algunos mercados tienen preferencia sobre la forma en que adquieren los camarones. Por ejemplo, En los Estados Unidos se prefiere el camarón pelado y descabezado, dejando intacta la cáscara del último segmento de la cola. Generalmente el consumidor mexicano prefiere el camarón fresco ó congelado descabezado, lo que incentiva a los pescadores a descabezarlo.

Gran parte del camarón producido en México es para exportación, aunque también tiene mercado nacional importante. El principal consumidor de camarón de México es los Estados Unidos Sin embargo en la década de los ochenta, México perdió parte del mercado debido a la repartición de éste con Ecuador y países asiáticos.

I.1.5. Composición de desechos de crustáceos

La composición aproximada de diferentes especies de crustáceos y harina de pescado se muestra en la Tabla I.3., ésta puede variar con la especie y la tecnología de procesado El contenido de quitina varía de un 13 hasta 35% (peso seco). La proteína en el desecho, va de 22 a 54% peso seco, proviene de la carne no recuperada así como aquella que esta adherida a la concha, y esta asociada a un importante pigmento natural conocido como astaxantina y la quitina. El contenido de lípidos varía desde 0.4% en conchas de camarón, 12% en krill

Tabla I.3. Composición aproximada de diferentes especies y tipo de desechos de crustáceos. (Porcentaje en base seca).

Desecho	Proteínas	Cenizas	Quitina	Grasa	Referencias
Harina de camarón	34-49.6	24.2-34.8	13-24.8	1.9-11	Meyers y col.(1973) Radhkrishnan y Prabhu. (1971)
Cabezas	53.5	22.6	11.1	8.9	Meyers (1986)
Exoesqueleto	22.8	31.7	27.2	0.4	Meyers (1986)
Fresco	32.7	26	14.2	25.2	Simpson y Haard (1985)
Pandalus borealis					
Cabezas cocidas y secas	25.5	28.5	21.4	3.6	De Silva, 1998
Pandalus jordani	51	18	28	13	Watkins y col. (1982)
Harina de cangrejo azul	27	39	14	1.4	De Silva, 1998
Harina de cangrejo rey	42	32	35	8.5	De Silva, 1998
Harina de langosta de Lousiana	35.8	38.1	16.5	9.9	De Silva, 1998
Krill del Antártico	41	23	24	11.6	Anderson y col.(1977)

La producción mundial de desperdicio de crustáceos se estimó de 1.44 millones de toneladas en base seca (Knorr, 1991). En México, una mínima parte de las cabezas de camarón es convertida a harina, el resto es desechada en altamar o en zonas aledañas a las áreas de cultivo con el consiguiente deterioro ambiental (Cañipa, 1994).

Para muchos productores el problema de la utilización de desechos de mariscos es que son muy perecederos bajo condiciones ambientales y que hay periodos en los que se encuentran en exceso lo que dificulta su manejo antes de la descomposición. Estos desechos pueden ser

congelados antes de ser procesados pero debido al volumen de éstos y el limitado espacio en los congeladores (el cual se reserva para productos con mayor valor agregado) hace poco rentable la conservación para su posterior utilización, comúnmente harina de pescado.

I.1.6. Calidad microbiológica del camarón

La contaminación inicial del camarón ocurre desde la captura ya que junto con el camarón se recoge gran cantidad de arena, otras fuentes de contaminación son el hielo en el que se conserva, la superficie de los barcos y la manipulación en general a la cual es sujeto.

Durante el deterioro el camarón sufre una serie de cambios bioquímicos, tales como el incremento de pH debido a producción de sustancias básicas volátiles, decoloración como resultado de la oxidación de pigmentos y algunas reacciones enzimáticas, conocida como melanosis. Estos cambios son producidos por enzimas endógenas y la descomposición se lleva a cabo más rápido que en el pescado, esto es debido a que son más pequeños y presentan mayor superficie de contacto con relación al volumen.

Para reducir la velocidad de descomposición, estos alimentos son puestos en hielo o en refrigeración. Sin embargo, algunas bacterias pueden crecer a bajas temperaturas. *Acinetobacter, Moraxella (Achromobacter), Pseudomonas* y bacterias corineformes están reportados como los grupos microbianos dominantes (Silliker, 1980).

Para el consumidor, la descomposición avanzada se ve manifestada por olores, sabores, textura, color, ruptura de tejidos y cambios de la apariencia en general. La venta de mariscos que presentan cualquiera de los cambios antes mencionados, es prohibida de acuerdo con estatutos de la FDA (Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos). La FDA ha definido

criterios de calidad de camarón crudo y congelado, en tres clases de acuerdo a sus características sensoriales: calidad aceptable, primera etapa de descomposición, y descomposición avanzada (Gecan y col. 1994).

Muchos géneros de microorganismos patógenos como *Salmonella* y *Listeria*, al no ser endémicos al tracto intestinal de los crustáceos están asociados a contaminación fecal, principalmente por agua en las granjas camaronícolas o en lugares de captura.

Gecan y col. (1994), realizaron un estudio de la calidad higiénica de los camarones adquiridos por Estados Unidos de diferentes paises. En dicho trabajo, analizaron la presencia de insectos, pelo de animales, *Salmonella* y *Listeria*, encontrando que para el caso particular de México, 37 5% de las muestras analizadas contenían residuos de insectos, indicando higiene deficiente, 12.5% fueron positivas para insectos incidentales (moscas, escarabajos acuáticos, avispas), en 25 y 37.5 % se encontraron pelo de roedores y de origen desconocido respectivamente India fue el país con mayor porcentaje de muestras positivas y Estados Unidos el más bajo.

En cuanto a la contaminación microbiana, el estudio reveló que alrededor de un 6.8 % y 8.1 % de las muestras de todo el mundo fueron positivas para *Listeria* y *Salmonella*, respectivamente. *L. monocytogenes* y *L. innocua* tuvieron casi la misma frecuencia; *L. grayi*, fue detectado una sola vez.

Listeria junto con *Vibrio* son considerados como un riesgo en productos de camarón crudo debido a la alta probabilidad de contaminación. La mayoría de los brotes causados por *Vibrio spp.* han ocurrido por almacenamientos inadecuados o por contaminación cruzada de otras fuentes de mariscos crudos. *Listeria spp.* fue aislada a partir de una variedad de mariscos que incluyen camarón congelado, carne de cangrejo, colas de langosta, aleta de pescado y surimi

(Berry y col. 1994).

Berry y col. (1994) reportaron las cuentas de aerobios, de *Listeria spp.* y *Vibrio spp.* determinados en muestras de camarón procedente de China, Ecuador y México en presentaciones de mayoreo (cajas congeladas de 5 kg) y menudeo (descongelado, aproximadamente 0.5 kg). El camarón por mayoreo tuvo una excelente calidad con respecto a cuenta de aerobios, mientras que los niveles más altos de contaminación fueron determinados en las muestras de menudeo. *Listeria spp.* y *L. monocytogenes* fueron aislados a partir de 16.7 y 6.7 % de las muestras respectivamente. *L. ivanovii* y *L. welshmeri* fueron también identificadas.

La mayoría de los microorganismos fueron identificados como *V. parahaemolyticus* (36.7%), *V. alginolyticus* (26.7%) y *V. vulnificus* (16.7%). Asimismo *Vibrio spp.* estuvo presente en 63.3 % de las muestras y fue más frecuente a partir de camarones de México o China, que de Ecuador.

I.2. Quitina y Quitosana

I.2.1. Ocurrencia y estructura

La quitina, además de encontrarse en crustáceos, se encuentra en el exoesqueleto de artrópodos y en las paredes celulares de hongos. Es el segundo polímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa (Tabla I.4.). Se calcula que más de 100 billones de toneladas de quitina son producidas anualmente por estos animales y microorganismos (Simpson y col., 1994). Químicamente es análoga a la celulosa, la cual está compuesta de glucosa β(1-4), mientras que la quitina es un polímero de N-acetilglucosamina enlazadas por unión β(1-4). El monómero es 2-acetoamida-2-desoxi-β-D-glucosa, cuya fórmula estructural es ($C_8H_{13}NO_5$). En la quitina los grupos amino están acetilados, la quitina desacetilada es conocida como quitosana, que es polímero β(1-4) de monómeros de 2-amino-2-desoxi-β-D-glucosa (Figura I.2).

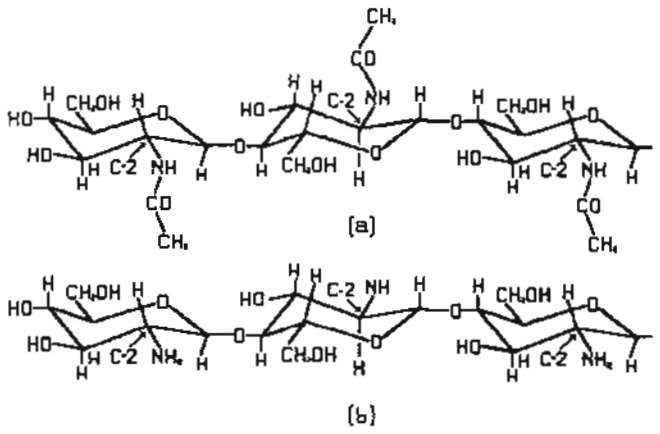


Figura I.2. a) Quitina; b) Quitosana.

La quitina se encuentra en tres formas que difieren cada una en su arreglo molecular, asi se tiene a la α-quitina que se encuentra en forma compacta, el arreglo de las cadenas es antiparalelo; β-quitina a diferencia de la anterior presenta cadenas en paralelo y en la γ-quitina dos cadenas se extienden hacia arriba por cada cadena que se encuentra hacia abajo. Se han aislada las tres formas en diferentes partes anatómicas del mismo animal por lo que se piensa que este polimorfismo es debido a diferentes funciones y no al grupo biológico a que pertenece el animal. La forma α es la más estable, y es comúnmente asociada con depósitos minerales, mientras que la β– y γ-quitinas parecen estar asociadas con proteínas del tipo colágeno, proporcionando tenacidad, flexibilidad y movilidad. (Muzzarelli, 1977)

En su forma natural, la quitina se presenta parcialmente desacetilada, la diferencia entre quitina y quitosana es de hecho arbitraria ya que las formas completamente acetiladas o desacetiladas no existen en la naturaleza ni como productos finales de un proceso, por lo que en la práctica al polímero que presenta mayor acetilación se le denomina quitina y al más desacetilado quitosana (Hansen y Llanes 1994).

Tabla I.4. Contenido de quitina en crustáceos, insectos, moluscos y hongos.

Crustáceos	Quitina %
Cangrejo (*Cancer spp.* y *Homolasis plana*)	15-30[b]
Cangrejo Rey (*Lithodes antarticus*)	15-30[b]
Camarón amarillo (*Pleuroncodes monodon*)	14[b]
Camarón rojo (*Cervimunida johni*)	14[b]
Camarón Nylon (*Heterocarpus reedi*)	17[b]
Krill (*Euphasia superba*)	25[b]
Cangrejo *Cancer*	72.1[c]
Cangrejo *Carcinus*	0.4-3.3[a] 8.29[b] 64.2[c]
Cangrejo Rey *Paralithodes*	35[b]
Cangrejo Azul *Callinectes*	14[a]
Cangrejo Rojo *Pleuroncodes*	1.3-1.8[b]
Camarón *Cintervalon*	5.8[b] 69.1[c]
Camarón de Alaska	28[d]
Langosta *Nephrops*	69.8[c] 6.7[b]
Langosta *Homarus*	60.8-77.0[c]
Percebe lepas	58.3[c]
Acanthephyra acanthetelsonis	7.2[f]
Acanthephyra acutifrons	12.5[f]
Acanthephyra curtirostris	6.6[f]
Acanthephyra purpurea	8.9[f]
Ephyrina hoskyni	4.3[f]
Meningodora vesca	4.0
Notostomus elegans	13.3[f]
Oplophorus gracilrostris	12.8[f]
Systellaspis cristata	4.6[f]
Systellaspis debilis	7.1[f]
Parapandulus richardi	7.1[f]
Parapasiphaea sulcatifrons	3.2[f]
Pasiphaea merriami	6.3[f]
Funchalia villosa	5.8[f]
Gennadas valens	5.9[f]
Sergestes henseni	6.6[f]
Sergestes paraseminudus	5.3[f]
Sergestes pectinatus	5.3[f]

Tabla I.4. (continuación)

Crustáceos	Quitina %
Sergia filictum	6.2[f]
Sergia grandis	6.5[f]
Sergia robustus	6.7[f]
Sergia spendens	6.5[f]
Eucopia sculpticauda	3.1[f]
Eucopia unguiculata	3.8[f]
Gnatophasia ingens	14.9[f]
Insectos	
Cucaracha *Periplaneta*	2.0[c]
Cucaracha *Blatella*	18.4[c] 10[b] 35[c]
Escarabajo *Colcoptera*	5-15[b] 27-35[c]
Escarabajo *Tenebrio*	2.1[a] 4.9[b] 31.3[c]
Escarabajo May	16[b]
Mosca *Diptera*	54.8[c]
Mariposa azufre Pieris	64[c]
Saltamontes	2-4[a] 20[c]
Gusano de seda *Bombyx*	44.2[c]
Gusano de cera *Calleria*	33.7[c]
Concha de almeja	6.1
Concha de ostión	3.6
Pluma de calamar	41.0
Concha desproteinizada de Krill	40.0+-5.2
Hongos	
Aspegillus niger	42.0[e]
Penicillium notatum	18.5[e]
Penicillium chrysogenium	20.1[e]
Saccharomyces cerevisiae	2.9[e]
Mucor rouxii	44.5
Lactarius vellereus	19.0

[a] Peso húmedo; [b] Peso seco; [c] Peso orgánico de la cutícula; [d] Peso seco total de la cutícula; [e] Peso seco de la pared celular ; f Peso seco libre de cenizas. Crustáceos del este del Golfo de México (Donelly y col.,. 1993)

I.2.2. Procesos de Obtención

En forma conjunta al problema ambiental, se observa un creciente interés en el uso de materiales naturales, esto hace que la quitina sea un biopolímero que podria tener muchas aplicaciones en el mercado. El costo de conversión es demasiado alto, lo que ha promovido que quienes se interesan por la explotación de la quitina busquen fórmulas que la hagan económicamente viable. Japón es el productor líder de quitina y quitosana, Kyowa Yushi Inc (Chiba, Japón) fue la primera empresa en producir quitosana a escala industrial y desde entonces otras compañías japonesas, estadounidenses y de otros países se han encargado de su industrialización. Por ejemplo Kyokuyo Co. (Tokio, Japón) y Polypate (Calcuta, India), la han obtenido a partir de camarón; Kypro Co. (Seattle, Estados Unidos) a partir de cangrejo; Fisheries Central Board (Sczecin, Polonia) a partir de krill y esqueleto de calamar (Simpson y col., 1994).

En las cutículas de crustáceos, la quitina se encuentra fuertemente asociada con sales inorgánicas, tales como carbonatos de calcio, proteínas, pigmentos y lípidos (Attwood y Zola, 1967; Fox, 1973; Muzzarelli, 1977; Shimahara y Takiguchi, 1988). De ahí que el proceso químico convencional para la obtención de quitina, a partir de esqueletos de crustáceos, consiste principalmente de tres etapas: desproteinización de la quitina con álcalis a temperatura moderada, seguida de una desmineralización con ácidos diluidos y finalmente una eliminación de lípidos con solventes orgánicos, esta última es opcional. Generalmente la desacetilación de la quitina se realiza con álcalis concentrados a altas temperaturas para la transformación a quitosana (Figura I.3). Las etapas anteriormente mencionadas se llevan a cabo en el orden indicado (Okafor, 1965; Ockerman, 1992) aunque algunos investigadores proponen algunas variaciones como Shahidi y Synowiecki (1991), quienes extraen primero

los pigmentos, seguido de desproteinización (KOH 2% p/v a 90°C 2 horas), y desmineralización (2 5 % p/v HCl a 20°C 1 hora). Estos autores reportaron que la incorporación de extracción con aceite de los pigmentos antes de las otras etapas no afectó la eficiencia del proceso. No y col., (1989) aislaron y caracterizaron quitina, desproteinizando, desmineralizando, extrayendo pigmentos con acetona y llevando a cabo un blanqueado con solución de hipoclorito de sodio.

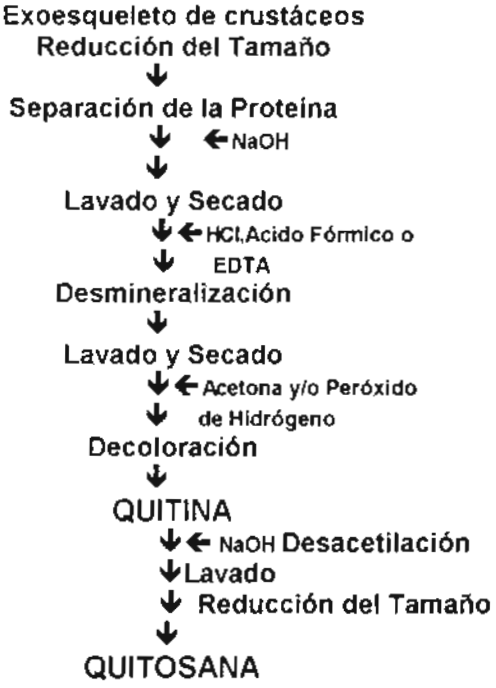


Figura I.3. Proceso convencional para la obtención de quitina y quitosana

Shimahara y Takiguchi (1988) aislaron quitina a partir de diferentes crustáceos, camarones, langostas y cangrejos probando diferentes métodos de extracción. La desmineralización la llevaron a cabo con HCl 2N durante 2 días a temperatura ambiente ó con EDTA (ácido etilendiaminotetracético) durante 6 días a temperatura ambiente, realizando cambios del

EDTA durante ese tiempo. Este último método tiene la ventaja de que no altera la quitina, aunque la eliminación de sales inorgánicas no es completa. La desproteinización la llevaron a cabo con NaOH ó usando *Pseudomonas maltophila*, que es un microorganismo con alta actividad proteolítica y no desacetila ni hidroliza al polimero pero presenta el inconveniente de que la desproteinización no es completa (desproteiniza hasta un 60%) ya que se requiere un tiempo de incubación prolongado (más de 6 días).

La quitina presenta características importantes que se deben de considerar para su extracción (Austin, 1988):

1. Es un poliacetal sensible y fácilmente hidrolizable por ácidos.
2. Es muy estable en álcalis diluidos.
3. Es sensible al calor a 40 - 50°C puede desnaturalizarse con el tiempo.
4 Es un potente agente secuestrante; por lo que debe emplearse agua desionizada.
5 Las decoloraciones con cloruros deben ser evitadas, ya que se pueden formar N-cloro compuestos con la quitina. Es preferible el uso de peróxido.
6. Los aislados de quitina contienen grupos aminos libres, aproximadamente uno de cada seis unidades de glucosa.

Las presentaciones comerciales de la quitina y quitosana son en forma de polvos, hojuelas, fibras, láminas y lechos, las cuales muestran una gran variedad en cuanto a la calidad debido a los métodos de producción que ocasionan modificaciones, tales como depolimerización y desacetilación, que cambian las características fisicoquímicas.

Por otra parte, el empleo de técnicas biológicas permiten recuperar productos con mejores propiedades, aunque con frecuencia los rendimientos pueden ser bajos. Aparte de los métodos biológicos de obtención de quitina, está la aplicación de enzimas (quimotripsina, papaína,

quitina desacetilasas) cuya finalidad es la de desproteinizar y desacetilar la quitina, con la desventaja que no se ha observado una remoción completa de proteinas. Se han empleado también microorganismos proteoliticos (*Pseudomonas maltophila, Bacillus subtilis, Streptococcus faecium, Pediococcus pentosaceus, Aspergillus oryzae*) en desechos de crustáceos, u hongos productores de quitina desacetilasas (*Mucor rouxii, Phycomyces blakesleeanus* y *Aspergillus niger*) (Bustos y Healy, 1994a; Bustos y Healy, 1994b; Simpson y col., 1994)

Otro procedimiento para separar quitina de residuos de crustáceos es el ensilado. Este método se describe con detalle en la sección 1.6., además de todas las ventajas descritas en la sección anterior, es posible recuperar otros productos para diversos propósitos (tales como proteinas, enzimas y pigmentos).

I.2.3. Propiedades

Quitina

La quitina es un compuesto biodegradable no tóxico, insoluble en agua y soluble en la mayoría de solventes orgánicos. Son solventes efectivos de la quitina: N,N-dimetilacetamida con 5 % de cloruro de litio, hexafluoroisopropanol, sesquihidrato de hexafluoroacetato, cloroalcoholes (2-cloroetanol), ácidos minerales concentrados y en ácido fórmico anhidrido (Muzzarelli, 1977). Se puede despolimerizar mediante el uso de ácidos fuertes. Su calor específico es de 0.373 +/- 0.03 cal/g/^{o}C. La higroscopicidad de la quitina es similar a la de fibras de celulosa, aunque su superficie es menos activa y permeable al agua que la de las fibras de celulosa (Hirano, 1986).

Las propiedades de la quitina pueden ser modificadas mediante la microcristalización, la quitina microcristalina absorbe considerablemente más agua que la celulosa microcristalina. El intervalo de absorción de humedad de los polímeros varia desde 325 a 440 % (p/p), estas diferencias se explican por la cristalinidad de los productos, la cantidad de grupos formadores de sales, así como por la cantidad de proteína remanente en la quitina. La quitina microcristalina demostró buenas propiedades de emulsión 900+/-47 ml aceite/g utilizando sonicación para producir la emulsión; produce dispersiones más estables que la celulosa microcristalina bajo condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente, ciclos de congelado y descongelado, y esterilización por lo que se ha propuesto su uso como estabilizante y espesante. Se ha observado que la adición de quitina microcristalina a diferentes niveles de agua, incrementa el volumen de la masa en la fabricación de panes a partir de mezclas de trigo y papa, debido a sus características surfactantes que ayudan a superar la depresión de leudancia, que se genera cuando se agregan proteínas de papa a harina de trigo (Knorr, 1984).

La pirólisis de la quitina a altas temperaturas (aproximadamente 900^{o}C) produce un gran número de compuestos de sabor. La fracción pirolizada puede dividirse en cuatro grupos (Knorr, 1984): fracción ácida que produce: ácido fórmico, acético, propiónico, isobutírico, butírico; fracción fenólica que produce: fenol, O-cresol, xilenol; fracción neutra que produce: tolueno, xileno, naftaleno; y fracción básica que produce: picolinas, pirazinas, piridinas y quinolinas.

Quitosana

Este compuesto soluble en soluciones diluidas de ácidos orgánicos, insoluble en solventes organicos y a concentraciones de ion hidrógeno por encima de pH 6.5. Es soluble en soluciones de ácido clorhídrico y nítrico al 0.15 hasta 1.1% pero insoluble a concentraciones del 10% Es insoluble a cualquier concentración de ácido sulfúrico y es ligeramente soluble en ácido ortofosfórico al 0.5% de concentración. El mejor solvente para la quitosana es el ácido fórmico, donde se obtienen soluciones desde concentraciones de fórmico de 0.2 hasta 100 % (Austin, 1988).

Los grupos aminos libres de la quitosana le confieren propiedades importantes. Cuando se solubiliza en ácido diluido la quitosana funciona como un polímero catiónico de estructura lineal con una alta densidad de carga positiva, esta carga puede ser aplicada en procesos de floculación, en la formación de capas e inmobilización de reactivos biológicos incluyendo enzimas.

Otra propiedad importante es su habilidad para actuar como una barrera de la humedad en cosméticos, como agente quelante de cationes, y como encapsulante cuando no tiene carga positiva (van Ornum, 1992).

I.2.4. Aplicaciones de la quitina y la quitosana

La quitina y la quitosana tienen numerosas aplicaciones en las industrias de alimentos, cosmética y farmacéutica como agentes espesantes, dispersantes, estabilizantes y gelificantes, así como en la elaboración de pinturas y textiles. Las ventajas del uso de estos polímeros es su condición de aditivo natural, no tóxico y biodegradable. A continuación se comentan algunas de las áreas en la que estos polímeros son utilizados.

Alimentos

La quitina y la quitosana han sido aprobados para potabilizar agua por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA). También han sido aprobados por la FDA y EPA para su uso como agentes precipitantes de materiales proteícos durante el procesado de alimentos, y como complementos alimenticios en niveles de incorporación que no excedan de 0.1%. Se utilizan también como clarificantes en vinos y agua potable en Reino Unido y otros paises europeos (Knorr, 1991).

Los polímeros quitinosos tienen propiedades antimicrobianas, debido a que privan a los microorganismos de iones vitales como el cobre, bloqueando o destruyendo funciones de membrana (McKay y col., 1987; Hawke y col., 1991; Simpson y col., 1994). Fang y col., (1994) observaron actividad inhibitoria para *Aspergillus niger* y para la producción de aflatoxinas por *Aspergillus parasiticus* en frutas cristalizadas con bajo contenido de azúcar con quitosana.

La quitina y la quitosana poseen usos potenciales como fibra dietética, se ha observado que la adición de hasta 10% de quitina en la dieta de pollos produce un crecimiento normal y vigor en los animales. Incrementa también el desarrollo de *Bifidobacterium* en el intestino de mamíferos, esta bacteria inhibe el crecimiento de otros microorganismos y genera lactasa requerida para la digestión de la leche.

Ramachandran y col. (1987) observaron aumentos significativos en el peso de pollos alimentados con quitina debido en gran parte a un incremento substancial en el apetito de las aves. Hirano y col. (1990) trataron de identificar el efecto de la quitosana en dietas de conejos, pollos y gallinas, reportando que la quitosana había sido segura y digerible, pero que en exceso ocasionaba trastornos fisiológicos muy graves, concluyendo que las dosis no debían de

sobrepasar 3 g de quitosana /kg de peso corporal, y estas dosis no debian administrarse por periodos prolongados.

Se ha sugerido el uso de la quitosana como reemplazante de gluten, sin embargo se ha observado que esta puede tener efectos inhibitorios en la fermentación de glucosa por *Saccharomyces cerevisiae*, por lo que requieren más estudios (Knorr, 1984).

Ambiental

El principal uso de la quitosana ha sido como un agente floculante para clarificación de efluentes industriales y otros productos de desecho (Knorr, 1991) por ejemplo residuos de cerveceria, aguas residuales de plantas procesadoras de pescado, y como quelante de contaminantes ambientales (metales pesados y/o radioactivos). La quitosana es capaz de llevar a cabo estas funciones debido a que está cargada positivamente, pudiendo combinar con biomoléculas cargadas negativamente o formar complejos con metales, los cuales entonces floculan y son separados por filtración, centrifugación o prensado.

Cosmetología

La quitosana es un excelente humectante por su alta capacidad de retener humedad, debido a esto se ha aplicado en productos fijadores del cabello (por ejemplo shampoo, acondicionador, lociones fijadoras etc.). La concentración de sales de quitosanas (aproximadamente 1%) requeridas para estos usos son comparativamente más bajas que la de resinas convencionales (aproximadamente 3%). También se sugiere el uso de quitina o quitosana granular como un abrasivo para limpieza de la piel, existen patentes de estos biopolímeros para su uso en tratamientos contra la celulitis (Simpson y col., 1994).

Otras aplicaciones.

A los polimeros quitinosos se les asocia propiedades terapéuticas como la posibilidad de ligar sales biliares, así como la posible disminución del colesterol sanguíneo (Hirano y col., 1990).

La habilidad de la quitina para producir capas se ha aplicado en la elaboración de cintas de fotografía, membranas para ósmosis inversa, y para recubrir semillas protegiéndolas de plagas (Simpson y col., 1994).

Recientemente se ha mostrado que la quitosana posee un uso potencial en un biosensor para monitorear oxidación lipídica, basándose en la habilidad de los grupos amino primarios que ésta posee y que pueden interactuar con los aldehídos que se liberan durante la ruptura de grasas

La quitosana también reacciona con aldehídos bajo condiciones adecuadas para formar geles, esta reacción es la base para el atrapamiento de células y enzimas. En Japón se comercializa para inmovilización de células enteras y enzimas como la glucosa isomerasa.

I.2.5. Métodos de determinación de quitina.

Se llevan a cabo mediante técnicas espectofotométricas o cromatográficas que determinan productos de hidrólisis, generalmente glucosaminas. Los métodos espectrofotométricos tienen la desventaja de que la cuantificación no es especifica para glucosaminas proveniente de quitina y que pueden presentar interferencias con otras sustancias. A diferencia de éstos, los métodos cromatográficos son más sensibles y específicos.

Una técnica clásica desarrollada por Campbell (1929) es la detección de glucosamina liberada por hidrólisis alcalina a partir de quitosana, esta reacciona con iodo y ácido sulfúrico

produciendo un color rojo violeta brillante. Los resultados son inconstantes dependientes de la naturaleza de la muestra y de la cantidad de quitina. En esta reacción hay un número considerable de sustancias que pueden interferir positivamente (Muzzarelli,1977).

Black y Schwartz (1950) propusieron un método de determinación de quitina y nitrógeno de quitina que consistia en el aislamiento de ésta mediante tratamiento con HCl 1N y calentamiento, seguido de digestiones con NaOH, decoloración con acetona y secado hasta peso constante, reportando la pérdida de peso como contenido de quitina. Para la cuantificación del nitrógeno de quitina, realizaron las digestiones ácidas y alcalinas; la quitina presente en el residuo obtenido fue sometida a la técnica de Kjeldahl. La determinación de quitina y de nitrógeno de quitina por este método presentó una baja precisión sobre muestras de cangrejo debido probablemente a la heterogeneidad del material. Este método es reportado como similar al método A.O.A.C. para determinación de fibra cruda, los autores realizaron una comparación con ambas técnicas encontrando una gran similitud de resultados.

Otra técnica la desarrolló Wieckowska (1968) basada en la cuantificación de N-acetil-D-glucosamina por reacción con p-amino benzaldehído, acetil acetona y ácido clorhídrico concentrado, que forman un compuesto rojo con una absorbencia máxima a 526 nm.

Ride y Drysdale (1972) desarrollaron una técnica para determinación de quitina fúngica en presencia de tejidos vegetales, en donde se liberaba glucosamina mediante hidrólisis alcalina y desaminación con ácido nitrico produciendo aldehídos, los cuales se determinan colorimétricamente con 3-metil-2-benzotiazolona hidrazona. El tiempo requerido para este análisis es de 5 horas aproximadamente y presenta interferencia con otras sustancias como la galactosamina. Donald y Mirocha (1977) aplicaron este método en frijol soya y maíz,

reportando su conveniencia debido a su rapidez en comparación con los métodos de placa (Método de Howard o HMC), además de que determina la cantidad total de micelio viable y no viable Sin embargo, encontraron que se podía presentar un margen de error considerable, debido a que no se distinguía entre las glucosaminas producidas a partir de quitina, y aquellas presentes en las glucoproteínas de las semillas estudiadas.

Jarvis (1977) realizó una comparación del método propuesto por Ride y Drysdale con las técnicas microbiológicas, y encontró resultados aceptables en jugos y purés de tomate no homogeneizados, reportó también interferencia de amino azúcares nativos, lo que redunda en la sobrestimación del contenido de quitina real.

Bishop y col. (1982) determinaron quitina como medida del grado de contaminación fúngica en purés, pastas y catsup de jitomate, mediante una técnica basada en las de Ride y Drysdale (1972) y de Jarvis (1977). Obtuvieron una correlación significativa en las muestras de pasta de jitomate entre el método HMC y la técnica que determinaba quitina, sin embargo la correlación no fue significativa ni en las muestras de purés, ni en las de catsup, además de ser una técnica que consume mucho tiempo.

Wu y Stahmann (1975) determinaron quitina como glucosamina, utilizando un analizador de aminoácidos en una columna de intercambio iónico, evitando interferencias de glicoproteínas vegetales.

Hubbard y col. (1979) describieron un método de cuantificación de quitina por intercambio iónico basado en el de Wu y Stahmann (1975), el cual comprendía una hidrólisis previa con ácido clorhídrico a 110° C. El tiempo de análisis puede ser disminuido utilizando columnas más cortas, aumentando la velocidad de flujo y alternando el uso de dos columnas.

Lin y Cousin (1985) analizaron muestras de puré de tomate y catsup, para determinar el grado de contaminación por hongos e insectos. Observaron que la máxima liberación de glucosamina a partir de quitina ocurria luego de 2 horas de hidrólisis con ácido clorhidrico, y posterior purificación por cromatografía de intercambio iónico, para finalmente hacer reaccionar con o-ftalaldehido/tiol y detección en un cromatógrafo de alta presión HPLC Adicionalmente compararon los métodos de determinación de glucosamina por HPLC y en analizador de aminoácidos, reportando que existe una diferencia promedio de 25%; además mostraron que en muestras con bajas concentraciones existe gran variabilidad entre ambos métodos, mientras que en muestras con cantidades mayores la diferencia fue menor. Asimismo se encontró que el método puede presentar variabilidad, debido a la inestabilidad de la reacción de fluorescencia.

Estas técnicas fueron propuestas como sustitutos de la evaluación del grado de contaminación por hongos en alimentos vegetales utilizando el crecimiento en placas, ya que estos procedimientos se caracterizan por ser lentos (5-7 días) y laboriosos. Por lo que la cuantificación de quitina por un método más rápido y sensible lo hace atractivo.

Ofenbeher y col. (1984) reportaron un procedimiento rutinario de aislamiento y determinación de quitina, sobre la base de su contenido de nitrógeno, diferenciando nitrógeno protéico del no protéico, de fibra cruda aislada a la cual realizaron un análisis elemental de C, H, y N; calculando el % de quitina mediante multiplicación del porcentaje de nitrógeno por un factor de 14.5 (en la quitina hay un 6.9 % de nitrógeno: 100/6.9=14.5).

La hidrólisis quimica completa de la quitina para liberar a las hexosaminas requiere tratamientos drásticos que pueden conducir a errores en la determinación, debidos principalmente a destrucción parcial de hexosaminas liberadas de quitina, o por determinación

de hexosaminas de glucoproteínas. Por esta razón se ha empleado la hidrólisis enzimática con quitinasas, como las de *Serratia marcescens*. Sin embargo estos métodos pueden presentar problemas debidos al enmascaramiento de la quitina con otros materiales (por ejemplo, glucanos y manoproteínas de la pared celular), que obstaculicen el paso de la quitinasa al sustrato. Cabib y Sburlati (1988) determinaron la cantidad de quitina en levaduras, mediante el uso de una quitinasa de *Serratia marcescens* en presencia de una preparación lítica de pared celular, determinando la cantidad de N-acetilglucosamina liberada.

Davies y col. (1987) propusieron que la espectroscopia de infrarrojo (I.R.) cercano, podría ser utilizada para determinar la cantidad de quitina debida al crecimiento de hongos en puré de jitomate, considerando que el análisis de regresión en las longitudes de onda seleccionadas (110 a 2500 nm) podrían ser asociadas con las bandas de absorción de la quitina. Sin embargo es importante considerar, que las técnicas de infrarrojo cercano son poco sensibles, requiriendo concentraciones relativamente altas.

I.2.6. Determinación del grado de acetilación de quitina.

Como ya se indicó, la quitosana presenta más posibilidades de aplicación en diversas áreas como farmacéutica y alimentos que la quitina. La calidad de la quitosana varía con el grado de acetilación, el grado de polimerización, el proceso de manufactura y las fuentes de obtención (Hirano, 1986).

El grado de desacetilación de la quitina puede ser determinado por hidrólisis de grupos acetilos con álcalis fuertes, y conversión de las sales a ácido acético, el cual puede ser destilado y titulado con NaOH.

Existen modificaciones sobre los métodos de determinación por titulación, como el que se basa en la titulación del clorhidrato de quitosana con NaOH, este compuesto se prepara mediante la adición en exceso de HCl ó NaCl a una solución de quitosana en ácido acético. Esta técnica tiene la desventaja de que el clorhidrato de quitosana es altamente higroscópico, por lo que se debe mantener en una cámara de humedad constante. Una modificación a esta técnica es la titulación de la forma clorohidratada de la quitosana con nitrato de plata (Domard y Rinaudo, 1983).

Otra forma de determinación es por espectroscopia de infrarrojo (I.R.), al respecto Sannan y col. (1978) reportaron que el grado de acetilación es linealmente dependiente de la relación de transmisión de la banda de la amida a 1550 cm^{-1} y la banda de transmisión de C-H a 2878 cm^{-1}.

Están reportados ensayos colorimétricos para determinar grado de acetilación, como el método modificado por absorbancia de Ride y Drisdale (1972), en quitosana disuelta en ácido, reaccionando con 3-metil-2-benzothiazolona hidrazona (Davies y Hayes, 1988).

Holan y col. (1980) desarrollaron un método para determinar quitina en materiales biológicos por liberación de ácido acético y cuantificándolo por cromatografía. La quitina era desacetilada con ácido a concentraciones mayores de 4 M de ácido clorhídrico o alcali.

Sin embargo, Ramachandran y Madhavan (1975) realizaron una comparación entre un método de desacetilación de quitina a temperatura ambiente y 100°C con álcalis, encontrando que cuando la desacetilación se realizaba bajo la primera condición se obtenía un producto de mejor calidad sobre la base de su viscosidad.

Contrario a lo anterior, Mima y col. (1983) aislaron quitina a partir de cangrejo mediante el uso de álcalis y ácidos, seguidos de decoloración con acetona. La quitosana fue obtenida

mediante tratamientos con NaOH bajo dos temperaturas: una baja (60°C) y otra alta (110°C), seguidos de determinación del grado de desacetilación, esto último mediante titulación coloidal y espectroscopia de I.R. El daño a la cadena polimérica se determinó por comparación de pesos moleculares en cromatografía de gases. La temperatura de reacción tuvo un efecto significativo sobre la desacetilación, y la velocidad de la reacción fue dos veces mayor a temperatura alta que a baja, sin embargo observaron una disminución del peso molecular. El máximo peso molecular obtenido en este estudio fue de 850 kDa, correspondiente a un grado de desacetilación del 84%. Con respecto a las propiedades mecánicas determinadas sobre las quitosanas con alta desacetilación, ellos comunicaron que la tensión de la capa húmeda de quitosana se incrementó con el grado de desacetilación, mientras que en condiciones secas las capas no presentaron este comportamiento. Con respecto a las propiedades físicas de la quitosana, Radhakrishnan y Prabhu (1971) determinaron viscosidades de quitosanas producidas por dos métodos de desacetilación: por calentamiento con hidróxido de potasio al 55% y por digestión con volúmenes iguales de NaOH y alcohol etílico siendo esta última condición la más efectiva. Del mismo modo compararon las viscosidades de quitosanas desmineralizadas con tres concentraciones diferentes de HCl (5, 10 y 15%), y dos temperaturas: ambiente y de ebullición, encontrando que las viscosidades más altas se obtuvieron a la concentración más baja de ácido y temperatura ambiente.

Madhavan y Ramachandran (1974) reportaron un proceso de preparación de quitosana a partir de desperdicio de camarón, que consistía en aplicar bajas concentraciones de álcalis y ácidos, y temperaturas moderadas. Ellos determinaron las viscosidades de las quitosanas obtenidas por tratamientos con NaOH a 100° C durante 30 hasta 120 minutos, observando que las viscosidades más altas obtenidas fueron a los 90 minutos, por lo que consideraron que tiempos

más prolongados no tienen efectos pronunciados sobre las propiedades. Sin embargo, en estos dos últimos trabajos no se reportan porcentajes de desacetilación, ni se realizaron determinaciones de peso molecular.

La desacetilación de la quitina fue propuesta por Domard y Rinaudo (1983), con NaOH a temperaturas mayores de 100°C, la principal diferencia de esta técnica con respecto a las anteriores, es el uso de tiofenol, el cual atrapa oxígeno previniendo la degradación y ejerciendo un efecto catalítico; en consecuencia se lleva a cabo una total desacetilación pero sin degradación. Los parámetros que jugaron un papel decisivo fueron: el tiempo de reacción, las concentraciones de los reactivos y la temperatura. Al determinar el grado de acetilación por espectroscopia I.R., y los pesos moleculares promedios por osmometría y dispersión de luz, los autores citados afirmaron haber obtenido quitosana totalmente desacetilada, sin descenso en los pesos moleculares (1.2 a 3 kDa).

I.3. Proteasas

Gusek y Kinsella (1988) reportaron una demanda de proteasas en el ámbito mundial, de aproximadamente $500 millones de dólares por año. En la Figura I.4. se muestra las principales aplicaciones y tipo de enzimas en el mercado mundial. Entre estas, las enzimas con mayor demanda son las proteasas, que ocupan alrededor de un 60% del mercado. El término proteasa se define como la enzima hidrolítica que cataliza el rompimiento de uno o más enlaces peptídicos en las proteínas.

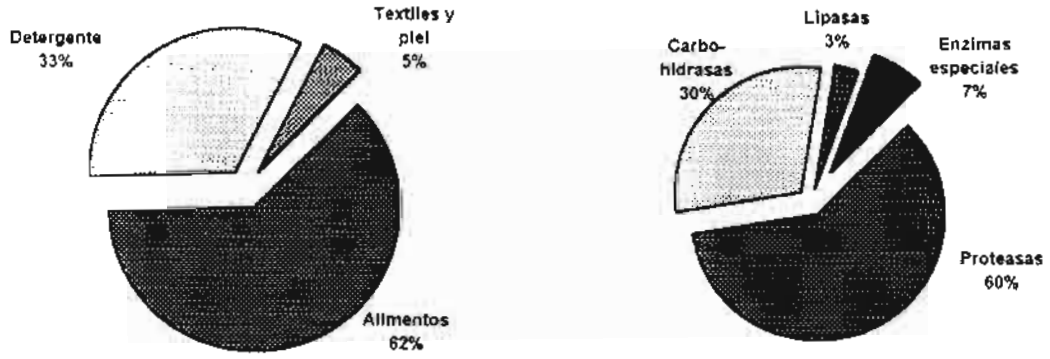


Figura I.4. Aplicaciones y distribución del mercado de las enzimas (Dziezak,1991).

Algunos criterios que deben de considerarse para la aplicación de proteasas son:

Especificidad

Las proteasas deben ser especificas de acuerdo a la reacción deseada, por ejemplo, para el queso la mayoría de las proteasas son inadecuadas debido su especificidad baja lo que tiene como consecuencia un escaso rendimiento en el coágulo, debido a una proteólisis excesiva, lo que ocasiona efectos negativos en la textura y el sabor. En este caso la enzima idónea es la quimosina, que tiene una especificidad alta por los enlaces peptídicos de las caseínas.

Un caso contrario se presenta en la producción de hidrolizados protéicos usados como saborizantes, en los que la enzima proteolítica debe tener especificidad baja para lograr un grado alto de hidrólisis, con la formación de péptidos de bajo peso molecular así como de aminoácidos.

pH

El pH de acción de la enzima es un criterio importante que debe ser considerado. La proteasa elegida debe funcionar bien en el pH del sustrato en el que se va a aplicar, por ejemplo la inestabilidad de la pepsina a pH neutros, limita su uso en la elaboración de queso.

Temperatura

La proteasa debe ser suficientemente activa y estable a la temperatura del proceso. Al respecto, las enzimas termoestables serán preferidas en procesos que se lleven a cabo a temperaturas elevadas, como la papaína para el ablandamiento de carnes durante la cocción. Sin embargo, esta característica puede resultar indeseable por la dificultad en inactivar dichas enzimas, pudiendo ocasionar sabores y texturas inadecuados en los productos en los que hayan sido aplicadas.

I.3.1. Proteasas de animales marinos

Las fuentes tradicionales de proteasas han sido plantas, microorganismos y animales terrestres. Las proteasas que provienen de animales marinos presentan caracteristicas distintivas, tales como eficiencia alta a bajas temperaturas, estabilidad térmica baja y ser activas/estables a pH neutros y alcalinos.

Las proteasas de animales marinos se clasifican con base a las similitudes con otras proteasas extensamente estudiadas de fuentes convencionales, por ejemplo tipo tripsina, quimotripsina, catepsina, etc.

Otros criterios de clasificación son:

i) pH de actividad, como proteasas ácidas, neutras o alcalinas,

ii) especificidad al sustrato,

iii) mecanismo de catálisis.

Este último sistema de clasificación es el usado por la Comisión de Enzimas, de la Unión Internacional de Bioquímica Aplicada (E.C.), en donde las proteasas de origen marino se clasifican en cuatro grupos: proteasas serínicas, aspárticas, cisteínicas y metaloproteasas (Haard y Simpson, 1994).

Proteasas Serínicas. Tipo Tripsina

Son un grupo de enzimas que catalizan preferentemente la hidrólisis de enlaces ester, y peptídicos que involucran a grupos carboxilos de aminoácidos básicos, arginina y lisina, y en los cuales los residuos de serina e histidina participan en el mecanismo de catálisis. Las tripsinas más estudiadas son las de bovino. Se han aislado proteasas tipo tripsina en tiburón, cangrejo y camarón blanco.

Las tripsinas de origen acuático son similares a las de animales de sangre caliente con respecto a su tamaño molecular, composición de aminoácidos y sensibilidad a inhibidores de proteasas serínicas. La familia completa de las tripsinas de diferentes organismos es un resultado de la evolución filogénetica de un gran grupo de enzimas proteolíticas y esterolíticas, cuyas similitudes funcionales y estructurales son prueba de que poseen ancestros comunes.

Las tripsinas purificadas a partir de pescado, tienden a ser estables en medio alcalino y muy inestable en condiciones ácidas, lo contrario a las provenientes de animales de sangre caliente. Otra diferencia es que las tripsinas de especies marinas, como el cangrejo, tienen la habilidad de hidrolizar proteínas globulares nativas. La energía de activación de Arrhenius es considerablemente más baja para tripsinas marinas, que para las de animales terrestres.

Proteasas Cisteínicas o Tiolproteasas

Tipo catepsinas

Las catepsinas aisladas de especies acuáticas como, carpa, bacalao, salmón, calamar, y camarón (Haard y Simpson, 1994), han sido caracterizadas como una cadena de polipéptidos con tamaños moleculares desde 13.6 hasta 25 kDa. Las catepsinas de diferentes especies muestran actividad máxima dentro de un intervalo amplio de pH, desde 3.5 y hasta 8. Son activadas por iones cloruro, generalmente requieren sulfhidrilos y/o agentes quelantes para su actividad, son inhibidas por iodoacetamida y metales pesados. Estas enzimas son endopeptidasas B, D, E, exopeptidasas A, C, y carboxipeptidasas catepticas A y B.

Metaloproteasas

Colagenasas

Para catalogar a una enzima como colagenasa, ésta debe de ser capaz de hidrolizar moléculas de colágeno en su forma nativa, que consiste en tres cadenas enrolladas a manera de cuerda para formar una estructura de triple hélice, con regiones de alta concentración de prolina, la estabilidad de esta hélice se debe principalmente a interacciones de puentes de hidrógeno

intercadena; tiene regiones de cadenas polipeptidicas que permanecen fuera del colágeno enrollado, y que son susceptibles a ser cortadas por proteasas como tripsinas o quimotripsinas Las colagenasas han sido extraidas y caracterizadas a partir de glándulas digestivas de diversos organismos marinos, tales como cangrejo, camarón y langosta (Haard y Simpson, 1994; Seifter y Harper, 1971). Las colagenasas de origen marino se parecen a su contraparte terrestre en su acción sobre el colágeno nativo. Sin embargo, las colagenasas digestivas difieren de las de tejido de mamíferos, al presentar especificidades del tipo de la tripsina y la quimotripsina. Estas colagenasas son más activas en el intervalo de pH de 6.5 a 8, y son inactivas a pH menores de 6; se inhiben con diisopropilfluorofosfato y fenilmetilsulfonilfluoruro. Las colagenasas de hepatopáncreas de invertebrados marinos están implicadas en el deterioro de textura postcaptura durante el almacenamiento.

I.3.2. Proteasas en camarón.

Se han reportado varios trabajos acerca del aislamiento de proteasas de crustáceos, los cuales se resumen en la Tabla I.5. La mayoría de estos trabajos se han enfocado en la distribución y localización de enzimas en el animal, con especial énfasis en la intervención de estas en los procesos de autólisis y descomposición.

Tabla I.5. Características y tipos de enzimas en crustáceos reportadas en la literatura.

Crustáceo	Enzimas	Características	Referencia
Pandalus platyceros *Pandalus jordani*	Tipo tripsina y catepsina	Actividad proteolítica sobre caseína y hemoglobina, pH óptimo a 3 y 7.5 a una temperatura de 55° C	De Villez y Buschlen, 1967 Decker, 1975
Krill	Carboxipeptidasas A y B, aminopeptidasas. Catepsina A y Tripsina	Determinaron la actividad enzimática en abdomen (catepsinas), cuerpo y cefalotórax (tripsinas). Carboxipeptidasas A y B, aminopeptidasas activas a pH 8. Catepsina B, H y L, carboxipeptidasa activas a pH 5.	Kawamura y col., 1981 Nishimura y col., 1983 Kawamura y col., 1984
Krill	Proteasa serínica	Metaloenzima, pH óptimo de 6.2 y temperatura óptima de 45° C	Fik, 1984
Machrobrachium rosenbergii	Baja actividad tripsinolítica y alfa quimotripsinolítica, alta actividad colagenolítica	Pérdida de textura durante el almacenamiento debido a difusión de colagenasas y diversas proteasas del hepatopáncreas al músculo.	Baranowski y col., 1984 Lindner y col., 1988
Illex illecebrosus (calamar)	Catepsina C	El peso molecular determinado fue de aproximadamente 25,000 Da, dependiente de cloruro y sulfhidrilos, cataliza la reacción de transpeptidación, pH óptimo de 5 a 6	Hameed y Haard, 1985
Gecarcinus lateralis (cangrejo)	Proteasas alcalinas cisteínicas	Detectaron dos tipos de actividades proteolíticas a pH ácido 4 a 5 y de 7 a 8. A temperaturas óptimas de 37 a 50 ° C.	O'Brien y Skinner, 1987, 1988
Penaeus monodon	Tripsina y quimotripsina	Temperatura y pH óptimos de actividad de 55°C pH 7 y 65°C pH 8.	Jiang y col., 1991
Penaeus californiensis	Tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasas A y B, leucinaminopeptidasa	Las enzimas presentaron tolerancia alta a la salinidad (2M de NaCl). Temperatura óptima 50 ° C en un intervalo de pH 6 a 10	Vega-Villasante y col., 1993, 1995.

Tabla I.5. (continuación)

Crustáceo	Enzimas	Características	Referencia
Carcinus maenas (cangrejo) y *Penaeus monodon*	A partir de hepatopáncreas, purificaron quimotripsina y colagenasa	Actividad enzimática inhibida por zinc y mercurio	Le Gal y col., 1995
Pleuroncodes planipes (Langostilla)	Proteasas: Tripsina, quimotripsina y serin colagenasa. Peptidasas: Leu-aminopeptidasas, carboxipeptidasas A y B	Proteasas con pesos moleculares desde 16 a 65 kDa, identificadas como serin proteasas y metalo proteasas. Aplicación para la maduración acelerada de queso Cheddar.	García Carreño y Hernández Cortés, 1995

I.3.3. Aplicaciones

Las aplicaciones de este tipo de proteasas son variadas, como en la reducción de la viscosidad en soluciones de proteínas, en la elaboración de concentrados protéicos, salsas de pescado, eliminación de piel de pescado, saborizantes, como ablandadores, recuperación de pigmentos (astaxantinas) y quitina.

I.4. Pigmentos Carotenoides

I.4.1. Ocurrencia

Los carotenoides se encuentran ampliamente distribuidos en plantas, hongos y animales, sintetizados por plantas y algunos microorganismos, a diferencia de los animales quienes no pueden biosintetizarlos, pero lo absorben de la dieta sin modificarlos. Se han identificado aproximadamente 400 carotenoides en la naturaleza, se clasifican en dos tipos: carotenos y xantofilas, los primeros son hidrocarburos, pocos en número, mientras que las xantofilas contienen al menos un átomo de oxígeno en la molécula y constituyen la mayoría (Goodwin y Britton, 1988).

Entre los componentes del cefalotórax de camarón se encuentran carotenoides con estructuras muy parecidas, que globalmente se conocen como astaxantinas. Los carotenoides presentes en el camarón son estereoisómeros de astaxantina, cantaxantina y astaceno, este último es considerado como el producto de la oxidación de la astaxantina (Goodwin y Britton, 1988).

Los carotenoides contribuyen a los patrones de color en los invertebrados, donde se encuentran en forma libre o como carotenoproteínas, estos últimos tienen un espectro de absorción más amplio cuando forman un complejo pigmento-proteína, que cuando se encuentran libres. Por ejemplo, el verde de los huevos de langosta y el morado de su caparazón se deben a la presencia de astaxantina unida a diferentes proteínas; y es naranja cuando está libre.

En períodos de anoxia se observa un aumento de la absorbencia al doble debido a la formación de epóxidos que funcionan como una reserva de oxígeno, que pueda ser utilizada en la producción de ATP en condiciones de anoxia con la subsecuente regeneración de la estructura conjugada de los pigmentos, y la concentración de pigmentos decrece cuando hay acceso al

oxígeno. Una función metabólica clara de los carotenoides, es ser precursores de vitaminas. (Goodwin y Britton, 1988).

La astaxantina y sus ésteres han sido identificados como los principales pigmentos en el exoesqueleto de crustáceos, en cangrejo se encuentra en un 90% (Chen y Meyers, 1982a) De aquí que el término astaxantina fuere utilizado en esta tesis para representar al total de carotenoides en el desperdicio de camarón.

I.4.2. Factores que afectan la extracción y determinación de pigmentos

Es importante considerar que los carotenoides son compuestos muy sensibles al oxígeno, la luz y el calor, además de que muchas características estructurales pueden ser modificadas por la exposición a álcalis y ácidos, lo que debe de ser considerado para evitar modificaciones o pérdida de pigmentos.

Oxidación

El oxígeno, especialmente en combinación con luz y/o calor, es el factor más destructivo La presencia de oxígeno aún en trazas, de peróxido en solventes, especialmente en éter dietílico, o de cualquier agente oxidante durante el almacenamiento de muestras, pueden conducir a la decoloración o a la formación de epóxidos o apocarotenales. Las muestras o extractos de pigmentos deben ser almacenados en una atmósfera inerte (Ar o N_2) o al vacío en una ausencia completa de oxígeno. Las soluciones deben de saturarse de nitrógeno o Ar unos minutos antes de ser almacenadas (Britton y Young, 1993).

Luz y calor

La exposición de carotenoides a la luz o al calor debe de ser evitada tanto como sea posible, aunque la fotoisomerización de la mayoría de los carotenoides durante las principales maniobras de extracción se presenta a bajas velocidades de formación. Es preferible la manipulación bajo la luz del día o artificial suave que bajo la luz del sol o UV que favorecen la isomerización, por lo que se debe proteger de la luz durante la cromatografía, por ejemplo cubriendo las columnas así como las cámaras para cromatografía en capa fina con papel aluminio o negro.

Se deben evitar las temperaturas altas y utilizar solventes con punto bajo de ebullición que puedan ser eliminados a temperaturas bajas que no excedan de 40°C (Britton y Young, 1993).

Acidos o álcalis

Todos los carotenoides son susceptibles a descomposición, deshidratación, o isomerización en condiciones ácidas, lo anterior se puede prevenir adicionando un agente neutralizante como bicarbonato de sodio durante la extracción. Los adsorbentes ácidos, especialmente silica gel, ácido silícico y alúmina ácida, así como los solventes ácidos (cloroformo, el cual puede tener trazas de HCl) provocan isomerización durante la cromatografía por lo que deben ser evitados. La mayoría de los carotenoides son estables a álcalis, sin embargo, algunos como la astaxantina son alterados aún bajo condiciones alcalinas suaves (Britton y Young, 1993).

Pureza de solventes, adsorbentes y reactivos.

Se deben usar reactivos de alta pureza, anhidros y redestilados, libres de peróxidos, almacenados a bajas concentraciones de oxígeno y en oscuridad. Una recomendación importante es evitar almacenar los solventes e incluso agua en envases plásticos, ya que se pueden contaminar con ftalatos (Britton y Young, 1993).

I.4.3. Métodos de extracción

La concentración de astaxantina es afectada por la relación de solventes utilizados para la extracción. Así en el caso de extracción con aceite, cuando la proporción de aceite es alta con respecto al material para extraer el pigmento, se observa un efecto de dilución y consecuentemente reduce el nivel de pigmento recuperado en el aceite. En la Tabla I.6. se muestran algunos de los métodos reportados para la extracción de carotenoides.

Tabla I.6. Métodos de extracción reportados para la extracción de pigmentos.

Condiciones	Comentarios	Referencias
Desecho de cangrejos, extracción de pigmentos con éter de petróleo.	Identificaron 49.4 % de astaxantinas esterificadas, 40.3% de astaxantinas sin esterificar y 10.3% de astaceno.	Meyers y Bligh (1981)
Desecho de cangrejo, aceite de soya (1:1 p/v). Uso de Etoxiquin como antioxidante. Adición de proteasas comerciales para liberar el pigmento	El uso de las proteasas incrementó en un 58% la liberación de astaxantina	Chen y Meyers (1982)
Ensilado ácido de cangrejo, extracción con aceite.	Mayor liberación del pigmento debido probablemente al efecto del ácido sobre los enlaces químicos de astaxantina, con partes del esqueleto o proteínas.	Chen y Meyers (1983)

Tabla I.6. (continuación)

Condiciones	Comentarios	Referencias
Desechos de cangrejo cocidos y ensilados con ácido, extracción con aceite de soya y de pescado.	Caracterizaron como mono y di ésteres de astaxantina en un 87%. El ensilado no afectó negativamente los perfiles del pigmento y ácidos grasos.	Omara-Alwala y col. (1985)
Uso de proteasas para mejorar extracción de carotenoides a partir de desecho cocido de camarón.	La tripsina de bacalao fue más efectiva que la bovina	Cano-López y col. (1987)
Desecho de camarón fermentado, sistemas de solventes cloroformo, metanol y agua en proporciones (1:2.4 p/v)	Determinación espectrofotómetrica	Hall y Hill (1990)
Desecho de camarón, extracción de pigmentos con éter de petróleo, acetona y agua	Disminución del tamaño de partícula para mejorar la eficiencia de extracción	Cañipa (1994)

I.4.4. Determinaciones cuantitativas de carotenoides.

Espectofotometría

Este método es generalmente llevada a cabo por técnicas simples, en donde la absorción del carotenoide es determinada en el solvente apropiado, comúnmente hexano o etanol para carotenos y xantófilas respectivamente, a la λ_{max} del carotenoide. El coeficiente específico de absorción $A_{1cm}^{1\%}$, que se define como la absorbencia de una solución de 1% (p/v) en una celda de 1 cm a una longitud de onda definida, es usado para cuantificar los carotenoides. Un $A_{1cm}^{1\%}$ arbitrario de 2500 puede ser utilizado cuando no se tienen disponibles valores específicos o para una mezcla de pigmentos.

La cantidad de carotenoides presentes (x gramos) en y ml de solvente se determina como

$$x = Ay(A_{1cm}^{1\%} X\ 100)^{-1} \ldots (1)$$

Los valores de $A_{1cm}^{1\%}$ de carotenoides han sido determinados y publicados por Britton y Young (1993).

Cromatografía de líquidos por alta resolución HPLC

La cuantificación por cromatografía de líquidos a alta resolución (HPLC) es el método más sensible, exacto y reproducible para determinar concentración de carotenoides. Las cantidades de cada pigmento en una mezcla pueden ser determinadas calculando el área del pico de cada componente a su longitud de onda máxima con un detector de longitud de onda múltiple.

I.5. Bacterias lácticas

La fermentación ácido láctica, es uno de los más antiguos métodos para preservar material biológico perecedero, como los alimentos para animales y para humanos. Es un proceso microbiano muy complejo, en el cual una población de bacterias lácticas llega a ser la microflora predominante (Anderson, 1988).

I.5.1. Concepto de bacterias lácticas.

El concepto de bacteria ácido láctica fue desarrollado en los primeros años del presente siglo. El nombre del grupo fue creado a partir de la observación de las bacterias causantes de la fermentación y coagulación de la leche. Orla-Jensen (1919) define "Las verdaderas bacterias lácticas forman un grupo natural de cocos y bacilos, Gram-positivos, inmóviles, no esporulados que fermentan azúcares produciendo ácido láctico", originalmente el grupo comprendía cinco géneros:

Thermobacterium, *Streptobacterium*, *Betabacterium*, *Streptococcus* y *Betacoccus*. Los primeros tres géneros son conocidos actualmente como *Lactobacillus*; y *Betacoccus* como *Leuconostoc*. Orla-Jensen no definió a *Microbacterium* y *Tetracoccus* actualmente conocidos como *Pediococcus*, consideradas como verdaderas bacterias lácticas. Más tarde Ingram (1975) caracterizó el grupo de bacterias lácticas como

"Gram-positivas, no esporuladas, fermentadoras de carbohidratos, productoras de ácido láctico, ácido tolerantes, con hábitats anaeróbicos, catalasa negativa, no móviles, no reductoras de nitratos". Incluyó en el grupo a *Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus* y *Streptococcus;* sin embargo fijó fronteras vagas del grupo con otros géneros como *Aerococcus, Brochotrix* y *Listeria.*

Recientemente los estreptococos del grupo N fueron propuestos para formar el género *Lactococcus* (Schleifer y col., 1985), contándose actualmente seis géneros de bacterias lácticas: *Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus* y *Bifidobacterium*. (Sneath y col. 1986; Schleifer y col. 1987).

I.5.2. Desarrollo de los Cultivos Iniciadores.

Se ha visto a través de los años, que los procesos de fermentación se llevaban acabo guardando una porción del producto fermentado, para comenzar el siguiente lote. Esto representa el primer uso de cultivos iniciadores. Un cultivo iniciador se define como una preparación que contiene microorganismos vivos, y que se aplican con la intención de aprovechar el metabolismo microbiano (Lucke y Brumer, 1990).

El progreso en la sustitución de procesos fermentativos fortuitos, por cultivos iniciadores, se observa en carnes, productos vegetales, productos lácteos y vinos; además de

otros procesos no destinados a la producción de alimentos, como el ensilado. Sin embargo algunos procesos son aún realizados por fermentaciones naturales o espontáneas, por ejemplo la col agria o sauerkraut. (Hammes, 1990).

Las bacterias incluidas en los cultivos iniciadores, en muchos casos incluían aquellas bacterias que predominaban en los alimentos fermentados antiguos, dichos cultivos han sido desarrollados por aislamiento de estas bacterias. El uso de cultivos iniciadores, como tales, se viene realizando desde hace aproximadamente un siglo. En los últimos años, la industria de los cultivos iniciadores ha sufrido un tremendo desarrollo, el mayor conocimiento se ha desarrollado en las fermentaciones lácteas, más que en cualquier otro campo de los productos fermentados.

Tipos de Cultivos Iniciadores.

Son principalmente de tres tipos:

1) Cultivos de cepas múltiples. Son mezclas de cepas conocidas, compatibles, sin bacteriófagos, cuidadosamente seleccionadas.

2) Cultivos mixtos. Son mezclas estables de cepas desconocidas, que se han desarrollado a través del uso continuo, y han sido adecuados para elaborar productos consistentes. El número de cepas y las relaciones de cada una de ellas con sus fagos es desconocidas.

3) Cultivos axénicos, bien conocida y seleccionada cuidadosamente (Hammes, 1990).

I.5.3. Propiedades antagónicas de las bacterias lácticas.

La mayoría de los productos fermentados, particularmente si son alimentos, son manufacturados bajo condiciones sanitarias controladas, para asegurar que la bioconversión sea la deseada. En muchos casos, como con los productos lácteos, el alimento

se expone a tratamiento térmico antes de agregar el cultivo iniciador con el objeto de reducir microorganismos indeseables. Sin embargo no en todos los casos es posible calentar el producto antes de la fermentación, como en la carne, por lo que el cultivo iniciador puede ser incluso destruido (Anderson, 1988).

Los cultivos iniciadores deben ser altamente competitivos contra otros microorganismos incluyendo otras bacterias lácticas para poder predominar. Dicho predominio dependerá básicamente de la velocidad con la que crezcan y produzcan ácido. La reducción del pH y la remoción de carbohidratos por fermentación, son las acciones conservadoras primarias; sin embargo las bacterias lácticas son capaces de producir otras sustancias inhibitorias en pequeñas cantidades, tales como peróxido de hidrógeno, diacetilo, bacteriocinas y productos secundarios generados por la acción de la lactoperoxidasa sobre el peróxido de hidrógeno y el tiocianato (Daeschel, 1989; Reeves, 1972; Hammes, 1990; Gilliland 1985).

Peróxido de hidrógeno

Los lactobacilos tienen la capacidad de generar peróxido de hidrógeno durante su crecimiento, por varios mecanismos la acumulación de peróxido de hidrógeno en el medio es debida a que los lactobacilos no poseen la enzima catalasa. Es bien conocida la actividad antimicrobiana del peróxido de hidrógeno, establece efectos antagonistas con microorganismos tales como *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas* sp.

Sistema lactoperoxidasa antimicrobiano.

El peróxido de hidrógeno puede reaccionar con otros componentes para formar sustancias inhibitorias. En la leche cruda reacciona con tiocianato, catalizada por lactoperoxidasa, para formar productos de oxidación que inhiben a varios microorganismos. A esta reacción se le conoce como "Sistema lactoperoxidasa antimicrobiano".

Diacetilo (2,3-butanodiona).

Es un producto final del metabolismo de bacterias lácticas, conocida como la sustancia que imparte aroma de mantequilla a alimentos fermentados. Tiene actividad antimicrobiana contra levaduras, y bacterias Gram-negativas, sin embargo se requieren altas concentraciones para llevar a cabo la inhibición, por lo que no se le reconoce como agente antimicrobiano.

Bacteriocinas.

Son sustancias antibacterianas potentes, macromoléculas de naturaleza proteica. Se han caracterizado bacteriocinas dentro del grupo de las bacterias lácticas de *Lactobacillus fermentum, Lactobacillus helveticus, Lactobacillus acidophillus, Lactobacillus plantarum, Pediococcus acidilactici* y *Pediococcus pentosaceus* (Daeschel, 1989). A las producidas por *Lactobacillus plantarum* se les denomina lactolina; a las de *Lactobacillus acidophillus* se les ha denominado lactocidinas, acidofilinas y acidolinas (Cogan, 1985). Una de las características que tienen en común las bacteriocinas es que son activas contra un amplio espectro de especies Gram-positivas. Tienen la habilidad de inhibir muchos microorganismos contaminantes de alimentos que son patógenos, como *Listeria monocytogenes, Streptococcus pneumoniae* y muchos enterococos (Reeves, 1972).

Aunque *Leuconostoc* es importante para fermentaciones lácteas, de vegetales y de vinos, no ha sido cuidadosamente analizada acerca de su capacidad para producir bacteriocinas. Sin embargo, se han reportado cepas de *Leuconostoc dextranicum* y de *Leuconostoc* sp. productoras de sustancias con actividad antimicrobiana contra otras bacterias lácticas (Harris, 1988).

Al género *Lactococcus* se le han caracterizado bacteriocinas como la nisina, con efectividad contra clostridios y ciertas especies Gram-positivas, como algunas de *Leuconostoc*, pero no así con bacterias Gram-negativas, levaduras y mohos. La nisina es la única bacteriocina aceptada por la FDA (Agencia de drogas y Alimentos, Estados Unidos de América), y es usada como conservador en varios paises. Es un péptido pequeño termoestable a pH ácido (Cogan, 1985). Ciertas cepas de *Streptococcus cremoris* producen la bacteriocina diplococina, cuya acción hacia *Staphylococcus aureus* es variable (Cogan, 1985).

Reuterina.

Se cree que es un compuesto de bajo peso molecular no proteínico, altamente soluble, producido a pH neutro por especies heterofermentativas de *Lactobacillus reuterii*. Es un agente antimicrobiano de amplio espectro contra ciertas bacterias
Gram-positivas y negativas, levaduras, mohos y protozoarios. Inhibe a *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Candida* y *Tripanosoma*.

I. 5.4. Características fermentativas de bacterias lácticas

La conversión de carbohidratos a lactato por bacterias lácticas, es uno de los más importantes procesos biotecnológicos. Las bacterias lácticas son clasificadas como homofermentativas, heterofermentativas y heterofermentativas facultativas.

Las bacterias lácticas homofermentativas dependen de la presencia o ausencia de las enzimas aldolasa y fosfocetolasa. *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* y algunos *Lactobacillus* contienen aldolasa y de ahí su capacidad de fermentar glucosa vía Embden-Meyerhof, tales bacterias lácticas producen solo lactato y son incapaces de metabolizar pentosas. *Leuconostoc* y algunos *Lactobacillus* contienen fosfocetolasa y fermentan glucosa

usando la vía de la fosfocetolasa; además de lactato, se producen acetato (etanol) y CO_2, estos microorganismos heterofermentativos son capaces de fermentar pentosas. Por último las bacterias lácticas heterofermentativas facultativas se caracterizan por que las pentosas inducen la formación de fosfocetolasa (Marshall, 1984).

En la Figura I.5. se presentan las principales rutas metabólicas de la fermentación de hexosas en bacterias lácticas.

Las bacterias lácticas requieren de azúcares como la lactosa, además de aminoácidos, vitaminas y otros factores de crecimiento.

I.5.5. Actividad proteolítica

Las bacterias lácticas son consideradas débilmente proteolíticas, a comparación de otros grupos bacterianos como *Pseudomonas, Bacillus, Proteus* y coliformes. Law y Kolstad (1983) estudiaron al complejo equipo proteolítico de las bacterias lácticas, que pueden presentar proteasas y peptidasas. Estos estudios son esquematizados en la Figura I.6. Estos autores reportan la existencia de proteasas y peptidasas principalmente de tipo intracelular, aunque pueden producir proteasas con propiedades similares a las extracelulares, debido a que son liberadas fuera de la célula sin evidencia de lisis o ruptura celular. Se reporta que este tipo de proteasas se encuentran ligadas a la membrana por medio de calcio, y cuando éste está se encuentra a bajas concentraciones o en presencia de secuestrantes, hay una liberación de las enzimas. Por otra parte, los estudios de la existencia de las proteasas intracelulares son concluyentes y de hecho se ha demostrado su localización en la célula (Law y Kolstad, 1983).

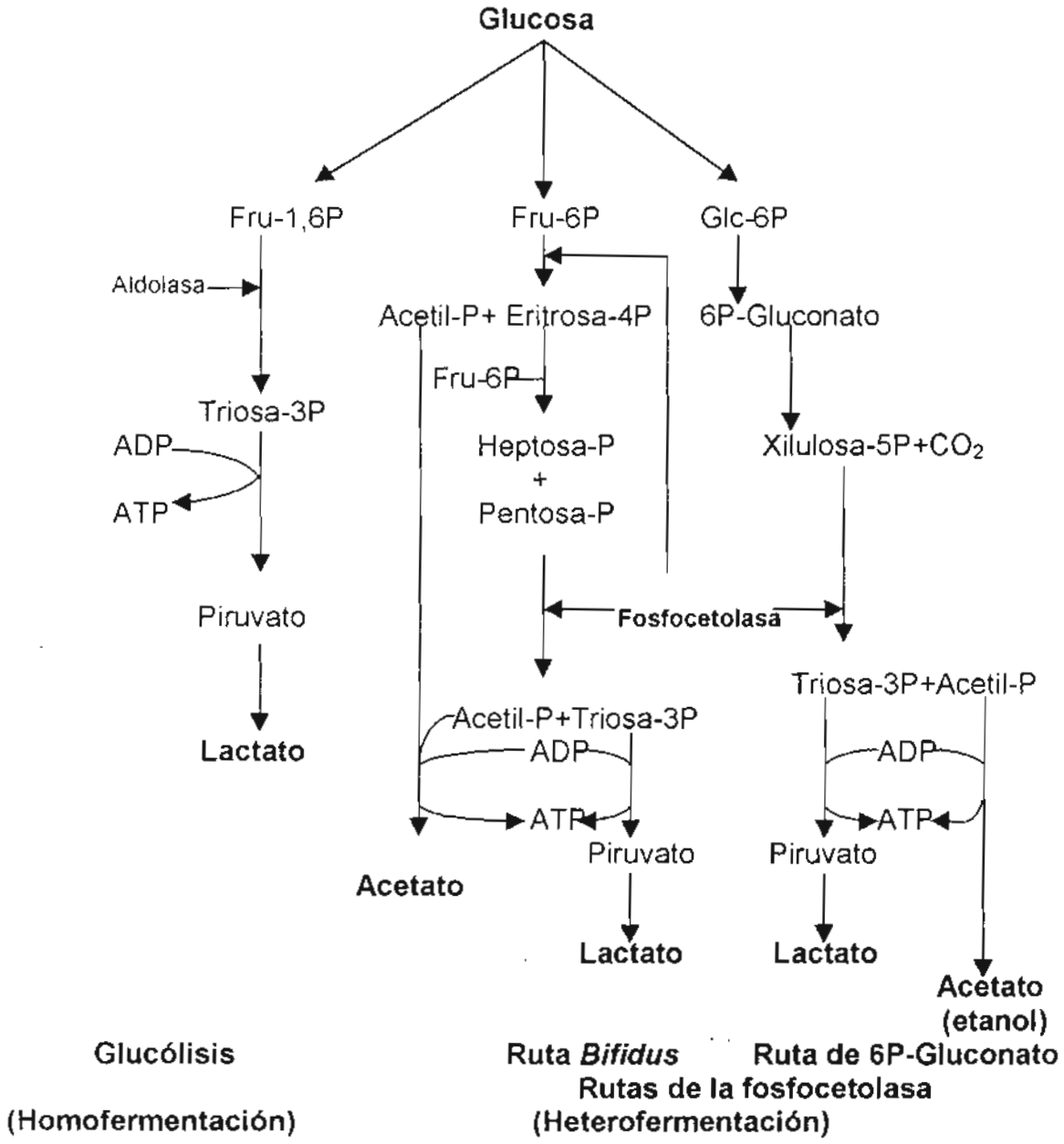


Figura I.5. Principales rutas de fermentación de carbohidratos por parte de las bacterias lácticas Fru-1,6P, fructuosa 1,6 difosfato, Fru-6P, fructuosa 6 fosfato,Glc-6P, Glucosa 6 fosfato(Kandler, 1983).

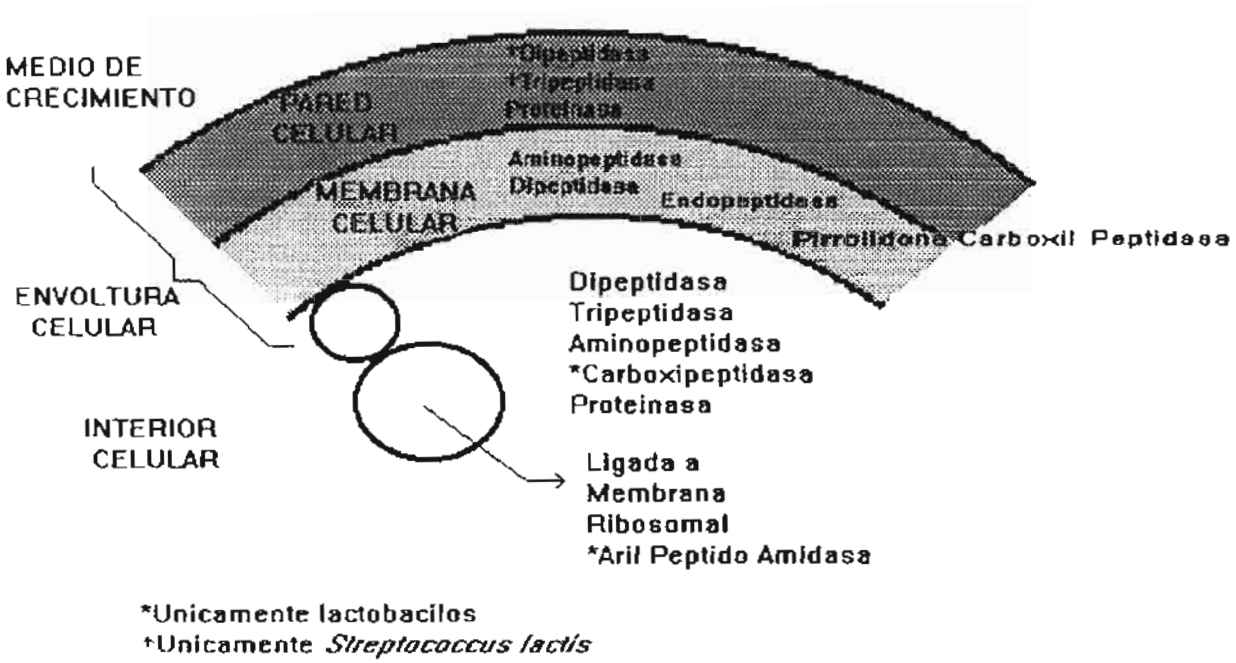


Figura I.6. Representación esquemática de la posible localización de proteinasas y peptidasas en bacterias lácticas. (Law y Kolstad, 1983)

I.5.6. Bacterias lácticas aisladas en organismos marinos

Las principales bacterias lácticas aisladas de organismos marinos son *Leuconostoc mesenteroides, Pediococcus cerevisiae, Lactobacillus plantarum, Streptococcus lactis, Streptococcus bovis, Streptococcus faecalis, Leuconostoc lactis, Lactobacillus coryneformis, Lactobacillus casei pseudoplantarum* y *Pediococcus halophilus* (Han-Ching y col., 1992).

Las bacterias lácticas se caracterizan por un sistema respiratorio deficiente, debido a la ausencia de grupos hemo, lo que les permite retener su metabolismo fermentativo en la presencia de oxígeno, siendo capaces de descender el pH en condiciones aeróbicas.

Algunas cepas aisladas a partir de pescado, pueden presentar un metabolismo complejo

Schroeder y col. (1980) observaron que una cepa aislada de *Lactobacillus plantarum* presentó un comportamiento homofermentativo en anaerobiosis y en presencia de altas concentraciones de glucosa, sin embargo en presencia de oxígeno y a bajas concentraciones de glucosa el metabolismo fue heterofermentativo. Estos cambios metabólicos ocurren en la conversión de piruvato el cual sigue una ruta secundaria, conduciendo a la formación de acetato, etanol, formato y CO_2. Esta conversión es estimulada en ciertas bacterias por concentraciones de glucosa bajas o por presencia de oxígeno (Kandler, 1983)

Algunas especies de bacterias lácticas pueden fermentar compuestos que contienen nitrógeno con la producción de amoniaco y productos orgánicos, muy diferentes de aquellos formados por fermentación de azúcares. El desarrollo de bacterias lácticas en material de origen marino que no contiene azúcar se caracteriza por la producción de gas, la cual podría ser favorecida por la descarboxilación de aminoácidos. En algunas especies de *Lactobacillus* la formación de CO_2 corresponde al paso final en la degradación de arginina, la cual es también acompañada por la liberación de amoniaco. Pocos lactobacilos heterofermentativos pueden utilizar aminoácidos como única fuente de energía (Han-Ching y col., 1992). La descarboxilación de aminoácidos puede conducir a la producción de aminas, que producen olores o acumulación de toxinas. El catabolismo de aminoácidos azufrados puede formar sulfuro de hidrógeno, ruta poco frecuente en lactobacilos pero que ha sido reportada en anaerobiosis a pH ácido y concentración baja de azúcar. (Law y Kolstad, 1983).

Las tecnologías tradicionales de fermentación láctica utilizan temperaturas en un intervalo de 15-35° C, en algunos casos se incrementa hasta 43° C. Estas condiciones conducen a una fermentación rápida, la cual termina después de 18 a 48 horas.

El pH en los sustratos de origen marino son generalmente neutros, uno de los objetivos de la fermentación es disminuir pH rápidamente, de esta forma inhibir el desarrollo de microorganismos alteradores y patógenos.

En muchos productos fermentados es común el descenso de a_w por adición de sales o deshidratación, lo que puede causar un retraso en la fermentación. Sin embargo, hay casos como el desarrollo de *Lactobacillus plantarum* en que se produce un descenso moderado de pH de 5.4 a a_w de 0.9. A medida que se incrementa la a_w el pH puede disminuir hasta por debajo de 4.5 (Han-Ching y col., 1992).

I.5.7. Ensilados

Definición

El ensilado es un proceso de conservación mediante el uso de ácidos para prevenir el crecimiento de microorganismos patógenos, la acción de enzimas nativas digiere las proteínas produciéndose un material líquido, que puede ser usado para alimentación animal. Se reconocen dos tipos de ensilados, de acuerdo al tipo de acidificación, descritos a continuación.

Ensilado Químico

El ensilado químico se realiza mediante la adición de ácidos inorgánicos u orgánicos (clorhídrico, sulfúrico, fórmico, propiónico solos o combinados) y posteriormente es neutralizado. Guillou y col. (1995) elaboraron un ensilado químico de desecho de camarón con ácidos sulfúrico, fosfórico y propiónico; determinaron el efecto del tiempo de almacenamiento (3 meses) en compuestos inestables, tales como astaxantinas y ácidos grasos polinsaturados, encontrando que una porción de pigmento permanecía en el desecho sin ensilar, mientras que la recuperación del compuesto fue total en el ensilado. Asimismo, se detectaron mayores concentraciones de ácidos grasos en el ensilado.

Ensilado fermentado

Los ensilados fermentados son aquellos en donde el ácido es producido *in situ* por fermentación bacteriana, a partir de una fuente de carbohidratos (malta, cereales, melazas, yuca, tapioca etc.) en donde los microorganismos responsables pueden pertenecer a la

microflora natural o bien ser cultivos iniciadores. El ensilado fermentado tiene la ventaja de que es más económico y menos peligroso ya que no involucra el uso de reactivos corrosivos, y se producen agentes inhibidores de microorganismos patógenos como bacteriocinas y peróxido de hidrógeno, no necesita neutralización y el valor nutricional es mayor que en el ensilado ácido (Hall y Da Silva, 1994; Han-Ching y col., 1992).

Se considera que el valor nutricional del ensilado es bueno, ya que presenta un contenido de aminoácidos esenciales significativamente más alto que los estándares, aunque tiene deficiencia de tiamina debido a que es degradado por tiaminasas (Hansen y Llanes, 1994).

Un buen ensilado cambiará de estado semi-sólido a líquido en 2 a 3 días, el pH es reducido y las enzimas actúan sobre las proteínas. Si el líquido y sólido (sedimento) son separados por centrifugación, el líquido representa aproximadamente 60 a 70 % (peso húmedo) del ensilado. El líquido contiene aproximadamente la mitad de las proteínas del desecho, y el resto permanece con el sedimento. En el caso de ensilados de materiales quitinosos, 85% de la quitina permanece en el sedimento, pero puede ser solubilizada por acción de enzimas. Parte de la grasa aparece como sobrenadante y el resto permanecen en el sedimento; los pigmentos son parcialmente solubles en la grasa, aunque una porción se encuentra asociada con la quitina. El ensilado puede separarse del sedimento por centrifugación, posteriormente secarse y adicionarse con algún carbohidrato, lo que constituye un pienzo. Por otra parte, la quitina puede tratarse hasta producir un compuesto final puro (Hall y Da Silva, 1994).

II. Justificación del proyecto

En las últimas dos décadas la explotación de productos marinos ha experimentado una significativa expansión, la que produce una gran cantidad de desechos, a consecuencia del impresionante crecimiento de alimentos congelados y enlatados, lo que conduce a la utilización de estos desperdicios para evitar contaminación. Según datos de Knorr (1991), la producción mundial de desperdicio de crustáceos se estimó de 1.44 millones de toneladas en base seca, seguramente en un futuro cercano se tendrá que hacer frente a estrictas leyes ecológicas que impedirán que se tiren estos desechos al mar. La utilización integral de recursos renovables es ciertamente una meta que reclama que nuevas tecnologías sean desarrolladas.

Para muchos productores el problema de la utilización de desechos de productos marinos es simplemente que son muy perecederos bajo condiciones ambientales y considerando que hay periodos en los que se encuentran en exceso dificultándose su manejo antes de la descomposición. Estos desechos pueden ser congelados antes de ser procesados pero debido al gran volumen de éstos y el limitado espacio en los congeladores (el cual se reserva para productos con mayor valor agregado) hace poco costeable la conservación por este método. En México, una mínima parte de las cabezas de camarón son convertidas a harina, la mayor parte son desechadas en altamar o en zonas aledañas a las áreas de cultivo con el consiguiente deterioro ambiental (Cañipa-Morales, 1994).

Las concentraciones de quitina, proteína (enzimas), pigmentos y lípidos en desechos de crustáceos son altas, según lo reportan varios autores (Tabla I.3).

Desde inicio de los años setenta, existe interés mundial en la recuperación y aplicación de la

quitina. La cual es obtenida por métodos de purificación, que involucran el uso de ácidos y álcalis a concentraciones y condiciones drásticas. Este proceso además de ser contaminante la mayoría de las veces no permite la recuperación de otros productos que se encuentran en estos sustratos.

Como se revisó en la sección I.2 de la revisión bibliográfica, la quitina es un biopolímero que tiene muchas aplicaciones en el mercado. Los procesos tradicionales (ácido álcali) para obtener quitina resultan agresivos a la ecología y en ocasiones a la calidad del producto ya que es posible ocasionar depolimerización. Lo anterior ha promovido la búsqueda de métodos alternativos, que involucran el uso de enzimas y/o microorganismos.

Los estudios que se han realizado sobre proteasas de camarón han tenido como objetivo conocer el funcionamiento de las proteasas endógenas en la autólisis, con la finalidad primordial de retardar la descomposición debido a la alta demanda de estos crustáceos. Se han purificado y caracterizado algunas de estas proteasas de los crustáceos en fresco, sin embargo no así para el ensilado, en donde no se conoce como se ven afectadas las enzimas por la fermentación y si las que permanecen activas pudiesen ser separadas.

Resalta la importancia en el estudio de fuentes alternativas de enzimas debido a la alta demanda industrial de proteasas, así como las características especiales reportadas, como el ser activas de pH neutro a alcalino.

Otro aspecto poco estudiado, es el grado de hidrólisis de las proteínas que puede ser obtenido por la fermentación, causada posiblemente por las proteasas endógenas y bacterianas en el sistema.

Los pigmentos poseen aplicaciones comerciales, como cosmetología y alimentación de peces. Dichos pigmentos pueden ser extraídos del camarón, existen estudios que observaron un

aumento en el rendimiento y la estabilidad de los pigmentos con la presencia de ácidos (ensilados químicos). Con respecto a esta tesis se establecieron y compararon metodología de extracción y rendimiento.

En esta tesis se plantea la fermentación del desecho de camarón, como tratamiento alterno de obtención de quitina que permita además recuperar otros productos como proteasas y pigmentos.

III. Antecedentes directos

La fermentación láctica de desechos de camarón (ensilado) ha sido propuesta por Dr. Hall en el Reino Unido, como un método de conservación que puede usarse para alimentación animal debido a su valor nutricional, y del cual se puede separar quitina parcialmente desmineralizada y desproteinizada.

Por otra parte, vías alternas de desproteinización de quitina fueron estudiadas por Dr. Healy en Reino Unido. Este grupo utilizó microorganismos proteolíticos como *Pseudomonas maltophila* y proteasas como tripsina bovina, comparando con el método químico.

IV. Objetivos

Objetivos Generales

Aplicación de fermentación láctica en desechos de camarón, para aumentar la vida de anaquel de estos. Recuperación de quitina, proteasas y pigmentos, a partir del ensilado producido.

Objetivos Particulares

1.1 Establecimiento de las condiciones de la fermentación: selección del iniciador, determinación de concentración del iniciador, fuente de carbono y tiempo de fermentación.

2.1. Recuperación de quitina, evaluación del grado de desmineralización y desproteinización después de la fermentación.

2.2. Caracterización de la quitina obtenida, grado de desacetilación, espectros de infrarrojo y análisis elemental.

3.1. Aislamiento, purificación parcial de proteasas endógenas del desecho de camarón fermentado.

3. 2 Determinación de la distribución del peso molecular de las proteínas obtenidas después de la fermentación.

4.1 Determinación del método de extracción y cuantificación de pigmentos

V. Materiales y Métodos

V.1. Fermentación láctica

V.1.1. Materiales

Las cabezas de camarón *(Penaeus sp.)* fueron compradas en el mercado de La Nueva Viga de la Ciudad de México. El desecho fue molido en un molino de carne (Sanitary Estados Unidos) y congelado hasta su utilización (-20°C).

V.1.2. Microorganismos

Las bacterias ácido lácticas utilizadas fueron cepas aisladas de camarones tropicales, identificadas como *Lactobacillus casei* (A3) y *Lactobacillus sp.* (B2) (Zakaria y col., 1995) e iniciadores comerciales de Christian Hansen: Floracarn SL (*Lactobacillus pentosus* y *Staphylococcus carnosus* proporción 1:2) y LP-1 (*Lactobacillus pentosus).* Las cepas fueron conservadas por liofilización. Los iniciadores fueron crecidos en medio APT (Difco, E.U.) a 30°C hasta 10^8 ufc/ml. En la Tabla V.1. se presenta información de los cultivos iniciadores utilizados. Para determinar la concentración de microorganismos se utilizó la curva que relaciona densidad óptica, ufc/ml y peso seco (Daalgard y col. 1994) (Apéndice I, Figura A1 y Tabla A1).

Tabla V.I. Microorganismos iniciadores probados en fermentación láctica de camarón.

Iniciador **Microorganismos**	**Procedencia**	**Intervalos de temperatura y pH de crecimiento**	
LP-1 *Lactobacillus pentosus*	Christian Hansen[1]	Temp. mínima 15°C Temp. óptima 35°C Temp. máxima 40°C	3.7 a 7.0
Floracarn SL *Staphylococcus carnosus* y *Lactobacillus pentosus* (2:1)	Christian Hansen[1]	Para *S. carnosus*: Temp. mínima 10°C Temp. óptima 30°C Temp. máxima 45°C Para *Lb. Pentosus*: Temp. mínima 15°C Temp. óptima 35°C Temp. máxima 40°C	Para *S. carnosus* 4.8 a 8.0 Para *Lb. pentosus* 3.7 a 7.0
A3 *Lactobacillus casei* B2 *Lactobacillus sp.*	Cepas aisladas de especies tropicales de camarón[2]. Identificadas por sistema API.	Sin información	Sin información

[1]Información de productos, Christian Hansen, Dinamarca.

[2]Zakaria y col. 1995.

V.1.3. Selección del iniciador

El desecho de camarón fue mezclado con 10% (p/p base seca) de glucosa monohidratada e inoculada con 5 % (v/p base húmeda) de los diferentes iniciadores. La fermentación fue llevada a cabo a 30°C, tomando muestras a las 0, 24 y 48 horas (Guerrero y col., 1995).

Estadísticamente se determinó el inoculo que produjo la mayor cantidad de ácido. Las variables de respuesta fueron ácidos orgánicos, ácido láctico y ácido acético, determinado por HPLC; pH, acidez total titulable (%ATT expresado como ácido láctico), a_w determinada por un sistema Decagon CX-1 (Devices Inc. Washington Estados Unidos de América.) (SAS, 1989).

V.1.4. Concentración de glucosa y nivel de inoculo

El desecho de camarón fue mezclado con las siguientes concentraciones de glucosa: 5, 7.5, 10 y 15% (p/p base húmeda) e inoculada con *Lactobacillus sp.* (B2) a diferentes concentraciones: 5, 10 y 20 % (v/p base húmeda) tomándose muestras a las 0, 4, 8, 24 y 48 horas de fermentación

Se llevó a cabo un análisis de superficie de respuestas para determinar la concentración de glucosa e iniciador que producían la mayor cantidad de ácido, utilizando como variables de respuesta pH y acidez total titulable (Giovanni, 1983; Schutz, 1983).

V.1.5. Análisis químicos

A cada muestra de la fermentación se le realizaron las siguientes determinaciones:

Acidez

El pH fue medido con un potenciómetro (Conductronic pH 20), previamente calibrado a dos puntos pH 4 y 7 a temperatura ambiente (20° C). Las muestras fueron mezcladas con una barra magnética durante la determinación.

Las muestras fueron diluidas 1:10 (p/v) en agua destilada y agitadas con una barra magnética, para medir la acidez total titulable (ATT), expresada como ácido láctico. La determinación fue hecha por titulación potenciométrica con NaOH valorado 0.1 M hasta un pH final de 8.0 (Zakaria, 1997). Suponiendo que todo el ácido fue láctico, entonces 1 ml de 0.1 M de NaOH es equivalente a 0.009 g de ácido láctico (90 g/mol), de ahí que el porcentaje de ácido es calculado:

$$\%ATT(p/v)=(\text{gasto del titulante})(0.009)(\text{volumen de la muestra})^{-1}$$

Contenido de glucosa por método de azúcares reductores

Las muestras fueron diluidas en agua 1:10 (p/v) con agua destilada, mezcladas y centrifugadas a 3500 g durante 20 minutos. El sobrenadante fue nuevamente diluido hasta alcanzar una concentración de azúcares en un intervalo de 0 hasta 100 µg/ml, que corresponde a la curva de calibración hecha con glucosa como azúcar estándar (Miller,1959).

Contenido de glucosa, ácidos orgánicos y etanol por HPLC.

Las muestras analizadas fueron previamente disueltas en agua y centrifugadas. Posteriormente los sobrenadantes obtenidos fueron filtrados en filtros de Millipore 0.45 mm.

Los productos de la fermentación: ácidos orgánicos (ácido láctico y acético), etanol y glucosa fueron analizados por cromatografía de liquidos a alta resolución en un cromátografo Perkin Elmer, utilizando una columna Phenomenex Rezex para ácidos orgánicos a una temperatura de 50°C con una fase móvil de ácido sulfúrico 30 mM. Se empleó un detector de indice de refracción

V.1.6. Determinación de la microflora

El crecimiento de la microflora durante la fermentación, fue determinado mediante la técnica de conteo en placa en medios sólidos de Man Rogosa Sharpe, MRS, (Rogosa y col., 1951), verde bilis brillante y de cuenta estándar para bacterias lácticas, coliformes y mesófilos totales respectivamente (Secretaría de Salubridad y Asistencia, 1979).

V.2. Recuperación de proteínas. Purificación parcial de proteasas.

V.2.1. Materiales.

Separación licor-sedimento del ensilado.

El residuo sólido fue separado del licor por centrifugación a 5000 rpm durante 20 minutos a 4°C en una centrífuga refrigerada (Beckman modelo JA-20, California). El dispositivo de centrifugación consistió en botellas de centrífuga con tapa en las que se adaptó tela de algodón, en donde se introdujo el camarón fermentado con la finalidad de conservar arriba de la tela el residuo sólido y en el fondo de la botella el licor. En la Figura V.1., se resume la separación de las proteasas a partir del licor de la fermentación.

V.2.2. Actividad proteolítica

Durante todos los pasos de purificación se determinó actividad proteolitica haciendo reaccionar a las proteasas con hemoglobina o caseina al 2% (p/v), 10 minutos a 30° C. La reacción fue parada con ácido tricloroacetico al 5 % (p/v). La mezcla se centrifugó y se determinó absorbencia del sobrenadante a 280 nm. La unidad de actividad enzimática se definió de acuerdo a Kunitz (1947) como "La cantidad de enzima que produce un cambio en la absorbencia a 280 nm de 0.001 por minuto en las condiciones descritas".

V.2.3. Determinación de proteína

El método de Lowry modificado por Peterson (1977), utiliza seroalbumina bovina (Sigma, San Luis Misouri) como proteína estándar en un intervalo de concentración de 0 a 200 mg/ml (Apéndice I).

Se añadió duodecil sulfato de sodio el cual evita interferencias con lípidos y otras sustancias que disminuyen la exactitud en la determinación. La absorbencia fue registrada a 750 nm.

V.2.4. Ultrafiltración

El licor obtenido de la fermentación fue concentrado por ultrafiltración, para lo cual se probaron membranas con diferentes cortes de peso molecular, desde 2, 10, 50 y 300 kDa.

En la Tabla V.2., se listan las propiedades de algunas de las membranas de ultrafiltración empleadas.

Tabla V.2. Características generales de las membranas de ultrafiltración utilizadas (Harris, 1989).

Membrana	Fabricante	Corte nominal de peso molecular (kDa).	Propiedades
XM Acrílica moderadamente hidrofílica	Amicon	100 300	Baja absorción de macromoléculas. Resistente a fosfatos y detergentes
YM Celulosica hidrofílica	Amicon	50 10 2	Absorción de proteínas excepcionalmente baja, por lo que son útiles particularmente para soluciones concentradas de proteínas.

V.2.5. Filtración en gel a baja presión

Se utilizó una columna de altura de 33 cm, con un empaque de la columna Sephacryl High Resolution 300 (Pharmacia Suecia), que posee un intervalo especifico de peso molecular de 10 a 1000 kDa. La columna estaba acoplada a un controlador y programador de gradiente LCC-500, así como a un colector de fracciones Pharmacia (Suecia) Frac-100, equipado con una bomba peristáltica P-500 y un detector con lampara de luz ultravioleta UV-1 y graficador de dos canales modelo 482. La fase móvil utilizada fue buffer de fosfatos 0.05 M y 0.15 M NaCl, pH 7 a un flujo de 0.6 ml/min.

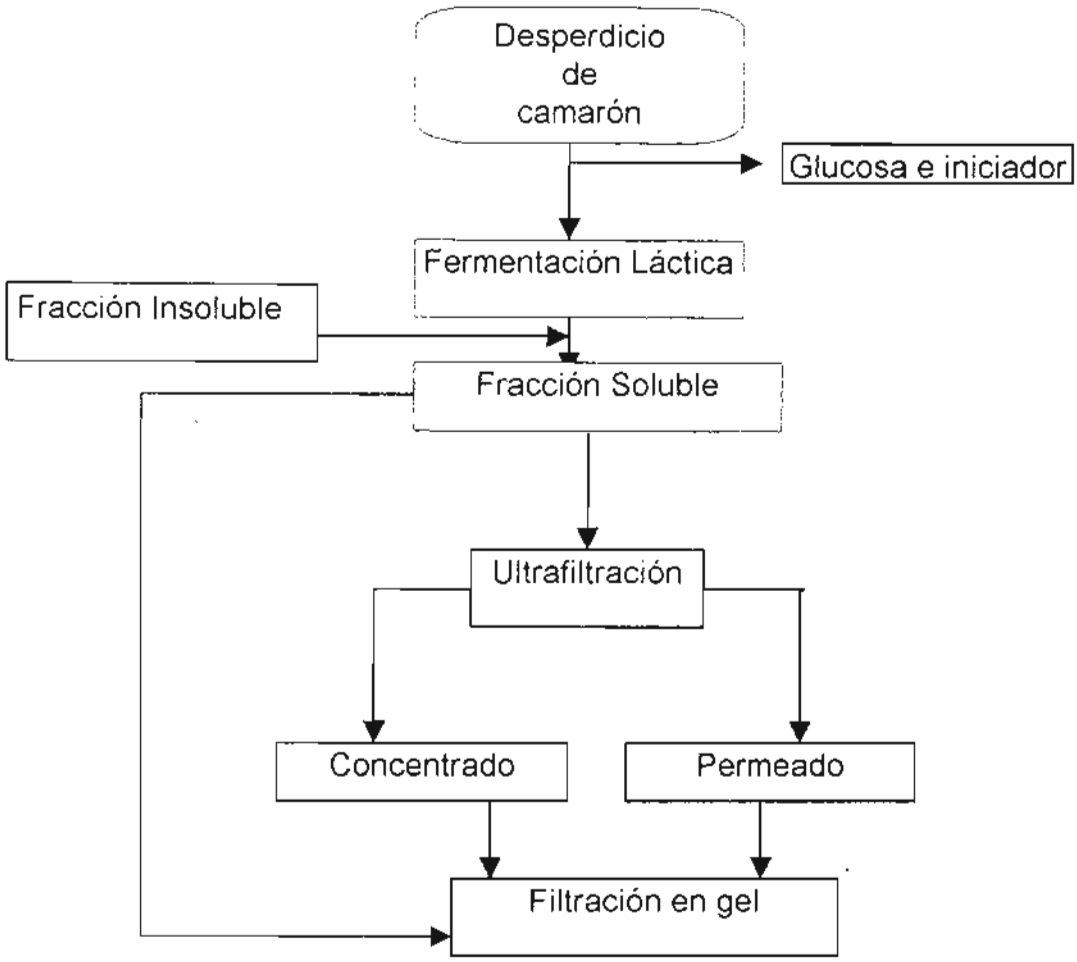


Figura V.1. Diagrama de flujo seguido para el aislamiento y purificación parcial de proteasas a partir de desperdicio de camarón

V.3. Extracción de quitina

V.3.1. Materiales

Desperdicio fresco

Las cabezas de camarón molidas (sección V.1.1.), fueron secadas a 105°C durante la noche, posteriormente fueron molidas y pasadas por una malla (Tyler No. 12) de tal forma que el tamaño de partícula fuera inferior a 1400 µm.

Desperdicio fermentado

El material fermentado de acuerdo a lo descrito en la sección V.1., fue secado, molido y seleccionado por tamaño como se indicó en el párrafo anterior.

V.3.2. Extracción de quitina

Este proceso consistió en las siguientes etapas:

Extracción de pigmentos.

La técnica utilizada fue la reportada por Hall y Hill (1990) y consistió en un sistema de solventes formado por agua destilada, cloroformo y metanol en proporciones 1:1:2 por gramo de sólido. Se adicionó 0.1% de BHA, butil hidroxianisol (BDH, Poole Inglaterra) como antioxidante. La mezcla de muestra, solventes y antioxidante se agitaron continuamente durante 2 minutos, posteriormente esta se filtró a vacío (Whatman No. 1) realizando lavados con cloroformo. El filtrado se colocó en un embudo de separación, decantándose la fase del cloroformo la cual se concentró en rotavapor a una temperatura de 65°C con una velocidad de rotación de 200 r.p.m. Los pigmentos extraídos fueron determinados por espectofotometría a 483 nm.

Se utilizó la ecuación descrita por Kelly y Harmon (1972), para el cálculo de la concentración de carotenoides presentes (Capítulo I. I.4):

$$x = Ay(A_{1cm}^{1\%} X\ 100)^{-1}$$

donde:

x son gramos de carotenoides presentes en y ml de solvente, considerando el coeficiente especifico de absorción $A_{1cm}^{1\%} = 1600$ para el cloroformo.

Desmineralización

El residuo sólido de la fase anterior fue mezclado con ácido clorhidrico1.2 M en agitación continua a 25° C durante 1 hora, en una proporción de 1:15. Posteriormente se lavó con agua hasta neutralidad. Se filtró al vacio con papel Whatman numero 1. El sólido se secó durante la noche a 60°C (Zakaria, 1997).

Desproteinizacion química

El sedimento obtenido después de la desmineralización fue mezclado con hidróxido de sodio 1 M durante 2 horas a 25° C. Se lavó hasta neutralidad, filtrándose al vacio en papel Whatman numero 1. El sólido se secó durante la noche a 60°C (Zakaria, 1997).

Desproteinización enzimática

La desproteinzación enzimática fue llevada a cabo en los sedimentos desmineralizados, que fueron resuspendidos en buffer de fosfatos 0.013 M pH 7. Se determinó el tiempo de reacción con 20 mg de tripsina bovina (BDH Poole Inglaterra) por gramo de desecho a 30°C tomándose muestras cada 2 hasta 96 horas (Bustos y Healy, 1994a). Las muestras fueron centrifugadas y los sobrenadantes se les determinó proteína soluble.

Posteriormente se emplearon enzimas comerciales como Alcalasa, Neutrasa, Savinasa y Esperasa en proporción 1:1:1:1 (Novo Industrias Copenhague, Dinamarca) así como el retenido de la ultrafiltración de proteasas de camarón. Estos experimentos fueron llevados a cabo a pH 7 y temperaturas de 30 ó 50°C según fuese el óptimo reportado por el fabricante (Novo, 1996). Se prepararon controles para ambas temperaturas sin enzima, es decir, sedimento desmineralizado en buffer de fosfatos. En el sobrenadante del medio de reacción se determinó proteína soluble y en los sedimentos nitrógeno total.

Blanqueado

Una vez desmineralizado y desproteinizado, se añadió al residuo una solución de hipoclorito de sodio al 5%, para ser posteriormente lavado y filtrado, para recuperar el sedimento. El sólido se secó durante la noche a 60°C (Zakaria, 1997).

V.3.3. Análisis de muestras

Determinación de humedad

Se determinó el contenido de humedad en el camarón crudo, las fracciones sólida y líquida obtenidas del ensilado. La metodología empleada consistió en pesar con exactitud 1 a 2 g de muestra en una cápsula de porcelana con peso constante. Se secaron a 105°C durante 12 horas, se sacaron de la estufa y se dejaron enfriar 1 hora para volver a ser pesadas. El contenido de humedad fue calculado por diferencia de pesos (A.O.A.C., 1980).

Contenido de calcio

Las muestras secas fueron carbonizadas con un mechero, posteriormente se colocaron en una mufla a 550° C durante 2 horas hasta que las cenizas fueran completamente blancas. Estas se dejaron enfriar, se humedecieron con agua desionizada y se les adicionaron 5 ml de ácido clorhídrico diluído (1:1 v/v). Las muestras fueron puestas en baño de ebullición hasta sequedad, se adicionaron 5 ml de HNO_3 y 5 ml de agua desionizada, se filtraron y se diluyeron hasta un volumen de 50 ml. Estas soluciones muestras fueron posteriormente diluidas y se les determinó absorbencia a una longitud de onda de 422 nm en un espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin Elmer, modelo 1100, Norwalk, Estados Unidos) con flama aire/acetileno (Pearson, 1976). Una serie de estándares de calcio fueron preparados a concentraciones de 1,2,3,4 y 5 mg/L (Apéndice IV, Figura AIV.1).

Contenido de proteína

i) Proteína soluble

Se llevó a cabo por el método reportado por Peterson (1977), anteriormente mencionado.

ii) Nitrógeno total

El contenido de nitrógeno total fue determinado en las fracciones sólida y liquida de la fermentación, así como en el desecho en fresco y la quitina obtenida por tratamiento químico, mediante el método de Kjeldahl (Pearson, 1976), en las muestras sólidas y líquidas.

El método de Kjeldahl consiste en la determinación de nitrógeno total mediante el calentamiento de la muestra con ácido sulfúrico concentrado (digestión), para acelerar la reacción se adiciona un catalizador. La oxidación convierte el nitrógeno a sulfato de amonio, posteriormente se alcaliniza con hidróxido de sodio, el amonio se destila y se recupera en ácido bórico en exceso y se estima la concentración por titulación.

Digestión

La estimación del nitrógeno total en las muestras fue llevada a cabo utilizando un sistema Kjeldahl Büchi (Büchi Laboratoriums-Technik Suiza). Las muestras secas, 0.5 g, fueron transferidas a los tubos de digestión que contenían ácido sulfúrico concentrado (12 ml) y se les agregaron 5 tabletas de la mezcla de catalizadores ($K_2 SO_4$ y $CuSO_4$), y fueron digeridos hasta que la solución cambió de color verde o verde claro (aproximadamente 30 a 60 minutos). Los tubos de digestión y sus contenidos fueron enfriados y transferidos a la unidad de destilación.

Destilación

La unidad de destilación fue programada para la adición automática de solución de NaOH al 32% (p/v), la neutralidad fue indicada por un cambio de color a negro. Si la solución no cambiaba a negro se adicionaba manualmente más solución de NaOH utilizando el botón correspondiente en el equipo. El destilado fue colectado en 60 ml de ácido bórico (2% p/v) que contenía rojo de metilo y bromocresol como indicador durante 3 minutos. El destilado fue titulado con 0.1 M de HCl hasta un color grisáceo. Se utilizó un blanco (papel filtro sin muestra), siguiendose el mismo procedimiento. El porcentaje de nitrógeno total fue calculado:

$$\%\text{Nitrógeno total (p/p)}=(0.14)(\text{ml HCl muestra-ml HCl blanco})(\text{peso de la muestra})^{-1}$$

La determinación del nitrógeno total en el líquido fue llevada a cabo de la siguiente manera: se peso 1 g de muestra del licor con 5 tabletas del catalizador y 12 ml de ácido sulfúrico.

ii) Nitrógeno proteico

El porcentaje de nitrógeno proteico fue determinado a partir del nitrógeno total determinado por el método de Kjeldahl, multiplicando por 6.25.

Análisis Elemental: Carbono, Hidrógeno, Nitrógeno

Las fracciones sólidas obtenidas de la fermentación del residuo de camarón sin ensilar, así como quitina y quitosana comercial (Sigma, San Luis Misouri y Fluka, Alemania, respectivamente) fueron secados a 105°C y pulverizados en mortero para asegurar la homogeneidad de las

muestras. Se analizaron muestras de un peso de 1 a 2 mg en un analizador elemental (Perkin Elmer II 2400 Estados Unidos), determinando contenido de carbono, hidrógeno y nitrógeno (Roberts,1992).

Grado de acetilación

La determinación del grado de acetilación se llevó a cabo por microscopía de Infrarrojo (Roberts, 1992), obteniéndose los espectros bajo las siguientes condiciones:

En la obtención de los espectros se varió la velocidad del interferómetro y el número de barridos por muestra, para obtener las mejores condiciones de análisis posibles. Las cuales fueron: apodización de Kaisser-Bessel, ganancia de 1, doce barridos por muestra, velocidad de interferómetro de 0.2 cm^{-1}. El intervalo en que se obtuvieron fue de 600 a 4000 cm^{-1}.

Los espectros se obtuvieron en un espectrofotómetro de transformada de Fourier para infrarrojo marca Perkin Elmer, serie 2000, utilizando un paquete IRDM (Infrared Data Manager).

VI. Resultados y Discusiones

VI.1. Fermentación láctica del desecho de camarón

Este capítulo presenta los resultados obtenidos en el establecimiento de las condiciones de la fermentación láctica del camarón, tales como, selección del iniciador, concentración de glucosa y nivel de inoculación. Para esto ultimo se utilizaron análisis de varianza, modelos de regresión lineal y no lineal.

VI.1.1. Selección del iniciador

La selección del microorganismo fue hecha basándose en aquellos con mayor capacidad de producción de ácido, para lo cual se probaron las cepas indicadas en la Tabla V.1., determinándose pH y ATT expresada como (ácido láctico), en tiempos de 0, 24, 48 y 72 horas, adicionando 10 % de glucosa (p/p base húmeda) y 5 % (v/p base húmeda) del inóculo. La concentración de glucosa y el nivel de inóculo empleado se establecieron basándose en los resultados reportados por Guerrero y col., (1995), quienes realizaron fermentaciones lácticas en camarones de especies frías y tropicales.

La Tabla VI.1. muestra los resultados obtenidos con los diferentes microorganismos y el control (sin inocular). El análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Duncan fue hecha utilizando pH, ácido láctico y a_w como variables de respuesta, entre los tres microorganismos y el control.

Se observó que considerando a los diferentes tipos de microorganismos como fuentes de variación, no había una diferencia significativa en el caso de pH, pero si para ATT, ácido láctico y a_w, en un nivel de significancia de 0.001.

Tabla VI.1. pH, ATT(%), a_w, glucosa y productos de fermentación (HPLC) determinados en desecho de camarón fermentado 48 horas a 30°C adicionado con 10% de glucosa p/p base húmeda (365.5 g (kg^{-1} desecho fermentado de camarón base seca)), utilizando diferentes iniciadores 5% v/p base húmeda (10^8 ufc/ml).

Microorganismos	pH	ATT	a_w	g Glucosa residual (kg^{-1}desecho fermentado de camarón base seca)	g Acido láctico (kg^{-1}desecho fermentado de camarón base seca)	g Acido acético (kg^{-1} desecho fermentado de camarón base seca)
Lactobacillus sp. B2	4.6	1.90 A	0.972 A, B	9.43 ± 0.5	237 ± 0.7 A	0.00
Lactobacillus casei A3	5.4	1.0 B	0.969 B	45±0.2	191.92 ± 0.8 B	0.00
Lactobacillus pentosus	5.5	1.16 A	0.970 A	0.00	228.9 ± 0.5 A	25.25 ± 0.04
Floracam SL	5.8	0.88 B	0.965 D	4 ± 0.1	197.7± 0.09 B	19.9 ± 0.03
Control	5.8	0.76 B	0.978 C	56.44 ± 0.03	179.10± 0.2C	34 ± 0.3

Los resultados mostrados son promedio de 4 observaciones
A,B,C,D Son grupos de Duncan, es decir, grupos con la misma letra no son significativamente diferentes.

pH

Los desechos de camarón presentan una alta concentración de proteínas y minerales, 49 y 30% (p/p base seca) respectivamente (Radkkrishnan y Prabhu, 1971). Lo anterior genera un efecto amortiguador, ya que estos compuestos pueden interactuar con los protones de las formas disociadas de los ácidos (Hall y De Silva, 1992), y por consiguiente el pH, que determina la concentración de protones, fuese una variable menos precisa en cuanto a la producción de ácido. Asimismo las pruebas de Duncan no detectaron diferencias significativas entre los inóculos, por lo que se considera que todos estos produjeron resultados similares con respecto al pH final.

ATT (%) expresada como ácido láctico

Para la acidez total titulable se observaron diferencias entre las medias en dos grupos (Tabla VI.1.):

i) *Lactobacillus sp. (B2)* y *Lactobacillus pentosus,*

ii) *Lactobacillus casei (A3), Floracarn SL* y *control,*

Lactobacillus sp. (B2) y *Lactobacillus pentosus* presentaron las medias más altas, sin embargo no fue posible distinguir cual de los dos iniciadores era mejor productor de ácido láctico, ya que la ATT como variable de respuesta no proporcionó información suficiente para la selección del iniciador; debido a que no identifica el tipo de ácido cuantificado.

Acido láctico

Con el fin de determinar la cantidad y tipo de ácidos se analizó el licor producido por cromatografía de alta resolución (HPLC), con esta técnica fue posible determinar los iniciadores que conducian a una fermentación homoláctica y producían mayor cantidad de ácido láctico.

La comparación múltiple de medias, considerando la concentración de ácido láctico como variable de respuesta fue similar al de ATT aunque las pruebas de Duncan diferenciaron tres grupos (Tabla VI.1):

i) *Lactobacillus sp. (B2) y Lactobacillus pentosus,*

ii) *Lactobacillus casei (A3),*

iii) *Floracarn SL y control,*

Lactobacillus sp. (B2) y *Lactobacillus pentosus* se encontraron en el mismo grupo, en donde *B2* presenta la media más alta, 237 g ácido láctico kg^{-1} (desecho fermentado de camarón base seca), lo que indica una acidificación mayor. Adicionalmente *Lactobacillus sp. (B2)* tuvo un patrón homofermentativo, mientras que en las fermentaciones con *Lactobacillus pentosus* se observaron concentraciones bajas de ácido acético, el cual fue producido probablemente por microflora nativa (Tabla VI.1).

Debido a que *Lactobacillus sp* (B2) presentó la mayor producción de ácido, además de presentar un patrón homofermentativo, este fue seleccionado para una etapa posterior, es decir, la determinación del nivel de inóculo y la concentración de glucosa.

a_w

La comparación de medias de a_w considerando iniciadores y tiempo de fermentación como fuentes de variación, mostró los siguientes resultados: Se presentaron diferencias de medias en cuatro grupos (Tabla VI.1.):

i) *Lactobacillus pentosus* y *Lactobacillus sp.* (B2),

ii) *Lactobacillus casei (A3)* y *Lactobacillus sp (B2),*

iii) *Control,*

iv) *Floracarn SL,*

Las bacterias lácticas se desarrollan mejor en medios con actividades acuosas elevadas, lo que explica que las a_w más altas correspondieron a las fermentaciones en donde la producción de ácido fue mayor.

El tiempo de fermentación como fuente de variación, observó diferencias significativas entre 0 y 24 a 48 horas, pero no hubo cambios de a_w entre 24 y 48 horas de la fermentación (Tabla VI.1, Figura VI.1). Una explicación a los cambios de a_w es que pudo haber pérdidas de agua debido a evaporación ya que los frascos en los que se fermentó no fueron cerrados herméticamente. La Figura VI.1. presenta estos resultados con respecto a tiempo e iniciador. En fermentaciones con Floracarn SL y el control, las cuales presentaron signos de descomposición (olor, color y pH), hubo un decremento de la actividad de agua mayor (Tabla VI.1). La actividad de agua se ve afectada directamente por la concentración de solutos por lo que la ruptura de moléculas grandes, como proteínas, en moléculas pequeñas podría explicar la disminución de actividad de agua (Horner, 1997).

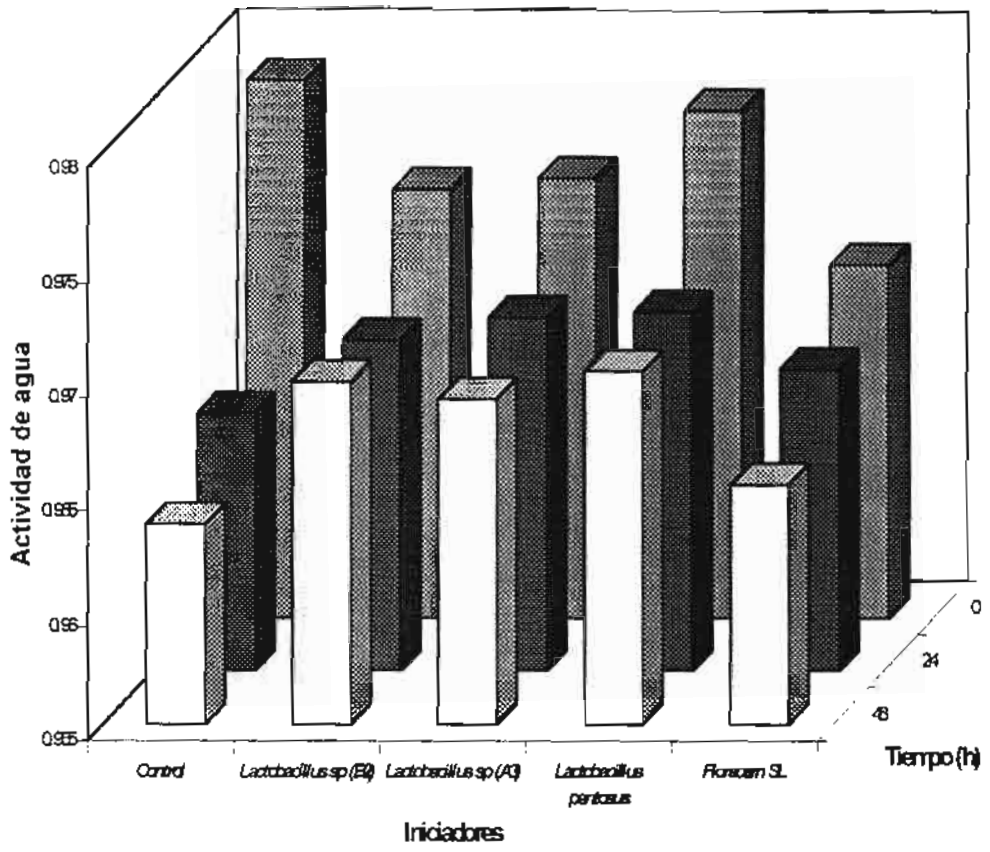


Figura VI.1. Efecto del tiempo de cultivo e iniciador sobre la actividad de agua en fermentaciones de cabeza de camarón con 365.5 g de glucosa (kg^{-1}desecho fermentado de camarón base seca) a 30°C.

VI.1.2. Concentración de glucosa y nivel de inoculación.

El porcentaje de acidez total titulable (%ATT) fue utilizado como variable de respuesta para la optimización de las concentraciones de inóculo y glucosa, debido a que se sigue para su determinación una técnica simple y rápida, lo cual permitió analizar 320 muestras.

Se probaron tres niveles de inoculación con *Lactobacillus sp.* (B2): 0, 5, 10 y 20 % (v/p base húmeda) así como cuatro concentraciones de glucosa: 5, 7.5, 10 y 15 % p/p base húmeda (182.75, 274.12, 365.5, 548.24 g de glucosa(kg^{-1} desecho fermentado de camarón base seca)). Se tomaron muestras a las 0, 4, 8, 24 y 48 horas de fermentación. Los resultados son mostrados en las Figuras VI.2, VI.3., VI.4. y VI.5., en los que se observa la variación de pH, ATT (expresada como % ácido láctico) y concentración de glucosa residual, determinada por el método de azúcares reductores reportado por Miller (1959).

En las fermentaciones con bajo contenido de glucosa, Figuras VI.2 y VI.3, se observaron aumentos de pH después de las 48 horas, debido a la descomposición de proteínas que producen compuestos aminados (Hall y De Silva, 1992).

Bajas concentraciones de ácido fueron detectadas con estas condiciones, produciéndose las más altas a 8 y 24 horas para 5 y 7.5 % de glucosa p/p base húmeda respectivamente, no obstante se consumió glucosa, esto coincide con lo reportado por van Wyk y Heydenrych (1985) en ensilados de pescado. Estos autores encontraron consumo de carbohidratos por levaduras, para producir bióxido de carbono y etanol, lo que ocasionaba una disminución del sustrato disponible al lactobacilo usado como iniciador. Este consumo favorecía la descomposición del ensilado, con un aumento de pH. Por otro lado, Pelczar y col. (1977) reportaron que las levaduras y ciertas bacterias pueden consumir ácido láctico en ausencia de azúcares fermentables.

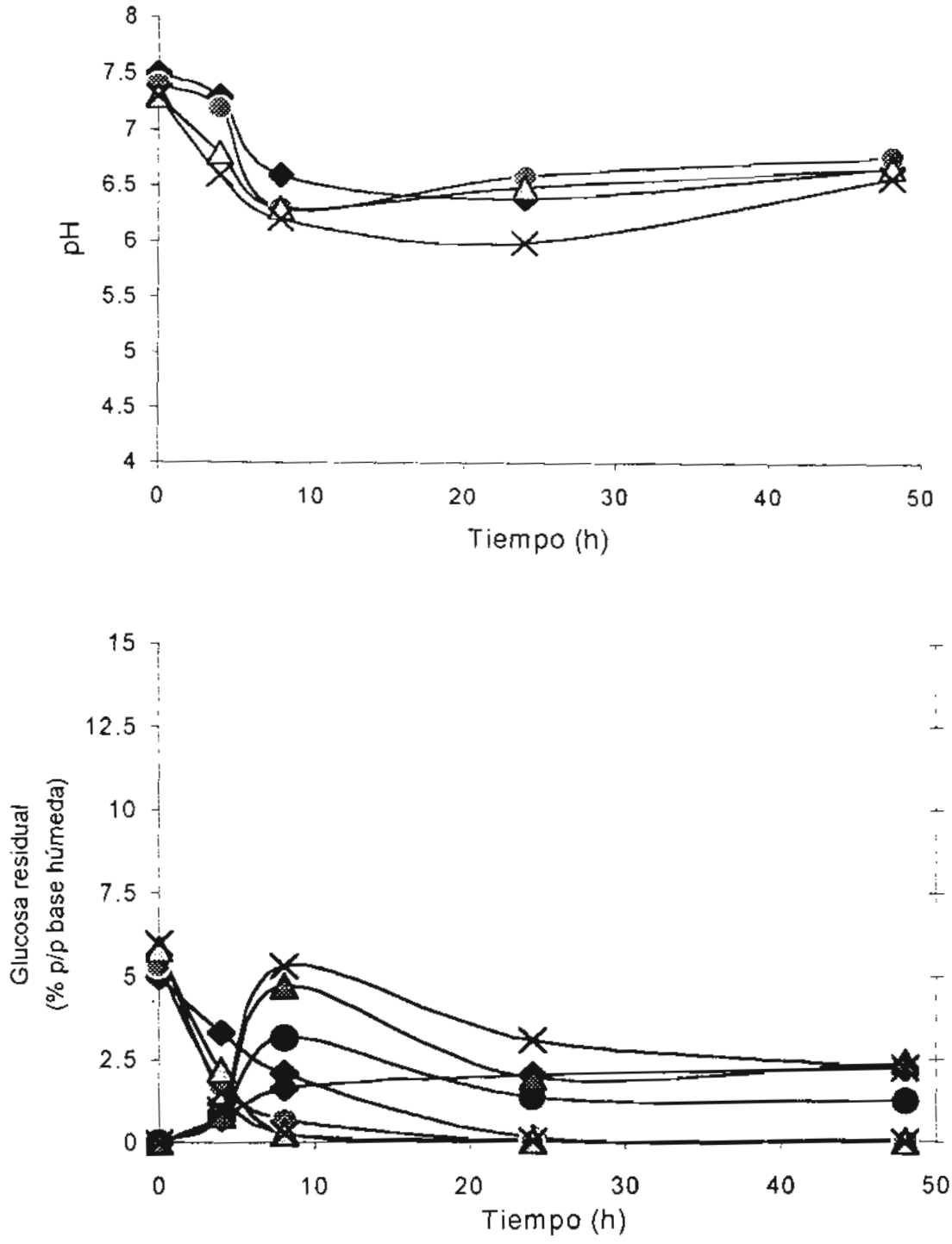


Figura VI.2. Fermentaciones de desecho de camarón adicionados con glucosa 5 % (p/p base húmeda) y diferentes concentraciones de inóculo *Lactobacillus sp* (B2). pH, glucosa (azúcares reductores), %acidez total titulable determinados a diferentes tiempos de fermentación. Niveles de inoculación (% v/p): ◆ 0, ● 5, ▲10 y ✕ 20.

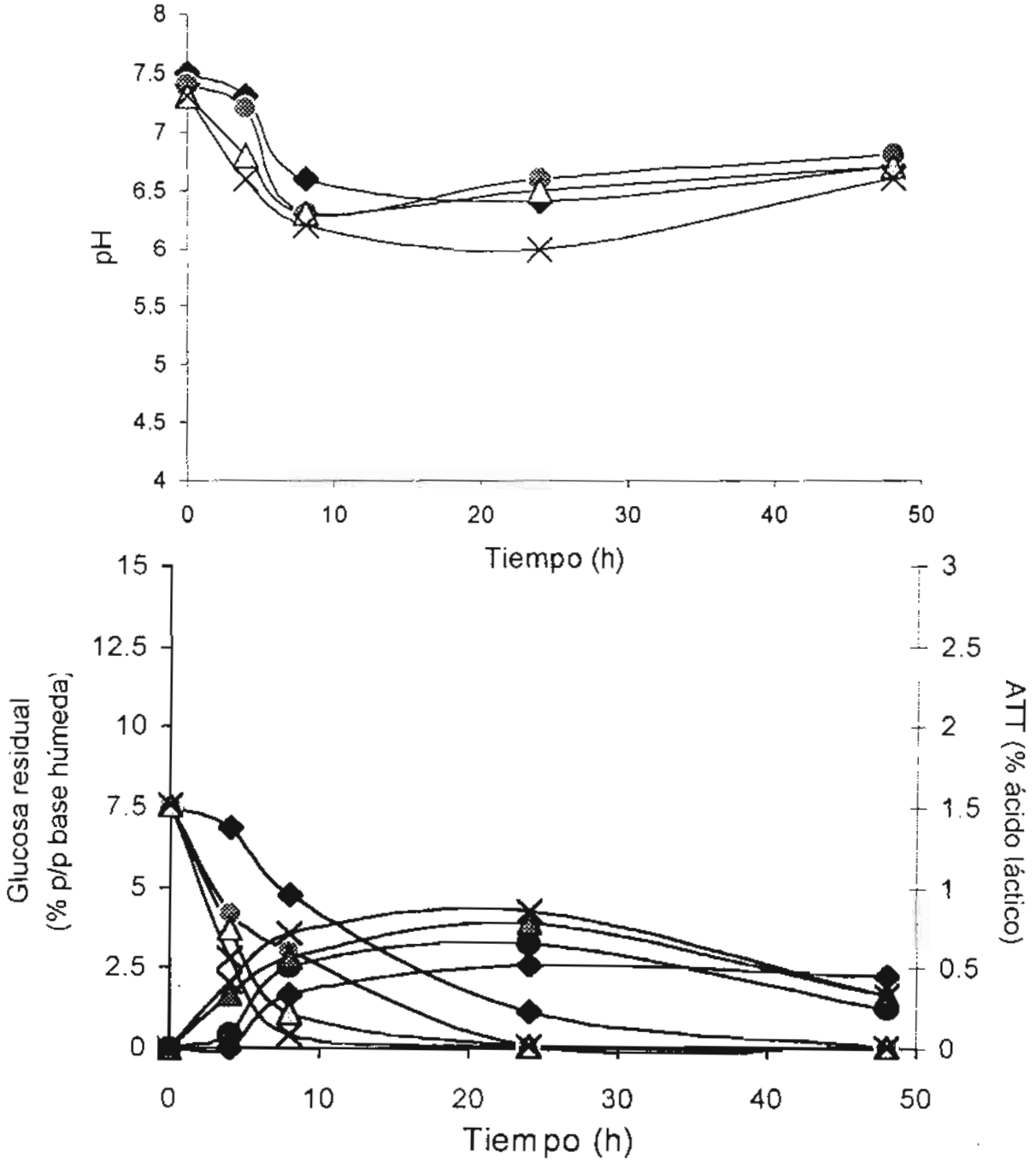


Figura VI.3. Fermentaciones de desecho de camarón adicionados con glucosa 7.5 % (p/p base húmeda) y diferentes concentraciones de inóculo *Lactobacillus sp* (B2). pH, glucosa (azúcares reductores), %acidez total titulable determinados a diferentes tiempos de fermentación. Niveles de inoculación (% v/p): ◆ 0, ● 5, ▲10 y ✕ 20.

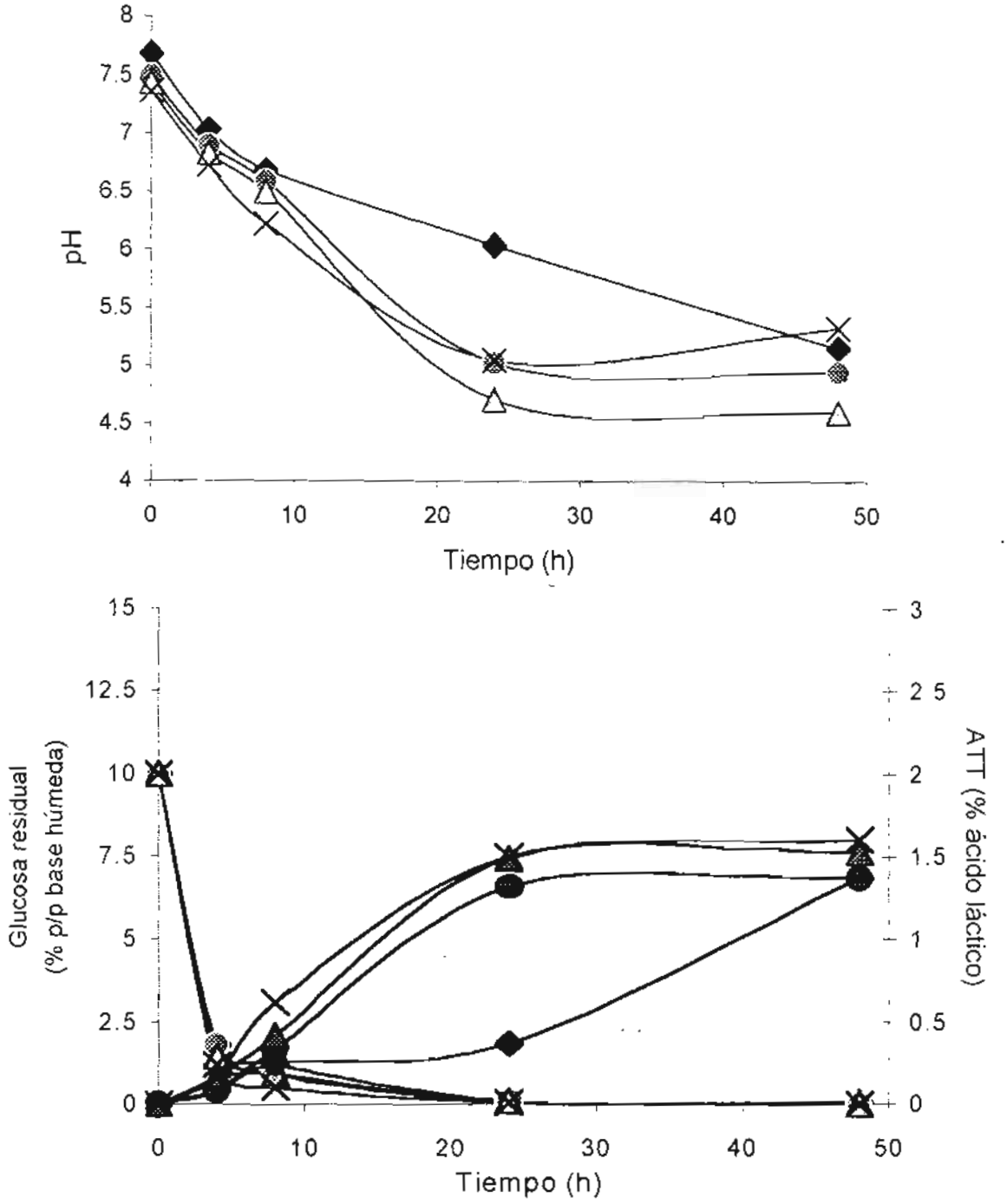


Figura VI.4. Fermentaciones de desecho de camarón adicionados con glucosa 10 % (p/p base húmeda) y diferentes concentraciones de inóculo *Lactobacillus sp* (B2). pH, glucosa (azúcares reductores), %acidez total titulable determinados a diferentes tiempos de fermentación. Niveles de inoculación (% v/p): ◆ 0, ● 5, ▲10 y ✕ 20.

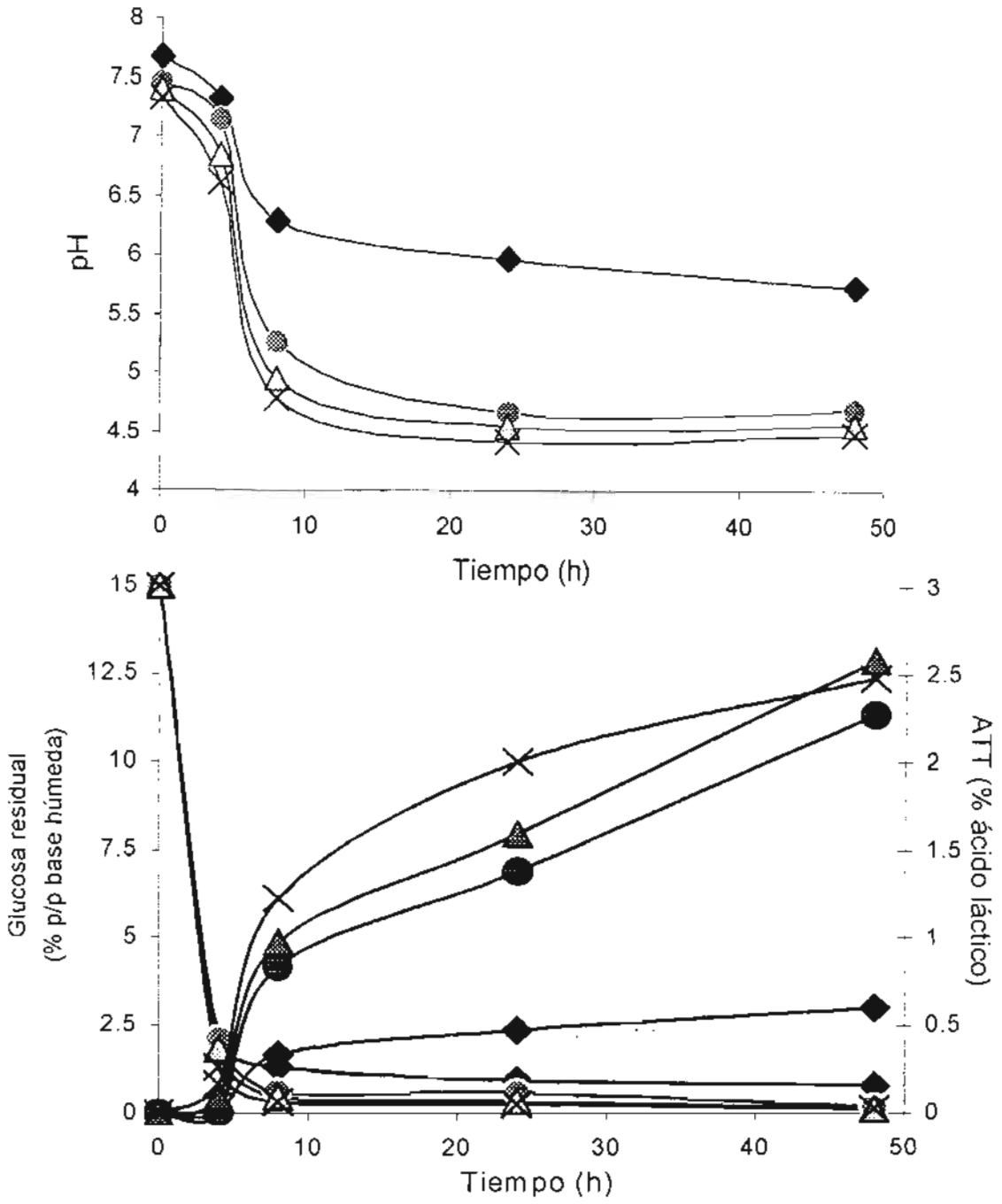


Figura VI.5. Fermentaciones de desecho de camarón adicionados con glucosa 15 % (p/p base húmeda) y diferentes concentraciones de inóculo *Lactobacillus sp* (B2). pH, glucosa (azúcares reductores), %acidez total titulable determinados a diferentes tiempos de fermentación. Niveles de inoculación (% v/p): ◆ 0, ● 5, ▲10 y ✕20.

En los ensilados con 10 y 15% p/p base húmeda de glucosa (365.5 g y 548.2 g (kg^{-1} desecho fermentado de camarón base seca)), el pH descendió hasta las 24 y 12 horas respectivamente, posteriormente se mantuvo casi constante (Figuras VI.4. y VI.5.). Un efecto similar fue reportado por Mosio y Heikonen (1994), en la fermentación láctica de ensilados vegetales. Según estos autores dicho efecto se debió a un proceso de inhibición por producto, en donde la bacteria produjo ácido láctico; y los iones hidrógeno cuando están ionizados originaron el descenso del pH, inhibiendo a los organismos fermentativos, siendo ahí cuando la acidificación cesa. Sin embargo, una producción ligera de ácido puede continuar, de tal forma que los compuestos básicos formados continuamente en el ensilado, interactúan con los iones hidrógenos manteniendo el pH constante.

Por otra parte, el aumento de pH se explica debido a que la acidez fue neutralizada por el carbonato de calcio del sustrato, además de que la actividad proteolítica de enzimas endógenas y microbianas produjeron compuestos nitrogenados los cuales incrementa el pH después de tiempos largos de fermentación (Hall y col., 1997; Shirai y col., 1997).

En ensilados con altas concentraciones de glucosa (365.5 y 548.24 g (kg^{-1} desecho fermentado de camarón base seca)), la mayor acidificación fue alcanzada a las 24 y 48 horas respectivamente. Para el ensilado producido con 15% glucosa p/p base húmeda (548.24 g (kg^{-1} desecho fermentado de camarón base seca)) se observó un alargamiento de la fase de retardo, comparando con las fermentaciones con concentraciones de glucosa menores; esto se explica por la disminución de la actividad de agua del sustrato por la cantidad de glucosa inicial (Figuras VI.4. y VI.5).

Los datos obtenidos fueron analizados estadisticamente mediante análisis de varianza (ANOVA), probando la hipótesis de que al menos una de las medias de producción de ácido de los iniciadores fuera diferente. La ANOVA hizo posible la comparación entre tratamientos, es decir, tiempo, concentraciones de glucosa e inóculo, lo cual facilitó la elección de las condiciones, sin embargo esta metodología no investiga la asociación entre variables.

Por lo que se aplicaron modelos de regresión lineal y no lineal, que describieron la relación entre variables con el propósito de predecir el comportamiento de los microorganismos bajo ciertas condiciones de inóculo, tiempo y sustrato (variables independientes), lo anterior estimaria la producción de ácido láctico (variable dependiente). A continuación se presentan los resultados y discusión tanto de ANOVA como modelos de regresión lineal y no lineal.

VI.1.2.1. Análisis de varianza

Se considero como variable de respuesta a ATT y como fuentes de variación a la concentración de glucosa, el nivel de inóculo y el tiempo de fermentación. Se consideraron también las interacciones entre fuentes, es decir, concentración de glucosa-inóculo, glucosa-tiempo, inóculo-tiempo y glucosa-inóculo-tiempo. En la Tabla AIII. (Apéndice II), se encuentran los resultados del ANOVA, mostrándose que la concentración de glucosa, el nivel de inóculo, tiempo y sus interacciones, tuvieron efectos significativos sobre la producción de ácido durante la fermentación. También se realizaron pruebas de comparación de medias por el método de Duncan, encontrándose lo siguiente:

Considerando la concentración de glucosa como fuente de variación, se observaron dos grupos (Tabla AII1, Apéndice II):

i) 365.5 y 548.24 g de glucosa(kg^{-1}desecho fermentado de camarón base seca)

ii) 182.75 y 274.12 g de glucosa(kg^{-1}desecho fermentado de camarón base seca),

La concentración de la fuente de carbono es un factor crítico en el desarrollo de las bacterias lácticas y la producción de ácidos orgánicos. De ahí que las medias más altas de ATT fueran para el primer grupo, es decir 365.5 y 548.24 g de glucosa(kg^{-1}desecho fermentado de camarón base seca). Mientras que para 182.75 y 274.12 g de glucosa(kg^{-1}desecho fermentado de camarón base seca), los desechos mostraron evidencias de descomposición después de las 24 y 48 horas respectivamente.

Por otro lado, considerando el inóculo como fuente de variación, hubo diferencias en tres grupos (Tabla AII1, Apéndice II):

i) 10 y20 %,

ii) 10 y 5%,

iii) 0%,

La mayor diferencia fue observada en las fermentaciones control en comparación con las inoculadas, a mayor cantidad de inóculo mayor fue la producción de ácido, sin embargo, no se detectaron diferencias entre niveles cercanos de iniciador.

Para el caso del tiempo de fermentación como fuente de variación, todas las medias fueron diferentes para cada tiempo de muestreo, lo cual es lógico porque a medida que las bacterias lácticas se desarrollaron produjeron ácidos orgánicos (Tabla AII1, Apéndice II).

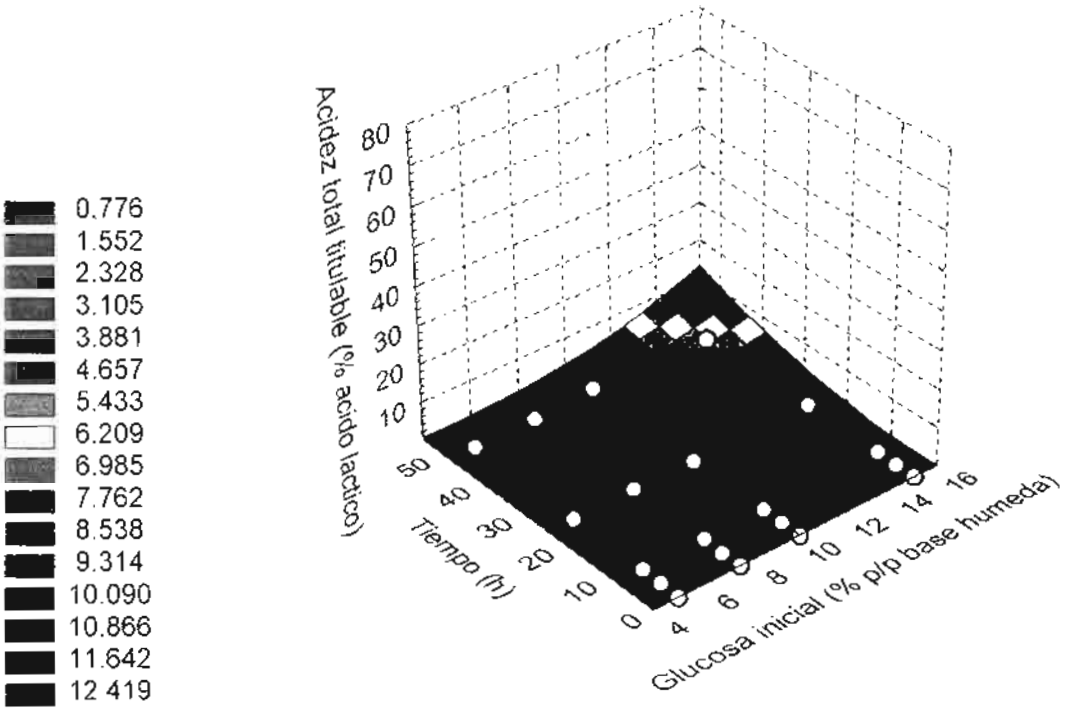
Del análisis realizado se seleccionaron las condiciones de 5% de inóculo y 365.5 g de

glucosa(kg^{-1}desecho fermentado de camarón base seca), para la determinación del patrón fermentativo. Esta decisión se realizó en función de que los ensilados con 5 y 10% de inóculo no fueron significativamente diferentes, con respecto a la producción de ácido. El uso de menor cantidad de iniciador y fuente de carbono, hace el proceso de ensilaje más barato. Por otra parte, la adición de una concentración alta de glucosa, mayor a 365.5 g de glucosa (kg^{-1}desecho fermentado de camarón base seca) provocó una fase de letargo más larga.

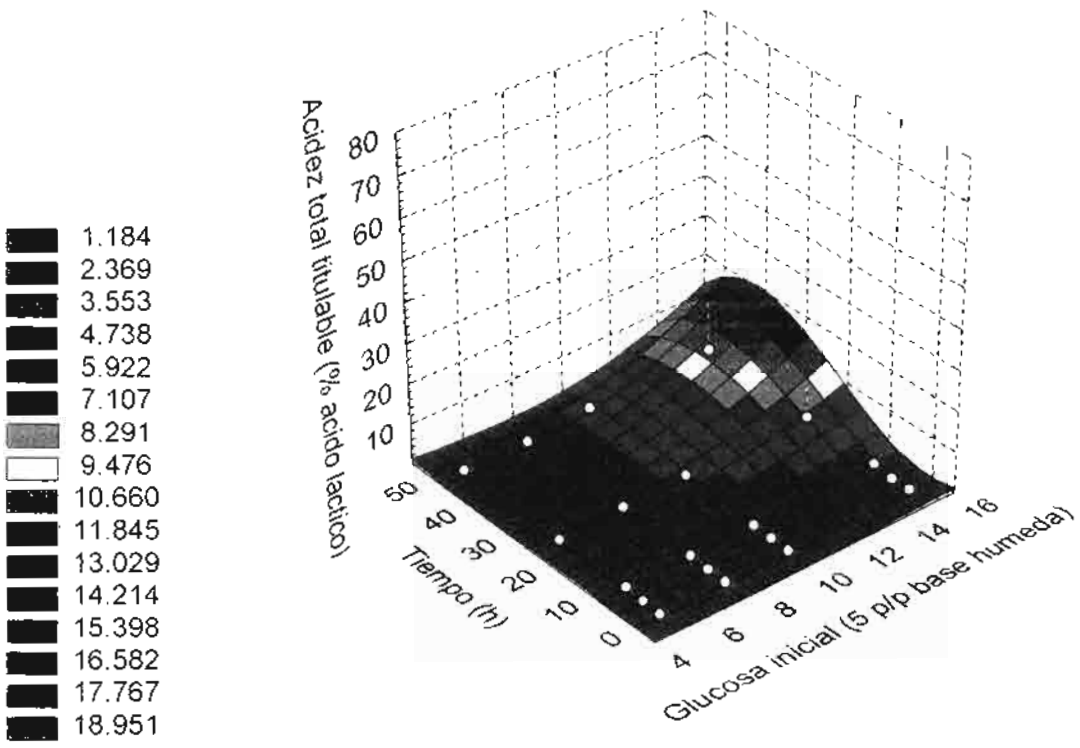
VI.1.2.2. Modelos de regresión lineal. Superficies de respuesta

El análisis de varianza realizado, permitió conocer el efecto de cada una de las fuentes de variación, así como establecer poblaciones que no presentaban diferencias significativas, lo que facilitó la selección de las condiciones de fermentación, 365.5 g de glucosa(kg^{-1}desecho fermentado de camarón base seca), 5% de inoculo y 48 horas de fermentación, para experimentos subsecuentes. Sin embargo, con este análisis no fue posible describir la variabilidad de la producción de ácido a través del tiempo y concentraciones iniciales de glucosa, por lo que se probaron diferentes modelos de regresión tales como, parabólico, exponencial, cuadrático, cúbico y recta. Después del ajuste estadístico, se realizaron comparaciones de R^2 para cada nivel de inóculo.

En la Tabla VI.2. se muestran los modelos de regresión lineal obtenidos para la predicción de la producción de ácido láctico. En todos estos modelos los valores del coeficiente de determinación (R^2) fueron superiores a 0.9. Asimismo se obtuvieron las superficies de respuesta para cada nivel de inóculo, con los parámetros estimados (Figuras VI.6., VI.7., VI.8. y VI.9.).



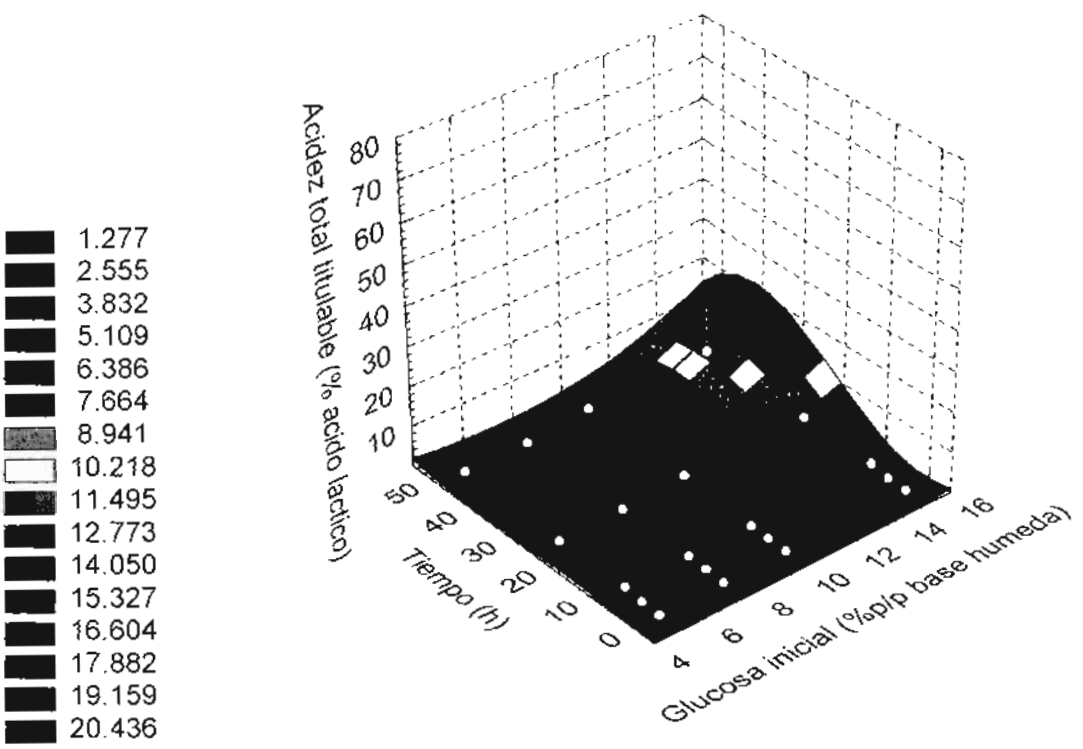
(A)



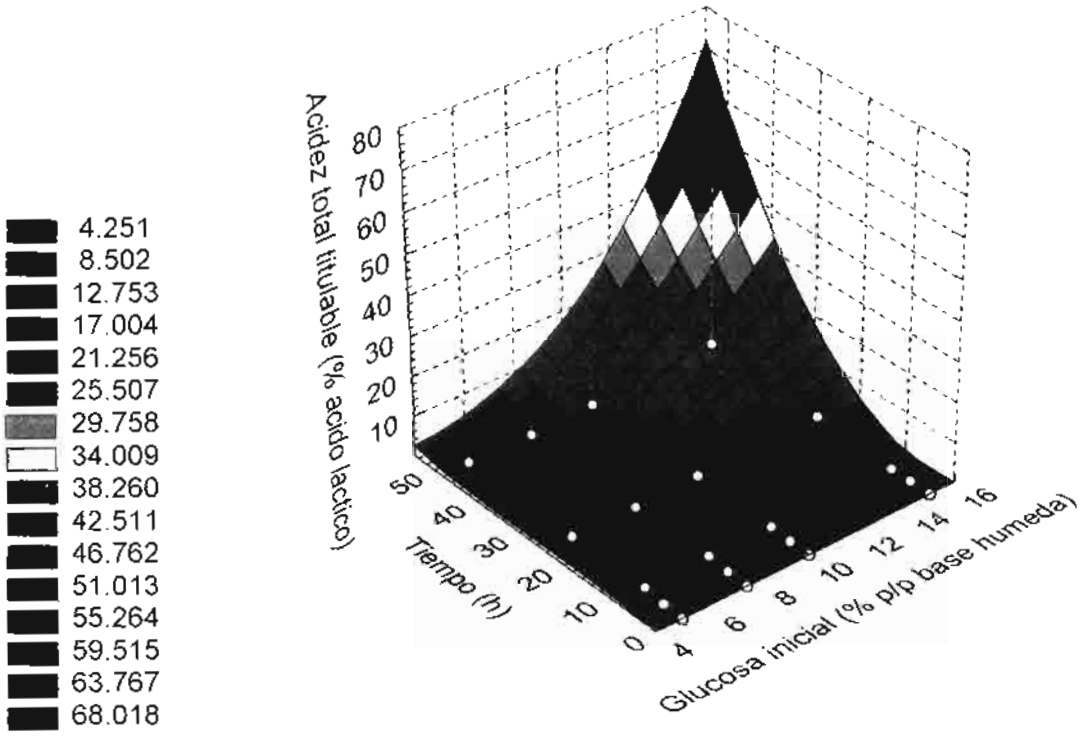
(B)

Figura VI.6. Produccion de acido lactico adiferentes condiciones de glucosa y tiempo en ensilados de camaron. (A) sin inoculo(control); (B) 5%(v/p base humeda) *Lactobacillus sp. (B2).*

OValores Experimentales.



(A)



(B)

Figura VI.7. Produccion de acido lactico adiferentes condiciones de glucosa y tiempo en ensilados de camaron inoculados con *Lactobacillus sp. (B2):* (A) 10%(v/p base humeda); (B) 20%(v/p base humeda). OValores Experimentales.

Tabla VI.2. Modelos ajustados de predicción de las superficies de respuesta, para la producción de ácido láctico (%ATT) con diferentes concentraciones iniciales de glucosa durante la fermentación.

	Nivel de inóculo (% v/p base húmeda)			
	0	5	10	20
B	-0.164	-0.267	-0.310	-0.214
X^3Y^3	ND	-0.000000165	-0.000000178	ND
X^3	ND	ND	ND	-0.00136
Y^3	0.0000187	0.0000665	0.0000942	0.0000937
X^3Y^2	0.000001.283	0.0000109	0.0000118	0.00000581
X^2	-0.0043	-0.00557	-0.00762	0.0181
Y^2	-0.0019	-0.00531	-0.00728	-0.00808
X^2Y^2	ND	ND	ND	0.0000171
X	0.055	0.0775	0.1	-0.0295
Y	0.069	0.169	0.21	0.246
XY	-0.00395	-0.0160	-0.0176	-0.0182
Coeficiente de correlación (R^2)	0.930	0.935	0.940	0.933

X= Concentración inicial de glucosa (%p/p base húmeda)
Y=Tiempo (horas)

ND No determinado

Con estos modelos y superficies de respuesta fue posible predecir la producción de ácido con un tiempo y una concentración inicial de glucosa. Sin embargo comparando los valores observados con los valores predichos por estos modelos se observan limitaciones a concentraciones de glucosa mayores de 365.5 g de glucosa(kg^{-1}desecho fermentado de camarón base seca), donde las predicciones del modelo no son similares a los datos experimentales.

Las Figuras VI.6., VI.7., VI.8., y VI.9. muestran las superficies de respuesta correspondientes a muestras control, 5, 10 y 20 % (v/p) de inóculo respectivamente, indicando que el nivel de inóculo incrementa la producción de ácido láctico cuando la concentración de glucosa y el tiempo aumentan.

VI.1.2.3. Modelos de regresión no lineal.

Como se discutió en la sección VI.I.2. la inoculación presentó un efecto significativo sobre las fermentaciones lácticas de camarón. Ajustándose los datos observados a modelos de superficie de respuesta, se estimaron coeficientes que pueden predecir la producción de ácido láctico en función de diferentes concentraciones de glucosa e inóculo a través del tiempo de fermentación. Sin embargo, a pesar de que estas superficies de respuesta pueden predecir de manera amplia la producción de ácido, resulta difícil interpretar el significado biológico de cada uno de los coeficientes estimados para cada una de las fuentes de variación y sus interacciones. En esta sección se pretende evaluar la cinética mediante el modelo de Gompertz, el cual tiene la ventaja de que los parámetros a estimar son de más fácil comprensión y manejo, aunque presenta limitaciones a bajas concentraciones de ácido.

A continuación se presentan las consideraciones teóricas del modelo de Gompertz, ecuación matemática así como la interpretación de los valores estimados en los ensilados obtenidos con 365.5 g de glucosa(kg^{-1}desecho fermentado de camarón base seca) y diferentes concentraciones de iniciador.

Consideraciones teóricas

La simulación de la fermentación láctica ha sido estudiada utilizando modelos diferentes como el propuesto por Luedeking y Piret (1959), el cual requiere de determinaciones exactas de biomasa, sustrato y producto. Otros autores han usado analogías a cinéticas químicas sin considerar mediciones de biomasa (Bovee y col. 1984). Dutta y col. (1996), consideraron además la inhibición por producto y los requerimientos de substratos para el mantenimiento celular en simulaciones de producción de ácido láctico a partir de medios con glucosa.

Sin embargo, los modelos mencionados no son aplicables a sistemas heterogéneos. Por otra parte el modelo de Gompertz, ha sido empleado para modelamiento de ensilados vegetales de yuca y cultivos no axenicos heterogéneos (Saucedo-Castañeda y Gómez, 1989; Saucedo-Castañeda y col., 1990; Meraz y col., 1992).

Este modelo es un tipo de curva logistica cuya ecuación es la siguiente:

$$dP/dt = k\,P\,ln\,(Pmax/P) \quad \text{....ecuación 1}$$

donde:

P es la concentración de ácido láctico, t es tiempo, k es la constante de acidificación y $Pmax$ es la máxima concentración de producto. La forma integrada de la ecuación anterior:

$$P = Pmax\ exp\ (-b\ exp\ (-kt)) \quad \text{.... ecuación 2}$$

Las condiciones límites de estas ecuaciones son:

Si $t \rightarrow 0$ entonces $P \rightarrow Po = Pmax\ exp(-b)$ y si b es un número definido positivo, entonces Po tiene un valor numérico pequeño no necesariamente cero (ecuación 2). Si $P=0$ o $P=Pmax$ entonces $dP=0$ (ecuación 1). El modelo de Gompertz es una función logística sin simetria en el

punto de inflexión; su flexibilidad permite describir las cinéticas de acidificación con precisión bajo ciertos límites.

Efecto de la inoculación sobre la producción de ácido láctico predicha por el modelo de Gompertz.

Para tratar de explicar el efecto de la inoculación sobre los desechos de camarón, los datos considerados fueron las diferentes concentraciones de iniciador a una concentración fija de sustrato (glucosa), 365.5 g de glucosa(kg^{-1}desecho fermentado de camarón base seca). Los criterios tomados para fijar esta concentración de glucosa han sido explicados en la sección anterior. La Figura VI.8. presenta la producción de ácido láctico en ensilados de camarón utilizando diferentes niveles de inoculación, los valores observados así como los predichos por el modelo de Gompertz. Los resultados de los ajustes al modelo de Gompertz son mostrados en la Tabla VI.3., en todos los niveles de inoculación se tuvo un coeficiente de correlación alto el método empleado para el punto de convergencia en las iteraciones fue el de Rosenbrock y quasi-Newton. Los rendimientos producto sustrato ($Y_{P/S}$) para los diferentes niveles de inoculación indican que con el uso de iniciador se aumento la producción de ácido a partir de glucosa (Tabla VI.5). Los valores predichos por el modelo en todos los niveles de inoculación difieren al inicio de la fermentación de los observados.

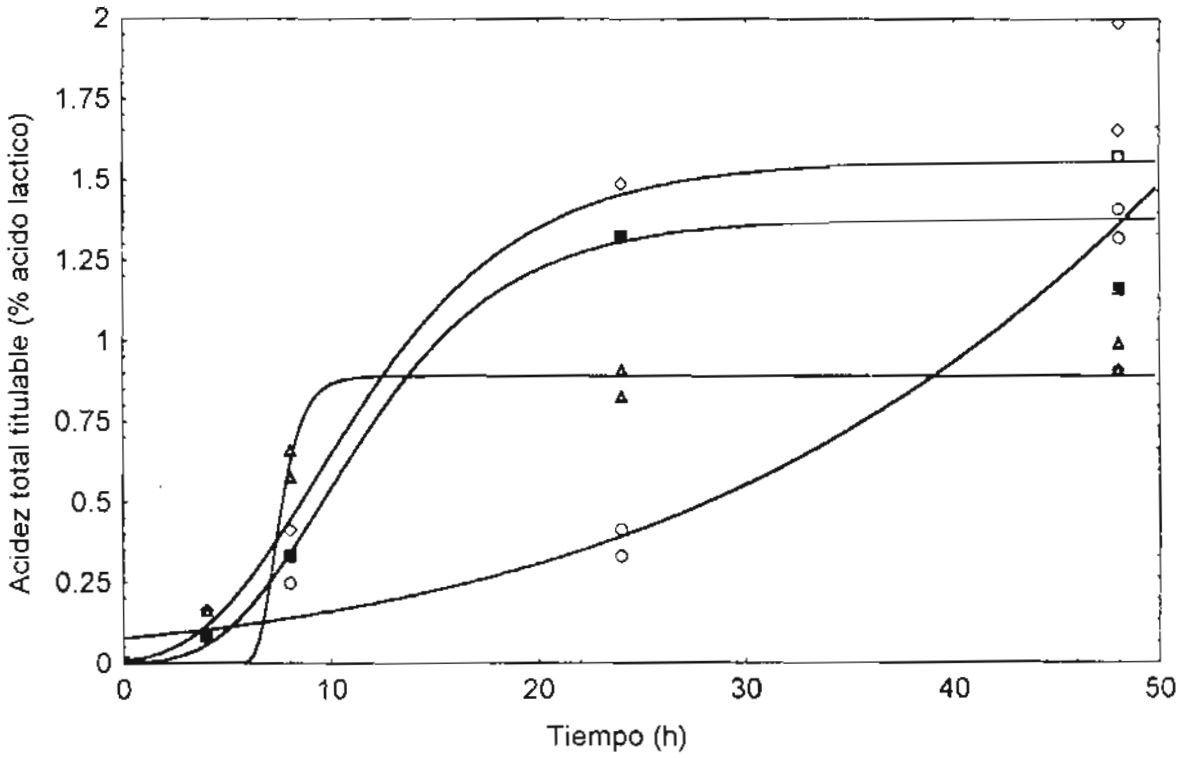


Figura VI.8. Efecto de los niveles de inoculacion de *Lactobacillus sp.* sobre la produccion de acido lactico, determinados por acidez total titulable, en fermentaciones de camaron con 10% p/p base humeda (365.5 g kg^{-1} base seca) de glucosa.

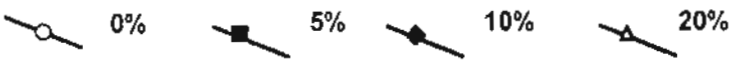


Tabla VI.3. Resultados del ajuste de la producción de ácido observada en el modelo de Gompertz en ensilado de camarón a diferentes niveles de inoculación de *Lactobacillus sp* (B2).

Nivel de inóculo (% v/w)	b	k	Producto del error	Pmax	Coeficiente de determinación (R^2)
0	6.96	0.011	0.088	82.4	0 99
5	7.13	0 204	0.176	1.38	0.99
10	5.31	0.18	0.631	1.56	0.932
20	6.248	0 313	1.373	2.8	0.976

El consumo de glucosa analizado por HPLC (Figura VI.9.) presentó el mismo comportamiento que con las determinaciones colorimétricas de azúcares reductores (Figura VI.4.), es decir se observa un consumo total de glucosa a pesar de que los rendimientos fueron de 0.24 a 0.61. Una buena parte del azúcar fue asimilado por los mismos iniciadores y por la microflora nativa, para la realización de otras funciones metabólicas.

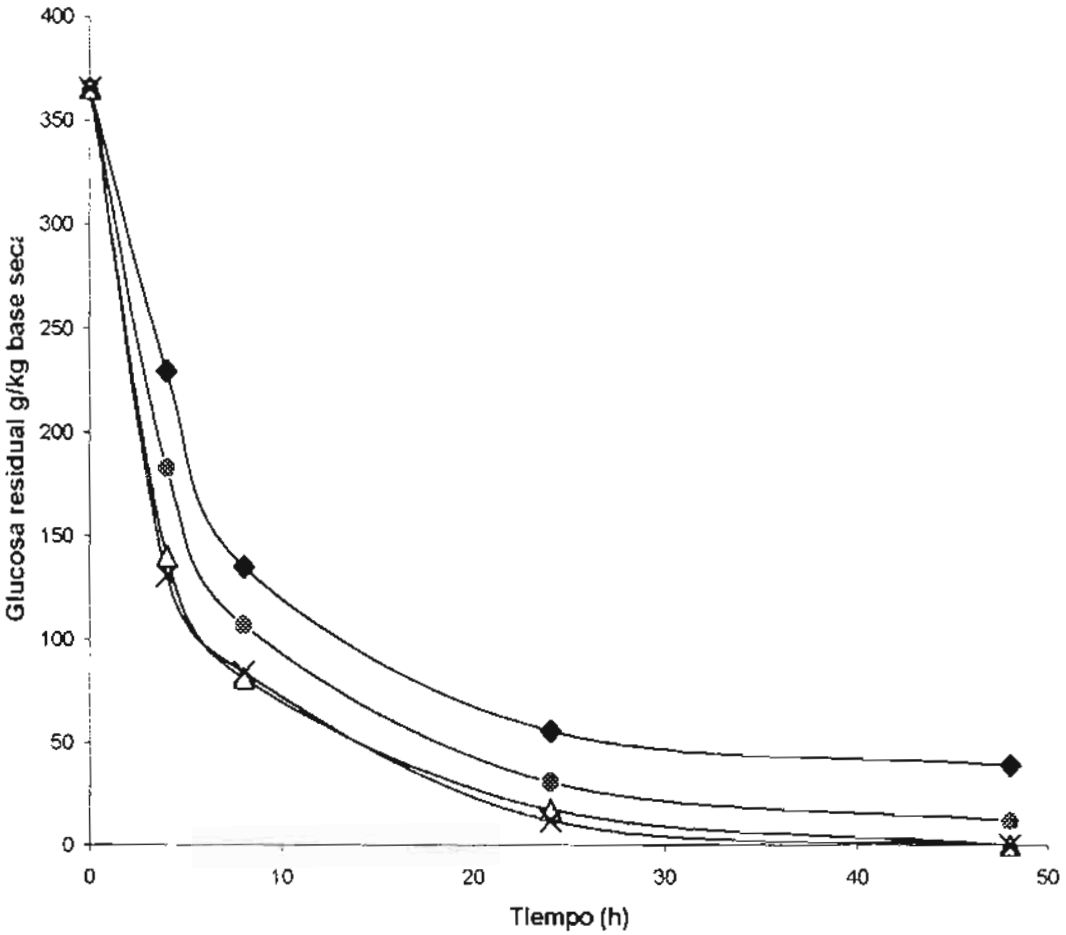


Figura V1.9. Efecto de los niveles de inoculación de *Lactobacillus sp.* sobre el consumo de glucosa (365.5 g kg^{-1} base seca) determinado por HPLC, en fermentaciones de camarón◆ 0, ● 5, ▲10 y ✕20.

VI.1.3. Relación pH y acidez producida

Una relación interesante en este tipo de fermentaciones es aquella entre el pH y el ácido producido ya que permite conocer mediante la medición de una variable sencilla como es el pH su correspondencia en cuanto al ácido producido. Este tipo de modelos resultan de gran aplicación sobre todo cuando se escala la fermentación. Para la obtención de esta relación se emplearon 320 datos experimentales.

Se empleó el modelo mecanistico reportado por Saucedo-Castañeda y col. (1990):

$$-dpH/dP=K(A-pH)$$.....ecuación 3

P es ácido láctico (%ATT), A es el valor mínimo de pH y K es la constante de acidificación. Los datos se ajustaron a la forma integrada de la ecuación (3):

$$pH=A[1+Bexp(-KP)]$$.....ecuación 4

En la Tabla VI.4., se presentan los parámetros estimados mediante el método de Marquardt, así como el coeficiente de correlación (r), con este modelo se explica un 94.73 % de los datos experimentales y el porcentaje restante no se ajustaron a este modelo. Esta ecuación es válida en los límites de los datos observados de pH 7.6 a 4.0 y de acidez titulable de 0 a 2.6 %.

Tabla VI.4. Parámetros estimados para el modelo mecanistico, correlación pH y ATT (ecuación 4)

Parámetros estimados	
A	3.89
B	0.89
K	0.76
Producto del error	25.9
Coeficiente de correlación (r)	0.9473

En la Figura VI.10. se presenta la correlación entre pH y ATT de las fermentaciones de camarón, se observa una mayor dispersión de los datos a bajas concentraciones de ácido. Este modelo puede ser de gran utilidad para poder conocer la concentración de ácido a partir del pH el cual es una variable que puede ser determinada más fácilmente.

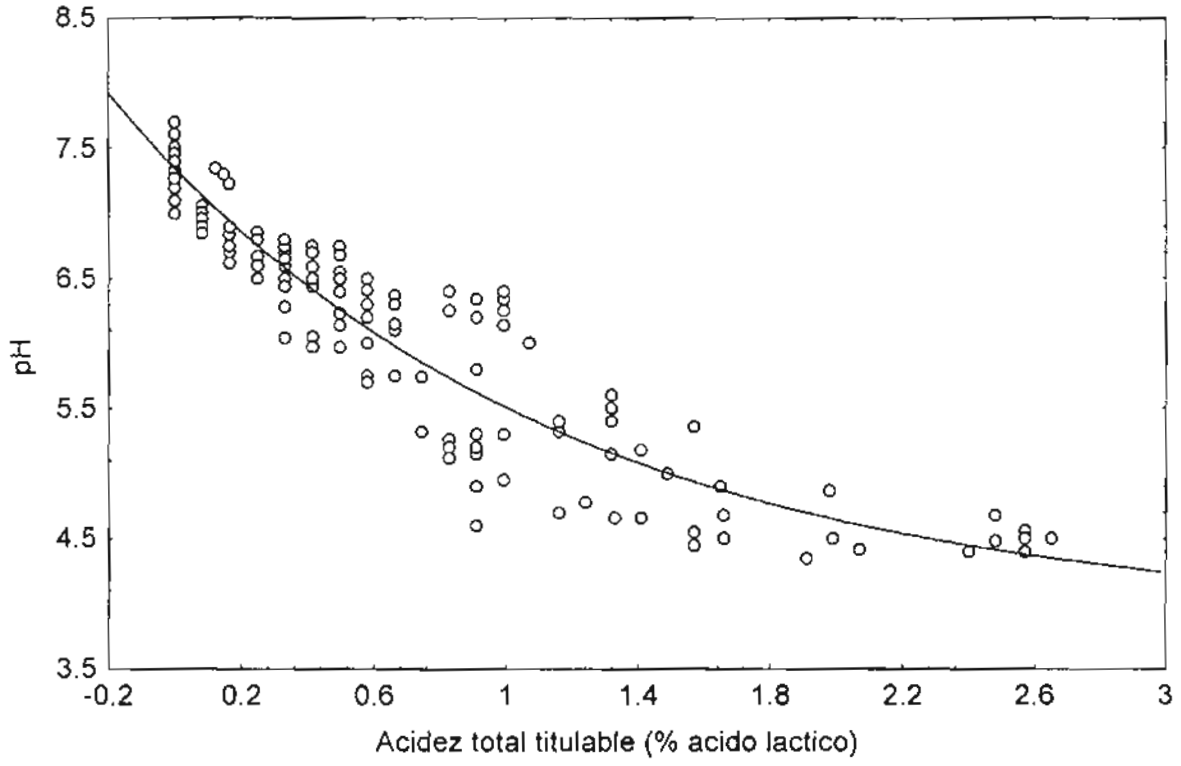


Figura VI.10. Correlación de pH y acidez total titulable (% ácido láctico) en ensilado de camarón con diferentes concentraciones de glucosa:5,7.5,10 y 15% (p/p base húmeda); niveles de inoculación de:0,5,10 y 20% (v/p base húmeda).

VI.1.4. Determinación del patrón fermentativo

Se analizaron por HPLC los productos de fermentación de las muestras a las: 0, 4, 8, 24 y 48 horas en residuos de camarón inoculado con 0, 5,10 y 20 % (v/p) de *Lactobacillus sp.* B2, con 365.5 g de glucosa(kg^{-1}desecho fermentado de camarón base seca). En el Apéndice II Tabla AII2, se presentan las ecuaciones de los estándares para determinar las concentraciones de glucosa, etanol y ácidos láctico y acético.

Estos resultados se muestran en las Figuras VI.10 y VI.13., donde se puede apreciar un descenso de glucosa debida al consumo para la producción de ácidos, principalmente láctico (Tabla VI.5.). Desde las primeras horas de la fermentación, hay un consumo de glucosa en el control de alrededor de 18.5 % si bien en muestras inoculadas con 5, 10 y 20 % de inóculo la glucosa se consume en 53.5, 35 y 50 % respectivamente (Figura VI.9).

Tabla VI.5. Productos finales de fermentación después de 48 horas: ácido láctico, acético, etanol y glucosa determinadas por HPLC, con 365.5 g de glucosa (kg^{-1}desecho fermentado de camarón base seca) y *Lactobacillus sp.* B2 como iniciador.

Compuesto	Nivel de Inoculación			
	Control	5%	10%	20%
Glucosa (g/kg base seca)	39	12.01	0	0
Acido Láctico(g/kg base seca)	100	217	230	254
$Y_{P/S}$	0.24	0.52	0.55	0.61
Acido Acético (g/kg base seca)	35	12.60	14.72	10.24
$Y_{P/S}$	0.16	0.03	0.035	0.024
Etanol (g/kg base seca)	3.21	0	0	0
$Y_{P/S}$	0.015			

En la Tabla VI.5. se muestran los rendimientos producto sustrato, observándose que a medida que se incrementa el nivel de inoculación se aumenta la cantidad de láctico producido. Asimismo se modifica el patrón fermentativo de un tipo heteroláctico a homoláctico, ya que las concentraciones de acético producido disminuyen considerablemente cuando se usa un iniciador. El ácido acético detectado pudo ser producido por microflora diversa incluyendo otras bacterias lácticas, a partir de la oxidación de etanol.

El uso de un iniciador aumenta la velocidad de fermentación e incrementa la proporción de bacterias lácticas homofermentativas sobre la flora natural presente, modificando de esta forma la proporción y tipo de productos. Con las fermentaciones sin inóculo fue posible obtener una fermentación con la flora láctica natural, pero requirió de más tiempo, lo que puede favorecer la descomposición del sustrato por parte de otro tipo de microorganismos presentes, tales como Corinebacterias, *Pseudomonas, Micrococcos*, hongos y levaduras.

VI.1.5. Evolución de la microflora

El camarón fresco del Golfo de México (*Penaeus aztecus*), tiene una vida de anaquel en hielo durante el transporte en barco de 12 a 14 días. La microflora inicial predominante esta constituida por corinebacterias, *Pseudomonas, Moraxella* y *Micrococcus*; después del transporte en hielo predominan *Pseudomonas*, *Moraxella* y *Acinetobacter,* sobre los otros tipos. Estas bacterias, particularmente *Pseudomonas,* se caracterizan por ser altamente proteolíticas y responsables del mal olor y descomposición del camarón (Benner y col. 1994).

Se realizaron las cuentas en placa de microorganismos presentes durante la fermentación, con la finalidad de determinar el efecto de la fermentación láctica a las condiciones elegidas, 365.5

g de glucosa(kg^{-1}desecho fermentado de camarón base seca) y 5% inóculo, sobre la microflora presente.

La cuenta inicial de mesófilos fue de 10^8 a 10^9 por gramo, si se comparan estos valores con los reportados por Benner y col. (1994) de aproximadamente 10^4 hasta 10^5 por gramo es elevada, sin embargo, los estudios hechos por estos autores fueron en camarón fresco sin refrigerar; mientras en esta tesis se utilizaron desechos de camarón constituidos por cabeza con una alta contaminación por fuentes secundarias, así como por manipulación después de la captura.

Los resultados de conteo en placa de aerobios mesófilos totales, bacterias lácticas y coliformes, se muestran en las Figuras VI.11. y VI.12. La cuenta de bacterias lácticas determinada durante la fermentación permaneció constante hasta las 72 horas de fermentación y después descendió un orden de magnitud.

Ya se ha reportado sobre la actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas, debido a la producción de ácido láctico, peróxido de hidrógeno y bioconservadores (Shirai y col. 1996). De igual forma esta bien demostrado el efecto inhibitorio del ácido láctico para muchos microorganismos, debido a la difusión de las formas no disociadas a través de las membranas para posteriormente disociarse en el interior ocasionando alteración de varios procesos metabólicos (Silliker y col. 1980). Como lo confirma Kim y col. (1995) estudiando el efecto combinado de un cultivo de bacterias lácticas y ácido láctico sobre la vida de anaquel de filetes de pescado. Estos autores observaron que esta combinación presentó efecto inhibitorio sobre bacterias Gram negativas durante 6 a 9 días de almacenamiento a 10° C.

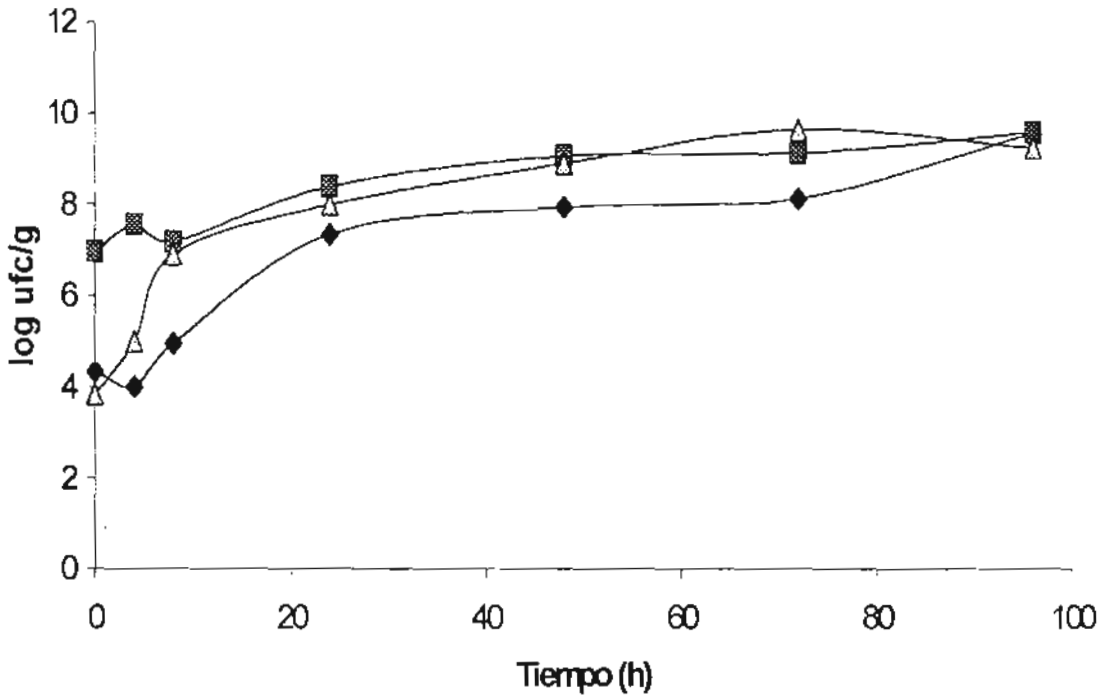


Figura VI.11. Cuenta de mesófilos, coliformes y bacterias lácticas durante la fermentación láctica de desechos de camarón sin inocular y con 10% p/p base húmeda de glucosa.

◆ Coliformes, ● Mesófilos, ▲Bacterias lácticas.

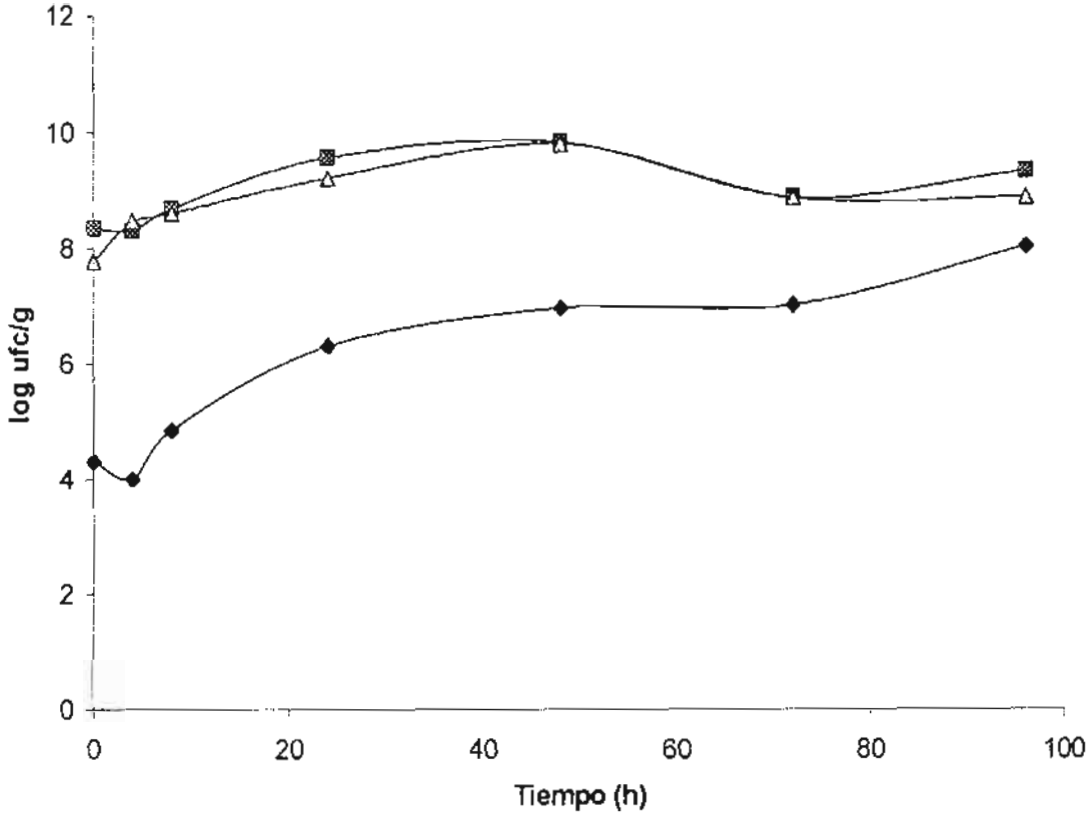


Figura VI.12. Cuenta de mesófilos, coliformes y bacterias lácticas durante la fermentación láctica de desechos de camarón con 5% de inoculo y con 10% p/p base húmeda de glucosa.

◆ Coliformes, ● Mesófilos, ▲Bacterias lácticas.

Sin embargo en otros estudios hechos con el uso de bacteriocinas de conocida actividad antibacteriana no se determinó una reducción significativa en cuentas de patógenos (Degnan y col. 1996). En este estudio se evaluó el uso de productos de fermentación láctica con actividades antibacterianas especificas contra *Listeria monocytogenes*, comparando con conservadores químicos a diferentes valores de pH (2 a 12) en carne de cangrejo fresco almacenado por 6 dias a 4°C. Otros autores como Moon y col. (1982) tampoco encontraron efectos inhibitorios de cultivos lácticos en camarón descabezado almacenado de 5 a 12°C sobre *Pseudomonas* y *Vibrio parahaemolyticus.*

En un estudio reciente hecho por Einarsson y Lauzon (1995), se encontró actividad inhibitoria variable de bacteriocinas empleadas para extender la vida de anaquel del camarón en salmuera. Las bacteriocinas probadas fueron nisina Z, carnocina y bavaricina A, comparadas con benzoato y sorbato. El uso de estos compuestos combinados con sal preservaba 31, 16 y 10 días respectivamente, aunque existía flora Gram positiva persistente hasta el final del tratamiento.

En el presente estudio la cuenta de coliformes se mantuvo constante durante 72 horas para posteriormente incrementar la cuenta hacia 96 horas, debido probablemente a que la concentración de ácido se mantuvo constante (Figuras VI.11. y VI.12), disminuyendo con ello el efecto inhibitorio. Es evidente que comparado las fermentaciones inoculadas con el control, se determina un menor número de coliformes, no hubo disminución pero se obtuvieron valores constantes, solo hubo un incremento hacia el final del estudio después de 4 días a 30°C.

El desecho estaba constituido por cabezas, en las cuales se encuentra la mayor cuenta bacteriana inicial así como las enzimas digestivas que son responsables en gran parte de descomposición. El descabezado es un proceso para extender la vida de anaquel del camarón ya que con la remoción del cefalotórax se reducen las cuentas microbianas, aproximadamente en un 75% (Borgstrom, 1961). Otro factor importante a considerar es la temperatura empleada durante la fermentación, 30°C, la cual favorece el desarrollo de mesófilos.

Al inicio de la fermentación se encontraba una condición aerobia posteriormente se producen gases, como CO_2, que desplazan el oxigeno presente y generan condiciones de anaerobiosis.

Lo anterior puede determinar cambios en la composición de la flora. Por ejemplo *Pseudomonas sp,*. es un constituyente de la flora inicial que por ser aerobia seria inhibida con la fermentación. La a_w tiende a disminuir con la fermentación afectando también la composición de la microflora (Figura VI.1.).

Con los resultados obtenidos, es difícil definir el mecanismo de inhibición del iniciador hacia el resto de la microflora, el cual pudo ser por ácidos o bien por presencia de otros compuestos con actividad antimicrobiana.

VI.2. Recuperación de productos

VI.2.1. Purificación parcial de proteasas.

La fermentación láctica del desperdicio de camarón fue realizada de acuerdo a las condiciones previamente establecidas (Capítulo VI.1.), es decir 10% (p/p base húmeda) de glucosa, 5% (v/p base húmeda) de *Lactobacillus sp* B2 y 48 h de fermentación. A partir del ensilado fermentado se separaron dos fracciones: soluble e insoluble. De la primera se purificaron proteasas y de la segunda quitina y pigmentos. A continuación se presentan los resultados para la obtención de los diferentes productos.

VI.2.1.1. Métodos de concentración

Con la fermentación se observó una solubilización de minerales, hidrólisis de proteínas, debidos a la actividad enzimática (Shirai y col., 1997, Hall y De Silva, 1994). Se separaron dos fracciones una insoluble y otra soluble, esta última, en lo sucesivo será denominada como licor inicial, en ella se encuentran proteínas, pigmentos, sales y lípidos. El pH obtenido en el ensilado después de 48 horas de fermentación fue de 4.5, y en el licor de 5.5. Con el objetivo de concentrar las proteínas, especificamente proteasas, se probaron tres métodos (Figura VI.13):

i) Precipitación con etanol,

ii) precipitación con sulfato de amonio,

iii) liofilización/ultrafiltración.

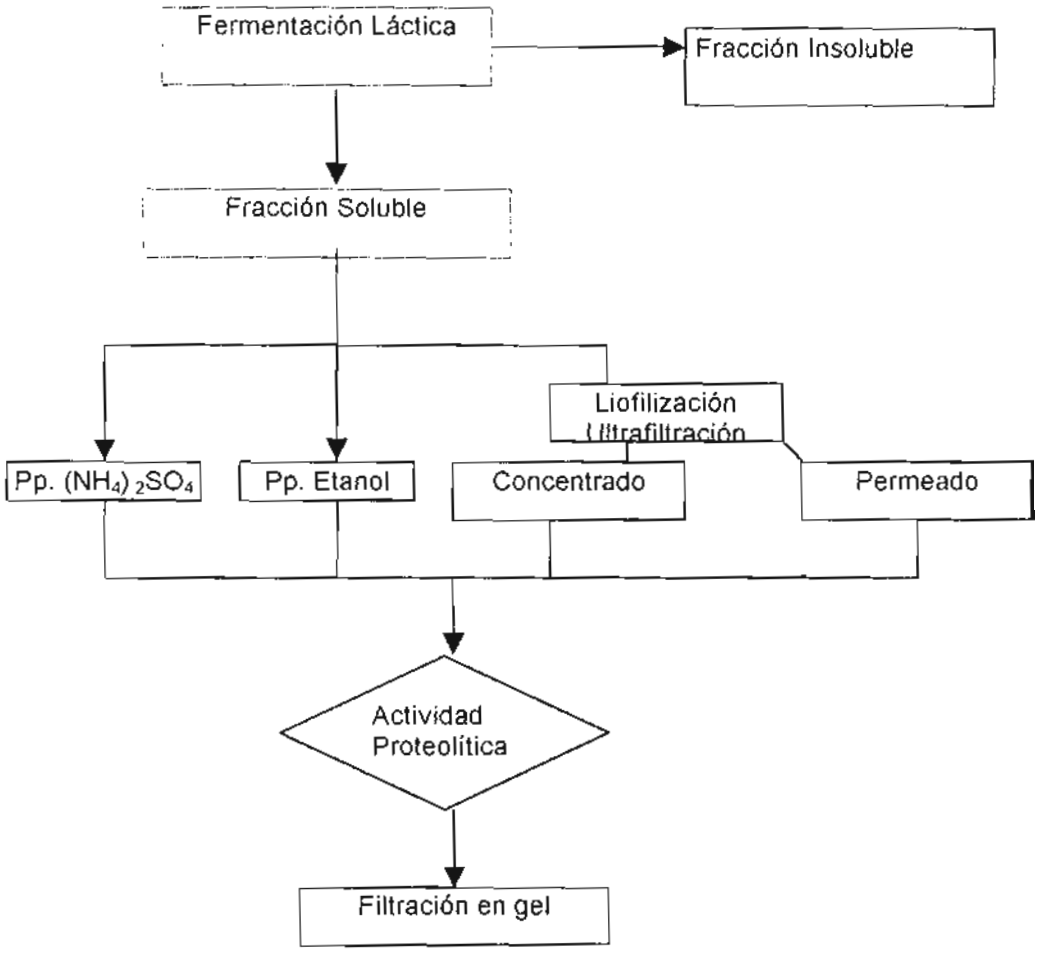


Figura VI.13. Diagrama de flujo seguido para la concentración de las proteasas de la fracción soluble del ensilado de camarón (Pp. Precipitación).

i) Precipitación con etanol

El efecto del etanol sobre las proteínas es de precipitar por deshidratación, dependiendo del grado de ionización de la proteína, el cual se debe a la presencia de grupos cargados que afectan la solvatación de esta (Scopes, 1994). Al adicionar diferentes concentraciones de etanol hasta un 40 % volumen, se observó pérdida total de la actividad enzimática, por lo que se decidió evitar este método. Sé estudio entonces la precipitación con sulfato de amonio de la cual se presentan los resultados a continuación.

ii) Precipitación con sulfato de amonio

El uso de sulfato de amonio en los diferentes porcentajes de saturación incrementó la actividad específica, sin embargo dado que se obtenía una cantidad considerable de actividad en el sobrenadante, se continuó adicionando sal a 50, 70 y 80 %. Siendo hasta este último el punto en que no se detectó actividad en el sobrenadante, tal como se observa en la Figura VI.14., en donde se muestran los diferentes porcentajes de saturación con sulfato de amonio con respecto a la actividad especifica.

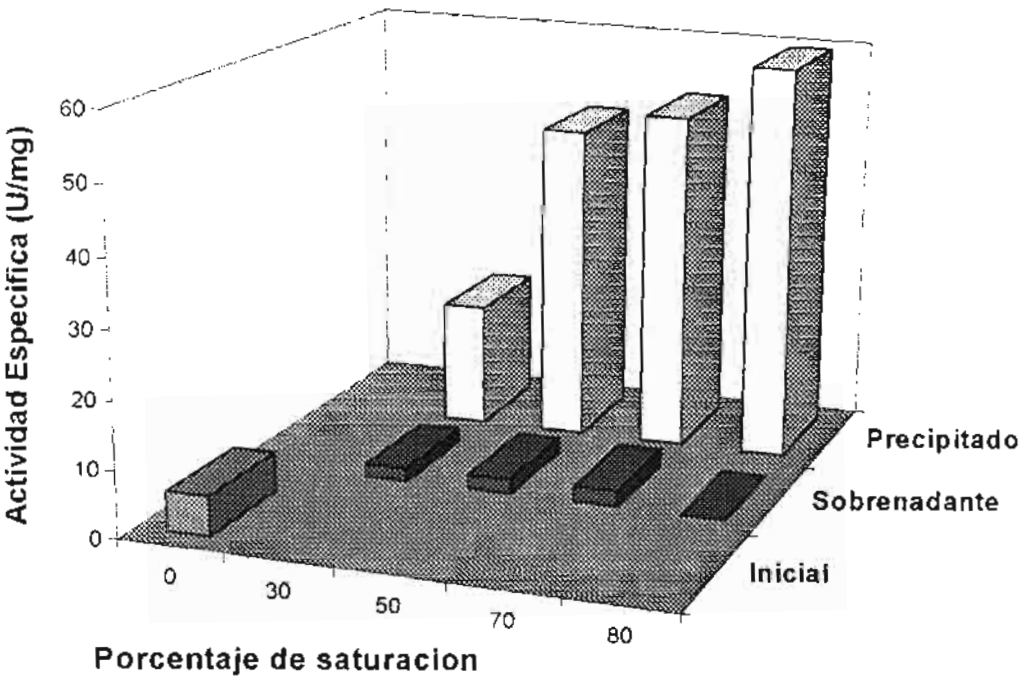


Figura VI.14. Actividad especifica a diferentes porcentajes de saturación de sulfato de amonio, del licor obtenido de la fermentación láctica de cabeza de camarón.

En la Tabla VI.6, se presenta el rendimiento en la purificación utilizando sulfato de amonio en 70 y 80% con los cuales sé observó un incremento de actividad de 6.41 y 7.7 veces, respectivamente. Las ventajas en el uso de sulfato de amonio han sido bien establecidas por ser altamente soluble, no tóxico para la mayoría de las enzimas, barato y en algunos casos puede presentar un efecto estabilizante a las enzimas (Dixon y Webb, 1979). Específicamente en este trabajo, el porcentaje de saturación fue muy alto y en procesos posteriores para eliminar la sal, tal como diálisis, se observó dilución del extracto, involucrando mayor número de pasos para

concentrar. Por lo anterior, considerando la posibilidad de realizar el proceso a gran escala, este método no era una buena opción, por consiguiente sé probo ultrafiltración

Tabla VI.6. Tabla de purificación de los extractos crudos obtenidos del licor de la fermentación a 70 y 80 % de saturación de sulfato de amonio. Actividades proteoliticas en caseína a pH 7.

Paso de la purificación	Proteína (mg/ml)	Proteína Total (mg)	Actividad U/ml	Actividad Total (U)	Actividad Especifica (U/mg)	Rendimiento %	Factor de purificación
Licor inicial	18.5	10,102.3	90.2	58,644.4	5.80	100	1
$(NH_4)_2SO_4$ PP 70%	0.4	19.3	14.3	716.9	37.2	1.2	6.4
$(NH_4)_2SO_4$ PP 80%	0.3	16.8	15.0	748.9	44.6	1.3	7.7

iii) Liofilización/Ultrafiltración

El proceso de liofilización ha sido empleado como método de concentración de proteínas, aunque su uso se ha limitado por que las proteinas son más sensibles a sufrir mezclas eutecticas que pueden conducir a secado incompleto o formación de espuma y desnaturalización Una forma de evitar estos problemas es reducir la concentración de sales y la temperatura. Esta técnica es de uso común para almacenamiento y transportación (Scopes, 1994). Al liofilizar el licor inicial no se presentaron los problemas antes mencionados y el secado se llevó a cabo eficientemente, 1 litro de licor fue secado para obtener 14 g de polvo. Se compararon

actividades antes y después del secado encontrándose que había una pérdida de actividad de 25 a 30%, sin embargo esta técnica permitió la reducción de volumen de trabajo, además de facilitar el manejo, almacenamiento y transporte de las muestras.

Para la ultrafiltración se emplearon membranas de diferente corte de peso molecular. Obteniéndose diferentes fracciones a las cuales se les determinó actividad proteolítica y proteína. En las Tablas VI.7. y VI.8., se muestran los resultados obtenidos para dichas fracciones empleándose como sustratos: hemoglobina y caseína a pH 2 y 7, respectivamente.

Se puede apreciar un aumento considerable de actividad en los concentrados, lo que significaría que las proteasas fueron retenidas durante la ultrafiltración.

Tabla VI.7. Actividad en las fracciones obtenidas durante la ultrafiltración del licor de la fermentación, utilizándose como sustrato hemoglobina a pH 2.

Muestra	Fracción	Actividad (U/ml)	Actividad Total (U)	Actividad Especifica (U/mg)	Rendimiento %	Factor de purificación
Inicial	NA	13.7	4,183.2	1.5 ± 0.1	100.0	1.0
XM300	Concentrado	4.0	288.0	0.9 ± 0.1	6.9	0.6
	Permeado	27.2	3,536.0	5.5 ± 0.6	84.5	3.7
XM50	Concentrado	17.0	333.4	2.9 ± 0.4	8.0	1.9
	Permeado	28.7	3,737.5	8.6 ± 0.2	89.3	5.7
YM10	Concentrado	12.5	700.0	7.7 ± 0.4	16.7	5.2
	Permeado	6 3	1,070.6	1.7 ± 0.2	25.6	1.0
YM2	Concentrado	15.7	897.8	3.4 ± 0.1	21.4	2.3
	Permeado	6.7	1,157.7	1.4 ± 0.3	27.7	0.9

[a]Promedio de seis observaciones

NA No aplicable

Tabla VI.8. Actividad detectada en las fracciones obtenidas durante la ultrafiltración del licor de la fermentación, utilizándose como sustrato caseína pH 7.

Muestra	Fracción	Actividad (U/ml)	Actividad Total (U)	Actividad Especifica (U/mg)	Rendimiento %	Factor de purificación
Inicial	NA	56.2	14,016.0	3.9 ± 0.2	100.0	1.0
XM300	Concentrado	48.3	3,091 2	11.3 ± 1.6	22.1	2.9
	Permeado	2 7	202.9	0.6 ± 0 04	1.5	0.1
XM50	Concentrado	54.0	4,860.0	14.6 ± 0.3	19.0	3.6
	Permeado	6.9	1,280.2	2.2 ± 0.3	9.1	0.5
YM10	Concentrado	60 0	3,140.0	15.7 ± 2.7	22.4	4.0
	Permeado	4.2	683 3	0.8 ± 0.1	4.9	0.2
YM2	Concentrado	88.6	5,845.4	18.6 ± 0.5	41.7	4.7
	Permeado	5 0	815 0	2.2 ± 0.3	5.8	0.6

*Promedio de seis observaciones
NA No aplicable

Las Tablas de la AIII.1. a la AIII.8 (Apéndice III), muestran los resultados del análisis de varianza realizado para concentrados y permeados en caseína (pH 7) y hemoglobina (pH 2) La variable de respuesta empleada fue la actividad específica obtenida con el uso de las diferentes membranas. De igual manera se realizaron comparaciones de medias para agrupar por pruebas de Duncan observándose que los concentrados obtenidos por las membranas fueron significativamente diferentes en cuanto a su actividad en pH ácido (hemoglobina) mientras que para pH neutro (caseína) se determinaron diferencias en dos grupos, que significó que para las membranas de 10, 50 y 2 no hubo diferencia significativa, mientras que si la hubo para la de 300 kDa.

En los permeados para caseína el uso de cada membrana fue agrupado diferente, es decir hubo mayor o menor actividad específica detectada en estas fracciones. Para hemoglobina no la hubo entre las membranas de 10 y 2 kDa, pero sí entre las restantes.

Con esta comparación de medias fue posible saber que los concentrados de 2 y 10 kDa eran los de mayor actividad (Tablas AIII.2. y AIII.6.), lo que indicó que las enzimas de interés se encontraban en un intervalo mayor a 10 kDa y que fueron retenidas durante el proceso de ultrafiltración. Se decidió utilizar el concentrado obtenido con YM10 basándose en lo anterior y considerando que para YM2 el proceso fue mucho más lento.

En la Tabla VI.9., se resumen los resultados obtenidos sobre el contenido y balance de proteína en las fracciones del licor. En cada paso hubo perdida de proteína debida posiblemente a depósitos de proteínas sobre las membranas así como mermas en volumen debido al manejo de las muestras

Tabla VI.9. Contenido y balance de proteína en las diferentes fracciones de ensilado de camarón obtenidas por ultrafiltración.

Membrana	Fracción	Proteína (μg/ml)[a]	Volumen (ml)	Proteína Total (g)	% de Proteína recuperada
Inicial	NA	5185.5	550	2.85	
XM300	Concentrado	6836.5	98	0.67	23.5
	Permeado	4850	400	1.94	68.1
XM50	Concentrado	4513	61	0.27	9.5
	Permeado	3946.8	305	1.204	42.2
YM10	Concentrado	4875	27	0.131	4.6
	Permeado	3862.05	225	2.0	70.2
YM2	Concentrado	5164.6	84	0.434	15.2
	Permeado	2665.3	174	1.816	63.7

[a]Promedio de seis observaciones. NA No aplicable

VI.2.1.2. Determinación de peso molecular en las fracciones de la ultrafiltración.

El peso molecular de las fracciones fue determinado mediante el uso de compuestos de peso molecular conocido considerando el tiempo de retención. Los resultados de la curva de calibración son mostrados en el Apéndice III. La Figura VI.15. presenta los cromatogramas obtenidos de la filtración en gel del permeado y retenido obtenidos de la ultrafiltración así como de Citocromo C como estándar para comparar los pesos moleculares, ya que esta proteína presenta un peso molecular de 12.7 kDa que es cercano al corte de la membrana empleada. Además de concentrar el extracto proteolítico la ultrafiltración fue capaz de fraccionar el licor, limpiando de otros compuestos que no presentaron actividad proteolítica.

Como se mencionó anteriormente el espectro de peso molecular fue determinado en el licor inicial, permeado y concentrado de YM10 por un sistema de cromatografía de baja resolución (Figura VI.16.). La mayoría de los compuestos con un peso molecular mayor o igual a 10 kDa fueron concentrados, sin embargo en el permeado algunos compuestos detectados fueron mayores de 10kDa, lo que explica la actividad proteolítica encontrada en los permeados (Tablas VI.7. y VI.8.).

La forma de las moléculas que pasan a través de la membrana puede afectar la eficiencia de ésta, para la separación de proteínas de acuerdo peso molecular. Adicionalmente, el tamaño del poro puede variar durante la fabricación afectando la separación (Harris y Angal, 1990).

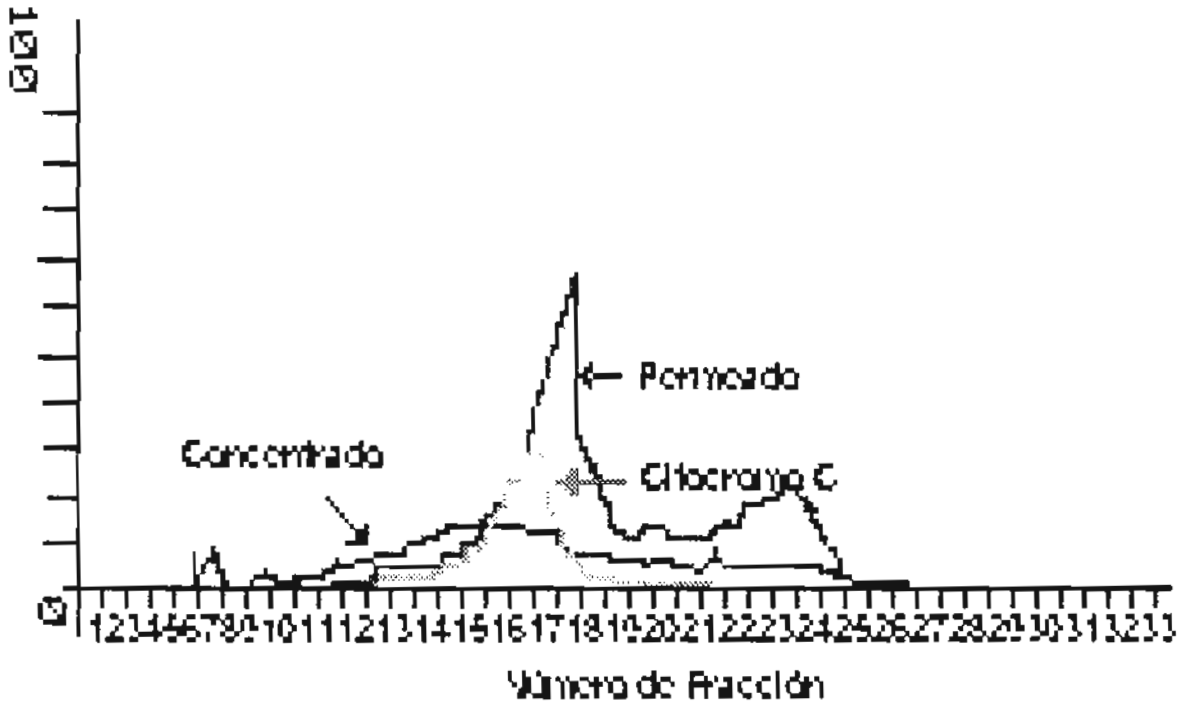


Figura VI.15. Cromatograma de filtración en gel de las fracciones obtenidas de la ultrafiltración con membrana de 10kDa de corte de peso molecular, y Citocromo C.

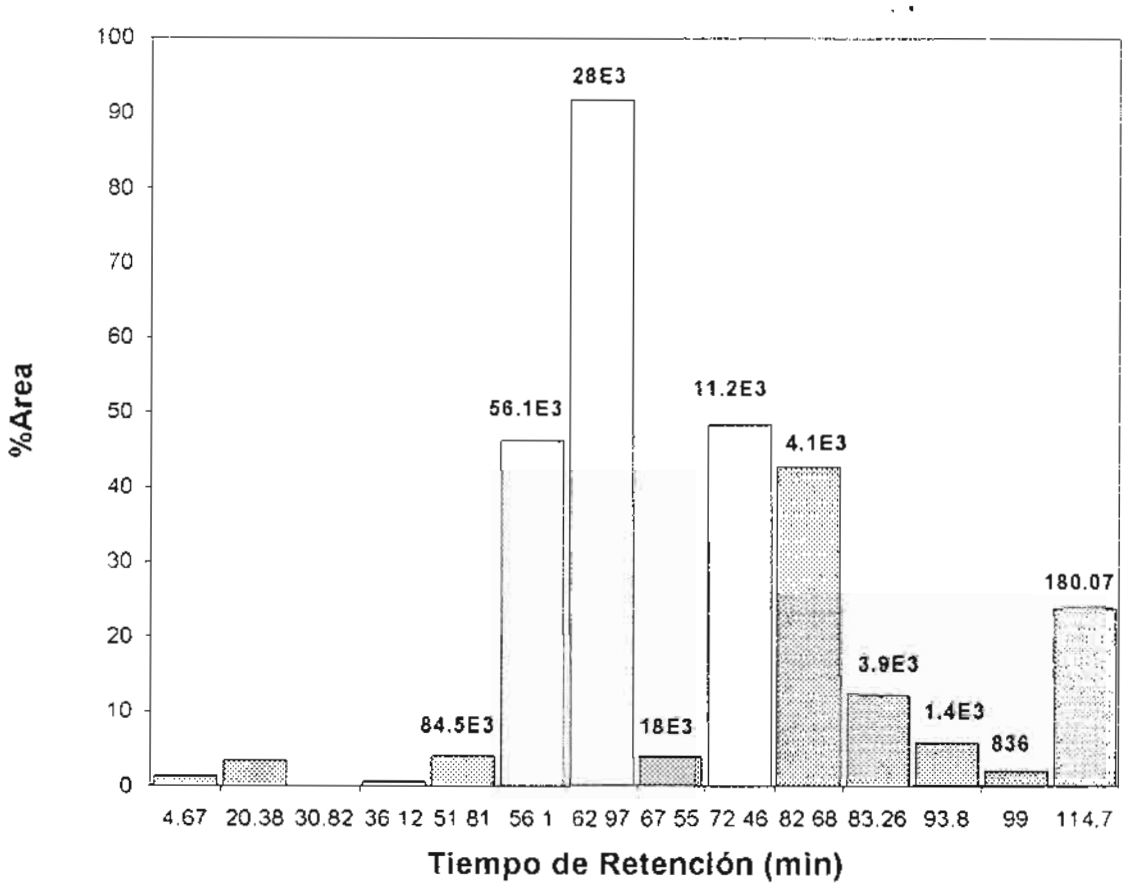


Figura VI.16. Distribución por peso molecular de las proteínas de las fracciones de ultrafiltración con membrana de corte molecular de 10 kDa (YM10).

Permeado Concentrado

Posteriormente, las fracciones, obtenidas de la cromatografía de filtración en gel, del retenido se les determinó actividad específica y absorción de proteína a 280 nm, las cuales son mostradas en la Figura VI.17.

El peso molecular de las fracciones con actividad correspondió a 56, 26 y 13 kDa. La actividad específica fue mayor a pH neutro que a ácido (5 veces mayor), según se muestra en la Tabla I 5., donde se resumen los trabajos relacionados al tema. Se puede observar que el mayor número de enzimas reportadas tienen mayor actividad a pH neutro-alcalino, lo cual confirma los resultados obtenidos. Se encuentran reportadas enzimas activas a pH ácido en camarones y otros crustáceos tales como cangrejo (O'Brien y Skinner 1988) y calamar (Hameed y Haard, 1985), que concuerda con la actividad a pH ácido.

Chen y Yan (1987) han purificado enzimas con pesos moleculares que van de los 24 a los 28 kDa, caracterizándolas como enzimas tipo tripsina, las cuales podrían corresponder al pico de 26 kDa observado. Jian y Moody (1991) han reportado enzimas de pesos moleculares del orden de 18.5 hasta 50.1 kDa en tracto digestivo de *Penaeus monodon.*

Otros trabajos reportan resultados similares como el de Garcia-Carreño y Hernández Cortes (1995), quienes identificaron proteasas serínicas y metaloproteasas en langostilla *Pleuroncodes planipes* con un peso molecular de 16 a 65 kDa.

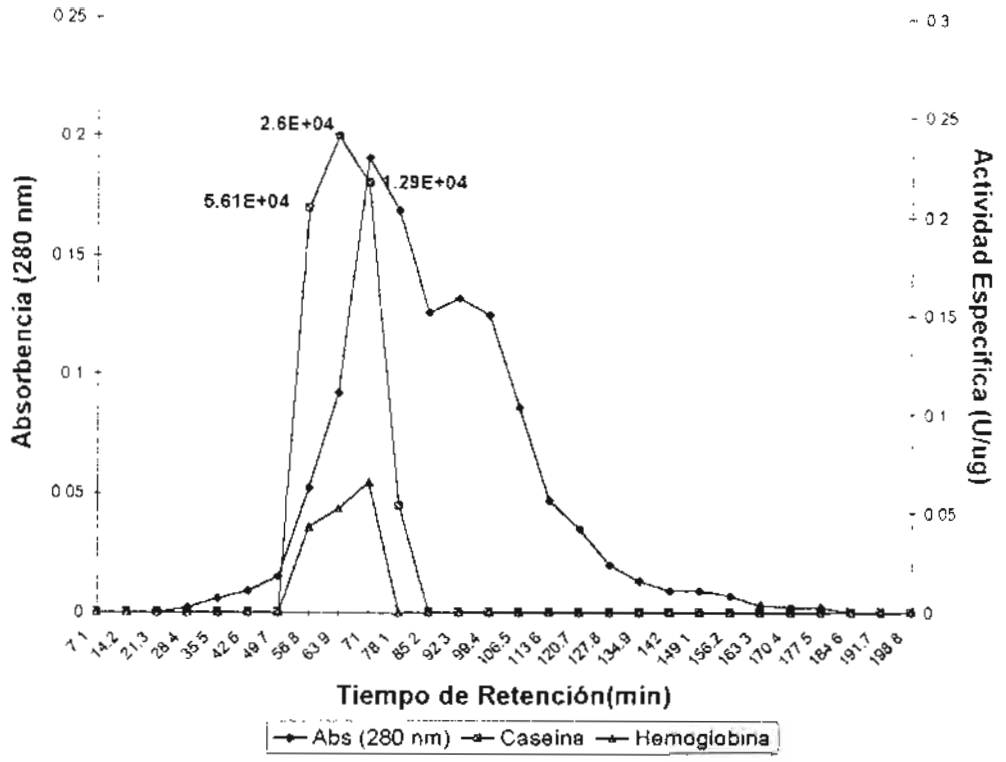


Figura VI.17. Cromatografía de filtración en gel del concentrado de la membrana de MWCO de 10 kDa. Actividad especifica sobre caseina a pH 7 y hemoglobina pH 2.

Se detectó una variación en cuanto a la actividad especifica entre lotes, lo que puede explicarse porque los desechos utilizados en esta tesis se adquirieron como una mezcla de diferentes especies de camarones, se sabe que el tipo y cantidad de enzimas presentes en los crustáceos pueden variar en función de la especie, alimentación y estadío de madurez. Sin embargo una de las metas de este trabajo fue determinar la factibilidad en la recuperación de enzimas a partir de las condiciones reales en las que se obtiene la materia prima. Este punto puede presentar inconvenientes sobre todo al momento de obtener extractos puros en donde se pierda reproducibilidad. A pesar de esta desventaja se obtuvo un concentrado estable que fue posible aplicarlo, así pues en este proyecto en la siguiente sección se abordará el uso del concentrado de proteasas en desproteinización de quitina.

En este sucapitulo se probaron diferentes estrategias de concentración de proteína encontrándose que la ultrafiltración puede ser un método adecuado para eliminar del licor inicial compuestos sin actividad proteolitica. Las enzimas purificadas podrían ser de tipo tripsina de acuerdo a su pH de actividad y peso molecular. El origen de estas enzimas podria tratarse de proteasas digestivas del camarón o bien producidas por la microflora.

VI.2.2. Extracción de Quitina y Pigmentos.

Este subcapítulo estudió la recuperación de quitina y pigmentos a partir de desperdicios de camarón. Para lo anterior se realizó la aplicación de un proceso biológico combinado con método químico y enzimático para producción de quitina. La primera parte de este proceso consistió en fermentación láctica, seguida de despigmentación y desmineralización del sólido. Posteriormente la adición de álcali o enzima fue llevada a cabo durante la etapa de desproteinización, finalmente se realizó un blanqueado. La quitina obtenida fue comparada con productos del método tradicional, así como comerciales.

VI.2.2.1. Separación del sólido después de la fermentación.

Al concluir el tiempo de fermentación láctica del desecho de camarón, el licor representó entre un 55 a 60% del peso inicial del ensilado y el 40 al 45% restante fue la fracción sólida (Tabla VI.10).

La Figura VI.18. muestra el diagrama de flujo del proceso general de extracción de quitina, quitsano y pigmentos, así como los procesos alternativos.

Tabla VI.10. Pesos y contenido de humedad de las diferentes fracciones.

	Peso en base húmeda (g)	Peso en base seca (g)	% de humedad
Inicial	3,103	849.2	72.6 ± 1.3
Sólido	1,326	442.1	66.7 ± 0.8
Licor	1,857	449.6	75.8 ± 0.2

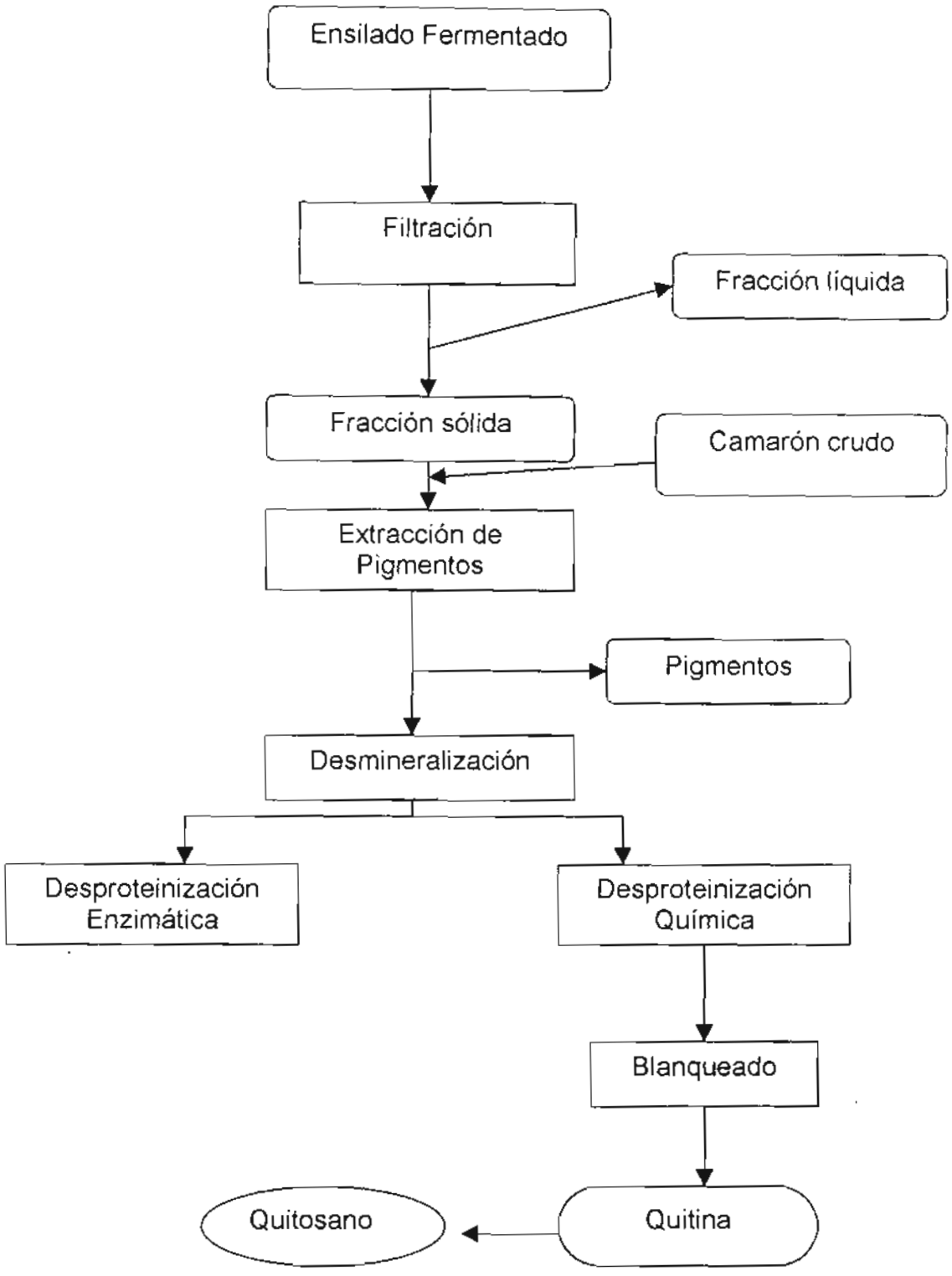


Figura VI.18. Diagrama de flujo del procedimiento general para extraer quitina, quitosano y pigmentos del desecho de camarón fermentado y sin fermentar.

VI.2.2.2. Extracción de pigmentos

En esta etapa del proceso se probaron y compararon los siguientes métodos de extracción:

i) cloroformo-metanol-agua en una relación 4:2:1,

ii) éter de petróleo-acetona-agua en una relación 15:75:10,

iii) aceite de pescado 1:1,

en muestras de camarón fermentado y sin fermentar, además de que se probaron diferentes tiempos de calentamiento con el aceite de pescado.

Los pigmentos extraidos fueron cuantificados mediante un método espectrofotometrico, se realizaron análisis de varianza con el objetivo de determinar el sistema de extracción más eficiente (Apéndice IV Tabla AIV1).

En la Figura VI.19. se muestran las concentraciones obtenidas con los diferentes métodos de extracción probados. En el Apéndice IV (Tabla AIV1) se presentan los análisis de varianza de estos resultados, se realizaron comparaciones entre medias de muestras fermentadas y sin fermentar con el objetivo de observar la influencia de la fermentación sobre la cantidad de pigmento extraido. De acuerdo al análisis estadístico se obtuvo mayor cantidad de pigmento en las muestras fermentadas (Apéndice IV Tabla AIV2).

Se encontraron resultados similares a los reportados por Chen y Meyers (1983), con ensilados químicos de cangrejo obteniéndose rendimientos mejores de extracción del pigmento, en comparación con los desechos congelados en los cuales se observó una rápida degradación de la astaxantina. La explicación que dan estos autores a lo anterior, es la deposición natural de la astaxantina que podría estar ligada químicamente a calcio, este último al ser solubilizado por la acción de los ácidos libera al pigmento haciéndolo más disponible a los agentes extractantes.

Torrisen y col., (1981/1982), realizaron estudios similares en cuanto a rendimientos de extracción determinando además la asimilación de la astaxantina contenida en ensilados químicos de camarón en dietas para truchas arcoiris, en el cual obtuvieron un porcentaje de 71% de digestibilidad comparado con 45% de dietas hechas a partir de desechos frescos y secos. De acuerdo a estos autores la astaxantina resulta ser muy estable a pH 4, sugiriendo potencialidad en el uso de ensilados para dietas de peces, sin embargo consideran importante el contenido de calcio para tener un adecuado balance nutricional.

En secciones posteriores de esta tesis se reporta el porcentaje de calcio removido durante la fermentación, 65.80 %, lo que indica que los ácidos producidos pudieron tener efecto sobre las asociaciones del pigmento con calcio, que hicieron posible un porcentaje mayor de recuperación, de un 38.4 y 13.6 % en las muestras del ensilado con éter de petróleo y cloroformo respectivamente. El pH obtenido mediante fermentación láctica (promedio de 4.5) al parecer estabilizó el compuesto.

Con respecto a los diferentes sistemas de extracción empleados, cloroformo-metanol-agua fue el que obtuvo el mayor contenido de pigmentos, seguido del éter de petróleo (Apéndice IV Tabla AIV3). En el caso de aceite de pescado los resultados obtenidos fueron muy bajos, 0.02-0.022 µg/g, no se observó un incremento del pigmento extraído al aumentar el tiempo de extracción a 30 minutos. Sin embargo, la idea de utilizar aceite de pescado fue la de tratar de incorporar los pigmentos en este vehículo a las dietas evitándose la eliminación de solventes.

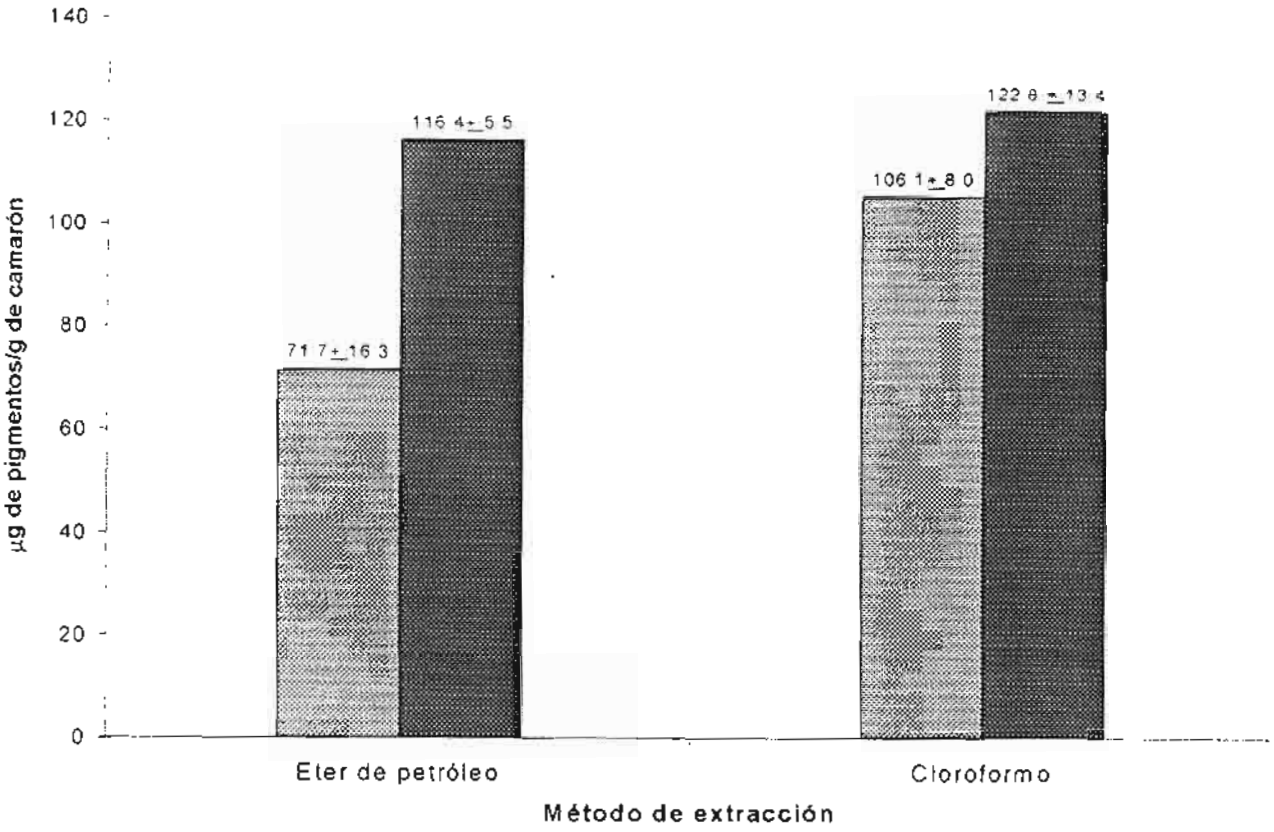


Figura VI.19. Contenido de pigmentos (µg/g), en los sistemas de solventes empleados en muestras de camarón fermentado y sin fermentar.

Sin fermentar **Fermentado**

VI.2.2.3. Desmineralización

La desmineralización en este estudio se realizó en dos etapas:

i) durante la fermentación,

ii) tratamiento con ácido

El método empleado para determinar el contenido de calcio para ambas etapas fue mediante absorción atómica y la curva elaborada, se encuentra en detalle en el Apéndice IV (Figura AIV1).

VI.2.2.3.1. Desmineralización durante la fermentación

Se han realizado estudios del contenido de calcio en diferentes tipos de desechos de crustáceos en los que se reporta un 18% en exoesqueleto de cangrejo y un 7.2 % en cabezas de camarón (Lovell y col., 1968; Meyers, 1986), el porcentaje determinado en el desecho empleado en este proyecto fue de 12.5% (Tabla VI.11).

La función del calcio es de escleretizar el exoesqueleto, es decir proporcionarle dureza, la forma en la que se encuentra es como carbonatos de calcio y esta asociado a quitina, proteínas y pigmentos.

Como se mencionó en el capítulo 1, uno de los usos de los desechos es la elaboración de harinas, sin embargo, para la alimentación de animales monogástricos la alta concentración de calcio, puede ocasionar un balance nutrimental inadecuado así como un decremento en la concentración de proteínas. En consecuencia la reducción de este mineral permitiría obtener una fuente proteica de buena calidad.

Otro aspecto importante es el de eliminar o reducir el contenido de este mineral para purificar la quitina ya que uno de los parámetros de calidad de este polímero es el contenido de cenizas, el cual debe de ser menor de 0.5% y según Meyers (1986) el porcentaje en cabezas es de 22.6.

En la Tabla VI.11. se muestran los resultados obtenidos de las determinaciones de calcio en las fracciones antes (inicial), y después (sólido y licor) de la fermentación, se determinó un porcentaje de remoción del sólido de 65.80 %. Comparando con el trabajo de Zakaria y col. (1997) sobre el mismo sustrato, es decir *Penaeus monodon*, fue más bajo ya que reportan un 79.90%, sin embargo, las condiciones de la fermentación fueron diferentes ya que Zakaria utilizó un reactor de tambor rotatorio, que le permitía eliminar el licor conforme se producía. Mientras que en este trabajo el ensilado se realizó en frascos lo cual ocasionaba que el licor se

mantuviese junto al sólido, y a pesar de que posteriormente fue filtrado, la separación pudo no ser tan eficiente.

Tabla VI.11. Análisis aproximado en base seca del desecho inicial, sólido y licor obtenidos después de la fermentación

Fracciones	Peso en base seca (g)	Calcio (gCa/100gbase seca)	Calcio (g)	% de Calcio removido
Inicial	849.2	12.5	106.1	NA
Sólido	442.1	8.2	36.3	34.2
Licor	449.6	15.5	69.9	65.8

NA No Aplicable

VI.2.2.3.2. Desmineralización con ácido clorhídrico

El proceso de desmineralización se llevó a cabo en el sedimento utilizando ácido clorhídrico en las condiciones descritas en la metodología. La Tabla VI.12. se encuentran las concentraciones de calcio determinadas en el sólido de la fermentación así como en el desecho sin fermentar, después del tratamiento con ácido. En el caso del sólido de la fermentación el 35% del calcio remanente fue eliminado en su totalidad.

Tabla VI.12. Contenido de calcio y quitina en base seca a partir del desecho sin fermentar y sólido (después de la fermentación)

	Peso en base seca (g)	Quitina (g/100g base seca)	Quitina (g)	Calcio (g/100g base seca)	Calcio (g)	% de Calcio removido
Inicial (Sin fermentar)	849.2	12.8	108.7	0.80	6.8	93.6
Sólido (Fermentado)	442.1	21.23	93.85	0.13	0.6	99.5

VI.2.2.4. Desproteinización.

Esta etapa de extracción de quitina se ha realizado en forma tradicional mediante el empleo de alcalíes tales como hidróxidos de sodio o potasio a diferentes concentraciones, tiempos, temperaturas y relaciones desecho: reactivo. Sin embargo este método como ya se menciono (Capítulo I) tiene desventajas.

Healy y col., (1994) revisan diferentes métodos biológicos de desproteinización tales como fermentación láctica, empleo de microorganismos proteoliticos y enzimas. Así pues se menciona trabajos como los de Shimahara y col. (1982) quien determinó un 99% de desproteinización con *Pseudomonas maltophila* en exoesqueleto de camarón, pese al alto porcentaje de proteina removida no fue económicamente rentable por la alta proporción de agua con relación al desecho (99:1). A diferencia del anterior, se propone una fermentación en estado sólido como un proceso de bioconversión y recuperación de productos. Se establecieron dos etapas de desproteinización en este proceso, la Figura VI.18., muestra un diagrama de flujo del proceso:

i) durante la fermentación,

ii) tratamiento

   a) enzimático

   b) químico

VI.2.2.4.1. Desproteinización durante la fermentación

La Tabla VI 13. muestra el contenido de proteína cruda en las fracciones así como el porcentaje de remoción, el cual fue de 75.7%. Esta reducción en el contenido de proteina se llevó a cabo por la actividad proteolítica presente durante la fermentación (sección VI.2.1). Trabajos similares (Hall y Da Silva, 1994; Zakaria y col., 1997) reportan proteólisis durante la fermentación, particularmente Zakaria y col. (1997) determinaron un porcentaje de remoción de 89.2 %, utilizando un reactor de tambor rotatorio.

Tabla VI.13. Contenido de Proteína en base seca a partir del desecho sin fermentar y sólido (ensilado), porcentaje de proteína removida con la fermentación.

	Peso en base seca (g)	Proteína (g/100g base seca)	Proteina (g)	% de Proteina removida
Inicial	849.2	46.43	394.3	75.7
Sólido	442.1	21.73	96.07	

VI.2.2.4.2. Desproteinización enzimática

Posteriormente las fracciones inicial y sólido, después de desmineralización y neutralización a pH 7, fueron sometidas a un tratamiento enzimático con la finalidad de hidrolizar la proteina restante.

Determinación del tiempo de reacción enzimática

El objetivo de esta serie de estudios fue calcular el tiempo de reacción a la cual se podía hacer el muestreo para realizar la comparación entre enzimas. Se usó tripsina de páncreas bovino, haciendo muestreo en intervalos regulares de tiempo hasta 96 horas. El uso de esta enzima fue debido a que se ha reportado por varios autores para desproteinización de sólidos para extracción de quitina así como para incrementar el rendimiento en la concentración de pigmentos (Chen y Meyers, 1983, Cano-López y col., 1987; Healy y col., 1994). Las condiciones empleadas en esta sección fueron siguiendo la metodología de Bustos y Healy (1994), quienes utilizaron tripsina en una concentración de 20 mg por gramo de desecho en buffer de fosfatos 0.013M pH 7 a 30° C.

La proteólisis obtenida con la tripsina sobre el sólido es presentada en la Figura VI.20., en donde sé observa un aumento en la proteína soluble durante las primeras 48 horas de reacción, posteriormente la concentración de proteína soluble se mantuvo estable.

En el control, sin enzima, se observó un incremento en la concentración de proteína soluble, el cual se explica por la solubilidad de proteína en el buffer (592.5 μg/ml), lo que representa un 36.5 % de la concentración de proteína soluble determinada en el tratamiento con enzima (1620.7 μg/ml). Como se mencionó al inicio de la sección esta información sirvió para fijar el tiempo de muestreo para la siguiente serie de experimentos. Posteriormente se hizo reaccionar las enzimas con el desecho fermentado durante 48 horas haciendo un muestreo cada 24 horas.

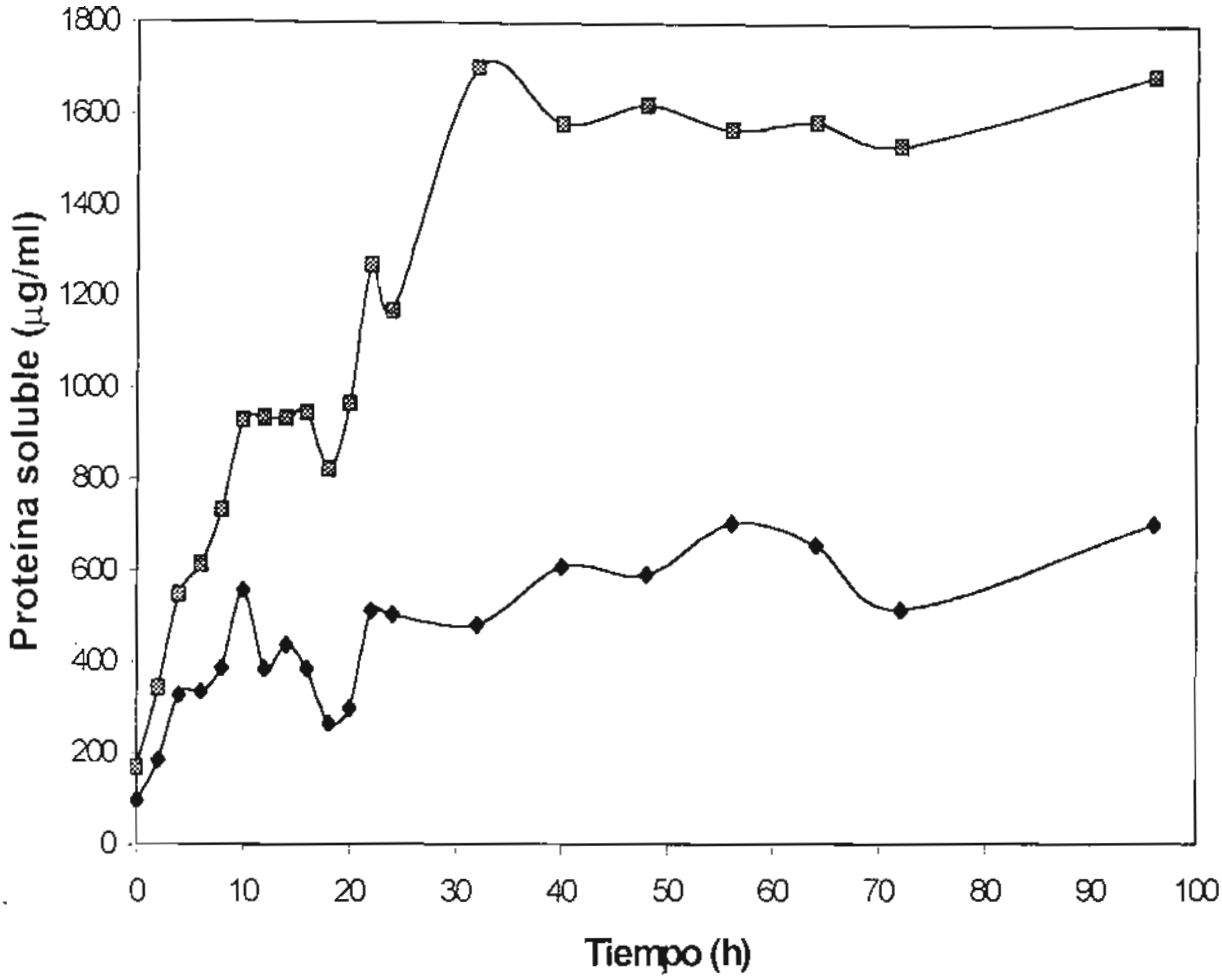


Figura VI.20. Hidrólisis de proteína durante el tratamiento con tripsina en el sólido, determinando proteína soluble en el medio de reacción a través del tiempo

◆ Control ■ Tripsina.

Uso de otras enzimas

Se probaron además de la tripsina, una mezcla de enzimas: Alcalasa, Neutrasa, Savinasa y Esperasa en proporción 1:1:1:1 (Novo Industrias Copenhague, Dinamarca), y un concentrado de proteasas de camarón obtenido por ultrafiltración, membrana de corte molecular de 10kDa (sección VI.2.1.). La proporción de dichas enzimas en el medio de reacción enzimática y temperatura utilizadas se muestra en la Tabla VI.14., el sistema consistió en resuspender el sólido (después de la fermentación) y el inicial (desecho sin fermentar) en buffer de fosfatos pH 7.0, se realizó en dos temperaturas diferentes 30 y 50° C, reportadas como óptimas para las enzimas.

Tabla VI.14. Condiciones del medio de desproteinización enzimática de desecho de camarón fermentado y sin fermentar

Enzima	Cantidad de enzima[a]	Cantidad de proteína (mg)	Actividad Específica (U/mg[b])	Temperatura (°C)[c]
Tripsina	20 mg	2.18	102.7	30
Neutrasa, Savinasa, Alcalasa y Esperasa (1:1:1:1)	0.0174 ml	1.21	184.4	50
Concentrado de proteasas de camarón	14.4	2.61	85.7	30

[a] 1 gramo de sólido por 25 ml de buffer de fosfatos, [b] Actividad Específica fija a 223.5 U, [c] Temperatura óptima reportada.

Desproteinización de residuos quitinosos.

En las Figuras VI.21. y VI.22. se observan las concentraciones de proteína soluble, en los medios de reacción enzimática con respecto al tiempo en sólidos sin fermentar y fermentados Asimismo, se comparan con los resultados obtenidos de la desproteinización química.

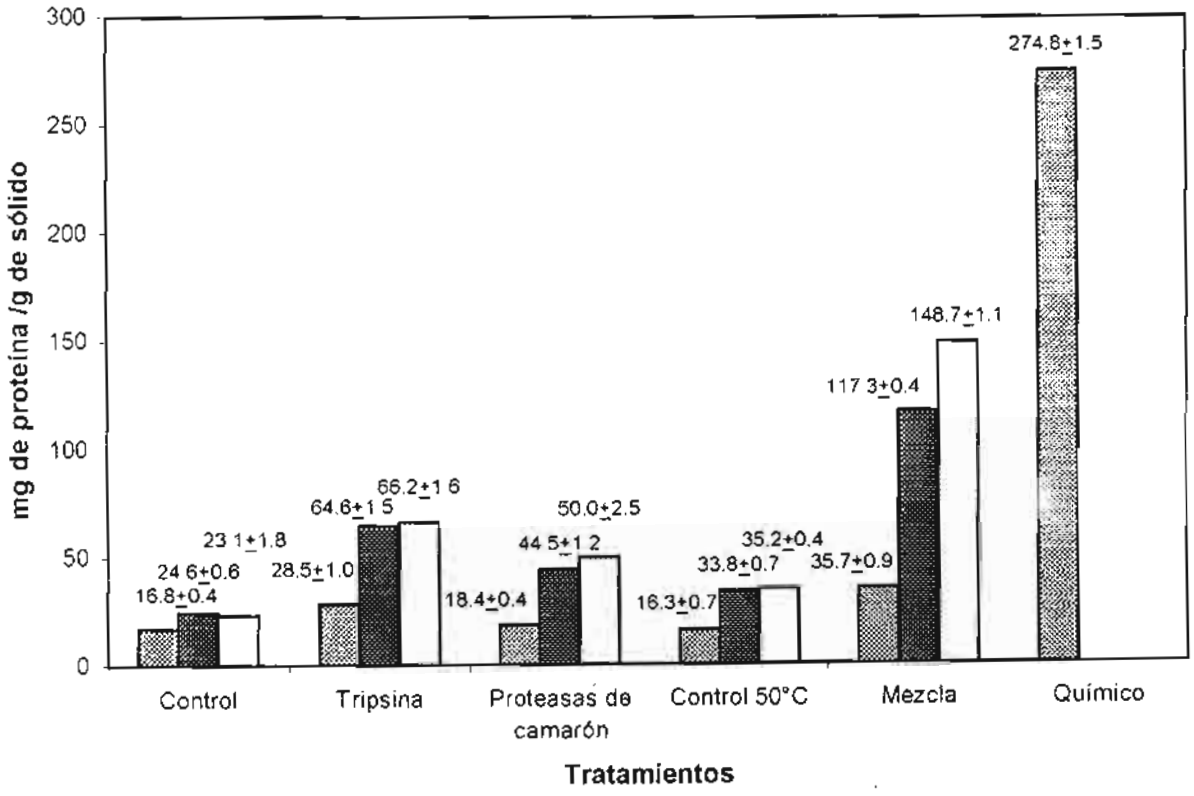


Figura VI.21. Proteína soluble liberada (Peterson, 1977) determinados en los medios de reacción enzimática y química de los desechos sin fermentar desmineralizados.

0 **24** **48 horas**

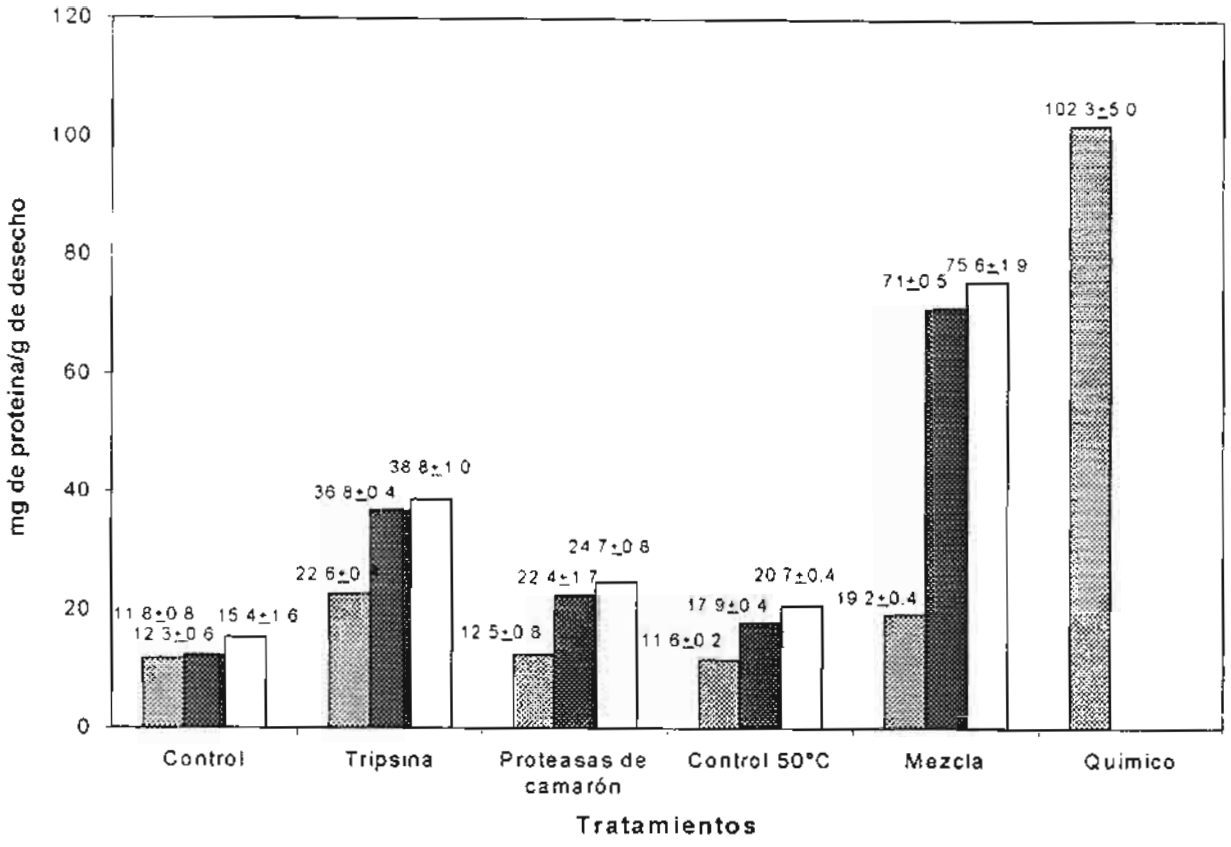


Figura VI.22. Proteína soluble liberada (Peterson, 1977) determinados en los medios de reacción enzimática y química de los desechos fermentados y desmineralizados.

0 24 48 horas

De acuerdo al análisis de varianza y la comparación de medias (Apéndice IV Tabla AIV4.). La concentración de proteína liberada para los desechos sin fermentar fue mayor que para los fermentados; lo anterior se debe a que la concentración de proteína disminuyó con la fermentación (sección VI.3.3.1., Apéndice IV Tabla AIV5.). El tratamiento con las diferentes enzimas mostró que la mezcla hidrolizó una cantidad mayor de proteína seguida de la tripsina

y por último las proteasas de camarón (Apéndice IV Tabla AIV.6). Así como se mencionó anteriormente, se observó solubilización de proteína en las soluciones reguladoras (controles), aunque este no fue diferente después de las 24 horas. El tiempo fue un factor de variación significativo en el análisis, determinándose que para los tres diferentes tiempos de reacción hubo diferencias (Apéndice IV Tabla AIV7.).

En las Tablas VI.15 y VI.16., se presentan los porcentajes de proteína removida con las diferentes enzimas sobre los desechos sin fermentar y fermentados respectivamente. Para los desechos sin fermentar el porcentaje más alto fue de 54.1 correspondiente a la mezcla de enzimas este porcentaje es bajo a comparación de los otros métodos, químico y el obtenido con la fermentación. Con el primero se reporta casi un 100% de eliminación de proteínas (Bustos y Healy, 1994), mientras que para el segundo se determinaron un 62.8 a 75.7%.

Los sólidos en esta serie de experimentos fueron sometidos a dos procesos de desproteinización: uno durante la fermentación láctica y el segundo con las enzimas probadas. Al utilizar las diferentes enzimas con los desechos fermentados, la mezcla de enzimas desproteinizó un 74.9% de la proteína remanente de la fermentación, lo que en total representa un 90.7%. Para los otros tratamientos se obtuvieron porcentajes totales de remoción de 68.7, 70.3, 76.9, y 71.7, para los controles de 30 y 50° C, tripsina y proteasas de camarón respectivamente. Esto indica que el mejor tratamiento empleado fue de la mezcla de enzimas, sin embargo sería necesario optimizar condiciones, por ejemplo concentración y proporción de enzima, así como comparar la calidad de la quitina obtenida en función de la especificidad de las enzimas probadas.

Tabla VI.15. Proteína soluble obtenida después de diferentes tratamientos sobre desechos desmineralizados y sin fermentar.

Tratamiento	Proteína soluble después de desproteinización (mg/g)	Porcentaje de Proteína removida
Desproteinización química.	274.8 ± 1.5	100*
Control 30°C	23.1 ± 0.6	8.4
Control 50°C	35.2 ± 0.4	12.8
Tripsina	66.2 ± 1.6	24.1
Proteasas de camarón	50.0 ± 2.5	18.2
Mezcla de enzimas	148.7± 1.10	54.1

*considerado como 100 % de desproteinización
Promedio de 6 observaciones

Tabla VI.16. Proteína soluble obtenida después de diferentes tratamientos sobre desechos desmineralizados y fermentados.

Tratamiento	Proteína soluble después de desproteinización (mg/g)	Porcentaje de Proteína removida
Desproteinización química.	102.3 ± 5.0	100*
Control 30°C	16.4 ± 0.8	16.0
Control 50°C	20.7 ± 0.3	20.2
Tripsina	38 8 ± 1.0	37.9
Proteasas de camarón	24.7 ± 0.8	24.1
Mezcla de enzimas	76.6 ± 1.9	74.9

*considerado como 100 % de desproteinización
Promedio de 6 observaciones

Se determinaron los contenidos de nitrógeno total en los sólidos, los cuales después de la reacción enzimática fueron secados y analizados mediante la técnica de Kjehldahl, estos resultados son mostrados en las Figuras VI.23. y VI.24. para desechos sin fermentar y fermentados respectivamente. Se llevo a cabo el análisis de varianza y comparación de medias

observándose que las fuentes de variación fueron significativas, en cuanto a comparación de medias (Apéndice IV Tabla AIV8):

i) Muestras fermentadas y sin fermentar hubo diferencias significativas entre ellas, en las últimas la media fue más alta lo cual se explica por un mayor contenido inicial de proteínas en los desechos (Apéndice IV Tabla AIV9).

ii) Tipos de enzimas se determinaron tres grupos, el primero con la media mayor de los controles, el segundo proteasas de camarón y tripsina y el de media más baja fue el de la mezcla (Apéndice IV Tabla AIV10)

iii) Tiempo, se determinaron dos grupos en los que se encontraron diferencias solo entre el inicial y 24 a 48 y ninguna entre estas dos últimas (Apéndice IV Tabla AIV11).

En las Figuras VI.23. y VI.24. se aprecia una disminución del nitrógeno total en los sólidos, esta es mayor de las 0 a las 24 horas, posteriormente fue estable, la mezcla que fue el tratamiento que produjo mayor hidrólisis se observaron los porcentajes más bajos.

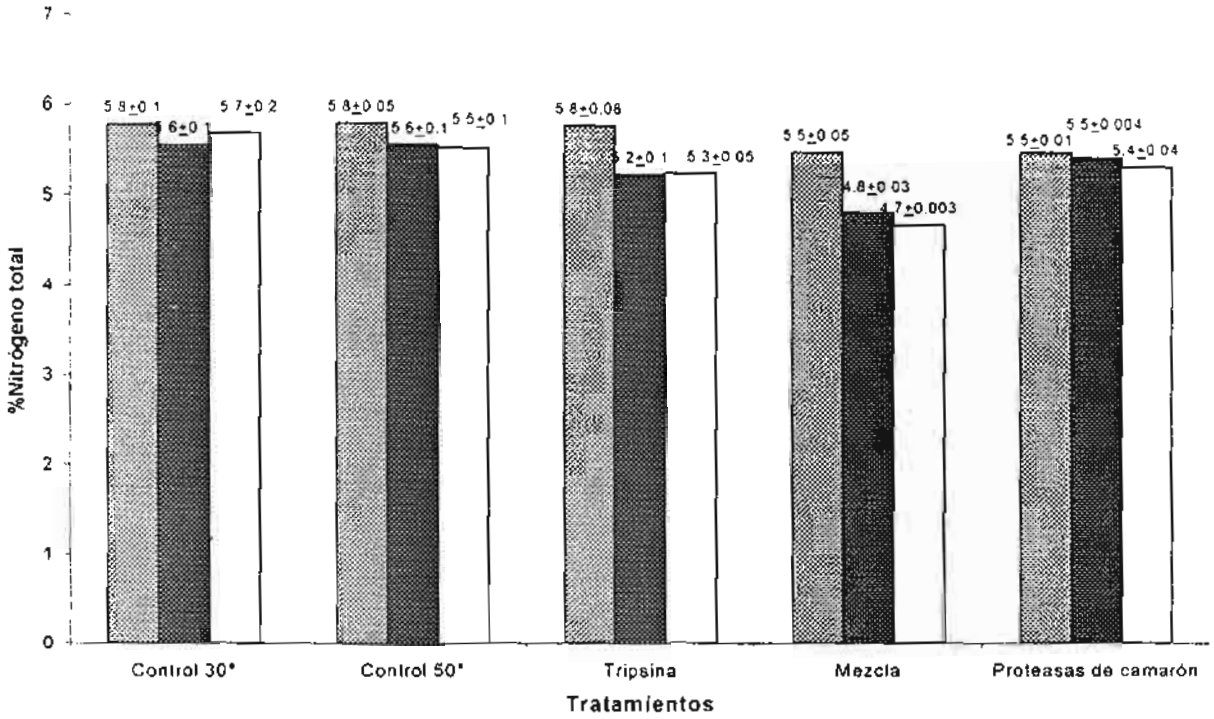


Figura VI.23. Nitrógeno total por Kjehldal (Pearson, 1981) determinado en los sólidos después de la reacción enzimática y química de los desechos sin fermentar desmineralizados.

0 24 48 horas

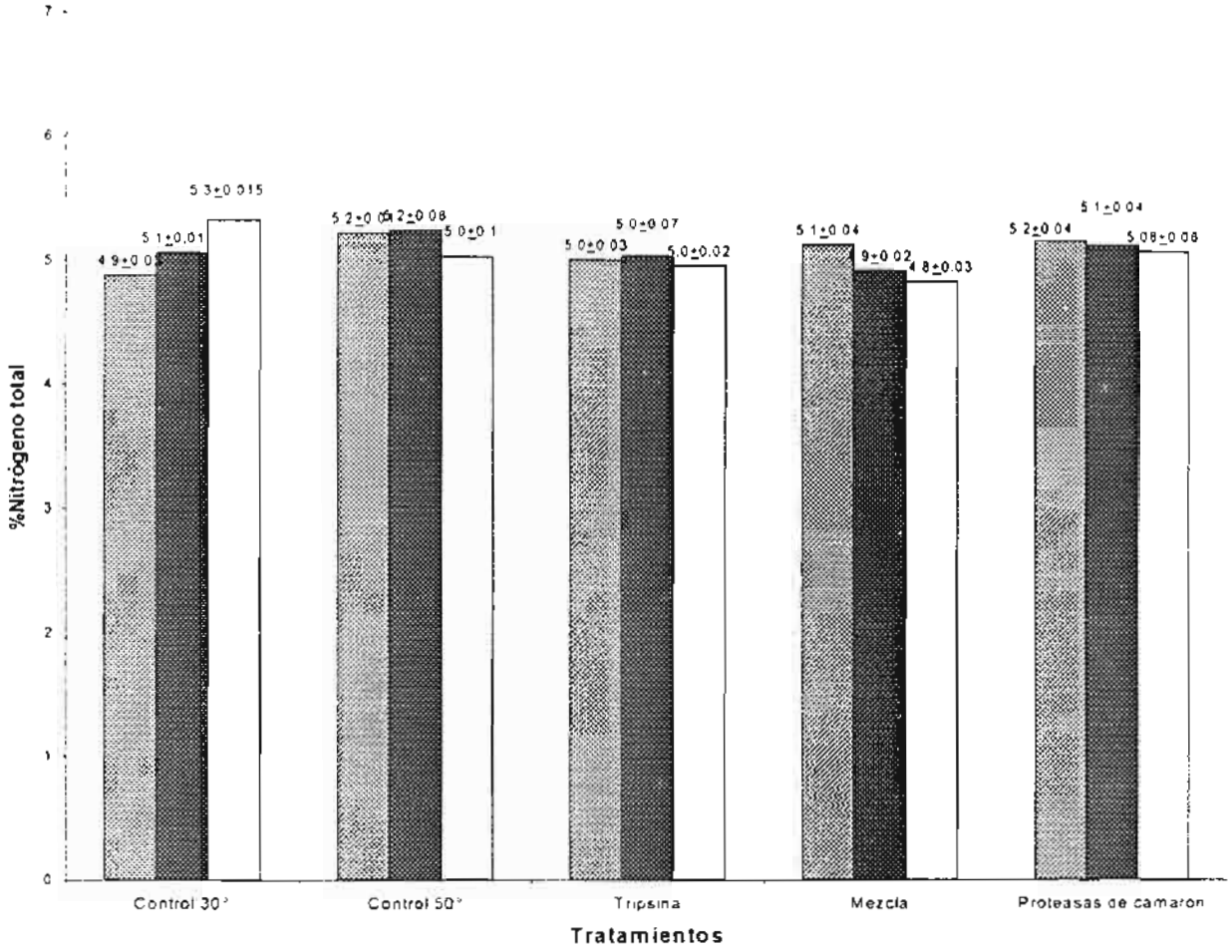


Figura VI.24. Nitrógeno total por Kjehldal (Pearson, 1981) determinado en los sólidos después de la reacción enzimática y química de los desechos fermentados y desmineralizados.

0 24 48 horas

Se realizaron análisis de elementos: Carbono, Hidrógeno y Nitrógeno, los cuales se muestran en las Tablas VI.17. y VI.18. para los sólidos sin fermentar y fermentados respectivamente.

Healy y col., (1994) realizaron determinaciones del contenido de nitrógeno con la misma técnica determinando el contenido de nitrógeno proteico por diferencia del inicial y después de la desproteinización, estas diferencias fueron multiplicadas por 6.25. Los contenidos de nitrógeno proteico fueron calculados confirmándose que para la mezcla el porcentaje de proteína removido fue más alto, 18.7%.

Comparando el contenido de los elementos analizados con los valores teóricos de la quitina (Tabla VI.21.) se observan valores altos de carbono e hidrógeno, esto es debido a la presencia de pigmentos. Se confirmó lo anterior con el análisis cualitativo de los espectros de infrarrojo de estas muestras (Figuras VI.25 y VI.26) en donde se pueden apreciar picos característicos reportados por Muriana y col., (1993) los cuales son a 3425 estiramiento O-H, 1652 estiramiento C=O, mientras que la muestra despigmentada no presenta estos picos (Tabla VI.19.). Para la muestra fermentada y despigmentada la pérdida de estos picos no es evidente, sin embargo los espectros son mas parecidos a los de la quitina pura (Tabla VI.20.).

Tabla VI.17. Análisis elemental de muestras sin fermentar de desproteinización enzimática.

Tratamiento	% Carbono	% Hidrógeno	% Nitrógeno
Sólido después de la desmineralización	45.45	6.45	7.70
Control 30°C, 48 horas	52.76	7.38	6.72
Control 50°C, 48 horas	51.75	7.23	6.21
Tripsina, 48 horas	50.22	7.01	5.97
Proteasas de camarón, 48 horas	51.88	7.29	6.06
Mezcla de enzimas, 48 horas	53.39	7.51	4.95

Tabla VI.18. Análisis elemental de muestras fermentadas de desproteinización enzimática.

Tratamiento	% Carbono	% Hidrógeno	% Nitrógeno
Sólido después de la desmineralización	51.21	7.16	6.03
Control 30°C, 48 horas	51.91	7 30	5.72
Control 50°C, 48 horas	51.05	7.12	5.66
Tripsina, 48 horas	51.85	7.37	5.31
Proteasas de camarón, 48 horas	50.44	7 05	5.63
Mezcla de enzimas, 48 horas	50.97	7.03	4.71

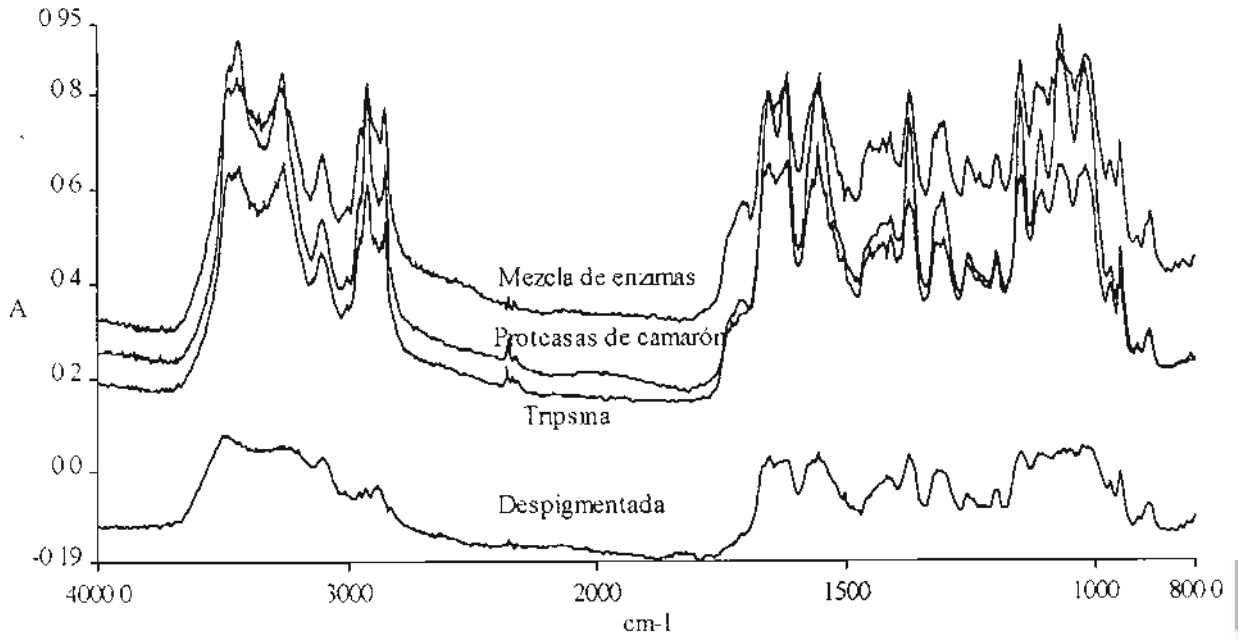


Figura VI.25. Espectros FTIR para desechos sin fermentar, tratamiento enzimático después de 48 horas.

Tabla VI.19. Absorbencias a 3425 y 1652 cm^{-1}, picos característicos de pigmentos (Muriana y col., 1993) para desechos sin fermentar, tratamiento enzimático después de 48 horas (Figura VI.25, espectro FTIR).

	Absorbencia (cm^{-1})	
	3425	1652
Despigmentada	0.05	0.02
Mezcla de enzimas	0.80	0.80
Tripsina	0.62	0.64
Proteasas de camarón	0.86	0.78

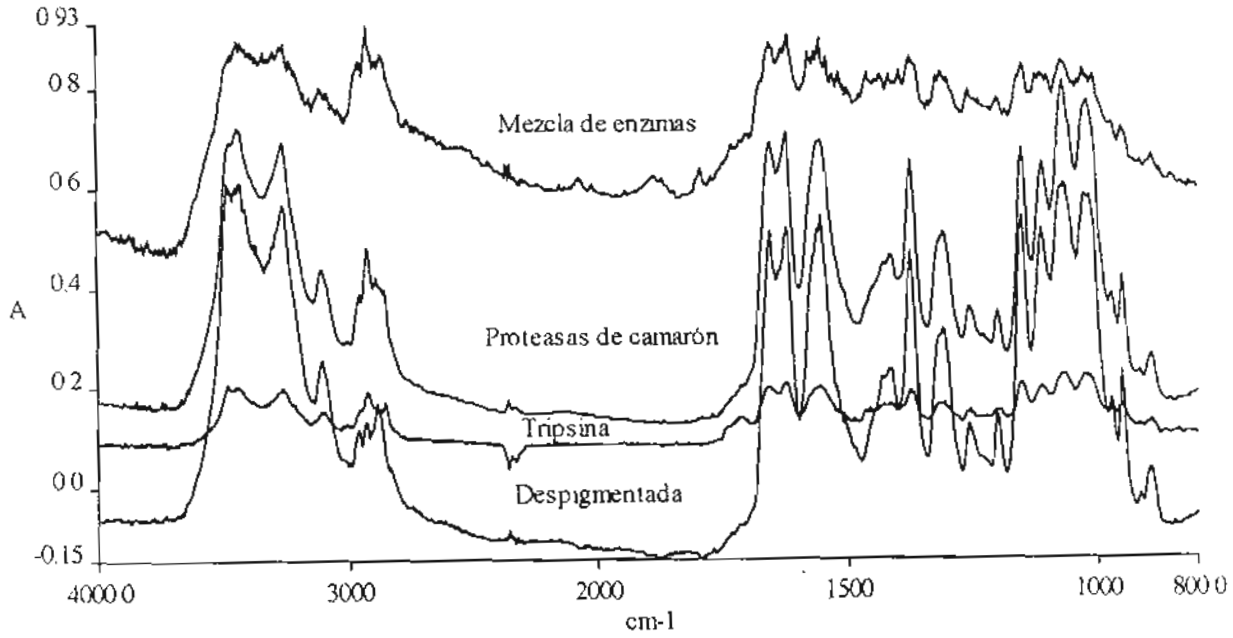


Figura VI.26. Espectros FTIR para desechos fermentados, tratamiento enzimático después de 48 horas.

Tabla VI.20. Absorbencias a 3425 y 1652 cm^{-1}, picos característicos de pigmentos (Muriana y col., 1993) para desechos fermentados, tratamiento enzimático después de 48 horas (Figura VI.26, espectro FTIR).

	Absorbencia (cm^{-1})	
	3425	1652
Despigmentada	0.57	0.48
Mezcla de enzimas	0.88	0.89
Tripsina	0.19	0.19
Proteasas de camarón	0.69	0.69

VI.2.2.4.3. Desproteinización química

Nitrógeno total en las diferentes etapas del proceso.

El proceso químico de desproteinización liberó la máxima concentración de proteina soluble. Los valores de proteína soluble obtenidos en los líquidos de la reacción con álcali de los desechos sin fermentar y fermentados son mostrados en las Figuras VI.21. y VI.22. respectivamente.

Las determinaciones de nitrógeno total a través del proceso total químico de los desechos se muestran en las Figuras VI.25. y VI.26. Para las muestras sin fermentar se observa una clara disminución del nitrógeno, especialmente en las primeras etapas del proceso, obteniéndose un producto final con contenido de nitrógeno similar al producto comercial. Por otra parte para los desechos fermentados el contenido de nitrógeno se mantiene casi constante y la disminución fue menor.

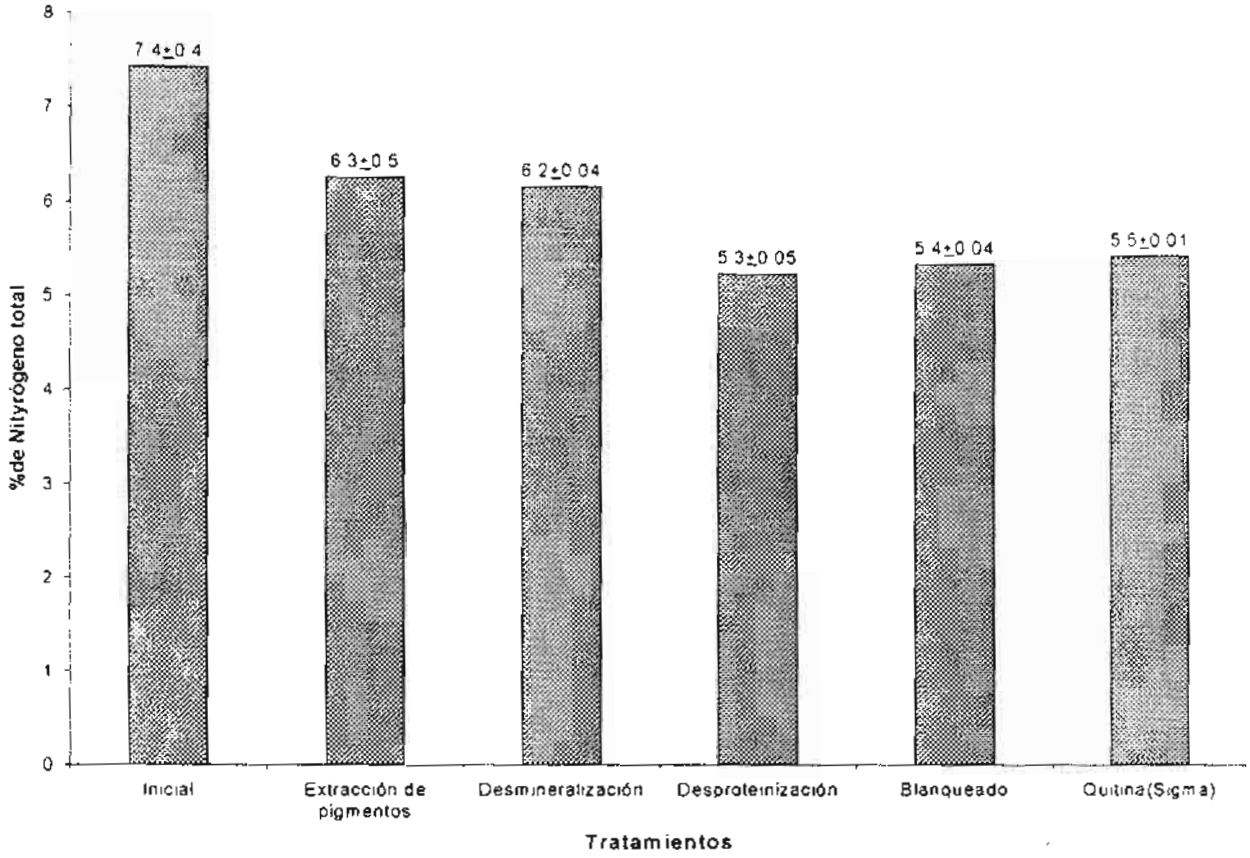


Figura VI.27. Nitrógeno total por Kjehldal (Pearson, 1981) determinado en los sólidos sin fermentar después del proceso químico.

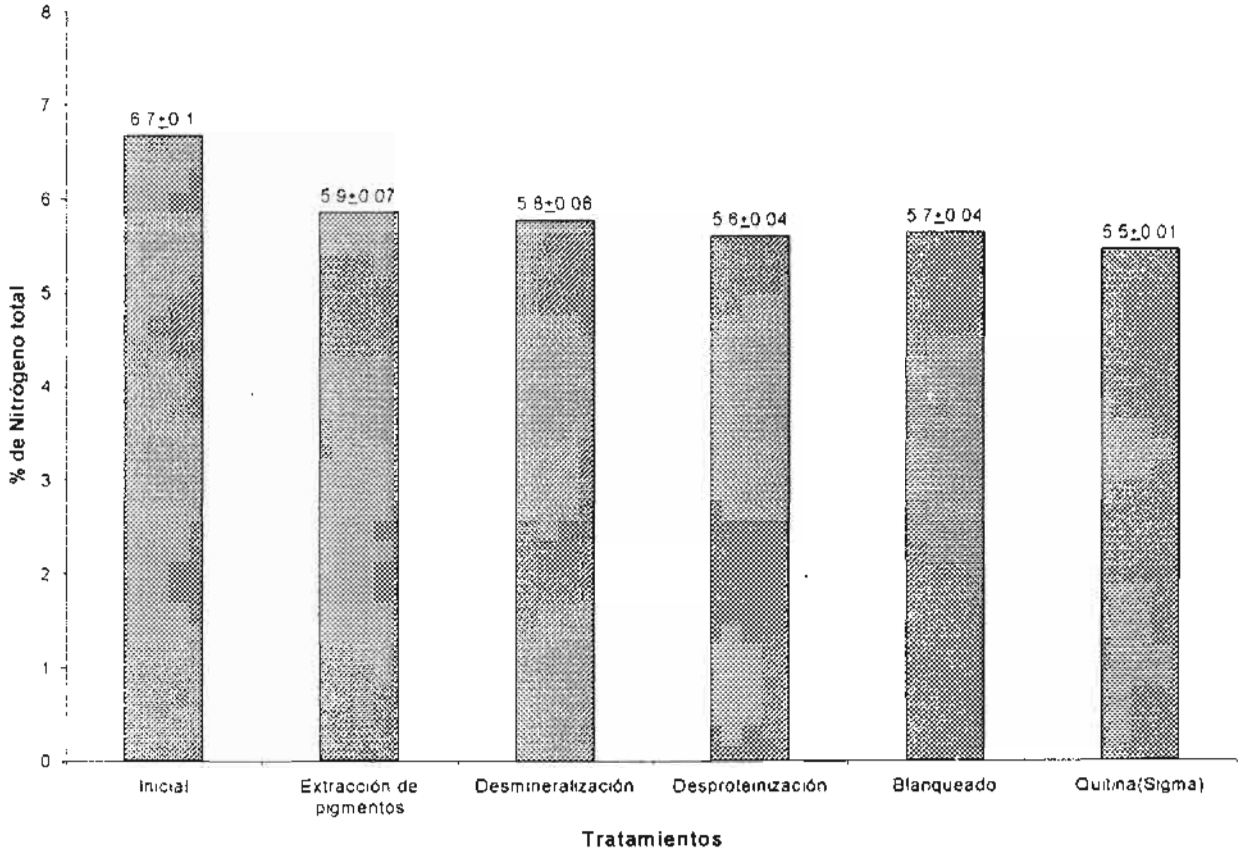


Figura VI.28. Nitrógeno total por Kjehldal (Pearson, 1981) determinado en los sólidos fermentados después del proceso químico.

Análisis Elemental: Carbono, Hidrógeno y Nitrógeno

La Tabla VI.21. muestra los valores obtenidos en las diferentes etapas del proceso químico para purificación de quitina en desechos sin fermentar y fermentados. Los contenidos finales de los elementos son aproximados a los valores teóricos y a los determinados en los estándares, en ninguno de los productos se observan valores cercanos a los del quitosano lo que sugiere que no hubo desacetilación considerable durante los tratamientos.

Tabla VI.21. Análisis elemental de muestras de *Penaeus monodon*, con diferentes tratamientos y estándares comerciales de quitina y quitosano, así como valores teóricos.

Tratamiento	% Carbono	% Hidrógeno	% Nitrógeno
Sin fermentar			
Inicial	43.45	6.44	8.04
Después de la desmineralización	45.45	6.45	7.70
Después de desproteinización	43.48	6.10	6.49
Después de blanqueado (Quitina)	44.78	6.51	6.40
Fermentado			
Inicial	39.60	6.01	7.43
Después de la desmineralización	44.96	6.20	7.12
Después de desproteinización	43.66	6.17	6.40
Después de blanqueado (Quitina)	43.30	6.01	6.34
Estándares			
Quitina (Sigma C-7170)	44.32	6.61	6.47
Quitina valores teóricos	45.28	6.65	6.60
Quitosano (Sigma C-3646)	42.38	6.80	7.85
Quitosano (Fluka 22742)	40.69	7.19	7.36

Análisis de espectros de infrarrojo

Productos Finales

Las Figuras VI 29. y VI.30. muestran los espectros de infrarrojo de los productos finales, es decir, proceso químico y combinado (fermentación más químico). La interpretación es la siguiente: a 3430 (O-H y N-H), 2920 (C-H alifático), 1650 y 1620 (amida I), 1550 (amida II) y 1150-1029 (piranosa). Los espectros de infrarrojo con transformadas de Fourier (FTIR) de quitinas comerciales y extraidas fueron cualitativamente similares, esto es, los picos a longitudes de onda especificas fueron los mismos, se observó dicha semejanza particularmente en las quitinas comerciales y aquella que fue obtenida por proceso químico únicamente (Figura VI.31). Lo anterior se explica a que ambas quitinas fueron producidas por métodos semejantes.

Kurita y col., (1994) reportaron espectros FTIR similares. Las quitinas obtenidas por ambos métodos presentaron picos alrededor de 1640 y 1620 los cuales son característicos de α-quitina (Kim y col., 1996).

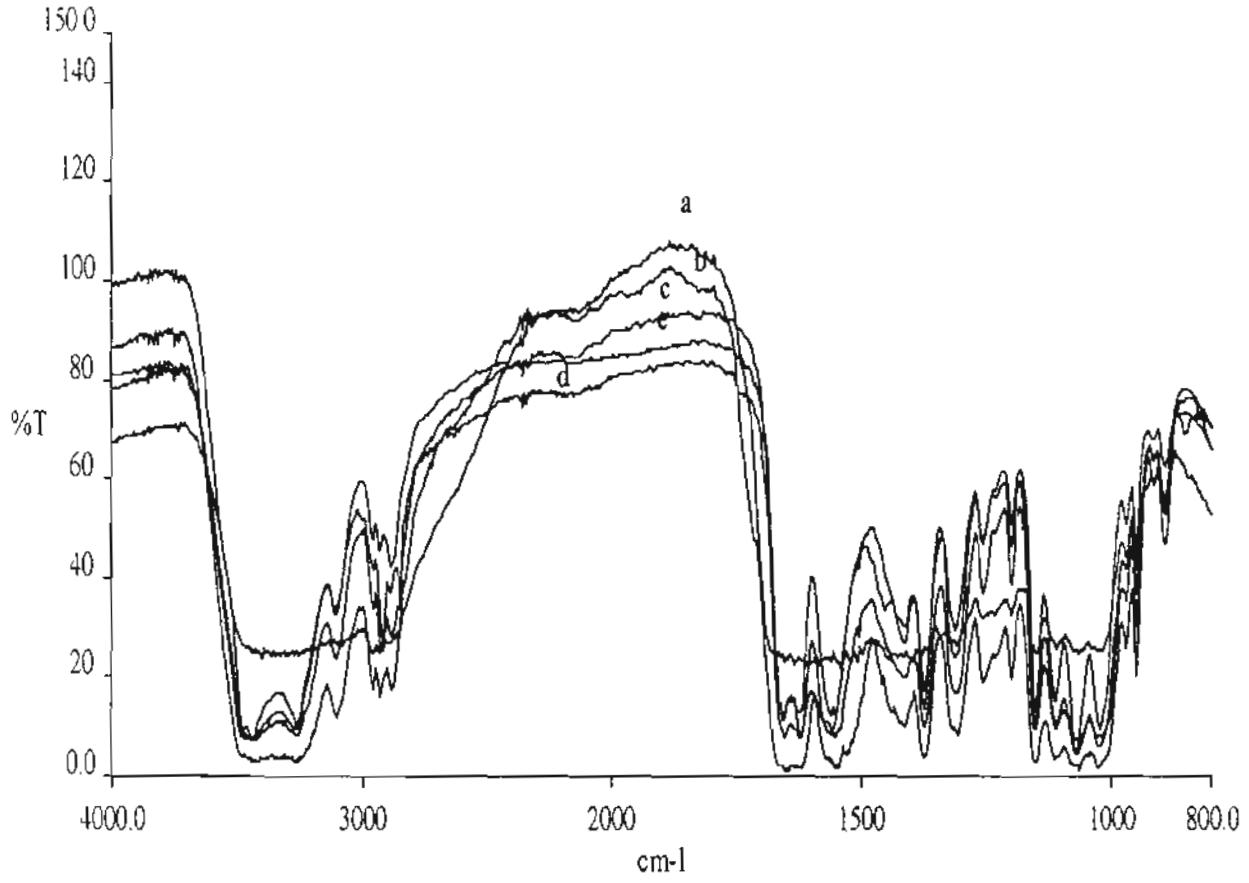


Figura VI.29. Espectros FTIR para proceso químico de desecho sin fermentar a)inicial, b)después de extracción de pigmentos y desmineralización, c)después de desproteinización, d) blanqueado, e) quitina comercial (Sigma). 3430 (O-H y N-H), 2920 (C-H alifático), 1650 y 1620 (amida I), 1550 (amida II) y 1150-1029 (piranosa).

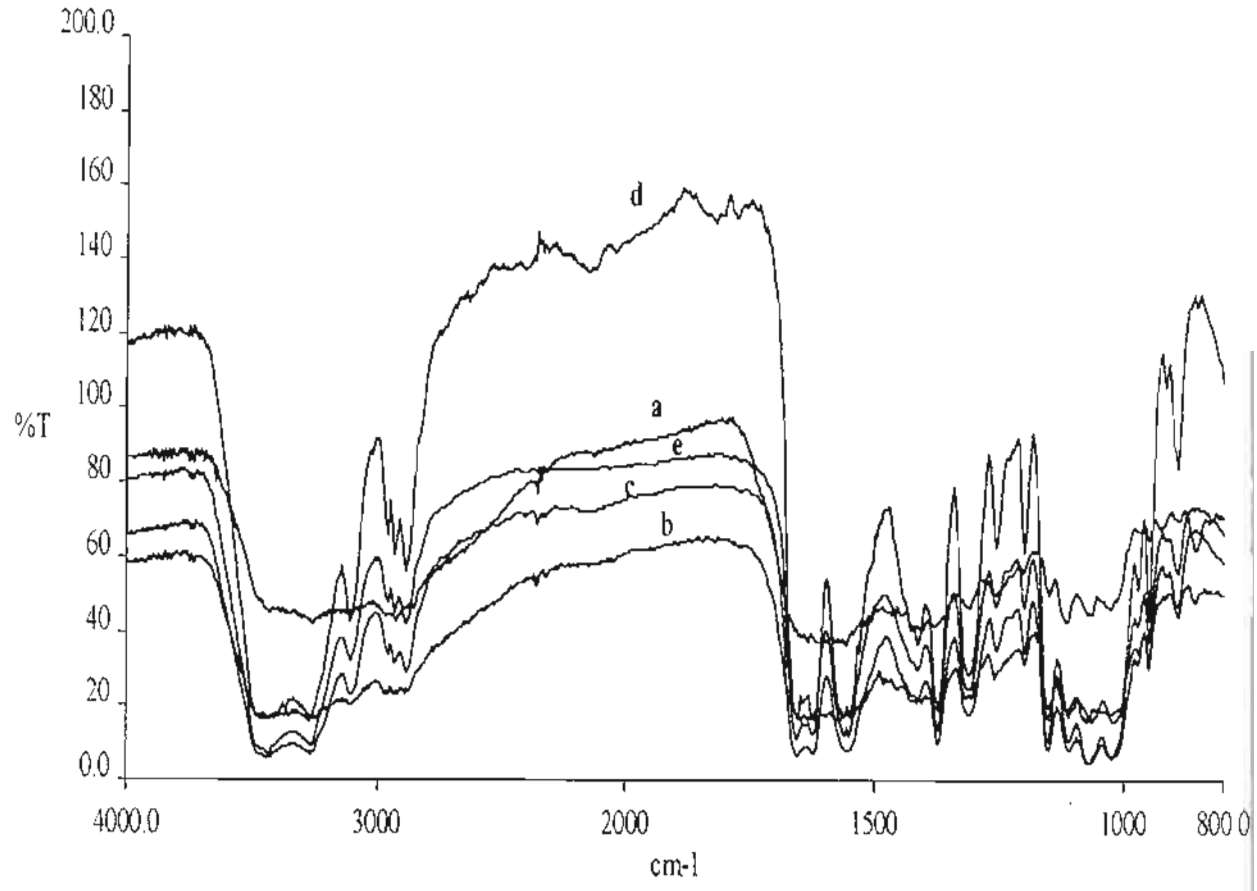


Figura VI.30. Espectros FTIR para proceso químico de desechos fermentados a)inicial, b)después de extracción de pigmentos y desmineralización, c)después de desproteinización, d) blanqueado, e) quitina comercial (Sigma). 3430 (O-H y N-H), 2920 (C-H alifático), 1650 y 1620 (amida I), 1550 (amida II) y 1150-1029 (piranosa).

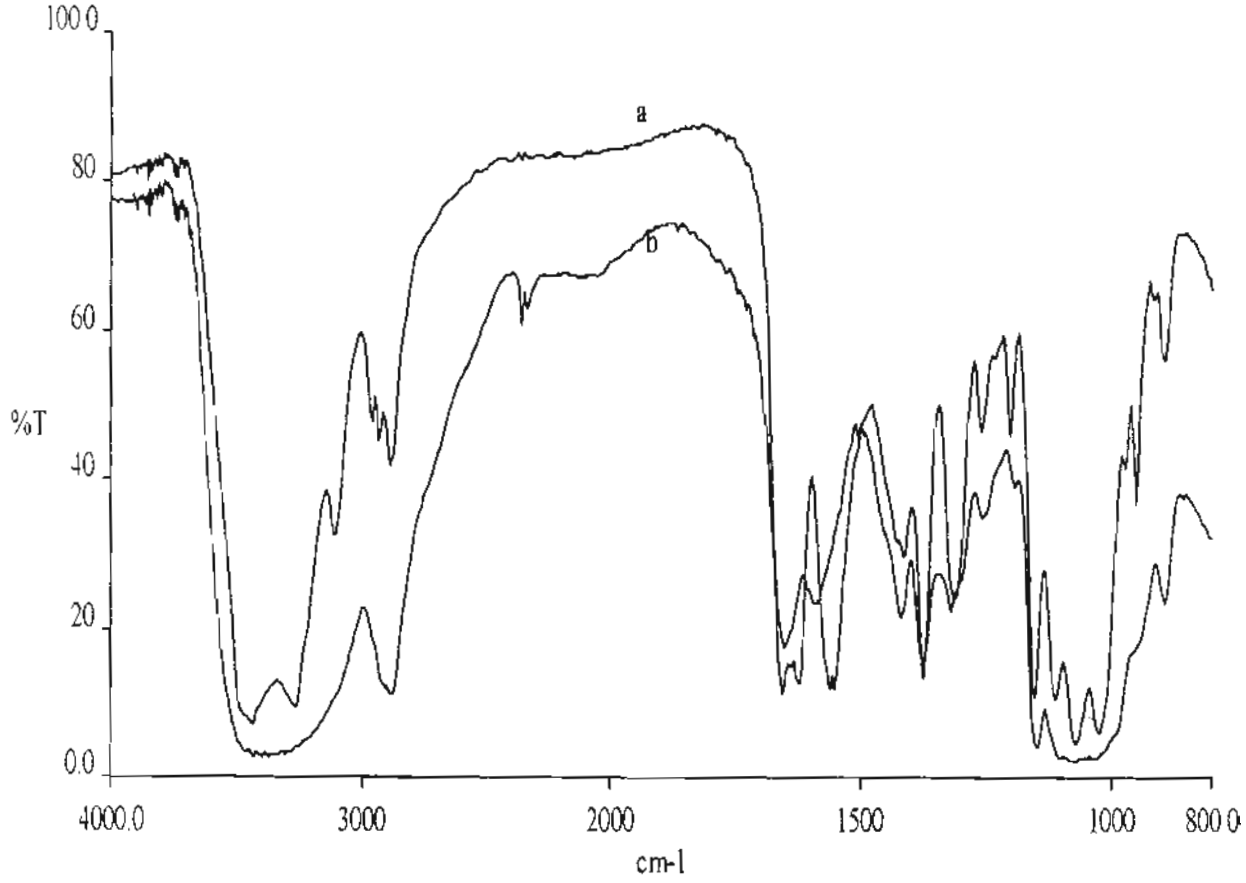


Figura VI.31. Espectros FTIR para a) quitina comercial (Sigma), b)quitosano (Fluka).

3430 (O-H y N-H), 2920 (C-H alifático), 1650 y 1620 (amida I), 1550 (amida II) y 1150-1029 (piranosa).

Grado de desacetilación

Cuando se esta considerando el análisis de quitina y quitosano debe recordarse que no es un polímero estándar con características definidas. Sin embargo en un buen número de aplicaciones el uso final impone ciertas especificaciones criticas tales como la ausencia de metales pesados, proteína residual, la cual puede ser alergénica para aplicaciones médicas. Las características frecuentemente determinadas son el grado de N-acetilación, peso molecular, contenido de humedad, cenizas, lípidos, metales pesados y color (Roberts, 1992).

La espectroscopia de infrarrojo ha sido utilizada freecuentemente para determinar el grado de N-acetilación de quitina y quitosano. El espectro de infrarrojo de α-quitina muestra dos bandas de absorción a aproximadamente 1655 y 1625 cm^{-1}, caracteristicas de hidrógeno ligado a grupos amida, con la desaparición de estas bandas durante la desacetilación, de ahi que se usen para determinar grado de N-acetilación. Al menos tres relaciones de bandas de absorción han sido utilizadas A_{1655}/ A_{3450}, A_{1550}/ A_{2878} y A_{1655}/ A_{2867}. La relación A_{1655}/ A_{3450} es al parecer la que presenta más ventajas, debido a que la banda de 3450 cm^{-1} es prominente y relativamente aislada, dos atributos de gran utilidad para el método de la línea base. El contenido de N-acetilos puede ser calculado a partir de la ecuación (Roberts, 1992).

$$\%\text{N-acetilación}=(A_{1655}/ A_{3450}) \text{ X } 115 \text{... ecuación 1.}$$

La Tabla VI 22. muestra el grado de N-acetilo de la quitina obtenida durante la fermentación láctica y tratamiento químico subsecuente sí como estándares comerciales. Los porcentajes de desacetilación obtenidos con las quitinas producidas con respecto a las comerciales se encuentran aproximadas.

Tabla VI.22. Grado de N-acetilación de acuerdo a la relación de absorbencias A_{1655}/ A_{3450} de las quitinas obtenidas así como estándares comerciales.

Estándar	% de desacetilación
Quitina (Sigma C-7170)	44.10 ± 4.3
Quitosano (Fluka 22742)	107.8 ± 20.7
Quitina camarón fermentado con proceso quimico	37.60 ± 3.01
Quitina camarón sin fermentar con proceso quimico	39.4 ± 6.00

Existen diversos métodos para calcular el grado de desacetilación, el empleo de esta ecuación puede estar sujeta a errores, sin embargo da una aproximación, y para trabajo posterior sería recomendable el uso de otras técnicas para caracterizar mejor los productos tales como dicroismo circular, determinación del contenido de grupos amino y resonancia magnética nuclear (NMR).

VII. Conclusiones.

En la presente tesis se estableció un proceso de recuperación de productos de valor agregado a partir de desechos de camarón, tales como quitina, pigmentos y proteínas, con la finalidad de utilizar una fuente de contaminación ambiental.

Los métodos tradicionales de obtención de quitina involucran el uso de reactivos químicos para desproteinizar, desmineralizar y despigmentar. La desventaja de que no es posible recuperar otros compuestos por ser demasiado drásticos. Considerando la ocurrencia de los productos antes mencionados se propuso la combinación de métodos biológicos y químicos que permitieran realizar esas partes del proceso y además obtener proteínas y pigmentos.

La primera parte de este trabajo consistió en establecer las condiciones óptimas de la fermentación mediante selección de iniciadores lácticos, siendo *Lactobacillus sp.* (Cepa B2) y *Lactobacillus pentosus* los microorganismos que disminuyeron más rápidamente el pH; sin embargo fueron determinadas bajas concentraciones de ácido acético por lo que se eligió B2 para el resto del estudio. Posteriormente se variaron las concentraciones de fuente de carbono e iniciador, las condiciones óptimas determinadas para la fermentación láctica de camarón fueron 10% de glucosa y 5% de inóculo.

La acidificación natural del desecho de camarón fue más lenta que aquella obtenida con inóculo, es decir la velocidad de acidificación fue mayor a medida que se incrementó la cantidad de iniciador.

La fuente de carbono presentó un marcado efecto sobre la fermentación y conservación del desecho. El patrón fermentativo fue establecido como homoláctico, lo cual permitió estabilizar el desecho.

La fermentación produjo una reducción inicial de enterobacterias, pero esta aumento después de 24 horas, mientras que las cuentas de bacterias lácticas se mantuvieron constantes y solo hacia el final de la fermentación descendieron.

Los resultados obtenidos de la acidificación fueron analizados mediante superficies de respuesta, para predecir los valores de acidez en función de la concentración de inóculo y glucosa. Así como se aplicó el modelo de Gompertz para evaluar el efecto de los niveles de inoculación y se estimó la velocidad de acidificación. Se determinó la correlación entre pH y acidez, con un alto porcentaje de explicabilidad del modelo matemático utilizado.

Los resultados obtenidos en esta parte del estudio permitieron establecer condiciones y predecir el comportamiento variando diferentes concentraciones de glucosa e iniciador, lo cual da bases para el escalamiento del ensilado.

En este trabajo se mostró la factibilidad en la recuperación de proteasas a partir de desechos fermentados. La ultrafiltración como técnica de separación y concentración de proteasas fue eficiente ya que se retuvo en el concentrado la mayoría de la actividad. De esta fracción se determinó peso molecular de las fracciones que presentaron actividad a pH 7, encontrándose 56.1, 28.3 y 14.3 kDa.

La quitina fue más fácil de obtener al ser parcialmente desmineralizada y desproteinizada durante la fermentación de igual forma la extracción de pigmentos se favoreció con el ensilado

La extracción de pigmentos fue realizada mediante el uso de aceite y solventes, encontrándose que en este último el rendimiento fue mayor. Mientras que para el aceite de pescado la concentración de pigmento extraido fue muy baja, sin embargo presenta la ventaja que puede ser aplicado el pigmento directamente a las dietas para peces y crustáceos. Trabajo posterior sería el

de tratar de incrementar el rendimiento mediante modificación de las proporciones desecho aceite, temperaturas y tiempos de residencia.

La quitina obtenida con los tratamientos químicos y enzimáticos presentó características similares a los productos comerciales. La adición de proteasas comerciales así como las obtenidas durante esta tesis hidrolizaron proteinas sin embargo el método químico fue más eficiente. La fermentación láctica removió proteínas y solubilizó calcio en el residuo, en 65.8 y 75.7 % respectivamente, facilitando la extracción de la quitina.

VIII. Recomendaciones para trabajo posterior

En este trabajo se mostró la factibilidad en recuperar productos a partir de un ensilado de camarón. La fermentación láctica fue hecha a escala laboratorio, uno de los pasos siguientes sería el escalamiento del proceso probando diferentes tipos de reactores de fermentación sólida, tales como sistema estático y dinámico. Un punto importante seria probar otras fuentes de carbono que fueran más económicas que la glucosa para escalar la fermentación.

La composición de la microflora de la fermentación es desconocida, seria recomendable determinar la presencia de patógenos para emplear el ensilado en alimentación humana y animal. Los mecanismos de inhibición de las bacterias lácticas no fueron determinados ya que pudo haber producción de peróxido de hidrógeno, bacteriocinas y compuestos con actividad antimicrobiana.

Con respecto a la quitina se sugiere que se prueben diferentes métodos de desacetilación para obtener quitosano, determinando la calidad de este. Una vez obtenidos ambos productos una parte de gran potencial serían las aplicaciones, ya que al menos en México el uso de estos polímeros es escaso a nulo y considerando que es posible producirlos y que son de importancia comercial en otros países se podría explorar sus usos como antimicrobianos en frutas y hortalizas, en cosméticos, tratamiento de aguas, precipitantes de proteínas, clarificantes de vinos, en textiles.

En las cabezas de camarón se han reportado una gran diversidad de enzimas que podrían ser recuperables tales como amilasas, quitinasas, hialuronidasas, por lo que sería interesante investigar el rendimiento de estas enzimas antes y después de la fermentación.

Las proteínas estudiadas podrían ser utilizadas en la elaboración de dietas para animales y humanos, así como su aplicación en saborizantes y medios de cultivo. En el caso particular de las dietas, la presencia de las enzimas antes mencionadas en caso de estar activas favorecerían el crecimiento de los animales. Además de que una porción de estas proteínas fueron hidrolizadas durante la fermentación lo que mejora la digestibilidad.

IX. REFERENCIAS

Anderson, C.G., de Pablo, N., y Ramo, C.R. (1977). Antartic krill (*Euphasia superba*) as a source of chitin and chitosan. En: Proceedings of the first international conference on chitin and chitosan. Muzarelli, R.A.A. y Pariser, E.R. (editores). M.I.T. Sea Grant Programme, Cambridge Massachusetts. P. 54-64.

Anderson, R. (1988). Food processing. Lactic acid bacteria in the production of food. Food Laboratory Newsletter No.14 :17-21.

Anónimo. Christian Hansen. Información de productos. Dinamarca.

Anónimo. (1979), Técnicas Generales para análisis microbiológico de alimentos. Secretaría de Salubridad y Asistencia . Subsecretaría de Salubridad. Dirección General de Laboratorios de Salud Pública. Pp. 78.

Anónimo. (1980). FAO, Species catalogue: Volume 1-Shrimps and Prawns of the World. Roma.

Anónimo. (1991). FAO, "Lista preliminar de especies acuáticas autóctonas cultivadas o en experimentación para su cultivo en América Latina", Circular de Pesca (FIP/C846). Diciembre.

Anónimo. (1991). NMFS, ad Ocean Garden Products, Comportamiento del mercado de camarón, Agosto-Septiembre.

Anónimo. (1992). Mexican shrimp culture. Departamento de Comercio. Servicios Oceánicos y Atmósfericos, Estados Unidos de América.

Anónimo. (1993). INFOFISH. Asia-wide shrimp agro- industry sector study. International Trade Center UNCTAD/GATT. SHRIMPS: A Survey of the world markety, p- 8.

Anónimo. (1997). Novo Enzymes. Catálogo de proteasas. Dinamarca.

Anónimo. (1997). SEMARNAP. Anuario estadistico de pesca. México.

A.O.A.C. (1980). Official Methods of Analysis. Horwitz (editor). 12th Edición. Association of Official Agricultural Cjemists, Washington, D.C.

Attwood, M.M. y Zola , H. (1967). The association between chitin and protein in some chitinous tissues. Comparative Biochemistry Physiology. 20:993.

Austin, P. R. (1988).Chitin solutions and purification of chitin. En: Methods in Enzymology. W. A. Wood y S.T. Kellogg (editores). Academic Press. Nueva York. Vol. 161 pp. 403-436.

Baranowsky, E. S., Nip, W. K. y Moy, J. H. (1984). Partial characterisation of a crude enzyme extract from the fresh water prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Journal of Food Science. 49:1494.

Barrat, A. y Montaño, R. (1986). Shrimp heads-a new source of protein. Product development pp. 15.

Benner, R.A., Miget, R., Finne, G. y Acuff, G.R. (1994). Lactic acid melanosis inhibitors to improve shelf life of brown shrimp (*Penaeus aztecus*). Journal of Food Science. 159(2):242.

Berry, T. M., Park, D. L., y Lightner, D. V. (1994). Comparison of the microbial quality of raw shrimp from China, Ecuador, or Mexico at both wholesale and retail levels Journal of Food Protection. 57 (2):150-153.

Bishop, R.H., Duncan, C.L., Evancho, G.,M. y Young, H. (1982). Estimation of fungal contamination in tomato products by a chemical assay for chitin. Journal of Food Science 47: 437-439,444.

Black, M. M y Schwartz, H. M. (1950). The estimation of chitin and chitin nitrogen in crawfish waste and derived products, Analyst, 75,185.

Borgström, G. (1961). Fish as food. Production, Biochemistry and Microbiology. Vol. I. Academic Press. Estados Unidos de América.

Bovee, J.P., Strehaiano, O., Goma, G. Sevely, Y. (1984). Alcoholic fermentation modelling based on sole substrate and product measurement. Biotechnology and Bioengineering 26:328-334.

Britton, G. y Young, A.J. (1993). Methods for the isolation and analysis of carotenoids

Bustos, O. R. y Healy, M. G. (1994a). Microbial/Enzymic deproteinisation of prawn shell waste, ICHEME Event.

Bustos, O. R. y Healy, M. G. (1994b). Microbial extraction of chitin from prawn shell waste. 6th International Conference of Chitin and Chitosan "Chitin world".

Cabib, E. y Sburlati, A. (1988). Enzymatic determination of chitin. En: Methods in Enzymology. W. A. Wood y S.T. Kellogg (editores). Academic Press. Nueva York. Vol. 161 pp. 457-486.

Campbell, F.L. (1929). The detection and estimation of insect chitin and the irrelation of chitinization to hardness and pigmentation of the cuticula of the American cockroach *Periplaneta americana*. Annual Entomology Society American. 22:401.

Cano-López, A., Simpson, B. K. y Haard, N. F. (1987). Extraction of carotenoprotein from shrimp process wastes with the aid of trypsin from Atlantic cod. Journal of Food Science. 52(2):503-506.

Cañipa Morales. A. J. (1994). Estudio sobre el aprovechamiento integral del cefalotorax del camarón. Tesis de Maestría, Facultad de Química. UNAM. México.

Carr, J.G. (1975). Lactics of the world unite. En: Lactic Acid Bacteria in Beverages and Foods. Carr J.G. Cutting C.V.y Whitting G.C. (editores). Academic Press Londres.

Chen, H. M. y Meyers, S. P. (1982a). Effect of antioxidants on stability of astaxanthin pigment in crawfish waste and oil extract. Journal of Agriculture Food Chemistry. 30:469-473.

Chen, H. M. y Meyers, S. P. (1982b). Extraction of astaxanthin pigment from crawfish waste using a soy oil process. Journal of Food Science.47:892-895,900.

Chen, H.M. y Meyers, S.P. (1983). Ensilage treatment of crawfish waste for improvement of astaxanthin pigment extraction. Journal of Food Science. 48:1516-1521.

Chen, C.S., Yan, T.R. y Chen, H.Y. (1987). Purification and properties of trypsinlike enzymes and a carboxypeptidase A from *Euphasia superba*. Journal of Food Biochemistry 21:349-366.

Cogan, T. (1985). The *Leuconostoc*: Milk products . En: Bacterial starter cultures for foods. Gilliland, S. E. (editor). CRC Press Inc. Florida.

Daeschel, M. A. (1989). Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservative. Food Technology 43(1):164-167.

Dalgaard, P., Ross, T., Kamperman, L., Neumeyer, K. y Mcmeekin, A. (1994). Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. International Journal of Food Microbiology 23:391-404.

De Silva, L.L.S.S.K. (1998). Poultry feeds prepared from fermented prawn waste silage. Tesis de Doctorado. Universidad de Loughborough, Reino Unido.

Davies, A. M. C., Dennis, C., Grant, A. , Hall, M. N. y Robertson, A. (1987). A screening of tomato puree for excessive mould content by near infrared spectroscopy: a preliminary evaluation. Journal of the Science of Food and Agriculture 39:349.

Davies, D. H. y Hayes, E. R. (1988). Determination of the degree of acetylation of chitin and chitosan. En: Methods in Enzymology. W. A. Wood y S.T. Kellogg (editores). Academic Press. Nueva York. Vol. 161 pp. 442-467.

Decker, C.D. (1975). Proteolytic activity in Pacific shrimp (*Pandalus jordani*) processing waste: distribution, effects on muscle proteins, and partial characterization. Dissertation Abstracts International 35 (7), 3379-3380.

Degnan, A. J., Kaspar, C. W., Otwell, W.S., Tamplin, M. L. y Luchansky, J. B. (1994). Evaluation of lactic acid bacterium fermentation products and food-grade chemicals to control *Listeria monocytogenes* in blue crab (*Callinectes sapidus*) meat. Applied and Environmental Microbiology 60(9):3198-3203.

De Villez, E. y Buschelen, K. (1967). Survey of a tryptic digestive enzyme in various species of crustacea. Comparative Biochemistry and Physiology 21:541-546.

Dixon, M. y Webb, E.C. (1979). Enzymes. 3ª Edición. Academic Press, Nueva York Estados Unidos.

Domard, A. y Rinaudo, M. (1983). Preparation and characterization of fully deacetylated chitosan. International Journal Biology Macromolecules 5:49.

Donald, W.W. y Mirocha, C.J. (1977). Chitin as a measure of fungal growrth in stored corn and soybean seed. Cereal Chemistry 54(3):466-474.

Donnelly, J., Stickney, D.G. y Torres, J.J. (1993). Proximate and elemental composition and enerègy content of mesopelagic crustaceans from the Eastern Gulf of Mexico. Marine Biology 115(3):469-480.

Dutta, K.S. Mukherjee, A.y Chakraborty, P. (1996). Effect of product inhibition on lactic acid fermentation: a simple modelling. Applied Microbiology and Biotechnology. 46(4): 410-413.

Dziezak, J.D. (1991). Enzymes: Catalysts for food processes. Food Technology.1:78-85.

Einarsson, H.y Lauzon, H.L. (1995). Biopreservation of brined shrimp (*Pandalus borealis*) by bacteriocins from lactic acid bacteria. Applied and Environmental Microbiology. 61(2): 669-676.

Fang, S. W., Li, C. F. y Shih, D. Y. C. (1994). Antifungal activity of chitosan and its preservative effect on low-sugar candied Kumquat. Journal of Food Protection 56(2):136.

Fik, M. (1984). Partial purification and some properties of protease from Antarctic krill. Zeitschrift-fuer-Lebensmittel Untersuchung und Forschung. 179(4):296-300

Folk, J., Piez, K., Carroll, W.R. y Gladner, J. (1960). Cobalt activation of carboxypeptidase A. Journal of Biological Chemistry 235 (1):60-63.

Folk, J. y Schrimer, S. (1963). The kinetics of carboxypeptidase B activity. II kinetic parameters of the cobalt and cadmium enzymes. Journal of Biological Chemistry 238: 3884-3890.

Fox, D. L. (1973). Chitin-bound keto-carotenoids in a crustacean carapace. Comparative Biochemistry Physiology 44B:953.

García Carreño, F. L. y Hernández Cortés, M. P. (1995). Proteasas digestivas de Langostilla. En: La Langostilla: Biología, Ecología y Aprovechamiento. Aurioles-Gamboa, D. y Balart, E. (editores.). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR) México. Pp 207-220.

García-Carreño, F. L., N. Dimes y N. Haard, (1993). Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceus proteinase inhibitors. Analytical Biochemistry, 214(1): 65-69.

Gecan, J.S., Bandler, R., y Staruszkiewicz, F. (1994). Fresh and frozen shrimp: a profile of filth, microbiological contamination, and decomposition. Journal of Food Protection 57(2):154-158.

Gildberg, A. (1988). Aspartic proteinases in fish and aquatic invertebrates. Comparative Biochemistry and Phisiology. 91B(3):425-435.

Gilliland, S. E. (1985). The *Lactobacilli*: Milk products. En: Bacterial starter cultures for foods. Gilliland, S. E. (editor) CRC Press Inc. Florida.

Giovanni, M. (1983). Response surface methodology and product optimization. Food Technology. 41-45,83.

Goodwin,T.W. y Britton, G. (1988). Distribution and analysis of carotenoids. En: Plant pigments. Academic Press. Londres pp. 362.

Guillou, A., Khalil, M. y Adambounou, L. (1995). Effects of silage preservation on astaxanthin forms and fatty acid profiles of processed shrimp (*Pandalus borealis*) waste. Aquaculture 130:351-360.

Gusek, T W. y Kinsella, J.E. (1988). Prooperties and potential applications of a unique heat-stable protease. Food Technology 42(1):102-107.

Hall, G. M. y Hill, J. A., (1990). Extraction of astaxanthin from fermented crawfish waste. Tesis de Maestría. Universidad de Loughborough, Reino Unido.

Hall, G. M., Zakaria, Z. y Reid, C. L. (1997). Recovery of value-added products from shellfish waste by a lactic acid fermentation process. En: Seafood from Producer to Consumer, Integrated Approach to Quality. Luten, J. B., Borresen, T. y Oehlenschlager (editores). Elsevier Science. pp. 97-102.

Hall, G. M. y de Silva, S. (1992). Lactic acid fermentation of shrimp (*Penaeus monodon*) waste for chitin recovery. En: Advances in Chitin and Chitosan. Brine, C. J.; Sandford, P. A. y Zikakis, J P. (editores). Elsevier Applied Sciences. Londres. pp 633-638.

Hall, G. M.; Reid, C. L. y De Silva, S. (1994). Fermentation of tropical and temperate water prawn waste with lactic acid bacteria. Proceedings 6th International Conference Chitin and Chitosan "Chitin World". Agosto. Gdynia, Polonia.

Hall, G. M. y Reid, C. L. (1994). Scale up of a lactic acid fermentation process for the recovery of chitin from prawn waste. Proceedings Asia-Pacific Chitin and chitosan Symposium. Kuala-Lumpur, Malasia.

Hameed, K. S. y Haard, N. F. (1985). Isolation and characterization of cathepsin C from atlantic short finned squid *Illex illecebrosus*. Comparative Biochemistry and Physiology. 82B (2):241-246.

Hammes, W. P. (1990). Bacterial starter cultures in Food Production. Food Biotechnology. 4 (1):383-397.

Han-Ching, L., In T., Mauguin, S. y Mescle, J.F. (1992). Application of lactic acid fermentations. En: Fish Processing Technology. G. M. Hall. (editor). Blackie Academic and Professional. Londres. 193-208.

Hansen, M.E. y Llanes, A. (1994). Applications of crustacean wastes in Biotechnology. En: Fisheries Processing: Biotechnological applications. A. M. Martin (editor) Chapman & Hall. Londres pp. 174-205.

Harris, E.L.V. y Angal, S. (1990). Protein purification applications. IRL Press. Inglaterra pp. 14-17.

Hawke, D. J., Sotolongo, S. y Millero, F. J. (1991). Uptake of Fe (II) and Mn (II) on chitin as a model organic phase. Marine chemistry 33(3):201.

Healy, M. G., Romo, C. R. y Bustos, R. (1994) Bioconversion of marine crustacean shell waste. Resources, Conservation and Recycling, 11,139-147.

Hirano, S. (1986). Chitin and chitosan. En: Ullmanns Encyclopaedia of Industrial Chemistry. Vol. A6. pp 231-232.

Hirano, S., Itakura, C., Seino, H., Akiyama, Y, Nonaka, I., Kanbara, N. y Kawakami, T. (1990). Chitosan as an ingredient for domestic animal feeds. Journal of Agriculture Food Chemistry 38:1214.

Holan, Z., Votruba, J. y Vlasáková, V. (1980). New method of chitin determination based on deacetylation and gas-liquid chromatographic assay of liberated acetic acid. Journal of Chromatography 190:67-76.

Hong, Z , Mann, P., Shaw, K.J. y Didomenico, B. (1994). Analysis of β-glucans and chitin in a *Saccaromyces cerevisiae* cell wall mutant using High-performance Liquid Chromatography. Yeast 10:1083-1092.

Horner, W.A. (1997). Preservation of fish by curing (drying, salting and smoking). En: Fish Processing Technology. G.M. Hall (editor). 2nd Edition. Blackie Academic and Professional. Inglaterra.

Hubbard, J.D., Seitz, L. M. y Ohr, H. E. (1979). Determination of hexosamines in chitin by ion-exchange chromatography. Journal of Food Science 44(5):1552-1553.

Ingram, M. (1975). The lactic acid bacteria. A broad view. En: Lactic acid bacteria in beverages and foods. Carr, J.G.; Cutting, C.V. y Whitting, G.C. (editores) Academic Press Londres.

Jarvis, B. (1977). A chemical method for the estimation of mould in tomato products. Journal of Food Technology 12:581-591.

Jiang, S.T., Woody, M. W. y Chen, H. C. (1991). Purification and characterisation of proteases from digestive tract of grass shrimp (*Penaeus monodon*). Journal of Food Science. 56(2):322-326.

Kandler, D. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. Anton Van Leeuwenhoek 49:209-224.

Kawamura, Y., Nishimura, K., Igarashi, S., Doi, E. y Yonezawa, D. (1981). Characteristics of autolysis of Antarctic krill. Agricultural Biological Chemistry 45(1): 93-100.

Kawamura, Y., Nishimura, K., Matoba, T., y Yonezawa, D. (1984). Effects of protease inhibitors on the autolysis and protease activities of Antarctic krill. Agricultural and Biological Chemistry. 48(4):923-930.

Kelly, C.E. y Harmon, A.W. (1972). Method of determining carotenoid contents of Alaska pink shrimp and representative values for several shrimps products. Fishering Bulletin. 70(1):111-113.

Kim, C.R., Hearnsberger, J.O. y Eun, J.B. (1995). Gram negative bacteria in refrigerated catfish filets treated with lactic culture and lactic acid. Journal of Food Protection. 58(6): 639-643.

Kim, S. S., Kim, H. S. y Moo Lee. (1996). Preparation, characterization, and properties of β-Chitin and N-acetylated β-Chitin. Journal of Polymer Science: Part B: polymer Physics. 34: 2367-2374.

Knorr, D. (1984). Use of chitinous polymers in food. Food Technology 38(1):85.

Knorr, D. (1991). Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. Food Technology. 38: 85-97.

Kunitz, M. (1947). Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. Journal of General Physiology. 30:291-310.

Kurita, K., Ishii, S., Tomita, K., Nishimura, S. y Shimoda, K. (1994). Reactivity characteristics of squid β-Chitin as compared with those of shrimp chitin: High potentials of squid chitin as a starting material for facile chemical modifications. Journal of Polymer Science. Part A: Polymer Chemistry. 32: 1027-1032.

Law, B.A. y Kolstad, J. (1983). Proteolytic systems in lactic acid bacteria. Antonie van Leewenhoek. 49:225-245.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227:680-685.

Le Gal, Y., Durand, P. y Batista, I. (1995). Upgrading of industrially available fish and crustacean wastes. Final Report for the European Communities Commission. Contract no. UP-3-654.

Lin, H.H. y Cousin, M.A. (1985). Detection of mold in processed foods by High Performance Liquid Chromatography. Journal of Food Protection. 48(8):671-678.

Lindner, P., Angel, S., Zvi, G., Weinberg y Granit R. (1988). Factors inducing mushiness in stored prawns. Food Chemistry 29:119-132.

Lovell, R. T., Lafleur, J. R. y Hoskins, F. H. (1968). Nutritional value of freshwater crayfish waste meal. Journal of Agriculture Food Chemistry. 16:204.

Lucke, F. y Brummer, J. M. (1990). Starter culture development. En: Processing and Quality of Foods. Vol.2. Zeuthen, P.; Cheftel, J.C. (editores). Elsevier Applied Science. Londres.

Madhavan, P.y Ramachandran, K.G. (1974). Utilization of prawn waste isolation of chitin and its conversion to chitosan. Fishery Technology IX (1):50.

Marshall, V. M. E. (1984). The phisiology and growth of dairy lactic acid bacteria. En: Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milks. Davies, F L. y Law, B. A. (editores). Elsevier Applied Science Publishing Barking. Londres

Martin, R. E. (1979). Krill as a protein source-Methods of recovery, potential uses, and problems. Food Technology. 33(9):46-51.

McKay, G., Blair, H.S. y Grant, S. (1987). Desorption of copper from copper-chitosan complex. Journal Chemistry Technology Biotechnology 40(1):63.

Meraz, M., Shirai, K., Larralde, P., y Revah, S. (1992). Studies on the bacterial acidification process of cassava (*Manihot esculenta*)Journal of Science Food and Agriculture. 60:457-463.

Meyers, S.P., Rutledge, y Sonu, S.C. (1973).Variability in proximate analysis of different processed shrimp meals. Feedstuffs. 45(47):34-35.

Meyers, S. P. y Bligh, D. (1981). Characterization of astaxanthin pigments from heat processed crawfish waste. Journal of Agriculture Food Chemistry. 29:505-508.

Meyers, S. P. (1986). Utilisation of shrimp processing wastes. INFOFISH MARKETING DIGEST. 4:18-19.

Miller, G.M. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Analytical Chemistry. 31:426-428.

Mima, S., Miya, M., Iwamoto, R. y Yoshikawa, S. (1983). Highly deacetylated chitosan and its properties. Journal of Applied Polymer Science. 28:1909.

Moisio, T. y Heikonen, M. (1994). Lactic acid fermentation in silage preserved with formic acid. Animal Feed Science and Technology 47:107-124.

Moon, N J., Beuchat, L.R., Kinkaid, D T. y Hays, E.R. (1982). Evaluation of lactic acid bacteria for extending shelf life of shrimp. Journal of Food Science 47(3):897-900.

Muriana, F. J. G , Ruíz-Gutiérrez, V., Gallardo-Guerrero, L. y Minguez-Mosquera, M. I. (1993). A study of the lipids and carotenoprotein in the prawn, *Penaeus japonicus*. Journal of Biochemistry. 114:223-229.

Muzzarelli, R. A. (1977). Chitin. Primera Edición. Ed. Pergamon Press Gran Bretaña. pp 309.

New, M .B. (1990). Freshwater prawn culture: a review. Aquaculture 88:99-143.

Nickelson II, R , Finne, G., Hanna, M.O. y Vanderzant, C. (1980). Minced fish flesh from nontraditional Gulf of Mexico Finfish species:Bacteriology. Journal of Food Science 45:1321-1329, 1340.

Nishimura, K., Kawamura, Y., Matoba, T., y Yonezawa, D. (1983). Agriculture Biological Chemistry 47(11):2577-2583.

No, H. K , Meyers, S. P. y Lee, K. S. (1989). Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste. Journal of Agriculture Food Chemistry. 37(3):575-579

O'Brien, J.J. y Skinner, D.M. (1987). Characterization of enzymes that degrade crab exoskeleton: I. Two alkaline cysteine proteinase activities. The Journal of Experimental Zoology. 243:389-400.

O'Brien, J.J. y Skinner, D.M. (1988). Characterization of enzymes that degrade crab exoskeleton: II. Two acid proteinase activities. The Journal of Experimental Zoology. 246:124-131.

Ockerman, H.W. (1992). Fishery by-products. En: Fish Processing Technology. G.M. Hall (editor). Blackie Academic & Professional Londres. pp 155-199.

Ofenbeher, M. I., Stanimirovic, D. y Stanimirovic, S. (1984). On determination of chitin content in mushrooms. Quality Plant. Plant Foods Human Nutrition. 34:197.

Omara-Alwala, T., Chen, H. M. , Ito, Y., Simpson, K. L. y Meyers, S. P. (1985). Carotenoid pigment and fatty acid analyses of crawfish oil extracts. Journal of Agricultural Food Chemistry. 33:260-263.

Orla-Jensen. (1919). En: Lactic Acid Bacteria in Beverages and Foods. Carr J.G. Cutting C.V.y Whitting G.C. (editores). Academic Press Londres.

Pearson, D. (1976). The Chemical Analysis of Foo. 7th edition, Churchill Livingston, United Kingdom.

Pearson, D. (1981). Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos. Editorial Acribia, España pp. 331.

Pelczar,M.J. , Chan, E.C.S. y Krieg, N.R. (1977). Elementos de Microbiología. Mc Graw-Hill, Inc. México. 745 páginas.

Peterson, G.L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. Analytical Biochemistry 83:346-356.

Radhakrishnan, A. G. y Prabhu, P.V. (1971). Chitosan from prawn waste. Research and Industry (India) 16:205.

Ramachandran, N.K.G. y Madhavan, P. (1975). On deacetylation of chitin-I. Proceedings of Symposium "Fish Processing Industry in India" C. F. T. R. I. Mysore, India.

Ramachandran, N.K.G.; Madhavan, P. y Gopakumar, K. (1986). Novel use of chitinous waste from crustacean processing plants. INFOFISH MARKETING DIGEST.4:

Ramachandran, K. G., Mathew, P. T., Madhavan, P. y Prabhu, P.V. (1987). Chitin as a feed additive for broiler chicken. Indian Journal of Poultry Science 22(1): 40.

Ratkowsky, D A. (1983). Nonlinear Regression Modeling. Ed. Marcel Dekker Inc. 275 pp. Estados Unidos

Reeves, P. (1972). The bacteriocins. Kleinzeller, A. (editor). Wittmann 142 pp . Berlin.

Ride, J.P. y Drysdale, R.B. (1972). A rapid method for the chemical estimation of filamentous fungi in plant tissue. Physiology Plant Pathology 2:7.

Roberts, L. A. F. (1992). Analysis of chitin and chitosan. En: Chitin Chemistry. Roberts, L. A. F. (editor) MacMillan Press, Londres. pp 85-94.

Rogosa, M., Mitchell, J.A. y Wiseman, R.F. (1951). A selective medium for the isolation and enumeration of oral and faecal lactobacilli. Journal of Bacteriology 62:132.

Sannan, T., Kurita, K., Ogura, K. e Iwamura, Y. (1978). Studies on chitin: IR spectroscopic determination of degree of deacetylation. Polymer 19:458.

SAS Institute. (1989). SAS User's Guide: Statistics. SAS Institute Inc., Cary, N.C.

Saucedo-Castañeda, G. y Gómez, J. (1989). The effect of glucose and ammonium sulfate on kinetic acidification by heterogeneous mixed culture. Biotechnology Letters 11(2):121-124.

Saucedo-Castañeda, G., González, P. B., Revah, S. M., Viniegra, G. C. y Raimbault, M. (1990). Effect of *Lactobacilli* inoculation on cassava (*Manihot esculenta*) silage: fermentation pattern and kinetic analysis. Journal of the Science Food Agriculture. 50:467-477.

Scopes, R. (1994). Protein purification principles and practice. 3ª Edición Springer Verlag. Nueva York.

Schleifer, K. H. (1987). Recent changes in the Taxonomy of lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews 46: 201 -203.

Schoemaker, R. (1991). Shrimp waste utilisation. INFOFISH Technical Handbook series. Canada. pp 20.

Schutz, (1983). Multiple regression approach to optimization. Food Technology 46-48,62.

Shahidi, F. y Synowiecki, J. (1991). Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chinoecetes opilio)* and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards. Journal of Agriculture Food and Chemistry 39:1527-1532.

Shimahara,K., Ohkouchi,K., e Ikeda,M. (1982). A new isolation method of crustacean chitin using proteolytic bacterium *Pseudomonas maltophila.* En: Proceedings 2nd International Conference Japan Societry Chitin and Chitosan. S. Hirano y S.Tokura (editores), Sapporo, pp. 10-14.

Shimahara, K. y Takiguchi, Y. (1988). Preparation of crustacean chitin. En: Methods in Enzymology, Vol. 161. W.A. Wood y S. T. Kellogg (editores)Academic Press Nueva York pp. 417-443.

Shirai, K, Guerrero, I. Saucedo, G., Rodriguez, G., Huerta, S. y Hall, G. M. (1997). Aspects of protein breakdown during the lactic acid fermentation on prawn wastes. In: *Advances in Chitin Science*. Eds. Domard, A., Roberts, G.A.F. and Varum, K.M. Jaques Andre Publisher. 2:56-63.

Shirai, K. Guerrero-Legarreta, I. y Hall, G. M. (1996a). La quitina: ocurrencia, propiedades y aplicaciones. Ciencia. 47(4):317-328.

Shirai, K. Guerrero-Legarreta, I. y Lara-Calderón, P. (1996b). Bacterias lácticas en alimentos fermentados. Ciencia. 47(5):125-137.

Silliker, J.H., Elliot, R.P., Baird-Parker, A.C., Bryan, F.L., Christian, J.H.B., Clark, D.S., Olson, J.C. y Roberts, T.A. (1980). Microbial Ecology of Foods. Volumen II. Editorial Academic Press. Estados Unidos. 589-592.

Simpson, B. K. y Haard, N.F. (1985). The use of proteolytic enzymes to extract the carotenoproteins from shrimp wastes. Journal of Applied Biochermistry.. 7:212-222.

Simpson, B.K., Simpson, M. V. y Haard, N.F. (1989). On the mechanism of enzyme action: Digestive proteases from selected marine organisms. Biotechnology and Applied Biochemistry 11:226-234.

Simpson, B.K., Gagne, N. y Simpson, M. V. (1994). Bioprocessing of chitin and chitosan. En: Fisheries processing: Biotechnological applications. A. M. Martin (editor) Chapman & Hall. Londres. pp 155-173.

Sneath P.H.A., Mair, N.S. y Sharpe, M.S. (1986). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2 . Eds..Williams and Wilkins, Baltimore USA.

Torrissen, O., Tidemann, E. Hansen, F. y Raa, J. (1981/1982). Ensiling in acid- A method to stabilize astaxanthin in shrimp processing by-products and improve uptake of this pigment by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Aquaculture 26:77-83.

Tsuji, A., Kinoshita, T. y Hoshino, M. 1969. Analytical chemical studies on amino sugars. II) Determination of hexosamines using 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone hydrochloride. Chemical Pharmacology Bulletin 17(7):1505-1510.

Tuppy, H., Wisbauer, W. y Wintersberger, E. (1962). Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 329:278.

Van Ornum, J. (1992). Shrimp waste-must it be wasted?. INFOFISH International. 6:48-52.

Van Wyk, H. y 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.

Vega-Villasante, F., Nolasco, H. y Civera, R. (1993). The digestive enzymes of the Pacific brown shrimp *Penaeus californiensis*. 1. Properties of amylase activity in the whole digestive tract. Comp. Biochem. Physiol. 106B:547-550.

Vega-Villasante, F., Nolasco, H. y Civera, R. (1995). The digestive enzymes of the Pacific brown shrimp *Penaeus californiensis*. 2. Properties of protease activity in the

whole digestive tract. Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry and Molecular Biology 112B(1):123-129.

Watkins, Adair, y Oldfield. (1982). Evaluation of shrimp and king crab processing by-products as feed supplements for mink. Journal of Animal Science. 55(3):1303-1308.

Wieckowska, E. (1968). Determination of chitin on the basis of glucosamine content. Chemistry Analytical 13: 1311.

Wu, L.C. y Stahmann. (1975). Chromatographic estimation of fungal mass in plant materials. Phytopathology 65:1032.

Zakaria, Z., Shama, G.M. y Hall, G.M. (1995). Comunicación personal. Universidad de Loughborough, Reino Unido.

Zakaria, Z. (1997). Lactic acid purification of chitin from prawn waste using a horizontal rotating bioreactor. Tesis de Doctorado. Universidad de Loughborough. Reino Unido.

Zakaria, Z., Hall, G.M. y Shama, G.M. (1998). Lactic acid fermentation of scampi waste in a rotating horizontal bioreactor for chitin recovery. Process Biochemistry. 33(1):1-6.

APENDICE I.

1. Determinación de la concentración de microorganismos en el cultivo iniciador.

Curva de densidad óptica, ufc/ml y peso seco

La ley de Beer, dice que la absorbencia es proporcional a la concentración y en suspensiones diluidas, la mayoría de las bacterias tienen la misma absorbencia por unidad de peso seco, independientemente del tamaño celular (Dalgaard y col., 1994). De acuerdo a lo anterior se procedió a diluir el cultivo con la máxima densidad óptica, determinando cuenta viable(ufc/ml), absorbencia (540 nm) y peso seco (g/l), con la finalidad de determinar células viables y no viables de *Lactobacillus sp.* (Cepa B2) en medio APT.

La máxima densidad óptica fue de 2.0, determinada a una longitud de onda de 540 nm, se determinó la concentración de ácido láctico por HPLC siendo de 4.8 g/l, la cual pudo ser inhibitoria para el microorganismo, ya que no fue posible obtener un aumento en la concentración de microorganismos. En la Figura AI1 y en la Tabla AI1 se presenta la curva de densidad óptica y la ecuación de la regresión respectivamente. De esta forma fue posible conocer el tamaño de inoculo utilizado, en microorganismos viables y biomasa (peso seco).

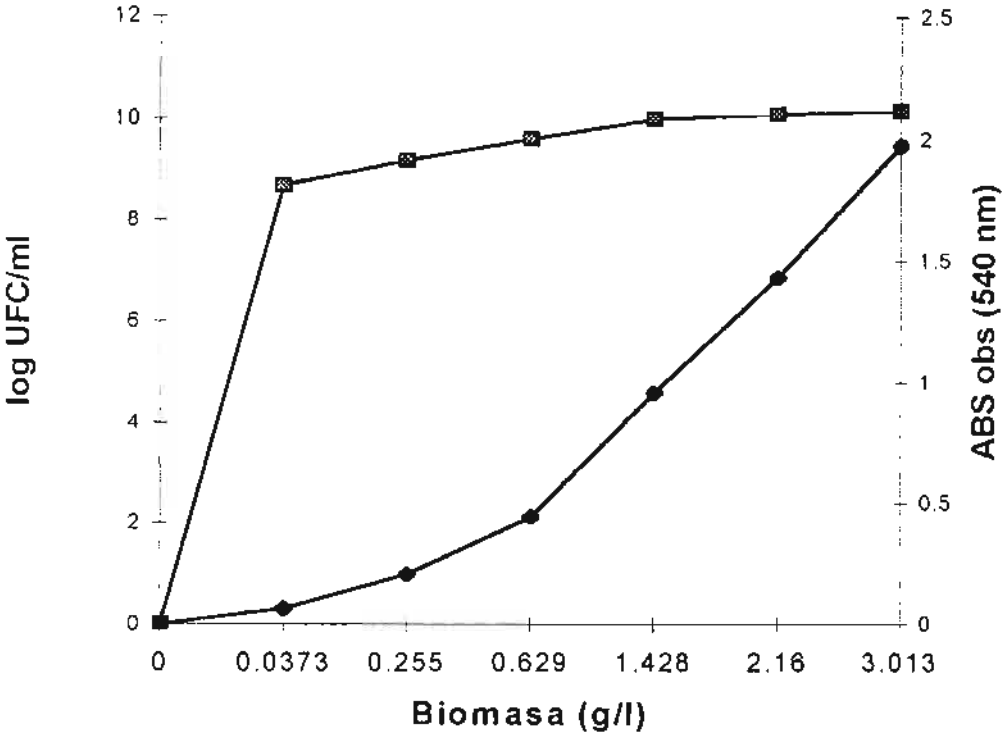


Figura AI1. Logaritmo de cuenta viable y cambios de absorbencia (540 nm) de *Lactobacillus sp.* (B2) en medio APT a 30°C

Tabla AI1. Ecuación de la curva de densidad óptica (D.O.) contra peso seco (g/l).

Coeficiente De correlación	Ordenada al origen	Pendiente	Ecuación
0 987051	0.041839174	-0.641622517	D.O.=-0.6416(PesoSeco) + 0.04184

2. Determinación de proteína

Método Lowry-Peterson (1977).

Reactivos empleados

a) Solución de carbonato de sodio tartrato de potasio

Se disuelven lentamente en 250 ml de agua destilada: 25 g de carbonato de sodio, 0 25 g de sulfato de cobre pentahidratado, 0.5 g de tartrato de sodio y potasio (Fisons, Loughborough, Reino Unido).

b) Solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) (Fisons, Loughborough, Reino Unido).

Se disuelve 25 g de SDS en 250 ml de agua destilada.

c) Solución de hidróxido de sodio

Se disuelve 8 g de NaOH (Fisons, Loughborough, Reino Unido) en 250 ml de agua destilada.

Reactivo A

Se mezclan volúmenes las soluciones a, b y c, aforándose con agua destilada a 1 l.

Nota: Se recomienda conservar el reactivo A en refrigeración. Al momento de usarse calentarlo a 25-30°C, hasta que observe que el SDS esta en solución nuevamente.

Reactivo B

Se prepara diluyendo 1:1 del reactivo fenol Folin-Ciocaltieu (Fisons, Loughborough, Reino Unido) con agua destilada, se conserva en obscuridad.

Procedimiento

1.- 1.25 mg de seroalbúmina bovina (Sigma San Luis Estados Unidos) se disuelve en 250 ml de agua destilada para preparar una solución 100 μg/ml.

2.- Se diluye con agua destilada para preparar una serie de muestras con diferentes concentraciones de 0 hasta 100 μg/ml.

3.- 1 ml de reactivo A se adiciona a 1 ml de las muestras preparadas de acuerdo al punto 2. Se mezclan y se incuban a 30°C 10 minutos.

4.- 0 5 ml de reactivo B se adiciona y se agita, incubándose a 30° C 30 minutos.

5.- Se determina absorbencia a 750 nm en un espectrofotómetro.

La Figura AI2 se muestra la curva estándar obtenida con el método anterior, con un coeficiente de correlación de 1.0

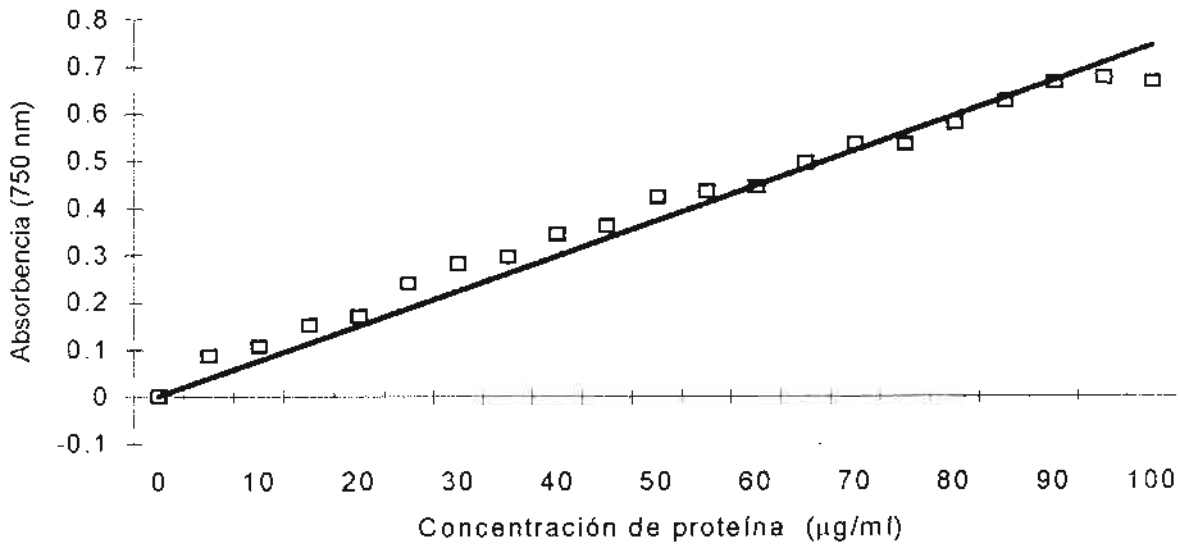


Figura AI2. Curva estándar de seroalbúmina bovina analizada por el método de Lowry-Peterson (1977).

APENDICE II.

FERMENTACION LACTICA.

1. Análisis de varianza para determinar concentración de glucosa y nivel de inoculación.

Tabla AII1. Análisis de varianza del modelo para explicar la producción de ácido (ATT) de ensilados fermentados de camarón.

Fuentes de variación: glucosa (5, 7.5, 10 y 15% p/p), inóculo (0, 5, 10 y 20% v/p) y tiempo (0,4,8, 24 y 48 horas) (SAS, 1989).

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medio	Pr>F
Modelo	78	112.59	1.443	0.0001
Error	241	3.401	0.0141	
Total corregido	319	115.989		

R-Cuadrada	Coeficiente de variación	Media del error (MSE)	Media ATT
0.971	22.55	0.119	0.527

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrada	Pr>F
Glucosa	3	13.820	4.608	0.0001
Inóculo	3	6.217	2.072	0.0001
Tiempo	4	50.075	12.519	0.0001
Glucosa*inóculo	9	5.262	0.585	0.0001
Glucosa* tiempo	12	25.619	2.135	0.0001
Inóculo*tiempo	12	2.370	0.197	0.0001
Glucosa*inóculo*tiempo	35	9.218	0.263	0.0001

2. Curvas estándar de glucosa, etanol, ácidos lactico y acético determinados por HPLC.

Se realizaron curvas estándar de glucosa, etanol, ácido acético y ácido láctico; en rangos de concentración de 0 a 6 g/l por HPLC en las condiciones descritas en metodología. La regresión de estas curvas estándar se muestra en la Tabla AII2.

Tabla AII2. Ecuaciones de las curvas estándares de glucosa, ácido láctico, acético y etanol por HPLC.

Compuesto (Tiempo de retención TR)	Coeficiente de correlación	Ordenada al origen	Pendiente	Ecuación
Glucosa (11.3-11.533)	1 0	-3.226854	228435.9	Area=228435.9 (glucosa g/l) - 3.226854
Ácido Láctico (15 813 – 15.841)	0.999973	699.23	147693.5	Area=147693.5(ácido láctico g/l) + 699 23
Acido Acético (18.154 – 18.173)	0.9999947	-84.1719	85008.10	Area=85008.1 (ácido acético g/l) –84.1719
Etanol (24.660 – 24.693)	0.9974956	-1440.06	68176.61	Area= 68176.61 (etanol g/l) - 1440.06

APENDICE III.

Recuperación de proteínas. Purificación parcial de proteasas.

1. Análisis de varianza para la selección de la membrana empleada para ultrafiltración.

Tabla AIII1. Análisis de varianza del modelo para elegir la membrana de ultrafiltración con mayor retención de proteasas, es decir, retenidos con actividad en hemoglobina pH 2. Membranas con diferentes cortes moleculares: 2, 10, 50 y 300 kDa (SAS, 1989).

Fuente	Grados De Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medio	Pr>F
Modelo	3	50.11	16.70	0.0001
Error	20	2.82	0.1413	
Total corregido	23	52.94		

R-Cuadrada	Coeficiente de variación	Media del error (MSE)	Media Actividad Específica
0.947	10.014	0.376	3.753

Fuente	Grados De libertad	Suma De Cuadrados	Media Cuadrada	Pr>F
Membrana	3	50.113	16.70	0.0001

Tabla AIII2. Pruebas de Duncan, comparación de medias de actividad específica en membranas de ultrafiltración, retenidos con actividad en hemoglobina pH 2. (SAS, 1989).

Grupos de Duncan	Media	Tipo de membrana (kDa)
A	5.703	50
B	4.137	300
C	3.503	10
D	1.670	2

Medias con la misma letra indican que no son significativamente diferentes

Tabla AIII3. Análisis de varianza del modelo para elegir la membrana de ultrafiltración. Permeados con actividad en hemoglobina pH 2. Membranas con diferentes cortes moleculares: 2, 10, 50 y 300 kDa (SAS, 1989).

Fuente	Grados De Libertad	Suma De Cuadrados	Cuadrados medio	Pr>F
Modelo	3	18.005	6.002	0.0001
Error	20	0.684	0.0342	
Total corregido	23	18.70		

R-Cuadrada	Coeficiente de variación	Media del error (MSE)	Media Actividad Específica
	11.155	0.185	1.66

Fuente	Grados De libertad	Suma De Cuadrados	Media Cuadrada	Pr>F
Membrana	3	18.0056	6.002	0.0001

Tabla AIII4. Pruebas de Duncan, comparación de medias de actividad específica en membranas de ultrafiltración, permeados con actividad en hemoglobina pH 2. (SAS, 1989).

Grupos de Duncan	Media	Tipo de membrana (kDa)
A	2.687	300
B	2.345	50
C	0.827	10
C	0.775	2

Medias con la misma letra indican que no son significativamente diferentes

Tabla AIII5. Análisis de varianza del modelo para elegir la membrana de ultrafiltración con mayor retención de proteasas, es decir, retenidos con actividad en caseína pH 7. Membranas con diferentes cortes moleculares: 2, 10, 50 y 300 kDa (SAS, 1989).

Fuente	Grados De Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medio	Pr>F
Modelo	3	3748.37	1249.46	0.0001
Error	20	923.42	46.17	
Total corregido	23	4671.8		

R-Cuadrada	Coeficiente de variación	Media del error (MSE)	Media Actividad Específica
0.802340	19.32	6.795	35.17

Fuente	Grados De libertad	Suma De Cuadrados	Media Cuadrada	Pr>F
Membrana	3	3748.373033	1249.46	0.0001

Tabla AIII6. Pruebas de Duncan, comparación de medias de actividad específica en membranas de ultrafiltración, retenidos con actividad en caseína pH 7. (SAS, 1989).

Grupos de Duncan	Media	Tipo de membrana (kDa)
A	46.528	10
A	40.083	50
A	40.05	2
B	14.01	300

Medias con la misma letra indican que no son significativamente diferentes

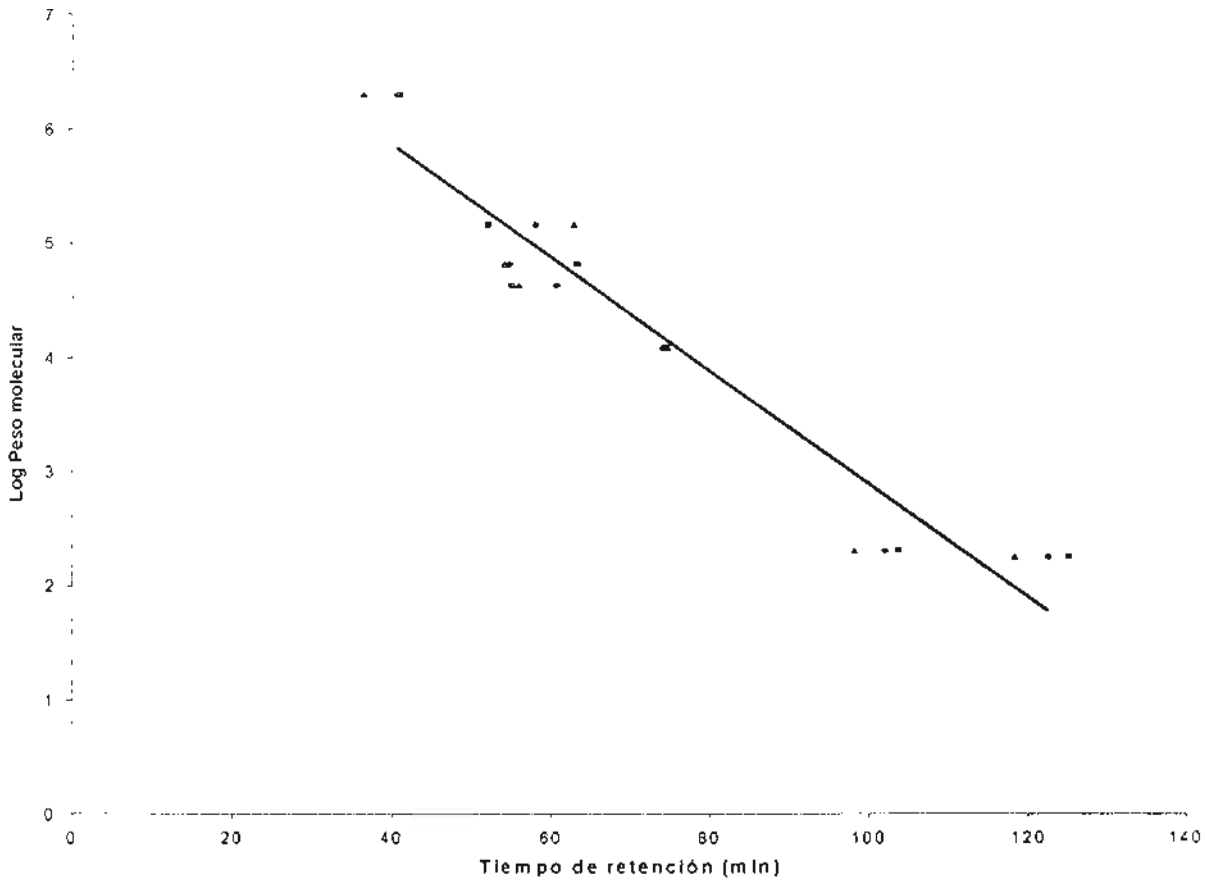


Figura AIII1. Curva de calibración para determinación de peso molecular por cromatografía de filtración en gel.

Tabla AIII7. Análisis de varianza del modelo para elegir la membrana de ultrafiltración. Permeados con actividad en caseína pH 7. Membranas con diferentes cortes moleculares: 2, 10, 50 y 300 kDa (SAS, 1989).

Fuente	Grados De Libertad	Suma De Cuadrados	Cuadrados medio	Pr>F
Modelo	3	29.82	9.94	0.0001
Error	20	1.79	0.089	
Total corregido	23	31.60		

R-Cuadrada	Coeficiente de variación	Media del error (MSE)	Media Actividad Específica
0.943346	9.82	0.299	3.046

Fuente	Grados De libertad	Suma De Cuadrados	Media Cuadrada	Pr>F
Membrana	3	29.818	9.94	0.0001

Tabla AIII8. Pruebas de Duncan, comparación de medias de actividad específica en membranas de ultrafiltración, permeados con actividad en caseína pH 7. (SAS, 1989).

Grupos de Duncan	Media	Tipo de membrana (kDa)
A	4.483	300
B	3.707	50
C	2.360	10
D	1.633	2

Medias con la misma letra indican que no son significativamente diferentes

2. Determinación de peso molecular por filtración en gel en cromatografía de baja resolución.

Para la determinación del peso molecular de las fracciones obtenidas de la ultrafiltración así como la inicial (Sección V.2.1.), se utilizaron estándares de peso molecular conocido los cuales se listan en la Tabla AIII1.

Los estándares fueron separados en la columna y los tiempos de retención obtenidos fueron graficados. El coeficiente de correlación obtenido mostró un adecuado ajuste de los datos experimentales al modelo lineal. Esta curva fue empleada para determinar el peso molecular de las fracciones con actividad proteolítica obtenidas.

Tabla AIII9. Proteínas con peso molecular conocido utilizadas para la curva de calibración mediante cromatografía de filtración en gel.

NOMBRE DEL MARCADOR	PESO MOLECULAR (DALTONS)	TIEMPO DE RETENCION (T_R) MINUTOS	VOLUMEN DE RETENCION (V_R) Ml
Azul Dextran	2,000,000	36.56	22.0
Lactato deshidrogenasa	145,900	62.93	37.6
Albúmina bovina sérica	66,000	54.14	32.48
Ovoalbúmina	42,700	55.92	33.55
Citocromo C	12,300	74.67	44.80
Triptofano	204.23	98.21	58.93
Tirosina	181.19	118.30	70.98

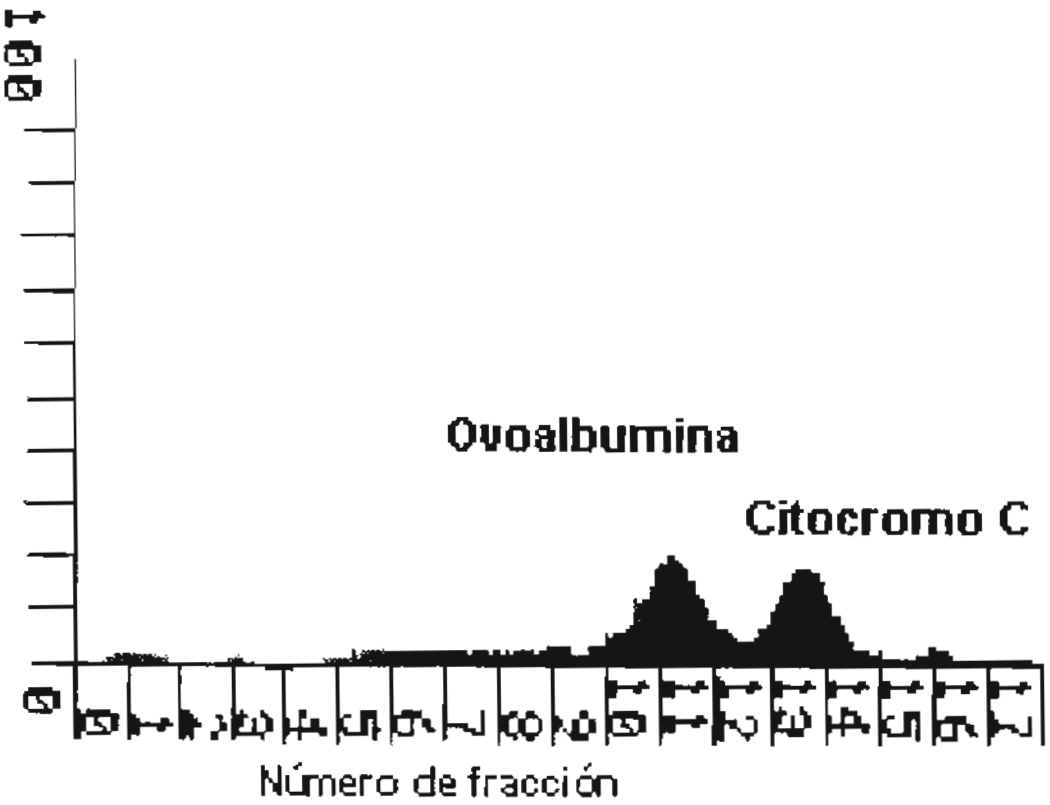


Figura AIII.2. Cromatograma de ovoalbumina y citocromo C, tiempos de retención (min) de 58.95 y 74.67 respectivamente.

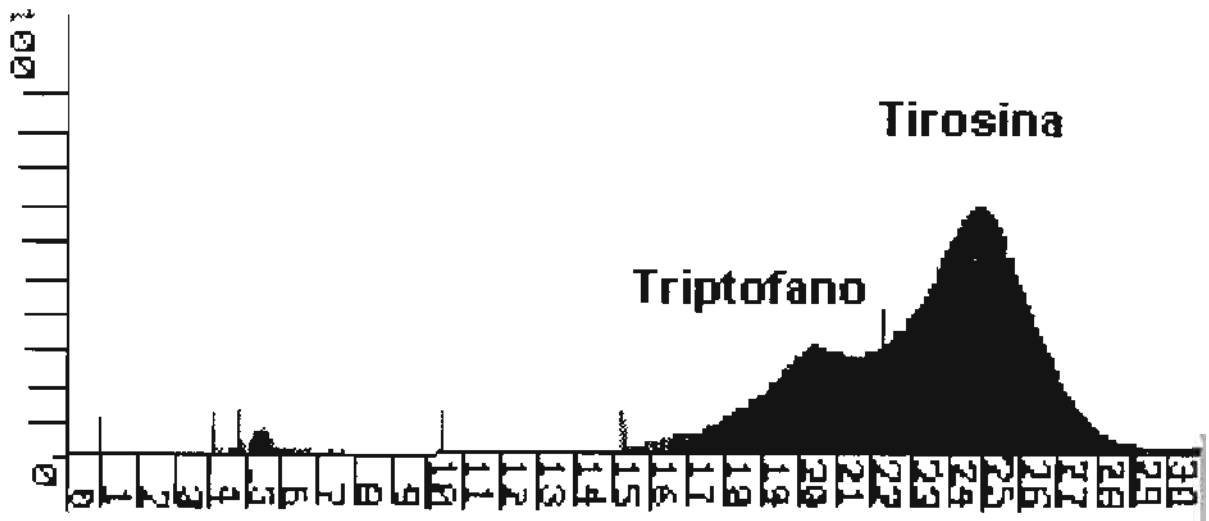


Figura AIII.3. Cromatograma de triptofano y tirosina, tiempos de retención (min) de 101 y 122 respectivamente.

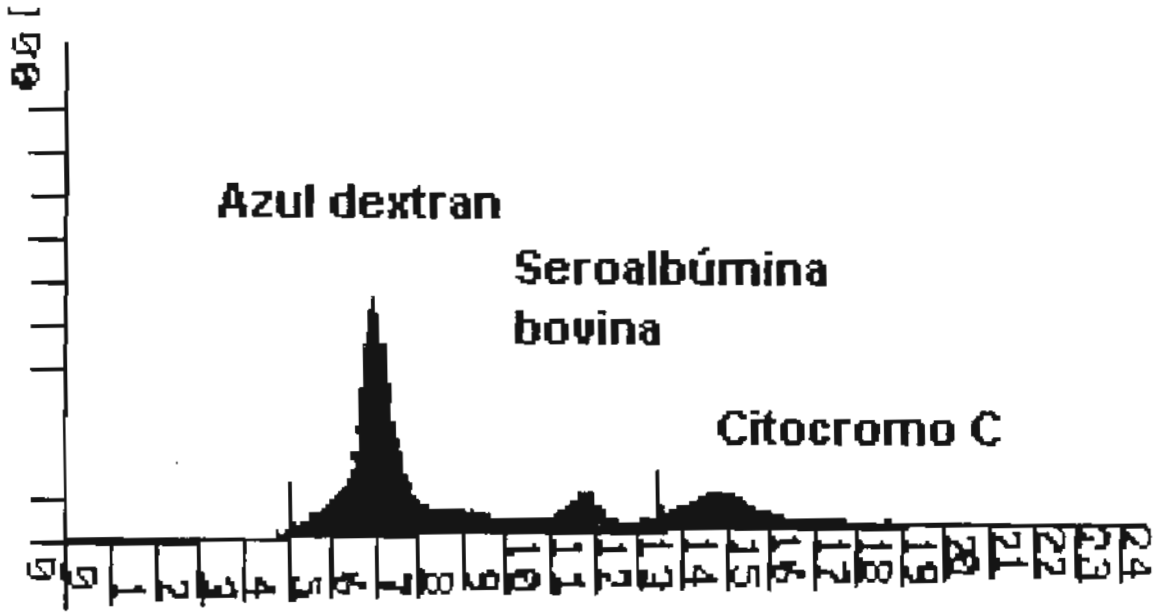


Figura AIII.4. Cromatograma de azul dextran, seroalbúmina bovina y citocromo C, tiempos de retención (min) de 36.56, 54.14 y 74.67 respectivamente.

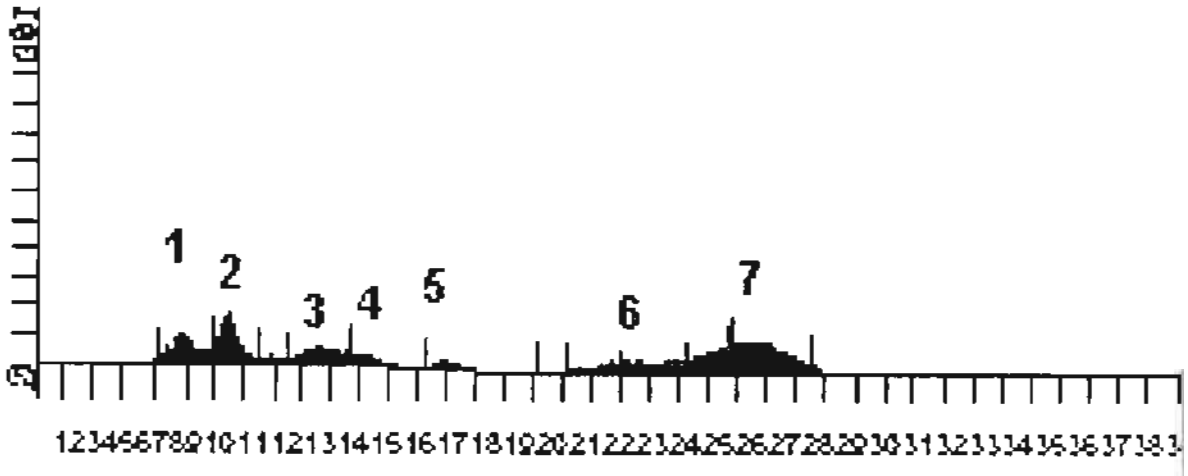


Figura AIII.5. Cromatograma de Azul dextran (1), Lactato deshidrogenasa (2), Seroalbúmina bovina (3), Ovoalbúmina (4), Citocromo C (5), Triptofano (6) y Tirosina (7), tiempos de retención (min) de 35, 62, 54.60, 55.03, 74, 101 y 122 respectivamente.

APENDICE IV.

1. Extracción de pigmentos

Tabla AIV1. Análisis de varianza del modelo comparando solventes para la extracción de pigmentos en muestras fermentadas y sin fermentar, variable de respuesta concentración de pigmento. (SAS, 1989).

Fuente	Grados De Libertad	Suma De Cuadrados	Cuadrados medio	Pr>F
Modelo	3	9202.61	3067.54	0.0001
Error	24	2996.45	124.85	
Total corregido	27	12199.06		

R-Cuadrada	Coeficiente de variación	Media del error (MSE)	Concentración de pigmento
0.754370	10.28	11.17	108.64

Fuente	Grados De libertad	Suma De Cuadrados	Media Cuadrada	Pr>F
SOLVENTES	1	1878.8	1878.8	0.0007
MUESTRA	1	6059.74	6059.74	0.0001
SOLVENTES*MUESTRA	1	1264.08	1264.08	0.0040

Solventes:eter de petróleo y cloroformo

Tabla AIV2. Pruebas de Duncan, comparación de medias de concentración de pigmento con diferentes solventes. (SAS, 1989).

Grupos de Duncan	Media	Solventes
A	116.83	Cloroformo
B	100.45	Eter de petróleo

Medias con la misma letra indican que no son significativamente diferentes

Tabla AIV3. Pruebas de Duncan, comparación de medias de concentración de pigmento con muestras fermentadas y sin fermentar. (SAS, 1989).

Grupos de Duncan	Media	Muestra
A	119.60	Fermentada
B	88.90	No Fermentada

Medias con la misma letra indican que no son significativamente diferentes

2. Desmineralización

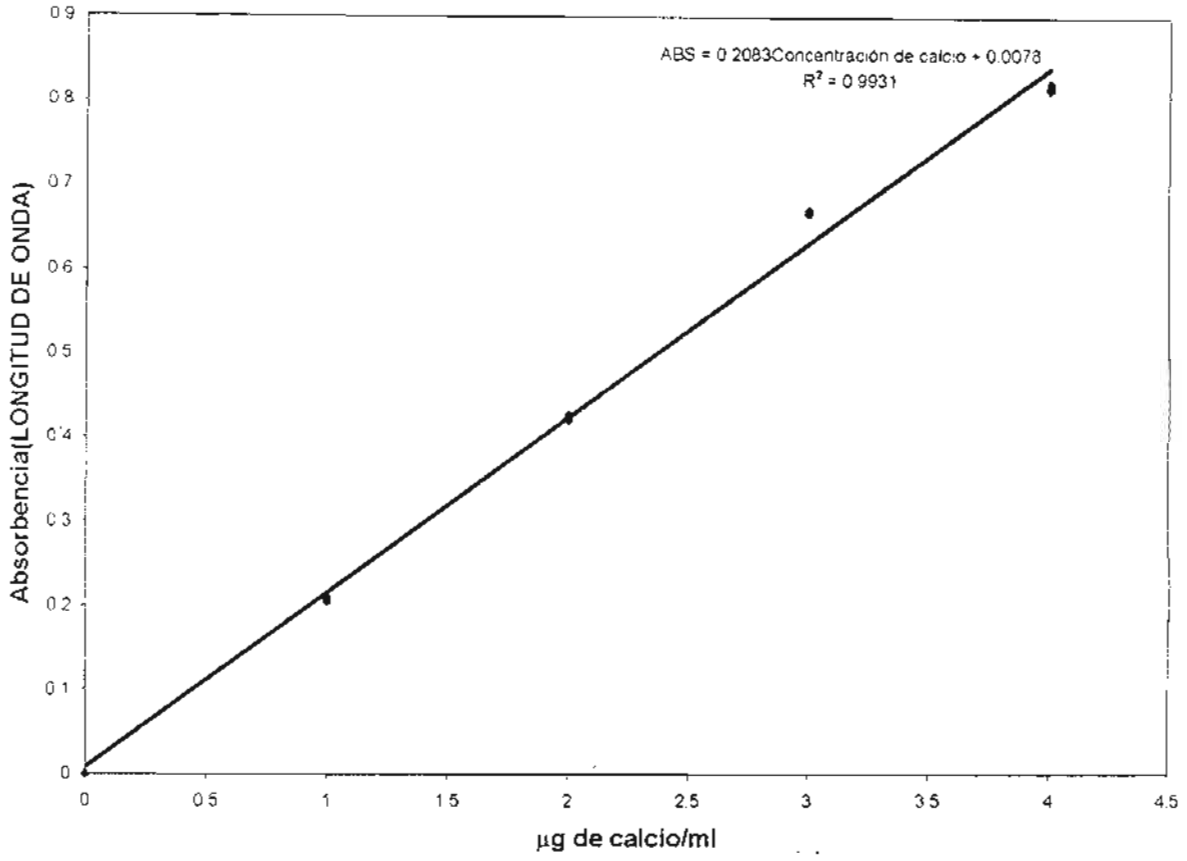


Figura AIV1. Curva de calibración de calcio (carbonato de calcio) por absorción atómica

Tabla AIV4. Análisis de varianza del modelo comparando el uso de enzimas (proteasas de camarón; mezcla de Neutrasa, Savinasa, Pronasa y Alcalasa; tripsina y sin enzimas(Control)) en muestras fermentadas y sin fermentar, tiempo 0, 24 y 48 horas de reacción, variable de respuesta concentración de proteína en los medios de reacción enzimática. (SAS, 1989).

Fuente	Grados De Libertad	Suma De Cuadrados	Cuadrados medio	Pr>F
Modelo	29	17869.96	616.17	0.0001
Error	30	742.40	24.75	
Total corregido	59	18611.4		

R-Cuadrada	Coeficiente de variación	Media del error (MSE)	Proteína soluble
	20.73	4.97	23.99

Fuente	Grados De libertad	Suma De Cuadrados	Media Cuadrada	Pr>F
MUESTRA	1	1770.5	17705	0.0001
ENZIMA	4	7459.6	1864.9	0.0001
TIEMPO	2	3500.33	1750.2	0.0001
MUESTRA*ENZIMA	4	797.94	199.48	0.0002
MUESTRA*TIEMPO	2	453.90	226.95	0.0008
MUESTRA*ENZIMA*TIEMPO	16	3886.74	242.92	0.0001

Tabla AIV5. Pruebas de Duncan, comparación de medias de concentración de proteína en medios de reacción enzimática de muestras de camarón. (SAS, 1989).

Grupos de Duncan	Media	Muestra
A	29.426	No fermentada
B	18.562	Fermentada

Medias con la misma letra indican que no son significativamente diferentes

Tabla AIV6. Pruebas de Duncan, comparación de medias de concentración de proteína en medios de reacción enzimática de diferentes enzimas. (SAS, 1989).

Grupos de Duncan	Media	Enzima
A	43.790	Mezcla
B	25.94	Tripsina
B	22.92	Proteasas de camarón
C	16.04	Control 50°C
D	11.281	Control 30° C

Medias con la misma letra indican que no son significativamente diferentes
Mezcla de Neutrasa, Savinasa, Pronasa y Alcalasa

Tabla AIV7. Pruebas de Duncan, comparación de medias de concentración de proteína en medios de reacción enzimática de diferentes tiempos (SAS, 1989).

Grupos de Duncan	Media	Tiempo
A	31.62	48
B	26.80	24
C	13.56	0

Medias con la misma letra indican que no son significativamente diferentes

Tabla AIV8. Análisis de varianza del modelo comparando el uso de enzimas (proteasas de camarón; mezcla de Neutrasa, Savinasa, Pronasa y Alcalasa; tripsina y sin enzimas(Control)) en muestras fermentadas y sin fermentar, tiempo 0, 24 y 48 horas de reacción, variable de respuesta nitrógeno total en los sólidos después de la reacción enzimática. (SAS, 1989).

Fuente	Grados De Libertad	Suma De Cuadrados	Cuadrados medio	Pr>F
Modelo	29	5.298	0.183	0.0001
Error	33	0.426	0.0129	
Total corregido	62	5.724		

R-Cuadrada	Coeficiente de variación	Media del error (MSE)	Nitrógeno total
0.925563	2.16	0.114	5.262

Fuente	Grados De libertad	Suma De Cuadrados	Media Cuadrada	Pr>F
MUESTRA	1	1.979	1.979	0.0001
ENZIMA	4	1.347	0.337	0.0001
TIEMPO	2	0.816	0.408	0.0001
MUESTRA*ENZIMA	4	0.197	0.049	0.0116
MUESTRA*TIEMPO	2	0.244	0.122	0.0006
MUESTRA*ENZIMA*TIEMPO	16	0.714	0.044	0.0013

Tabla AIV9. Pruebas de Duncan, comparación de medias de nitrógeno total en residuos de muestras de camarón. (SAS, 1989).

Grupos de Duncan	Media	Muestra
A	5.4312	No fermentada
B	5.0763	Fermentada

Medias con la misma letra indican que no son significativamente diferentes

Tabla AIV10. Pruebas de Duncan, comparación de medias de nitrógeno total en residuos de muestras de camarón con diferentes enzimas. (SAS, 1989).

Grupos de Duncan	Media	Enzima
A	5.455	Control 30°C
A	5.404	Control 50°C
B	5.286	Proteasas de camarón
B	5.202	Tripsina
C	5.035	Mezcla

Medias con la misma letra indican que no son significativamente diferentes
Mezcla de Neutrasa, Savinasa, Pronasa y Alcalasa

Tabla AIV11. Pruebas de Duncan, comparación de medias de nitrógeno total en residuos de muestras de camarón a diferentes tiempos (SAS, 1989).

Grupos de Duncan	Media	Tiempo
A	5.42	0
B	5.21	24
B	5.16	48

Medias con la misma letra indican que no son significativamente diferentes