



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Desarrollo y caracterización de un
bioproceso para la obtención de
quitosano a partir de desechos de
camarón**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERO QUÍMICO

PRESENTA

HECTOR GIOVANI LUNA BARRÓN

ASESOR DE TESIS

M. EN C. EN IBQ ANA MARÍA SIXTO BERROCAL

COASESOR

DR. MARTÍN ROGELIO CRUZ DÍAZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2022.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: DRA. MARIA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis y Examen Profesional**

Desarrollo y caracterización de un bioproceso para la obtención de quitosano a partir de desechos de camarón.

Que presenta el pasante: **Hector Giovanni Luna Barrón**
Con número de cuenta: **314106306** para obtener el título de: **Ingeniero Químico**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 15 de noviembre de 2022.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	I.Q. Guadalupe Franco Rodríguez	
VOCAL	Dra. Susana Patricia Miranda Castro	
SECRETARIO	MCIBQ. Ana María Sixto Berrocal	
1er. SUPLENTE	MCE y MI. Ana María Soto Bautista	
2do. SUPLENTE	Dra. Francisca Alicia Rodríguez Pérez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	III
DEDICATORIA	V
AGRADECIMIENTOS	VI
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	VIII
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN	3
1. MARCO TEÓRICO.....	5
1.1 Desechos de camarón como fuente de quitina	5
1.2 Generalidades de la quitina	6
1.3 Quitina y Quitosano	7
1.4 Método químico de obtención de quitina y quitosano	10
1.5 Método biotecnológico de obtención de quitina y quitosano.....	11
1.6 Efecto de pretratamiento ultrasónico a quitina previo a desacetilación	13
1.7 Aplicación de la quitina y quitosano	14
1.7.1 Aplicaciones de quitina y quitosano en los alimentos.....	15
1.7.2 Aplicación de quitina y quitosano en tratamiento de agua.....	15
1.7.3 Aplicación de quitina y quitosano en agricultura.....	16
1.7.4 Aplicación de quitina y quitosano en biomedicina	16
1.7.5 Aplicación de quitina y quitosano en cosméticos	17
1.7.6 Aplicación de quitina y quitosano en textiles.....	18
OBJETIVOS	19
Objetivo General	19
Objetivos Particulares	19
2. METODOLOGIA	20
2.1 Materiales y métodos	20
2.1.1 Obtención y tratamiento de residuos de camarón.	20
2.1.2 Preparación de medios de cultivo.....	20
2.1.3 Medio MRS (Man, Ragosa y Sharpe)	21
2.1.4 Medio de agar papa dextrosa (PDA).....	21
2.1.4.2 Medio mínimo.....	22
2.1.5 Preparación de inóculo.....	22
2.2 Desmineralización y desproteización de la cáscara de camarón.....	23
Desarrollo de la fermentación mixta secuencial a nivel biorreactor	23
2.3 Desacetilación de la quitina obtenida posterior a la desmineralización y desproteización..	25

2.4 Caracterización del método para la obtención de quitin desacetilasas.....	26
2.5 Obtención de extracto crudo enzimático rico en desacetilasas a nivel biorreactor	27
2.6 Identificación de pH y T óptimos para la reacción enzimática del ECEQDAs y su estabilidad a la variación de T, pH.....	28
2.7 Caracterización del método experimental para la desacetilación de quitina mediante la adición de extracto enzimático.....	28
2.8 Determinación del tiempo de choque ultrasónico	29
2.9 Obtención de quitosano en fermentación sumergida a nivel biorreactor	30
2.10 Técnicas analíticas.....	31
2.10.1 Determinación de pH	31
2.10.2 Cuantificación del contenido de ácido láctico.....	31
2.10.3 Cuantificación del contenido de calcio en el sobrenadante.....	32
2.10.4 Cuantificación de azúcares reductores en el sobrenadante.....	32
2.10.5 Cuantificación de proteína en el sobrenadante.....	33
2.10.5 Cuantificación de proteasas.....	33
2.10.6 Cuantificación de desacetilasas	34
2.10.7 Cuantificación de Biomasa.....	35
2.10.8 Cuantificación de grado de desacetilación de quitosano.....	35
2.10.9 Identificación de la quitina y quitosano contenidos en la cáscara por espectroscopía	36
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
3.1 Obtención y caracterización de la materia prima	37
3.2 Obtención de quitina mediante una fermentación mixta secuencial desarrollada a nivel biorreactor	37
3.3 Caracterización del método de obtención de quitin desacetilasas a partir de <i>Aspergillus niger</i> y cáscara de camarón a nivel matraz	40
3.4 Obtención de ECEQDAs a nivel biorreactor	41
3.5 Determinación de T y pH óptimos para el ECEDs y su estabilidad a la variación de T y pH	42
3.6 Desacetilación enzimática de quitina a nivel matraz.....	44
3.7 Efecto de pretratamiento ultrasónico en el proceso de desacetilación enzimática	45
3.8 Desacetilación enzimática a nivel biorreactor.....	46
CONCLUSIONES	48
BIBLIOGRAFÍA.....	50
ANEXOS.....	54
ANEXO 1. CURVA PATRÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO	54
ANEXO 2. CURVA PATRÓN DE CaCO ₃	55
ANEXO 3. CURVA PATRÓN DE LA GLUCOSA	56
ANEXO 4. CURVA PATRÓN DE BRADFORD	57
ANEXO 5. CURVA PATRÓN DE TIROSINA	58

ANEXO 6. SUPERFICIE DE RESPUESTA (ANOVA).....	59
ANEXO 7. SOLUCIONES REGULADORAS O AMORTIGUADORA.....	61
PRODUCTIVIDAD COMO PARTICIPACIONES EN CONGRESOS	63

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1.....	40
Tabla 2.....	45
Figura 1. Estructura química de la celulosa (superior) y estructura química de la quitina.	6
Figura 2. Jerarquía del esqueleto de camarón.	7
Figura 3. Representación estructural de la α -quitina.	8
Figura 4. Estructura primaria de la quitina (izquierda) y quitosano (derecha) (Pacheco y col.2010).	10
Figura 5. Reacción de desacetilación enzimática (Tsigos et al. 2000).	13
Figura 6. Gel de quitosano con aplicaciones biomédicas (Fa Tan Lai et Col, 2021).	14
Figura 7. Tratamiento de aguas residuales empleando quitosano (Álava.2015).	15
Figura 8. Apósito de quitosano comercial (A), apósito de quitosano colocado sobre quemadura (B) (Foryou Medical,2021).	17
Figura 9. Publicidad de empresa surcoreana especializada en cosmetología dermatológica a base de quitosano.	18
Figura 10. Cáscara de camarón sucia (A), cáscara de camarón seleccionada, lavada y seca (B) y cáscara de camarón seca molida (C).	20
Figura 11. Medio de cultivo MRS estéril.	21
Figura 12. Medio mínimo empleado en la fermentación mixta secuencial.	22
Figura 13. Inoculo de la bacteria <i>Lactobacillus delbrueckii</i> (A), inoculo de la bacteria <i>Bifidobacterium lactis</i> (B).	23
Figura 14. Obtención de quitina a partir de una fermentación mixta secuencial en biorreactor de tanque agitado marca Applikon equipado con controlador Bio Controller.	25
Figura 15. Recolección de esporas de <i>Aspergillus niger</i>	26
Figura 16. Sistemas propuestos por el DCC transcurridas 48 h de fermentación.	27
Figura 17. Producción de extracto crudo enzimático a nivel biorreactor (izquierda), extracto crudo enzimático centrifugado (centro), almacenamiento de extracto crudo enzimático (derecha).	28
Figura 18. Baño de ultrasonido con capacidad de 6 L empleado durante el pretratamiento ultrasónico.	29
Figura 19. Lavado del material resultante de la desacetilación con pretratamiento ultrasónico.	30
Figura 20. Desacetilación enzimática a nivel biorreactor (A), material resultante de la desacetilación enzimática.	31
Figura 21. Etapas de la obtención de la materia prima, cáscara de camarón sucia(A), cáscara de camarón lavada y seca (B), cáscara de camarón triturada (C)	37
Figura 22. Fermentación mixta secuencial desarrollada con cáscara de camarón sin cabeza ni cola, <i>inoculado</i> de <i>L. delbrueckii</i> y <i>B. lactis</i> . Se muestra la concentración de azúcares reductores (A), producción de ácido láctico (B), concentración de calcio en sobrenadante (C), producción de proteasas (D), concentración de proteína en líquido (E) y contenido de biomasa en sobrenadante (F y G).	39

Figura 23. Producción de extracto crudo enzimático rico en deacetilasas a nivel biorreactor.....	41
Figura 24. Producción de quitin-desacetilasas por <i>A. niger</i> a nivel biorreactor de 1L.....	42
Figura 25. Temperatura óptima (A) y pH óptimo (B) del ECEDs producido por <i>A. niger</i> en cultivo sumergido a nivel biorreactor de 1 L.	43
Figura 26. Extracto crudo enzimático rico en quitin-desacetilasas generado por <i>Aspergillus niger</i> sobre cáscara de camarón como sustrato.....	44
Figura 27. Porcentaje de desacetilación (A) y porcentaje de solubilidad (B) del quitosano obtenido a partir de desacetilación enzimática.	46
Figura 28. Espectro IR de la quitina obtenida por un cultivo bacteriano mixto secuencial (A) y del quitosano obtenido luego del tratamiento de desacetilación enzimática con el ECEDs producido por <i>A. niger</i> (B).....	47

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi madre Reyna Barrón Contreras, por ser mi mayor ejemplo por seguir y demostrarme en cada momento que las limitantes únicamente están en tu mente. Siempre has sido una mujer exitosa, un ejemplo de superación, fuerte, amorosa, justa y mi alegría. Gracias por siempre estar para mí, te quiero con todo mi corazón, no sería la persona que soy hoy sin tu educación.

A mi padre Hilario Luna Reséndiz, por su apoyo durante mi formación académica, su cariño, su paciencia y su comprensión. Por difíciles e inmensos que expresaba mis problemas siempre me llamaba a mantener la calma pues todo estaría bien. Te agradezco por todo tu apoyo, pues sin ti este logro no sería posible.

A mi hermana Ana Laura Luna Barrón por todo su cariño que siempre me demuestra, por el amor que le tiene a nuestra familia, por mostrarme que la ciencia es esa ventana que te permite conocer el mundo, por ser mi motivo para estudiar esta hermosa carrera, por preocuparse siempre por mi bienestar y ser un gran ejemplo de crecimiento. Gracias por demostrarme que la ciencia es una gran compañera de vida.

A mi hermano Alejandro Erick Luna Barrón por su amor que le tiene a nuestra familia, mostrarme la importancia de mantenerse fuerte en los momentos difíciles, su increíble creatividad, su perseverancia y su valentía siempre han sido virtudes que pocos llegan a tener. Gracias por tu cariño, por siempre tenerme presente y por siempre estar para la familia.

A mis amigos de la carrera Osvaldo García, Neftalí Iván Esquinca, José Manuel Anaya, Andrés Reyes, Vanessa Vega y Jessica Michelle Cuenca, por haber formado parte de este periodo de mi vida y brindarme su amistad sincera. Lo hemos conseguido amigos.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por siempre recibirme con las puertas abiertas, permitiéndome llegar a ser el profesionalista que siempre anhele llegar a ser y a la vez permitir ser parte de su comunidad universitaria.

Agradezco infinitamente a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por proporcionarme todos los recursos necesarios para mi formación académica, así como brindar en cada momento un ambiente de respeto y tolerancia.

A mis padres por su amor, comprensión, motivación, educación y apoyo durante toda mi formación académica, sin ellos yo no sería la persona que soy hoy en día. Este logro también es suyo.

Mi más sincero agradecimiento a mis asesores, la M. en C. en IBQ Ana María Sixto Berrocal y el Dr. Martín Rogelio Cruz Díaz por su conocimiento, disposición, apoyo y comprensión durante todo el proyecto. Sin su orientación profesional y su confianza en mi trabajo esto no hubiera sido posible.

A la Dra. Susana Patricia Miranda Castro del Laboratorio de Biotecnología del área de posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por su apoyo, conocimiento y permitirme trabajar con confianza en su laboratorio.

A el Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, por permitirme tener acceso a su Laboratorio de Cinética Enzimática y sus instalaciones.

A la Dra. María Aurora Martínez Trujillo del Laboratorio de Cinética Enzimática del TESE por todo su conocimiento, su tiempo, su amabilidad y su completa disposición a la resolución de mis dudas. Aprecio infinitamente el recibimiento que me tuvo durante mi estancia, así como la confianza y su interés en mi trabajo.

A Dios por permitirme estar rodeado de la gente que amo, disfrutar de mis logros de la mano con ellos y por nunca dejarme solo aun en mis momentos de mayor oscuridad. Gracias por la fortaleza, la salud y todo el amor que me has dado.

Agradezco el financiamiento otorgado por parte del Programa de Apoyo y Proyectos para Innovar y Mejorar la Enseñanza (PAPIME) de la UNAM con clave PE104122 y título: Prácticas experimentales y virtuales para la obtención de habilidades en el desarrollo de bioprocesos.

Agradezco el financiamiento otorgado por parte del Fondo para la Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico del Estado de México (FICDTEM), dentro de la convocatoria “Financiamiento para la Investigación de Mujeres Científicas” con clave FICDTEM-2021-064 título: Empleo del ultrasonido para la intensificación del método biológico para la obtención de quitina/quitosano a partir de cáscara de camarón.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

DCC	Diseño Compuesto Central
BpFMS-E	Bioproceso Fermentativo Mixto Secuencial Enzimático
DM	Desmineralización
DP	Desproteínización
BPFMS	Bioproceso Fermentativo Mixto Secuencial
ECEQDAs	Extracto Crudo Enzimático rico en Quitin Desacetilasas
DA	Desacetilación
FMS	Fermentación Mixta Secuencial
BALs	Bacterias Ácido-Lácticas
MRS	Man, Rogosa y Sharpe
PDA	Papa Dextrosa
CSCC	Cáscara Sin Cabeza ni Cola
CCSCC	Cáscara de Camarón Sin Cabeza ni Cola
QDAs	Quitin Desacetilasas
GDA	Grado de Desacetilación
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico

RESUMEN

En el presente trabajo se implementó un bioproceso fermentativo mixto secuencial enzimático (BpFMS-E) así como una fermentación enzimática, aprovechando desechos del camarón para obtener quitosano. El proceso consistió en caracterizar un método experimental para obtener quitina en primera instancia y posteriormente quitosano. En el experimento, la quitina fue obtenida mediante una fermentación mixta secuencial, utilizando bacterias ácido lácticas en el bioproceso fermentativo las cuales fueron adicionadas de manera secuencial; bacterias lácticas *Lactobacillus delbrueckii* y *Bifidobacterium lactis* fueron usadas para desmineralizar y desproteínizar la cáscara de camarón, obteniendo quitina con un alto grado de pureza. La quitina obtenida se sometió a una desacetilación enzimática en un biorreactor Applikon Biotechnology, el hongo *Aspergillus niger* fue utilizado para producir un extracto enzimático rico en desacetilasas; mismo que se usó para la obtención de quitosano.

El estudio se puede dividir en: a) desmineralización (DM) y desproteínización (DP) de los desechos de camarón utilizando las bacterias lácticas *Lactobacillus delbrueckii* y *Bifidobacterium lactis* respectivamente, mediante un proceso fermentativo mixto (DM)-(DP) en un biorreactor de tanque agitado Applikon Biotechnology de 3 L b) Caracterización del método para la obtención de extracto crudo enzimático de deacetilasas mediante la variación de concentración de fuente de carbono, la concentración del extracto de levadura y el pH inicial c) Obtención y caracterización de extracto crudo enzimático de deacetilasas a las condiciones óptimas, proveniente de un cultivo de *Aspergillus niger* y cáscara de camarón como sustrato, d) Desacetilación enzimática de la quitina obtenida a nivel matraz, e) Efecto de un pretratamiento ultrasónico a la quitina previamente obtenida, f) Desacetilación enzimática de la quitina a nivel biorreactor.

El BpFMS se realizó mediante el diseño propuesto por Sixto en 2019, manteniendo constantes el contenido de la cáscara de camarón (% p/v), la concentración del inóculo (% v/v), la temperatura de incubación, la velocidad de agitación (rpm) y el pH inicial.

Por otro lado, el proceso de desacetilación (DA) partió desde la producción del ECEQDAs. Las condiciones óptimas de producción se obtuvieron mediante el desarrollo de un diseño compuesto central ocupando como variables la concentración de extracto de levadura, el pH inicial y la relación entre cáscara de camarón y glucosa. Para su posterior aplicación en el

proceso de desacetilación enzimática a nivel matraz y biorreactor el extracto enzimático se caracterizó respecto a su temperatura y pH óptimos, así como su estabilidad a diferentes valores de pH, temperatura y la presencia de diversos metales.

Durante el presente trabajo se llegó a definir un proceso completamente biotecnológico para la obtención de quitosano a partir de cáscara de camarón. Empleando las condiciones óptimas establecidas por el DCC, se obtuvo un extracto crudo enzimático rico en deacetilasas (ECEDs) con una actividad enzimática de 288 U mL^{-1} , en un cultivo sumergido en un reactor de 1 L. El ECEDs obtenido mostró una temperatura óptima de $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y un pH óptimo de 7. Este extracto fue estable luego de mantenerse por 24 h a temperaturas por debajo de $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y valores de pH de 4 a 7. El ECEDs se empleó en la desacetilación de una quitina proveniente de un bioproceso fermentativo secuencial, obteniendo quitosano con un grado de desacetilación de $74.32 \pm 1.66 \%$.

INTRODUCCIÓN

Uno de los retos que se presentan con más frecuencia en la industria es el poder generar nuevos materiales que cubran necesidades cada vez más especializadas y al mismo tiempo disminuir del impacto ambiental en su fabricación. La humanidad siempre ha conseguido generar esos materiales mediante el uso sin medida de recursos, muchas veces no renovables, o generando desechos altamente contaminantes. Estas prácticas a menudo son más perjudiciales ante un inminente cambio climático. Los bioprocesos han sido aplicados desde la antigüedad para la producción de productos que satisficieran necesidades específicas de la población; sin embargo, fue hasta apenas hace algunos años en que comenzaron a posicionarse como una nueva alternativa para cubrir las necesidades productivas de materiales a nivel industrial. El presente trabajo busca demostrar la eficiencia de los bioprocesos para la obtención de quitosano.

El quitosano es considerado un biopolímero biodegradable, el cual es extraído a partir del exoesqueleto de algunos crustáceos, cuenta con características físicas y químicas que le permiten su aplicación en diversos sectores industriales; sin embargo, a pesar de que el quitosano es un biopolímero de alta demanda, en la actualidad es producido mediante métodos químicos sumamente contaminantes que utilizan como principales reactivos ácidos y bases en concentraciones elevadas. A su vez, los subproductos y productos finales son lavados con grandes cantidades de agua que inevitablemente será contaminada, generando así un grave problema ambiental.

El método de producción de quitosano propuesto en este trabajo genera así una nueva alternativa a los métodos químicos tradicionales. La obtención de quitina/quitosano se llevó a cabo mediante un bioproceso fermentativo mixto secuencial enzimático (BpFMS-E), que no solo velará por el problema ambiental superando los inconvenientes causados por el método químico convencional, de igual forma mejora las propiedades del quitosano obtenido. El método que se llevó a cabo durante este proceso consta de dos partes: la primera es referente a la obtención de quitina a partir de la cáscara de camarón blanco (*Litopenaeus vanname*) sin cabeza ni cola. En la primera parte se desarrolló una fermentación mixta secuencial (FMS), la cual tendrá como finalidad la desproteínización (DP) y desmineralización (DM) de la materia orgánica. Posterior a la primera fermentación se llevó

a cabo un segundo tratamiento, pero esta vez en presencia de un extracto enzimático, con la finalidad de desacetilizar la quitina resultante de la primera fermentación para así obtener como producto final quitosano.

El presente trabajo cuenta con una estructura, en donde inicialmente, se presenta un marco teórico para proporcionarle al lector información necesaria para familiarizarse con la terminología, la importancia de los bioprocesos, así como el papel que juegan los microorganismos en el mismo, los avances que se han realizado en el campo de la investigación y la aplicación del quitosano en la actualidad para los distintos giros industriales.

Posteriormente, se presentan los objetivos a cumplir, así como una descripción detallada del método experimental, las técnicas utilizadas durante la experimentación. Se presentan los resultados obtenidos durante la experimentación, un análisis y discusión de estos. En la última parte de esta tesis se podrá encontrar la conclusión, las perspectivas a futuro que se esperan y que servirá como bases para investigaciones posteriores.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Desechos de camarón como fuente de quitina

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) presentó en 2020 un estudio estadístico definiendo que el consumo global anual de pescado es de 20.5 kilogramos por persona, un nivel récord que se espera que aumente en los próximos diez años. Los camarones y gambas representan un 15% de la proporción de los principales grupos de especies en el comercio de pescado en 2020 (FAO, 2020).

México es el séptimo productor de camarón a nivel mundial, con una producción de 237 mil 647 toneladas. El principal estado productor de camarón en México es Sinaloa con más de 96 mil toneladas, le sigue Sonora con 75 mil toneladas y Nayarit con 17 mil toneladas. En los últimos cinco años el volumen de captura y cosecha de este crustáceo ha tenido una tendencia al alza; en 2019 continuó con esta tendencia, aumentó 3.2% respecto al año anterior (<https://www.gob.mx/agricultura>). Sin embargo, se ha reportado que alrededor de 48-60% del peso total del camarón corresponde a la fracción no comestible, que comprende el exoesqueleto, la cabeza y la cola. Por lo general, estas partes son consideradas y manejadas como desechos pecuarios; no obstante, poseen importantes cantidades de proteínas, lípidos, quitina y carotenoides, como la astaxantina (Pattanaik y cols., 2020). La descomposición de estos desechos, además de los malos olores, puede generar un problema ambiental grave si no son tratados adecuadamente. Por ello, se ha estudiado la composición de los desechos de camarón con el objetivo de conocer nuevas estrategias para su aprovechamiento (Hamed y col., 2016).

La composición de los desechos de camarón se resume en 30%-40% de proteína, 20%-30% de quitina, 30%-50% de minerales, 2%-7% de lípidos, 1%-5% de astaxantina. Los reportes señalan que ésta varía según la especie y el tipo de procesamiento (Arbia y col., 2012). El contenido de quitina, proteína, minerales y carotenoides presente en los caparazones de crustáceos varía dependiendo de la especie, parte de la cubierta, estado de nutrición y su ciclo reproductivo. El exoesqueleto del camarón (*Litopenaeus vannamei*) contiene como componente principal entre 20% y 30% de quitina, proteína entre 30 y 40% y carbonato de

calcio entre 30 y 50%, y en menor cantidad pigmentos y otras sales metálicas (Younes y Rinaudo, 2015).

La quitina es el segundo biopolímero más abundante en la tierra solo después de la celulosa, es el mayor componente estructural del exoesqueleto de los invertebrados, así como de la pared celular de hongos (Tan y col., 1996). En la Figura.1 se representa la similitud entre la estructura molecular de la celulosa y de la quitina.

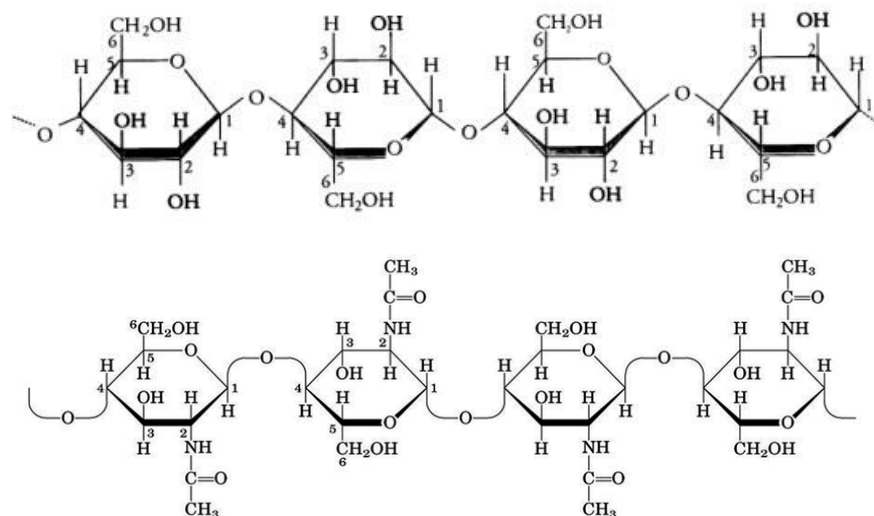


Figura 1. Estructura química de la celulosa (superior) y estructura química de la quitina.

1.2 Generalidades de la quitina

Los biopolímeros son macromoléculas presentes en los seres vivos. Una definición de estos los considera materiales poliméricos o macromoleculares sintetizados por los seres vivos. El biopolímero más abundante en la Tierra es la celulosa, seguida por la quitina, que se encuentra en los exoesqueletos de arácnidos, crustáceos e insectos (Klemm D y Heublein, 2005).

La quitina fue aislada por primera vez por el científico Braconnot en 1811 a partir de algunos hongos. Posteriormente, en 1823 Auguste Odier consiguió aislar un residuo insoluble en hidróxido de potasio proveniente del exoesqueleto de un escarabajo, al que posteriormente le conferiría el nombre de quitina. Odier logró identificar la quitina presente en los caparzones de crustáceos. Fue hasta 1929 cuando Albert Hofmann consiguió describir correctamente la estructura química de la quitina.

El exoesqueleto de los crustáceos es una capa secretada por la epidermis, la cual se encuentra formando una organización jerárquica. A nivel molecular la quitina está conformada mediante un alineamiento antiparalelo, los cuales forman estructuras cristalinas. Posteriormente, el siguiente nivel estructural es el arreglo entre las moléculas que se encuentran ligadas a proteínas globulares, formando estrechas unidades llamadas nanofibrillas; el tipo de proteínas presente contiene α -aminoácidos como la glicina, tirosina, glicoproteínas conteniendo residuos histidil y aspartil, ácido aspártico, serina y glicina (Tharanathan y col., 2003).

Las nanofibrillas de quitina-proteína se agrupan formando racimos, que a su vez forman capas planas horizontales y paralelas de fibrillas que cambien de dirección de un plano otro en continua rotación. Este complejo forma una red de láminas, que agrupan a la quitina y proteínas con minerales, que se encuentran por lo general, en forma de cristales de carbonato de calcio y lípidos (Raabe y col., 2005). Esta jerarquía se muestra en la Figura 2.

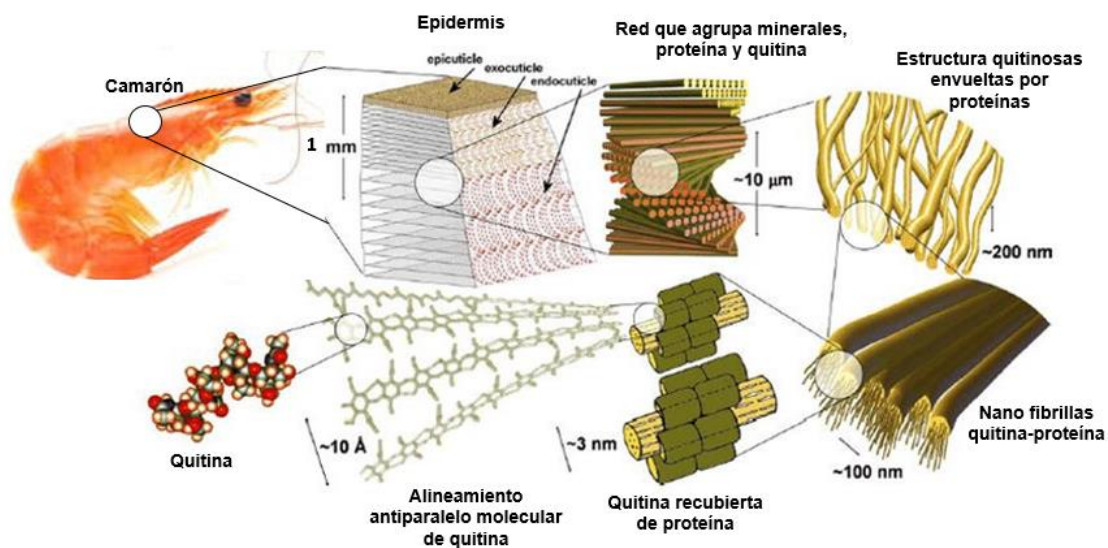


Figura 2. Jerarquía del esqueleto de camarón.

1.3 Quitina y Quitosano

La quitina es un polisacárido compuesto de unidades de N-acetilglucosamina (exactamente N-acetil-D-glucos-2-amina). Estas están unidas entre sí con enlaces covalentes β -1,4, de la misma forma que las unidades de glucosa componen la celulosa (Biología molecular de la

célula, 2004). Los polisacáridos son cadenas largas compuestas de monosacáridos o azúcares. Cuando analizamos la palabra polisacárido, obtenemos poli, que significa muchos, y sacárido, lo que significa azúcar. Por lo tanto, es una molécula grande con muchas unidades de azúcares como glucosa, fructosa u otros derivados de la glucosa. Estos monosacáridos se combinan mediante enlaces glicosídicos. A diferencia de la celulosa, que es un polisacárido de la glucosa, la quitina une subunidades de un derivado de la glucosa, N-acetil-D-glucosamina.

La quitina pura es un sólido blanco, parcialmente cristalino, inodoro e insípido. Otras características importantes de este bioproducto de naturaleza polimérica, es su elevada masa molecular, además de su estructura porosa que le permite absorber mucha agua (Tamura y col., 2006). La quitina puede encontrarse en tres diferentes formas polifórmicas α -, β - y γ -quitina, de las cuales la más común es la α -quitina. Esta contiene cadenas en una orientación antiparalelas y se encuentra presente en insectos, crustáceos, levaduras y hongos (Jang y col., 2004); su estructura molecular se muestra en la Figura 3. La β -quitina es derivada de las plumas de calamares y se encuentra presente en cadenas de N-acetilglucosamina en una orientación paralela (Muzzarelli, 2010). La γ -quitina es considerada la forma más rara presente en los insectos y en el estómago del calamar Loligo, esta posee dos cadenas de N-acetilglucosamina, la cual está orientada en una dirección y la tercera corre en dirección opuesta. Las cadenas individuales de quitina se mantienen juntas por enlaces de hidrógeno (Álvarez, F, 2014)

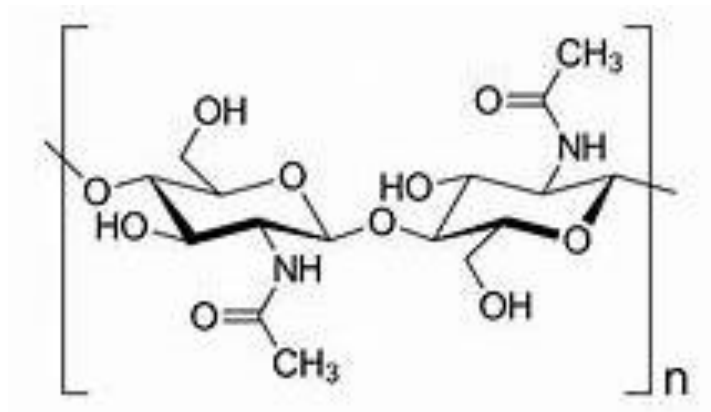


Figura 3. Representación estructural de la α -quitina.

Las características de la quitina pueden llegar a variar según su fuente de obtención y método de preparación. Se busca definir y caracterizar métodos de obtención apropiados para lograr las propiedades más convenientes para los distintos usos (Rinaudo M y col., 2006).

La quitina presenta una insolubilidad en el agua, se disuelve rápidamente en ácidos concentrados, en algunos fluoroalcoholes y soluciones al 5% de cloruro de litio. Esta propiedad limita significativamente sus aplicaciones, debido a esto, en muchas ocasiones es conveniente trabajar con algunos de sus derivados directos en lugar del biopolímero original (Vader y col., 1998).

El más relevante de los compuestos derivados de la quitina es el quitosano. Su característica fundamental es que sus unidades están mayormente desacetiladas; este cambio en su estructura molecular influye directamente en sus propiedades químicas y biológicas. El quitosano es uno de los pocos polímeros catiónicos naturales que existen en la naturaleza. Posee una elevada solubilidad en disoluciones ácidas diluidas, y manifiesta una potente actividad antimicrobiana (Harish Pashanth y col., 2007). Se disuelve fácilmente en soluciones diluidas de ácidos orgánicos, tales como: ácido fórmico, acético, cítrico y tartárico, y también en soluciones ácidas diluidas de origen mineral a excepción del ácido sulfúrico (Gauna y Nuñez, 2004). La solubilidad del quitosano se debe a que su grupo amino adquiere carga positiva, lo cual también explica sus propiedades antimicrobianas (Xu y col., 2007).

La viscosidad de las disoluciones de quitosano favorece su actividad biológica, la cual depende de factores como el grado de desacetilación, el peso molecular promedio del polímero y la concentración de la disolución, entre otros. Las disoluciones de quitosano permiten obtener películas, hilos y vendajes con una extensa aplicación (Pillai y col., 2007).

La quitina y el quitosano poseen distintas características, sin embargo, no existe nomenclatura oficial que permita diferenciarlos; la única diferencia es de acuerdo con el porcentaje de grupos acetilados contenidos en la molécula, comúnmente llamado grado de desacetilación (GDA). Se ha establecido que la quitina con más de un 50% de desacetilación debe ser considerada quitosano e incluso algunos investigadores lo consideran como quitosano con un GDA superior al 60 %. Usualmente en el caso del quitosano el GDA se

encuentra comprendido entre 60-98 % (Muzzarelli,1977). En la Figura 4 se muestra la representación estructural primaria de la quitina y el quitosano.

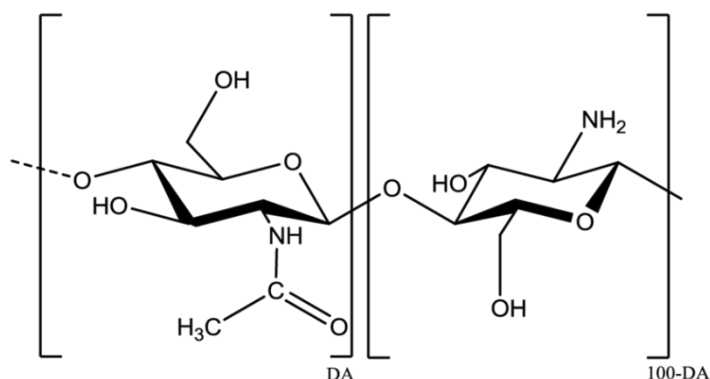


Figura 4. Estructura primaria de la quitina (izquierda) y quitosano (derecha) (Pacheco y col.,2010).

1.4 Método químico de obtención de quitina y quitosano

Las técnicas de extracción encontradas en la literatura son muy variadas, dependen en gran medida de las características de la fuente. La composición del material de partida varía notablemente de una especie a otra. En general los procesos de obtención de quitina se realizan mediante los siguientes pasos consecutivos: acondicionamiento de la materia prima, desproteinización (DP), desmineralización (DM) y la decoloración de la quitina (Marinela y col., 2014). La quitina resultante es desacetilada, si la quitina es desacetilada en más de un 50% se produce el quitosano, y cuando el GDA alcanza un 100% el polímero se conoce como quitano (Larez, 2006).

El acondicionamiento de la materia prima consiste en el lavado de los caparzones con agua y separación de la masa (carne) que pueda quedar adherida a los mismos. Se procede a la molienda de los caparzones hasta el tamaño de partícula adecuado para la extracción, generalmente es de varios milímetros (Marinela y col., 2014).

El procedimiento más comúnmente utilizado para DP consiste en tratar los caparzones de los crustáceos con una solución alcalina de NaOH al 3% a temperatura alta (65–100°C), con el fin de disolver la proteína. El tiempo de tratamiento suele variar entre 0.5 y 72 horas. Si bien el NaOH es el reactivo más comúnmente utilizado también se han empleado otros agentes para extraer la proteína, tales como Na₂CO₃, NaHCO₃, KOH, K₂CO₃, Ca(OH)₂, Na₂SO₃, NaHSO₃, Na₃PO₄ y Na₂S (Argüilles y col.,1988).

Durante la DM se busca la solubilización del carbonato de calcio, el principal componente inorgánico de los caparazones de los crustáceos. Este compuesto se suele eliminar empleando soluciones diluidas de HCl (hasta el 10%) a temperatura ambiente; también se han utilizado otros ácidos como HNO₃, HCOOH, H₂SO₄, y CH₃COOH. La concentración del ácido y el tiempo de tratamiento dependen de la fuente, pero deben evitarse los tratamientos a temperaturas más altas, que provocan la degradación del polímero (Argüilles M y col., 1988).

Los tratamientos de DP y DM descritos anteriormente no son capaces de eliminar los pigmentos, los que suelen extraerse a temperatura ambiente con acetona, cloroformo, éter, etanol, acetato de etilo o mezcla de disolventes (Agüero G y col., 1989).

La desacetilación (DA) de la quitina se lleva a cabo por hidrólisis de los grupos acetamida en medio fuertemente alcalino, a altas temperaturas. Generalmente la reacción se realiza en fase heterogénea empleando soluciones concentradas de NaOH o KOH (30–50%) a temperaturas superiores a 100°C, preferiblemente en atmósfera inerte o en presencia de sustancias reductoras como el NaBH₄ o el Na₂SO₃ para evitar la despolimerización del polímero. No obstante, con un solo tratamiento alcalino, el máximo GDA alcanzado no suele sobrepasar del 75 al 85%. Tratamientos prolongados suelen provocar la degradación del polímero sin traducirse en un aumento sensible del grado de desacetilación (Peniche y col., 1992; Argüelles y col., 1993).

Ante la ausencia de un método de extracción estándar, el establecimiento de condiciones de reacción y el uso de grandes volúmenes de soluciones corrosivas hacen que el método sea costoso, además aumenta el precio de los productos; sin mencionar los daños que sufre el medio ambiente por la utilización de reactivos químicos altamente corrosivos que normalmente se descargan en las aguas residuales. Esto resalta la importancia de buscar métodos alternativos de procesamiento (Salas y col., 2017).

1.5 Método biotecnológico de obtención de quitina y quitosano

El método biotecnológico de extracción de la quitina presenta varias ventajas, como una extracción reproducible, mayor facilidad en el manejo del proceso, el uso de ácidos y bases fuertes se suplen con compuestos orgánicos, consume menos energía, es más productivo, “amigable” con el ambiente y hay menor grado de descomposición, lo que permite recuperar

los subproductos con menor limitación en la purificación de los compuestos finales (Krithika y Chellaram, 2016; Gortari y Hours, 2014).

El proceso microbiológico para la extracción de quitina por fermentación ácido-láctica ha sido estudiado. Estos estudios han reportado tener mayores ventajas con respecto al tratamiento químico: no produce desechos tóxicos, mejor calidad del producto obtenido y disminución en los costos de producción (Carvalho et al., 2009).

La DP puede llevarse a cabo utilizando bacterias productoras de proteasas, como lo son *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. maltophilia*, *Serratia marcescens*, *Bacillus thuringiensis*, *Streptococcus thermophilus*, entre otras, que descomponen las proteínas en hidrolizados de proteínas solubles en agua. Mientras que para la DM se ha optado por el uso de bacterias ácido-lácticas (BAL), al ser microorganismos productores de ácidos orgánicos, como *Lactobacillus paracasei*, *L. pentosus*, entre otros, que producen ácido láctico que puede eliminar los iones de calcio de las conchas (Jung y col., 2006; Guo Na y col, 2018).

Las BALs producen ácido láctico por vía fermentativa, el ácido láctico reacciona con el carbonato de calcio presente en los desechos de crustáceos para producir lactato de calcio soluble, como se presenta en la siguiente reacción estequiométrica (Pacheco, 2010).



Sixto (2019) en el laboratorio de cinética enzimática del Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec en México, implementó un bioproceso fermentativo mixto secuencial para la obtención de quitina a partir de desechos de cáscara de camarón sin cola y cabeza, empleando una bacteria productora de ácido láctico (*Lactobacillus delbrueckii*) para la DM y una bacteria productora de proteasas (*Bifidobacterium lactis*) para la DP.

Por otro lado, las quitin desacetilasas (QDAs) pueden convertir la quitina a quitosano al retirar los grupos acetilo de la quitina. Esto mediante un mecanismo de desacetilación enzimática, que genera un ataque múltiple al grupo amino de las unidades monoméricas de acetil glucosamina de la quitina. Con ello, es posible producir quitosano de alta calidad. Las QDAs se identificaron por primera vez en el hongo *Mucor rouxii*, posteriormente se obtuvieron mediante la caracterización y purificación de otros hongos, tales como: *Mortierella*, *Rhizopus*

circinans, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Penicillium oxalicum*, *Absidia caerulea*, *Aspergillus flavus*. (Jinlong y col., 2020). En la Figura 5 se muestra la reacción de desacetilación por parte de la QDA sobre la quitina.

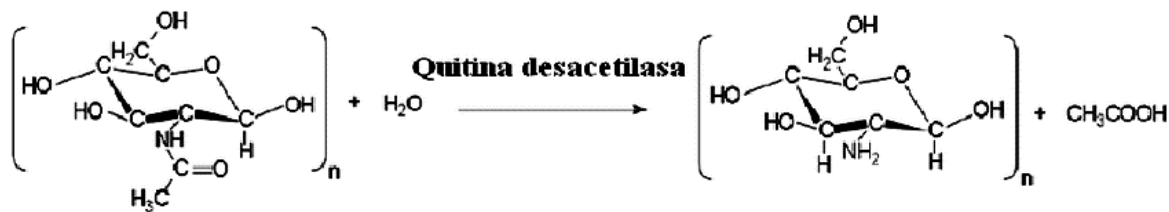


Figura 5. Reacción de desacetilación enzimática (Tsigos et al. 2000).

Karthik y col., (2016) implementaron un método de producción de QDAs a partir de fermentaciones con *Apergillus flavus*, mostraron el efecto que tiene el pH inicial, la temperatura de incubación, el efecto de la glucosa, el tiempo de incubación, la adición de iones metálicos sobre la producción de un extracto crudo enzimático rico en QDAs. Yonis y col., (2019) optimizaron la producción de QDAs por *Aspergillus flavus* a través del pH y T.

Zhao y col., 2010 observaron que la DA de la quitina es menos eficiente si a la quitina cristalina no se le realiza un pretratamiento previo, por lo que para mejorar la accesibilidad de la quitin-desacetilasa a los grupos acetilo de la quitina cristalina natural, es necesario realizar un tratamiento previo con métodos físicos o químicos, tales como sonicación, molienda, calentamiento y derivación e interacción con sacáridos (Zhao y col., 2010).

1.6 Efecto de pretratamiento ultrasónico a quitina previo a desacetilación

La aplicación de ultrasonido a baja temperatura intensifica significativamente el proceso de DA de la quitina y resulta en un alto rendimiento de quitosano de bajo peso molecular. La DA ultrasónica da como resultado un quitosano de calidad superior que se utiliza como ingrediente alimenticio y farmacéutico, como fertilizante y en muchas otras aplicaciones industriales. Kjartansson y col. (2008), encontraron que la sonicación mejora drásticamente la conversión de quitina a quitosano.

La ecografía de alta potencia promueve la conversión de quitina a quitosano, ya que el disolvente se fragmenta y penetra en las partículas sólidas de quitina, ampliando así la

superficie de contacto y mejorando la transferencia de masa entre la fase sólida y la líquida. Las elevadas fuerzas de cizallamiento de la cavitación ultrasónica crean radicales libres que aumentan la reactividad del reactivo durante la hidrólisis. Como técnica de procesamiento no térmica, la sonicación impide la degradación térmica produciendo un quitosano de alta calidad. Los ultrasonidos acortan los tiempos de procesamiento necesarios para extraer la quitina de los crustáceos, así como para producir quitina y quitosano de mayor pureza en comparación con las condiciones de procesamiento tradicionales (Sarabia y col., 2015).

1.7 Aplicación de la quitina y quitosano

Los grupos funcionales amino e hidroxilo presentes en el quitosano pueden someterse fácilmente a una derivación química, permitiendo la manipulación de propiedades mecánicas y de solubilidad, esto mismo permite que el quitosano este presente en una gran cantidad de aplicaciones. La quitina y el quitosano pueden existir en diferentes formas aplicadas, como lo son hidrogeles, películas, membranas, nano fibras, micro perlas, nanopartículas y esponjas (Rejane y col., 2009). En la Figura 6 se muestra un gel de quitosano empleado en la producción de películas bio-poliméricas.

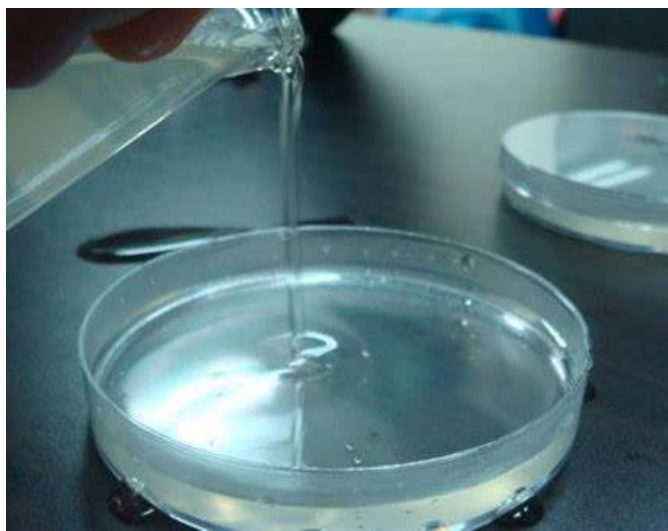


Figura 6. Gel de quitosano con aplicaciones biomédicas (Fa Tan Lai et Col, 2021).

1.7.1 Aplicaciones de quitina y quitosano en los alimentos

En la industria alimentaria la quitina y el quitosano tienen uso como aditivos en los alimentos (espesantes, gelificantes y emulsificantes), en recubrimientos protectores comestibles y en procesos industriales como la recuperación de proteína de desechos de ovoproductos para alimentación animal (Hernández, 2004). De igual manera, el quitosano es empleado como clarificadores en industrias de bebidas (agua, vino, zumo de manzana y zanahoria), sin afectar el color (Knorr, 1991).

1.7.2 Aplicación de quitina y quitosano en tratamiento de agua

Entre los principales usos en esta área se tiene: como coagulante primario para aguas residuales de alta turbidez y alcalinidad (Hernández, 2004). Es utilizado como floculante para remoción de partículas coloidales sólidas y aceites, y para la captura de metales pesados y pesticidas en soluciones acuosas (Lárez, 2006). Otra aplicación del quitosano es la inmovilización de los microorganismos o lodos en matrices de quitosano, para el tratamiento de aguas residuales en condiciones ambientales extremas (pH extremo y presencia de disolventes orgánicos), permitiendo la reutilización de células y por lo tanto su implementación en procesos continuos (Arbia y col., 2010). En la Figura 7 se observa un proceso de tratamiento de agua empleando quitosano.



Figura 7. Tratamiento de aguas residuales empleando quitosano (Álava.2015).

1.7.3 Aplicación de quitina y quitosano en agricultura

La quitina y el quitosano son efectivos en el control de enfermedades y plagas vegetales. Pueden actuar sobre el organismo patógeno, o inducir mecanismos defensivos en las plantas, contra varias enfermedades vegetales antes y después de la cosecha. Favorece el crecimiento y la actividad de muchos organismos quitinolíticos, por un efecto sinérgico. Estos constituyen controles biológicos y enemigos naturales de muchos agentes causales de enfermedades y plagas vegetales. Además, favorecen el crecimiento y desarrollo de microorganismos beneficiosos que establecen relaciones simbióticas con las plantas, tales como las micorrizas o especies del género *Rhizobium*. A su vez, incrementan la población y la actividad microbiana en el suelo, lo que mejora la disposición de nutrientes y sus propiedades. Como reguladores del crecimiento, aceleran la germinación de las semillas, el vigor de las plantas, y el rendimiento agrícola. Por tanto, por su gran potencial de aplicación en la agricultura, se augura que se utilizarán con una mayor extensión, principalmente como sustitutos de los actuales plaguicidas químicos o como reguladores del crecimiento de las plantas (Ramírez y col., 2010).

1.7.4 Aplicación de quitina y quitosano en biomedicina

La quitina y el quitosano son excelentes accesorios biológicos, por su no toxicidad y la posibilidad de biodegradación en el cuerpo humano, la biocompatibilidad y sus características inmunológicas, antibacterianas, de cicatrización de heridas y actividad hemostática en cultivos celulares e ingeniería de tejidos, y la administración de fármacos, ya que es altamente biocompatible y biodegradable en entornos fisiológicos. La quitina también se puede utilizar como excipiente y portador de medicamentos en forma de películas, gel o polvos, para aplicaciones que implica muco adhesividad. Recientemente se demostró que los oligómeros de quitina y quitosano tienen actividad antitumoral y regulatoria antibacteriana y antifúngica (Miranda y col., 2012). En la Figura 8 se muestra un producto a base de quitosano empleado en el tratamiento de quemaduras, así como su aplicación.



Figura 8. Apósito de quitosano comercial (A), apósito de quitosano colocado sobre quemadura (B) (Foryou Medical,2021).

1.7.5 Aplicación de quitina y quitosano en cosméticos

El quitosano y sus derivados se utilizan como un componente de diferentes productos de uso personal: pasta de dientes, cremas para manos y cuerpo, y cuidado del cabello. Estos biopolímeros también fueron investigados como ingredientes de formulaciones cosméticas, especialmente adecuados para productos enfocados a la piel sensible (Horner y col., 1997). El quitosano tiene un efecto hidratante sobre la piel, que depende de la molécula, peso y grado de desacetilación, ya que ofrecen protección contra el cabello dañado mecánicamente y exhiben un efecto anti electrostático en el cabello. Debido a su alto peso molecular, el quitosano aumenta la resistencia al agua de emulsiones que protegen contra la irradiación solar y, en consecuencia, mejoran su capacidad de formación de película.

Los líquidos y las pastas dentales que contienen quitosano disminuyen la permeabilidad a la dentina. El quitosano está presente en tales productos en forma de hidrogel, puede ayudar a sellar microtubos dentales y proteger contra infecciones microbianas y a su vez mantienen la difusión beneficiosa de iones y agua (Pawllowska,1997). En la Figura 9 se muestra la campaña publicitaria de Othniel, presentando su nueva línea de productos a partir de quitosano.

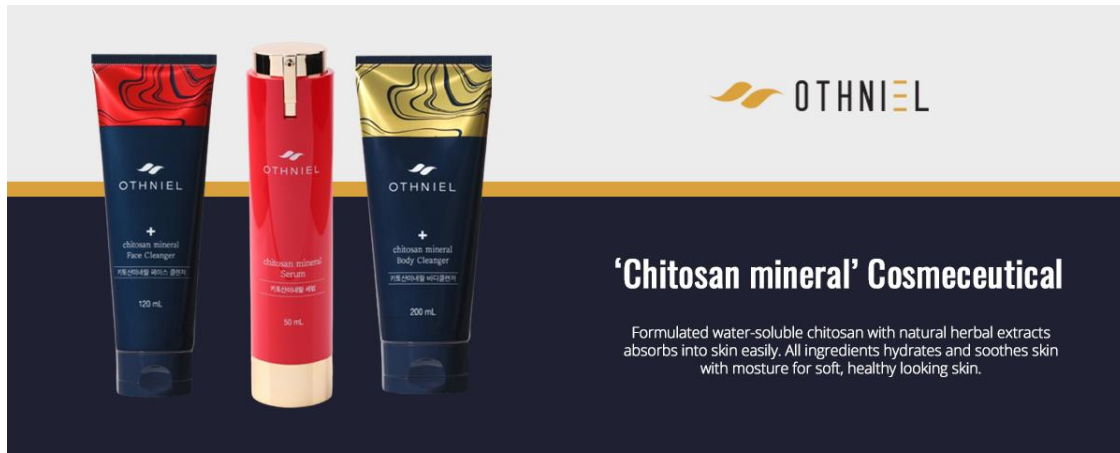


Figura 9. Publicidad de empresa surcoreana especializada en cosmetología dermatológica a base de quitosano.

1.7.6 Aplicación de quitina y quitosano en textiles

La quitina y sus derivados se pueden utilizar en la industria textil para la producción de fibras artificiales y como acabados de fibras textiles, recubrimientos y auxiliares textiles (Wieczorek y col., 1997). El uso de tales fibras modificadas incluye la producción de apósitos para heridas, textiles quirúrgicos, absorbentes sanitarios y no alergénicos, desodorizantes y antimicrobianos de ropa interior, ropa deportiva y calcetines. La adición de quitina en el recubrimiento de impermeables textiles provoca un gran aumento en su impermeabilidad al vapor. Además, el acabado de fibras de lana con derivados de quitina mejora el teñido y solidez de color (Synowiecki y col., 2003).

OBJETIVOS

Objetivo General

Desarrollar un método experimental que comprenda las etapas biológicas de desmineralización (DM), desproteínización (DP) y desacetilación (DA) de desechos de camarón para la obtención de quitosano

Objetivos Particulares

1. Obtener quitina (DM y DP) a partir del proceso experimental propuesto por Sixto 2019.
2. Estudiar el proceso de producción de quitin-desacetilasas (QDAs) provenientes de la cepa fúngica de *Aspergillus niger*.
3. Definir la estabilidad de un extracto crudo enzimático rico de deacetilasas en función de la temperatura y pH.
4. Comprender el efecto de un pretratamiento ultrasónico en el proceso de desacetilación enzimática de quitina.
5. Estudiar el bioproceso de obtención de quitosano a nivel biorreactor bajo las condiciones definidas en el punto 3 y 4.

2. METODOLOGIA

2.1 Materiales y métodos

2.1.1 Obtención y tratamiento de residuos de camarón.

La obtención de los residuos de camarón consistió en solicitar a cadenas de restaurantes locales la separación del desperdicio de camarón, el cual se recogería semanalmente. Es importante mencionar que la especie de camarón predominante en los establecimientos es el *Litopenaeus vanname*. Posteriormente, el desperdicio fue sometido a una selección minuciosa para reducir la presencia de carne, cabeza, cola y extremidades inferiores o cualquier agente externo adherido al exoesqueleto. Una vez seleccionados los caparazones del camarón (desecho) fueron lavados con agua común sin utilizar detergente alguno; terminado la etapa de lavado, la cáscara se secó a temperatura ambiente y se trituró con ayuda de un molino mecánico, con la finalidad de reducir el tamaño de partícula hasta 2mm aproximadamente. El material se almacenó en un lugar libre de humedad para evitar su contaminación y descomposición. El aspecto de las distintas fases del tratamiento se muestra en la Figura 10.

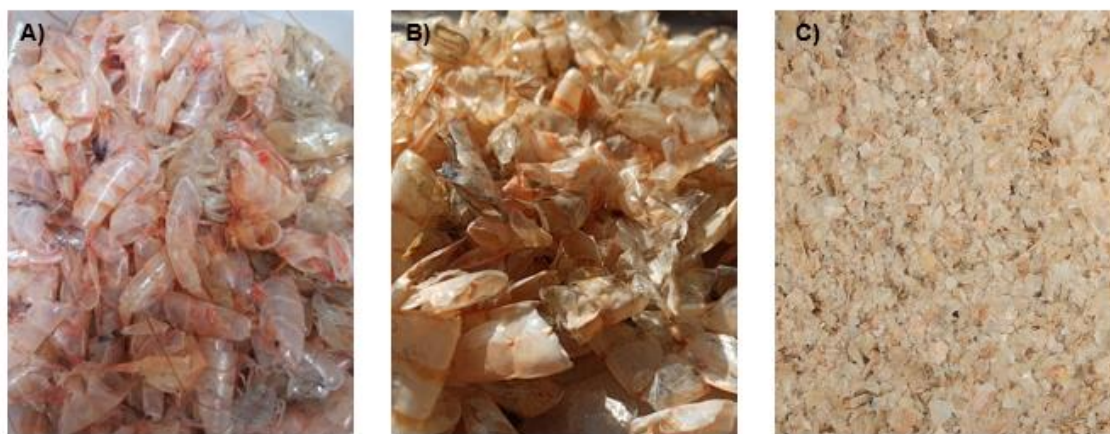


Figura 10. Cáscara de camarón sucia (A), cáscara de camarón seleccionada, lavada y seca (B) y cáscara de camarón seca molida (C).

2.1.2 Preparación de medios de cultivo

Los microorganismos que se utilizaron en el presente trabajo fueron cepas de bacterias lácticas (BALs) y el hongo *Aspergillus niger*. Las cepas BALs fueron *Bifidobacterium lactis*

y *Lactobacillus delbrueckii*, que se sembraron en placas de agar con medio MRS. *Aspergillus niger* se sembró en placas de agar con medio papa dextrosa.

2.1.3 Medio MRS (Man, Ragosa y Sharpe)

Se preparó medio MRS suficiente para 10 cajas Petri, previamente esterilizadas. La formulación del medio de cultivo fue la siguiente: agar MRS 19.25 g, Agar bacteriológico 4.2 g y agua destilada 350 mL. Una vez disueltos los agares en agua destilada, la solución se esterilizó en una autoclave a una presión de 15 psi durante 15 minutos. Finalmente, la solución estéril se vertió en las cajas Petri con las debidas medidas de inocuidad para prevenir problemas de contaminación del medio. En la Figura 11 se muestra el aspecto del medio MRS posterior a su esterilización.



Figura 11. Medio de cultivo MRS estéril.

2.1.4 Medio de agar papa dextrosa (PDA)

Se preparó medio suficiente para 4 matraces Erlenmeyer de 250 mL de capacidad con 50 mL de agar papa dextrosa en cada uno; la formulación del medio de cultivo para cada matraz es la siguiente: agar papa dextrosa 1.95 g, disuelto en 50 mL de agua destilada. Una vez disuelto el agar papa dextrosa en el volumen de agua destilada correspondiente a cada sistema, se tapó con un tapón de algodón y se esterilizó en una autoclave bajo la condición de 15 psi durante 15 min. Finalmente se dejó enfriar procurando no perder la esterilidad, hasta que el agar solidificó.

2.1.4.2 Medio mínimo

Este medio de cultivo se utilizó en las fermentaciones mixtas secuenciales para DM y DP los residuos de cáscara de camarón. La formulación del medio mínimo fue la siguiente: Extracto de levadura 25g, fosfato de amonio $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ 5g y sulfato de manganeso (MnSO_4) , 0.25g, disueltos en 1900 mL de agua destilada. Esta formulación es dada en función al volumen total del biorreactor de 2.7 L. En la Figura 12 se muestra el aspecto del medio mínimo empleado en la FMS.

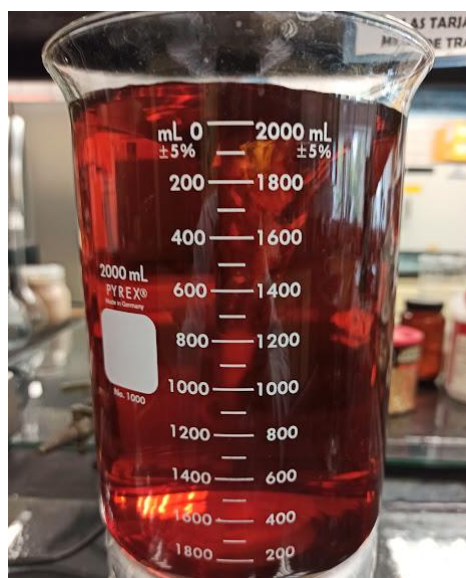


Figura 12. Medio mínimo empleado en la fermentación mixta secuencial.

2.1.5 Preparación de inóculo

Las bacterias que se utilizaron en el estudio son consideradas bacterias lácticas; *Bifidobacterium Lactis* y *Lactobacillus delbrueckii*, comparten su afinidad por crecer en medio MRS (por las siglas de sus inventores: Man, Rogosa, Sharpe, 1960). A su vez el medio permite que las bacterias puedan ser sembradas y resembradas periódicamente observando un crecimiento favorable. El inóculo se generó a partir de la adición de asadas provenientes de una caja Petri con un buen crecimiento de las bacterias a un matraz Erlenmeyer que contenía el medio líquido MRS. Las condiciones de incubación que favorecen el crecimiento de las bacterias lácticas son: temperatura de 38 °C, durante un periodo de 48 h. A su vez, el

crecimiento bacteriano se ve favorecido en presencia de una agitación constante durante el tiempo de crecimiento entre valores de 200 rpm y 300 rpm. En la Figura 13 se muestran los inóculos de cada bacteria con su respectivo crecimiento bacteriano trascurridas 48 h.

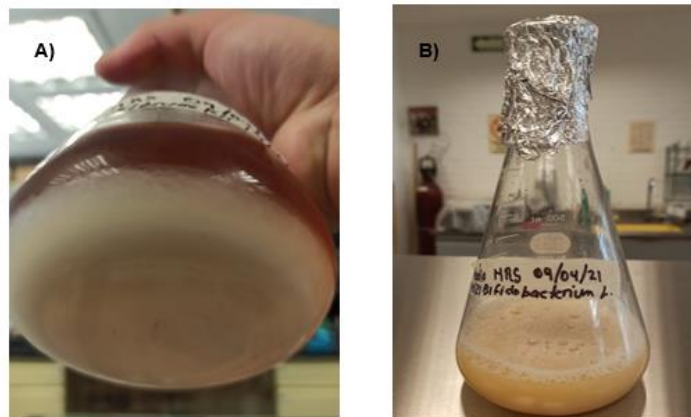


Figura 13. Inoculo de la bacteria *Lactobacillus delbrueckii* (A), inoculo de la bacteria *Bifidobacterium lactis* (B).

2.2 Desmineralización y desproteinización de la cáscara de camarón

Durante la experimentación se utilizó cáscara de camarón sin cabeza y cola (CSCC), para el proceso de desproteinización (DP) y desmineralización (DM) y se utilizó una relación de 10% (p/v) de cáscara de camarón. Los microorganismos encargados de realizar dichos procesos fueron las bacterias lácticas *Lactobacillus delbrueckii* productora principalmente de ácido láctico y *Bifidobacterium lactis* productora de enzimas proteolíticas.

Desarrollo de la fermentación mixta secuencial a nivel biorreactor

El proceso de DM y DP de la CSCC se llevó a cabo en un biorreactor de tanque agitado de 3 L desarrollando un cultivo intermitente (Applikon Biotechnology ®). Las mejores condiciones para la DM y DP fueron obtenidas mediante un estudio previo realizado por Sixto (2019). En primera instancia se pesó la CSCC seca (10% (p/v)), posteriormente se le adicionó medio mínimo previamente preparado. Una vez adicionados todos los componentes en un matraz Erlenmeyer, se esterilizó en una autoclave bajo la condición de 15 psi durante 15 min. Este paso es de suma importancia, ya que así se eliminan bacterias o microorganismos ajenos a los empleados en la fermentación. Es importante realizar, previo a la inoculación, una desinfección del biorreactor con alcohol o solución desinfectante, así como el área de trabajo para impedir cualquier tipo de contaminación.

Una vez considerado todo lo anterior, se vertió la mezcla de CSCC y el medio mínimo al biorreactor, siempre conservando la esterilidad. De igual forma, se adicionó una solución de glucosa previamente esterilizada (125 g de glucosa disuelta en 200 mL de agua destilada) y el primer inóculo perteneciente a la bacteria *Lactobacillus delbrueckii*. Es importante mencionar que esta bacteria provoca una disminución del valor de pH del sistema, y para favorecer la descalcificación de la cáscara es vital que el sistema no disminuya debajo del valor de $\text{pH} = 4.0 \pm 0.2$. Luego de 24 h de la adición del inóculo de *Lactobacillus delbrueckii*, se incrementó el pH de la fermentación a 6.5 con la adición de NaOH 10.0 M y se inoculó con la bacteria *Bifidobacterium Lactis* para así continuar con la etapa de desproteinización, hasta alcanzar las 96 h totales.

El biorreactor en esta segunda etapa de inoculación siempre debe de mantenerse bajo las condiciones de operación de 40°C , $\text{pH} = 6.5 \pm 0.2$ y una agitación constante iniciando con 800 rpm y disminuyendo progresivamente hasta 400 rpm al final de la fermentación. Se realizó un muestreo del biorreactor cada 2 h desde el tiempo cero hasta el final de la fermentación a las 96 h. En la Figura 14 se muestra el arreglo del biorreactor durante la obtención de quitina.

Las muestras se sometieron a centrifugación para separar la fase sólida (biomasa y cáscara) de la fase líquida. A la fase sólida se les determinó el contenido de proteínas, calcio y biomasa; mientras que a la fase líquida se le determinó el contenido de azúcares reductores, ácido láctico, proteína y calcio. Las técnicas empleadas para llevar a cabo las determinaciones se describen más adelante en este capítulo.

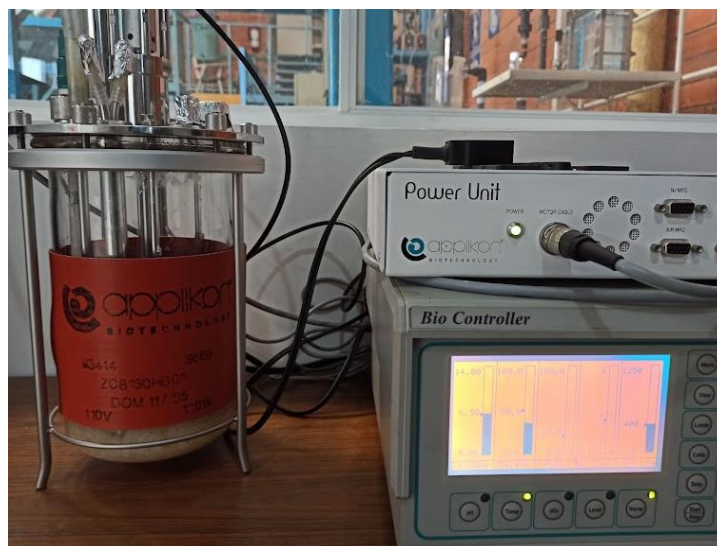


Figura 14. Obtención de quitina a partir de una fermentación mixta secuencial en biorreactor de tanque agitado marca Applikon equipado con controlador Bio Controller.

2.3 Desacetilación de la quitina obtenida posterior a la desmineralización y desproteinización.

El proceso de desacetilación (DA) es fundamental a la hora de obtener quitosano. El microorganismo utilizado para obtener desacetilasas pertenece a una cepa de *Aspergillus niger*, este hongo fue obtenido mediante la resiembra periódica. El hongo se cultivó en matraces erlenmeyer estériles de 250 mL con 50 mL de agar PDA, adicionando a cada matraz 100 μ L de la suspensión madre de esporas. Una vez sembrados, los sistemas se incubaron a una temperatura de 37°C. Pasado algunos días y observando un correcto crecimiento del hongo, se recolectaron las esporas obtenidas, mediante un barrido con 50mL de solución salina (NaCl al 0.9% p/v). Para el barrido se empleó un agitador magnético sobre una parrilla de agitación, como se muestra en la Figura 15.

La suspensión de esporas obtenidas es adicionada al siguiente matraz colectando así las esporas de cada sistema. Esta operación se repitió hasta tener una suspensión con las esporas de los 5 matraces cultivados. La suspensión de esporas obtenidas se almacenó en un tubo estéril y se refrigeró hasta su uso. Se realizó un conteo de esporas para determinar aproximadamente la cantidad de esporas presentes por mililitro de solución, se llevó a cabo una dilución 1:20 para facilitar el conteo, la concentración final de la solución fue de

$2.19 \times 10^8 \frac{esp}{mL}$. La concentración deseada en cada sistema es de $1 \times 10^6 \frac{esp}{mL}$, por lo que se adicionó el volumen necesario para alcanzar esta condición.



Figura 15. Recolección de esporas de *Aspergillus niger*.

2.4 Caracterización del método para la obtención de quitin desacetilasas

Se utilizó la cepa *Aspergillus niger* como productora de quitin desacetilasas. Sin embargo, inicialmente se caracterizó el método de obtención del extracto enzimático debido al desconocimiento de las condiciones óptimas para llevar a cabo la producción de quitin desacetilasas (QDAs). La producción del extracto crudo enzimático rico en quitin desacetilasas (ECEQDAs), se desarrolló mediante un diseño compuesto central (DCC) en matraces de 250 mL con 50 mL de medio. Las variables que se consideraron en el diseño compuesto central fueron (con valores inferior, -1, y superior, +1) la relación CCSCC:glucosa (75:25 y 25:75), la concentración de extracto de levadura (5 y 15 g L⁻¹) y el pH inicial del medio (5 y 9).

Los resultados obtenidos del DCC se analizaron con Design Expert, el parámetro que se consideró para reconocer la eficiencia de la producción enzimática fue la cuantificación de la actividad del extracto enzimático. Las fermentaciones se llevaron a cabo en matraces de 250 mL, en los cuales se adicionó 0.5g de cáscara de camarón en presencia de 50 mL de medio basal, posteriormente se esterilizó la solución y fue inoculada con $2.19 \times 10^8 \frac{esp}{mL}$ de

Aspergillus niger. En la Figura 16 se muestran los sistemas definidos por el DCC trascurridas 48 h de fermentación.



Figura 16. Sistemas propuestos por el DCC trascurridas 48 h de fermentación.

2.5 Obtención de extracto crudo enzimático rico en desacetilasas a nivel biorreactor

Habiendo caracterizado el método de obtención del ECEQDAs, se buscó el escalamiento del proceso a nivel biorreactor; se utilizó un biorreactor de tanque agitado intermitente de 1 L (Applikon Biotechnology ® con controlador *Applikon Ez-Control bioreactor*). Se adicionaron 70 g de CSCC sumergida en 700 mL de medio basal. Se esterilizó la mezcla y se inoculó con 4.6 mL de una solución de *Aspergillus niger* con una concentración de $2.19 \times 10^8 \frac{esp}{mL}$. La fermentación se llevó a cabo a una temperatura de 37 °C, una oxigenación del 79%, un pH= 7.0 y una agitación constante de 200 rpm. El tiempo de fermentación fue de 96 h.

Terminada la fermentación, se separó la fase sólida presente en el biorreactor del extracto enzimático, se cuantificó la actividad del extracto enzimático para corroborar la presencia de actividad enzimática, finalmente se congeló el extracto enzimático con la finalidad de conservar sus propiedades hasta su uso. En la Figura 17 se muestra las fases del proceso para la obtención de ECEQDAs.

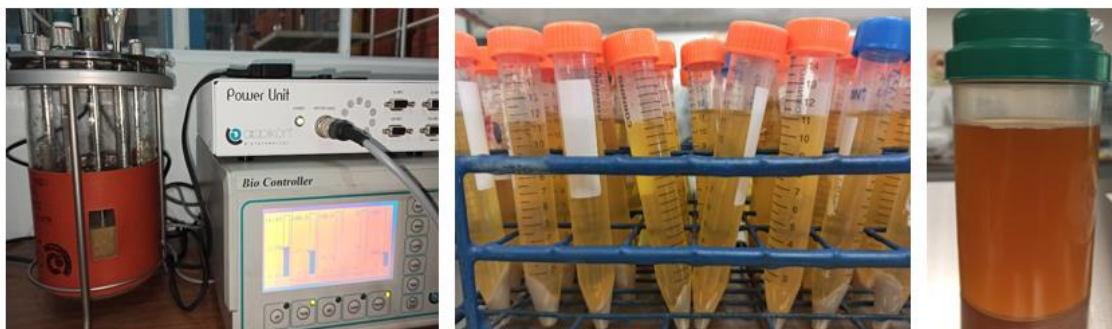


Figura 17. Producción de extracto crudo enzimático a nivel biorreactor (izquierda), extracto crudo enzimático centrifugado (centro), almacenamiento de extracto crudo enzimático (derecha).

2.6 Identificación de pH y T óptimos para la reacción enzimática del ECEQDAs y su estabilidad a la variación de T, pH

Habiendo obtenido el ECEQDAs, se procedió a determinar la temperatura y pH óptimos para la reacción catalizada por la enzima, así como la estabilidad del extracto a diferentes valores de pH y temperatura y a la presencia de diferentes metales. La T óptima se analizó incubando la reacción enzimática en el intervalo de 30 a 70 °C, utilizando un regulador de citratos de fosfatos a 200 mM pH 7. Posteriormente se cuantificó la actividad enzimática del ECEQDAs a diferentes valores de pH (3 a 7), incubando la reacción a la temperatura óptima. Se analizó la estabilidad del ECEQDAs a partir de la cuantificación de la actividad residual de QDAs presente en diferentes alícuotas de ECEQDAs, incubadas a diferentes temperaturas (30 a 70 °C) o en contacto con soluciones de diferentes valores de pH (3-9) durante 8 h, muestreando cada 2 h. En todos los casos, la actividad enzimática de QDA se cuantificó mediante la técnica propuesta por Sung et al (2013)

2.7 Caracterización del método experimental para la desacetilación de quitina mediante la adición de extracto enzimático

Habiendo obtenido el ECEQDAs y corroborando que contará con una actividad enzimática óptima, se desarrolló el método de obtención de quitosano a partir de la quitina utilizando el ECEQDAs, previamente obtenido. Se prepararon 24 sistemas de 20 mL de capacidad, de los cuales 8 fueron sometidos a un pretratamiento de un único choque ultrasónico con una frecuencia de 40 KHz, temperatura de 40° C durante 15 min previo a la adición ECEQDAs. Otro grupo de 8 tubos fueron sometidos a un doble choque ultrasónico a la misma frecuencia por 15 minutos previo a la adición del ECEQDAs y un segundo choque ultrasónico después

de 6 h de reacción. Finalmente, 8 sistemas no fueron sometidos a ningún choque ultrasónico. Cada sistema se componía de 1 g de quitina, 18 mL de solución reguladora de fosfatos a 0.2 M con pH= 7.0 y 2 mL de extracto enzimático. En la Figura 18 se muestra el equipo utilizado para llevar a cabo el choque ultrasónico.

Una vez preparados todos los sistemas, se incubaron a una temperatura de 50°C y una agitación constante de 200 rpm durante 24 h. A lo largo del transcurso de la experimentación se realizó un muestreo, extrayendo un sistema de cada tipo de pretratamiento cada 2 h hasta completar con el tiempo de fermentación. Pasado este tiempo, el material sólido residual se lavó con agua común y se cuantificó el grado de desacetilación (GDA) por medio del método de titulación potenciométrica propuesto por De Alvarenga, 2011; Hidalgo y Miranda. 2013. Con la finalidad de observar la eficiencia del ECEQDAs sobre la desacetilación de la quitina, el material residual se sometió a un análisis de espectroscopia de infrarrojo y se comparó con un espectro de referencia reportado en la literatura.



Figura 18. Baño de ultrasonido con capacidad de 6 L empleado durante el pretratamiento ultrasónico.

2.8 Determinación del tiempo de choque ultrasónico

Habiendo demostrado el efecto del pretratamiento ultrasónico a la quitina, el cual favorece la conversión a quitosano, se prepararon 12 sistemas adicionales. Estos contenían 1g de

quitina, obtenida previamente mediante una fermentación mixta secuencial, y 18 mL de regulador de fosfatos pH 7. El grupo de sistemas se dividió en 6 pares, cada par fue sometido a diferentes tiempos de choque en intervalos de 0 min, 30 min, 1 h, 1.5 h, 2 h y 2.5 h, respectivamente. Pasado el tiempo de choque, se inocularon con 2 mL de ECEQDAs y se incubaron durante 48 h a 50 °C. El material resultante de cada sistema fue lavado y analizado mediante la técnica potenciométrica (De Alvarenga, 2011; Hidalgo y Miranda. 2013) para determinar el GDA. En la Figura 19 se muestra el lavado del material resultante del proceso de DA.



Figura 19. Lavado del material resultante de la desacetilación con pretratamiento ultrasónico.

2.9 Obtención de quitosano en fermentación sumergida a nivel biorreactor

Luego de identificar las condiciones óptimas para llevar a cabo la DA de la quitina previamente obtenida, se desarrolló el escalamiento del proceso de desacetilación a nivel biorreactor. Para esto se utilizó un biorreactor de tanque agitado de 3 L (Applikon Biotechnology ®) con 65 g de quitina sumergidos en 1.2 L de solución reguladora de fosfatos pH 7. Se sometió a un choque de 40 KHz a 40 °C durante 2.5 h. Transcurrido el tiempo de choque, se adicionó al biorreactor 130 mL de ECEQDAs. La DA se llevó a cabo durante un

tiempo de reacción de 48 h, bajo las condiciones de 50 °C, una agitación constante de 500 rpm y pH 7. El material resultante fue sometido a un lavado y secado previo a su análisis. En la Figura 20 se muestra la mezcla de reacción al final del proceso (Fig. 20 A) y el aspecto que adquirió el quitosano lavado (Fig. 20 B).

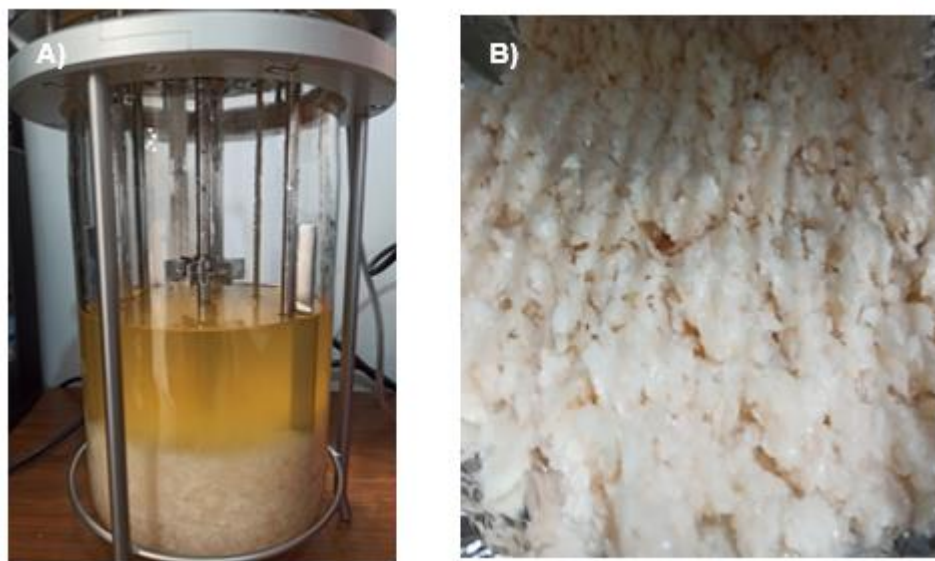


Figura 20. Desacetilación enzimática a nivel biorreactor (A), material resultante de la desacetilación enzimática.

2.10 Técnicas analíticas

2.10.1 Determinación de pH

Todas las determinaciones de pH se obtuvieron con un medidor multiparamétrico de la marca Waterproof PCS Testr 35, capaz de medir pH, temperatura y conductividad. El cual previo a su uso fue calibrado con solución buffer de pH 7.

2.10.2 Cuantificación del contenido de ácido láctico

El contenido de ácido láctico en el sobrenadante se determinó por el método descrito por Borshchevskaya (2016). Es importante considerar que el sobrenadante fue previamente sometido a una centrifugación y a una dilución 1:10. La técnica estipula que a 50 μ L de cada una de las disoluciones se le agregó 2 mL de cloruro de hierro (FeCl_3) al 0.2 % (p/v); la absorbancia fue registrada a 390 nm, el valor de frecuencia fue calibrado utilizando un blanco de agua destilada en lugar de muestra. Las lecturas de absorbancia obtenidas fueron

transformadas a concentración por medio de una curva patrón de ácido láctico. Los resultados de esta curva se encuentran en el ANEXO 1.

2.10.3 Cuantificación del contenido de calcio en el sobrenadante

La cuantificación de calcio presente en las muestras líquidas se realizó a través de la técnica de EDTA. Cuando el pH es lo suficientemente elevado para que el calcio precipite en forma de hidróxido, se emplea murexida. La murexida es una sal común del ácido purpúrico ($C_8H_8O_6N_6 \cdot H_2O$) a su vez juega un papel de indicador que reacciona en presencia de calcio. En el punto de viraje cuando todo el calcio forma un complejo con el EDTA a un pH de 12 a 13, el indicador cambia de color rosado a purpura.

Para llevar a cabo la cuantificación de calcio en el líquido, se utilizaron 2 mL de muestra y se diluyeron en 68 mL de agua desionizada. La disolución fue ajustada hasta valores de pH de 12 a 13 con la adición de solución de NaOH a 6M, posteriormente se adicionó 1mL de trietanolamina, $C_6H_{15}NO_3$, y 5 gotas de murexida. La solución titulante de EDTA al 0.01M se incorporó mediante disparos de 20 μ L, agitando continuamente hasta el punto de vire de la reacción, indicado por un color purpura permanente. La curva patrón obtenida se muestra en el ANEXO 2. Para determinar el contenido de calcio en las muestras líquidas se utilizó la siguiente ecuación:

$$mg/L_{Ca} = (mL_{EDTA} * 0.01 * 40.1 * 1000) / mL_{muestra}$$

Donde:

0.01 = Normalidad del EDTA

40.1 = PM del Ca

1000 = factor de conversión para convertir el volumen de muestra de mL a L

2.10.4 Cuantificación de azúcares reductores en el sobrenadante

La cuantificación de azúcares reductores se llevó a cabo mediante la técnica de DNS (Miller 1959). La técnica establece que a 1 mL de la muestra debidamente diluida se adicionan 2 mL del reactivo DNS, posteriormente someter la mezcla a ebullición durante 5 min. Transcurridos esos 5 min se adiciona 5 mL de agua destilada y se registra su lectura a 575 nm utilizando un espectrofotómetro. El equipo fue calibrado previamente con un blanco

preparado con agua como sustituto a la muestra a analizar, pero igualmente sujeta al mismo tratamiento.

Las lecturas de la muestra se compararon con las de una curva patrón de glucosa, con una concentración máxima de 1 g/L. La curva patrón obtenida se muestra en el ANEXO 3.

2.10.5 Cuantificación de proteína en el sobrenadante.

La cuantificación de proteína en el sobrenadante se realizó mediante la técnica de Bradford, realizando ligeras modificaciones. En cada sistema se adicionaron 0.75 mL de la muestra debidamente diluida y 0.75 mL del reactivo de Bradford, se registró la lectura de absorbancia a la 595 nm en el espectrofotómetro UV-vis transcurridos 2 min de haber llevado la reacción. Las lecturas de la muestra se compararon con las lecturas de una curva patrón de albumina bovina en una concentración máxima de 150 µg/mL (Bradford, 1976).

Previo a llevar a cabo las mediciones se calibro el equipo a cero, con una mezcla de 0.75 mL de agua destilada y 0.75 mL de reactivo de Bradford. La curva patrón obtenida se muestra en el ANEXO 4.

2.10.5 Cuantificación de proteasas

La cuantificación de proteasas se realizó mediante la técnica propuesta por Castro y Sato (2014). La actividad de proteasas puede medirse con el uso de caseína o albumina de suero bovino como sustrato. Se agregaron 5 mL de sobrenadante a 5 mL de solución de albumina de suero bovino al 1% p/v, disuelta en regulador 100 mM de citratos-fosfatos con un pH de 5.0. Dicha mezcla se incubó a 50 °C durante 20 min. La reacción se detuvo agregando 0.5 mL de ácido tricloroacético al 20% p/v, para precipitar la proteína no hidrolizada. Se dejó enfriar la muestra y se centrifugó a 1000 rpm, para recuperar la fase líquida, que contiene a los aminoácidos generados por la hidrólisis de la proteína. La tirosina formada por acción de la enzima sobre la albumina se encontraba presente en la fase superior, y se cuantificó al registrar la lectura de esta fase a 280 nm comparando este dato con una curva patrón de tirosina con máximo valor de 50 mg/L. El equipo se ajustó a cero con un blanco en el que se agregaron 0.5 mL de regulador de citratos-fosfatos, para cada muestra se desarrolló un blanco, en el cual la enzima se agregó seguido del ácido tricloroacético, para cuantificar el contenido de tirosina presente en el líquido. La curva patrón de la tirosina se presenta en el ANEXO 5.

Una unidad de actividad de proteasas se definió como la cantidad de enzima que libera 1µg de tirosina bajo las condiciones de reacción.

Los cálculos utilizados para cuantificar esta actividad son:

$$Actividad \left[\frac{U}{mL} \right] = \left(\frac{Y - b}{m} * 2 * Dilución \frac{mg \text{ de tirosina}}{L} \right) \left(\frac{1 L}{1000 mL} \right) \left(\frac{1000 \mu g \text{ de tirosina}}{1 mg \text{ de tirosina}} \right) \left(\frac{1}{15 min} \right)$$

Donde el número 2 en la ecuación anterior se debe a la dilución de la muestra en la mezcla de reacción (0.5 mL de sustrato + 0.5 mL de muestra). Se considera la dilución que puede haberse hecho a la muestra antes de agregarla a la mezcla de reacción. Si no se hace tal dilución, entonces se pone un 1 en ese dato. Al final, 1 U [=] µg de tirosina/min de reacción.

2.10.6 Cuantificación de desacetilasas

La cuantificación de la actividad de desacetilasas se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por Sung y col., 2013 utilizando 4-nitrocetanilidina como sustrato. La mezcla de reacción en cada sistema contenía 0.1 mL de la solución de 4-nitrocetanilidina con una concentración de 200 mg/L, 0.1 mL de la muestra a analizar y 0.3 mL de un regulador de fosfatos con una concentración de 0.2 M pH 7.0. Esta se incubó a 50°C durante 15 min, transcurrido este tiempo los sistemas se sumergieron en agua hirviendo durante 5 min, con la finalidad de inactivar la enzima. Habiendo inactivado la enzima se agregó 1mL de agua y se sometió a una centrifugación a 4000 rpm durante 5 min. Se registró la densidad óptica del sobrenadante resultante a 400 nm, comparando las lecturas contra la curva patrón de 4-nitrocetanilidina en una concentración de 200 µg/mL.

Una unidad de QDA se definió como la enzima que cataliza la liberación de 1.0 µg de 4-nitroanilina por hora a partir del 4-nitroacetanilidina bajo las condiciones de ensayo.

Los cálculos utilizados para cuantificar la actividad son:

$$Actividad \left[\frac{U}{mL} \right] = \left(\frac{Y - b}{m} * 5 * Dilución \frac{\mu g \text{ de } 4 - \text{nitroanilina}}{mL} \right) \left(\frac{1 L}{0.25 h} \right)$$

Donde el número 5 en la ecuación anterior se debe a la dilución de la muestra en la mezcla de reacción (0.1 mL de enzima en 0.5 mL finales de mezcla). De igual forma se debe de considerar la dilución que puede haberse hecho a la muestra antes de agregar está a la mezcla

de reacción. Si no se lleva a cabo ninguna dilución, entonces se pone un 1 en ese dato. Al final, 1 U [=] μ g de 4-nitrianilina/h de reacción.

2.10.7 Cuantificación de Biomasa

Se determinó la concentración aproximada de la biomasa microbiana presente durante los diferentes tiempos de fermentación en términos de pesos seco por unidad de volumen, como sólidos en suspensión. Las células se separaron del líquido por centrifugación y posteriormente de la cáscara mediante lavados con una solución de cloruro de sodio al 0.9 % p/v, cuidando el recuperar la capa superior de los sólidos. La biomasa que se obtuvo se suspendió en 10 mL de agua y se tomó 1 mL de la muestra, la cual se colocó en charolas a peso constante y se secaron a la temperatura de 60°C en la estufa hasta obtener su peso constante. La cantidad de biomasa contenida en cada muestra se determinó mediante la siguiente ecuación.

$$Biomasa \left[\frac{g}{L} \right] = \left(\frac{(\text{peso de la charola con muestra}) - (\text{peso de la charola vacía})}{\text{Volumen de la muestra colocada en la charola}} \right)$$

2.10.8 Cuantificación de grado de desacetilación de quitosano

Se cuantificó el grado de desacetilación (GD) del quitosano mediante el método de titulación potenciométrica propuesto por Hidalgo y Miranda (2015). El quitosano obtenido se sometió un proceso de secado en una estufa a 80 °C hasta alcanzar peso constante. Una vez libre de humedad, se pulverizó en un mortero. Del polvo resultante se pesó 0.1 g y se disolvió en 15 mL de HCl, estandarizado con una concentración de 0.1M \pm 0.02M, bajo agitación constante durante 24h, trascurrido el tiempo se filtró la solución. Se le agregaron 2 gotas de anaranjado de metilo a la solución resultante de la digestión y se valoró con una solución estandarizada de NaOH al 0.1 M \pm 0.2 M, siguiendo la reacción potenciométricamente. La titulación se llevó a cabo adicionando disparos de 200 μ L de NaOH hasta llegar a pH 12, la adición se llevó a cabo bajo agitación constante.

La curva de valoración pH versus volumen de base añadido presentaba dos puntos de inflexión; el primero corresponde a la neutralización del exceso de HCl añadido y el segundo corresponde a la neutralización de los iones amonio del quitosano. El GD de cada muestra, se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$GD = \frac{16.1(Y - X)}{W} * Z$$

Donde GD es el grado de desacetilación del quitosano (%). 16.1 es un valor relacionado al peso del grupo amino (-NH₂) (Balanta y col., 2010), Y punto de inflexión mayor (mL), X corresponde al punto de inflexión menor (mL), W es el peso exacto del biopolímero (g) y Z es la concentración real de la solución de NaOH (M).

2.10.9 Identificación de la quitina y quitosano contenidos en la cáscara por espectroscopía

La quitina obtenida luego del proceso de DM y DP, así como el quitosano obtenido a partir de la DAE de la quitina, se caracterizaron por la técnica de espectroscopia de infrarrojos (IR). Los espectros de infrarrojo se realizaron en fase sólida en un equipo NICO iS10 Thermo Scientific adaptado con un accesorio Smarth Orbit Thermo Scientific.

La muestra pulverizada se colocó directamente en una placa de diamante utilizando una punta de acero inoxidable y se registró la lectura. El espectro de absorción de cada material se comparó con los espectros reportados en la literatura y con muestras de quitina y quitosano grado reactivo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Obtención y caracterización de la materia prima

Para la obtención de quitosano a partir de cáscara de camarón (CSCC) como primer paso se llevó a cabo la obtención de la materia prima, en primera instancia se recolectaron los desperdicios de cáscara de camarón (DCC) en diferentes establecimientos (Figura 21 A). El DCC fue sometido a una selección y lavado minucioso con abundante agua. El lavado se realizó con la finalidad de eliminar la mayor cantidad de impurezas, así como retirar el exceso de carne adherida a la CC (Figura 21 B). La CC se secó al sol y se trituro mediante un molino manual hasta obtener un tamaño de partícula aproximadamente de 2 mm, ya que un tamaño superior a esta medida influye de manera significativa en la DM, pero no en la DP (Rocha-Pino y col., 2008). El tratamiento de la materia prima se muestra en la Figura 21 C.

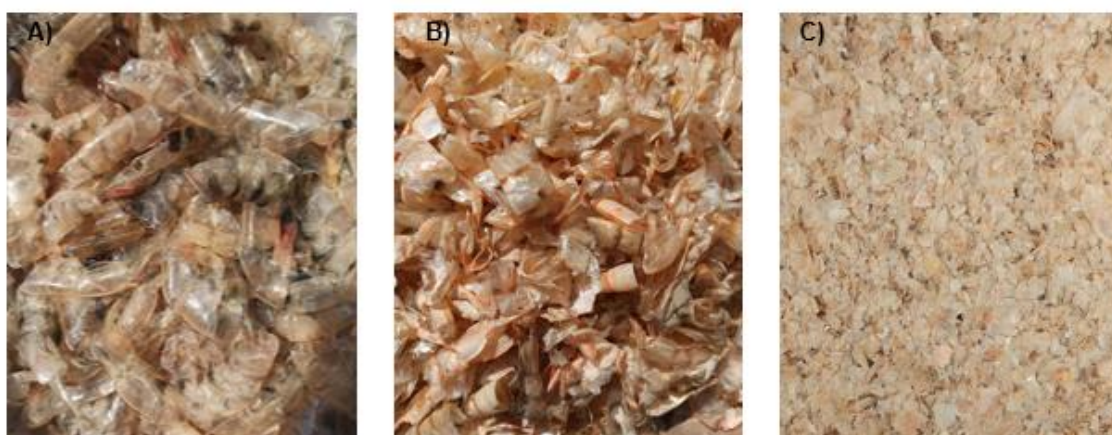


Figura 21. Etapas de la obtención de la materia prima, cáscara de camarón sucia(A), cáscara de camarón lavada y seca (B), cáscara de camarón triturada (C)

3.2 Obtención de quitina mediante una fermentación mixta secuencial desarrollada a nivel biorreactor

A partir del bioproceso propuesto por Sixto 2019, se realizó la fermentación mixta secuencial (FMS) en un biorreactor Applikon Biotechnology de 3 L, las condiciones de operación fueron 40°C, pH inicial de 6.5, iniciando con 800 rpm y disminuyendo progresivamente hasta 400 rpm al final de la fermentación, el tiempo de fermentación fue de 96 h.

En la Figura 22 se muestran los resultados obtenidos de la FMS. En la Fig. 22 (A) se observa que a las 15 horas de fermentación *Lactobacillus delbrueckii* consumió prácticamente toda

la glucosa (Glu), como es conocido, una gran cantidad de glucosa se transforma en ácido láctico (AcLac, Fig. 22 B), mientras que otra se incorporará en la síntesis de biomasa (Figs. 22 F y 22 G). En el trabajo de Martínez-Trujillo y col., 2019 se ha reporto que *Lactobacillus delbrueckii* tiene un rendimiento alrededor de 2 g de AcLac por g de glucosa ($Y_{A.L/Glu} = 2.0$). Por lo tanto, en el presente trabajo se tendría que formar por lo menos 90 g de AcLac, en la Fig. 20 B la máxima concentración de AcLac alcanzada es alrededor de 3.5 g/L, esto se debe a que conforme se produce el AcLac, simultáneamente se lleva a cabo la DM de la cáscara de camarón, por consiguiente, se observa un aumento de ión calcio en la fase líquida (Fig. 22 C).

Con respecto al proceso de DP, en la Figura 22 (D) se observa que *Lactobacillus delbrueckii* también tiene la capacidad de producir proteasas, muy probablemente las proteasas que produce *L. delbrueckii* atacan la proteína de las primeras capas de la cáscara, los oligopéptidos liberados y la cantidad de proteína inicial presente en el medio favorecen el crecimiento de biomasa.

En la segunda etapa cuando se inoculó *Bifidumbacterium Lactis*, después de las 24 h de fermentación, se observa un incremento de proteasas y por consiguiente un aumento de proteína en fase líquida (ver Fig. 22 E), indicando una DP de la cáscara, después de las 50 h la actividad de las proteasas comienza a disminuir y, la concentración de proteína disminuye porque la consumen las BALs presentando un aumento en la concentración de biomasa (ver Fig. 22 F), lo cual se comprobó mediante las técnicas de peso seco y densidad óptica .

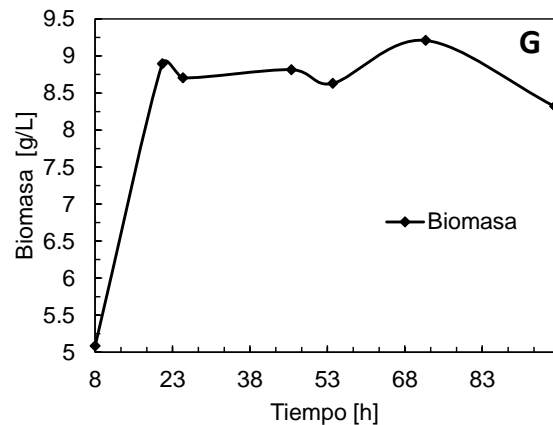
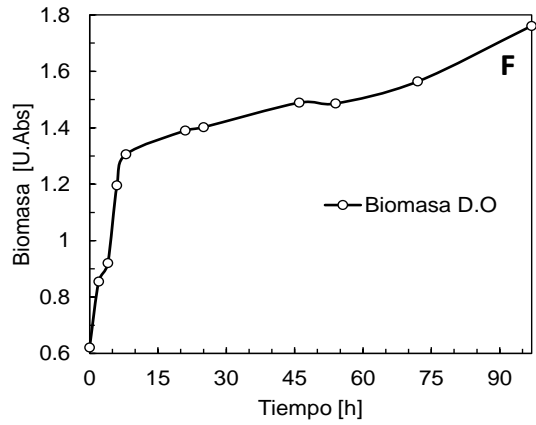
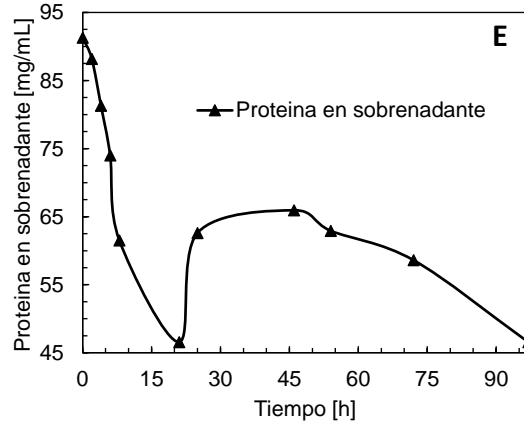
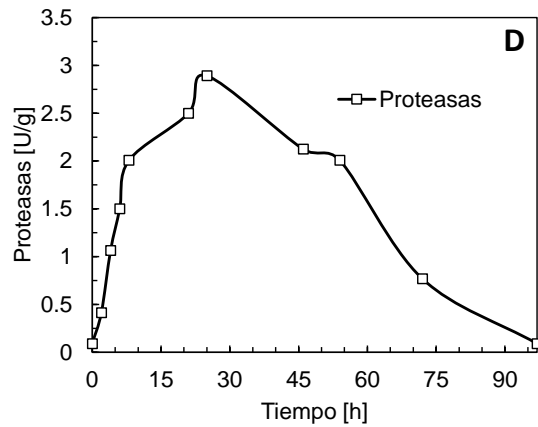
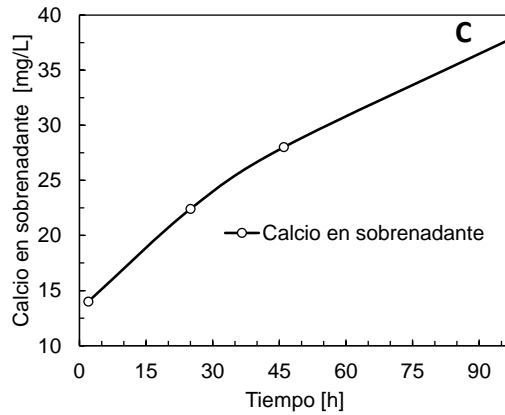
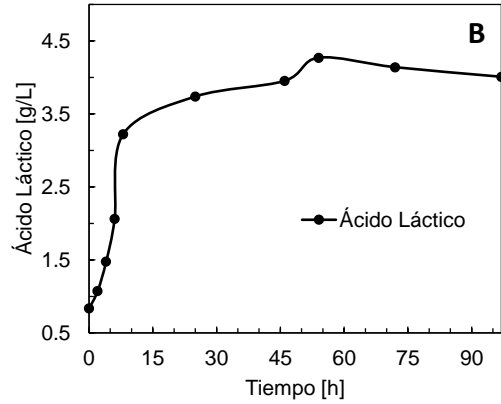
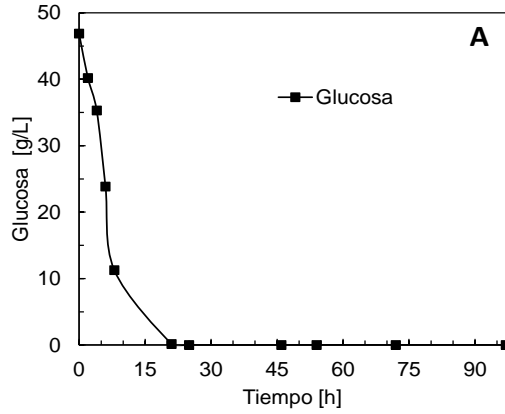


Figura 22. Fermentación mixta secuencial desarrollada con cáscara de camarón sin cabeza ni cola, inoculado de *L. delbrueckii* y *B. lactis*. Se muestra la concentración de azúcares reductores (A), producción de ácido láctico (B), concentración de calcio en sobrenadante (C), producción de proteasas (D), concentración de proteína en líquido (E) y contenido de biomasa en sobrenadante (F y G).

3.3 Caracterización del método de obtención de quitin desacetilasas a partir de *Aspergillus niger* y cáscara de camarón a nivel matraz

La relación óptima de CCSCC:glucosa, la concentración de extracto de levadura y el pH inicial para obtener la mayor producción de QDAs, se determinó a través de un diseño compuesto central (Tabla 1), para ello se realizaron experimentos a diferentes condiciones de fermentación, este diseño redujo el número de experimentos. Al sobrenadante obtenido de las fermentaciones se les cuantificó la actividad enzimática mediante la técnica propuesta por Sung y col., 2013. En la Tabla 1 se muestra el DCC a detalle.

Tabla 1

*Condiciones experimentales propuestas y resultados del DCC**

Experimento	CC:Glu* (X1)	Extracto de levadura (g/L) (X2)	pH (X3)	QDA (U/mL) (Y)
1	75:25 (-1)	5 (-1)	5 (-1)	127.37
2	25:75 (+1)	5 (-1)	5 (-1)	97.57
3	75:25 (-1)	15 (+1)	5 (-1)	275.61
4	25:75 (+1)	15 (+1)	5 (-1)	368.94
5	75:25 (-1)	5 (-1)	9 (+1)	129.73
6	25:75 (+1)	5 (-1)	9 (+1)	71.69
7	75:25 (-1)	15 (+1)	9 (+1)	343.84
8	25:75 (+1)	15 (+1)	9 (+1)	252.08
9	50:50 (0)	10 (0)	7 (0)	425.41
10	50:50 (0)	10 (0)	7 (0)	325.33
11	90.8:10.22 (- α)	10 (0)	7 (0)	68.55
12	10.22:90.8 (+ α)	10 (0)	7 (0)	420.71
13	50:50 (0)	1.84 (- α)	7 (0)	306.98
14	50:50 (0)	18 (+ α)	7 (0)	195.61
15	50:50 (0)	10 (0)	3.8 (- α)	376
16	50:50 (0)	10 (0)	10.2 (+ α)	363.33
17	50:50 (0)	10 (0)	7 (0)	366.67
18	50:50 (0)	10 (0)	7 (0)	311.69

Nota. *DCC es diseño compuesto central

*CC es cáscara de camarón, Glu es glucosa

Las proporciones referidas para una concentración de 100 g/L

Tal como se observa en la Tabla 1 los experimentos que presentaron un incremento en el extracto de levadura obtuvieron una actividad enzimática mayor, en el ANEXO 6 se presenta la superficie de respuesta obtenida a partir del análisis de varianza (ANOVA) del DCC. Con este diseño se demostró que el extracto de levadura posee un mayor efecto en la producción de QDAs empleando una cepa silvestre de *Aspergillus niger* y CCSCC.

3.4 Obtención de ECEQDAs a nivel biorreactor

El DCC permitió conocer las condiciones óptimas de producción de ECEDs, se propuso realizar la producción en un biorreactor de tanque agitado intermitente de 1 L (Applikon Biotechnology ® con controlador *Applikon Ez-Control bioreactor*). A las siguientes condiciones: 70 g de CCSCC, 10 g/L de glucosa, 15 g/L de extracto de levadura en 700 mL de medio basal con pH inicial de 7 (Figura 23).



Figura 23. Producción de extracto crudo enzimático rico en deacetilasas a nivel biorreactor.

En la Figura 24 se presenta la producción de QDAs a nivel biorreactor durante un tiempo de fermentación de 96 h. La Figura 24 muestra el gráfico con un crecimiento constante hasta alcanzar una máxima producción de QDAs a las 72 h (287.88 U/mL). Posterior a este tiempo, se presenta un decrecimiento en la producción de QDAs, esto permitió definir el tiempo óptimo de fermentación.

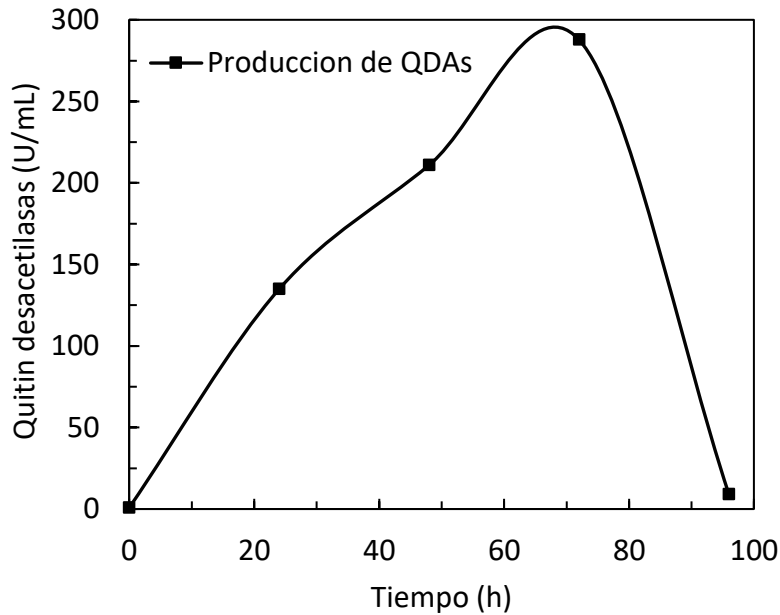


Figura 24. Producción de quitin-desacetilasas por *A. niger* a nivel biorreactor de 1L.

3.5 Determinación de T y pH óptimos para el ECEDs y su estabilidad a la variación de T y pH

Continuando con la obtención y caracterización del ECEDs, se buscó encontrar los valores de temperatura y pH óptimos en los que la enzima lleve a cabo la reacción de desacetilación. En la Figura 25A se muestra el valor alcanzado de actividad enzimática a las diferentes temperaturas (30 a 70 °C). En el gráfico se observa que la mayor producción de QDAs se obtiene a una temperatura óptima de 50 °C.

Habiendo definido la temperatura óptima para el ECEDs, posteriormente se cuantificó su actividad enzimática en el intervalo de valores de pH 3 a 7, desarrollando cada reacción a 50°C. En la Figura 25 B se observa la mayor actividad enzimática a un valor de pH=7.0, mostrando una diferencia muy marcada con respecto a los demás valores de pH. Con esto se pudo observar que el efecto del pH es importante sobre la enzima durante el proceso de desacetilación de la quitina.

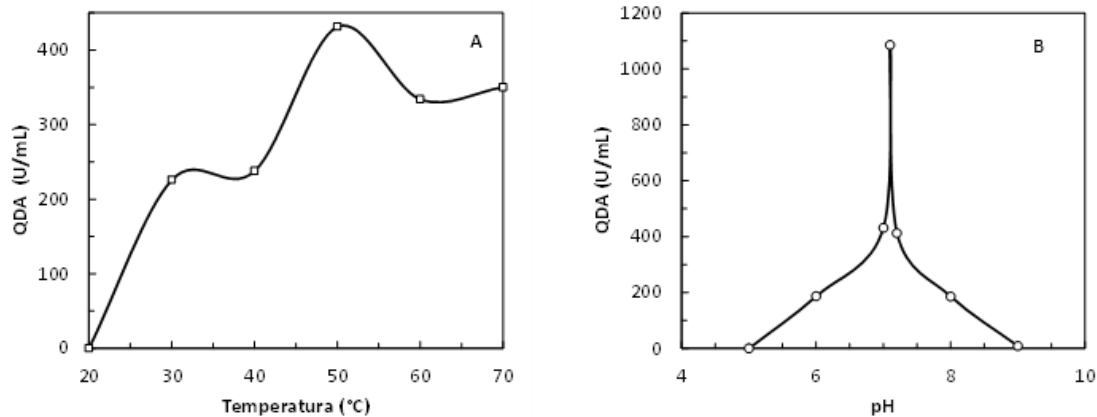


Figura 25. Temperatura óptima (A) y pH óptimo (B) del ECEDs producido por *A. niger* en cultivo sumergido a nivel biorreactor de 1 L.

Una vez que se definieron la T y pH óptimos para la actividad de las quitin desacetilasas contenidas en el ECEDs, se midió su estabilidad, cuantificando la actividad enzimática residual de las QDAs luego de incubarlas a temperatura de 30 a 70°C y valores de pH de 3 a 9 durante 8 h en experimentos independientes. El análisis del ECEDs demostró que se mantuvo al 100% la actividad enzimática al incubarlo durante 6 h en un intervalo de temperaturas de 30 a 50°C y valores de pH de 4 a 7. La capacidad de mantener la actividad enzimática que posee el ECEDs obtenido bajo las condiciones propuestas durante la caracterización, permitió sugerir su aplicación en el proceso de desacetilación de la quitina proveniente de una fermentación láctica secuencial. El ECEDs permitirá acelerar la velocidad de reacción de la DA sin modificar el carácter exotérmico o endotérmico de la reacción, manteniendo su elevada selectividad (Badui, 1981).

El poder definir un método experimental para la producción de QDAs a partir de una cepa de *Aspergillus niger* y, que a su vez el ECEDs sea barato y aplicable en el proceso de desacetilación de quitosano, sin duda alguna es un avance sobresaliente en el estudio de un proceso 100% biológico para la producción de quitosano. En la Figura 26 se muestra el ECEDs como producto final.

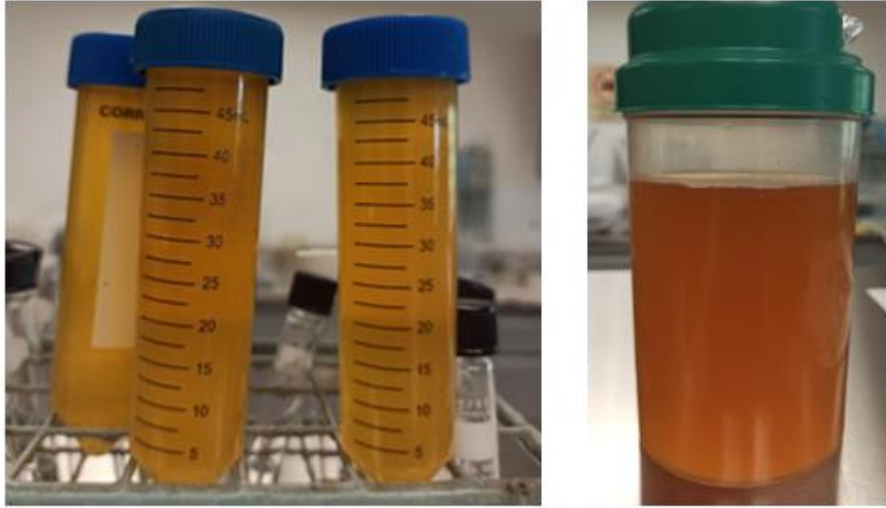


Figura 26. Extracto crudo enzimático rico en quitin-desacetilasas generado por *Aspergillus niger* sobre cáscara de camarón como sustrato.

3.6 Desacetilación enzimática de quitina a nivel matraz

Se propusieron tres condiciones de desacetilación:

1. Se sometió la quitina a un pretratamiento con un choque ultrasónico antes de agregar las quitin desacetilasas, la duración de cada choque ultrasónico fue de 15 min a 40 KHz.
2. Se sometió la quitina a 2 choques de ultrasonido con una duración de 15 min a 40KHz, uno antes de agregar las QDA's y otro una vez que se inició el tratamiento enzimático a las 6 h de tratamiento.
3. No se sometió la quitina al pretratamiento ultrasónico.

Después de 24h de reacción se cuantificó el grado de desacetilación (GDA) por el método de titulación potenciométrica propuesto por Hidalgo y Miranda (2015). En la Tabla 2 se presentan los %DA obtenidos.

Tabla 2.

%DA mediante método de titulación potenciométrica de muestras de quitosano			
Tiempo [h]	Sin choque ultrasónico	Un choque ultrasónico	Doble choque ultrasónico
0	57.63	61.66	61.00
24	71.82	63.66	73.22

Nota. La duración de cada choque ultrasónico fue de 15 min a 40KHz.

Los resultados que se muestran en la Tabla 2 permitieron demostrar que el pretratamiento ultrasónico favorece la desacetilación de la quitina, la cual presenta en un inicio un 57% de desacetilación. Este valor aumenta hasta el 61 % aproximadamente al aplicarle el choque ultrasónico antes de iniciar el tratamiento con las desacetilasas. Se observó que el porcentaje de desacetilación de la quitina disminuyó después de 24 h de reacción hasta un 71.8 % aproximadamente sin pretratamiento y en un 73.22 % aplicando un segundo choque.

3.7 Efecto de pretratamiento ultrasónico en el proceso de desacetilación enzimática

En el experimento anterior, se observó que al someter las muestras de quitina a un pretratamiento ultrasónico favorecía la DA de la misma. Sin embargo, hacía falta el definir el tiempo de duración del choque ultrasónico. Para esto se desarrolló un experimento en el cual doce sistemas fueron sometidos a un único choque ultrasónico de 40 KHz previo a la adición de las QDA's, variando su duración. En la Figura 27 se muestran los gráficos con los resultados de las pruebas de %DA y % solubilidad del producto final de los sistemas antes mencionados. Se definió el %DA del producto final de la DAE a partir de la técnica propuesta por Hidalgo y Miranda (2015). Adicionalmente se consideró cuantificar el % solubilidad, ya que es una propiedad física de gran importancia, que nos permite definir la calidad del quitosano.

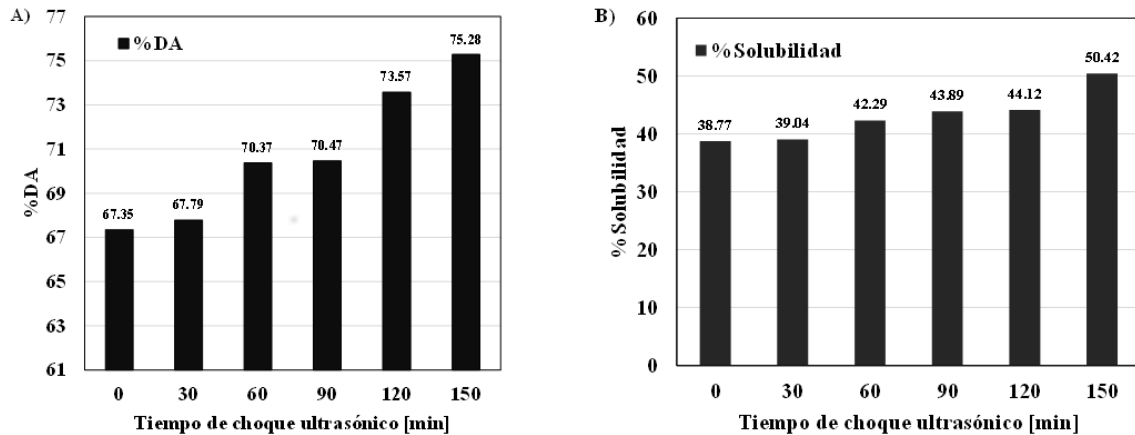


Figura 27. Porcentaje de desacetilación (A) y porcentaje de solubilidad (B) del quitosano obtenido a partir de desacetilación enzimática.

En la Figura 27A se observa la relación que existe entre el tiempo de choque y el %DA, entre más tiempo ha sido expuesta la muestra a desacetilar a un choque ultrasónico continuo, es favorecida la desacetilación llegando a obtener hasta un 75.28% de desacetilación. La muestra que no fue sometida a un choque ultrasónico obtuvo una desacetilación de 67.35%; esto es un incremento de desacetilación del 7.93% de la muestra con 150 min de choque ultrasónico.

En la Figura 27B se presenta el %Solubilidad alcanzado por cada muestra respecto al tiempo de choque ultrasónico suministrado, se pudo determinar también una mayor solubilidad del quitosano resultante. La muestra que fue sometida a 150 min de choque ultrasónico mostró una solubilidad del 50.42%, en tanto que la muestra que no fue sometida a choque ultrasónico presentó una solubilidad del 38.77%; esto es un incremento de la solubilidad del 11.65% de la muestra con 150min de choque ultrasónico.

3.8 Desacetilación enzimática a nivel biorreactor

Los resultados obtenidos mostraron que las mejores condiciones para llevar a cabo la desacetilación de quitina obtenida mediante un proceso biológico, utilizando un pretratamiento de ultrasonido a 40 KHz durante 2.5 h, para incentivar su conversión a quitosano. A partir de este resultado se consiguió realizar un escalamiento a nivel biorreactor. La desacetilación enzimática se realizó en un biorreactor de tanque agitado intermitente de 3 L Applikon Biotechnology ® con controlador *Applikon Ez-Control biorreactor* a

condiciones de 50°C y pH cercanos a 7. El producto obtenido de la DAE (quitosano) fue sometido a un análisis cuantitativo del grado de desacetilación, así como su identificación mediante espectroscopia de infrarrojos (IR). En la Figura 28A se muestra el espectro IR de la quitina obtenida a partir de BAL y en la Figura 28B se muestra el espectro IR del material obtenido posterior a la desacetilación.

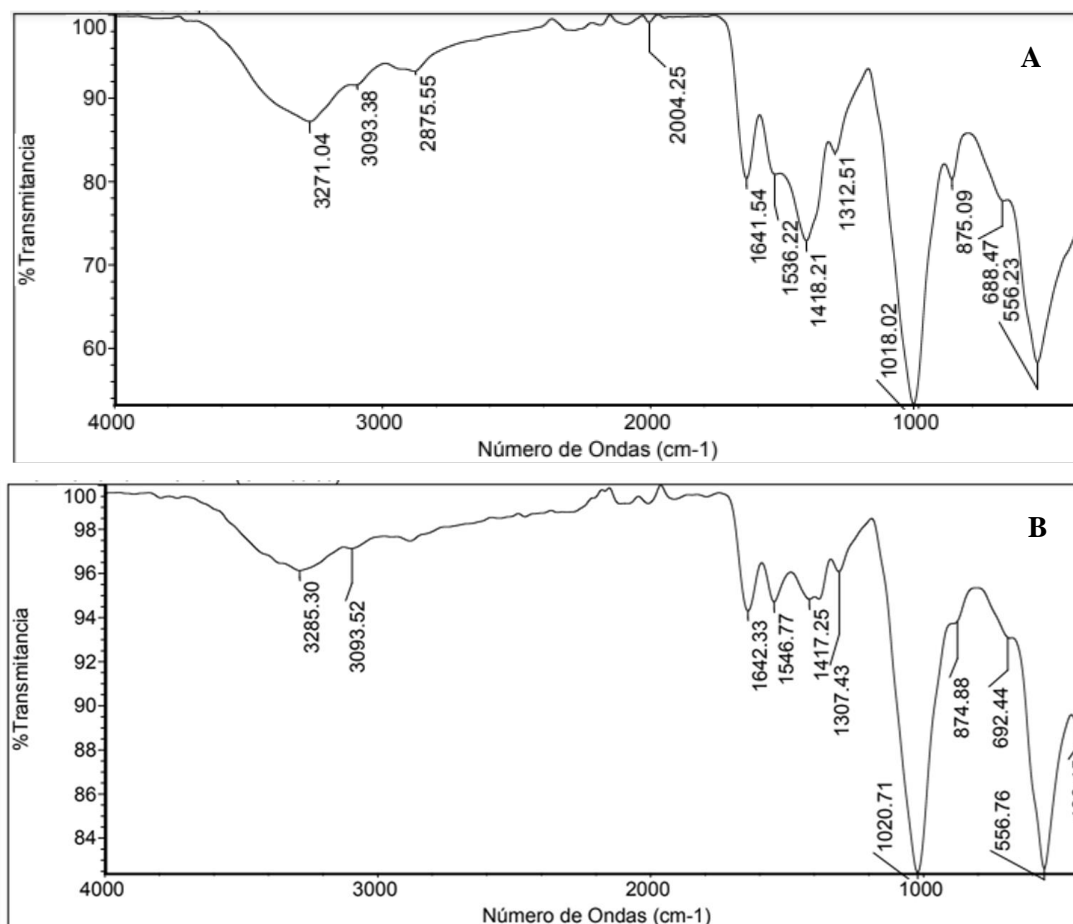


Figura 28. Espectro IR de la quitina obtenida por un cultivo bacteriano mixto secuencial (A) y del quitosano obtenido luego del tratamiento de desacetilación enzimática con el ECEDs producido por *A. niger* (B).

En la Figura 28B se pueden apreciar las bandas características del quitosano; 3285 cm⁻¹ correspondiente al grupo NH, 1642 cm⁻¹ a los enlaces C=O de la amina primaria, 1546 cm⁻¹ a los enlaces N-H de la amina secundaria y 1417 cm⁻¹ correspondiente a la amida terciaria. El espectro IR confirma la presencia de quitosano, con un GDA de 74.32 ± 1.66 %.

CONCLUSIONES

Es posible emplear bacterias ácido lácticas (BAL's) en el proceso de desmineralización (DM) y desproteínización (DP) de los desperdicios provenientes de cáscara de camarón (CC), ya que el material resultante de la fermentación posee concentraciones de proteínas y minerales óptimos para ser clasificado como quitina. El desperdicio de CC no fue sometido a ningún pretratamiento, siendo así las BAL's las responsables de su degradación.

El seguimiento de la fermentación permitió demostrar el efecto que tienen en la misma variables como la temperatura, el pH del medio y concentración de glucosa. La adición de *Lactobacillus delbureckii* y la relación con el incremento de calcio en sobrenadante, permitió demostrar la capacidad de DM y producción de ácido láctico (AcLac) de la bacteria. El crecimiento de la bacteria se vio reflejado en el incremento de la acidez hasta valores $\text{pH} = 5 \pm 0.4$. Transcurridas 24 h, la adición de *Bifidobacterium lactis* así como su efecto de DP se observó por el incrementos de proteína en líquido y biomasa posterior a su adición.

Para conseguir desacetilar la quitina resultante de la fermentación mixta secuencial, se empleó *Aspergillus niger*, una cepa productora de desacetilasas al crecer en un medio que contiene cáscara de camarón. Se empleó un diseño compuesto central con la finalidad de determinar las condiciones y formulación del medio adecuado para la mayor producción de quitin-desacetilasas (QDA), el diseño a su vez permitió definir que la concentración de extracto de levadura tiene un mayor efecto sobre dicha producción. El extracto crudo enzimático rico en desacetilasas (ECEDA) obtenido bajo condiciones ideales presentó una actividad enzimática elevada, así como pH y temperatura parecido a los reportados para las QDA presentes en otras especies de *Aspergillus*. Las QDA presentes en el extracto crudo enzimático (ECE) presentaron una estabilidad a temperaturas inferiores a 50°C y en un amplio intervalo de pH, pudiendo de este modo llegar a desacetilar a la quitina.

La quitina fue sometida a un pretratamiento ultrasónico, el cual permitió obtener un porcentaje de desacetilación (%DA) mayor al obtenido en sistemas sin pretratamiento alguno. Posterior a la sonicación, con el uso del extracto enzimático rico en desacetilasas se consiguió completar el proceso de obtención de quitina y quitosano. El espectro de absorción infra rojo de las muestras obtenidas de quitina y quitosano presenta las bandas de absorción

características de las moléculas, por lo que podemos decir que los materiales obtenidos son quitina y quitosano, a pesar de que no se pudo remover el calcio de las cáscaras en un 100%.

Se puede concluir que es posible la obtención de quitina empleando BAL's luego de llevar a cabo una desmineralización y desproteización de CC. Durante el proceso de DA se pudo definir y caracterizar la producción de un ECEDA con una óptima actividad enzimática capaz de desacetilar quitina hasta %DA=75.2.

Con esto se llega a cumplir por completo el objetivo general de este trabajo, se consiguió desarrollar un proceso de obtención de quitina y quitosano a partir de desechos de camarón mediante un enfoque completamente biotecnológico.

BIBLIOGRAFÍA

1. FAO. 2020. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. Roma. <https://doi.org/10.4060/ca9229es>
2. [Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural | Gobierno | gob.mx \(www.gob.mx\)](http://www.gob.mx) “Producción de camarón crece para alimentar a México”
3. Pattanaik, S. S., P. B. Sawant, K. M. Xavier, K. Dube, P. P. Srivastava, V. Dhanabalan y N. K. Chadha (2020), “Characterization of carotenoprotein from different shrimp shell waste for possible use as supplementary nutritive feed ingredient in animal diets”, *Aquaculture*, 515:734594
4. Hamed, I., F. Özogul y J. M. Regenstein (2016), “Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review”, *Trends in Food Science & Technology*, 48:40-50
5. Arbia, W., Arbia, L., Adour, L and Amrane, A. (2012). Chitin Extraction from Crustacean Shells Using Biological Methods – A Review *Food Technol. Biotechnol.* 51 (1) 12-25.
6. S.C. Tan, T.K. Tan, S.M. Wong, E. Khor (1996) “The Chitosan Yield Of Zygomycetes at their Optimum Harvesting Time” *Carbohydr. Poly.* 30, pp. 239-242
7. Sun, Y., Zhang, J., Wu, S., & Wang, S. (2014). *Carbohydrate polymers* (2014). 102: 649-652.
8. Wu, T. Zivanovic, S, Hanyes, D.G., Weiss, J. (2008) Efficient reduction of chitosan molecular weight by high-intensity ultrasound: Underlying mechanism and effect of processing parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*
9. Borshchevskaya, L., Gordeeva, T., Kalinina, A., and Sineokii, S, (2016)
10. Klemm, D; heublein, B.; Fink, HP, Bohn, A (2005). «Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material»
11. Younes, I., y Rinaudo, M. (2015). Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties, and applications. *Mar. Drugs.* 13: 1133-1174.
12. Tharanathan, R. N., & Kittur, F. S. (2003). Chitin--the undisputed biomolecule of great potential. *Critical reviews in food science and nutrition*, 43(1), 61–87.
13. Raabbe, D., Sachs, C. and Romano, P. (2005). The crustacean exoskeleton as an example of a structurally and mechanically graded biological nanocomposite material. *Acta Materialia* . 53: 4281-4292
14. VV.AA. (2004). *Biología molecular de la célula* (4 ed.). Barcelona: Omega. ISBN 978-84-282-1351-6.
15. Tamura H, Nagahama H, Tokura S. Preparation of chitin hydrogel under mild conditions. *Cellulose* 2006;13(4):357-64.
16. Jang, M.-K.; Kong, B.-G.; Jeong, Y.-I.; Lee, C.H.; Nah, J.-W. Physicochemical characterization of α -chitin, β -chitin, and γ -chitin separated from natural resources. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 2004, 42,3423–3432.
17. Muzzarelli, R.A.A. Chitins and chitosans as immunoadjuvants and non-allergenic drug carriers. *Mar. Drugs* 2010, 8, 292–312.
18. Alvarez, F.J. The effect of chitin size, shape, source and purification method on immune recognition. *Molecules* 2014, 19, 4433–4451.

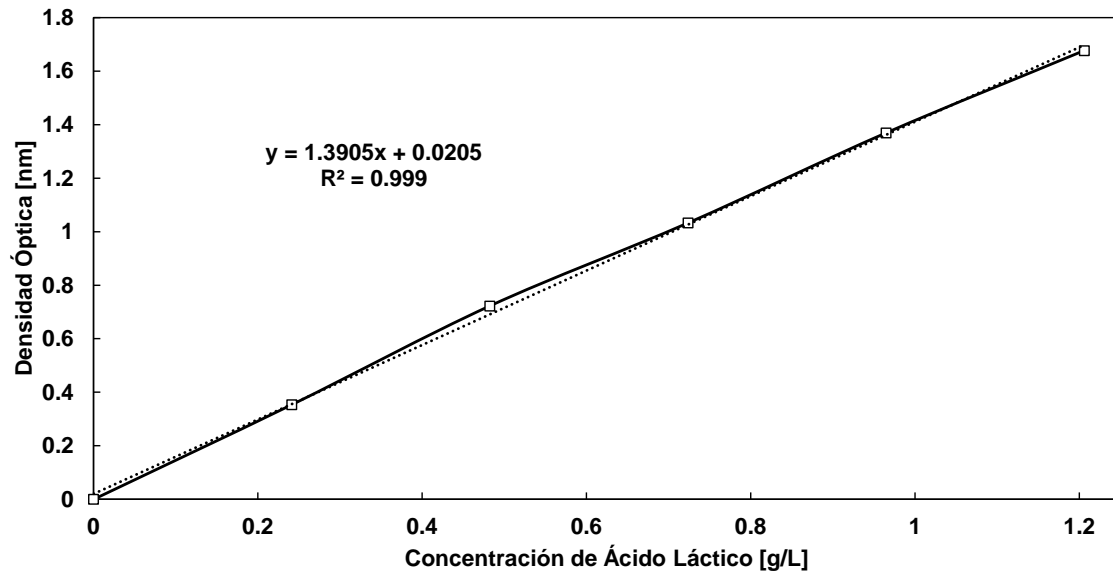
19. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym Sci* 2006;31(7):603-32
20. Vander, P., Varum, K.M., Alain Domard, A., Eddine, N., Gueddari, E., and Morschbacher, B.(1998). Compison of the Ability of Partially N-Acetylated Chitosans and Chitooligosaccharides to Elicit Resistance Reactions in Wheat Leaves 1. *Plan Physiology*, 118, 1353-1359
21. Harish Prashanth KV, Tharanathan RN. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential an overview. *Trends Food Sci Technol* 2007;18(3):117-31
22. Xu J, Zhao X, Han X, Du Y. Antifungal activity of oligochitosan against *Phytophthora capsici* and other plant pathogenic fungi in vitro. *Pest Biochem Physiol* 2007;87(3):220-8
23. Pillai CKS, Paul W, Sharma CP. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Prog Polym Sci* 2009;34(7):641-78.
24. Gauna, M., y Nuñez, N. Efecto del ultrasonido en la desacetilación de quitina de conchas de camarón. Trabajo especial de grado para optar al título de ingeniero químico. Universidad del Zulia. (2004) p.55
25. Muzzarelli, R. A. A. 1977. Enzymatic synthesis of chitin and chitosan. En: *Chitin*. Pergamon Press, Oxford University pp. 164-167.
26. Borshchevskaya, L., Gordeeva, T., Kalinina, A., and Sineokii, S. (2016). Spectrophometric Determination of Acid. *Journal of analytical chemistry*, 71(8), 755-758.
27. Miller, G.L. (1959). *Analitical Chemistry*, 31, 426-42
28. Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72.248-254
29. Castro, R.J. S, Nishide, T.G., Sato, H.H., (2014). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 236-245
30. Sun, Y., Zhang, J., Wu, S., & Wang, S. (2014). Statistical optimization for production of chitin deacetylase from *Rhodococcus erythropolis* HG05. *Carbohydrate polymers*, 102,649-652
31. Hidalgo, J.L y Miranda P.S. (2015). Síntesis de esferans de quitosano y quitosano-TiO₂ impresas molecularmente para la adsorción de Hg (II) y la degradación fotocatalítica del rojo de metilo para el tratamiento de aguas residuales.
32. Balanta D., Grande.C. D., Zuluaga, F. (2010). Extracción, Identificación y Caracterización de Quitosano del Micelio De *Aspergillus Niger* y sus Aplicaciones como Material Bioadsorbente en el Tratamiento de Aguas.Revista Iberoamericana de Polímeros. 11(5), 297-316
33. Alvarenga,E.S.(2011).Characterization and Properties of Chitosan Chapter 3.2pag.94
34. Marinela, Colina. (2014). Evaluación de los procesos para la obtención química de quitina y quitosano a partir de desechos de Cangrejos. escala piloto e industrial. *Revista Iberoamericana*. 15. 21.

35. Larez C “Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro”, *Avances de Química*, 1, 15 (2006)
36. Argüelles L, Álvarez O, Pérez ME, Pérez C, Peniche W “Aprovechamiento integral de los desechos de langosta”. En *Memorias de Quimindustria, Química Aplicada Tomo II*, 528 (1988)
37. Agüero G, Argüelles W, Peniche C “Estudio de la cristalinidad de la quitosana”, *Revista Cubana de Química.*, 5(1), 25 (1989)
38. Peniche C, Alvarez L, Argüelles W “The adsorption of mercuric ions by chitosan”, *J. Appl. Polym. Sci.*, 42, 1147 (1992)
39. Argüelles W, Peniche C “Preparation and characterization of a mercaptan derivative of chitosan for the removal of mercury from brines”, *Die Angewandte Makromol. Chemie.*, 207, 1 (1993)
40. Salas R, Gálvez D, Rosas R “La quitina: Lo mejor de los desechos marinos”, *CIENCIA UANL / AÑO 20*, No. 84, abril-junio 2017
41. Krithika, S., y Chellaram, C. (2016). Isolation, screening, and characterization of chitinase producing bacteria from marine wastes. *Int J Pharm Sci.* 8(5): 34-36.
42. Gortari, M.C., y Hours, R.A. (2014). Biotechnological processes for chitin recovery out of crustacean waste: a mini review. *Electr J Biotechnol.* 16(3): 1-14.
43. Carvalho, T., Nogueira, V., Melo, G., Pinheiro, P., Craveiro, A., & Melo, V.M. (2009). Bioprocessing of crustacean shell waste to recovery chitin, proteins and pigments. En: Rustichelli, F., Caramella, C., Senel, S., & Vaarum, K.M. (Eds.). *Advances in chitin science*, vol. XI (pp. 431-434). Venice, Italy: Polytechnic University of Marche
44. Jung W.J., Kuk J.H, Kim K.Y., Park R.D (2005). Desmineralización de residuos de cascara de cangrejo rojo por fermentación de ácido láctico. *Microbiología Aplicada y Biotecnología.* 67(6) 851-884
45. Guo Na , Sun Jianan , Zhang Zhaohui and Mao Xiangzha. (2018). Recovery of chitin and protein from shrimp head waste by endogenous enzyme autolysis and fermentation.
46. Sixto-Berrocal, A. (2019). Tesis de Maestría. Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec
47. Pacheco, N., Garnica-González, M., Bárzana, E., Trombotto, S., Laurent, D., Shirai, K. (2011) Structural characterization of chitin and chitosan obtained by biological and chemical methods. *Bio-macromolecules.* American Chemical Society 12:3285-3290
48. Jinlong Chai, Jiahao Hang, Chunguang Zhang, Jie Yang, Shujun Wang, Shu Liu, Yaowei Fang. (2020). *International Journal of Biological Macromolecules* 152 (2020): 922-929.
49. P. Sarabia-Bañuelos, D. Mendoza-García et al., (2015) Aprovechamiento integral de crustáceos: obtención de quitina y quitosana de su cefalotórax y exoesqueleto por métodos ecológicos y de carotenoproteínas para consumo humano
50. Karthik Narayanan, Binod Parameswaran & Ashok Pandey (2016) Production of chitin deacetylase by *Aspergillus flavus* in submerged conditions, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 46:5, 501-508

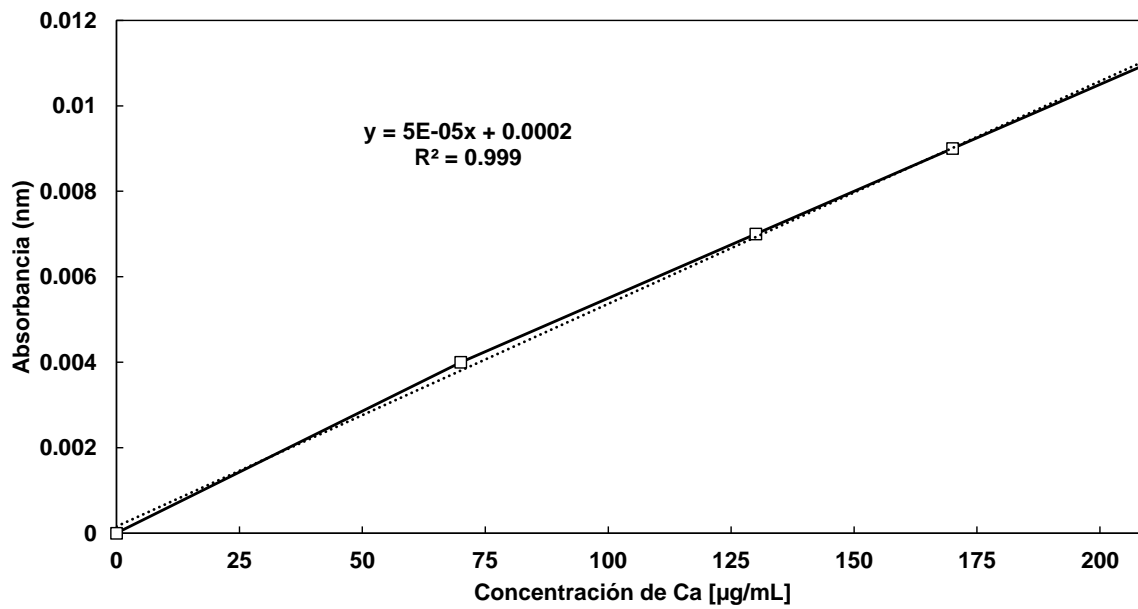
51. Yonis. 2019 IJS An Application of Response Surface Methodology for Optimizing the Production of Chitin Deacetylase Enzyme by *Aspergillus Flavus*
52. Zhao, Y., Ro-Dong Park y Muzzarelli, R.R. (2010) Chitin Desacetylases: Properties and Applications. *Marine Drugs* 8, 24-46
53. Kjartansson, G., Kristbergsson, K., Zivanovic, S., Weiss, J. (2008): Influencia de ultrasonido de alta intensidad para acelerar la conversión de la quitina en quitosano, Reunión Anual del Instituto de Tecnólogos de Alimentos, Nueva Orleans, LA, 30 de junio de 95-18
54. Rejane C. Goy; Douglas de Britto; Odilio B. G. Assis. (2009). A review of the
55. antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros*, vol.19 no.3
56. Hernández, Y. La quitina y la quitosana, polisacáridos animales de gran importancia. Departamento de Bioquímica del centro universitario José Martí. Habana, Cuba (2004)
57. Knorr Dietrich. Recovery and Utilization of Chitin and Chitosan in Food Processing Waste Management Food Technology. (1991)
58. Lárez, C. Quitina y quitosano: Materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances de Química* 1: (2006) 15-21
59. Arbia, W., Arbia, L., Adour, L. and Amrane, A. (2012) Chitin Extraction from Crustacean Shells Using Biological Methods- A Review *Food Technol. Biotechnol.* 51(1) 12-25
60. Ramírez Miguel Á, Rodríguez Aida T, Alfonso Luis, Peniche Carlos. Chitin and its derivatives as biopolymers with potential agricultural applications. *Biotecnología Aplicada* v.27 n. 4; (2010) 270-276
61. Miranda, S.P. y Lizarraga E. G. Paulín. Is Chitosan a New Panacea? Areas of Application. *The complex world of polysaccharides*. 1, 3-46
62. Horner, V., Pittermann, W., and Wachter, R., Efficiency of high molecular weight chitosan in skin care applications. In: Domard, A., Roberts, G.A.F., and Varum, K., Eds., *Advances in Chitin Science*, Lyon: Jaques Andre Publishers, 1997; 671–677
63. Pawlowska, E., The assessment of influence of chitosan on the dental pulp in rats. In: Domard, A., Roberts, G.A.F., and Varum, K.M., Eds., *Advances in Chitin Science*, Lyon: Jacques Andre Publisher, 1997; 705–710.
64. Wiczorek, A. and Mucha, M., Application of chitin derivatives and their composites to biodegradable paper coatings. In: Domard, A., Roberts G.A.F., and Varum K.M., Eds., *Advances in Chitin Science*, Lyon: Jaques Andre Publisher, 1997, 890–896
65. Synowiecki, J., & Al-Khateeb, N. A. (2003). Production, Properties, and Some New Applications of Chitin and Its Derivatives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(2), 145–171.
66. Rocha-Pino, Z., Shirai, K., Arias, L., & Vázquez-Torres, H. (2008). Efecto de la calidad del agua y tamaño de partícula en la producción de quitosano a partir de β -quitina extraída de desperdicios de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). *Revista mexicana de ingeniería química*, 7(3), 299-307.
67. Badui Jergal S.(1981) *Química de los alimentos*. Departamento de alimentos UNAM

ANEXOS

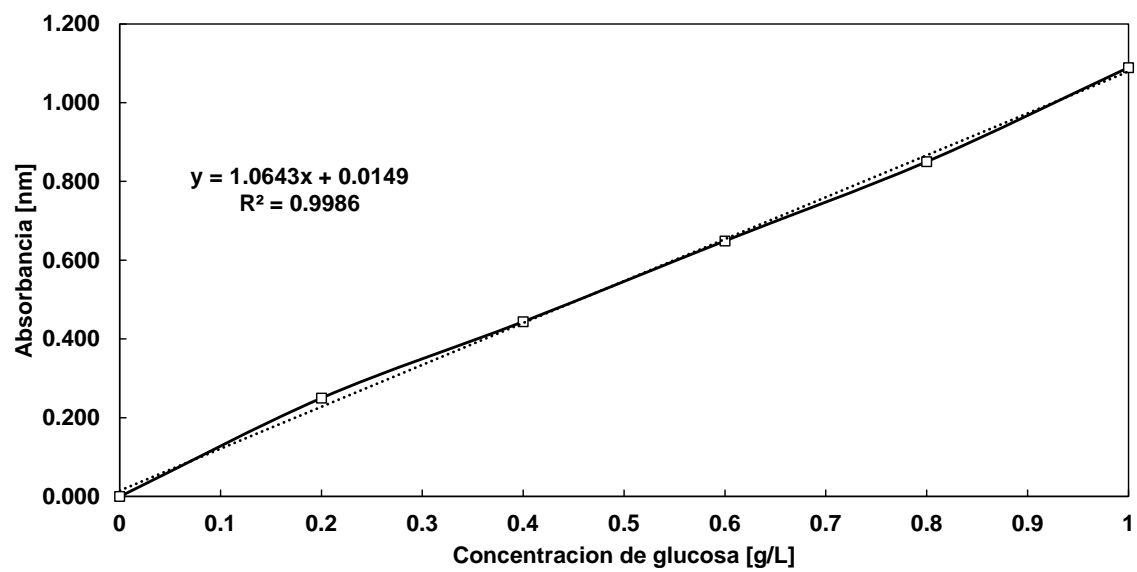
ANEXO 1. CURVA PATRÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO



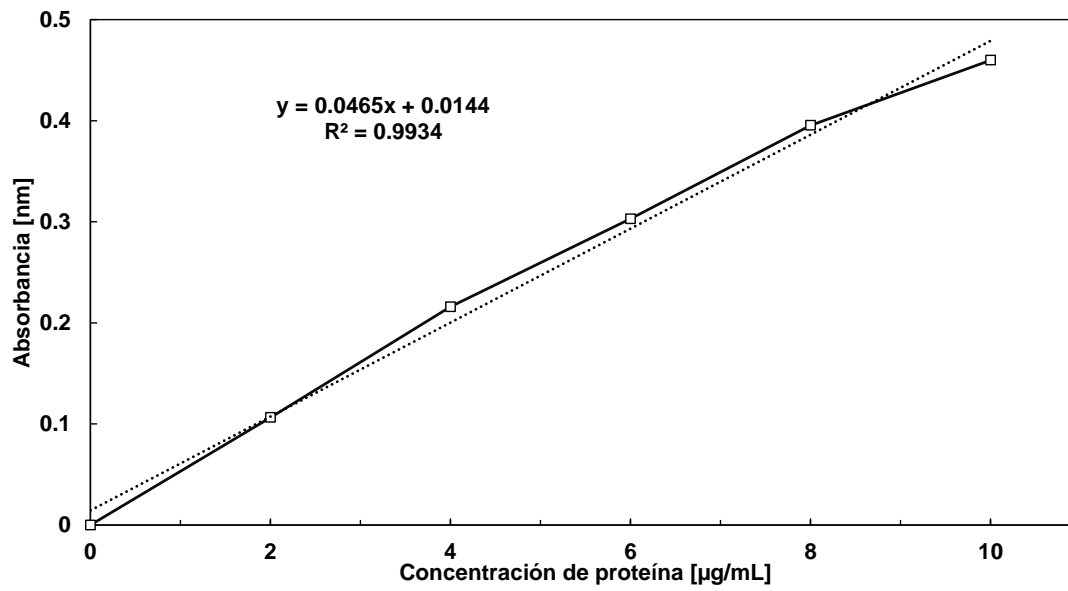
ANEXO 2. CURVA PATRÓN DE CaCO₃



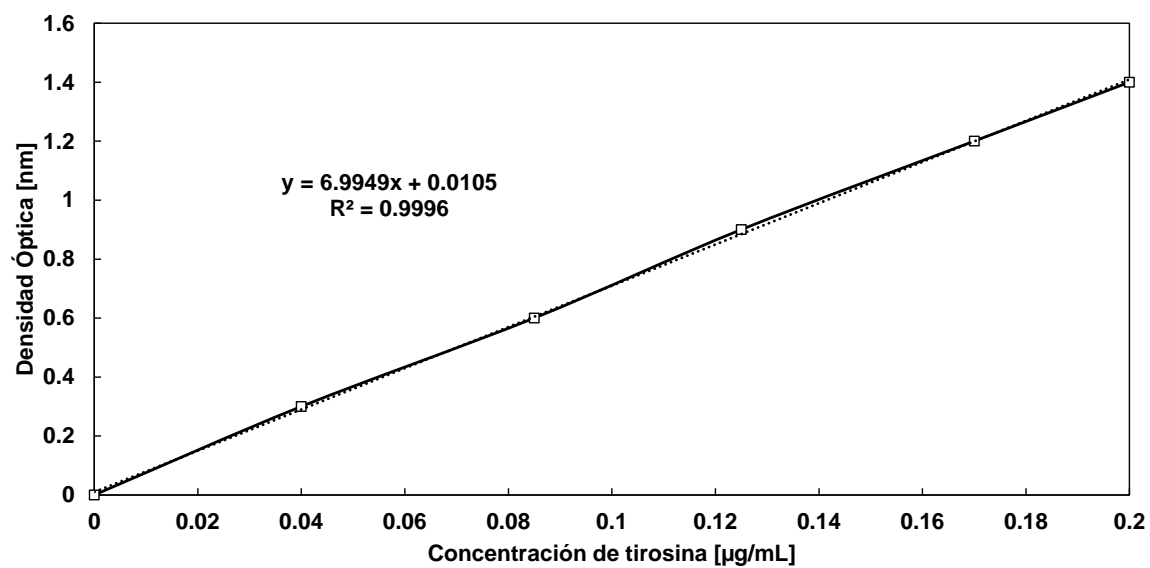
ANEXO 3. CURVA PATRÓN DE LA GLUCOSA



ANEXO 4. CURVA PATRÓN DE BRADFORD



ANEXO 5. CURVA PATRÓN DE TIROSINA



ANEXO 6. SUPERFICIE DE RESPUESTA (ANOVA)

Response 1: QDA

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	2.126E+06	9	2.362E+05	6.50	0.0036	significant
A-A-Glucose	4905.07	1	4905.07	0.1350	0.7210	
B-B-YE	1.303E+06	1	1.303E+06	35.87	0.0001	
C-C-pH	44364.27	1	44364.27	1.22	0.2951	
AB	8994.09	1	8994.09	0.2475	0.6296	
AC	51200.00	1	51200.00	1.41	0.2627	
BC	708.38	1	708.38	0.0195	0.8917	
A²	12332.70	1	12332.70	0.3394	0.5731	
B²	3.805E+05	1	3.805E+05	10.47	0.0089	
C²	3.481E+05	1	3.481E+05	9.58	0.0113	
Residual	3.634E+05	10	36340.73			
Lack of Fit	3.178E+05	5	63562.71	6.97	0.0263	significant
Pure Error	45593.75	5	9118.75			
Cor Total	2.489E+06	19				

Factor coding is **Coded**.

Sum of squares is **Type III - Partial**

The **Model F-value** of 6.50 implies the model is significant. There is only a 0.36% chance that an F-value this large could occur due to noise.

P-values less than 0.0500 indicate model terms are significant. In this case B, B², C² are significant model terms. Values greater than 0.1000 indicate the model terms are not significant. If there are many insignificant model terms (not counting those required to support hierarchy), model reduction may improve your model.

The **Lack of Fit F-value** of 6.97 implies the Lack of Fit is significant. There is only a 2.63% chance that a Lack of Fit F-value this large could occur due to noise. Significant lack of fit is bad -- we want the model to fit.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

QDA (U/ml)

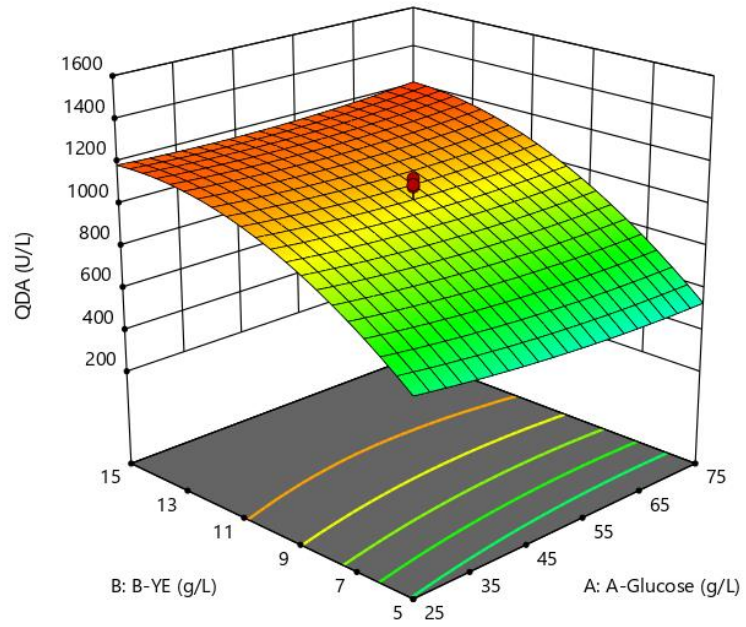
● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

205.65  1276.23

X1 = A: A-Glucose
X2 = B: B-YE

Actual Factor
C: C-pH = 7



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

QDA (U/ml)

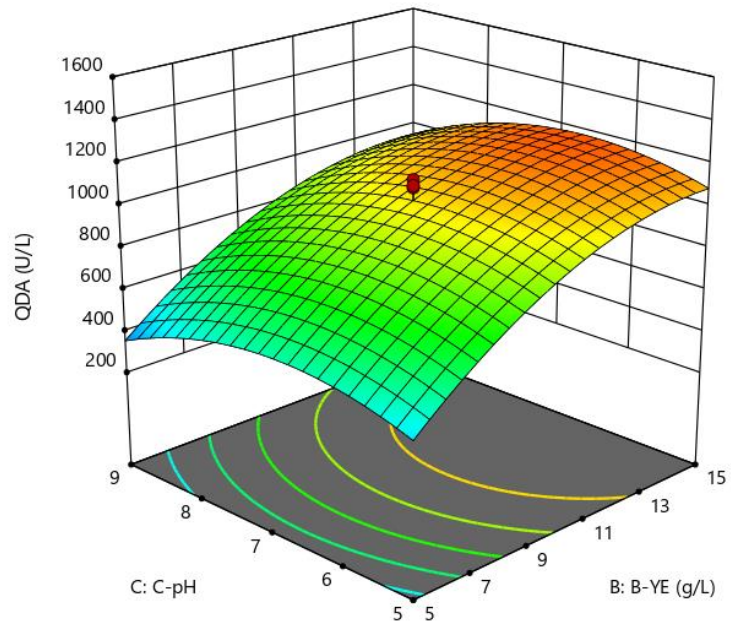
● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

205.65  1276.23

X1 = B: B-YE
X2 = C: C-pH

Actual Factor
A: A-Glucose = 50



ANEXO 7. SOLUCIONES REGULADORAS O AMORTIGUADORA

También son conocidas como soluciones regulador, son todas aquellas que se oponen a los cambios de pH, estos cambios pueden suscitarse durante la adición de ácidos o álcalis (hidróxidos). Su acción se basa en la absorción de hidrogeniones (H^+) e iones hidroxilo (OH^-). En general una solución amortiguadora está conformada por una mezcla binaria de un ácido débil y una sal de este ácido proveniente de base fuerte o también, una base y una sal de esta base proveniente de un ácido fuerte. Algunos ejemplos pueden ser: Una mezcla de ácido acético y acetato de sodio, hidróxido de amonio y cloruro de amonio.

La principal aplicación de estas soluciones reside en el estudio de la regulación del equilibrio ácido-base en los sistemas biológicos, a nivel experimento bioquímico son empleados para controlar el pH de reacciones.

Regulador de Fosfatos

Solución A: 0.2 M de solución de fosfato de sodio monobásico (27.8g en 1000mL)

Solución B: 0.2 M de solución de fosfato de sodio dibásico (53.65g de $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ o 71.7g de $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ en 1000mL)

Xml de A + Xml de B (diluirlo en 200mL)

Para pH=6:

87.7 mL de fosfato de sodio monobásico + 12.3 mL de fosfato de sodio dibásico

Para pH=7

39.0 mL de fosfato de sodio monobásico + 61.0 mL de fosfato de sodio dibásico

Regulador Citratos-Fosfatos

Solución A: 0.2 M de solución de ácido cítrico (19.21g en 1000 mL)

Solución B: 0.2 M de solución de fosfato de sodio dibásico (53.65g de $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ o 71.7g de $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ en 1000mL)

Para pH=4:

61.4 mL de ácido cítrico + 30.6 mL de fosfato de sodio dibásico

Para pH=5:

48.6 mL de ácido cítrico + 51.4 mL de fosfato de sodio dibásico

Para pH=6:

35.8 mL de ácido cítrico + 64.2 mL de fosfato de sodio dibásico

Regulador de Acetatos

Solución A: 0.2 M de solución de ácido acético (11.55 mL en 1000 mL)

Solución B: 0.2 M de solución de acetato de sodio (16.4 g de $C_2H_3O_2Na$ o 27.2 g de $C_2H_3O_2Na \cdot 3H_2O$ en 1000mL)

Para pH=5:

14.8 mL de ácido acético + 35.2 mL de acetato de sodio dibásico

Para pH=5.2:

10.5 mL de ácido acético + 39.5 mL de acetato de sodio dibásico

PRODUCTIVIDAD COMO PARTICIPACIONES EN CONGRESOS

El desarrollo del presente trabajo se expuso en los siguientes congresos:

1. XLIII Encuentro Nacional de la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química. “La Ingeniería Química, la Sostenibilidad y la Economía Circular”. Puerto Vallarta, Jal., México. 23 al 26 de agosto de 2022.
2. 5° Encuentro Estudiantil de Ingeniería Química realizado el 9 de diciembre de 2022. Ganador del Primer lugar en la modalidad de ponencia.

AMIDIQ

Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C.



XLIII Encuentro Nacional de la AMIDIQ
"La Ingeniería Química,
la Sostenibilidad y la Economía Circular"

La Academia Mexicana de Investigación y Docencia
en Ingeniería Química A.C.

otorga el presente

RECONOCIMIENTO

a:

Hector Giovanni Luna-Barrón, Ana María Sixto-Berrocal, M. Aurora Martínez-Trujillo, Martín R. Cruz-Díaz

Por la presentación del trabajo en modalidad oral:

**PRODUCCIÓN DE QUITIN DESACETILASAS EN UN BIORREACTOR DE TANQUE AGITADO A PARTIR DE
UN CULTIVO FUNGICO Y CASCARA DE CAMARON**

ID: 704

XLIII Encuentro Nacional de la AMIDIQ

Puerto Vallarta, Jal., México. 23 al 26 de agosto de 2022


Dr. Jorge Ramón Robledo Ortiz
PRESIDENTE DE LA AMIDIQ Y DEL COMITÉ ORGANIZADOR


Dr. Tomás Mueños García
PRESIDENTE DEL COMITÉ TÉCNICO



Universidad Nacional Autónoma de México
Consejo Académico del Área de las Ciencias
Físico Matemáticas y de las Ingenierías
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
Coordinación de la Licenciatura en Ingeniería Química



Otorgan el presente

Reconocimiento

a:

Héctor Giovanni Luna Barrón
M. en IBQ. Ana María Sixto Berrocal
Dr. Martín Rogelio Cruz Díaz

Por su participación como ponente para la conferencia magistral

**“Producción de Quintin Desacetilasas en un
biorreactor de tanque agitado a partir de un
cultivo fúngico y cascara de camarón”**

En el 5º Encuentro Estudiantil de Ingeniería Química
realizado el 9 de diciembre de 2022.

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cuautitlán Izcalli, Estado de México, diciembre de 2022.

Dr. Demetrio Fabián García Nocetti
Coordinador del Consejo Académico
del Área de las Ciencias Físico Matemáticas
y de las Ingenierías (CAAFMI)

Dr. David Quintanar Guerrero
Director de la FES Cuautitlán



Folio: 202.2005.16

Ganadores de ponencias

Primer Lugar

12:10 – 12:30	<i>Producción de Quitín Desacetilasas en un biorreactor de tanque agitado a partir de un cultivo fúngico y cascara de camarón.</i>
OII-6 (65 pts)	Alumno: Héctor Giovani Luna Barrón. hectorluna2611@gmail.com Docente: M en IBQ. Ana María Sixto Berrocal. anmerysix@yahoo.com.mx Docente: Dr. Martín Rogelio Cruz Díaz. cdmrmartin@gmail.com <i>Procedencia: FES-Cuautitlán</i>

Segundo Lugar

11:50 – 12:10	<i>Fermentación en lotes de Lactobacillus Delbrueckii</i>
OII-5 (61 pts)	Alumno: Luis David González García david114luisdg@gmail.com Docente: Dr. Martín Rogelio Cruz Díaz cdmrmartin@hotmail.com <i>Procedencia: FES – Cuautitlán</i>

Tercer Lugar

11:30 – 11:50	<i>Estudio de catalizadores a base de óxidos de V promovidos con óxidos de Fe para el proceso ODS.</i>
OI-4 (60 pts)	Alumno: Israel Cortés Zamudio. 314218630@quimica.unam.mx Docente: Dr. Luis Cedeño Caero caero@unam.mx <i>Procedencia: Facultad de Química</i>