



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales

"I Z T A C A L A"

"Langostilla Mexicana como recurso para la Producción de Quitina y N-acetil-D- glucosamina y sus posibles usos en alimentos"

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O  
P R E S E N T A N

DAVID JULIO ZARATE LOMELI

JOSE CUPERTINO RUBIO RUBIO



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

ESTE TRABAJO SE DESARROLLO EN EL DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA Y BIOINGENIERIA DEL CENTRO DE INVESTIGACION Y - DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL I.P.N., BAJO LA DIRECCION DE LA DRA. CARMEN A. ORTEGA GARZA A QUIEN AGRADECEMOS INFINITAMENTE LA AYUDA Y ORIENTACION PRESTADA, DEL MISMO MODO DAMOS LAS GRACIAS AL INSTITUTO NACIONAL DE PESCA Y - EN PARTICULAR A LA ING. LUZ MARIA DIAZ LOPEZ, POR SU VALIOSA COLABORACION.

HACEMOS PATENTE NUESTRO AGRADECIMIENTO AL Q.F.I. RAUL REYES MEJIA, POR SU GRAN AYUDA; AL DR. PEDRO A. LEHMAN, POR TODAS LAS FACILIDADES BRINDADAS EN SU LABORATORIO; A LA M. EN C. JOVITA MARTINEZ, POR SU ASESORIA Y REGAÑOS QUE SIRVIERON DE MUCHO; A MA. ELIZABETH ZARATE L., POR TODO EL TIEMPO DEDICADO A LA REDACCION DE ESTE TRABAJO Y EN GENERAL, A TODOS AQUELLOS QUE COLABORARON EN LA REALIZACION DEL MISMO.

DEDICATORIA:

DEDICO ESTE TRABAJO A LA MEMORIA DE UN GRAN HOMBRE, MI PADRE Y A MI MADRE, DE QUIENES HE OBTENIDO LO MAS HERMOSO DE ESTE MUNDO: AMOR, SINCERIDAD, Y APOYO EN LOS MOMENTOS MAS DIFICILES.

A MIS HERMANOS JOSE LUIS Y MA.ELIZABETH, POR EL GRAN CARIÑO Y ENTUSIASMO QUE ME TRANSMITEN.

A MIS QUERIDOS ABUELOS, JESUS Y MARIA DE JESUS; A MIS TIAS, IRENE Y PETRITA; A LEO Y LILI; Y A QUIENES CONSIDERO MIS MAS GRANDES AMIGOS: RAUL REYES MEJIA, JOSE LUIS CEDILLO B., ERVIN SILVA GONZALEZ Y LUIS MIGUEL LIMARES.

A MIS MAESTROS QUE CON SU SABIDURIA Y DEDICACION HAN LOGRADO QUE ALCANZARA UNA DE MIS METAS MAS DESEADAS.

DAVID

## DEDICATORIA

CON RESPETO Y AMOR A MIS PADRES: ANASTACIO RUBIO OLIVA Y JUANA RUBIO CHAVEZ, LOS CUALES ME BRINDARON TODAS LAS FACILIDADES NECESARIAS Y EL APOYO PARA LA REALIZACION DE MIS ESTUDIOS Y DE QUIENES OBTUVE EL EJEMPLO PARA PODER LOGRAR UNA META EN LA VIDA.

A MIS HERMANOS: IRMA, GRACIELA, JAVIER, ALFREDO, EDUARDO Y GASPAR, ASI COMO A MIS CUÑADOS: ADRIANA Y JUAN, Y A MIS SUEGROS: DON NORBERTO Y DOÑA ROSITA, QUIENES DE ALGUNA FORMA CONTRIBUYERON CON SU ENTUSIASMO Y APOYO PARA SEGUIR ADELANTE.

A MI QUERIDA ESPOSA: ARACELY ORTIZ DE RUBIO, POR TODO SU APOYO Y ALIENTO, TANTO EN LOS MOMENTOS FELICES COMO EN LOS CRITICOS. CON AMOR.

A MIS AMIGOS Y EN ESPECIAL A ERVIN SILVA GONZALEZ, POR SU GRAN AMISTAD.

A MI FINADO ABUELO: MARTIN RUBIO, QUE FUE UN EJEMPLO DE HONESTIDAD, NOBLEZA Y DEDICACION. CON CARIÑO Y ADMIRACION.

A CADA UNO DE MIS PROFESORES, QUE CON SUS ENSEÑANZAS CONTRIBUYERON A MI FORMACION. A TODOS ELLOS MI GRATITUD.

CUPERTINO

## INDICE

I.	INTRODUCCION . . . . .	1
	1.1 DISTRIBUCION DE LA QUITINA EN LA NATURALEZA . . . . .	2
	1.2 FUENTES POTENCIALES DE QUITINA. . . . .	4
	1.2.1 Generalidades . . . . .	4
	1.2.2 Fuentes potenciales de Quitina en México. . . . .	4
	A) Camarón	
	B) Langostilla Mexicana	
	1.3 CARACTERISTICAS QUIMICAS DE LA QUITINA . . . . .	11
	1.4 METODOS DE OBTENCION DE QUITINA . . . . .	14
	1.5 HIDROLISIS ENZIMATICA DE LA QUITINA . . . . .	17
	1.6 USOS DE LA QUITINA Y N-ACETIL-D-GLUCOSAMINA . . . . .	20
II.	PARTE EXPERIMENTAL . . . . .	25
	2.1 MATERIAL . . . . .	25
	2.2 METODOLOGIA. . . . .	28
	2.2.1 Métodos empleados para la obtención de quitina	28
	A) Método de Hackman	
	B) Método de Foster & Hackman	
	2.2.2 Caracterización de la quitina . . . . .	30
	2.2.3 Hidrólisis de la quitina . . . . .	32
	A) Hidrólisis enzimática	
	B) Análisis de azúcares	
III.	RESULTADOS . . . . .	41
	3.1 OBTENCION DE LA QUITINA . . . . .	41
	3.2 CARACTERIZACION DE LA QUITINA . . . . .	41
	3.3 HIDROLISIS DE LA QUITINA . . . . .	43
IV.	DISCUSION Y CONCLUSIONES . . . . .	58
V.	BIBLIOGRAFIA . . . . .	62

## 1.- INTRODUCCION

Debido a que en los últimos años se ha producido un notable incremento en la población de la Langostilla Mexicana (Pleuroncodes planipes. Stimpson) en algunas regiones del Pacífico mexicano y que de acuerdo a evaluaciones biológico-pesqueras se calcula un potencial de captura de hasta 250,000 toneladas anuales, el Instituto Nacional de Pesca (INP) en un Programa de Aprovechamiento Integral para este pequeño crustáceo contempla dentro de uno de sus objetivos, la posibilidad de utilizar la Langostilla Mexicana como fuente potencial de quitina, ya que la cantidad de ésta es considerable en su composición.

El presente estudio pretende unir esfuerzos con el INP, para la obtención de quitina a partir de la harina de Langostilla así como la producción de su monómero N-acetil-D-glucosamina (NAG) por vía enzimática, utilizando para tal efecto Serratia marcescens QMB1466, además de plantear los posibles usos para quitina y NAG.



## 1.1 DISTRIBUCION DE LA QUITINA EN LA NATURALEZA

La quitina [poli- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-N-acetil-D-glucosamina] se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, formando junto con otros materiales (proteínas y sales minerales) estructuras de protección, especialmente en invertebrados marinos, insectos, hongos y ciertos tipos de algas unicelulares, Tabla 1.

La cutícula de insectos e invertebrados marinos se encuentra constituida en gran parte por quitina, a la que usualmente se asocian proteínas en el caso de los primeros y además sales minerales (carbonato y fosfato de calcio) en el caso de los últimos.

En otros pequeños invertebrados marinos como los lofoforados su concha se caracteriza por estar constituida de quitina y fosfato de calcio. El tegumento de los diplópodos es duro y parecido al de los crustáceos, ya que a pesar de su naturaleza quitinosa, también se encuentra impregnada de carbonato de calcio, lo mismo sucede en la cutícula de briozoarios y en las espinas y dientes que recubren el cuerpo de quetognatos, entre otros.<sup>6,24</sup>

También algunos tipos de hongos se encuentran entre los organismos que incluyen quitina en estructuras de protección, como la pared celular que está constituida en su mayor parte por quitina y en menor proporción por celulosa y otros azúcares. Por ejemplo, para Aspergillus niger y Penicillium chrysogenum la quitina representa entre un 22 y 35% en peso seco respectivamente.<sup>2,14,32</sup>

ORGANISMO	CONTENIDO QUITINA ( % )
<u>CRUSTACEOS</u>	
Cáncer (cangrejo) . . . . .	72.1 <sup>c</sup>
Carcinus (cangrejo) . . . . .	0.4-3.3 <sup>a</sup>
	8.29 <sup>d</sup>
	64.2
Callinectes (cangrejo azul) . . . . .	14 <sup>a</sup>
Pleuroncodes (cangrejo rojo) . . . . .	1.3-1.8 <sup>b</sup>
Camarón Alaska . . . . .	28 <sup>d</sup>
Nephrops (langosta) . . . . .	69.8 <sup>c</sup>
Krill (caparazón desproteinizado) . . . . .	40.2
<u>INSECTOS</u>	
Periplaneta (cucaracha) . . . . .	2.0
Blattella (cucaracha) . . . . .	48.4 <sup>c</sup>
	10 <sup>b</sup>
Tenebria (escarabajo) . . . . .	35 <sup>c</sup>
Escarabajo espinoso . . . . .	16 <sup>b</sup>
Pieris (mariposas sulfúreas) . . . . .	64 <sup>c</sup>
Bombyx (gusano de seda) . . . . .	44.2 <sup>c</sup>
Calleria (gusano de cera) . . . . .	33.7 <sup>c</sup>
<u>MOLUSCOS</u>	
almeja . . . . .	6.1
ostra . . . . .	3.6
calamar . . . . .	41.0
<u>HONGOS</u>	
Aspergillus niger . . . . .	42.0 <sup>e</sup>
Penicillius notatum . . . . .	18.5 <sup>e</sup>
P. chrysogenum . . . . .	20.1 <sup>e</sup>
S. cerevisiae . . . . .	2.9 <sup>e</sup>
Mucor rouxii . . . . .	44.5

Tabla 1 Contenido de quitina en algunos Crustáceos, Insectos, Hongos y Moluscos.

- a - Peso seco
- b - Peso húmedo
- c - Peso orgánico de cutícula
- d - Peso total seco de cutícula
- e - Peso seco de pared celular

## 1.2 FUENTES POTENCIALES DE QUITINA

### 1.2.1 Generalidades

A partir de la industria pesquera en todo el mundo se generan grandes cantidades de subproductos quitinosos que de acuerdo a cálculos realizados podrían ascender a un poco más de un billón de toneladas. Tan sólo en Japón son procesados un millón de kg de residuos quitinosos que se destinan para muy variados usos<sup>4,24</sup>. La industria pesquera en los Estados Unidos tiene un promedio de captura de 150 a 180 millones de kg anuales de camarón y cangrejo, de los cuales la quitina representa potencialmente, en el procesamiento del camarón de un 14 a 27% y de un 13 a 15% en peso seco para el cangrejo.

Un recurso que representa una fuente muy importante de quitina a nivel mundial es un pequeño crustáceo (Euphasia superba) conocido como krill que se captura anualmente a razón de 500 billones de kg y que procesados industrialmente se pueden traducir en aproximadamente 150 millones de kg/año de quitina.<sup>37</sup>

### 1.2.2 Fuentes potenciales de quitina en nuestro país.

Considerando las 200 millas de mar patrimonial y los importantes volúmenes de organismos marinos con caparazón que son capturados y -

procesados, se podrá calcular la cantidad de quitina que puede ser generada en nuestro país, en donde son varios los organismos que representan por sus volúmenes de captura una fuente importante de éste polisacárido, tales como: almeja, calamar, camarón, jaiba, langosta, ostión, etc.

#### A) Camarón

El camarón es el más importante pues anualmente se capturan aproximadamente 72,010 toneladas en peso fresco, de cuyo procesamiento se obtienen volúmenes importantes (19,000 a 23,000 ton/año) de subproductos quitinosos, como cabezas, colas y caparazón; que industrializados se pueden traducir en una quitina disponible de 1,621 ton/año. Debido a lo anterior, se plantea la posibilidad de utilizar este tipo de subproductos que en la actualidad al menos en México, son considerados como desperdicios y que en forma directa o sometidos a hidrólisis parcial o total pueden ser utilizados para la elaboración de muy variados productos.<sup>13.30</sup>

#### B) Langostilla Mexicana

Otra fuente importante de quitina en nuestro país, corresponde a un pequeño crustáceo decápodo perteneciente a la familia Galatheidae: Pleuoncodes planipes. Stimpson ( 1860 ) llamado comúnmente Cangrejo Rojo, Cangrejo Mexicano o Langostilla Mexicana, Fig 1 que en estado adulto alcanza una talla de 8.8 a 12.7 cms y un peso aproximado de 3 a 5 gr. Las hembras se diferencian de los machos en que son más pequeños y en la carencia del primer par de patas, los

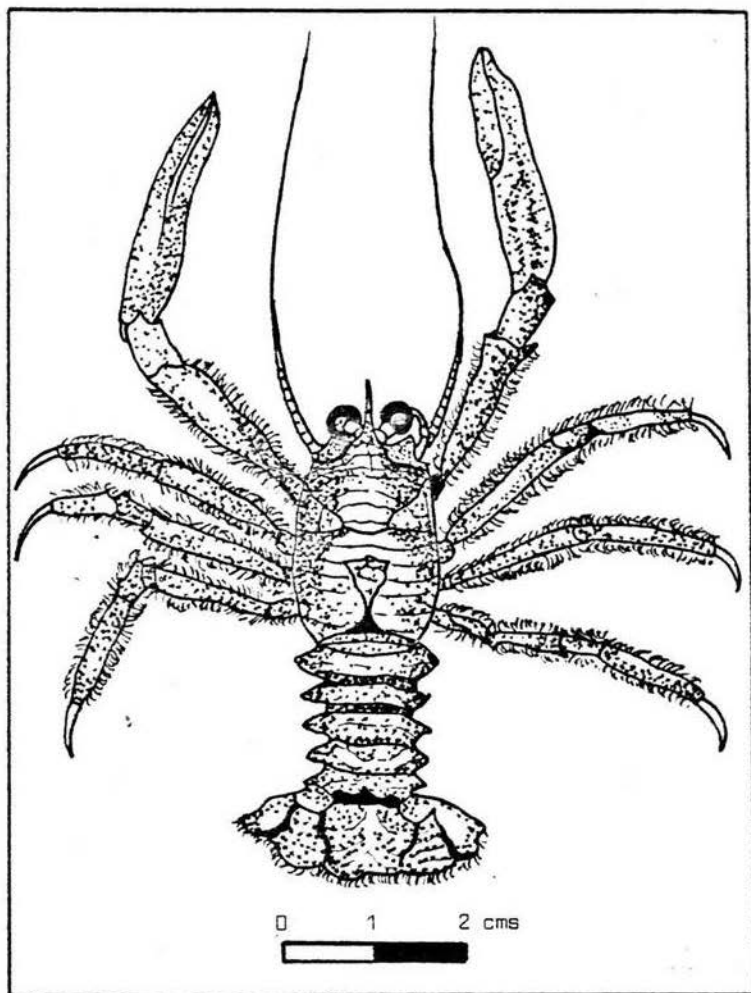


FIGURA 1.- Langostilla (Pleuroncodes planipes, Stimpson)

machos presentan una coloración rojiza en todo el cuerpo, mientras que las hembras sólo la tienen en la parte ventral.<sup>9,10,20</sup>

Este pequeño cangrejo se distribuye ampliamente en ambos litorales de la Península de Baja California (principalmente en la parte sur) y en el Golfo de California a lo largo de las costas de Sonora y Sinaloa, con la mayor densidad entre Macapú y el Dorado de Sinaloa.<sup>9,10</sup>

La Langostilla Mexicana constituye un alimento importante para aves marinas, atún de aleta amarilla, albacora, así como de grandes cetáceos (ballenas) que año con año arriban al Golfo de California con fines reproductivos.

Como consecuencia de la baja notable en el número de ballenas y ante la creciente sobreexplotación a que son sometidos los principales consumidores del Cangrejo Mexicano, se ha producido en los últimos años un gran incremento en la población de este organismo que por su abundancia propicia la formación de una nueva pesquería.<sup>11</sup>

Las características que se deben tomar en cuenta para un aprovechamiento razonable de crustáceos de pequeña talla como el Krill (Euphasia superba) y la Langostilla Mexicana son: La conformación del cuerpo y la composición química, características que sirven para la selección y elaboración de una tecnología adecuada para la utilización de tales recursos.<sup>10</sup>

Algunas evaluaciones biológico - pesqueras, como las realizadas por

Arvizú en 1976, permiten establecer un potencial de captura para la langostilla de 250 mil toneladas anuales. La razón fundamental de que hasta el momento no exista una pesquería dedicada a su explotación, se debe a la carencia de adecuación de una tecnología que permita su manejo, transporte y comercialización. Es por esto que el Instituto Nacional de Pesca en un Programa para el Aprovechamiento Integral de Langostilla, llevado a cabo en un Centro Regional de Investigaciones Pesqueras (CRIP), en la Paz, B.C.S., pretende a corto plazo adecuar a nivel piloto una tecnología para la elaboración de varios productos como: pastas, harinas, saborizantes y colorantes así como la obtención de quitina.

Las características en cuanto a composición química y constitución del cuerpo de la Langostilla Mexicana son muy semejantes a las del krill, Tabla 2. Por lo que este crustáceo es susceptible de procesarse e industrializarse de una manera semejante a la del krill.<sup>10</sup>

Actualmente las investigaciones se están encaminando a la utilización de Langostilla a nivel piloto como alimento (en forma de harinas o pastas), para peces de ornato y para peces de cultivo, como carpa y salmón, a las que confiere un agradable color rosado; así como alimento para animales domésticos.

La composición de dichas harinas es comparable a la harina de pescado, en cuanto a calidad, por lo que hasta el momento la utilización de la harina de langostilla ha dado resultados satisfactorios, al igual que el uso de saborizantes obtenidos de ésta, que de acuerdo a pruebas preliminares permiten dar un sabor característico de camarón

Componente	Krill	Langostilla Mexicana		
Agua %	75.0	76.9 <sup>a</sup>	78.9 <sup>b</sup>	83.0 <sup>c</sup>
Masa Seca %	25.0	23.1	21.1	17.0
Proteína %	12.5	10.6	9.0	9.3
(N <sub>t</sub> 6.25)				
Grasa %	6.5	2.5	0.9	0.8
Ceniza %	3.0	6.3	4.8	3.9
Quitina %	1.0	5.0	1.3	2.36
Carotina %	30-90	83-99 (wilkie, 1972)		
		120-160 (Spinelli, 1979)		
		39 (Surman, 1979)		
		230 (Beltrán, 1978)		

Nota: a) Kato, 1974

b) Spinelli, 1974

c) Beltrán, 1976

TABLA 2. Comparación de la Composición Química Básica del Krill Antártico (Euphasia superba. Dana) con la Langostilla-Mexicana (Pleuroncodes planipes. Stimpson)



a algunos productos que pueden ser destinados para consumo humano.\*

Debido al pequeño tamaño de la Langostilla Mexicana y a su aspecto desconocido, es un producto poco atractivo para consumo humano, pero su sabor tan parecido al del camarón, hace posible que pueda ser empleada para la elaboración directa de platillos o en forma de productos enlatados, consomés deshidratados, etc., que pueden sustituir al camarón. En relación a esto último se han elaborado concentrados proteicos de langostilla para consumo humano tratando de utilizar al máximo su valor nutritivo pero para ésto se requiere fomentar el desarrollo y comercialización de tales productos.<sup>20</sup>

Dentro de los objetivos del Programa para el Aprovechamiento Integral de la Langostilla se incluyen la obtención de otros productos como la quitina y quitosana, a éste respecto también en la planta piloto del CRIP de la Paz, B.C.S., dependiente del INP, se han realizado estudios dirigidos a la obtención de quitina a partir de la harina de langostilla previamente desengrasada y despigmentada, utilizando el método de Black & Schwartz<sup>20</sup> que ha permitido obtener rendimientos de un 9 al 13% en peso seco.\*\*

Como parte del Programa de Aprovechamiento Integral de la Langostilla, los objetivos del presente trabajo son: La obtención de quitina a partir de Langostilla Mexicana molida y deshidratada, así como la

\* Compers. Ing. Luz María Díaz López (INP)

\*\* Compers. Ing. Victor Mungúia Bastidas CRIP de la Paz, B.C.S.

producción de N-acetil-D-glucosamina, por medio de la hidrólisis enzimática de la quitina obtenida, utilizando las enzimas quitinolíticas de Serratia marcescens, planteando además los posibles usos que se podría dar a ambos productos.

### 1.3 CARACTERISTICAS QUIMICAS DE LA QUITINA

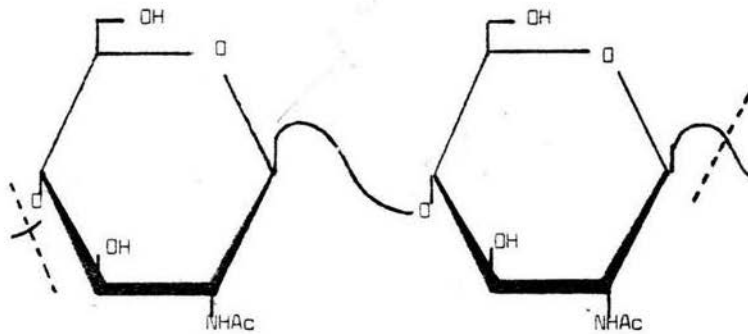
La quitina es un polisacárido constituido por unidades de N-acetil-D-glucosamina (NAG) unidas por medio de enlaces  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4). En este biopolímero los grupos amino se encuentran acetilados, por lo que la quitina corresponde a una amida del ácido acético<sup>3</sup>.

El término quitosana se refiere al producto de desacetilación obtenido a partir de la quitina en la que los grupos acetilo han sido eliminados, por consiguiente en la quitosana el grupo amino se encuentra libre, como amina primaria.

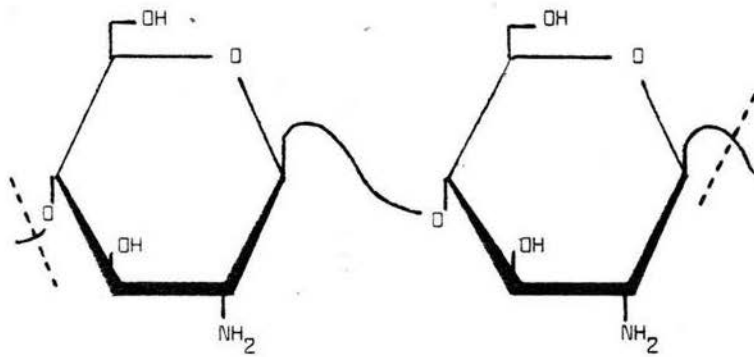
Los radicales amino tanto de la quitina como de la quitosana son excepcionalmente estables en hidróxido de sodio al 50% y a temperaturas de hasta 160°C.

El nombre oficial de la quitina es:  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-deoxi-D-glucana y el de la quitosana es  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-2-deoxi-D-glucana, Figura 2.

La quitina es un polímero de aspecto cristalino que se caracteriza por su elevada insolubilidad en los solventes más comunes y su notable resistencia a la acción hidrolítica de ácidos y álcalis<sup>4,31</sup>.



( A )



( B )

FIGURA 2.- Estructura química de: (A) Quitina y (B) Quitosana

Se ha podido observar que la quitina es soluble en algunos fluoroalcoholes y ciertas soluciones de sales hidrotópicas pero éstas presentan el inconveniente de alterar la estructura química de la quitina.

La N,N-dimetil acetamida en solución con cloruro de litio al 5% ha demostrado ser un sistema apropiado para disolver la quitina ya que no produce alteraciones en la estructura de ésta, el descubrimiento de éste sistema ha dado la oportunidad de poder determinar la rotación óptica de la quitina y considerar ésta como un parámetro adicional en la medida de sus propiedades físicas.

La quitina presenta una estructura quiral generada por los carbonos asimétricos de cada una de las unidades del polímero que la hacen adquirir una conformación helicoidal, la cual puede evidenciarse por el lento cambio en la dirección de la rotación óptica de algunos tipos de quitina en solución.

Del caparazón no calcificado del cangrejo Limulus polyphemus ha sido obtenida quitina bajo condiciones alcalinas ligeras, siendo ésta levorotatoria. Algunas quitinas que requieren para su aislamiento de tratamientos drásticos con ácidos fuertes a altas temperaturas son dextrorotatorias, aunque las variaciones en las rotaciones ópticas pueden deberse a la severidad de los tratamientos químicos, también el tipo de organismo de que haya sido obtenida la quitina, puede ser un factor importante.<sup>31</sup>

#### 1.4 METODOS DE OBTENCION DE QUITINA

Los objetivos básicos que se persiguen al aplicar los procesos químicos para la obtención de quitina a partir del caparazón de crustáceos o desperdicios producidos en la industria pesquera son: a) eliminación de proteínas y b) eliminación de las sales minerales, con las que se encuentra fuertemente asociada.

Uno de los métodos más frecuentemente utilizados es el método de Hackman (1954) Figura 3, con el que se puede obtener quitina a partir del caparazón de crustáceos por medio de extracciones, primero con ácido clorhídrico y posteriormente con hidróxido de sodio para eliminar proteínas y sales minerales.<sup>31</sup>

Whistler y BeMiller (1962) sugieren un esquema similar al método de Hackman, al que hacen una ligera modificación al dar un tratamiento adicional con alcohol etílico para solubilizar los pigmentos y un tratamiento con éter etílico para la eliminación de grasas.<sup>31</sup>

En general estos métodos, así como otros empleados en la obtención de quitina a partir del caparazón de crustáceos son catalogados como tratamientos drásticos, debido a que el uso de ácidos y bases fuertes pueden modificar la estructura química de la quitina, ya sea produciendo hidrólisis parcial en la molécula o desacetilando a ésta con la consecuente producción de quitosana.

Existen otros métodos para la obtención de la quitina como el descrito por Foster & Hackman ( 1957 ), con el que se ha podido aislar



FIGURA 3. Método de Hackman. Extracción de quitina

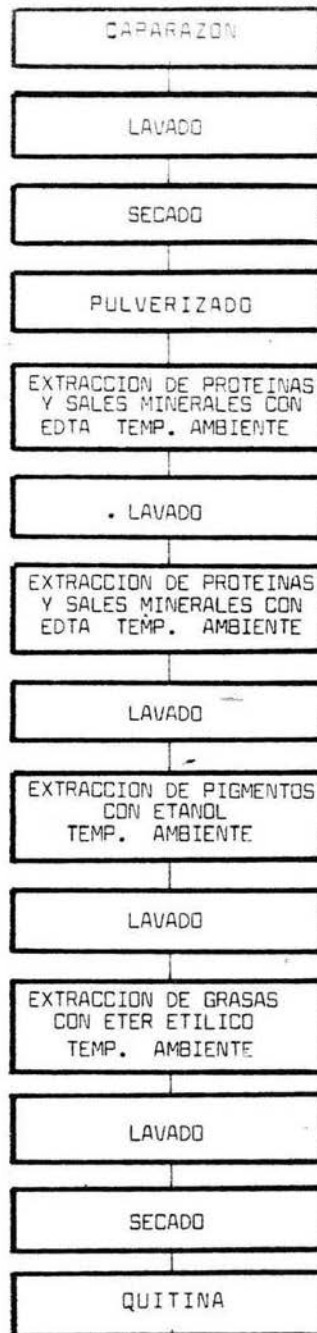


FIGURA 4. Método de Foster & Hackman. Extracción de quitina

quitina del cangrejo Cáncer pagurus sin alterar su estructura química, Figura 4, éste proceso se basa en la utilización de ácido etileno diamino tetraacético (EDTA) a diferentes valores de pH para eliminar tanto proteínas como sales minerales. La eliminación de grasas y pigmentos requieren de un tratamiento con éter etílico y alcohol respectivamente.<sup>18,31</sup>

El método de Takeda & Abe (1962) además de utilizar EDTA utiliza enzimas proteolíticas que permiten obtener una quitina con bajo porcentaje de proteínas y poco alterada en su conformación química.<sup>31</sup>

Durante la etapa de desproteínización de cualquiera de los métodos empleados para la obtención de quitina las proteínas eliminadas pueden ser recuperadas por filtración o neutralización con ácidos o bases según sea el caso. Dicha recuperación puede incrementar la rentabilidad de cualquiera de los métodos empleados debido a que se pueden obtener derivados proteícos que bien podrían ser utilizados como complementos en dietas para alimentación animal.<sup>10</sup>

### 1.5 HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE QUITINA

Investigaciones recientes han demostrado que el complejo quitinolítico es un sistema inducible y parece estar constituido por tres enzimas; una endoglucanasa, una quitobiasa y un factor prehidrolítico.

En la quitinolisis actúa primero el factor prehidrolítico cuya función básica es la descristalización de la quitina la cual posteriormente por medio de un número no determinado de endoquitinasas produ-



ce oligosacáridos solubles, especialmente N,N-diacetilquitobiasa, finalmente son transformados a NAG por medio de una quitobiasa.<sup>1,13</sup>

En 1969 Monreal & Reese establecieron las condiciones óptimas de cultivo de Serratia marcescens QMB1466 para la máxima producción de quitinasas y concluyeron que la naturaleza de la quitina es importante para obtener altos rendimientos de la enzima, además de otros factores tales como: a) Concentración del sustrato, b) Temperatura y c) pH. En relación a la concentración del sustrato confirmaron el carácter inductivo del sistema enzimático referente a la temperatura y pH, determinándose que la mayor producción de enzima se tiene a 30°C y a un pH óptimo de 7.5.<sup>29</sup>

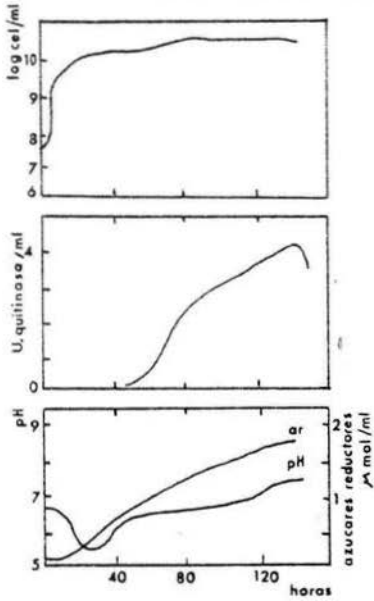
La actividad de la enzima generada se expresa por unidades de quitinasa correspondiente a la cantidad de quitinasa requerida para liberar una micromol de NAG. Cosio & Carroad (1982) y Revah & Carroad (1981) basados en lo anterior, evaluaron las condiciones óptimas de producción de NAG y del sistema quitinolítico de Serratia marcescens para su utilización a nivel planta piloto, en la conversión de materiales quitinosos principalmente desechos de camarón a proteína unicelular que pueda ser empleada en alimentación animal como un complemento dietético de buena calidad.<sup>12,37</sup>

Cruz Camarillo (1984) ha estudiado la biosíntesis de quitinasa y quitobiasa de Serratia marcescens en un medio con sales minerales, citrato de amonio, glicerol y quitina. En ciertos experimentos suprimió el glicerol o el citrato y varió la naturaleza de la quitina, Figura 5, utilizando en ocasiones quitina comercial\* quitina desproteínizada\*\*

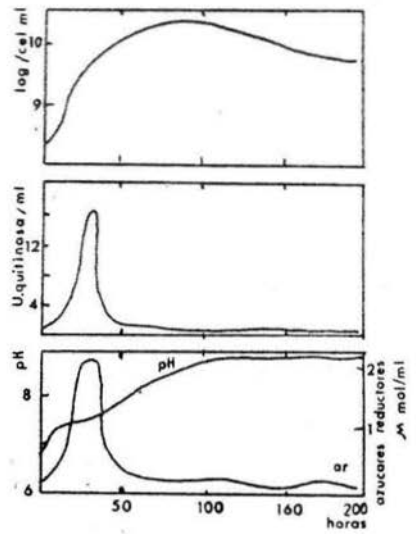
\* Quitina comercial: Nutritional Biochem. Co. Cleveland, Ohio.

\*\* Quitina desproteínizada: Quitina comercial libre de proteínas mediante tratamiento con KOH.

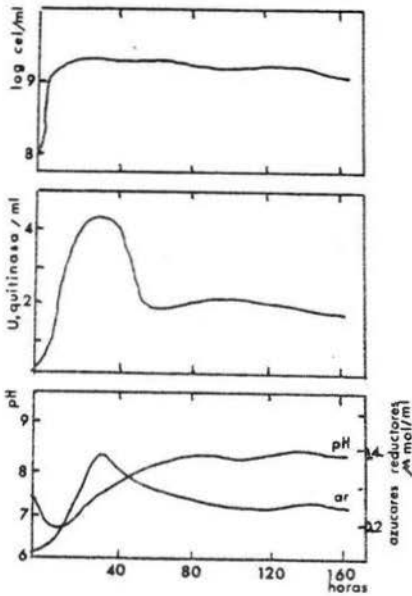
QUITINA COMERCIAL Y 1/2 COMPLETO



SOLO QUITINA COMERCIAL



QUITINA COLIDAL SIN GLICEROL



QUITINA DESPROTEINIZADA SIN GLICEROL

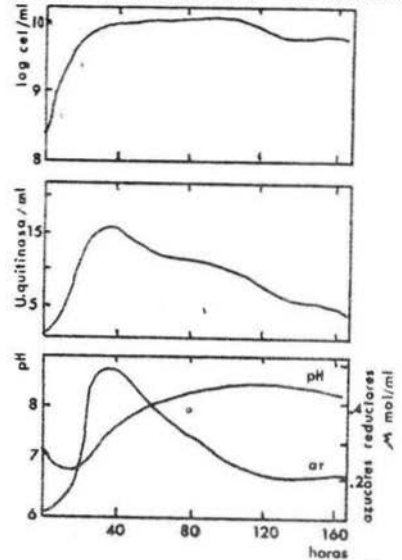


FIGURA 5. Hidrólisis enzimática de quitina por medio de *Serratia marcescens* 13

o quitina coloidal\*\*\*. Los resultados obtenidos fueron muy variados encontrándose que los valores más altos para ambas enzimas así como de NAG correspondían al emplear el medio completo y quitina comercial, y los más bajos al utilizar quitina coloidal y desproteinizada. Al suministrar sólo quitina comercial como única fuente de carbono se obtienen niveles bajos de las enzimas, aún cuando la cantidad de NAG es aceptable, además de esto se realizó la caracterización parcial de las quitinasas y quitobiasas a nivel de extracto crudo, observando además que: a) La actividad de las dos enzimas se mantiene estable por varios meses a temperaturas de refrigeración o de congelación, b) La NAG no afecta la actividad de la quitinasa a altas concentraciones, pero sí la de la quitobiasa, sugiriendo en relación a esto que la regulación de ésta enzima está sujeta probablemente a una inhibición por producto final.<sup>13</sup>

#### 1.6 USOS DE QUITINA Y N-ACETIL-D-GLUCOSAMINA.

Son muchos los usos que se le dan y pueden dar a los productos quitinosos, prueba de ello es que ya se procesan la quitina y quitosana a nivel industrial a partir de desperdicios de crustáceos para la elaboración de muy diversos productos, esto es en: Bioshel Products Albany, Oregon, USA; Kyokuyo, Co., Tokyo, Japón; Kyowa Oil and Fat, Tokyo, Japón.

Características tales como dureza, biodegradabilidad y bioactividad,

\*\*\* Quitina coloidal: Quitina sometida a un tratamiento con ácido fosfórico.

hacen de la quitina y sus derivados, materiales que en la industria procesadora de alimentos puedan ser empleados para modificar o controlar las propiedades funcionales de los alimentos, ya sea como regulador de formación de cristales de hielo en alimentos congelados, agente espesante, texturizante, quelante, emulsionante, etc., para la elaboración de aderezos, salsas, bebidas, pastelería, embutidos, gelatinas, productos lácteos, etc.

La quitina microcristalina producida por hidrólisis ácida controlada, es apropiada para ser utilizada como un espesante y estabilizador que supera en mucho (10 a 20 veces más eficiente) a otros polímeros empleados comúnmente como la celulosa microcristalina, para la elaboración de mayonesas, manteca de cacahuete y otros alimentos tipo emulsión.<sup>4,24</sup>

La propiedad coagulante o quelante de la quitina y quitosana dada por su naturaleza policatiónica, hacen de estos polímeros un producto ideal para la separación de coloides y partículas suspendidas que se generan durante la elaboración de ciertos tipos de alimentos, permitiendo además de la reducción de sólidos totales, la recuperación de materiales, tales como: proteínas, grasas y carbohidratos de buena calidad, que pueden ser reciclados como alimentos o forraje para animales.<sup>24</sup>

La naturaleza policatiónica tanto en quitina como en quitosana hacen que puedan ser empleados en la industria de alimentos para remover sustancias no deseadas en algunos productos como jugos, cerveza y bebidas en general. La quitina y quitosana son propuestos como agentes para el tratamiento de aguas residuales, debido a que además

de remover sólidos en suspensión, también tienen la propiedad de secuestrar metales pesados como: arsénico, zinc, cobre, cromo, plutonio e incluso uranio. Estas propiedades ya son utilizadas en algunas plantas de los Estados Unidos en sistemas de purificación para agua.<sup>16</sup> La quitina en forma de gel también puede ser usada como soporte o excipiente para algunos medicamentos.<sup>28</sup>

Los filamentos producidos por la solubilización de quitina en un sistema de cloruro de litio y dimetilacetamida, aceleran los procesos de cicatrización en heridas, siendo un material ideal para la fabricación de suturas quirúrgicas ya que esos filamentos son absorbibles y no alergénicos.

El suero de leche combinado con quitina microcristalina puede reemplazar hasta en un 20 % las formulaciones de alimentos para animales, sin producir algún efecto adverso y sí mejorando el valor nutritivo de dichos alimentos y las características organolépticas del producto.

La quitina y quitosana también poseen la propiedad de adsorber enzimas, por lo que pueden utilizarse ya sea para la purificación o inmovilización de sistemas enzimáticos.<sup>19</sup>

La quitina también puede ser empleada como sustrato para la producción de proteína unicelular de muy buena calidad que pueda ser incorporada en alimentos balanceados para animales,<sup>37</sup> la quitina por medio de hidrólisis produce NAG que puede utilizarse en laboratorio como un reactivo analítico.

La quitina como fuente de NAG es muy importante, ya que éste monosacárido y su forma alquilada pueden adicionarse a la leche y sus derivados, para atenuar el problema de la mala digestión o intolerancia a la lactosa de la leche, debido a una deficiencia primaria de la enzima galactosidasa. En México de un 50 a 70 % de la población mayor de seis años presenta problemas de mala absorción o intolerancia a la lactosa, los síntomas de dicha intolerancia se deben a que la lactosa y otros disacáridos permanecen en el intestino delgado, sin desdoblarse, causando problemas tales como diarrea, en ocasiones severas y cólicos.<sup>4,5,15,17,25</sup>

La NAG que de manera natural sólo se encuentra en el calostro y leche materna, y sus derivados alquilados tienen un efecto promotor de crecimiento (factor bifidus) para la bacteria Lactobacillus bifidus que al igual que otros microorganismos como L.acidophilus son parte importante de la flora intestinal normal, dichos microorganismos intervienen en procesos de asimilación de productos lácteos, particularmente ayudando a desdoblar la lactosa de la leche y sus derivados. Es por ésto que se ha considerado la administración de productos alquilados de NAG a personas que padecen de intolerancia a la lactosa para ayudar a atenuar el problema, favoreciendo el crecimiento de la bifidobacteria que genera la lactosa necesaria para el desdoblamiento de dicho disacárido.<sup>5,15,17,21,22</sup>

Otra importante aplicación de la NAG y sus alquil-derivados, es que junto con el suero de leche pueden ser utilizados como complementos en dietas para alimentación animal. El uso de NAG o de sus compuestos alquilados y del suero de leche proporcionaría además de un complemento rico en carbohidratos y proteínas de alta calidad, la promoción de la flora intestinal que puede atenuar la mala absorción

de la lactosa y por consiguiente problemas tales como cólicos y diarreas severas a que están propensos los animales que incluyan en su dieta considerables cantidades de suero de leche.<sup>4</sup>

## II.- PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1 MATERIAL

#### -Reactivos

Acido acético (G.A., J.T. Baker)  
Acido 3,5 dinitrosalicílico (cristalino, Sigma)  
Acido etilendiamino tetracético (EDTA) (G.A.,J.T.Baker)  
Acido fosfórico (G.A., J.T.Baker)  
Acido sulfúrico (G.A., J.T.Baker)  
Anhídrido acético (G.A.,J.T.Baker)  
Bisulfito de sodio (G.A., J.T.Baker)  
Borohidruro de sodio (98% grado "Baker", J.T.Baker)  
Fenol, cristales (Merck's Meagenzeen)  
Hidróxido de sodio, lentejas (G.A.,J.T.Baker)  
Piridina (G.A.,J.T.Baker)

#### -Solventes

Acetona (G.A.,J.T.Baker)  
Agua destilada  
Agua deuterada (99.8% D,Stohler Isotope Chemicals)  
Alcohol etílico absoluto (G.A.,J.T.Baker)  
Alcohol metílico absoluto (G.A.,J.T.Baker)  
Benceno, libre de tiofeno (G.A.,J.T.Baker)  
Cloroformo (G.A.,J.T.Baker)  
Cloruro de metilo (G.A.,J.T.Baker)  
Eter etílico (G.A.,J.T.Baker)

\* G.A. grado analítico



-Estandares

D-arabinosa [(Nutritional Biochemical Corporation (N.B.C.))]  
D-glucosa (N.B.C.)  
D-galactosa (N.B.C.)  
D-fucosa (N.B.C.)  
D-manosa (N.B.C.)  
N-acetil-D-glucosamina (N.B.C.)

-Equipo

Microjeringas (Hamilton, Co.)  
Columna de cromatografía OV-17 (Applied Science Labs., Inc.)  
Papel filtro (Ederol No.1)  
Papel filtro (Ederol No.4)  
Papel filtro (Ederol No.15)  
Nitrógeno de alta pureza, gas no licuado, envasado a alta presión, Industrias Franco, S.A. (INFRA)  
Agitador vortex (Scientific Industries In., mod. K550-6)  
Autoclave (Wisconsin Aluminum Co. Inc. Foundry, de 210 a 259°C y un máximo de 30 atm)  
Balanza analítica (Sartorius,  $1.0 \times 10^{-5}$  a 160 g)  
Balanza granataria (Sartorius, tipo Babener, capacidad máxima 1,000 g)  
Baño para calentamiento (Bacel Philadelphia P.D.)  
Centrífuga (Du Pont Instrument, Sorval GLC-28)  
Equipo Kofler (Hoffman-Phinter and Bors Worth S.A., modelo Reichert 285 987)  
Estufa (Presión Thelco, mod.16, temperatura máxima 200°C)

Parrillas de calentamiento y agitación

Rotavapor (Büchi, mod. "R")

Espectrofotómetro de absorción de Infrarrojo. Beckman AccuLab<sup>TM</sup> 10

Espectrofotómetro (Bausch and Lomb, espectral 20)

Liofilizadora (Virtis mod. 10-MR-80, 208/25 volts, 60 ciclos 12 -  
ampers, 1 fase)

Mantas de calentamiento (Glass-Col Apparatus Co.)

Reostatos (Fisher Scientific Co.)

Potenciómetro (Perkin-Elmer Coleman, mod. 288)

Cromatógrafo de gases (Varian Aerograph, mod. 3700)

Registrador (Varian Aerograph, mod. 9196)

Graficador (Varian Aerograph, mod. 9176 Recorder)

-Material para medios de cultivo microbiológico

Agar nutritivo deshidratado (Bacto Nutrient Broth, DIFCO)

Agar bacteriológico (Bioxan)

Extracto de levadura (Bacto Nutrient Broth, DIFCO)

Fosfato de potasio monobásico (cristales, G.A.,J.T.Baker)

Regulador de fosfatos 0.06 M a pH de 6.5

Sulfato de amonio (granular, G.A.,J.T.Baker)

Sulfato de magnesio heptahidratado (cristales,G.A.,J.T.Baker)

Tartrato de sodio y potasio (G.A.,J.T.Baker)

El material de vidrio empleado para las determinaciones colorimétricas y la parte microbiológica se lavó de la siguiente manera:

El material se enjuagó con etanol y se puso en mezcla crómica. Después se sometió a un lavado común con agua y jabón. Se enjuagó con agua destilada y con etanol, para después secarse en la estufa a 170°C

- Materia prima para la obtención de quitina

Se utilizó harina de langostilla molida y deshidratada con la que se obtuvieron:

- QP Quitina obtenida en el INP utilizando el método de Black & Schwartz
- QL Quitina obtenida en el presente trabajo utilizando el método de Hackman y el método de Foster & Hackman que posteriormente no se utilizó por sus bajos rendimientos de quitina.

## 2.2 METODOLOGIA

Con el objeto de seleccionar un método para la obtención de quitina que diera altos rendimientos a un bajo costo se probaron: el método de Hackman y el de Foster & Hackman como a continuación se indica:

### A) Método de Hackman, 1954.

Lotes de 330 g (en peso seco) de langostilla molida se sometieron a tratamientos ácidos y alcalinos para la eliminación de carbohidratos, proteínas, pigmentos y lípidos.

El primer paso consistió en la digestión ácida usando ácido clorhídrico.

drico 2N, durante 5 horas a temperatura ambiente y agitación constante; enseguida se procedió a filtrar el precipitado obtenido y se lavó con agua destilada.

Una segunda digestión se llevó a cabo con ácido clorhídrico 2N a 0°C durante 48 horas. Se filtró y se lavó de igual manera que en la primera extracción.

El paso siguiente consistió en la extracción con 750 ml de hidróxido de sodio 1N a temperatura de reflujo, durante 12 horas, en constante agitación. Posteriormente se filtró y el sólido se lavó con agua destilada. Este último paso se repitió 5 veces obteniéndose un sólido cristalino de color blanco, Figura 3.

B) Método de Foster & Hackman, 1957.

Este método se basa en el uso del ácido etilendiamino tetraacético (EDTA), para la extracción de quitina.

Se tomaron lotes de 25 gr de langostilla molida y deshidratada y se descalcificaron con 150 ml de EDTA 1 N durante 1.5 horas. Posteriormente se filtró y lavó con agua destilada, enseguida el sólido es tratado con 150 ml de EDTA 1N a pH de 3 durante 1.5 horas a temperatura ambiente, lavando después 5 veces con agua destilada. Se realizó una tercera extracción con 100 ml de alcohol etílico durante 20 minutos a temperatura ambiente y después se filtró y lavó como en las extracciones anteriores.

En una cuarta extracción se eliminaron lípidos con 100 ml de éter

etélico durante 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se realizaron 2 extracciones durante 2 horas a temperatura de reflujo, la primera con 150 ml de hidróxido de sodio 1N y la segunda con 150 ml de agua destilada, posteriormente al precipitado se filtró, lavó y secó al vacío en un horno a 80°C durante 3.5 horas,<sup>18</sup> Figura 4.

### 2.2.2 Caracterización de la quitina

#### - Solubilidad

Se comprobó la insolubilidad de la QP y QL en los solventes más comunes a temperatura ambiente y a temperatura de reflujo.

#### - Punto de descomposición

Se tomó un cristal de cada muestra de quitina para observar el punto de descomposición en un equipo Kofler. Las muestras de QP y QL fueron molidas previamente para homogenizar el tamaño de la partícula.

#### - Espectro infrarrojo

Las muestras para la determinación del espectro infrarrojo ( IR ) se prepararon mediante la técnica de la pastilla o disco prensado con bromuro de potasio, debido a la insolubilidad de la quitina en los solventes utilizados para la realización del espectro. En esta técnica, la muestra previamente molida y secada fué íntimamente mezclada con bromuro de potasio para posteriormente prensarse hasta obtener

una pastilla transparente.

Los espectros obtenidos se interpretaron con las tablas correspondientes de espectros de IR y se compararon con lo reportado en la literatura para quitina.<sup>26,32,39,40</sup>

Estas pruebas se llevaron a cabo en el Laboratorio de Análisis Químico e Instrumental de la Unidad de Investigación Interdisciplinaria de Ciencias de la Salud y de la Educación de la ENEP-Iztacala, UNAM.

#### -Cromatografía de gases

Se efectuaron cromatogramas para las muestras procedentes de la hidrólisis de QP y QL con ácido fluorhídrico al 100%. Dicho análisis se efectuó en columna capilar y fué realizado por el químico Pia Seffers en el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Estocolmo, Suecia, como parte de la caracterización de QP y QL.

#### -Análisis bromatológico

Se realizó el análisis bromatológico<sup>3</sup> a la harina de langostilla y a las quitinas obtenidas por el Instituto de Pesca (QP) y en el Laboratorio (QL). Estas determinaciones se muestran en la Tabla No.4 y fueron realizadas por la Q.F.B. Ma. Concepción Medina en el Depto. de Biotecnología en el CINVESTAV-IPN, utilizando los siguientes métodos:

Humedad: Realizado de acuerdo al método 7.003 del AOAC

Cenizas: Fue determinado de acuerdo al método 7.010 del AOAC

Nitrógeno Total: De acuerdo al método de micro-Kjeldahl 42.014 AOAC

*Que valor  
de factor  
de conversión dió.*

Fibra cruda: De acuerdo al método de Kamer & Ginkel

Extracto etéreo: De acuerdo al método 15.030 del AOAC

Extracto libre de Nitrógeno: Se obtuvo restando de 100 la suma de porcentajes de proteínas, cenizas, extracto etéreo y fibra cruda.

### 2.2.3 Hidrólisis de la quitina

Se realizaron pruebas de laboratorio para efectuar la hidrólisis de las quitinas QP y QL utilizando: ácido sulfúrico 8M y ácido clorhídrico 8M; ambos se probaron durante 20, 40 y 60 minutos a temperatura ambiente y a 100°C. Al final de estos tratamientos se observó solubilidad parcial de las muestras de quitina. El producto obtenido en la hidrólisis química se analizó por cromatografía en placa fina observándose que el producto principal de la hidrólisis era NAG acompañado de productos de descomposición del polisacárido. En base a lo anterior se optó por probar la hidrólisis-enzimática.

#### A) Hidrólisis enzimática de la quitina

##### -Microorganismo utilizado

La bacteria con actividad quitinolítica empleada en el presente estudio fué: Serratia marcescens WF QMB1466, proporcionada por el Dr. Ramón Cruz Camarillo, Jefe del Departamento de Enzimología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

Durante la investigación la cepa fue conservada en agar nutritivo a temperatura de refrigeración.\*

#### -Medios de cultivo

El medio utilizado para el crecimiento del microorganismo fue el - descrito por Monreal y Reese<sup>29</sup> (1969), cuya composición es la siguiente: quitina, 15 g/l; extracto de levadura, 0.5 g/l; sulfato de magnesio heptahidratado, 0.3 g/l; fosfato de potasio monobásico, 1.36 g/l; y agua destilada. El pH se ajustó a 6.8 con hidróxido de sodio 1N y se esterilizó a 15 atm durante 50 minutos.

Se preparó un lote de medio de cultivo con quitina de pesca y otro lote de medio de cultivo con quitina de laboratorio, para realizar el estudio comparativo entre QP y QL. Para la determinación de la cuenta viable se utilizó como medio de cultivo agar nutritivo.

#### -Preparación del reactivo del ácido 3,5-dinitrosalicílico.<sup>27</sup>

Este reactivo se utilizó para la determinación de NAG presente en - los medios de cultivo. Se prepararon dos soluciones:

Solución A: Se mezclaron 0.71 g de ácido dinitrosalicílico y 1.32 g de hidróxido de sodio en agua destilada.

Solución B: Se disolvieron 20.4 g de tartrato de sodio y potasio; - 0.51 ml de fenol y 0.55 g de meta-bisulfito de sodio en agua destilada.

\* La parte microbiológica de éste estudio fué realizada bajo la dirección de la M.C. Jovita Martínez, CINVESTAV-IPN.



Las dos soluciones se mezclaron y se aforaron a 100 ml con agua destilada.

El reactivo fue preparado 24 horas antes de su utilización, conservado en un frasco ambar y a temperatura de refrigeración.

- Preparación de la curva patrón de azúcares reductores.

Se tomaron muestras de NAG a diferentes concentraciones y se prepararon de acuerdo a la técnica del ácido 3,5 dinitrosalicílico, determinándose su absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro.

La curva patrón se obtuvo graficando absorbancia vs concentración de NAG con los datos ajustados por el método de mínimos cuadrados para interpolar en ésta la NAG obtenida de la hidrólisis enzimática de la quitina, quedando representada la curva patrón por la siguiente ecuación:  $\text{Absorbancia} = 0.3877 (\text{mg NAG}) - 0.0891$ .

- Preparación de la quitina coloidal

La quitina coloidal se preparó a partir de las muestras de QP y QL. Se pesaron 10 g de quitina y se les agregó, poco a poco, ácido fosfórico al 85%. Se mantuvo a 5°C con agitación ocasional durante 48 horas. Posteriormente se le adicionó agua destilada en exceso para la precipitación de la quitina, la cual fué separada por filtración y lavada con agua destilada hasta la completa eliminación del ácido fosfórico. El gel obtenido fué esterilizado a una presión de 15 libras durante 15 minutos y conservado a 5°C hasta su posterior uso.

#### -Preparación del sustrato de quitina coloidal

Se suspendieron 15 g de quitina coloidal en un litro de regulador de fosfatos 1/15 M a pH de 6.5

La suspensión se mantuvo a 5<sup>o</sup>C hasta su empleo. Antes de ser utilizada se incubó a 50<sup>o</sup>C durante una hora.

Este procedimiento se siguió de igual manera tanto para la muestra de QP como para la de QL.

#### -Cinética de crecimiento

A partir de una cepa de Serratia marcescens WF QMB1466, crecida en agar nutritivo, se inocularon dos matraces conteniendo el medio mineral más quitina, estos fueron incubados a 29<sup>o</sup>C durante 24 horas a 150 rpm, Figura 6. Con el objeto de adaptar y estabilizar la edad del inóculo, se realizaron dos resiembras más. Los cultivos efectuados para la adaptación de la bacteria fueron llevados a cabo de manera similar para los medios de QP y QL.

Después de la tercera resiembra se inocularon 8 matraces de 250 ml conteniendo 50 ml de medio de QL y QP, respectivamente, para el seguimiento de la cinética de crecimiento del microorganismo. Estos matraces se mantuvieron en agitación a 150 rpm, a temperatura de 29<sup>o</sup>C.

Para la determinación de la cuenta viable se tomaron 0.5 ml de estos medios cada 24 horas con los que se inocularon cajas petri con

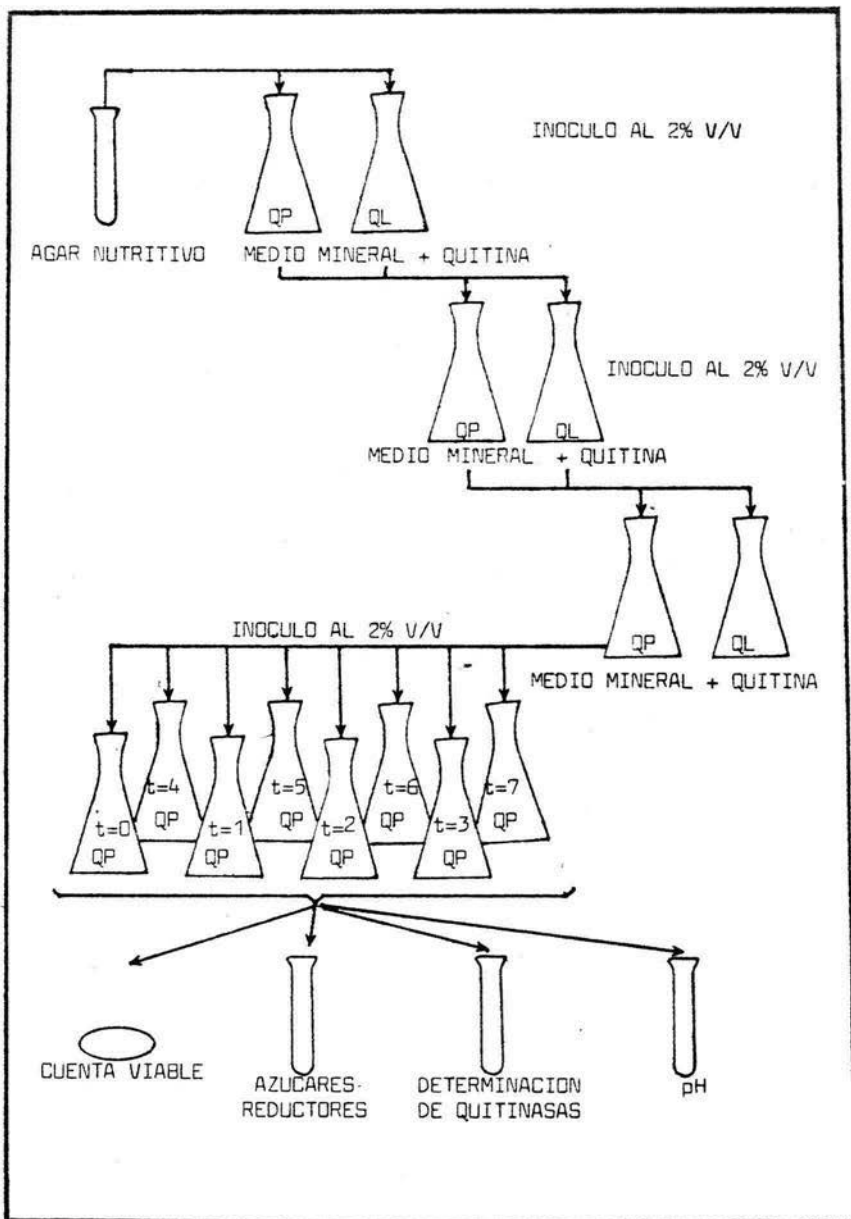


FIGURA 6.- Cinética de crecimiento de *Serratia marcescens* QMB1466 en medio quitinoso.

medio nutritivo siguiendo el método de recuento por vaciado en placa. Posteriormente se procedió a incubar la muestra a temperatura de 29°C durante 24 horas para el conteo de las colonias. Por otra parte se tomaron alícuotas de 10 ml de los matraces previamente inoculados, para la determinación de azúcares reductores, quitinasas y pH.

#### -Determinación de azúcares reductores.

Las muestras tomadas de los matraces conteniendo el medio inductor fueron filtradas y centrifugadas a 300 rpm durante 30 min. Del sobrenadante, se tomaron muestras para realizar las siguientes determinaciones: Azúcares reductores, pH y estimación de la enzima presente en el medio.

Para la determinación de los azúcares reductores se tomó un ml de la muestra centrifugada y se le adicionó un ml del reactivo del ácido 3,5-dinitrosalicílico. La mezcla se homogenizó en un vortex. Las muestras fueron colocadas después en baño maría a ebullición durante 5 minutos, posteriormente se enfriaron en baño de hielo. Después se adicionó a cada tubo 2 ml de agua destilada y se homogenizó nuevamente - en un vortex se determinó la absorbancia a 540 nm. Los testigos se prepararon con 1 ml de agua destilada, siguiendo el proceso descrito anteriormente. Las lecturas se interpolaron en una curva tipo preparada con NAG como estandar.

#### -Determinación de quitinasas

Se tomó una alícuota de 1 ml del sobrenadante, de la muestra centrifugada y se le agregó 1 ml del sustrato de quitina coloidal, ésta mezcla fué agitada en un vortex y se incubó a 50°C durante 1 hora. Después de éste tiempo, se detuvo la reacción adicionando 1 ml de hidróxido de so

dio al 1% antes de la incubación. Para cada muestra problema se preparó un testigo de igual forma, sólo que el hidróxido de sodio se adicionó desde un principio y antes que el sustrato. Los resultados fueron interpolados en la curva tipo. La cantidad de enzima liberada para producir 1 mol de NAG por ml de muestra y por cada hora de incubación a 50°C fué considerada como una unidad de quitinasa.

#### - Análisis de azúcares

Para identificar los azúcares presentes en el medio se tomaron muestras durante los 8 días de incubación las cuales se filtraron, centrifugaron, decantaron y liofilizaron para ser guardadas en refrigeración hasta su utilización para el análisis de azúcares por medio de cromatografía en placa fina y cromatografía de gases.

#### - Cromatografía en placa fina

Para identificar los azúcares obtenidos mediante la hidrólisis enzimática de QP y QL se utilizaron arabinosa, fucosa, glucosa y NAG como estandares, los cuales fueron preparados de la siguiente manera: Se pesaron 10 mg tanto de cada uno de los estandares como de las muestras liofilizadas de QP y QL, ésta cantidad fue diluida en 1 ml de agua destilada y de ahí fué tomada la muestra con un capilar para ser aplicada en placa fina. El eluente empleado fue N-propanol-amoniaco-agua en proporción 6:2:2. El tipo de sílice fué Kiesegel 60F 264, 0.2-0.5 mm. Se utilizó como revelador ácido sulfúrico al 8%.

## B) Análisis de azúcares

A 3mg de las muestras liofilizadas, provenientes de la hidrólisis enzimática de QP y QL se les adicionaron 2 ml de ácido clorhídrico 4M y se mantuvieron en baño María durante 2 horas a 100°C, las muestras se enfriaron y se llevaron al rotavapor, en donde se evaporaron (3 veces) casi a sequedad agregando 2ml de agua destilada cada vez hasta llegar a un pH de aproximadamente 6.

Se agregó 1 ml de agua destilada y se trató con aproximadamente 5 mg de borohidruro de sodio hasta llegar a un pH de 11. Las muestras se dejaron reposar en esta condición por un mínimo de 3 horas. Después de éste tiempo se agregó ácido acético glacial al 50% hasta llevar las muestras a un pH de 3. La muestra se evaporó en el rotavapor, agregando 3 ml de metanol cada vez. Se adicionó 1 ml de piridina seca y 1 ml de anhídrido acético. Se llevó a baño María a 100°C durante 30 minutos. Posteriormente la muestra se evaporó en el rotavapor 3 veces con etanol, cada evaporación casi a sequedad. Se realizó después una extracción con una mezcla de cloroformo-agua 2 ml de cada uno. La mezcla se agitó y se dejaron separar las fases. La fase orgánica se lavó tres veces con agua, enseguida se concentró en el rotavapor, para después transferirla con una pipeta Pasteur a un tubo para cromatografía gas-líquido. La muestra así procesada, se concentra bajo corriente de nitrógeno de alta pureza y se analiza por cromatografía gas-líquido.<sup>23</sup>

### - Características de la cromatografía de gases .

Se utilizó una columna de vidrio de 6 pies de largo y 1/16 de pulgada de diámetro interno, ajustada con férulas de teflón.

El gas acarreador utilizado fué nitrógeno de alta pureza con trampa de tamiz molecular activado.

La fase estacionaria utilizada fué OV-17

Los parámetros de operación fueron los siguientes:

La velocidad del registrador de 0.25 cm/minuto

Sensibilidad del registrador  $32 \times 10^{-11}$

Programa: de 170° a 250°C, aumentando la temperatura 1°C/min.

#### -Identificación de los azúcares

La asignación de los picos que aparecen en los cromatogramas de las muestras se realizaron por comparación con una mezcla de azúcares estandar.

El disolvente empleado para las muestras fué cloroformo. Se alternaron las inyecciones de las muestras por identificar, la mezcla de estandares y el estandar de N-acetil-D-glucosamina.

En los cromatogramas así obtenidos, se compararon los tiempos de retención de cada uno de los picos presentes en las muestras y los característicos para los estandares.

### III. RESULTADOS

#### 3.1 OBTENCION DE QUITINA

Los datos que se presentan en la Tabla 3, corresponden a los rendimientos obtenidos en la extracción de quitina a partir de Langostilla Mexicana mediante los métodos de Hackman, Foster & Hackman y Black & Schwartz, los dos primeros fueron utilizados en la obtención de quitina en éste estudio (QL), mientras que el último fue utilizado por el INP para el mismo fin (QP). En la Figura 7 se muestran los porcentajes de quitina obtenidos a partir de la harina de langostilla por los 3 métodos anteriormente señalados, donde se puede observar que la cantidad de quitina extraída mediante el método de Black & Schwartz y el método de Hackman, es comparable si se considera que el primero utiliza como materia prima harina de langostilla previamente desengrasada y despigmentada y el segundo utiliza harina integral.

#### 3.2 CARACTERIZACION DE LA QUITINA

Se comprobó el aspecto cristalino de ambas quitinas, así como su elevada insolubilidad con los solventes más comunes y se registraron los puntos de descomposición, correspondiendo  $305^{\circ}\text{C}$  para la QP y  $301^{\circ}\text{C}$  para QL.

Una de las determinaciones que permitieron caracterizar a QP y QL fue la espectroscopia infrarroja, en la Figura 8 se pueden observar los espectros de absorción obtenidos por ésta técnica para ambas quitinas, apreciándose una gran similitud entre ellas. Dichos espec-



tros fueron comparados a su vez con lo reportado en la literatura, detectándose las bandas cercanas a los 3265, 3105, 1655, 1620, 1550, 953 y 892  $\text{cm}^{-1}$  que son significativas en los espectros de quitina.

En relación a lo anterior, y al comparar con las tablas de correlación para grupos funcionales se observó que las bandas localizadas alrededor de los 3265  $\text{cm}^{-1}$  se relacionan con los grupos  $\text{CH}_3$  y  $\text{CH}_2$ , las bandas de absorción dadas entre los 1600 y 1650  $\text{cm}^{-1}$  coinciden con lo reportado para el grupo metileno. La banda de absorción correspondiente a una amina secundaria se localiza alrededor de los 1530  $\text{cm}^{-1}$ .

En la Figura 9 se muestran los cromatogramas realizados para las muestras procedentes de la hidrólisis de QP y QL con ácido fluorhídrico al 100% y una mezcla de estándares. En donde se observa que, como producto de la hidrólisis se obtiene NAG con un tiempo de retención de 18.4 min correspondiente a el estándar de NAG. También se observan otros picos que no corresponden a ninguno de los estándares utilizados, pudiéndose asociar éstos a productos de descomposición producida durante la hidrólisis ácida.

Con respecto al análisis bromatológico efectuado tanto a la harina de Langostilla como a QL y QP, Tabla 4, se puede observar que - como era de esperarse no son exactamente iguales los resultados obtenidos para QL y QP, sin embargo, no existen diferencias muy marcadas entre las dos quitinas a excepción del contenido de cenizas, el cual es considerablemente mayor en QL.

### 3.3 HIDROLISIS DE LA QUITINA

#### A) Hidrólisis enzimática

Las gráficas 1 y 2 corresponden a la hidrólisis enzimática, y la gráfica 3 a la cinética de crecimiento de Serratia marcescens utilizando como sustrato QL y QP. La Gráfica 4 muestra la hidrólisis de dichas quitinas representadas por la acumulación en los medios de cultivo del monómero de la quitina y en la Gráfica 5 se observa la producción de la enzima quitinasa.

En la Gráfica 1 se puede observar que el crecimiento de Serratia marcescens en un medio cuya única fuente de carbono es QL alcanza su máximo valor después de 48 hrs de incubación. Como consecuencia de la hidrólisis de la quitina, se acumulan en el medio, sustancias que paulatinamente elevan el pH hasta valores cercanos a 8.5. La hidrólisis del polímero se hace evidente con la simultánea aparición en los medios de cultivo de azúcares reductores ( NAG ) y quitinasa, la síntesis de ésta última se mantiene baja durante las primeras 120 hrs de incubación y posteriormente se incrementa rápida y logarítmicamente, registrándose como valor máximo 28.26 UQ/ml a las 192 hrs en que se dió por terminado el experimento. En relación a la acumulación de azúcares reductores en el medio se puede observar que ésta es proporcional a la producción de quitinasa, alcanzando 1.42 mol/ml como máxima concentración de NAG.

En la Gráfica 2 se observa que el crecimiento de S. marcescens en un

medio quitinoso (QP) sigue el mismo patrón que en el caso anterior al igual que las cinéticas de producción de quitinasas y acumulación de azúcares reductores, encontrándose concentraciones de quitinasas de 11 UQ/ml y 1.5 Mol/ml de azúcares reductores y un pH al momento de suspender el experimento de aproximadamente 8.5. La Gráfica 3 muestra la gran similitud en cinética de crecimiento obtenida para QL y QP.

En la Gráfica 4 se compara la producción de quitinasa a partir de la utilización de QP y QL como inductores, observándose cinéticas similares con la salvedad de que con la QL se obtienen mayores cantidades de enzima.

En la Gráfica 5 se muestra la acumulación de azúcares reductores como producto de la hidrólisis de QP y QL observándose comportamientos similares, a pesar de que QP parece favorecer la formación de una mayor cantidad de azúcares reductores en el medio de cultivo.

#### B) Análisis de azúcares

En la Figura 10 se muestra la cromatografía en placa fina de las sustancias obtenidas como producto de la hidrólisis enzimática de ambas quitinas, apreciándose en ellas la NAG como producto principal y otros compuestos que no son comparables a los estándares utilizados en la identificación por lo que se asocian probablemente a productos de degradación de la misma quitina.

En la Figura 11 se detalla el estudio que por medio de cromatografía de gases se efectuó a las muestras obtenidas durante la hidró-

lisis enzimática de la quitina, comparándolas con la mezcla de es tandares anteriormente señalado (Ver pág.57). En dicha Figura se indica el pico correspondiente a NAG y su tiempo de retención (22 min).

METODO UTILIZADO	VALOR MINIMO	VALOR MAXIMO	VALOR PROMEDIO	DESVIACION ESTANDAR
FOSTER Y HACKMAN	4 %	4.69%	4.3 %	0.48%
HACKMAN	4.3%	14.32%	8.66%	3.43%
BLACK Y SCHWARTZ	-	-	9-13 %	-

TABLA 3.- Rendimientos porcentuales de las extracciones de quitina

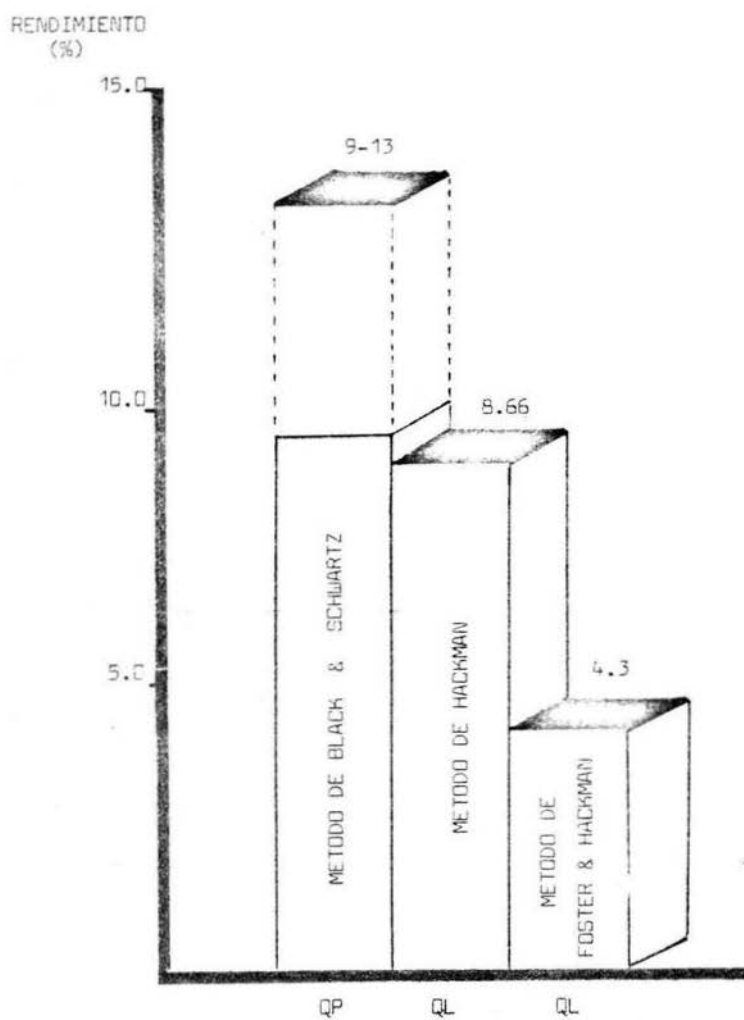


FIGURA No.7. Porcentaje de quitina (QL y QP) obtenida a partir de la harina de Langostilla Mexicana.

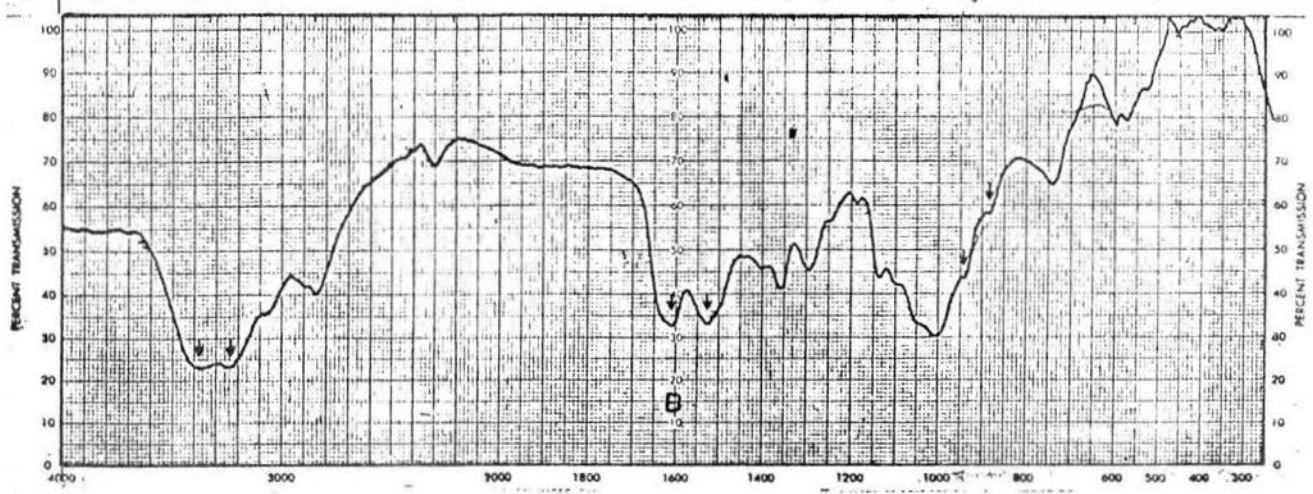
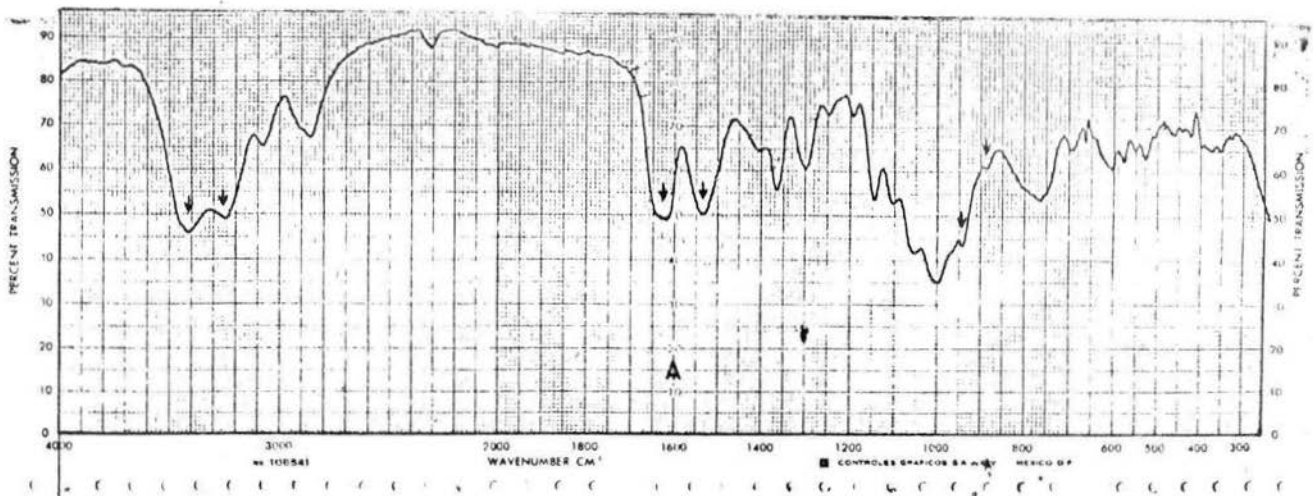


FIGURA B. Espectros de Infrarrojo de : A) QP y B) QL .

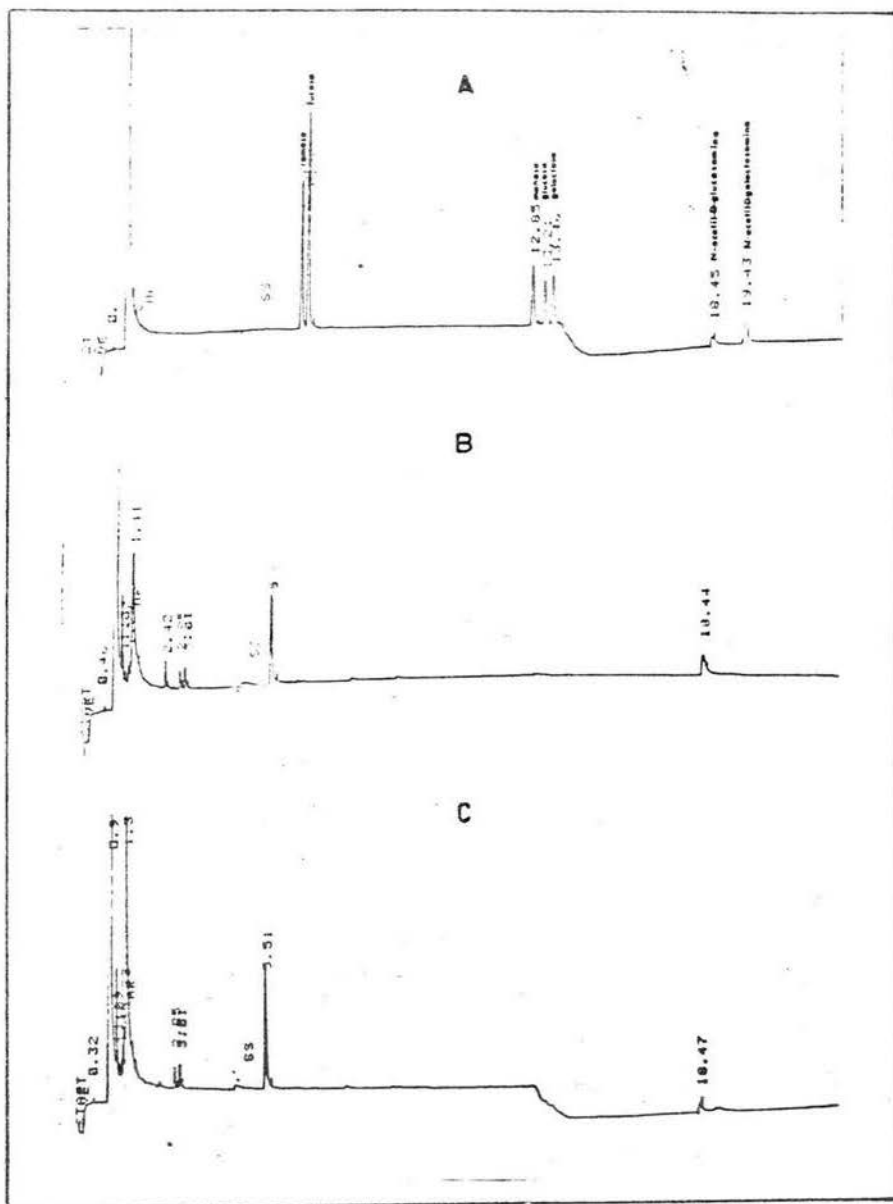
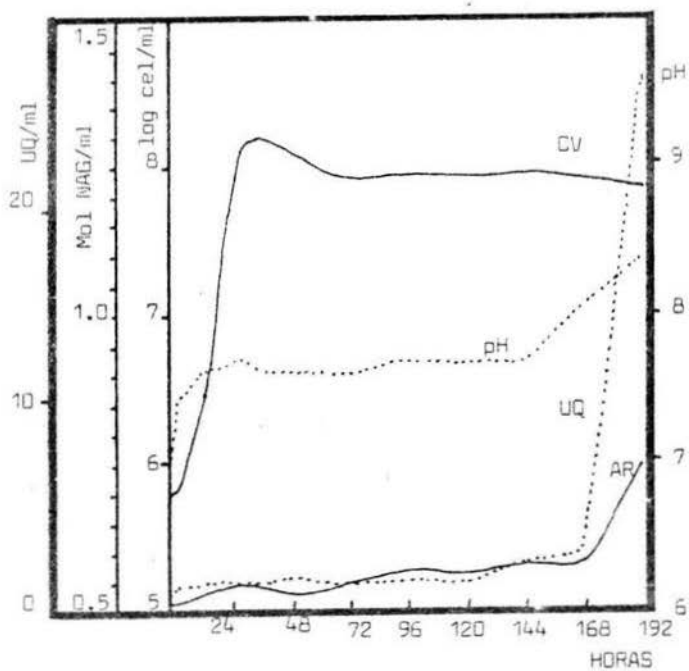


FIGURA 9. Cromatografía de Gases : A) Mezcla de Estándares B) QP C) QL .



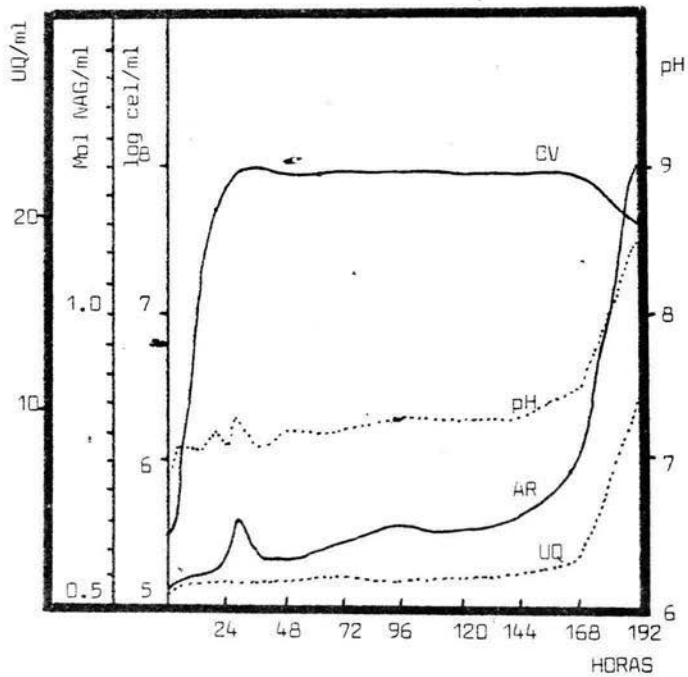
COMPOSICION CENTESIMAL DE MUESTRAS			
DETERMINACION	LANGOSTILLA MEXICANA	QL	QP
Humedad	4.6	3.7	3.1
Cenizas	28.0	3.7	1.2
Nitrógeno total	35.0	34.6	35.4
Fibra cruda	19.0	20.8	21.4
E. etéreo	11.5	9.4	10.3
E. libre de nitrógeno	1.0	27.8	28.6

Tabla 4. Análisis Bromatológico de la harina de Langostilla y de las quitinas (QL y QP).



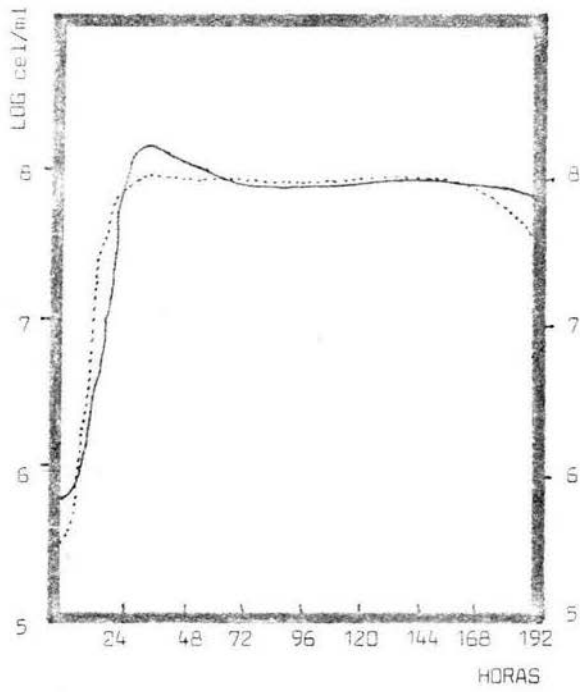
AR AZUCARES REDUCTORES  
 CV CUENTA VIABLE  
 pH  
 UQ UNIDADES DE QUITINASA

GRAFICA 1. Hidrólisis enzimática de QL por medio de *S. marcescens* QMB1466



AR AZUCARES REDUCTORES  
 CV CUENTA VIABLE  
 pH  
 UQ UNIDADES DE QUITINASA

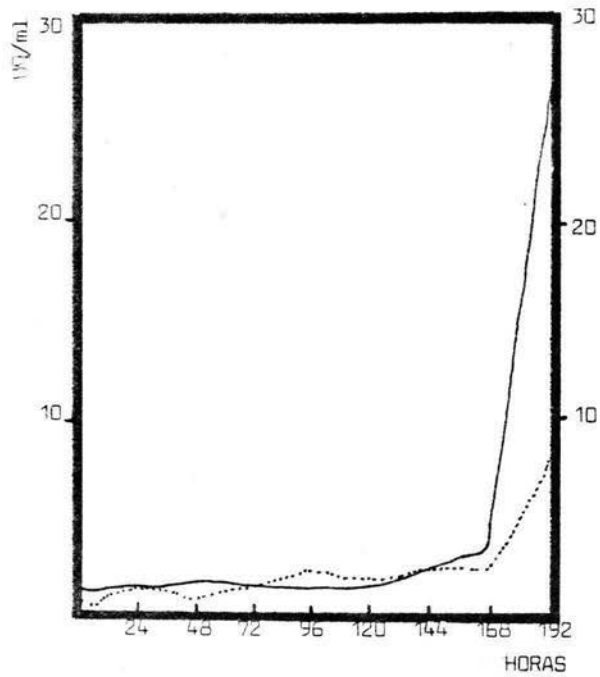
GRAFICA 2. Hidrólisis enzimática de QP por medio de *S. marcescens* QMB1466.



-----QUITINA LABORATORIO

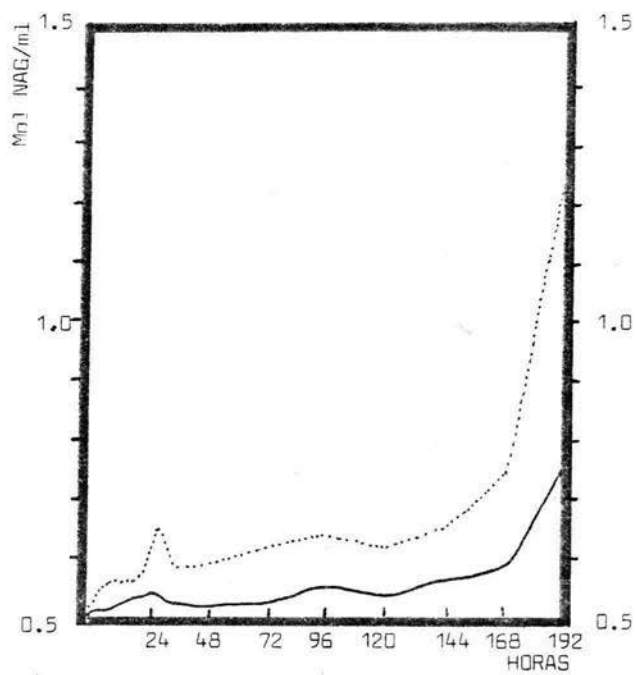
————QUITINA PESCA

GRAFICA 3. Cinética de crecimiento de S.marcescens QMB 1466



——— QUITINA LABORATORIO  
 - - - - QUITINA PESCA

GRAFICA 4. Producción de quitinasas de S.marcescens QMB 1466.



——— QUITINA LABORATORIO  
 - - - - QUITINA PESCA

GRAFICA 5. Acumulación de azúcares reductores a partir de QP y QL.

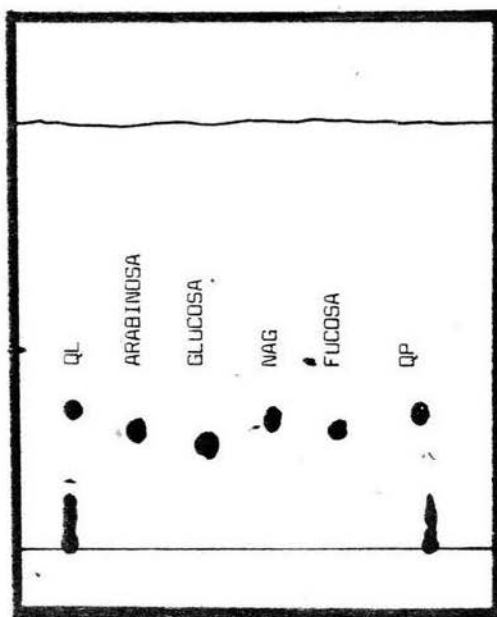


Figura 10.- Cromatografía en Placa fina de las muestras obtenidas de la hidrólisis enzimática de QP, QL y estandares.





#### IV.-DISCUSION Y CONCLUSIONES

Debido al notable incremento de la población de Langostilla Mexicana y ante la creciente necesidad de desarrollar una tecnología que permita el aprovechamiento integral de este pequeño crustáceo, se estima conveniente transformarlo industrialmente con el fin de obtener diversos productos tales como: pastas, harinas, saborizantes, colorantes y quitina. Se pretende, uniendo esfuerzos con el INP, la obtención de quitina a partir de la harina de langostilla y su monómero la N-acetil-D-glucosamina por vía enzimática.

Los resultados que se muestran en la Tabla 3 y en la Figura 7 sugieren, en relación a la extracción de quitina, que el método de Hackman permite obtener un porcentaje menor al producido por el INP al utilizar el método de Black & Schwartz, no obstante, considerando que éste último emplea harina de langostilla previamente desengrasada y despigmentada, cabe suponer que el método de Hackman, puede optimizarse al considerar factores tales como: Tamaño de partícula, concentración óptima de ácido y base, tiempos de tratamiento ácido y alcalino, etc.

En la Tabla 3 se observa que la cantidad de quitina obtenida, presenta diferencias considerables dentro de un mismo método, que se pueden atribuir a variaciones en espacio y tiempo, como: temporada, lugar de captura, etapa de ciclo de vida en que se encuentran los organismos, etc. Por lo que resultaría conveniente realizar estudios tanto biológico-pesqueros, como de composición química de la

langostilla que permitan estimar la época óptima de captura que proporcione mayor cantidad de materiales quitinosos.

Los espectros infrarrojos obtenidos para la caracterización de la quitina comprueban la similitud existente entre QL y QP con lo reportado en la literatura para éste polímero, permitiendo descartar la posibilidad de que la quitina o la mayor parte de ella se haya desacetilado, produciendo quitosana, durante su extracción con los métodos empleados en este estudio y el utilizado por el INP.

Las ligeras diferencias obtenidas en los puntos de descomposición para QL y QP, se explican con las variaciones observadas en el análisis bromatológico, realizado tanto a QL, QP y la harina de langostilla, como era de esperarse dichos análisis no son exactamente iguales, ya que como se hizo notar anteriormente, no sólo varían en cuanto al método de extracción sino además, el recurso es diferente en cuanto a tiempo y lugar de captura. El contenido de cenizas es marcadamente diferente, lo que justifica las diferencias en los puntos de descomposición.

Es importante destacar, en relación a la producción de quitinasa, que con QL se acumularon mayores cantidades de enzima, en cambio con QP se obtuvieron mayores cantidades de NAG en los medios de cultivo.

Lo anterior permite suponer que QP es un inductor más pobre que QL, debido probablemente a que en el primer caso ocurre una hidrólisis parcial o un cambio en el aspecto cristalino del polímero

durante el proceso de extracción o también al menor contenido de sales minerales, factores que en conjunto, pueden ser determinantes en la inducción y actividad de la quitinasa de Serratia marcescens. Como se mencionó anteriormente, la QP produce mayor cantidad de NAG en comparación a QL debido a una posible hidrólisis parcial en el polímero que como consecuencia facilitara más la actividad de la quitinasa.

Debido a que en nuestro país se carece de estudios dirigidos al aprovechamiento de materiales quitinosos, se puede concluir y sugerir, en base a los resultados obtenidos, que la Langostilla mexicana se puede utilizar estandarizando y optimizando procesos tanto para la obtención de quitina como el producto de su hidrólisis (NAG), además de otros productos como se propone en un esquema general de aprovechamiento integral de este recurso. Fig. 12.

Finalmente se puede sugerir que la quitina o sus derivados, como la quitina microcristalina y quitosana, debido a características como dureza, biodegradabilidad y bioactividad, pueden ser susceptibles de ser utilizados en la industria procesadora de alimentos como agentes espesantes, texturizantes, quelantes y emulsificantes. También pueden ser utilizados en el tratamiento de aguas residuales; así como para la obtención de biomasa, producción de quitinasas y aminoazúcares (NAG) como productos de su hidrólisis enzimática. Por otra parte, el NAG puede ser utilizado como reactivo analítico de laboratorio, además como complemento en adición con suero de leche en la alimentación animal y como promotor de la flora intestinal que atenue la mala absorción de lactasa, tanto en animales como en el hombre mismo, razón por la cual todo lo anteriormente señalado espera despertar el interés por investigaciones posteriores en un campo tan amplio que el aprovechamiento de la quitina y el NAG promete.

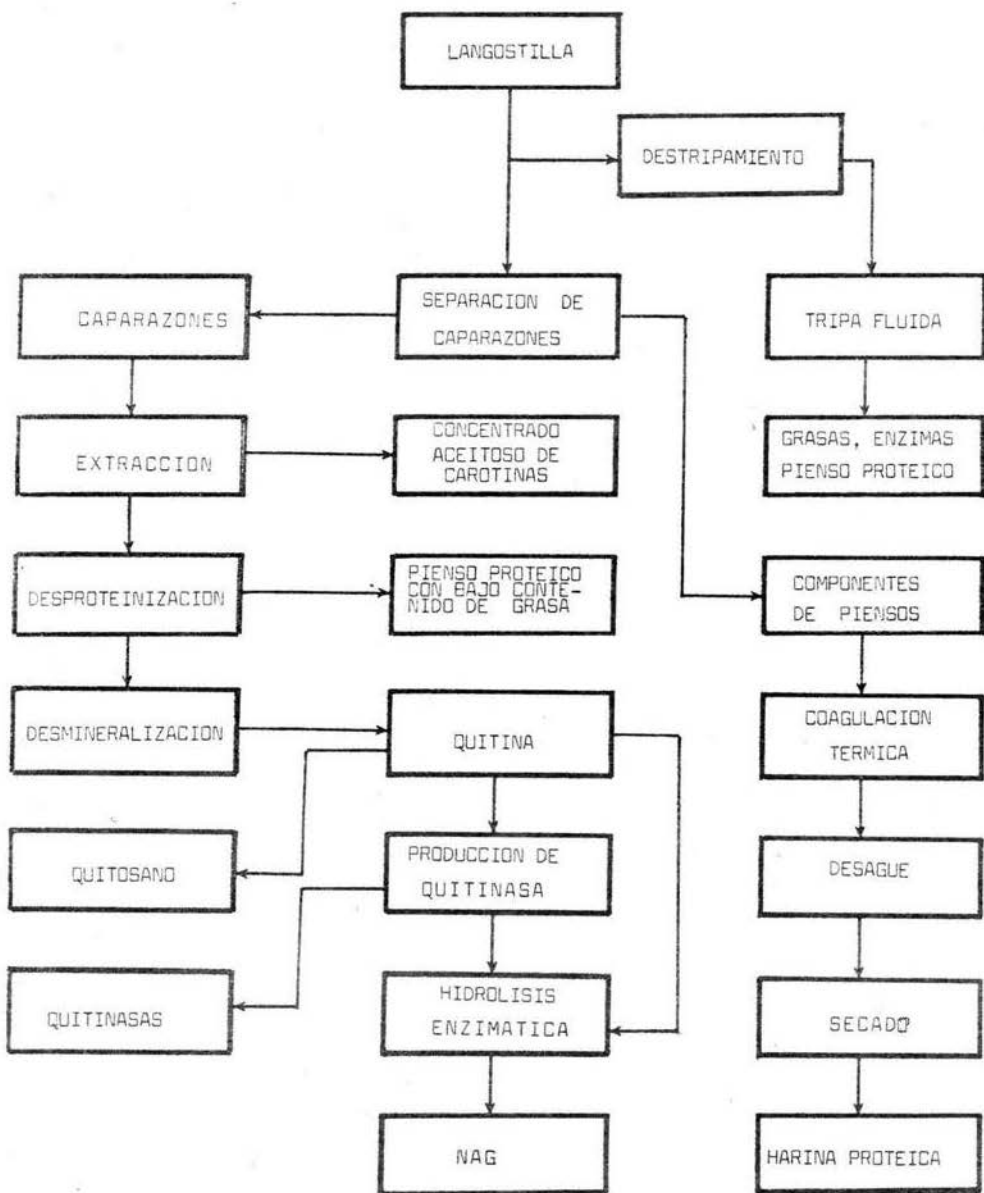


FIGURA 12. Esquema sugerido para el Aprovechamiento Integral de la Langostilla.

V.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aguayo, R.B. Estudio preliminar sobre la producción de quitina sa de Serratia marcescens. Tesis Profesional. ENCB (1976)
- 2.- Alexopoulos, C.J. & Bold, H.C. Algae and Fungi. Macmillan Publishing Co. New York (1967)
- 3.- Association of official Analytical Chemist. Official Methods of Analysis. Ed. 11, Washington, USA (1970)
- 4.- Austin, P.L. Chitin: New Facets of Research. Science.12:749-754 (1981)
- 5.- Austin, P.L. et al. U.S. Patent 4,320,150 (1982)
- 6.- Barnes, R.D. Zoología de los Invertebrados, Ed.Interamericana, México (1977)
- 7.- Bennet, C.B., Hood, M.A. Effects of Cultural Condition on the Production of Chitinase by Strain of Bacillus megaterium. Developments in Industrial Microbiology.21:357-363 (1980)
- 8.- Bough, W.A. Chitosan a Polymer From Seafood Waste for use in Treatment of Food Processing Wastes and Activate Sludge. Process Biochemical 11:13-16 (1976)

pag  
31

- 9.- Boyd, C.M. The Benthic and Pelagic Habitats on the Red Crab Pleuroncodes planipes. Pacific Science 21(3):394-403 (1967)
- 10.- Brzeski, M.M., Kolodziejcki, W.J., Schwartz, W. Posibilidades - previstas del Aprovechamiento de la Langostilla Mexicana - (Pleuroncodes planipes. Stimpson). Instituto Marítimo de Pesca. Gdynia, Polonia 1-31 (1984)
- 11.- Conclusiones y Recomendaciones de la Reunión Nacional Sobre Investigaciones Científico Pesqueras. UAM-SEPEs. México (1984)
- 12.- Cosío, G.I. et al. Bioconversion of Shellfish Chitin Waste: Waste Pretreatment, Enzyme Production, Process Design and Economic Analysis. J. Food Science. 47:901-905 (1982)
- 13.- Cruz, C.A., Chávez, C.J. El Sistema Quitinolítico de Serratia marcescens. Revista Latinoamericana de Microbiología 26:203-215 (1984)
- 14.- Cronquist, A. Introducción a la Botánica. CECSA. México (1971)
- 15.- Dunn, H.J. Farr, M.R., U.S. Patent 3,847,897 (1974)
- 16.- Elson, C.M. Hammss, R.H. Removal of arsenic from contaminated drinking water by chitosan/chitin mixture. Water Research 14:1307-1511 (1980)
- 17.- Friedrich, P. G., U.S. Patent 3,239-358 (1966)
- 18.- Foster, A.B., Hackman, R.H. Applications of ethylenediamine tetracetic Acid in the Isolation of Crustacean chitin. Nature. 180:40-41 (1957)

- 19.- García, G.M., Munguía, C.A. Enzimas Inmovilizadas y su aplicación en la Industria Alimentaria. Ciencia y Desarrollo.58:39-48 (1984)
- 20.- Gallardo, Y.N. Aprovechamiento Integral de la Langostilla Pleuroncodes planipes. Tesis profesional (1975)
- 21.- Gilliland, S.E. Beneficial interrelationships between certain microorganism and humans; candidate J. Food Protection. 42(2):164-167 (1979)
- 22.- Gyory, P., Kuhn, R., Rose, R. Bifidus factor. Its occurrence in milk from different species and other natural products. Archives Biochemical Biophysics 48:202-207 (1954)
- 23.- Holan, Z. Votruba, J., Vlasakova, V. New Method of chitin determination based on desacetylation and Gas-liquid. Chromatographic assay of liberated acetic acid. J. Chromatography. 190:67-76 (1980)
- 24.- Knorr, D. Use of chitinous polymers in food. Food Technology. 212: 85-97 (1984)
- 25.- Lisker, R. Deficiencia de Lactasa: Frecuencia, modo de herencia, implicaciones prácticas. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 31 (2) 223-234 (1981)
- 26.- Michel, A.J. & Scurfield, G. An assessment of infrared spectral as indicators of fungal cell wall composition. Austral J. Biology. Science. 23:345-360 (1970)
- 27.- Miller, G.L. Reducing Sugar by DNS Method. Analytical Chemical 31:426

- 28.- Miyasaki, S., Ischii, K., Nada, T. The use of chitin and chitosan as drug carriers, *Chemical Pharmacology Bulletin*. 29(10):3067-3069 (1981)
- 29.- Monreal, J., Reese, E.T. The chitinase of Serratia marcescens. *Canadian Journal Microbiology*. 15:689-696 (1969)
- 30.- Moreira, G.N. Aprovechamiento por vía microbiana de materiales quitinosos. Tesis Profesional. ENCB (1979)
- 31.- Muzarelli, R.C. Chitin. Pergamon Press. Oxford. 87-154 (1976)
- 32.- Novaes-Ledieu, M., Garcia, M.C. The cell walls of Agaricus bisporus and A. campestris fruiting body hyphae. *Canadian Journal Microbiology*. 27:779-787 (1981)
- 33.- Nuño, M. Infrarrojo, Internacional Científica, S.A. México (1977)
- 34.- Ramond, A.T., Carroad, P.A. Effect on Reaction Conditions on Hydrolysate of chitin by S. marcescens QMB1466. Chitinase. *J. Food Science*. 46:646-647 (1981)
- 35.- Raidvaud, P., Dvclzear, R. Las bacterias del tubo digestivo. *Mundo Científico*. 4:292-302 (1984)
- 36.- Reid, J.A., Ogrydziak, D.M. Chitinase over producing mutant of S. marcescens. *Applied Environment Microbiology*. 41:664-669 (1981)
- 37.- Revah-Moiseev, S., Carroad, P.A. Conversion of the Enzymatic Hydrolysate of Shellfish Waste Chitin to Single-Cell Protein. *Biotechnology and Bioengineering*. 23:1017-1078 (1981)



- 38.- Ruiz, R.A. Purificación y caracterización parcial de la quitina  
se extracelular de *S. marcescens*. Tesis Profesional. ENCB (1977)
- 39.- San Blas, G.L. & Carbonel, L.M. Chemical and ultrastructural studies  
on the cell walls of the yeastlike and mycelial forms of Histoplasma  
farciminosum. J. Bacteriology. 119:602-611 (1974)
- 40.- Simon, W., Clerc, T. Elucidación estructural de compuestos orgáni-  
cos por métodos espectroscópicos, 2 (1) Ed. Alhambra, España (1970)
- 41.- Smith, K.L. et al. Respiration and Chemical Composition of Pleuron  
codes planipes (Decapoda:Galatheidae):Energetic Significance in an  
Upwelling System. J. Fish Research Board Canadian. 32(9):1607-1611  
(1975),