

Egoitza / Sede Bizkaia

Txatxarramendi ugartea z/g
E-48395 Sukarrieta - Bizkaia (Spain)
Tel.: +34 946 029 400 - Fax: +34 946 870 006

Egoitza / Sede Gipuzkoa

Herrera Kaia - Portu aldea z/g
E-20110 Pasaia - Gipuzkoa (Spain)
Tel.: +34 943 004 800 - Fax: +34 943 004 801

<http://www.azti.es>
e-mail: info@azti.es



POLNAT-II: Desarrollo de materiales antimicrobianos de base biopolimérica para mejorar la conservación y seguridad de alimentos minimamente procesados.

Convenio AZTI/DAPA

Informe final 2007

para:

**Dirección de Innovación y Desarrollo Tecnológico,
Viceconsejería de Política e Industria Alimentaria,
Dpto. Agricultura, Pesca y Alimentación , Eusko
Jaurlaritza - Gobierno Vasco**

Sukarrieta, 14 de enero de 2008

Tipo documento Informe final

Fecha 14/01/2008

Proyecto POLNAT-II: Desarrollo de materiales antimicrobianos de base biopolimérica para mejorar la conservación y seguridad de alimentos minimamente procesados.

Código IA2007043

Cliente Dirección de Innovación y Desarrollo Tecnológico,
Viceconsejería de Política e Industria Alimentaria, Dpto.
Agricultura, Pesca y Alimentación , Eusko Jaurlaritza -
Gobierno Vasco

Equipo de proyecto: **Idoia Olabarrieta**
Maria Berasategui
Leire Iturriaga
Ziortza Cruz

**Responsable
proyecto** Idoia Olabarrieta Paul

Revisado por

Fecha

ÍNDICE

1.	INTRODUCCION	4
2.	BENEFICIOS GENERADOS.....	5
3.	TRABAJOS COMPLEMENTARIOS	11
4.	DIFUSIÓN	13

1. INTRODUCCION

Hoy en día toda clase de alimentos viene conservado en alguna clase de envase o contenedor, envoltorio, o muchas veces el envase y el alimento es todo uno (el caso del plátano, huevos, entre otros). En muchos casos estos envoltorios o contenedores son comestibles, como el recubrimiento de los embutidos, cono de helados, frutas, etc. Los biopolímeros tienen propiedades muy atractivas para el empleo en envasado de alimentación. En la actualidad mucha investigación se está llevando a cabo para potenciar el uso de biopolímeros como recubrimientos o parte de sistemas activos con el fin de proteger la calidad y seguridad de los alimentos. La finalidad es minimizar la cantidad de materiales externos no biodegradables y la mejora de la conservación y propiedades organolépticas del alimento.

Una línea prioritaria de investigación con gran potencial son los polímeros derivados de fuentes renovables, genéricamente llamados biopolímeros, obtenidos a partir de macromoléculas naturales. Actualmente los biopolímeros basados en polisacáridos, proteínas o lípidos, obtenidos directamente de productos marinos o agrícolas son los que están siendo objeto de un mayor estudio como material de envase o recubrimientos de alimentos. La gran ventaja de la utilización de estos materiales es que son naturales, biodegradables y en muchas ocasiones pueden ser extraídos de residuos o como subproductos de la industria agrícola o alimentaria. Es por ello que la ventaja es doble, ya que el coste de la materia prima se abarata y porque además, se le da un valor añadido a un residuo o subproducto industrial.

Con este proyecto se pretende impulsar la línea de biopolímeros en AZTI, profundizando en el estudio de extracciones de biopolímeros, uso y aplicaciones como recubrimientos y films activos. De esta forma se intenta obtener el conocimiento y experiencia necesaria para comenzar a ser competitivos y poder ofrecer a la industria alimentaria una alternativa factible y real de los biopolímeros para aplicaciones en alimentos y envases activos.

Se ha desarrollado un proceso de evaluación de distintas alternativas de aprovechamiento de los residuos generados en la acuicultura. Debido al gran interés existente por numerosos empresas de acuicultura, se ha enfocado la tarea principal en la extracción de quitosano.

Paralelamente se utilizó parte de la financiación de este proyecto para la realización de otro tipo de actividades complementarias relacionadas con la temática de los biopolímeros que se describen al final del informe y que han servido para complementar, impulsar y dar más presencia y contenido a la línea de biopolímeros.

2. BENEFICIOS GENERADOS

El objetivo general de este trabajo es la obtención de quitosano de los residuos generados del procesado industrial de cangrejo de río (*Procambarus clarkii*), con el fin de proporcionar una alternativa para la obtención de un producto de alto valor añadido y mejorar así la rentabilidad de las plantas procesadoras de cangrejo. Asimismo, se pretende establecer cuales son los requisitos técnicos, legislativos y de mercado que puedan determinar la viabilidad de la obtención de quitosano y su aplicación comercial de modo y a escala real.

2.1 RESULTADOS MÁS IMPORTANTES Y UTILIDAD DE ESTOS

Basados en experiencias anteriores y en otros trabajos de extracción realizados con cangrejo de río, se ha seleccionado un proceso de extracción (detallado en la Figura 1). En el diagrama se indica además, el rendimiento aproximado estimado para 100 Kg. de materia prima.

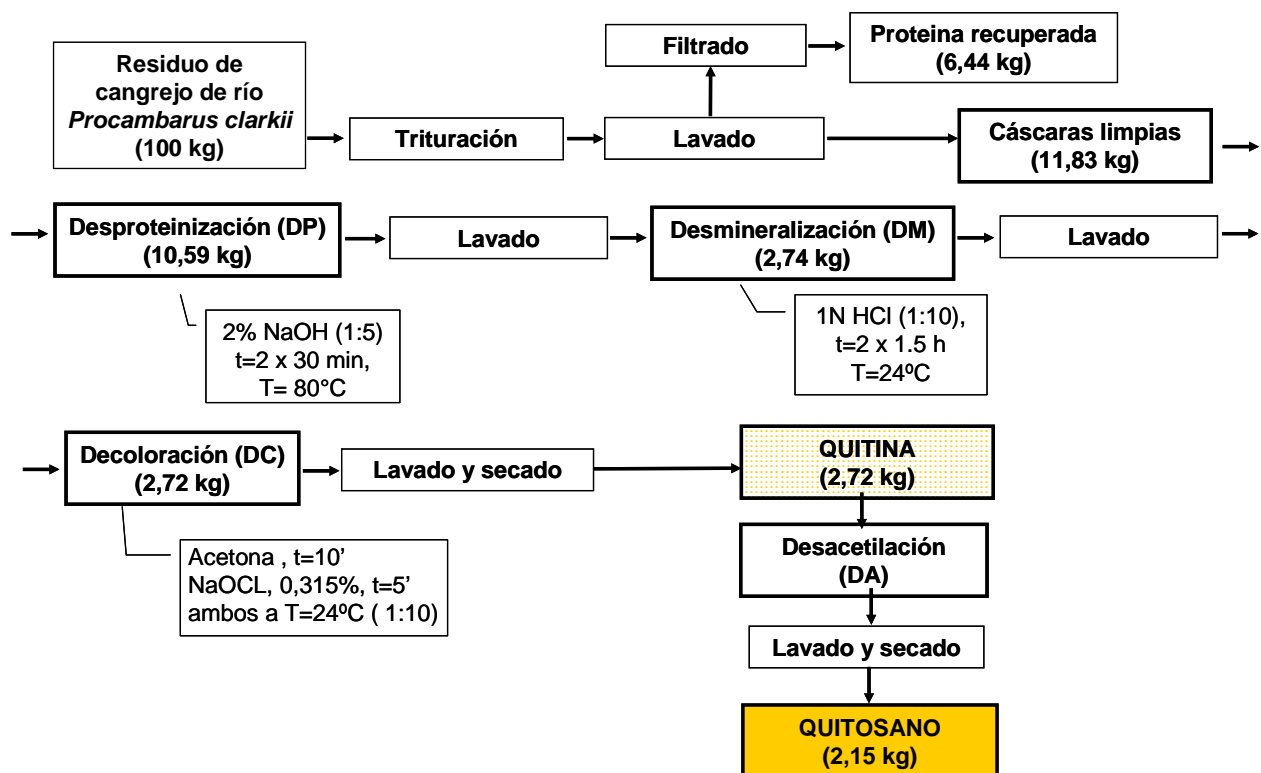


Figura 1: diagrama del Proceso General de Obtención de Quitosano

Desacetilación (DA)

La desacetilación es el proceso en el que la quitina se convierte en quitosano tras la extracción de los grupos acetilos. En este proyecto se estudiaron tres tipos desacetilaciones para probar el metodo mas efectivo que nos de un producto de alto grado de desacetilacion y que nos

Metodos de caracterización

Para caracterizar los productos obtenidos se realizaron analisis de humedad, cenizas, contenido de nitrógeno, grasa, solubilidad, grado de desacetilación y análisis antimicrobiano.

Las cáscaras trituradas se lavaron exhaustivamente con chorro de agua a temperatura ambiente para lograr una mejor remoción de la masa proteica (proteína recuperable) pegada a las cáscaras. Después de escurrirlas bien se dejaron secar durante 12 horas a 60°C, se pesaron y se midió el % de humedad. Esta fracción (cáscara seca recuperable) se consideró la base de los sucesivos rendimientos de las etapas de la extracción calculados posteriormente.

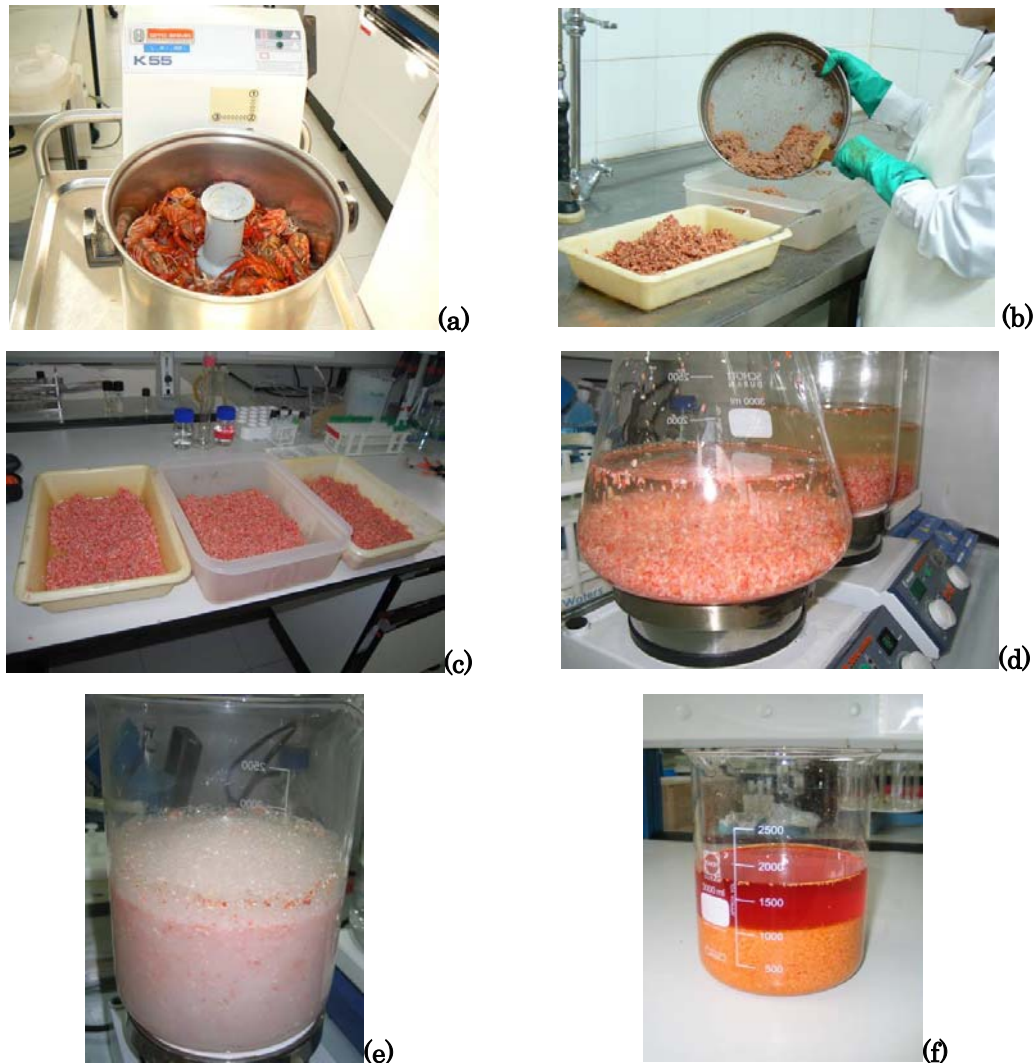


Figura 2: diferentes etapas del proceso de extracción; (a) trituración de las muestras; (b) etapa de acondicionamiento, lavado de las cáscaras; (c) cáscaras limpias y listas para secar; (d) etapa de desproteinización; (e) etapa de desmineralización y (f) decoloración de la muestra.

La composición de las cáscaras residuo nos dio un 21,52% de contenido en quitina, resultado en concordancia con otros estudios realizados para el mismo tipo de materia prima.

Las muestras de quitosano extraídas tras ser secadas 24 horas a 60°C consiguen un % de humedad de entre 7.0% a 8,5% y este valor de mantiene después de dos meses de

almacenamiento. Valores en concordancia con otros estudios realizados anteriormente. Normalmente los quitosanos comerciales contienen menos de un 10% de humedad.

El contenido de cenizas es un indicador de la efectividad del proceso de desmineralización (DM), el cual es una eliminación del carbonato cálcico. Además, el contenido de cenizas en el quitosano final es un parámetro importante ya que las cenizas residuales pueden afectar la solubilidad, contribuyendo a disminuir la viscosidad y afectando la calidad del producto final (menos pureza). El contenido inicial de los residuos a tratar era aproximadamente de un 50%. Las muestras finales de quitosano extraído nos dan un contenido de cenizas de menor al 0.1%. El contenido de cenizas está dentro del rango aceptado para este tipo de productos (<3%) e incluso dentro del rango que se supone para un quitosano de alta calidad, el cual debe tener un contenido de cenizas menor al 1%. Esto nos indica que nuestra extracción es óptima.

La proteína está unida por enlaces covalentes formando complejos estables con la quitina y el quitosano. Es imposible lograr el 100% de desproteínización. El nitrógeno queda en el quitosano contenido en el grupo amino ($-NH_2$). El contenido inicial de las cáscaras de residuo era de un 15.83%, resultado acorde con la caracterización realizada por otros estudios para el mismo tipo de residuo. La desproteínización realizada para la extracción de quitina es de un 6,6% y para los quitosanos es de 7.2-7.6%, estos datos son aproximados al 7%, valores reportados por otros investigadores. Según las referencias consultadas el polvo de quitosano varía en la naturaleza desde amarillo claro a blanco. En el caso del cangrejo de río parece que los pigmentos están más íntimamente ligados a la matriz ya que la decoloración no parece ser tan efectiva como para otras especies reportadas en la literatura. El producto obtenido en nuestro estudio ofrece un color crema con algunas pequeñas partículas de color anaranjado.

Los resultados de los estudios antimicrobianos indican que los quitosanos extraídos en Azti muestran actividad antimicrobiana frente a *Listeria innocua* en las condiciones de ensayo. En la Figura 3 se observa como durante las primeras 22 horas de incubación, se observó un descenso de ufc-s desde 10^6 ufc/mL hasta el límite de detección de 10^1 ufc/mL en el quitosano extraído número 12 y en el comercial, mientras que el quitosano extraído número 13 necesita 29 horas para alcanzar el mismo nivel. El quitosano extraído número 11, por el contrario, es el que menor efectividad mostró ya que los recuentos de listeria sólo descendieron hasta 1.7×10^2 ufc/mL recuperando el crecimiento y llegando hasta 1×10^5 ufc/mL tras 59 horas de incubación. Se continuará trabajando en el análisis antimicrobiano de estos quitosanos con el fin de evaluar la efectividad de los mismos en el tiempo.

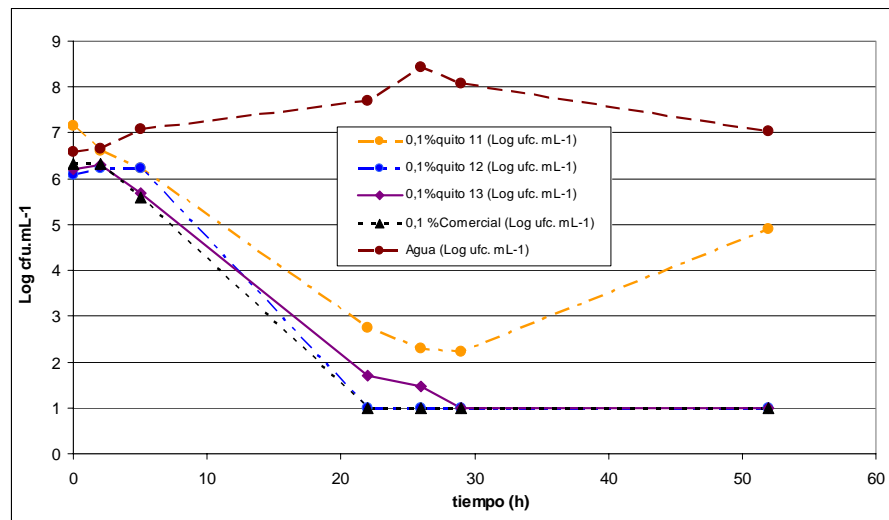


Figura 3: Desarrollo microbiano de los diferentes quitosanos

2.2 CONCLUSIONES

- Los resultados de la caracterización del producto extraído nos indican que los procesos de desproteínización, desmineralización y decoloración realizados en AZTI han sido efectivos, los bajos índices de cenizas, nitrógeno y grasa, nos indican que el producto final está libre de impurezas y que los procesos de desproteínización y desmineralización son los correctos, por lo que conseguimos un quitosano de alta pureza.
- Se ha logrado poner a punto un método de desacetilación mediante autoclavado (DA11) el cual genera un quitosano soluble con mejor grado de desacetilación y por mejor solubilidad del mismo. El sumergir la quitina en solución básica previo al autoclavado (DA13) hace posible obtener un quitosano de igual o mejor calidad que doblando el tiempo de autoclavado. Esta técnica, además, rentabiliza el proceso ya que el rendimiento es superior y se economiza en coste de energía. Aun así, se puede decir que el quitosano obtenido por los tres métodos analizados es de gran calidad.
- Se ha realizado la caracterización físico-química de los diferentes quitosanos extraídos: solubilidad, análisis químico, colorimetría, humedad, FTIR, y viscosimetría. Los resultados obtenidos nos indican que el quitosano extraído en AZTI es de gran pureza y calidad. Gracias a la colaboración con la UPV se ha podido completar esta caracterización del quitosano. AZTI en compensación ha realizado ensayos de reología de varios biopolímeros para la UPV y a puesto a punto la metodología para el estudio de la tensión superficial de filmes biopoliméricos utilizando el equipo de FTA32 para “contact angle”.
- Se ha realizado la evaluación de la capacidad antimicrobiana mediante estudios *in vitro*. Los resultados de los estudios antimicrobianos indican que los quitosanos extraídos en AZTI muestran actividad antimicrobiana frente a *Listeria innocua* en las condiciones de ensayo, alguno de ellos con efectividad tan alta como la del comercial.

3. TRABAJOS COMPLEMENTARIOS

- Paralelamente al trabajo de extracción de quitosano se ha optimizado el proceso de extracción de proteína de atún de residuos de conserveras. Se ha desarrollado una vigilancia sobre filmes y recubrimientos de proteína miofibrilar para seleccionar unos parámetros básicos a utilizar en nuestros laboratorios a la hora de elaborar dichos filmes. Una vez realizadas las pruebas preliminares de preparación de filmes con proteína de atún de residuos de conserveras y tras definir algunos parámetros básicos para su obtención, se realizan nuevas pruebas utilizando diferentes condiciones de extracción (T, pH, tiempo de extracción, etc.) para obtener una proteína de mejor calidad o un mayor rendimiento en el proceso y así utilizar una menor cantidad de proteína a la hora de realizar los filmes. Por otra parte, se han realizado unas primeras pruebas de la capacidad antimicrobiana de la proteína. En estos momentos se continúa el proceso de optimización de la extracción ya que se han tenido problemas con el método.
- Con esta temática como base, “biopolymers for food packaging” AZTI mantuvo (de enero a mayo del 2007) diversas reuniones juntó con un consorcio compuesto por 10 diferentes socios europeos con el fin de redactar una propuesta en el VII Programa Marco Europeo. El call en el que se enmarcaba la propuesta era el NMP-2-4-3- "Renewable materials for functional packaging applications". En esta propuesta de proyecto llamada “Renewable water barrier and active packaging” (REWAP) se describía el desarrollo de envases activos alimentarios con materiales renovables biopoliméricos con funcionalidad antimicrobiana. El objetivo era el uso de materiales renovables para la fabricación de los envases activos y la mejora de la conservación de los alimentos. La propuesta fue rechazada en junio. El consorcio, aún así, ha decidido mantenerse en contacto para la posible redacción conjunta de futuras propuestas europeas. Gracias a la participación en esta propuesta, AZTI, ha dado un primer paso para darse a conocer a nivel internacional en este área de trabajo.

- El 16 de noviembre, Idoia Olabarrieta, presentó en la Escuela de Ingenieros de Bilbao (Departamento de Ciencia de los Materiales), la tesis doctoral en euskara “polimero naturalen hesi propietateak eta portaera mekanikoa hobetzeko estrategiak- kitosanoa, esne-gazur proteina eta gari-glutena” (ESTRATEGIAS PARA LA MEJORA DE LAS PROPIEDADES MECANICAS Y DE BARRERA DE LOS POLIMEROS NATURALES- Quitosano, proteína de suero de leche y gluten de trigo). Esta tesis, iniciada y desarrollada en gran parte en Suecia y financiada parcialmente por El Vicerrectorado de Euskera de la UPV, ha servido para comenzar oficialmente y afianzar una relación de colaboración entre la UPV y AZTI.

Resumen tesis

El quitosano, la proteína de suero y el gluten de trigo son biomateriales con prometedoras propiedades para su empleo en aplicaciones tales como envases. Tienen buenas propiedades formadoras de filmes y buenas propiedades barrera en condiciones secas. Además, por ser extraídas de subproductos del procesado industrial de alimentos y ser biodegradables, ofrecen ventajas ecológicas sobre los polímeros derivados del petróleo. Aun así, sus características fisicoquímicas deben ser mejoradas para convertirlos de interés comercial para la industria de envases. El objetivo de este trabajo es el estudiar diferentes estrategias con el objetivo de mejorar la resistencia al agua y las propiedades de envejecimiento de éstos polímeros, las cuales son las desventajas clave de estos materiales.

Palabras clave: *polímeros biodegradables, quitosano, proteína de suero, gluten de trigo, Poli (ϵ -caprolactona), montmorillonita, envases de alimentos, propiedades mecánicas, envejecimiento, pH, migración.*

- Entre las acciones de colaboración realizadas entre la UPV y AZTI ha estado la gestión de la participación, en el curso 07/08, de dos investigadores de AZTI en la docencia de parte del Master de postgrado “Ingeniería de Materiales” impartido por la UPV. Para ello, se ha preparado la materia que se va a dar en la asignatura de dicho Master titulada "Obtención, propiedades y aplicaciones de biopolímeros y sistemas poliméricos biodegradables".

4. DIFUSIÓN

- Los resultados obtenidos de la extracción de quitosano se van a utilizar para presentar una **publicación científica** con autores tanto de AZTI como de la Escuela de Ingenieros de Bilbao. En estos momentos se tiene un borrador, a la espera de los últimos resultados de viscosimetría y peso molecular que están siendo realizados por la UPV. La revista inicialmente elegida es el: Journal of Agricultural and Food Chemistry (ACS Publications) con un factor de impacto de 2.32.
- Dentro esta línea también se ha realizado un pequeño estudio de caracterización de filmes de proteína de pescado utilizada por el restaurante Mugaritz. Los resultados obtenidos han sido incluidos en una **presentación oral** realizada en la conferencia “Delivery of Functionality in Complex Food Systems: Physically-Inspired Approaches From Nanoscale To Microscale”, el 8-10 de octubre del 2007 en la Universidad de Massachusetts, Amherst, MA, USA.
- Los resultados presentados en la Conferencia anterior han sido utilizados para la redacción del **artículo científico** siguiente, enviado a la revista **Food Biophysics**: “From the chef’s mind to the dish: How scientific approach can help to make the way easier”, con Juan-Carlos Arboleya, Idoia Olabarrieta, Andoni Aduriz, Daniel Lasa, Javier Vergara, Esther Sanmartín, Leire Iturriaga, Antonio Duch and Iñigo Martínez de Marañón como autores.

Como se ha descrito anteriormente, el presente proyecto, a pesar de haber tenido como eje central la extracción y caracterización del quitosano para su aplicación en envase activo, ha servido para desarrollar diferentes estudios y tareas en paralelo en la temática de polímeros naturales que ha servido para afianzar la línea de biopolímeros en AZTI. Durante este año se ha profundizado en el estudio de su uso y aplicaciones como recubrimientos y films activos. Gracias al presente Convenio Marco se ha gestionado y planificado el inicio de una tesis doctoral para el próximo curso que tendrá como temática los biopolímeros en envase activo y será dirigida desde AZTI, la cual, lanzará por fin, la línea estratégica de biopolímeros en envase activo en esta empresa.