

Using acid hydrolysis to convert waste shrimp shells to glucosamine

Héctor García, Gisela Páez, José R. Ferrer
Zulay Mármol, Eduardo Ramones

Facultad de Ingeniería, Universidad del Zulia, Apartado 526, Maracaibo 4001-A, Venezuela

Abstract

The purpose of this study was to characterize the discarded shells of shrimp caught in the Gulf of Venezuela, establish optimum pre-treatment conditions and use acid hydrolysis of chitin to obtain glucosamine.

The composition of the shells indicated 39.6% protein, 22.6% chitin and 28.1% ash. Optimum protein-extraction conditions were: 2-hours alkaline digestion at pH12, stirring, at 30°C, with a 1/20 p/v solid/liquid ratio.

Acid hydrolysis of chitin with concentrated HCl yielded 79.9% glucosamine.

Key words: Shrimp shell waste, acid hydrolysis, glucosamine.

Conversión del desecho de conchas de camarón a glucosamina por hidrólisis ácida

Resumen

El propósito de este estudio fue la caracterización de desechos de conchas obtenidos del camarón extraído del Golfo de Venezuela, el establecimiento de las condiciones de su pretratamiento y la hidrólisis ácida de la quitina para la obtención de glucosamina.

La composición del desecho indicó un alto contenido de proteína, 39.6% ; quitina, 22.6% y cenizas, 28.1%. Las condiciones óptimas para la extracción de la proteína fueron : digestión alcalina, pH 12, durante 2 horas con agitación a 30 C, y una relación sólido/líquido de 1/20 p/v.

La hidrólisis ácida de la quitina con HCl concentrado, alcanzó un rendimiento en glucosamina de 79.9% .

Palabras claves: Desechos de conchas de camarón, hidrólisis ácida, glucosamina.

Introducción

En Venezuela los residuos de conchas de mariscos, tales como camarones, langostinos, cangrejos, etc., tienen un gran potencial para ser utilizados como materia prima a través de los procesos de bioconversión, tomando en cuenta factores tales como la facilidad de recolección del desecho, cantidad generada y escaso pretratamiento. En particular, el desecho de conchas de camarón, tiene múltiples ventajas frente a los residuos de los otros mariscos, ya que se produ-

cen en grandes cantidades a nivel de las plantas procesadoras. Para 1991, la producción de camarones en Venezuela fue de 8.186 TM [1], casi la totalidad de esa producción está constituida por la especie más comercial, el *Penaeus vannamei*. Básicamente la concha de camarón está constituida por proteínas, quitina y otros componentes tales como sustancias solubles y grasa. La quitina es un carbohidrato, que tiene una estructura parecida a la celulosa, es un polímero de N-acetilglucosamina con enlaces β -1.4 entre cada unidad monomérica [2].

En el aprovechamiento de la quitina del desecho de conchas de camarón, las investigaciones se han dirigido principalmente hacia la producción óptima del sistema enzimático quitinasa [2,3,4,5,6].

La finalidad de la presente investigación es la caracterización del desecho de conchas de camarón, el establecimiento de las condiciones del pretratamiento y la hidrólisis ácida de la quitina.

Materiales y Metodología Experimental

Desecho de conchas de camarón

La materia prima, fue obtenida de una planta industrial procesadora de camarones situada en Carirubana, Punto Fijo, estado Falcón. Procedente del procesamiento del camarón extraído de las aguas del Golfo de Venezuela, cercanas a la Península de la Guajira.

Caracterización del desecho de conchas de camarón

El sustrato, conchas de camarón, fue molido y clasificado con un rango de tamaño de 20 a 60 mesh (0,85 a 0,25mm), de acuerdo a Romo *et al* [7]; y luego caracterizado en términos de proteína, quitina, grasa, cenizas y humedad. La evaluación físico-química, se realizó a través de los siguientes análisis:

- Proteína cruda: por métodos Microkjeldahl [8].
- Quitina: el porcentaje de quitina sobre un peso base en muestras de mariscos, fue determinada gravimétricamente, después de solubilizar la proteína y los minerales [3].
- Grasa: método extractivo de grasa Soxhlet, usando Hexano como solvente a 140°C [8].
- Cenizas: por diferencia de peso, luego de incinerar la muestra a 530°C [8].
- Calcio, Magnesio, Hierro, Zinc, Cobre, Manganeso, Fósforo orgánico: por espectrofotometría de absorción atómica [8,9].
- Cloruros: método de Mohr [8].
- Sulfato: método fotocolorimétrico [9].

- Humedad: por diferencia de peso, [8].

Pretratamiento del desecho de conchas de camarón

Este involucra reducción de tamaño, desproteínización y desmineralización, de acuerdo al esquema propuesto por Bough *et al* [10].

Reducción de tamaño

El desecho de conchas una vez secado a temperatura de 32°C, fue molido utilizando un molino eléctrico (Electrolux) y clasificado, en rangos de tamaño de 20 - 60 mesh [4,11], tal como se hizo en la etapa de caracterización.

Desproteínización

Se realizó un estudio preliminar para conocer el efecto del pH sobre la solubilidad de la proteína nativa de la concha; esto con el fin de ubicar el pH óptimo de extracción de proteína de la concha. Para ello se tomaron fracciones molidas de conchas y se colocaron en contacto con agua, a una relación sólido-líquido de 1:20, de acuerdo a lo recomendado por Meinke [12] y Romo [7]; se ajustó el pH, en un intervalo de 2 a 12, con soluciones de NaOH y HCl. Cada sistema o fracción al respectivo pH, se sometió a agitación constante en plancha con agitador magnético a temperatura de 30°C. Se probó el efecto del tiempo de extracción de la proteína de la concha; aplicando tiempos de extracción de 2 y 16 horas [4]. La efectividad del tratamiento para cada una de las soluciones, fue medida por duplicado empleando el método espectrofotométrico de Bluret [8] a 540 nm, con una sensibilidad de 0,25 a 200 mg.

Desmineralización

La fracción de desecho desproteínizado, fue desmineralizado siguiendo la técnica propuesta por Cosio [4], que consiste en utilizar una relación sólido/líquido de 1:10 (100 g de desecho de concha desproteínizada en un litro de solución de ácido clorhídrico al 8%), y luego someterse a agitación constante por una hora. El residuo de quitina se filtró al vacío, utilizando papel Whatman 42, se lavó con agua destilada y se secó a 103°C durante 3 horas en estufa de aire forzado [10].

Tabla 1
Composición porcentual aproximada en base seca (%P/P) del desecho de conchas de camarón

Proteína	Quitina	Grasa	Humedad	Cenizas
39.6	22.6	1.9	7.7	28.1

Tabla 2
Composición de la ceniza, obtenida del desecho de conchas de camarón

Componente	Valor promedio
Calcio, (%)	23.94
Magnesio, (%)	7.34
Cloruros, (%)	3.37
Azufre, (%)	2.92
Sulfatos, (S como sulfato)	8.77
Hierro, (%)	0.48
Zinc, (ppm)	0.52
Cobre, (ppm)	< 0.10
Fósforo, (ppm)	23.00
Carbono Inorgánico, (%)	1.14
Mercurio, (ppb)	ND ¹
Plomo, (ppb)	< 50.00
Manganeso, (ppb)	< 20.00

(1) No detectado, límite de detección = 0.5 ppb.

Hidrólisis ácida de la quitina

Se aplicó el proceso propuesto por Hackman [13]. Se sometió a la quitina obtenida del pretratamiento, a reflujo con ácido clorhídrico concentrado durante 20 minutos. El volumen de HCl usado fue el necesario para cubrir el sólido de quitina. Luego la solución se dejó en reposo por 14 horas, precipitando la glucosamina, que fue recogida por filtración, lavada con agua fría y recristalizada. La glucosamina recristalizada se identificó mediante la obtención del espectro Infrarrojo, el cual fue comparado con el de una muestra patrón (Sigma Chemical Co.).

Resultados y Discusión

Caracterización del desecho de conchas de camarón

La Tabla 1 muestra la composición porcentual promedio del desecho de conchas de camarón molido antes del pretratamiento.

Estos resultados se pueden comparar con los reportados por Ashford, citado por Cosio [4], que reporta un contenido de proteína de 34.9% y 18.1 de quitina. En cambio Carroad y Tom [3] reportan un 24.4% de quitina en desechos de conchas de camarón. En cuanto a las cenizas el estudio de Boug [10], determina 31%-36%. El alto porcentaje de cenizas obtenido, 28,1%, revela el gran contenido de minerales en la concha. El análisis de cenizas se presenta en la Tabla 2, e indica altos contenidos de Calcio, Magnesio y Sulfatos, así como cantidades apreciables de Hierro, Zinc, Cloruros y Fósforo. Estos componentes de las cenizas podrían incorporarse como constituyente mineral del medio del cultivo en los procesos de fermentación.

Pretratamiento

La Figura 1 presenta los perfiles de solubilidad de la proteína nativa del desecho de conchas a diferentes pH y sometida a extracción durante dos horas (curva A), y 16 horas (curva B).

Las curvas son similares a las obtenidas por Romo [11] para desechos de Krill y a las de Cosio [4] para desechos de conchas de mariscos. Se observó un mínimo de solubilidad en soluciones neutras, y un máximo a pH 12 - 13.

Una comparación de las curvas A (2 horas) y B (16 horas) de la Figura 1 permiten concluir que tiempos de extracción mayores de 2 horas no influye significativamente en la cantidad de proteína solubilizada. Según indican las curvas A y B de la Figura 1, la máxima solubilidad de la

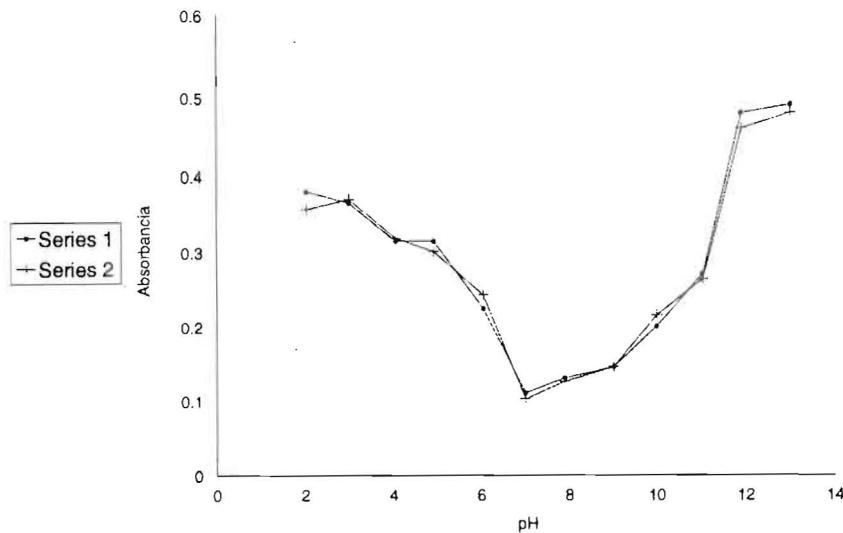


Figura 1. Efecto del pH sobre la solubilidad de la proteína en la concha de camarón.

proteína de la concha se consigue a pH de 12 - 13, así mismo, se indican valores máximos que son aproximadamente iguales, 84,34% - 87,88%; y 87,0% - 88,9%, para 2 horas y 16 horas de digestión respectivamente. Sin embargo, estos resultados son más bajos que los reportados por Cosío [4], que logra un 90% - 95% de proteína en solución para un tiempo de dos horas. Se debe tener presente que este porcentaje de proteínas en solución, es con relación a la proteína cruda, determinada por el método de Kjeldahl, que da valores ligeramente mayores debido al nitrógeno de fuentes tales como aminas y compuestos aminados como la N-acetilglucosamina presente en ellas; por lo que la diferencia entre los resultados podría ser menor. Igualmente a partir de la Figura 1, se puede realizar un estimado de la cantidad de proteínas solubles que se espera recuperar por ajuste del pH del extracto, hasta un valor en la región isoelectrica; por tanto, más del 90% de la proteína soluble a pH 12 - 13, se podría recuperar por precipitación al llevarla a pH isoelectrico. Respecto a esto Meinke [12], así como Romo [11], han reportado en estudios sobre extracción de proteínas en músculos de peces y en residuos de Krill, que una combinación simultánea del ajuste del pH del extracto hasta la región isoelectrica, y luego un breve calentamiento, permite recuperar del 93 al 96% de la proteína en solución. En base a estos resultados, se establecieron como condiciones para el tratamiento de desproteinización

de las conchas de camarón: digestión en solución alcalina (pH 12) durante 2 horas con agitación a temperatura 30°C con una relación sólido/líquido 1:20.

Hidrólisis ácida de la quitina

La Figura 2 presenta los espectros Infrarrojos (IR), logrados a muestras de glucosamina patrón (Sigma Chemical Co), y al producto sólido obtenido del proceso de hidrólisis ácida a la quitina del desecho de conchas de camarón. El análisis del IR obtenido del producto de la hidrólisis ácida y su comparación con el espectro IR de la glucosamina pura, confirma que el único carbohidrato obtenido de la hidrólisis ácida es la glucosamina. El proceso de hidrólisis ácida de la quitina, utilizando ácido clorhídrico concentrado, permitió obtener un rendimiento en glucosamina del 79,89%. Durante el proceso de revisión bibliográfica no fue posible encontrar estudios que aplicaran el proceso de hidrólisis ácida a la quitina del desecho de conchas de camarón. Por consiguiente no se pudieron comparar rendimientos de glucosamina obtenidos mediante el mismo proceso de extracción. La literatura reporta procesos de hidrólisis enzimática de la quitina [2,3,4,5,6,10,14]. El inconveniente de este proceso es el tiempo necesario para obtener la quitinasa a concentraciones adecuadas. En la Tabla 3 se observan los resultados del proceso de hidrólisis ácida de la quitina comparándolo

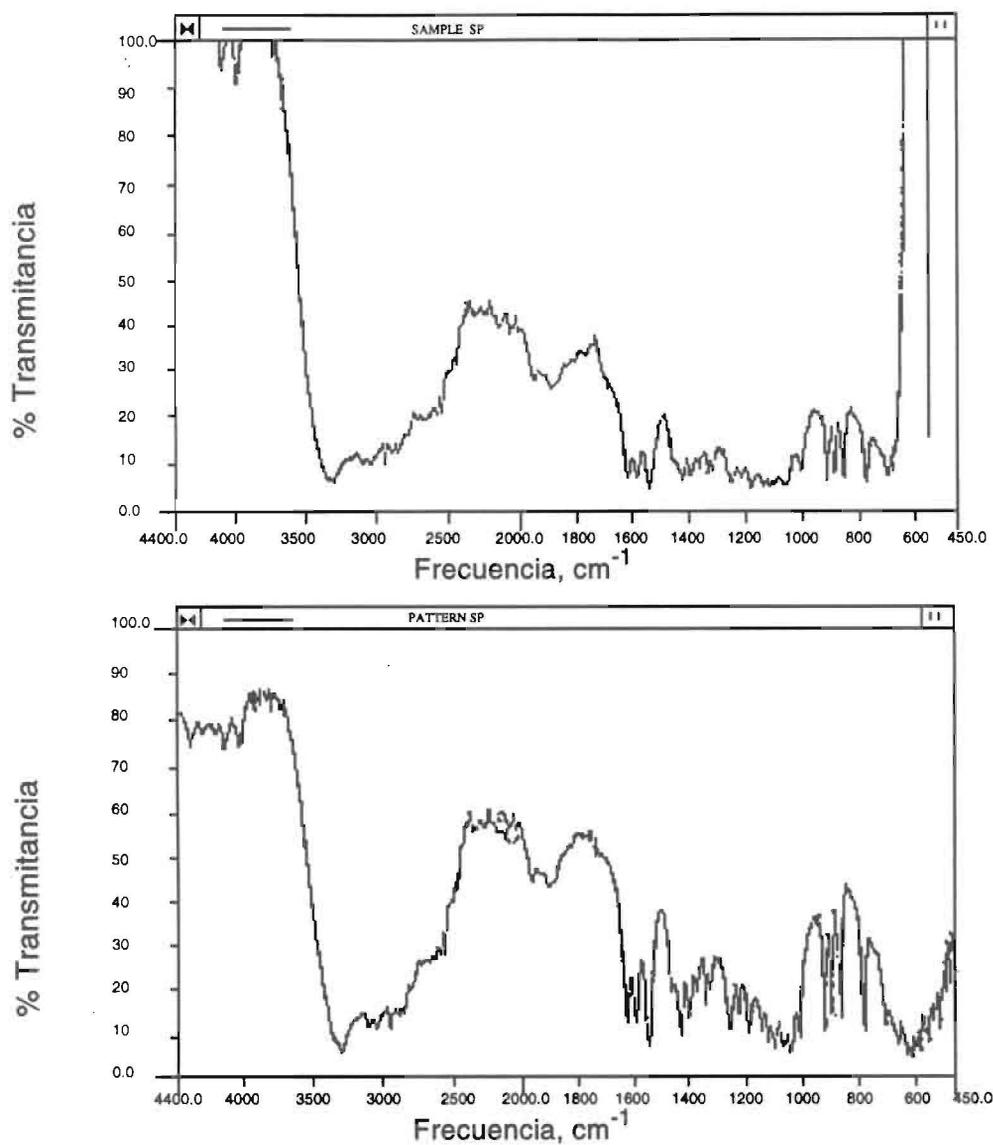


Figura 2. Espectros Infrarrojo de la glucosamina patrón (Sigma Ch. Co) y del producto de la hidrólisis ácida de la quitina del desecho de conchas de camarón.

Tabla 3

Comparación de los % de conversión de quitina obtenidos por hidrólisis ácida y enzimática

Autores	Proceso	Actividad Enzimática (Unidades/ml)	Duración (h)	Conversión %
García <i>et al</i>	Hidrólisis ácida	-	-	79.89
Costo <i>et al</i> (4)	Hidrólisis Enzimática	73	24	80.00
Carroad y Tom (3)	Hidrólisis Enzimática	83	40	57.60
Tom y Carroad (6)	Hidrólisis Enzimática	193	44	78.00
Revah <i>et al</i> (2)	Hidrólisis Enzimática	61	10	93.00

con la hidrólisis enzimática reportados por otros autores. La conversión obtenida de 79.89% en glucosamina permite apreciar que éste es un método adecuado de hidrólisis, considerando su sencillez, rapidez y economía.

Conclusiones

1.- Los componentes principales del desecho de conchas de camarón, son: proteína (aproximadamente 40%), quitina (23%) y cenizas (28%).

2.- La proteína nativa en el desecho de conchas de camarón, puede ser extraída en medio alcalino a pH 12 y recuperada del extracto hasta en más de 90%, a pH de 7-8; lo que representa un resultado a tomar en cuenta, con miras a su posible uso como suplemento alimenticio adicional para animales.

3.- El proceso de hidrólisis ácida aplicado a la quitina del desecho de conchas de camarón, permite obtener rendimientos de glucosamina de un 80%, demostrando ser un proceso sencillo y rápido para la obtención de azúcares fermentables. Estos azúcares podrían servir como sustrato para el proceso de bioconversión del desecho de conchas de camarón a proteína unicelular.

Agradecimiento

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES) y al Instituto Alonzo Gamero por el financiamiento de esta investigación.

Referencias Bibliográficas

1. Ministerio de Agricultura y Cría.: Anuario Estadístico Agropecuario 1992. Dirección General de Planificación Agrícola. Caracas, Venezuela, (1992), 733.
2. Revah - Moisev, S. & Carroad, P.A.: Conversion of the Enzymatic Hydrolysate of Shellfish Waste Chitin to Single cell protein. *Biotech and Bioengin.* 23, (1981), 1067 - 1078.
3. Carroad, P.A. & Tom, R.A.: Bioconversion of Shellfish Chitin Wastes: Process Conception and Selection of microorganisms, *J. Food Sci.*, 48, (4), (1978), 1158- 1161.
4. Cosio, G., Fisher R. and Carroad.: Bioconversion of Shellfish Chitin Waste: Waste Pretreatment, Enzyme Production, Process and Design and Economic Analysis. *J. Food Sci.*, 47, (1981), 901 - 905.
5. Rowena, L.R. and Cabid E.: One-Step purification and Use for the Determination of Chitin. *Analytical Biochemistry*, 127, (1982), 402 - 412.
6. Tom, R.A. and Carroad, P.A.: Effect of Reaction Conditions on Hydrolysis of Chitin by *Serratia marcescens* QMB 1466 Chitinase. *J. Food Sci.*, 46, (1981), 646 - 647.
7. Romo, C.R., Lakin, A.L. and Rolfe, E.J.: Properties of Protein Isolates Prepared from Ground Seeds. 1. Development and Evaluation of a Dyebinding Procedure for The Measurement of Protein Solubility. *J. Food Technol.* 10, (1975), 541-545.
8. Horwitz, W.: AOAC. Methods, Ed. 30. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C., (1980).
9. American Public Health Association, AWWA and WPCF.: Standard Methods for the Examinations of Water and Wastewater, 16th Edition, APHA, Washington D.C., (1985).
10. Bough, W.A., Salter, W. L., Wu, A.C.M., and Perkins, B.E.: Influence of Manufacturing Variables on the Characteristics and Effectiveness of Chitosan Products, *Biotech and Bioengineering.* 20; (1981).
11. Romo, C.R. and Anderson, C.G.: Determination of Optimum Parameters for Protein Isolation from Krill Waste Products. *J. Food Sci.* 44 (5), (1979), 1425-1429.
12. Meinke, W.W., Rahman, M.A. and Mattil, K.F.: Some Factors Influencing the Production of Isolates from Whole Fish. *J. Food Sci.*, 37 (2), (1972), 195 - 198.
13. Domingues, X., y Domínguez, A.: Química Orgánica Experimental. Editorial Limusa, México (1982), 203.
14. Salm, A.A., Morón-Salm, A.R. Delgado, M.M.: Un Proceso para la obtención de quitina y extracto saborizante a partir de las cabezas de camarones. *Acta Científica Venezolana.* Vol. 39, supl. 1, (1988), 208.

Recibido el 10 de Enero de 1995

En forma revisada el 10 de Octubre de 1996