



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PRODUCCIÓN DE LACTOBACILOS EMPLEANDO HIDROLIZADOS PROTEICOS DE
DESPERDICIOS DE CAMARÓN Y SU APLICACIÓN EN LA EXTRACCIÓN BIOLÓGICA
DE QUITINA A ESCALA PLANTA PILOTO.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

Ana Iris Silva Castro

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto

Ciudad universitaria, Cd. Mx., 2017



JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Bertha Julieta Sandoval Guillén**

VOCAL: **Profesor: Francisco Ruíz Terán**

SECRETARIO: **Profesor: Concepción Keiko Shirai Matsumoto**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Beatriz Ruiz Villafán**

2° SUPLENTE: **Profesor: Oscar Hernández Meléndez**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biopolímeros y en la planta piloto 10 del departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto. El trabajo experimental se llevó a cabo con financiamiento de la Secretaría de Economía y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología proyecto FINNOVA/CONACYT (No. 224962) y a CONACYT (No. 237292). Así mismo se agradece por la beca otorgada FINNOVA/CONACYT (No. 224962)

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto

SUSTENTANTE:

Ana Iris Silva Castro

Índice

Nomenclatura	1
Introducción	1
Resumen	2
Capítulo 1.....	3
MARCO TEÓRICO.....	3
1.1 CAMARÓN	4
1.1.1 Composición química proximal.....	4
1.1.2 Microbiota del camarón	5
1.1.2.1. Acinetobacter.....	5
1.1.2.3. Pseudomonas aeruginosa	5
1.1.2.4. Flavobacterium	7
1.1.2.5. Moraxella	8
1.1.2.6. Arthrobacter	8
1.2 Quitina y quitosano	8
1.3. Obtención de quitina y quitosano	10
1.3.1. Obtención de quitina	10
1.3.2. Obtención de quitosano	12
1.4 FERMENTACIÓN ACIDO LÁCTICA	12
1.5 LACTOBACILOS	13
1.5.1. Metabolismo	13
1.5.2. Lactobacillus plantarum	14
1.5.3. Lactobacillus brevis	15
1.6. ENSILADOS DE PRODUCTOS MARINOS.....	16
1.6.1. Ensilado químico	16
1.6.2. Ensilado biológico.....	17
1.7 PROTEINA E HIDROLIZADO PROTEICO	17
1.7.1. Aplicación de hidrolizados proteicos.....	18
1.8 MEDIO DE CULTIVO MAN ROGOSA Y SHARPE (MRS)	19
1.8.1. Componentes del MRS	19

1.8.1.1. Extracto de carne y levadura	19
1.8.1.2 Peptona de caseína.....	20
1.8.1.3. Glucosa	20
1.8.1.4. Tween 80	20
1.8.1.6. Acetato de sodio	21
1.8.1.7. Citrato de amonio.....	21
1.8.1.8. Sulfato de magnesio	21
1.8.1.9. Sulfato de manganeso	21
Justificación	23
Objetivos.....	24
Objetivo General.....	24
Objetivos específicos	24
Hipótesis	24
Capítulo 2 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA	25
2.0 Estrategia de trabajo	26
2.1 Aprovechamiento de la fracción rica en proteína y obtención de hidrolizados proteicos.....	28
2.2. Sustitución de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo MRS y la evaluación de crecimiento L. brevis y L. plantarum.....	31
2.2.1. Sustitución de la fuente de nitrógeno	31
2.2.2 Evaluación de crecimiento.....	31
2.3. Escalamiento de extracción biológica de quitina a 250 kg.....	32
2.3.1. Preparación del inóculo.....	32
2.3.2. Acondicionamiento de la materia prima e inicio de la fermentación.....	33
2.3.3. Muestreo y tratamiento de muestras	34
2.3.4. Análisis de muestras y quitina final	35
2.4. Obtención de quitosano	35
2.5 Técnicas de caracterización química y estructural.....	35
2.5.1. Análisis químico proximal (AQP)	35

2.5.2. Acidez total titulable (ATT).....	36
2.5.3. Determinación de azúcares solubles totales	36
2.5.4. Proteína soluble.....	36
2.5.5. Determinación de azúcares y ácidos orgánicos por HPLC.....	36
2.5.6. Cromatografía de exclusión de peso molecular	36
2.5.7. Análisis electroforético	37
2.5.8. Grado de Hidrolisis.....	37
2.5.9. Microscopia electrónica de barrido (MEB) acoplado con Microanálisis de Energía Dispersiva de Rayos X (EDS)	37
2.5.10. Determinación de solubles	37
2.5.11. Peso molecular	37
2.5.12. Grado de acetilación por ¹ H RMN.....	38
Capítulo 3 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	39
3.1. Producción de la fracción rica en proteína y obtención de hidrolizados proteicos.....	40
3.1.1. Caracterización fisicoquímica de las fracciones proteicas e hidrolizados proteicos.	40
3.1.2 Caracterización fisicoquímica del hidrolizado proteico	41
3.1.3. Determinación del peso molecular de los compuestos del HPC.	43
3.2 Formulación del medio de cultivo y evaluación de crecimiento de lactobacilos.....	46
3.2.1. Formulación del medio de cultivo	46
3.2.2. Evaluación de crecimiento.....	47
3.3 Escalamiento de extracción biológica de quitina con <i>L. brevis</i> desarrollado en MRS-HPC a 250 kg de DC (MRS-HPC 250).....	49
3.3.1. Cuantificación de microorganismos y ácidos orgánicos.....	49
3.3.2. Desproteínización y Desmineralización	52
3.3.4. Micrografía electrónica de barrido	55
3.4. Caracterización del quitosano	63
Conclusiones.....	66

Bibliografía	68
ANEXO	79
Anexo I. Cálculos para el balance de nitrógeno en MRS y MRS-HPC. ...	80
Anexo II. Curva patrón de azúcares solubles totales y Tratamiento de muestra	80
Anexo III. Reactivos para la determinación de Proteína soluble por Lowry-Peterson, y Curva patrón de Seroalbúmina bovina.	81
Solución A.....	81
Solución B.....	81
Curva patrón de seroalbumina bovina.....	81
Tratamiento de la muestra	81
Anexo III. Tratamiento de muestras para determinación de azúcares y ácidos orgánicos por HPLC.	82
ANEXO IV. Preparación de buffer, Cromatograma de Gel Standard Filtration y curva patrón	83
Curva patrón con Gel Filtration Standard de BIO RAD	84
Anexo V. tratamiento de muestras para análisis electroforético.	84
Análisis de bandas	84
Curva patrón para electroforesis de gel de Tricina-SDS-PAGE.	85
Anexo VI. Grado de Hidrólisis	85
Curva patrón de L-Leucina en SDS a 1%.....	85
Anexo VII. Tratamiento de la muestra para la terminación de solubles	85
Anexo VIII. Tratamiento de la muestra para determinación de peso molecular.	86
a partir de 0.1g de quitosano disuelto en una solución al 2% de ácido acético glacial (MEYER, pureza 99.7%) y 0.2M de acetato de sodio (MEYER, pureza 90%).	86
Anexo IX. Tratamiento de la muestra para determinación de grado de acetilación por HRMN	86
Anexo X. Modelo de crecimiento para L. brevis en MRS y MRS-HPC.....	87
Modelo de crecimiento correspondiente a L. brevis en MRS-HPC	87
Modelo de crecimiento correspondiente a L. brevis en MRS.	87

Anexo X1. Modelo de crecimiento para <i>L. plantarum</i> en MRS y MRS-HPC.	87
Modelo de crecimiento correspondiente a <i>L. plantarum</i> en MRS-HPC.	88
Modelo de crecimiento correspondiente a <i>L. plantarum</i> en MRS.	88
Anexo XII. Análisis de varianza en la cinética de crecimiento para <i>L. brevis</i> y <i>L. plantarum</i>	88

Índice de tablas

Tabla 1. Caracterización fisicoquímica de los camarones.	4
Tabla 2. Caracterización fisicoquímica de los exoesqueletos de camarón en base seca.	4
Tabla 3. Caracterización fisicoquímica de dos lotes de fracciones proteicas.	40
Tabla 4. Caracterización fisicoquímica de dos lotes de hidrolizados proteicos obtenidos a partir del refinamiento de las fracciones proteicas.	41
Tabla 5. Caracterización fisicoquímica del hidrolizado proteico de camarón (HPC).	43
Tabla 6. Composición general del medio de cultivo MRS con la mezcla de hidrolizados proteico de camarón (MRS-HPC) como sustituto de proteína.	46
Tabla 7. Tasa de crecimiento a 30°C para <i>L. brevis</i> y <i>L. plantarum</i> en MRS y MRS-HPC.	48
Tabla 8. Azúcares, etanol y ácidos orgánicos, determinados por cromatografía líquida de alta resolución en el filtrado de la muestra final de MRS-HPC 250.	52
Tabla 9. Análisis elemental por EDS correspondiente a una hojuela de cefalotórax de camarón.	57
Tabla 10. Análisis elemental por EDS correspondiente a una hojuela de cefalotórax de camarón al tiempo 48 h del proceso MRS-HPC 250.	59
Tabla 11. Análisis elemental por EDS de una hojuela de quitina cruda obtenida de cefalotórax de camarón, después de 92 h de proceso de extracción biológica.	61
Tabla 12. Caracterización de hojuelas de quitosano.	63
Tabla 13. Caracterización del quitosano obtenido a partir de la QMRS-HPC 250.	65

Índice de figuras

Figura 1. Vía de Entner-Doudoroff (Madigan, y Martinko, 2006).	6
Figura 2. Ciclo de ácido tricarbóxico (Munray, et al, 2009).	7
Figura 3. Quitina, homopolisacárido compuesto por unidades repetitivas de residuos de N-acetilglucosamina con enlaces β (1 \rightarrow 4). (Murray, et al.,2013)	9
Figura 4. Vías metabólicas en la fermentación de glucosa por lactobacilos (Kandler, 1983).	14
Figura 5. Proceso de ensilado químico y biológico.	17
Figura 6. Filtración de la fracción líquida del proceso de extracción biológica de quitina, en bastidores de apertura 40 y 100 para obtener la fracción rica en proteína.	28
Figura 7. Pellet y sobrenadante, resultado de la centrifugación de la fracción rica en proteína en Centrifuga Beckman Coulter en un rotor J2-MC, a 14,000 rpm durante 20 minutos a 4°C.	29
Figura 8. Proceso de concentración de proteína a partir de los hidrolizados proteicos.....	30
Figura 9. HPC, sales y glucosa del medio MRS, esterilizados a 121°C, 1 atm, 15 min; e inóculo de <i>L. brevis</i> incubado a 30°C durante 24 h. (Previos a la preparación del inóculo).....	33
Figura 10. Inoculación del reactor con el 10% v/p de <i>L. brevis</i> , en 250 kg de camarón con 10% p/p de azúcar, con temperatura de 30°C.....	34
Figura 11. Proteína soluble la fracción rica en proteína (FP), en los sobrenadantes I Y II (SI y SII), y en los hidrolizados proteicos (HP) de las pruebas piloto 1 y 2.	42
Figura 12. Cromatogramas de los hidrolizados proteicos, obtenidos en el cromatógrafo de líquidos de mediana presión (FPLC).	44
Figura 13. Electroforetogramas de los hidrolizados proteicos de camarón SDS-Page (Izquierda) y Tricina SDS-Page (Derecha).	45
Figura 14. Curvas de crecimiento de <i>L. brevis</i> y <i>L. plantarum</i> en MRS y MRS-HPC, durante 24 horas, incubados a 30°C.	47
Figura 15. Cambio de pH, durante la extracción biológica de quitina partir de 250 kg de DP a 30°C con 10% p/p de inóculo <i>L. brevis</i> desarrollado en MRS-HPC, y 10% p/p de azúcar.	49
Figura 16. Bacterias ácido lácticas (BAL), mesófilos aerobios (MA), coliformes (COL) y azúcares solubles totales, durante la extracción	

biológica de quitina partir de 250 kg de DP a 30°C con 10% p/p de inóculo L. brevis desarrollado en MRS-HPC, y 10% p/p de azúcar.	51
Figura 17. Proceso de desproteínización durante la extracción biológica de quitina partir de 250 kg de DP a 30°C con 10% p/p de inóculo L.brevis desarrollado en MRS-HPC, y 10% p/p de azúcar.	53
Figura 18. Proceso de desmineralización durante la extracción biológica de quitina partir de 250 kg de DP a 30°C con 10% p/p de inóculo L.brevis desarrollado en MRS-HPC, y 10% p/p de azúcar.	54
Figura 19. Micrografía obtenida por MEB a x10.000 x110 de una hojuela de quitina cruda en el t= 0 h MRS-HPC 250, donde M corresponde a minerales.	56
Figura 20. micrografía obtenida a x4000 y x9000 de una hojuela de quitina en el t= 48 h MRS-HPC 250, donde M corresponde a minerales, Ba a bacilos y Co a cocos.	58
Figura 21. Micrografía obtenida a x5000 y x15000 de una hojuela de quitina cruda obtenida de MRS-HPC 250 en t=92 h, donde M corresponde a minerales, Ba a bacilos y Co a cocos.	60
Figura 22. Micrografía electrónica de la quitina cruda obtenida del proceso MRS-HPC 250.	62
Figura 23. Espectro Infrarrojo de quitosano, el quitosano obtenido (rojo), quitosano biológico (azul) y de quitosano comercial SIGMA(negro).	64

Nomenclatura

% DM: porcentaje de desmineralización.

%DP: porcentaje de desproteización.

%DA: porcentaje de acetilación.

% DDA: porcentaje de desacetilación.

AQP: Análisis químico proximal.

ATT: acidez total titulable.

BAL: Bacterias ácido lácticas.

COL: coliformes totales.

HP: hidrolizado proteico.

HP1: hidrolizado proteico de la prueba piloto 1.

HP2: hidrolizado proteico de la prueba piloto 2.

HPC: Hidrolizado proteico de camarón.

DC: Desperdicio de camarón.

GH: grado de hidrólisis.

FAL: fermentación ácido láctica.

FP: fracción rica en proteínas.

FP1: fracción rica en proteínas de la prueba piloto 1.

FP2: fracción rica en proteínas de la prueba piloto 2.

FP-HP1: fracción rica en proteínas e hidrolizado proteico de la prueba piloto 1.

FP-HP2: fracción rica en proteínas e hidrolizado proteico de la prueba piloto 2.

IR: Espectroscopia infrarroja.

MA: mesófilos aerobios.

mg/g: miligramo por gramo de muestra.

mmol/g: milimoles por gramo de muestra.

MRS: Medio de cultivo Man Rogosa Sharpe.

MRS-HPC: Medio de cultivo con la sustitución de la fuente de nitrógeno por el hidrolizado proteico de camarón.

MRS-HPC 250: escalamiento a 250 kg de DC con 10% de inóculo desarrollado en MRS-HPC.

P1: prueba piloto 1.

P2: prueba piloto 2.

pH: Potencial de hidrógeno.

PM: peso molecular.

SI: sobrenadante 1.

SII: sobrenadante 2.

SBN: sobrenadante.

UFC: unidades formadoras de colonias.

QMRS-HPC 250: Quitina cruda obtenida del escalamiento a 250 kg de DC con 10% de inóculo desarrollado en MRS-HPC.

Introducción

La presente tesis surgió como una alternativa para el aprovechamiento los subproductos que son generados durante el proceso de extracción biológica de quitina a partir de cefalotórax de camarón.

El subproducto del proceso anterior presenta composición proteica, de éste se puede obtener un hidrolizado proteico. Los hidrolizados proteicos son producidos a partir de materias primas para aprovechar el valor de las proteínas en la nutrición de animales de granja acuícolas, y como sustitutos de nitrógeno en medios de cultivo para desarrollar microorganismos. Un ejemplo de proceso de obtención de hidrolizado es la fermentación ácido láctica de los azúcares y las enzimas producidas por los lactobacilos en ensilados; dos ejemplos de dichos microorganismos son *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus plantarum*, que son clasificados como cepas probióticas y son incorporados en alimentos funcionales, otra aplicación es la reducción o inhibición de compuestos y microorganismos no deseados con la finalidad de conservar la calidad de los alimentos.

Bajo los antecedentes ya estipulados, el trabajo descrito en los siguientes capítulos se enfocó en aprovechar, caracterizar y dar aplicación a los subproductos de un proceso que busca obtener quitina de los exoesqueletos de camarón; a partir de la obtención de hidrolizados proteicos, posteriormente utilizados como sustitutos de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo para desarrollar los lactobacilos aplicados como inóculos en la extracción biológica de la quitina; con la finalidad de optimizar el proceso y también generar menos residuos.

Resumen

La industria camaronícola del país genera desechos como exoesqueletos y cefalotórax, estos son aprovechados para la extracción biológica de quitina mediante ensilados, donde los productos de la fermentación ácido láctica (FAL) de los azúcares con *Lactobacillus* spp., producen condiciones de pH a 4.6 y acidez total titulable expresada como ácido láctico de 0.52 mmol/g, dando lugar a una fracción rica en proteína (FP) que fue caracterizada, y presentó un valor de 61.55% de proteína en base seca, después de un proceso de refinamiento, se extrajo un hidrolizado proteico (HP) de 46.33% de proteína.

El HP fue empleado como sustituto de la fuente de nitrógeno en el medio Man Rogosa Sharpe (MRS), en este medio de cultivo se evaluó el crecimiento de *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus plantarum*, mediante cuenta en placa de microorganismos viables, sin obtener diferencia significativa entre el medio tradicional MRS y el medió con el HP.

El medio formulado con hidrolizado proteico de camarón (HPC) fue utilizado para preparar el cultivo iniciador de *L. brevis*, mismo que fue inoculado en un 10% (v/p) a 250 kg de cefalotórax de camarón, del que se obtuvo el 25% de quitina en base húmeda. Ésta fue desacetilada con método alcalino heterogéneo para obtener quitosano.

Finalmente, la quitina cruda y el quitosano fueron caracterizados mediante espectroscopia de absorción en infrarrojo, resonancia magnética nuclear de protón, viscosimetría para determinación de pureza, grado de acetilación, masa molecular, micrografía electrónica de barrido y microanálisis de energía dispersiva de rayos x.

Capítulo 1

MARCO TEÓRICO

1.1 CAMARÓN

Durante el periodo de 2007 a 2013, la industria camaronera mexicana tuvo una producción promedio anual de 173 992 toneladas métricas de camarón en peso vivo (CONAPESCA, 2013).

1.1.1 Composición química proximal

Los camarones presentan una composición química compleja (Tabla 1), estos son comercializados en diferentes presentaciones, generando diversos subproductos como desechos de cefalotórax, patas y vísceras; un equivalente a 65% del peso inicial de camarón. (Pacheco *et al.*, 2009; Shirai *et al.*, 1996).

Tabla 1. Caracterización fisicoquímica de los camarones.

Humedad (%)	72.6
Proteína (%)	23.3
Lípidos (%)	1.1
Cenizas (%)	3.2

Los cefalotórax de camarón (Tabla 2) presentan una composición conveniente para obtener proteínas, minerales, pigmentos y quitina, productos que son útiles en la industria alimentaria, cosmética, farmacéutica, entre otras (Knorr, 1991; Salas-Duran *et al.*, 2015).

Tabla 2. Caracterización fisicoquímica de los exoesqueletos de camarón en base seca.

Proteína (%)	40.67
Ceniza (%)	27.48
Lípidos (%)	11.05
Fibra cruda (%)	7.12
Calcio (%)	9.03
Fósforo (%)	2.66

1.1.2 Microbiota del camarón

La microbiota del camarón fresco y después de su almacenamiento en congelación está constituida por bacterias mesófilas aerobias, entre ellas se han aislado e identificado a *Acinetobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Flavobacterium*, *Moraxella* y *Arthrobacter* (Heinsz *et al.*, 1988).

1.1.2.1. *Acinetobacter*

Acinetobacter es una bacteria Gram negativa en forma de bastón corto, a menudo encapsulado, presenta un diámetro de 1 – 1.5 μm y longitud de 1.5 – 2.5 μm y en su etapa de crecimiento estacionaria, es de forma cocoide con diámetro de 0.6 - 0.8 μm y longitud de 1.0 - 1.5 μm . Es catalasa positiva y oxidasa negativa y no esporula. Puede ser capaz de utilizar un gran número de fuentes de carbono, pero no utiliza la glucosa como fuente de carbono, la mayoría no puede reducir el nitrato a nitrito, pero algunas cepas pueden utilizar estos compuestos como fuentes de nitrógeno por medio de una nitrato reductasa (Percival, *et al.*, 2004).

1.1.2.3. *Pseudomonas aeruginosa*

La *Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo aeróbico con diámetro de 0.4 - 1.0 μm y 1.5 - 5.0 μm de longitud, Gram negativo y no esporula, es oxidasa y catalasa positiva, obtiene energía a partir de carbohidratos de tres a seis carbonos por la vía del ciclo de Entner-Doudoroff (Figura 1), también utiliza succinato y otros intermediarios del ciclo de ácido tricarboxílico (Figura 2) (Montie, 1998 y Percival, *et al.*, 2004).

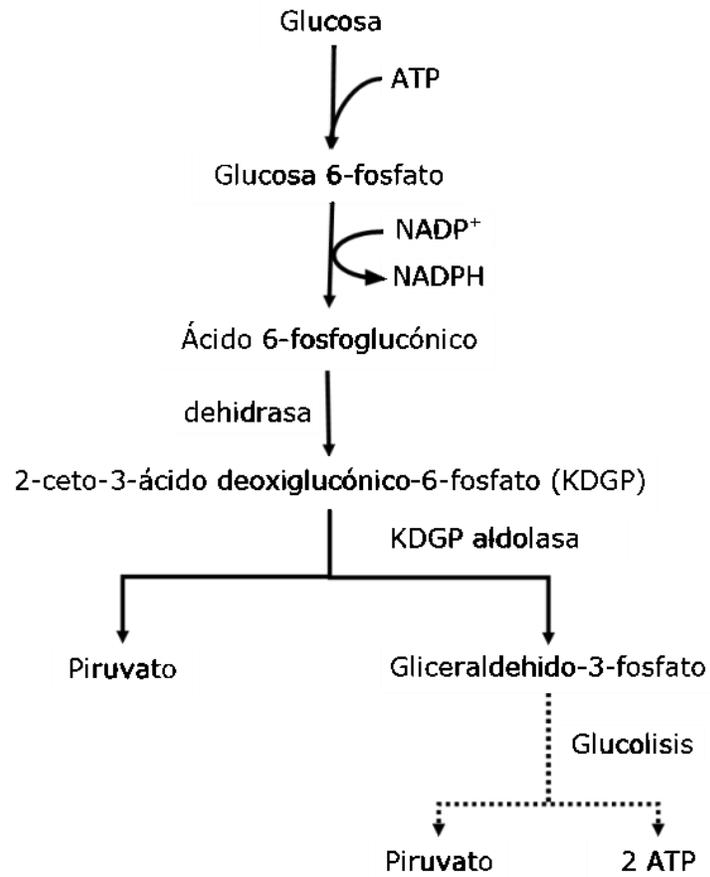


Figura 1. Vía de Entner-Doudoroff (Madigan, y Martinko, 2006).

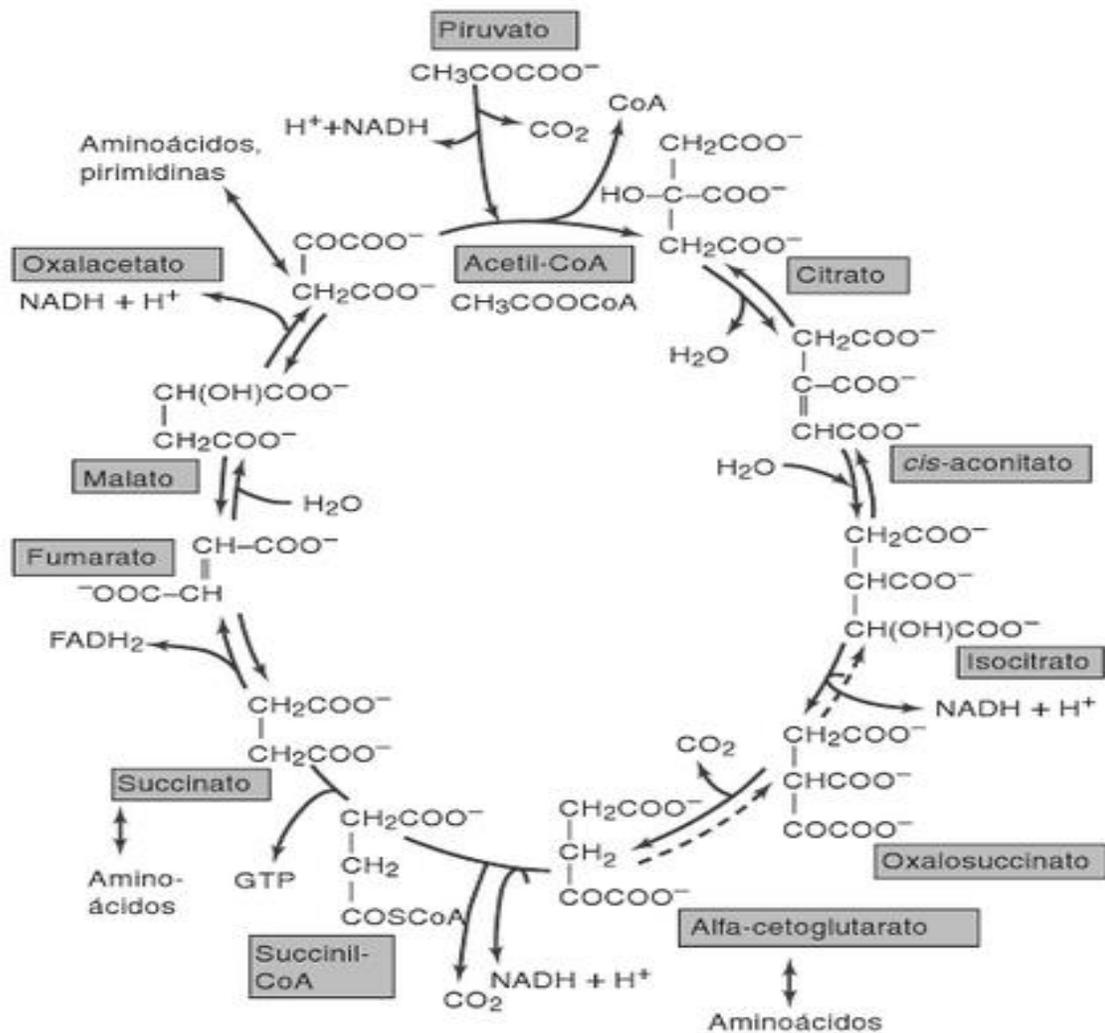


Figura 2. Ciclo de ácido tricarbóxico (Munray, et al, 2009).

1.1.2.4. *Flavobacterium*

Este género presenta forma de varilla recta, ligeramente curvada con extremos redondeados o ligeramente cónicos, algunas de las especies producen formas degenerativas esféricas en la fase estacionaria, presentan un diámetro de 0.3 -0.5 μm y longitud de 2.0 -5.0 μm , no forman esporas, son Gram negativos y quimiotróficas, la mayoría de las especies son aeróbicas obligadas, aunque hay especies microaerobias,

como anaerobias, la temperatura de crecimiento es de 20 – 30 °C (Krieg, 2010).

1.1.2.5. *Moraxella*

Es un género de bacilos cortos y cocobacilos, tienen 0.05 µm de diámetro y 1.5 µm de longitud, son Gram negativos, no esporulados, son oxidasa y catalasa positiva. La mayoría son aerobios y algunos son anaerobios facultativos, obtienen energía de la degradación de compuestos orgánicos como: aminoácidos, alcoholes y ácidos orgánicos. La temperatura óptima de crecimiento está entre 30-35°C (Ray y Bhunia, 2013).

1.1.2.6. *Arthrobacter*

Este género está compuesto por una amplia fracción de la población bacteriana, son quimioheterótrofos aeróbicos, presentan una sucesión de cambios en su morfología; en la fase estacionara presenta formas esféricas y de tamaño uniforme, cuando el crecimiento se reinicia, forman bacilos para presentar fisión binaria. Son catalasa positiva y presentan una longitud de 1.8 µm y diámetro de 0.8- 1.2 µm (Stanier *et al.*, 2005)

1.2 Quitina y quitosano

La quitina es un homopolisacárido insoluble en agua, formado por residuos de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) ligados por enlaces β (1 → 4), diferenciado químicamente de la celulosa por el grupo OH en el carbono 2, sustituido por el grupo acetilamino (Figura 3) (Shirai *et al.*, 1996). UNESCO, 2010).

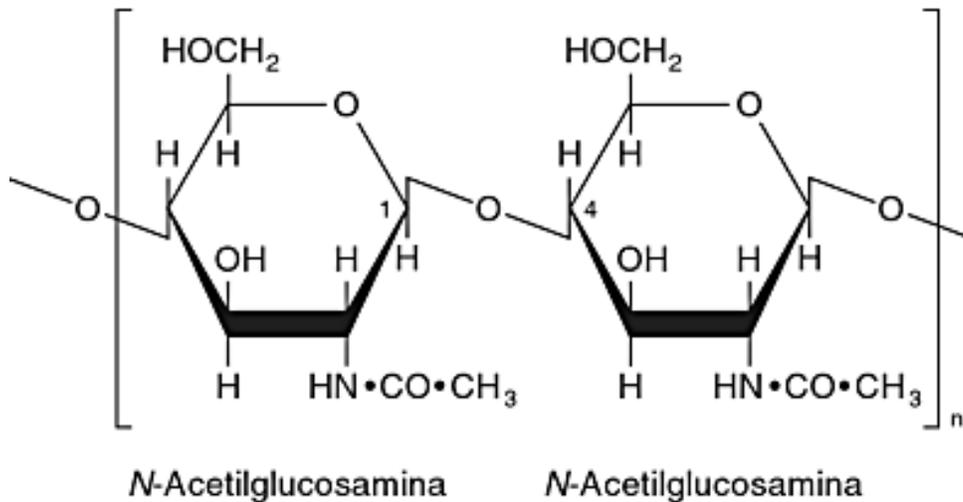


Figura 3. Quitina, homopolisacárido compuesto por unidades repetitivas de residuos de N -acetilglucosamina con enlaces β (1 \rightarrow 4). (Murray, et al.,2013)

La quitina se encuentra en tres formas que difieren en el arreglo molecular y presentan pesos moleculares aproximados dependiendo de su tipo: α -quitina, PM~701 kDa; β -quitina, PM~612 kDa; y γ -quitina, PM~524 kDa (Jang et al,2004; Shirai et al, 1996).

La α -quitina está formada por cadenas en arreglo anti-paralelo, generando una forma ortorrómbica cristalina atribuida por los 4 hidrógenos de los grupos hidroxilos y dos grupos amida en la unidad de repetición. El polimorfismo está relacionado a su función biológica, formando una matriz sobre la cual se produce la mineralización y, en consecuencia, presenta baja solubilidad en la mayoría de los disolventes orgánicos.

La β -quitina tiene un arreglo paralelo alineado que forma una simetría cristalina monocíclica, donde retiene agua y por lo tanto es soluble en ácido fórmico.

La γ -quitina es una mezcla entre α -quitina y β -quitina, con dos cadenas paralelas en una dirección y la tercera en la dirección opuesta. Debido a éstas características de β y γ -quitina, la opresión y el número de enlaces

de hidrógeno entre cadenas de embalaje se reducen, aumentando el grado de hidratación y la reducción de estanqueidad, favoreciendo su asociación con proteínas. (Melo y Cuamatzi, 2007; Shirai et al, 1996).

El quitosano es considerado un amino-polisacárido debido a su contenido aproximado del 7% de nitrógeno; compuesto de, D-glucosamina desacetilada unida por el β (1 \rightarrow 4) a N-acetil-D-glucosamina, su peso molecular es dependiente del grado de acetilación, y se puede definir como de alto, medio y bajo peso molecular (Shuai *et al*, 2013; de Sousa *et al*, 2015):

- Alto peso molecular (8% DA): 313-375 kDa
- Medio peso molecular (25% DA): 190-310 kDa
- Bajo peso molecular (37% DA): 50–190 kDa

1.3. Obtención de quitina y quitosano

1.3.1. Obtención de quitina

La principal fuente de la producción industrial de quitina son los exoesqueletos de crustáceos; en cabezas de camarón (*Penaeus semisulcatus*) se ha reportado un aproximado de 6% de este homopolisacárido en base seca (Mizani y Aminlari, 2007). La obtención de quitina es a partir de dos tipos: el proceso químico y el proceso biotecnológico.

1.3.1.1. Proceso químico

El proceso químico es realizado bajo condiciones de ácido y álcali, donde primero se realiza la remoción de proteína con soluciones del 1 al 10% de hidróxido de sodio o potasio a temperaturas que van desde los 30°C a los 100°C, con tiempos de reacción de 30 min a 12 h (Kim, 2010). Posteriormente, se efectúa la remoción de compuestos minerales como carbonato y fosfato de calcio con ácido clorhídrico diluido, durante 2 a 3 horas a temperatura ambiente (Shahidi & Synowiecki, 1991; Kim, 2010).

Los inconvenientes de este proceso son las grandes cantidades de residuos químicos peligrosos, y las inconsistencias en el producto final de la hidrólisis y desacetilación parcial de la quitina (Shirai et al, 1996).

1.3.1.2. Procesos biológicos

Los procesos biológicos surgen como alternativa al método químico y se realizan a partir de fermentación ácido-láctica y por proceso fermentativo-enzimático.

La fermentación ácido láctica consiste en ensilar al residuo adicionado con una fuente de carbono (sacarosa) e inocularlo con una cepa homoláctica (*Lactobacillus spp.*) que producirá ácido láctico *in situ*, dando lugar a una disminución de pH a 4.6 con 0.52 mmol/g de acidez total titulable, obteniendo así, la hidrólisis parcial de proteínas, y en consecuencia la remoción de la misma. El residuo fermentado es un sustrato semilíquido, que es separado de la quitina parcialmente desproteïnizada por centrifugación de la fracción sólida: el licor contiene la mayoría de carotenoides, enzimas, proteínas, lípidos y otros compuestos solubles. (Cira, et al., 2002; Shirai et al, 1996 y Pacheco et al., 2009).

1.3.1.3. Proceso enzimático

El proceso enzimático surge como un método alternativo eficiente pero costoso, consta de la utilización directa de enzimas como alcalasas, pancreatina o proteasas bacterianas con alcali a condiciones de pH 7.5 y 40°C (Mayrén, 2013).

Otro método es realizado a partir de fermentaciones con bacterias que producen enzimas proteolíticas y las proteasas digestivas de los crustáceos, que llevan a cabo el proceso de desproteïnización (Shirai et al., 2001; Shirai et al, 1996 y Pacheco et al., 2009).

El inconveniente de los procesos fermentativos y enzimáticos, es la proteína residual que a menudo sigue siendo alta y los tiempos de reacción son mayores a los del método químico (Kim, 2010).

1.3.2. Obtención de quitosano

En la obtención de quitosano se emplean diferentes métodos de desacetilación de quitina. El proceso con álcali, se lleva a cabo con NaOH (50% p/p) y temperaturas de 100-120°C. Se han estudiado variantes a menores temperaturas y menor concentración de NaOH, con diluyentes miscibles en agua tales como, acetona y tributilamonio, como medio de reacción para lograr una distribución uniforme de NaOH a lo largo de la desacetilación (Kim, 2013).

También se han empleado métodos biológicos de desacetilación usando enzimas quitina desacetilasas, extraídas de diversos hongos como: *Colletotrichum lindemuthianum*, *C. gloeosporioides* y *Mucor rouxii*. Considerado como un método favorable porque no se requiere de una reacción química o altas temperaturas, es amigable con el ambiente y no degradante, pero con la desventaja de la inaccesibilidad del sustrato a las enzimas, debido a la alta cristalinidad e insolubilidad (Kim, 2013; Pacheco *et al*, 2013; Ramos-Puebla *et al*, 2016).

1.4 FERMENTACIÓN ACIDO LÁCTICA

La fermentación se define como un proceso metabólico en el que se logran cambios químicos en un sustrato orgánico a través de la actividad de las enzimas excretadas por diferentes microorganismos a través del ácido láctico, etanol, ácido acético y compuestos alcalinos (Chinte-Sanchez, 2008).

La fermentación ácido láctica se lleva a cabo por la descomposición de carbohidratos, ya sea hexosas o pentosas mediante un proceso homofermentativo o heterofermentativo, el primero se lleva a cabo cuando los microorganismos producen exclusivamente ácido láctico y el segundo, se produce una mezcla de ácido láctico, ácido acético, dióxido de carbono y etanol (Auras, *et al*, 2010).

1.5 LACTOBACILOS

Los lactobacilos son microorganismos homofermentativos Gram positivos, no esporulan, hay especies cortas, menores a 1.5 μm de longitud, mientras que otras son de 5 μm ; cuando son observadas en microscopio tienen una apariencia curva y delgada; son anaerobios facultativos, su temperatura óptima de crecimiento es entre los 30 - 45 °C, aunque pueden sobrevivir a temperaturas entre 5 - 53 °C, algunas especies resisten a altas concentraciones de sal, presión osmótica y baja actividad de agua; también, presentan crecimiento óptimo a pH de 5.5 a 5.8; en general pueden crecer hasta pH<5 porque resisten el ácido láctico producido por las mismas al fermentar el azúcar.

1.5.1. Metabolismo

Los lactobacilos presentan un metabolismo homofermentativo o heterofermentativo (Figura 4). Los primeros utilizan la vía de la glucólisis, en la que a partir de la división de fructosa 1,6-bifosfato en dos triosas-3-fosfato, se convertirán en lactato. Mientras que los heterofermentativos, inician con la oxidación de la glucosa 6-fosfato a glucanato 6-fosfato, seguido de la descarboxilación y la división de la pentosa 5-fosfato. Así se producen dióxido de carbono, lactato y acetato o etanol, o bien se inicia por la división fructosa 6-fosfato con fosfocetolasa, para finalmente dar como resultado la formación de acetato y lactato a una relación molar de 3:2. (Kandler, 1983).

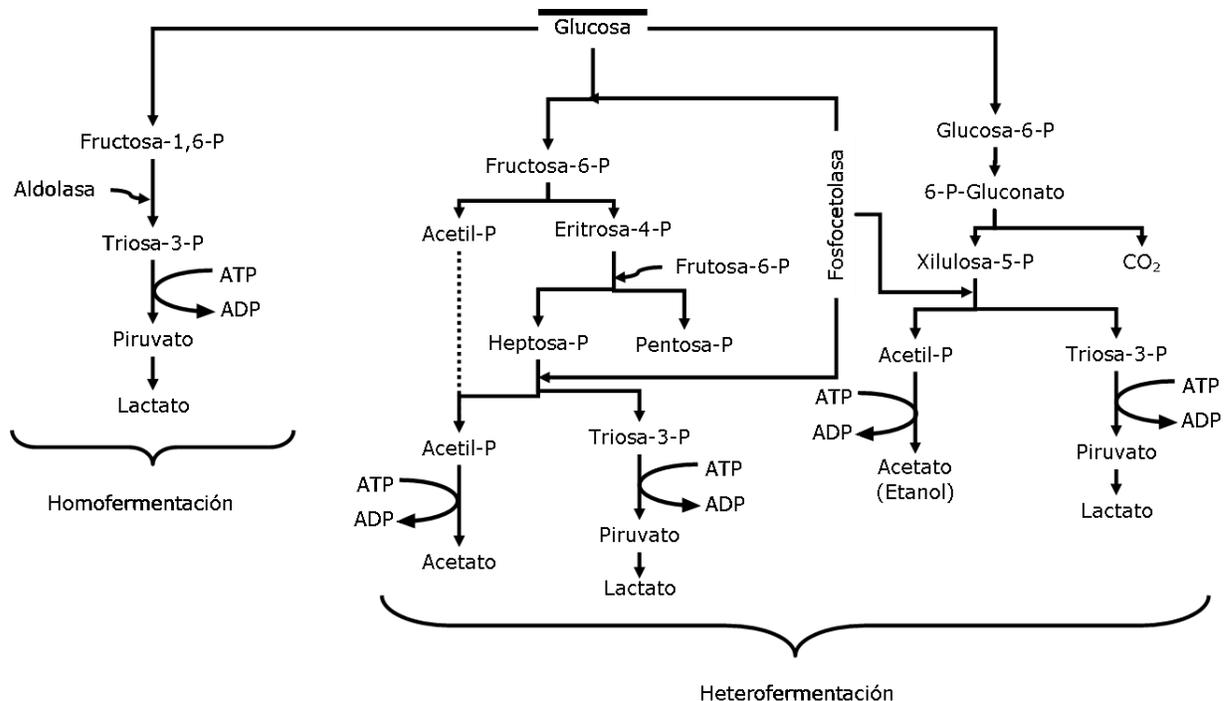


Figura 4. Vías metabólicas en la fermentación de glucosa por lactobacilos (Kandler, 1983).

Algunas especies del género *Lactobacillus* son denominadas como homofermentativos facultativos, porque bajo condiciones de anaerobiosis o microaerobiosis, presentan características homofermentativas, mientras que en condiciones aeróbicas forman además de ácido láctico, ácido acético, acetoina y peróxido de hidrógeno (Porro et al., 1999; Li et al., 2006).

1.5.2. *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum es un microorganismo homofermentativo, bajo condiciones anaerobias forma principalmente ácido láctico a partir de glucosa, muestra un aumento dramático en la producción de ácido acético bajo condiciones aeróbicas, junto con pequeñas cantidades de acetoina y acetato, posee la capacidad única de proteger contra los radicales libres de oxígeno por una reducción de superóxido no enzimática mediada por el manganeso y el pH óptimo de crecimiento es de 4.6 – 4.8. Bajo condiciones especiales, algunas cepas de *L. plantarum* poseen catalasa y

manganesina que contiene pseudocatalasa, algunas poseen nitritas y reductasas dependientes de nitrato y hematina. (Khachatourians, 1994; Ljung y Wadström, 2006; Corsetti y Valmorri, 2011).

1.5.2.1. Aplicaciones

Lactobacillus plantarum es clasificado como una cepa probiótica, (microorganismo vivo que en cantidades adecuada confiere un beneficio para la salud del anfitrión) por esta propiedad es incorporada en alimentos funcionales; tal es el ejemplo de un probiótico compuesto por *L. plantarum* otros *Lactobacillus*, *Streptococcus thermophilus* y *bifidobacterias*, es aplicado para reducir la toxicidad de algunas proteínas del gluten; también, *L. plantarum* en mezcla con *L. brevis* y *L. curvatus*, es utilizado para reducir el contenido de ácido fítico, y el *myo*-inositol hexafosfato en la masa del pan fermentada durante 12 h, también es responsable de los ácidos generados durante la maduración de los quesos (Consetti y Valmorri, 2011).

Otras aplicaciones son: la utilización de *L. plantarum* como inóculo para la extracción biológica de quitina (Cira *et al*, 2002), así como su aplicación para la producción de ácidos linoleicos conjugados y su uso en vacunas para administrar antígenos del sistema inmune de la mucosa. (Consetti y Valmorri, 2011)

1.5.3. *Lactobacillus brevis*

Lactobacillus brevis es heterofermentativo, posee actividad de catalasa para eliminar el peróxido de hidrógeno y también nitroreductasas; tiene un pH óptimo de crecimiento de 4.0 – 5.0 y metaboliza activamente sólo a estos valores bajos de pH. Para su desarrollo se utiliza preferentemente fructosa o sacarosa; la glucosa, fructosa o maltosa a menudo causan viscosidad por la producción de polisacáridos. (Roussos *et al*, 2003; Dworkin, *et al.*, 2006)

1.5.3.1. Aplicaciones

Lactobacillus brevis se utiliza por capacidad para inhibir el deterioro por microflora y patógenos con la finalidad de mejorar la seguridad y mantener la calidad de alimentos como quesos, productos fermentados con vegetales, en la fermentación maloláctica del vino y en productos horneados, así como microorganismo fermentativo en la acidificación de ensilajes de forraje verde para rumiantes. (Roussos *et al*, 2003; Calasso y Gobbetti, 2011; Teixeira, 2016).

Otra aplicación es la producción de 1,3-propanodiol, donde se utiliza *L. brevis* como biocatalizador en la fermentación de glicerol-glucosa; siendo una alternativa ambiental y económica al proceso de reacciones termoquímicas de derivados de los oleoquímicos (derivados del petróleo) (Vivek *et al*, 2016).

1.6. ENSILADOS DE PRODUCTOS MARINOS

El ensilado de pescado o productos marinos surge como una alternativa de procesamiento de los residuos de plantas pesqueras. El ensilado es un producto líquido pastoso obtenido de partes de pescado o residuos en medio ácido a pH < 4.5, logrando que la licuefacción se lleve a cabo por enzimas endógenas presentes en el pescado. El ácido ayuda a acelerar el proceso, ya que crea las condiciones adecuadas para que las enzimas ayuden a la digestión del hueso, evitando el desarrollo de bacterias (Parín y Zugarramurdi, 1997).

Existen varias técnicas para la obtención del ensilado, ya sea por medios químicos o biológicos (Figura 5). Este proceso consta principalmente de molienda, homogenización, envasado y almacenamiento.

1.6.1. Ensilado químico

El ensilado químico es elaborado por la adición de ácidos minerales, ácidos orgánicos o una mezcla de ellos. Algunos de los ácidos empleados son:

ácido fórmico, sulfúrico, clorhídrico, propiónico y la mezcla de acético - fórmico - fosfórico; fórmico - sulfúrico o propiónico - sulfúrico.

1.6.2. Ensilado biológico

El ensilado microbiano o biológico es desarrollado a partir de la adición de una fuente de carbono y un microorganismo a los residuos marinos. En este proceso el microorganismo utiliza la fuente de carbono (principalmente carbohidratos) para producir ácido láctico.

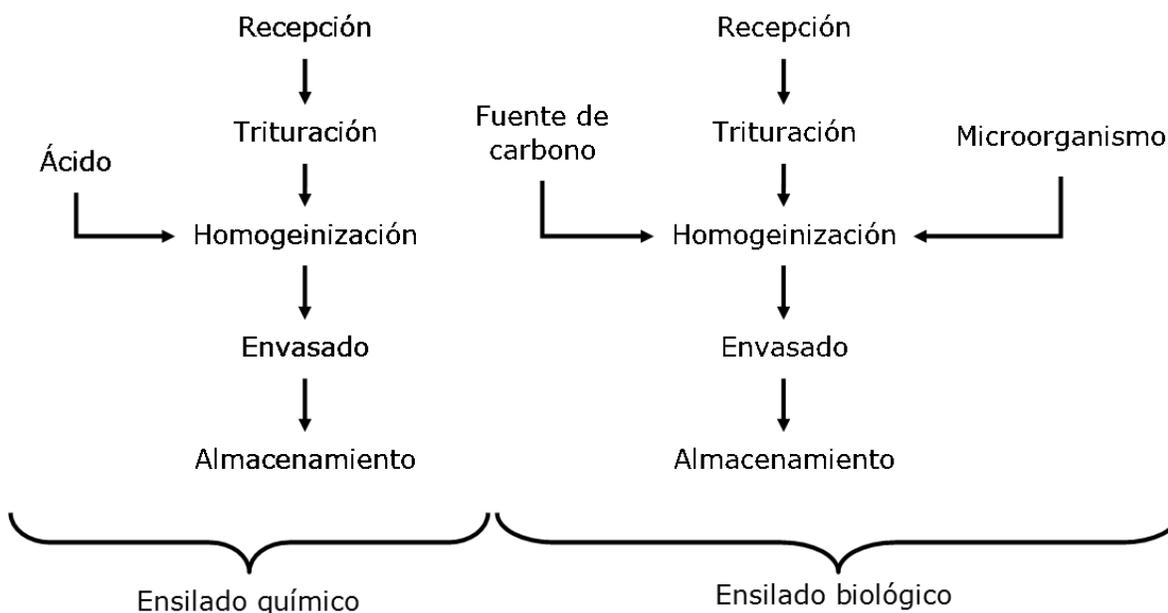


Figura 5. Proceso de ensilado químico y biológico.

1.7 PROTEINA E HIDROLIZADO PROTEICO

Las proteínas tienen diferentes funciones biológicas en plantas y animales; constituyen estructuras, actúan como enzimas e inhibidores, hormonas, anticuerpos, procesos de transporte de membrana, protección anticongelante y almacenamiento de nitrógeno.

En los alimentos las proteínas estructurales están presentes en los músculos, esqueletos y la piel de los animales, mientras que en la planta se encuentran como proteínas de almacenamiento. Durante el periodo de poscosecha o posmortem, las proteínas de almacenamiento realizan funciones bioquímicas y metabólicas, y las proteínas estructurales

permanecen inactivas y los inhibidores de enzimas contribuyen a los cambios en la estructura y las propiedades de los constituyentes nitrogenados, lípidos y azúcares. las proteínas de almacenamiento realizan funciones bioquímicas y metabólicas. (Voet y Voet, 2006)

La hidrólisis es el proceso en el que se produce la fragmentación de la proteína hasta aminoácidos, esto se logra con ácido o álcali, pero se prefiere la hidrólisis enzimática porque los métodos químicos generan mezclas racémicas de aminoácidos y puede generar sustancias tóxicas tales como lisino-alanina (Sikorski, 2002).

1.7.1. Aplicación de hidrolizados proteicos.

El uso tradicional de hidrolizados de proteína se ha limitado a un pequeño número de aplicaciones de alimentos y piensos, tal es el caso de su uso como sustitutos de proteína en la dieta de crecimiento de la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus* L) y de langostas de agua dulce (*Cherax quadricarinatus*), por su contenido de aminoácidos y péptidos cortos, la digestibilidad, asimilación de la proteína y baja concentración de factores anti-nutricionales; contribuyendo a la supervivencia, el crecimiento, la alimentación, el consumo, los costos y el aumento del rendimiento para los productores (Plascencia, *et al.*, 2002; Sikorski, 2002; Arredondo, *et al.*, 2013).

Una aplicación de hidrolizados como fuente de nutrientes en medios de cultivos ha sido reportada para el hidrolizado de proteína de soya, suero bovino y clara de huevo, que son ocupados por separado y en mezclas, como suplementos de medios para bifidobacterias y bacterias ácido lácticas. (de Castro y Sato 2014); en hidrolizados de productos marinos se han reportado los obtenidos de pescado *Merluccius hubssi*, y pulpo; para el primero se obtuvieron propiedades similares a los medios de cultivos convencionales, en el crecimiento de arqueas (*Halobacterium salinarum*) y eubacterias (*Escherichia coli* Gram (-), *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus epidermidis* Gram (+)); para el segundo, se sustituyó el

extracto de carne, peptona y tween 80 del MRS, con peptona marina proveniente de la hidrólisis enzimática del agua residual de la producción de pulpo. Con los hidrolizados se ha logrado igualar o superar el crecimiento de bacterias ácido lácticas; por lo tanto, es una fuente de nutrientes económica para medios de cultivos (Martone, *et al.*, 2004; Vázquez., y Murado., 2008).

1.8 MEDIO DE CULTIVO MAN ROGOSA Y SHARPE (MRS)

Las exigencias nutrimentales de los lactobacilos son cubiertas por el medio MRS, éste es utilizado para el mantenimiento y propagación de bacterias ácido lácticas (Man *et al.*, 1960). En particular, se ha empleado en la extracción biológica de quitina para la producción del cultivo iniciador (Shirai *et al.*, 2001; Cira *et al.*, 2002; Pacheco *et al.*, 2009; Flores-Albino *et al.*, 2012).

1.8.1. Componentes del MRS

Cada uno de los ingredientes tiene características y funciones específicas, por ejemplo, el magnesio y acetato son factores de inhibición de microorganismos diferentes a lactobacilos, el citrato es un inhibidor específico de Gram negativos, tween 80 provee ácidos grasos, y manganeso es un cofactor para la actividad enzimática. (König., *et al.*, 2009; Foerst., y Santivarangkna., 2015).

1.8.1.1. Extracto de carne y levadura

Los extractos son polvos obtenidos de concentrados acuosos obtenidos del calentamiento, evaporación y secado. Estos compuestos son ricos en proteínas de bajo peso molecular, factores de crecimiento, característica que los hace viables para usarse como fuentes de nitrógeno en los medios de cultivos.

El extracto de carne es obtenido de carne libre de tendones y grasa predigerida mediante enzimas, este producto está libre de carbohidratos, característica que lo hace adecuado para medios de cultivos destinados a realización de ensayos de fermentación. (Sagardoy y Mandolesi, 2004).

El extracto de levadura se obtiene mediante la extracción acuosa de levadura de cerveza autolisada, que posteriormente es filtrada para separar el contenido citoplasmático de los restos celulares. Este compuesto es rico oligómeros, entre los que destacan los aminoácidos, péptidos, vitamina B y los ácidos nucleicos de bajo peso molecular los cuales son solubles en agua (Sagardoy y Mandolesi, 2004; García *et al.*, 1993).

1.8.1.2 Peptona de caseína

Las peptonas son sustancias de origen proteico, partiendo del estado coloidal de las proteínas nativas, a partir de la modificación por fragmentación de estas últimas, en fracciones hidrolizables que no son coagulables. La peptona de caseína está conformada por péptidos resultantes de la proteólisis de la β -caseína por la proteasa nativa de la leche; se encuentran tres fracciones que con las γ -caseínas, son el conjunto de fragmentos liberados de la β -caseína (Sagardoy y Mandolesi, 2004; Hernández y Sastre, 1999).

1.8.1.3. Glucosa

La glucosa es un carbohidrato conformado por 6 átomos de carbono, presenta un peso molecular de 180.16 g/mol, y en agua presenta formas hemiacetálicas por la interacción de los grupos hidroxilos con los aldehídos de la misma molécula (Ege, 1998).

1.8.1.4. Tween 80

Tween 80, también llamado polisorbato 80 o momooleato de sorbitan polioxietileno; es un solubilizante no iónico compuesto por una mezcla de ésteres parciales del sorbitol y sus mono- y di-anhídridos junto con ácido oleico comercial comestible y condensado con, aproximadamente, 20 moles de óxido de etileno por mol de sorbitol y sus anhídridos. (Barros, 2009).

El tween 80 es utilizado en medios de cultivos para obtener un aumento o reducción de la actividad antimicrobiana, debido su interacción con

aceites esenciales favorece la solubilización micelar o la formación de complejos de aceite libres en medio acuoso. A mayor concentración aumenta la actividad antimicrobiana, debido a la permeabilidad de la célula bacteriana (Akhila, 2010).

1.8.1.5. Fosfato dipotásico

El Fosfato dipotásico es una sal con solubilidad de 170 g por cada 100 mL de agua a 25°C, en solución presenta pH de 9 y funciona como secuestrante y estabilizador, mejora la solubilidad coloidal de las proteínas y actúa como amortiguador contra la variación de pH (Igoe, 1996).

1.8.1.6. Acetato de sodio

El acetato de sodio es una sal derivada del ácido acético, su masa molar es de 82.03 g/mol, y en el medio MRS actúa con el tween 80 para obtener una acción selectiva para la inhibición de las bacterias Gram negativas y hongos (Alais y Lacasa, 1985).

1.8.1.7. Citrato de amonio

El citrato de amonio es una sal con solubilidad de 1 mg/mL de agua a 25°C, masa molar de 226.18 g/mol, y actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram negativas. (Pubchem, 2016; Britanialab, 2016)

1.8.1.8. Sulfato de magnesio

El sulfato de magnesio es una sal de masa molar de 120.37 g/mol, con solubilidad de 11.6 mg/mL de agua, es insoluble en acetona, y soluble en alcohol y glicerina, junto al tween 80, el manganeso y acetato, aporta cofactores y puede inhibir el desarrollo de algunos microorganismos. (Pubchem, 2016; Britanialab,2016)

1.8.1.9. Sulfato de manganeso

El manganeso de esta sal estimula el crecimiento de las estreptobacterias y las betabacterias, provoca un desplazamiento del equilibrio en un cultivo

láctico cuando se adicionan en pequeñas cantidades, volviendo al medio favorable para el grupo de los lactobacilos (Alais y Lacasa, 1985)

Justificación

La extracción biológica de quitina genera subproductos con alto valor proteico; con las condiciones de acidez y las proteasas que contiene esta fracción se da lugar a un hidrolizado de proteínas.

El hidrolizado de proteína puede ser refinado y utilizado como fuente de nitrógeno en el medio de cultivo en el que se desarrolla el lactobacilo que crea las condiciones de acidez para la remoción de minerales y proteína acompañantes de la quitina en los cefalotórax de camarón.

Con el hidrolizado proteico obtenido de las fracciones proteicas, se generarán menos residuos y se optimizará el proceso de la extracción biológica de quitina, para que así se pueda hacer la producción de quitina cruda a escala piloto.

Objetivos

Objetivo General

Aprovechar los subproductos de la extracción biológica de quitina como fuente de nitrógeno para desarrollar *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus plantarum* y la aplicación de éstos como inóculo en el escalamiento piloto de la extracción de quitina.

Objetivos específicos

- Obtener y caracterizar el hidrolizado proteico a partir del subproducto generado durante la extracción biológica de quitina.
- Aplicar el hidrolizado proteico como sustituto de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo MRS y evaluar el crecimiento de los *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus plantarum*.
- Aplicar como cultivo iniciador el lactobacilo con mayor tasa de crecimiento en el medio de cultivo formulado al escalamiento con 250 kg de cefalotórax de camarón.
- Caracterizar la quitina cruda obtenida durante y al final del escalamiento y obtener quitosano a partir de esta.

Hipótesis

El hidrolizado proteico obtenido a partir de la fracción proteica de la extracción biológica de quitina, será una fuente de nitrógeno para el desarrollo de *L. brevis* y *L. plantarum*; y será aplicable en el escalamiento de la extracción biológica de quitina con 250 kg de cefalotórax.

Capítulo 2

ESTRATEGIA

EXPERIMENTAL

Y

METODOLOGÍA

2.0 Estrategia de trabajo

La estrategia experimental consistió en las siguientes etapas:

- Aprovechamiento de la fracción rica en proteína y obtención del hidrolizado proteico.
- Sustitución de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo MRS por hidrolizado proteico de camarón (HPC) y la evaluación de crecimiento de *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus plantarum* en el medio de cultivo con el HPC (MRS-HPC)
- Escalamiento de extracción biológica de quitina a 250 kg (MRS-HPC 250), con el lactobacilo de mejor crecimiento en el MRS-HPC
- Producción de quitosano a partir de la quitina biológica obtenida del escalamiento
- Caracterización de los productos obtenidos durante cada proceso.

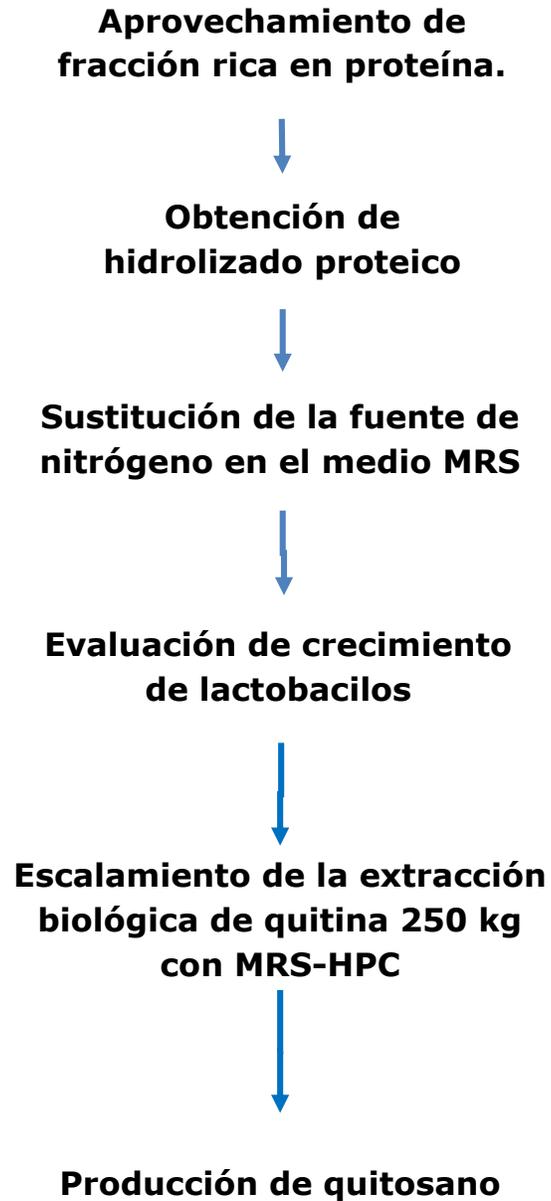


Diagrama general de la estrategia de trabajo para la producción de la fracción rica en proteína e hidrolizados proteicos; así como la producción biológica de quitina.

2.1 Aprovechamiento de la fracción rica en proteína y obtención de hidrolizados proteicos.

La FP fue obtenida como subproducto del proceso de extracción biológica de quitina, donde la FP fue separada de la quitina con bastidores de apertura 40 y 100 (Figura 6).



Figura 6. Filtración de la fracción líquida del proceso de extracción biológica de quitina, en bastidores de apertura 40 y 100 para obtener la fracción rica en proteína.

La FP fue refrigerada con la finalidad de favorecer la hidrólisis de proteína con las proteasas generadas por *L. brevis*; la presencia de ácido láctico (producto de la fermentación de los azúcares en el ensilado) y la fuerza iónica producida por los minerales removidos de los exoesqueletos de camarón.

Posteriormente la FP fue sometida a centrifugación (Centrifuga Beckman Coulter en un rotor J2-MC) hasta que se obtuvieron sobrenadantes y pellets (Figura 7) bajo las condiciones establecidas en la Figura 8.

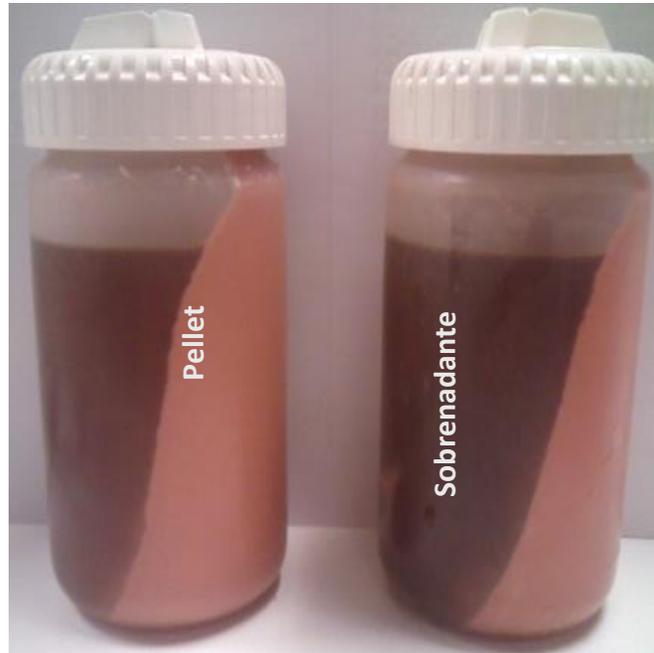


Figura 7. Pellet y sobrenadante, resultado de la centrifugación de la fracción rica en proteína en Centrifuga Beckman Coulter en un rotor J2-MC, a 14,000 rpm durante 20 minutos a 4°C.

Los sobrenadantes fueron sometidos a neutralización con una solución de NaOH 2N (Meyer, 97% de pureza). Los pellets se disolvieron en agua destilada y fueron tamizados en malla Tyler del No. 20 y 100, con la finalidad de separar los conglomerados de grasa y minerales del proceso de fermentación ácido láctica de los desperdicios de camarón.

Finalmente, el hidrolizado proteico (HP) fue obtenido con la mezcla de los pellets resultantes de la centrifugación.

Las FP y HP se sometieron a análisis químico proximal (AQP), adicionalmente se midió el potencial de hidrógeno (pH) y acidez total titulable (ATT) así como grado de hidrólisis (GH), Proteína soluble por Lowry-Peterson, asimismo, se realizó un análisis electroforético con SDS-PAGE, Tricina-SDS-PAGE y cromatografía de exclusión molecular para determinar la presencia y el peso molecular de los péptidos y proteínas.

2.2. Sustitución de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo MRS y la evaluación de crecimiento *L. brevis* y *L. plantarum*.

2.2.1. Sustitución de la fuente de nitrógeno

La sustitución de la fuente de nitrógeno en el medio MRS se realizó mediante el cálculo de la cantidad necesaria de HPC (Anexo I) para obtener equivalencia de nitrógeno y asegurar la presencia de factores de crecimiento necesarios para los lactobacilos.

2.2.2 Evaluación de crecimiento

La siembra inicial se realizó a partir de las cepas de *L. brevis* y *L. plantarum* conservadas en glicerol, estas fueron reactivadas medio MRS e incubadas durante 72 horas a 30°C, para posteriormente resembrar en MRS e incubar a 30°C, 24 horas previas al inicio de las cinéticas de crecimiento.

La evaluación del crecimiento bacteriano se realizó con cinéticas que consistieron en inocular una serie de tubos con medio MRS y MRS-HPC, éstos fueron divididos en subgrupos, que se incubaron a 30°C durante tiempos diferentes: 0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 horas, cumplido el tiempo de incubación se cuantificaron las células viables por dilución y cuenta en placa, reportando las placas donde hubo crecimiento en el rango de 30 a 300 colonias. (Prado *et al.*, 2013).

Se utilizó el modelo matemático de crecimiento poblacional para ajustar los datos experimentales de cuenta de bacterias viables (Ecuación 1)

$$X_t = X_0^{-\mu t} \dots\dots(1)$$

X_0 =Número inicial de bacterias

X_t =Número final de bacterias

μ =tasa de crecimiento

t =tiempo

2.3. Escalamiento de extracción biológica de quitina a 250 kg.

La extracción biológica de quitina se llevó a cabo con 250 kg de desperdicio de camarón (DC), 10 % p/p de azúcar estándar y 10% v/p de inóculo de *L. brevis* desarrollado en MRS-HPC, a 30°C, este escalamiento constó de la preparación de inóculo, acondicionamiento de la materia prima e inició de la fermentación, muestreo, y caracterización de muestras y quitina final.

2.3.1. Preparación del inóculo

EL desarrollo del inóculo de *L. brevis* consistió en la preparación del medio de cultivo, a partir de la solubilización del HPC y las sales en $\frac{3}{4}$ partes del volumen de agua y en el $\frac{1}{4}$ restante se disolvió la glucosa, se esterilizaron por separado a 121°C, 1 atm por 15 min y se dejó enfriar hasta 30°C (Figura 9), el medio fue inoculado con 1 L de pre-inóculo de *L. brevis* cultivado a 30°C durante 24 h. El medio inoculado se incubó a 30°C las 24 horas previas al inicio de la fermentación. En todos los cultivos se realizó tinción Gram para descartar contaminación de la cepa.



Figura 9. HPC, sales y glucosa del medio MRS, esterilizados a 121°C, 1 atm, 15 min; e inóculo de *L. brevis* incubado a 30°C durante 24 h. (Previos a la preparación del inóculo).

2.3.2. Acondicionamiento de la materia prima e inicio de la fermentación.

El acondicionamiento del DC se llevó a cabo mediante la descongelación de los 250 kg, este proceso fue dentro del reactor y se estabilizó a 30°C, se agregó el azúcar y el reactor mantuvo agitación durante 5 min para homogeneizar la materia prima; posteriormente se inoculó el reactor con 10% v/p de *L. brevis* (Figura 10), se homogeneizó y se tomó la muestra correspondiente al tiempo cero.



Figura 10. Inoculación del reactor con el 10% v/p de L. brevis, en 250 kg de camarón con 10% p/p de azúcar, con temperatura de 30°C.

2.3.3. Muestreo y tratamiento de muestras

El muestreo se realizó cada 6 horas durante las primeras 60 h, y posteriormente se tomaron cada 24 h hasta las 92 h.

Las muestras fueron equivalentes al 1% y el tratamiento consistió en medir temperatura, pH y la separación de una muestra de 10 g para análisis microbiológico, después, se filtró para separar la fase sólida de la líquida; la fase sólida fue distribuida en charolas de aluminio y sometida a secado a 40°C en estufa, mientras que la fase líquida fue congelada a -20°C para posterior análisis.

2.3.4. Análisis de muestras y quitina final

El análisis de muestras se llevó a cabo de forma general con análisis microbiológico, mientras que para ambas fases se realizaron análisis para cambios fisicoquímicos específicos. En la fase líquida se analizó ATT, azúcares solubles totales por Fenol-Sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956), análisis de azúcares y ácidos orgánicos por HPLC. Para la fase sólida se realizó AQP, y la quitina final se caracterizó con AQP, espectroscopia de absorción en infrarrojo, resonancia magnética nuclear de protón, viscosimetría para determinación de pureza, grado de acetilación, masa molecular, micrografía electrónica de barrido y microanálisis de energía dispersiva de rayos x.

2.4. Obtención de quitosano

La obtención de quitosano fue a partir del proceso alcalino, en el que se utilizó NaOH al 50% de pureza, la relación de NaOH y quitina fue 15:1, respectivamente. La quitina fue sumergida en el NaOH a 100°C durante 4 h, después fue filtrado, y enjuagado con agua acidificada a pH 5 con HCl al 36.5% de pureza, hasta la neutralización del NaOH, posteriormente fue sometido a secado a temperatura ambiente.

La caracterización consistió en AQP, espectroscopia de absorción en infrarrojo, resonancia magnética nuclear de protón, viscosimetría para determinación de pureza, grado de acetilación y masa molecular.

2.5 Técnicas de caracterización química y estructural.

2.5.1. Análisis químico proximal (AQP)

La caracterización química proximal de las muestras fue determinada mediante las metodologías descritas en el A.O.A.C., 1990 con la numeración correspondiente a:

- Humedad: A.O.A.C. 930.15
- Cenizas: A.O.A.C. 923.03
- Grasa: A.O.A.C. 945.16

- Proteína: A.O.A.C. 990.03

2.5.2. Acidez total titulable (ATT)

La acidez total titulable fue cuantificada por titulación con hidróxido de sodio y expresada como ácido láctico, bajo la metodología A.O.A.C. 947.05 (A.O.A.C., 1990).

2.5.3. Determinación de azúcares solubles totales

Los azúcares solubles totales fueron cuantificados bajo principio colorimétrico diseñado por Dubois et al, (1956).

Curva patrón y tratamiento de muestra en anexo II

2.5.4. Proteína soluble

La proteína soluble fue determinada por el método de Folin-Ciocalteu modificado por Peterson en 1977.

Curva patrón y tratamiento de muestra en anexo III

2.5.5. Determinación de azúcares y ácidos orgánicos por HPLC

Las muestras fueron sometidas a cromatografía líquida de alta resolución (HPLC Agilent Technologies 1260 infinity), con una columna H1 para ácidos orgánicos (Aminex HPX-87H) con fase móvil de H₂SO₄(Meyer, 98% de pureza) 5 mM, flujo 0.6 ml/min, 40°C y detector de índice de refracción.

Tratamiento de muestras Anexo III.

2.5.6. Cromatografía de exclusión de peso molecular

En este análisis se utilizó el cromatógrafo de líquidos de mediana presión (FPLC) (ÄKTA pure 25M, Uppsala, Suecia) con una columna Hiprep 26/60 Sephacryl S100HR (GE Healthcare Life Sciences Corporation, Piscataway, New Jersey, USA) la cual, fue estabilizada con un buffer de TRIS-HCl 0.5 M NaCl 0.15 M, pH 7.8, bajo condiciones de flujo de 1.3 mL/min y volumen equivalente a 320 mL.

Preparación del Buffer de corrida, cromatograma y curva patrón del estándar (Gel Filtration Standard de BIO RAD) en ANEXO IV.

2.5.7. Análisis electroforético

Las muestras fueron analizadas en geles de SDS-PAGE y Ticina-SDS-PAGE (Laemmli., 1970; Schägger y von Jagow., 1987).

Tratamiento de muestras y curva patrón en Anexo V.

2.5.8. Grado de Hidrolisis

La determinación del grado de hidrólisis de las proteínas se realizó con ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) bajo la metodología desarrollada por Adler-Nissen (1979).

Curva Patrón en Anexo VI.

2.5.9. Microscopia electrónica de barrido (MEB) acoplado con Microanálisis de Energía Dispersiva de Rayos X (EDS)

Las imágenes obtenidas por MEB de las hojuelas de quitina a diferentes tiempos del proceso, se observaron en un microscopio JEOL JSM-7800F equipado con un sistema de microanálisis por dispersión de energía de rayos-X.

2.5.10. Determinación de solubles

El porcentaje de solubles en el quitosano fue determinado a partir de la metodología reportada por Shrinivas and Stevens, (2005).

Tratamiento de muestra Anexo VII

2.5.11. Peso molecular

El peso molecular fue determinado por viscosidad intrínseca. Los parámetros se determinaron con la ayuda de la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada y las constantes determinadas a y k para el disolvente empleado. (Shrinivas and Stevens, 2005; Pacheco, 2007; Mao et al., 2007).

$$[\eta] = KM_v^\alpha \dots\dots\dots(2)$$

$$K = 1.38 \times 10^{-5} \text{ Lg}^{-1}$$

M=masa molar

$$\alpha = 0.85$$

Tratamiento de muestra Anexo VIII

2.5.12. Grado de acetilación por $^1\text{HRMN}$.

El grado de acetilación fue calculado por la desaparición de la señal del protón metil del residuo de (1-4)-2-acetoamido-2-desoxi-beta-D-glucano con la referencia de los protones H-2 al H-6 de la estructura completa (Hirai, *et al*, 1991; Pacheco, *et al*, 2008).

Tratamiento de muestra Anexo IX.

Capítulo 3

RESULTADOS Y

ANÁLISIS DE

RESULTADOS

3.1. Producción de la fracción rica en proteína y obtención de hidrolizados proteicos.

3.1.1. Caracterización fisicoquímica de las fracciones proteicas e hidrolizados proteicos.

La Tabla 3 presenta la caracterización fisicoquímica de dos lotes de fracciones proteicas obtenidas como subproducto de la extracción biológica de quitina.

Tabla 3. Caracterización fisicoquímica de dos lotes de fracciones proteicas.

	FP1	FP2
Humedad (%)	74.46 ± 0.24	74.48 ± 0.49
Proteína (%)	61.55 ± 0.64	64.30 ± 0.17
Cenizas (%)	19.38 ± 1.20	18.90 ± 0.16
Grasa (%)	14.70 ± 0.02	2.15 ± 0.11
GH (%)	37.51 ± 0.28	36.02 ± 0.30
pH	4.80 ± 0.04	4.83 ± 0.04
ATT (mmol de ácido láctico/g)	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.02
Proteína soluble (mg/g)	125.16 ± 7.49	106.98 ± 0.02

El porcentaje de proteína en las FP fueron comparados con los resultados reportados por Dey & Dora en 2014, en cuyas fracciones proteicas obtenidas con proteasas microbianas Protamex (*Bacillus sp.*) y Neutraxe (*Bacillus amyloliquefaciens*), presentaron 65.8 % y 60.2% de proteína cruda, respectivamente, mientras que los HP obtenidos con la actividad enzimática y proteolítica de *Lactobacillus brevis* durante la extracción biológica de quitina (Shirai *et al.*, 2001; y Pacheco *et al.*, 2009), se obtuvieron el 61.55% y 64.30%.

Bajo el principio de fragmentación de la proteína por la actividad enzimática, proteolítica y la modificación del pH por acidez (Sikorski, 2002; Herrera *et al.*, 2003), se determinó el grado de hidrólisis (GH) con porcentajes de 37.51 y 36.02, resultados que aunados a la proteína

soluble corroboró que las proteínas nativas del camarón fueron modificadas y por lo tanto se generaron y expusieron fragmentos con grupos funcionales hidrofílicos, las cuales atribuyeron al aumento de este parámetro.

3.1.2 Caracterización fisicoquímica del hidrolizado proteico

La Tabla 4 presenta la caracterización fisicoquímica de dos lotes de hidrolizados proteicos obtenidos como subproducto de la extracción biológica de quitina.

Tabla 4. Caracterización fisicoquímica de dos lotes de hidrolizados proteicos obtenidos a partir del refinamiento de las fracciones proteicas.

	HP1	HP2
Rendimiento másico (%)	19.97	19.41
Humedad (%)	72.52 ± 0.17	74.26 ± 0.04
Proteína (%)	46.33 ± 0.25	45.13 ± 0.23
Cenizas (%)	32.95 ± 0.04	41.31 ± 0.27
Grasa (%)	5.10 ± 0.01	1.11 ± 0.05
pH	6.58 ± 0.02	6.60 ± 0.02
ATT (mmol ácido láctico/g)	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.00
Proteína soluble (mg/g)	87.70 ± 0.01	81.65 ± 0.60

Con base en los valores de la FP el pH aumento y la ATT disminuyo, consecuencia de la neutralización del ácido con la solución de NaOH, este proceso creó un equilibrio simultaneo, donde este se desplazó hacia la forma de lactato de calcio por la neutralización del ácido, dando lugar a precipitados que se concentraron en los pellets como minerales y esto provocó mayor porcentaje en los HP (Rao *et al*, 2000).

La concentración de proteína disminuyó respecto a la FP debido a la proteína solubilizada en los sobrenadantes (Figura 11); para cuantificar la cantidad de proteína perdida, se determinó la proteína soluble de las fracciones ricas en proteína, sobrenadantes e hidrolizado.

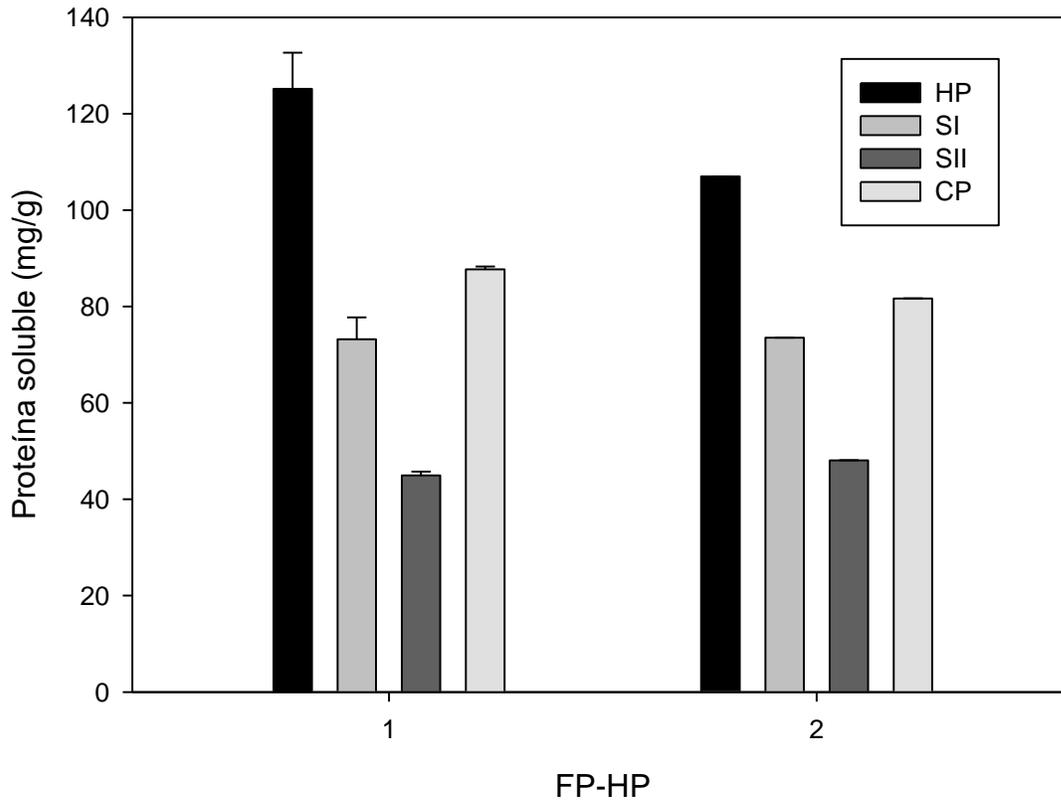


Figura 11. Proteína soluble la fracción rica en proteína (FP), en los sobrenadantes I Y II (SI y SII), y en los hidrolizados proteicos (HP) de las pruebas piloto 1 y 2.

Se observó que la proteína perdida en los sobrenadantes (SI y SII), fue de 73.20 hasta 44 mg/g, porción relevante para la concentración inicial en las FP que fue mayor a 100 mg/g, ésta pérdida se justificó por el porcentaje de hidrólisis, y la fuerza iónica (consecuencia de los iones presentes en los sobrenadantes), ya que éstas propiedades aumentan la solubilidad de las proteínas (Voet., 2004).

La Tabla 5 presenta la caracterización fisicoquímica del hidrolizado proteico de camarón (HPC), obtenido de la mezcla de los lotes de HP1 y HP2.

Tabla 5. Caracterización fisicoquímica del hidrolizado proteico de camarón (HPC).

	HPC
pH	6.59 ± 0.02
ATT (mmol/g)	0.03 ± 0.01
Humedad (%)	73.59 ± 0.09
Proteína (%)	45.59 ± 0.24
Cenizas (%)	38.11 ± 0.18
Grasa (%)	2.64 ± 0.04
Proteína soluble (mg/g)	83.97 ± 0.25
Nitrógeno total (mmol/g)	5.21 ± 0.03

3.1.3. Determinación del peso molecular de los compuestos del HPC.

Los pesos moleculares determinados por cromatografía líquida (Figura 12) constaron de los 117 Da hasta 400 kDa, que en conjunto de los obtenidos por electroforesis de 8 a 219 kDa (Figura 13) concuerdan con reportes de proteínas, péptidos y aminoácidos; así como, complejos de carotenoides con proteínas y enzimas digestivas (Lemos *et al*, 2000; Armenta-López, *et al*, 2002; Nge, *et al*, 2006).

Los compuestos presentes en el HPC presentaron pesos moleculares en el intervalo reportado para las fuentes convencionales de nitrógeno en el MRS, porque la peptona de caseína presenta valores desde 10 kDa, el extracto *de levadura* de 2 a 500 kDa y el extracto de carne de 5 a 500 kDa. (Gil, 2010). Por lo tanto, el HPC fue una fuente compleja para ser el sustituto de las fuentes de nitrógeno en el MRS.

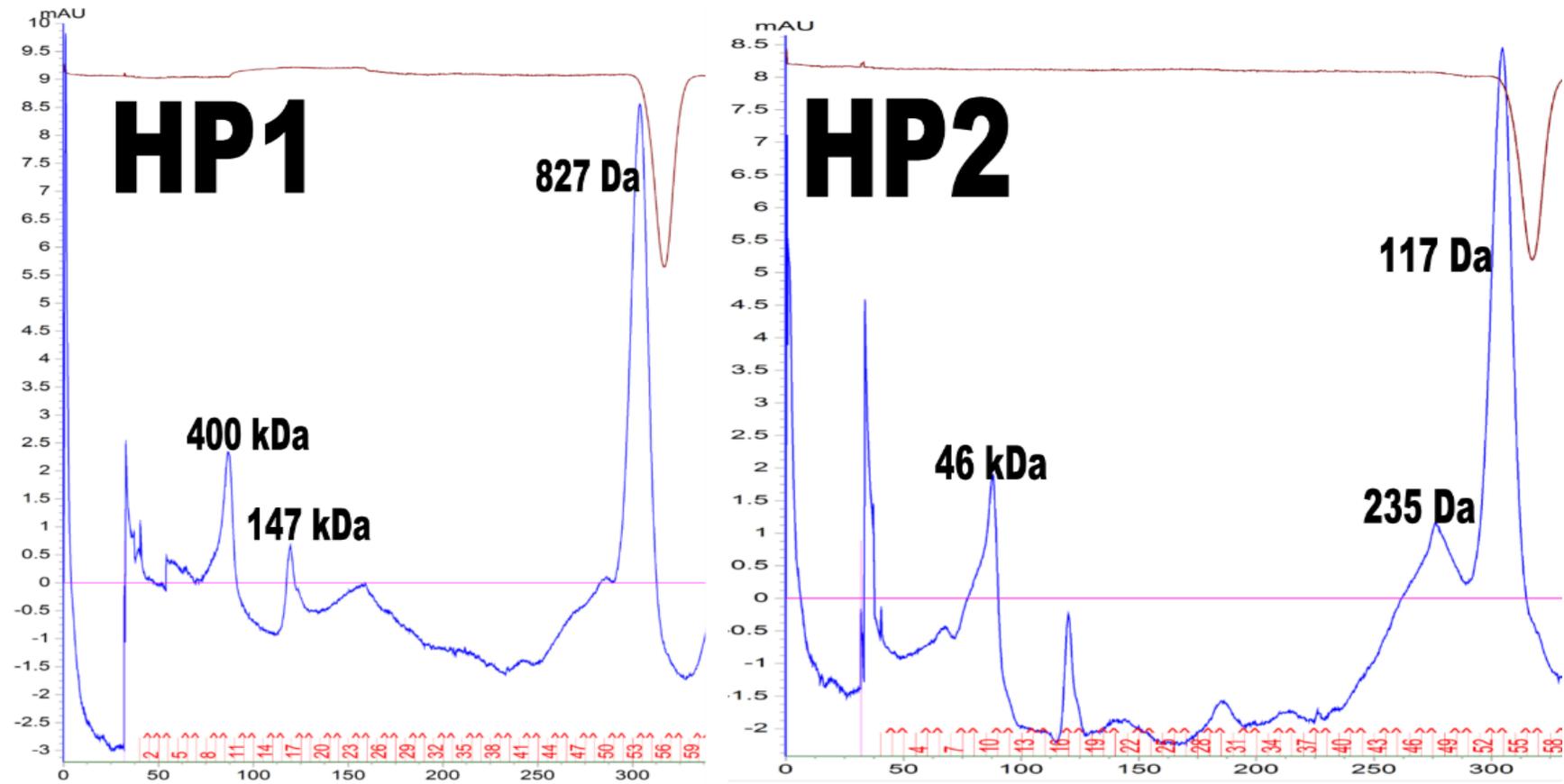


Figura 12. Cromatogramas de los hidrolizados proteicos, obtenidos en el cromatógrafo de líquidos de mediana presión (FPLC).

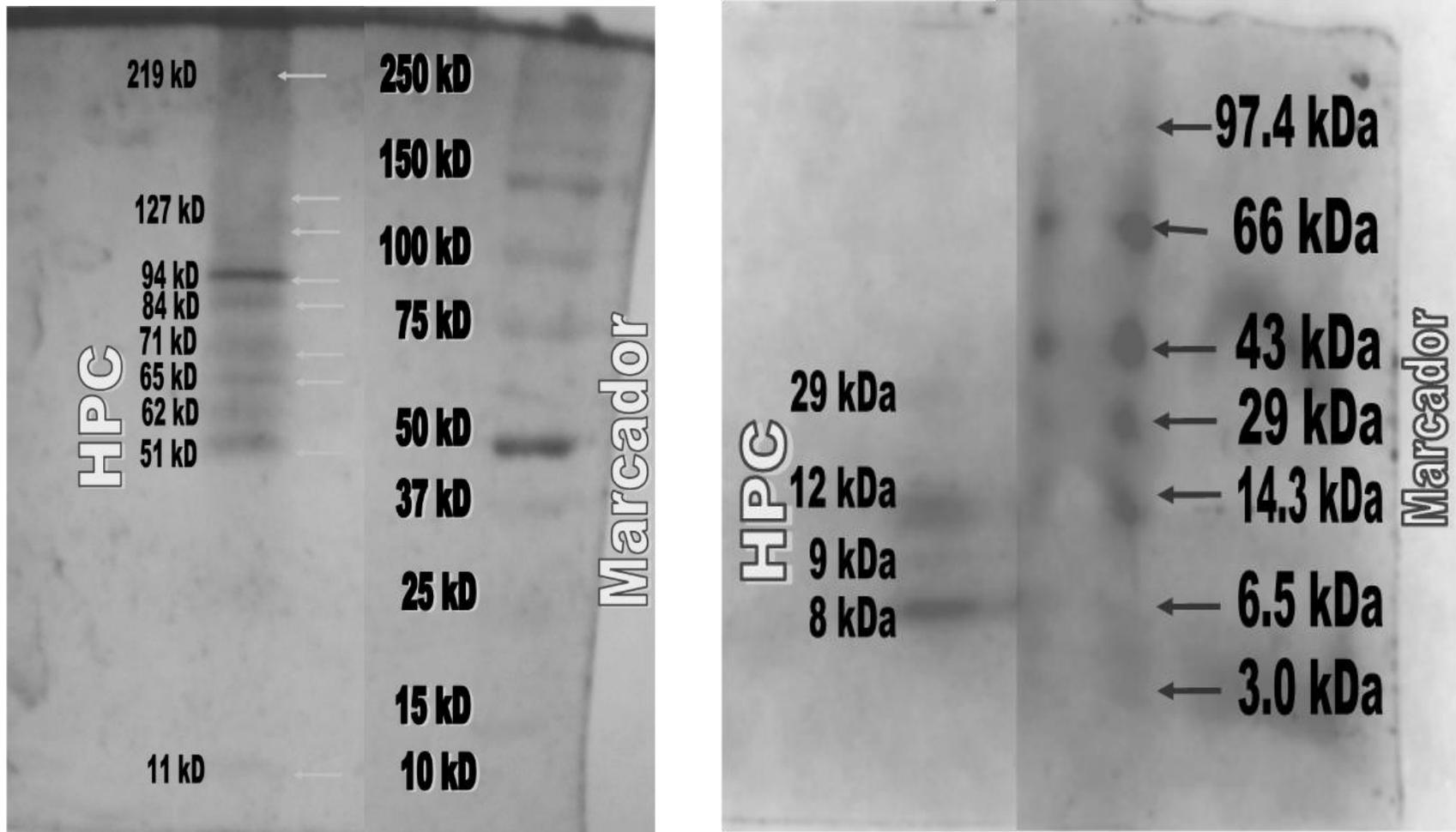


Figura 13. Electroforetogramas de los hidrolizados proteicos de camarón SDS-Page (Izquierda) y Tricina SDS-Page (Derecha).

3.2 Formulación del medio de cultivo y evaluación de crecimiento de lactobacilos.

3.2.1. Formulación del medio de cultivo

La formulación del medio de cultivo se realizó sustituyendo el 35.4%, de nitrógeno que constituye la fuente de este elemento en medio MRS, equivalente a 210.9 mM, esta concentración se obtuvo con 40.48 g de HPC en peso seco, logrando sustituir las fuentes de nitrógeno y con ello reformular el medio como se describe en la Tabla 6.

Tabla 6. Composición general del medio de cultivo MRS con la mezcla de hidrolizados proteico de camarón (MRS-HPC) como sustituto de proteína.

MRS-HPC	
Nutriente	g/L
HPC	40.48
Glucosa	20.00
Tween 80	1.00
Fosfato dipotásico	2.00
Acetato de sodio	5.00
Citrato de amonio	2.00
Sulfato de magnesio	0.10
Sulfato de manganeso	0.05

3.2.2. Evaluación de crecimiento

La figura 14 describe la cinética de crecimiento de *L. brevis* y *L. plantarum*, comparando el crecimiento en medio MRS, contra el medio MRS-HPC.

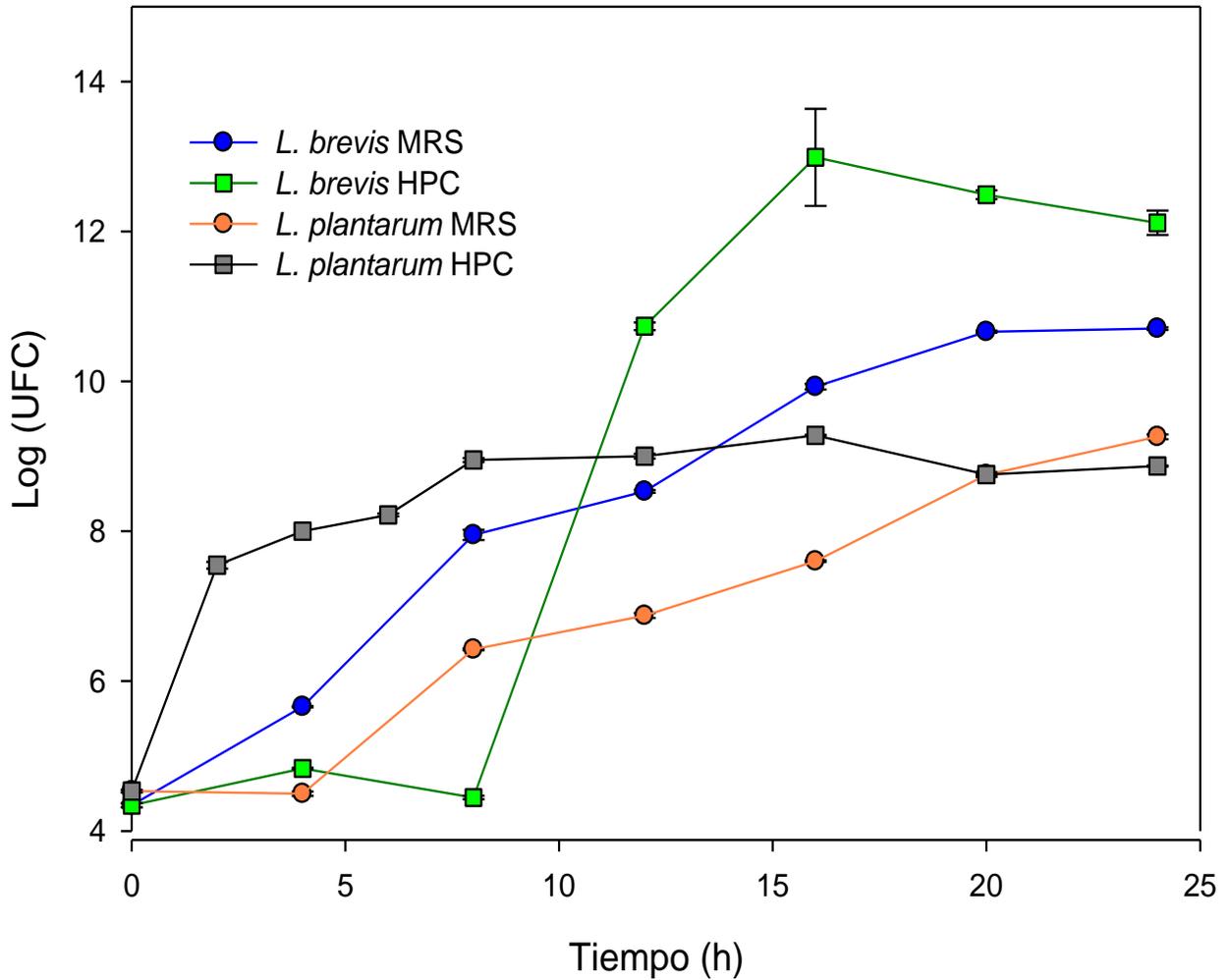


Figura 14. Curvas de crecimiento de *L. brevis* y *L. plantarum* en MRS y MRS-HPC, durante 24 horas, incubados a 30°C.

Para ajustar los datos experimentales de la cuenta de bacterias viables, se determinó la tasa de crecimiento y cuenta máxima de lactobacilos (Tabla 7) mediante el modelo de crecimiento (Anexo X y XI).

Tabla 7. Tasa de crecimiento a 30°C para L. brevis y L. plantarum en MRS y MRS-HPC.

Microorganismo	Medio de cultivo	Tasa de crecimiento (h⁻¹)	R²
<i>Lactobacillus brevis</i>	MRS	0.0314	0.9368
	MRS-HPC	0.0522	0.9256
<i>Lactobacillus plantarum</i>	MRS	0.0365	0.9314
	MRS-HPC	0.0302	0.8095

Lactobacillus brevis presentó mayor crecimiento en MRS hasta las 8 h, después de este punto se observó mayor crecimiento en el MRS-HPC, con los resultados obtenidos de las tasas de crecimiento de *L. brevis*, no presentó diferencia significativa entre los medios, por lo tanto, se concluyó que el hidrolizado de proteína de camarón es adecuado como sustituto de nitrógeno en el medio MRS para su desarrollo.

En el caso de *L. plantarum*, obtuvo mayor tasa de crecimiento en el MRS; con base en el análisis mediante el modelo de crecimiento la R², presenta un valor del 80.95% de confianza que aunado al análisis de varianza en el programa IBM SPSS Statistics 19 (Anexo XII), no se presentó diferencia significativa, por lo tanto, fue adecuado para usarse como sustituto de la fuente de nitrógeno en el medio MRS.

El crecimiento de los lactobacilos se justificó por el consumo de nutrientes, y la producción de ácido láctico que favorece el pH de crecimiento de los lactobacilos, porque con las condiciones de acidez se favoreció la hidrólisis de la proteína, dejándola disponible para los microorganismos (Porro et al., 1999; Sikorski, 2002; Li et al., 2006).

3.3 Escalamiento de extracción biológica de quitina con *L. brevis* desarrollado en MRS-HPC a 250 kg de DC (MRS-HPC 250).

El MRS-HPC se aplicó en el desarrollo del inóculo para el proceso de escalamiento de extracción de quitina al 10% de *L. brevis*, en 250 kg de DC, obteniendo un rendimiento másico de quitina del 11.67 % p/p.

3.3.1. Cuantificación de microorganismos y ácidos orgánicos

Uno de los parámetros cuantificables para determinar la extracción es el cambio de pH (Figura 15).

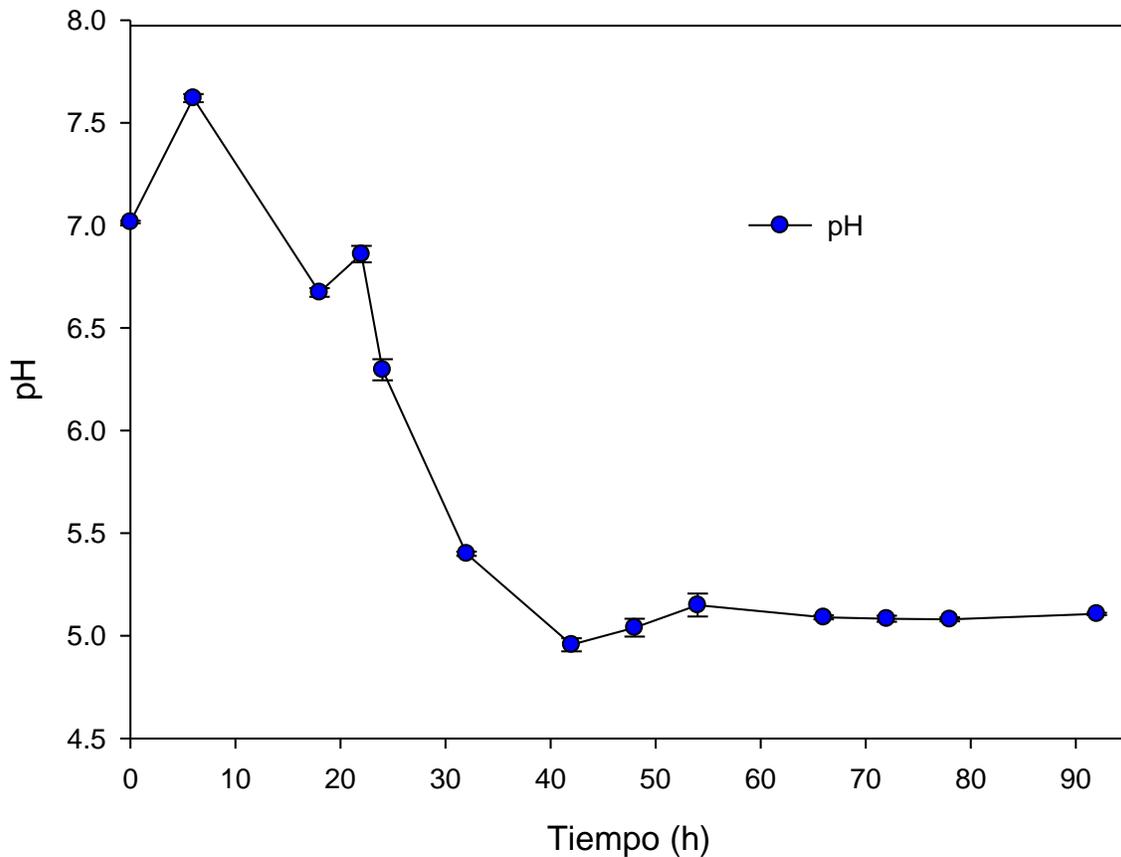


Figura 15. Cambio de pH, durante la extracción biológica de quitina partir de 250 kg de DP a 30°C con 10% p/p de inóculo *L. brevis* desarrollado en MRS-HPC, y 10% p/p de azúcar.

Para el proceso de MRS-HPC se dio fin a la fermentación a las 92 h debido a que a las 40 h se presentó un aumento de pH, y después de las 48 h no hubo cambio significativo en dicho valor; este comportamiento ha sido reportado en fermentación de crustáceos, como consecuencia del calcio solubilizado, ya que dicho elemento presenta capacidad amortiguadora (Zakaria, *et al*, 1998).

Durante la fermentación, el mayor descenso de pH y azúcares fue observado durante las primeras 40 h. La concentración de ácidos orgánicos obtenida fue de 0.37 mmol/g, menor a la reportada por Cira *et al* en 2002, de 0.46 mmol/g, después de las 96 h.

El aumento de ácido durante la fermentación fue consecuencia del consumo de azúcar por los microorganismos (Figura 16), se observó que durante las primeras 20 h los microorganismos presentaron la etapa exponencial del crecimiento obteniendo una tasa de crecimiento 0.0101 h^{-1} , es durante este tiempo cuando se da el mayor consumo de azúcar y producción de ácido.

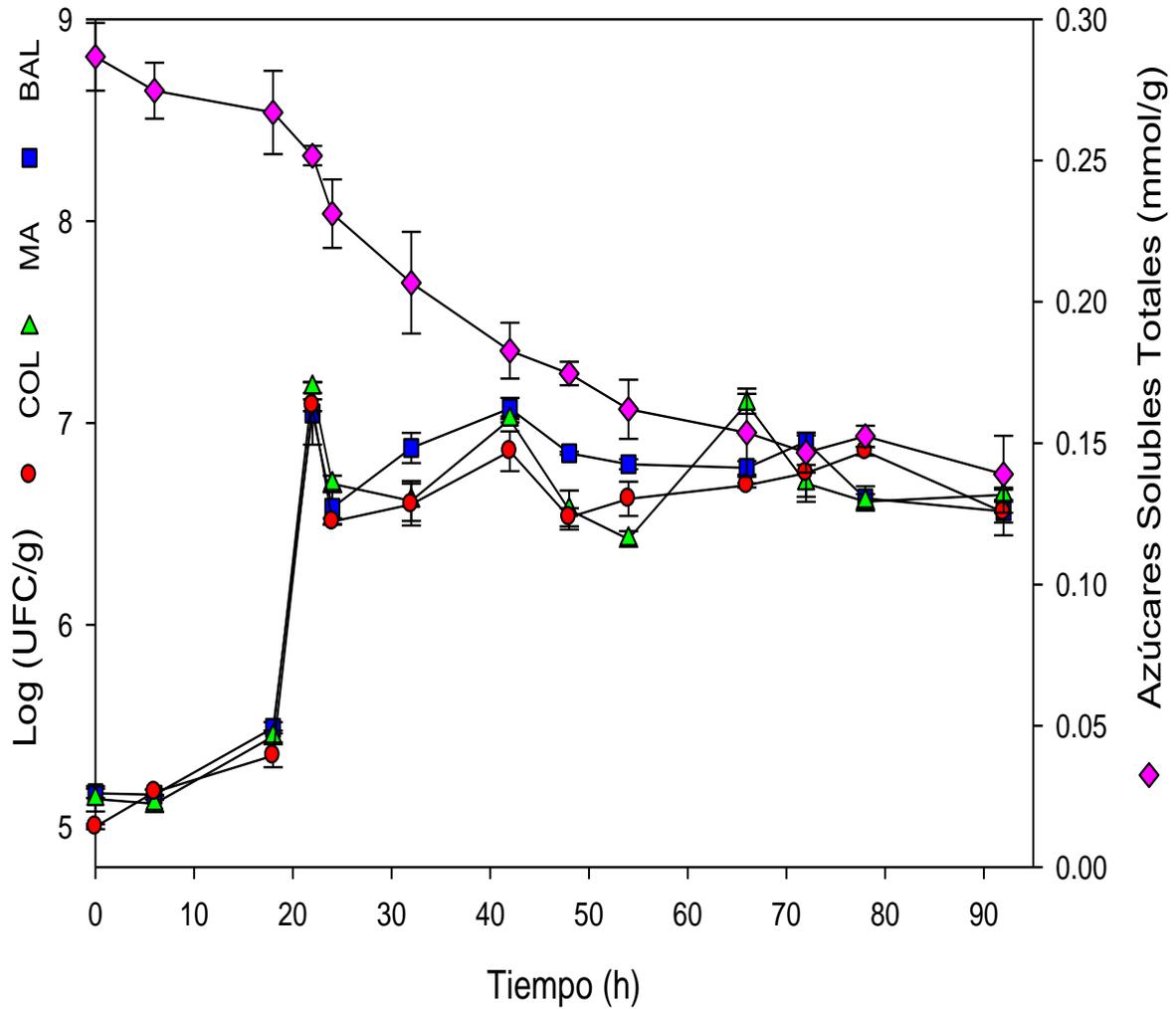


Figura 16. Bacterias ácido lácticas (BAL), mesófilos aerobios (MA), coliformes (COL) y azúcares solubles totales, durante la extracción biológica de quitina partir de 250 kg de DP a 30°C con 10% p/p de inóculo *L. brevis* desarrollado en MRS-HPC, y 10% p/p de azúcar.

La caracterización de los azúcares y ácidos orgánicos presentes en el filtrado de muestra final de la extracción biológica de quitina (Tabla 8), tuvo presencia de los ácidos generados del proceso de la fermentación heteroláctica de la glucosa (ácido láctico, ácido acético), así como ácidos orgánicos productos de las vías aerobias como la vía de Entner-Doudoroff

y el ciclo del ácido tricarboxílico (Montie, *et al*, 1998 y Percival, *et al.*, 2004).

Tabla 8. Azúcares, etanol y ácidos orgánicos, determinados por cromatografía líquida de alta resolución en el filtrado de la muestra final de MRS-HPC 250.

	MRS-HPC 250 (92 h)
Sacarosa (mmol/g)	ND
Glucosa (mmol/g)	0.0090 ± 0.0010
Fructosa (mmol/g)	0.0055 ± 0.0002
Ácido láctico (mmol/g)	0.3146 ± 0.0022
Ácido acético (mmol/g)	0.0534 ± 0.0004
Etanol (mmol/g)	ND
Ácido oxálico (mmol/g)	0.0001 ± 0.0000
Ácido cítrico (mmol/g)	0.0437 ± 0.0003
Ácido succínico (mmol/g)	0.0018 ± 0.000

ND No detectado

En el tiempo final, la concentración de sacarosa no fue detectable, pero aún hubo presencia de glucosa y fructosa, estos azúcares son consecuencia de la hidrólisis de la sacarosa, si la fermentación hubiese continuado por la vía homoláctica, por relación estequiométrica se hubiera dado lugar a un aumento de 0.0724 mmol en la concentración del ácido láctico.

3.3.2. Desproteínización y Desmineralización

En la Figura 17 se presenta el proceso de remoción de proteína durante la fermentación, se observó que el valor de DP aumentó con respecto al tiempo como consecuencia de la producción de enzimas proteolíticas y

quitinolíticas (Shirai *et al.*, 2001; Pacheco *et al.*, 2009) por *L. brevis* donde se obtuvo un porcentaje final de 66.35 ± 0.33 de desproteínización.

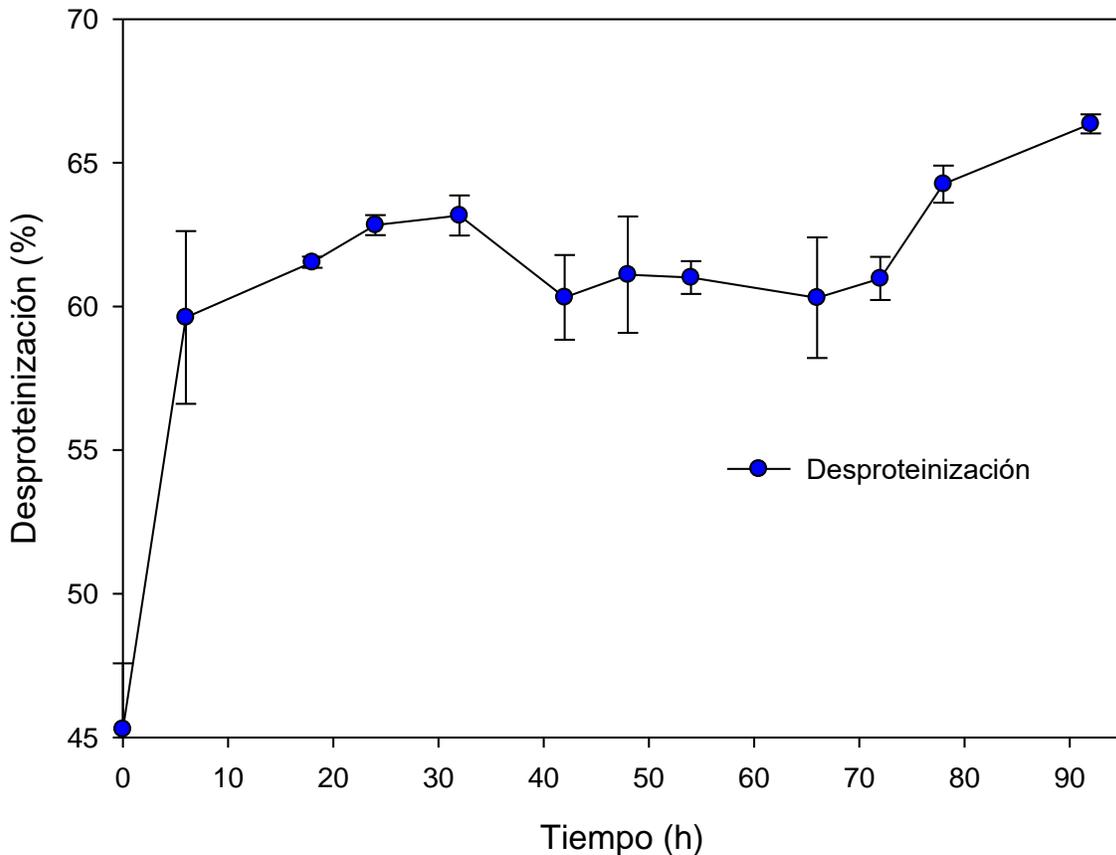


Figura 17. Proceso de desproteínización durante la extracción biológica de quitina partir de 250 kg de DP a 30°C con 10% p/p de inóculo *L.brevis* desarrollado en MRS-HPC, y 10% p/p de azúcar.

La desmineralización del proceso fue baja ($15.75 \pm 0.06\%$) a comparación del 85% publicado por Cira *et al* en 2002. Este resultado es debido a la baja concentración de ácidos producidos, Cira *et al* en 2002 determinaron el valor del ácido láctico de 0.46 mmol/g mientras que el obtenido en este trabajo fue de 0.31 mmol/g. En la Figura 18 se muestra la cinética de desmineralización durante el proceso de extracción, se observa un comportamiento ascendente con respecto al tiempo, pero, algunos puntos

son constantes, y algunos descendentes, este comportamiento fue explicado por el efecto amortiguador de pH, atribuido por el calcio solubilizado (Zakaria, *et al*, 1998).

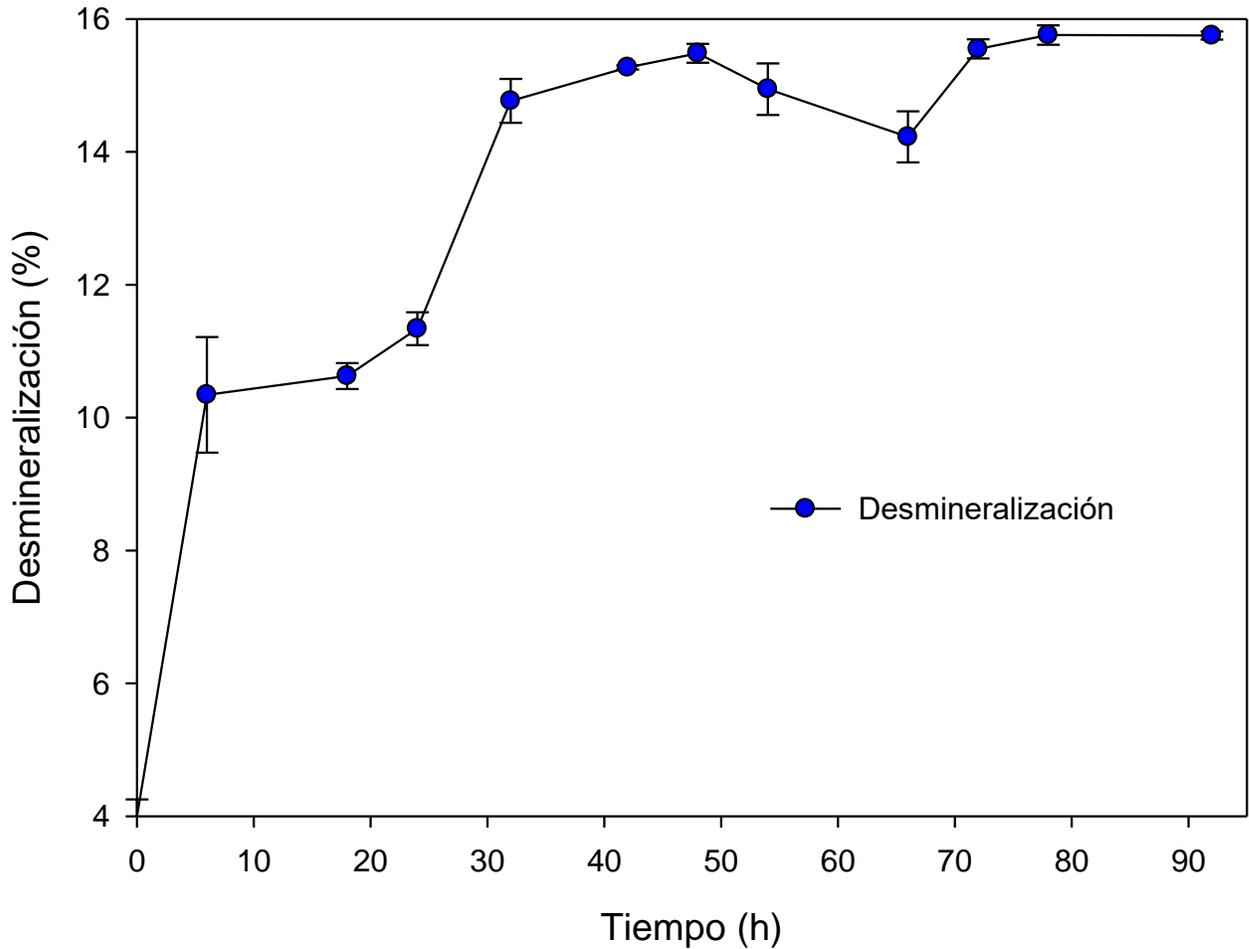


Figura 18. Proceso de desmineralización durante la extracción biológica de quitina partir de 250 kg de DP a 30°C con 10% p/p de inóculo L.brevis desarrollado en MRS-HPC, y 10% p/p de azúcar.

Si bien los reportes de desmineralización se atribuyen a la presencia del ácido láctico, se ha reportado que la presencia del ácido cítrico ha presentado un 87 % DP y 90 % DM con 72 mmol de ácido cítrico por cada

300 g de desperdicio de camarón en fermentaciones de camarón con 10% de *Lactobacillus* y 5% de glucosa (Rao *et al*, 2000).

De los resultados obtenidos en este escalamiento de 250 kg de DC, los porcentajes de desmineralización y desproteínización resultaron menores a los reportados en el escalamiento a 30 kg por Cira *et al* en el 2002, pero, se observó que la variable directa en estos resultados, fue la producción de ácido láctico, aunado a la variable del medio de cultivo con hidrolizado de camarón, se infirió que los minerales presentes en éste, dieron lugar al efecto amortiguador de pH en las últimas horas de la fermentación, junto a la cuantificación de los microorganismos dio lugar a deducir que el inóculo desarrollado con MRS-HPC presentó un medio apto para el desarrollo de las bacterias.

3.3.4. Micrografía electrónica de barrido

Se obtuvieron las micrografías por MEB en a un tamaño de partícula 144 μ (hojuelas) con el fin de observar los cambios en la superficie del material respecto al tiempo de fermentación, así como la extracción de la quitina en presencia de microorganismos (Figura 19).

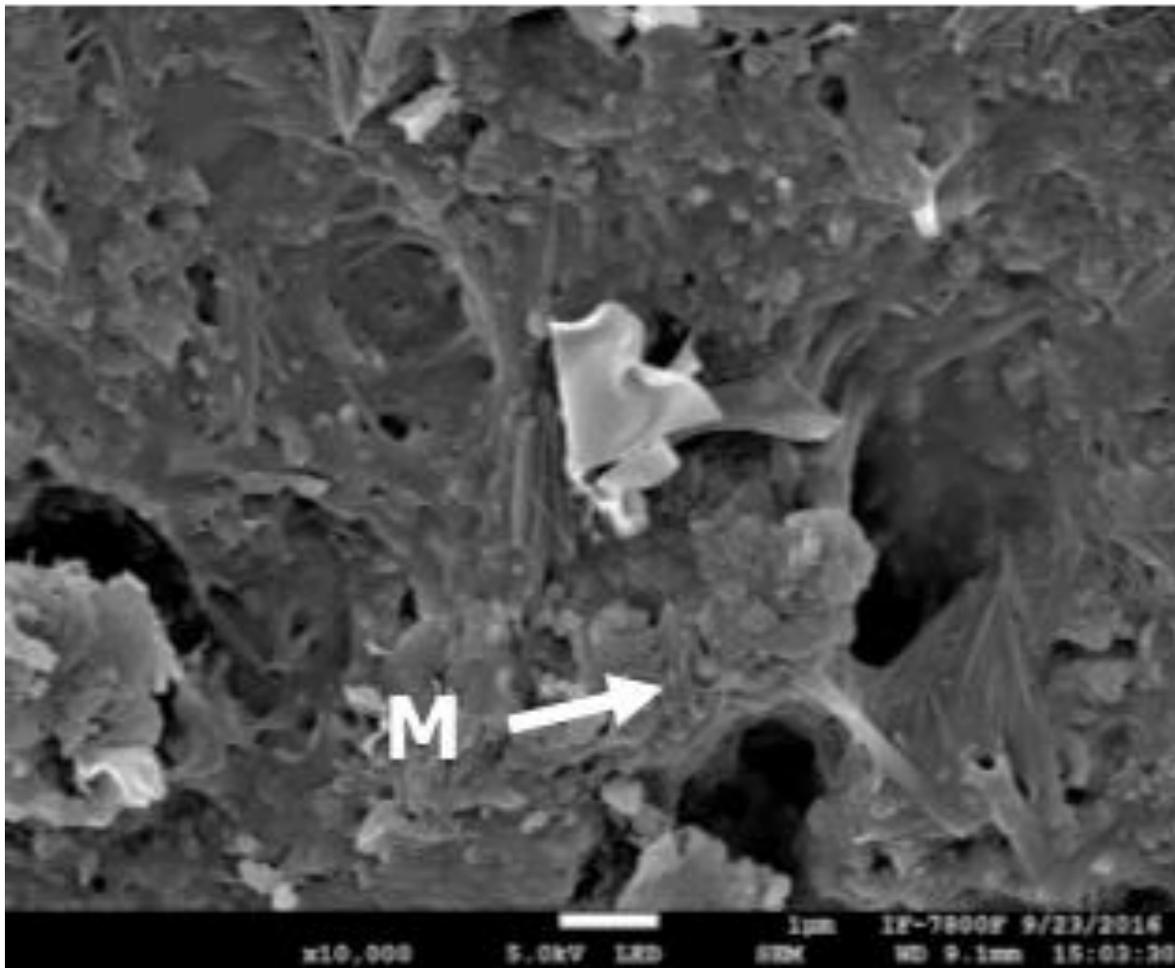
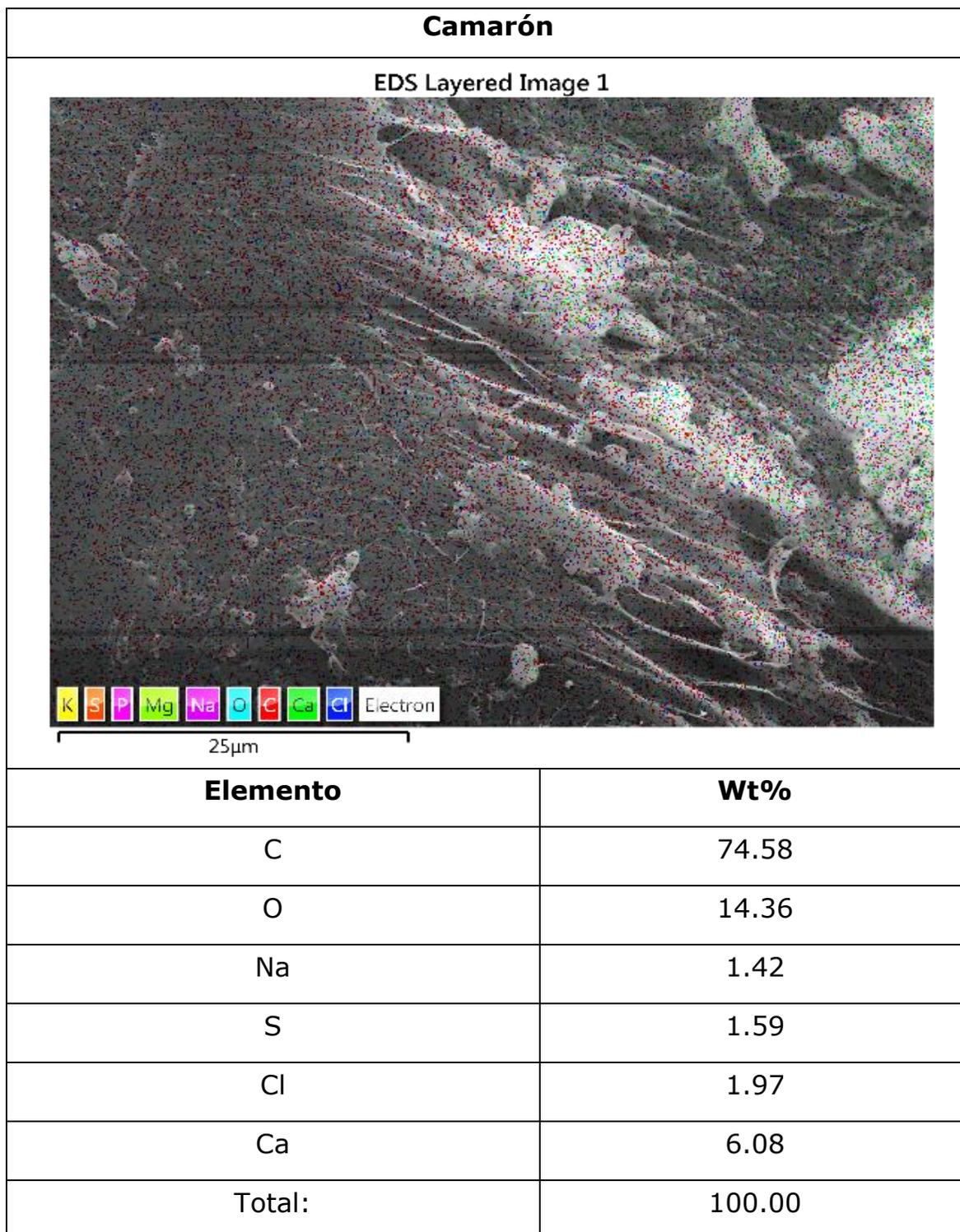


Figura 19. Micrografía obtenida por MEB a x10.000 x110 de una hojuela de quitina cruda en el t= 0 h MRS-HPC 250, donde M corresponde a minerales.

En la Figura 19 se muestra la micrografía correspondiente al tiempo cero horas de MRS-HPC 250, se observa una superficie rugosa (M), que corresponde a minerales. El análisis elemental EDS (Tabla 9) determinó la presencia de los elementos: carbono (C), oxígeno (O) y calcio (Ca) que, de acuerdo con la literatura, en el exoesqueleto de camarón se encuentran como carbonato de calcio CaCO_3 , la presencia de sodio (Na) y el cloro (Cl) se atribuye a los residuos de agua marina con el que se transporta o se lava el camarón (Cárdenas, *et al*, 2004; Guerrero, 2009; NOM-242-SSA1-2009).

Tabla 9. Análisis elemental por EDS correspondiente a una hojuela de cefalotórax de camarón.



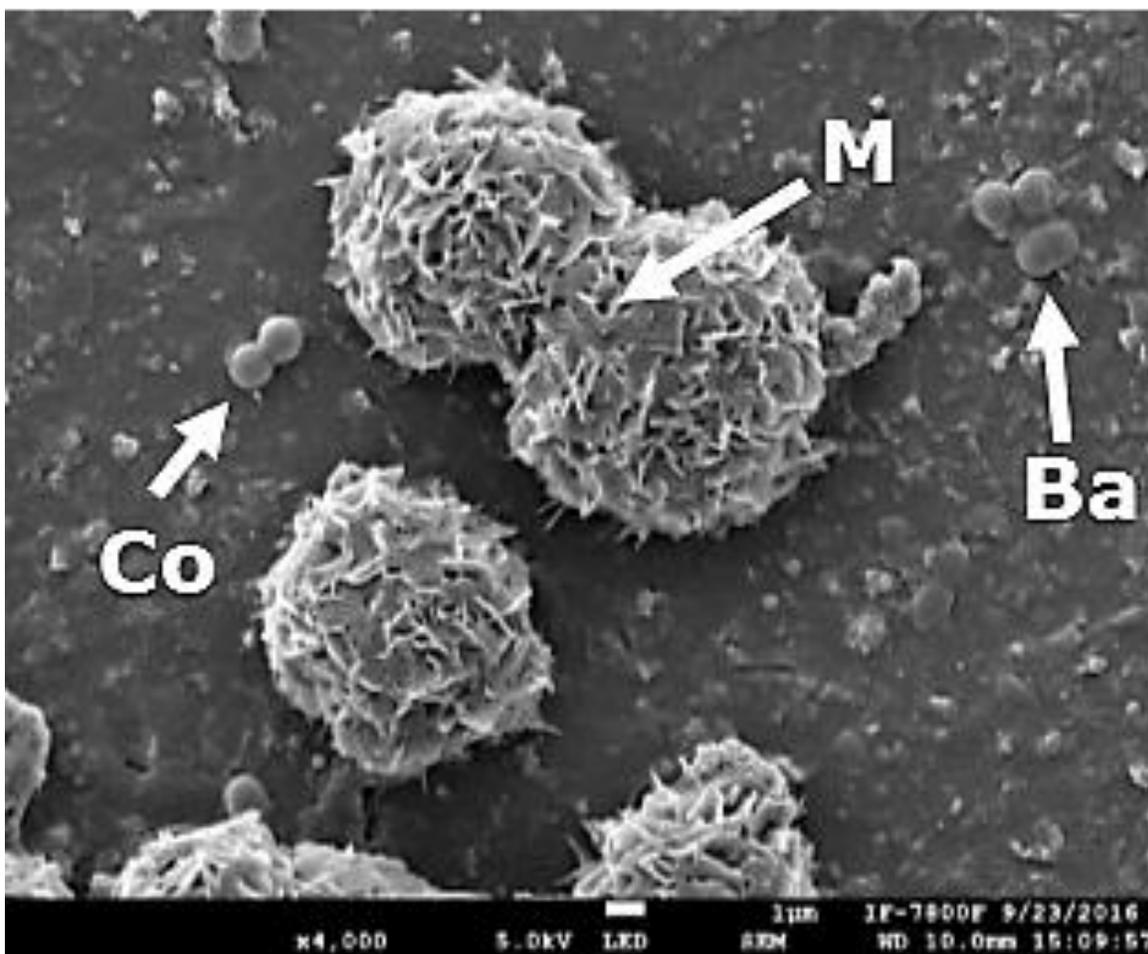
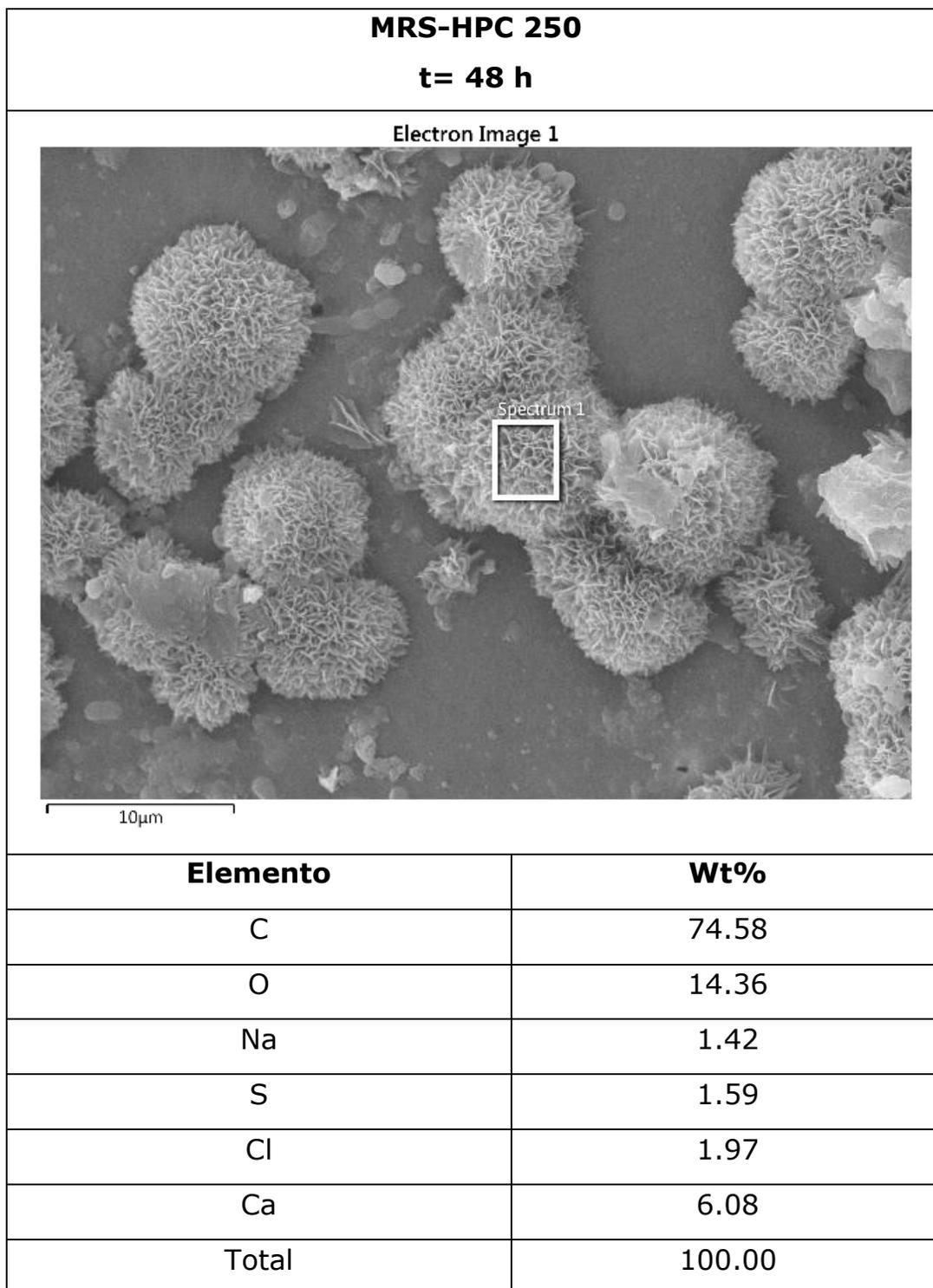


Figura 20. micrografía obtenida a x4000 y x9000 de una hojuela de quitina en el t= 48 h MRS-HPC 250, donde M corresponde a minerales, Ba a bacilos y Co a cocos.

La figura 20 corresponde a la micrografía del tiempo 48 h MRC-HPC 250 se observan algunos cocos (Co) y bacilos cortos (Ba) algunos conglomerados de minerales (M), estos fueron analizados por EDS, en la Tabla 10 se muestran los resultados de este análisis. El Ca se atribuye a CaCO_3 , el Cl y Na al agua marina como ya se mencionó anteriormente.

Tabla 10. Análisis elemental por EDS correspondiente a una hojuela de cefalotórax de camarón al tiempo 48 h del proceso MRS-HPC 250.



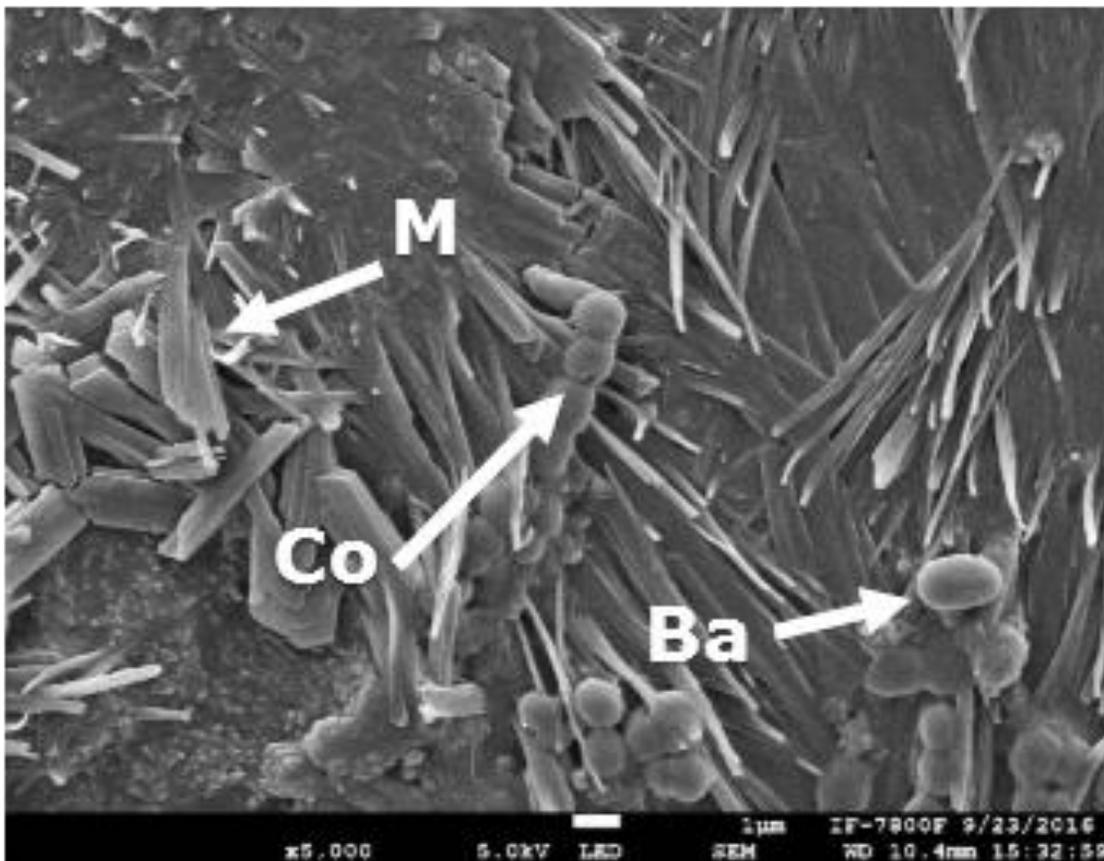
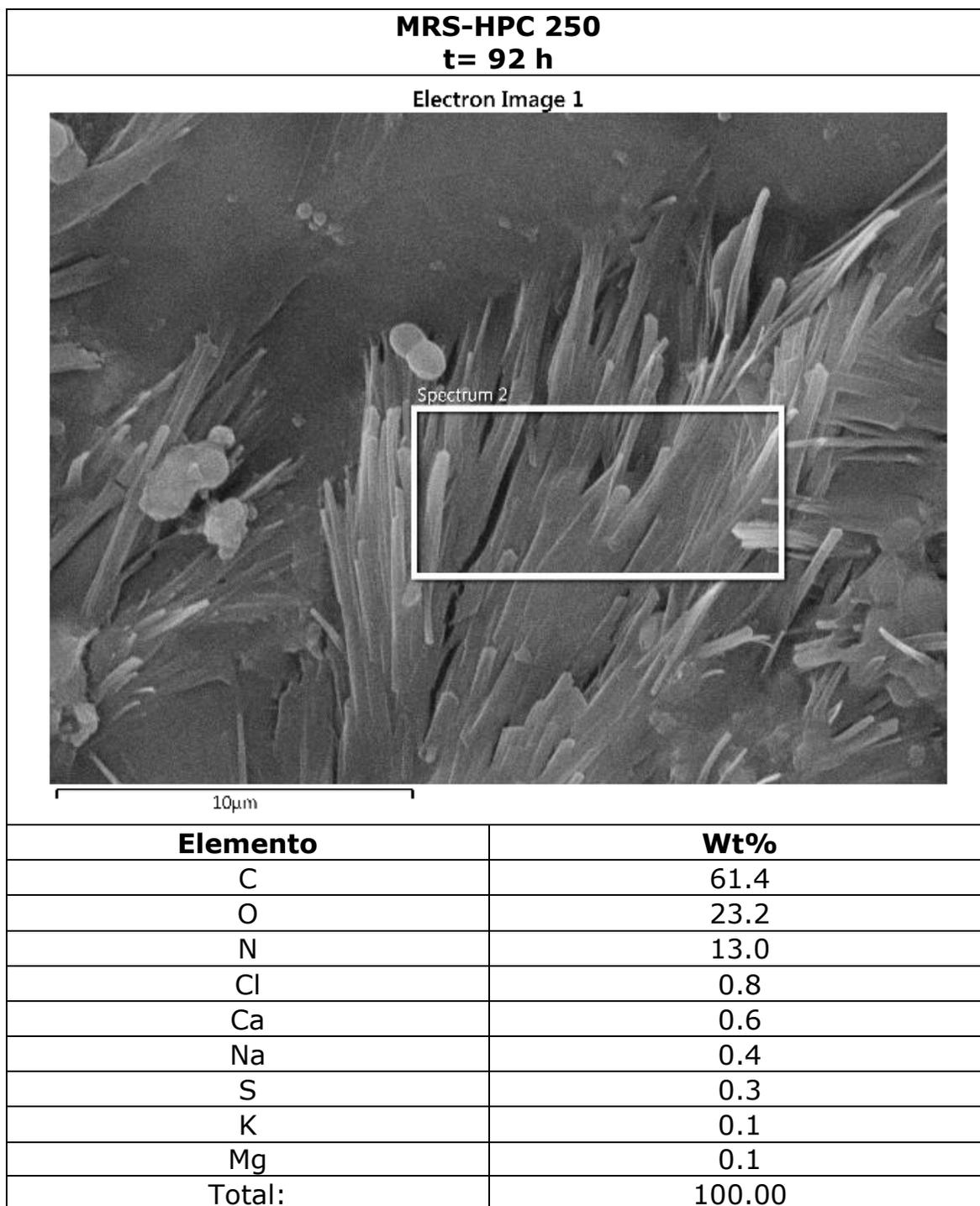


Figura 21. Micrografía obtenida a x5000 y x15000 de una hojuela de quitina cruda obtenida de MRS-HPC 250 en t=92 h, donde M corresponde a minerales, Ba a bacilos y Co a cocos.

La figura 21 corresponde a la micrografía obtenida de la muestra de quitina cruda en el tiempo final del proceso MRS-HCP 250, aún se observan conglomerado de minerales, estos fueron analizados por EDS. En la Tabla 11 se muestra la composición elemental del análisis donde se observa la presencia de C, O y N que corrobora la presencia de quitina y en menor porcentaje Ca, S, K, Na y Mg que corrobora la purificación del material obteniendo.

Tabla 11. Análisis elemental por EDS de una hojuela de quitina cruda obtenida de cefalotórax de camarón, después de 92 h de proceso de extracción biológica.



Al final del proceso MRS-HPC 250 (Figura 22) en la micrografía superior, se observan que en ciertas zonas las fibras de α -quitina ya son visibles (Cárdenas, *et al*, 2004), las cuales son características de la quitina proveniente de exoesqueleto de camarón, pero aún hay presencia de los minerales como se observa en la micrografía Inferior.

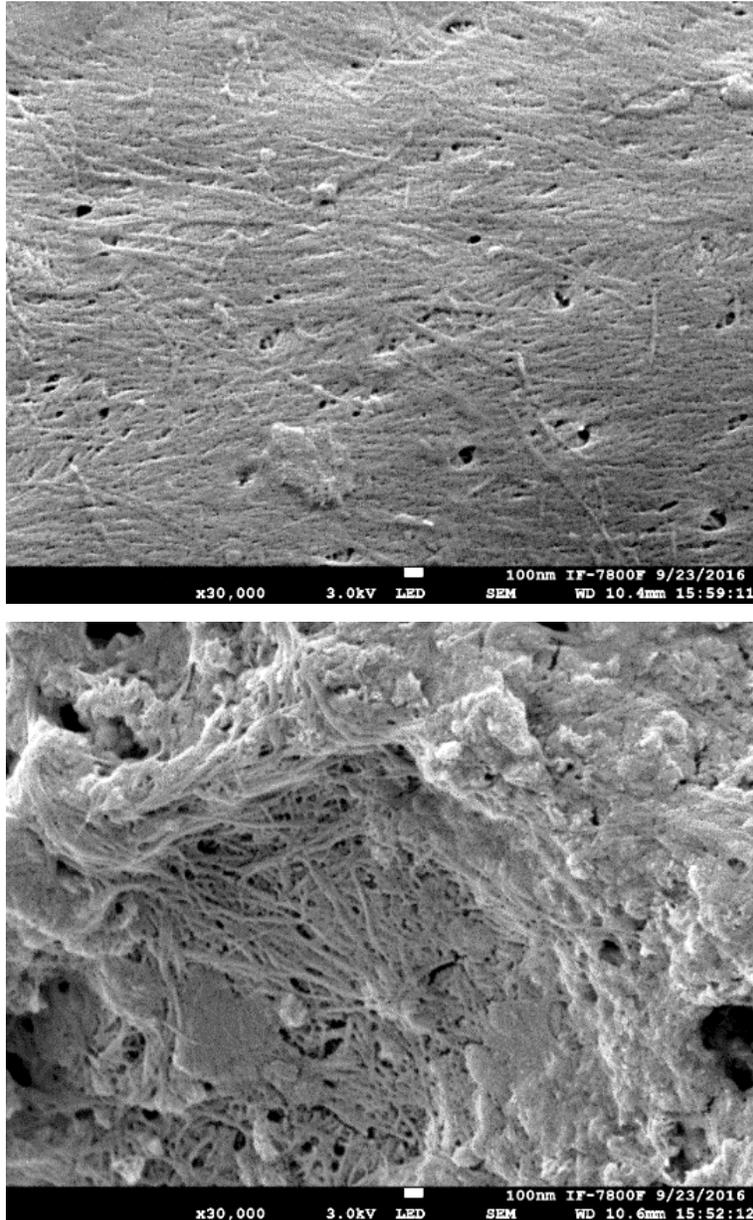


Figura 22. Micrografía electrónica de la quitina cruda obtenida del proceso MRS-HPC 250.

3.4. Caracterización del quitosano

Con el fin de observar si era posible estandarizar la quitina cruda obtenida de MRS-HPC 250 como quitosano, se realizó el proceso de desacetilación, y fue caracterizado con: determinación de cenizas, proteína, grado de desacetilación, IR, %solubilidad en ácido acético y peso molecular (Tabla 12).

Tabla 12. Caracterización de hojuelas de quitosano.

	Quitosano
% solubles	90.48 ± 0.32
PM (kDa)	117.40 ± 0.17
%DA	17.97 ± 0.48
% DDA	82.03

Durante el proceso de desacetilación se cuantificó el porcentaje de sólidos solubles en ácido acético; el cual aumenta respecto al tiempo, esto debido a la disminución de la cristalinidad por la distribución uniforme de los grupos N-acetil (Goosen, 1996).

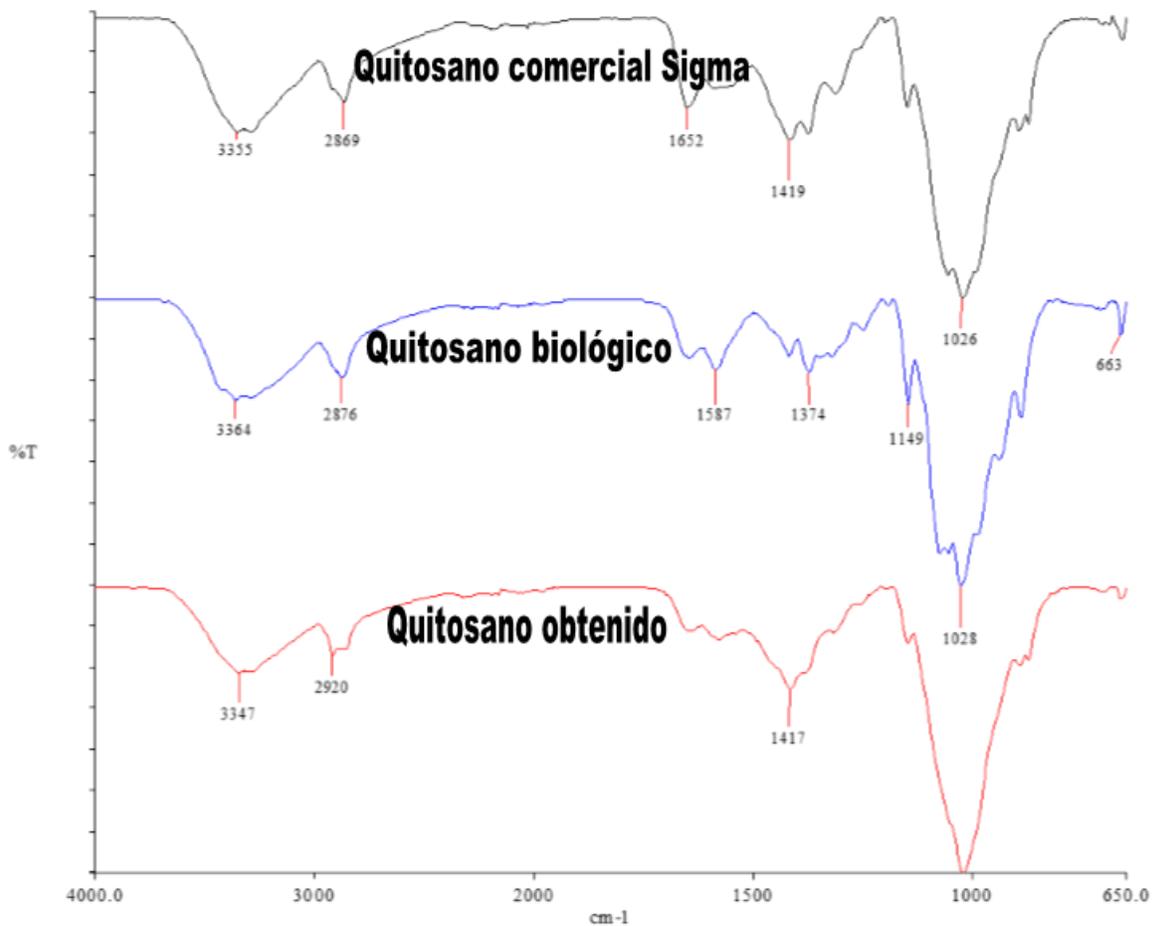


Figura 23. Espectro Infrarrojo de quitosano, el quitosano obtenido (rojo), quitosano biológico (azul) y de quitosano comercial SIGMA (negro).

El espectro IR (Figura 23), muestra las señales de los grupos funcionales de quitosano comercial; las señales cercanas a 3300 cm^{-1} corresponden a vibraciones de estiramiento del NH y el estiramiento de los grupos OH, en 2900 cm^{-1} correspondiente al estiramiento de CH, la señal de 1400 cm^{-1} es característica de la banda de amidas secundarias y 1020 cm^{-1} corresponde a las vibraciones del CO (Kumirska, *et al*, 2010).

El quitosano obtenido de la QMRS-HPC 250 presentó un alto porcentaje de cenizas, debido a que no se realizó el proceso de desmineralización de la QMRS-HPC 250; y se denominó como quitosano de peso molecular

medio, porque presentó un peso molecular de 214.95 kDa (de Sousa, 2015).

Tabla 13. Caracterización del quitosano obtenido a partir de la QMRS-HPC 250

	Quitosano
% humedad	8.59 ± 0.51
% cenizas	33.47 ± 0.03
% proteína	0.03 ± 0.01
% solubles	91.51 ± 0.11
PM (kDa)	214.95 ± 0.81
%DA	14.07 ± 0.15

Conclusiones

- La fracción rica en proteína obtenida del proceso de extracción biológica de quitina, es apropiado para obtener hidrolizados proteicos con residuos de proteínas y péptidos de pesos moleculares aptos para ser usados como sustituto de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo MRS.
- El medio de cultivo con hidrolizado proteico de camarón, no presentó diferencia significativa con el MRS en el crecimiento de *L. brevis*.
- Por el efecto amortiguador de pH ocasionado por las sales acompañantes del hidrolizado proteico de camarón, el medio de cultivo puede ser utilizado para mantener la viabilidad de las bacterias que son inhibidas por el ácido producido durante su crecimiento en el medio.
- El escalamiento con 250 kg de cefalotórax de camarón, no presentó la desmineralización y desproteinización deseada, por lo que el medio no fue apto para una óptima extracción biológica de quitina.

Recomendaciones

Con base en los resultados obtenidos, es conveniente modificar las condiciones de producción de los hidrolizados proteicos, mediante el principio de fuerza iónica para precipitar la proteína soluble y con ello obtener mayor rendimiento de hidrolizados proteicos, también, la identificación de los péptidos y aminoácidos presentes en el hidrolizado proteico de camarón.

Para optimizar el uso del hidrolizado proteico de camarón como fuente de nitrógeno en el desarrollo del lactobacilo responsable de la acidificación del ensilado de exoesqueletos de camarón para extracción biológica de quitina, será conveniente retirar los minerales para evitar el efecto amortiguador y con ello lograr la desmineralización y desproteinización deseada.

Es recomendable realizar el aislamiento de los microorganismos presentes durante el proceso de extracción biológica de quitina y su identificación mediante pruebas bioquímicas.

Bibliografía

- A.O.A.C., 1990. *Official Methods of Analyses of the Association of Official Analytical Chemists*. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Akhila, A., (2010). *Essential oil-bearing grasses: the genus cymbopogon*. U.S.:CRC Press
- Alais, C. y Lacasa, A. (1985) *Ciencia de la leche: principios de técnica lechera*. España: Reverte.
- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of agricultural and food chemistry*, 27(6), 1256-1262.
- Armenta-López, R., Guerrero, L., Huerta, S.. (2002). Astaxanthin extraction from shrimp waste by lactic fermentation and enzymatic hydrolysis of the carotenoprotein complex. *JFS:Food Chemistry and Toxicology*. (67), 1002-1006.
- Arredondo, J., Ponce, J., Shirai, K., Pérez, A., Barriga, I. y Ruiz, A. (2013). Effects of including shrimp protein hydrolysate in practical diets on the growth and survival of redclaw crayfish hatchlings *Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1968). *Aquaculture Research* 44, 966-973.
- Auras, R., Lim, L., Selke, S., Tsuji, H. (2010). *Poly (lactic acid): Synthesis, structures, properties, processing, and applications*. Canada: John Wiley & Sons.
- Barros C., (2009). *Los aditivos en la alimentación de los españoles y la legislación que regula su autorización y uso*. España: Visión libros.
- Barrow, G., y Feltham R., (2003). *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*. United States: Cambridge University Press.

- Barros, I., Guzmán, L., & Tarón, A. (2015). Extraction and quantitative comparison of chitin obtained from the shell of *Callinectes sapidus* and *Penaeus vannamei*. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 18(1), 227-234.
- Batt, A., 2014. *Encyclopedia of food microbiology*. USA: Academic Press.
- Calasso, M., and Gobbetti M. (2011). *Encyclopedia of dairy sciences*. Academic Press, p. 125-131.
- Cárdenas, G., Cabrera, G., Taboada, E., & Miranda, S. P. (2004). Chitin characterization by SEM, FTIR, XRD, and ¹³C cross polarization/mass angle spinning NMR. *Journal of Applied Polymer Science*, 93(4), 1876-1885.
- Chinte-Sanchez, P., (2008). Philippine fermented foods: Principles and Technology. Philippines: UP Press.
- Chou, H., Huang C., Wang C., Chiang H., Lo, C., 1995. Pathogenicity of baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *DAO* (23), 165-173.
- Cira, L., Huerta, S., Hall, G., & Shirai, K., 2002. Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process biochemistry* (37), 1359-1366.
- https://www.yumpu.com/es/document/view/14361702/camaronicultore_spdf-sagarpa, Sonora.
- CONAPESCA 2009. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2009. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca, Mazatlán, Sinaloa, México.
- CONAPESCA 2013. La Pesca y Acuicultura En Cifras 2013. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca, México.
- Corsetti, A., Valmorri, S. (2011). *Lactobacillus spp.: Lactobacillus plantarum*, In Fuquay J, Fox P, McSweeney P, editors. (ed), *Encyclopedia of dairy science*, 2nd ed, vol 3 Academic Press, Elsevier Science, San Diego, CA, p 114-118

- de Castro, R. J. S., & Sato, H. H. (2014). Functional properties and growth promotion of bifidobacteria and lactic acid bacteria strains by protein hydrolysates using a statistical mixture design. *Food Bioscience*, 7, 19-30.
- de Sousa, H. C., Braga, M. E., & Sosnik, A. (2015). Biomateriais aplicados ao desenvolvimento de sistemas terapêuticos avançados. Imprensa da Universidade de Coimbra/Coimbra University Press.
- Dey, S., & Dora, C. (2014). Optimization of the production of shrimp waste protein hydrolysate using microbial proteases adopting response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology*, 51(1), 16-24.
- Dworkin, m., Falkow, E., Rosenberg, K.H., and Schliefer, E. 2006. Organic Acid and Solvent production. Springer, Ney York, NY, pp.511-756.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
- Ege, S. (1998). *Química orgánica: estructura y reactividad* (Vol. 2). Reverté.
- Flores-Albino B., Arias L., Gómez J., Castillo A., Gimeno M. and Shirai K.. Chitin and L(+)-lactic acid production from crab (*Callinectes bellicosus*) wastes by fermentation of *Lactobacillus* sp B2 using sugar cane molasses as carbon source. 2012. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 35(7):1193-1200.
- Foerst. P. and Santivarangkna C. 2015. *Advances in Probiotic Technology*. United States: CRC Press.
- García, M., Quintero, R., López-Munguía. (1993). *Biotecnología alimentaria*. México: Limusa.
- Gil, A. 2010. *Tratado de Nutrición: composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos*. España: Panamericana.

- Gimeno M., Martínez-Ibarra C., Pacheco N., García-Arrazola R., Bárzana E. and Shirai K. One-solvent Extraction of Astaxanthin from Lactic acid Fermented Shrimp Wastes. 2007. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55:10345–10350
- Goosen, M. F. (Ed.). (1996). *Applications of Chitan and Chitosan*. CRC Press.
- Guerrero, I., Rosmini, M. y Armenta, R. (2009). *Tecnología de productos de origen acuático*. México:Limusa.
- Heinsz, L. J., Harrison, M. A., & Leiting, V. A. (1988). Microflora of brown shrimp (*Penaeus aztecus*) from Georgia coastal waters. *Food Microbiology*, 5(3), 141-145.
- Hernández, M., Sastre, A. (1999). *Tratado de nutrición*. España: Díaz de Santos.
- Herrera, C., Bolaños, N., Lutz, G. (2003). *Química de alimentos*. Costa Rica: CEUCR.
- Hirai, A., Odain, H., Nakajima, A. (1991). *Polymer Boletín*: 26, 87.
- Igoe, R., & Hui, Y. (1996). *Dictionary of food ingredients*. U.S.: Springer Science & Business Media.
- Jang, M. K., Kong, B. G., Jeong, Y. I., Lee, C. H., & Nah, J. W. (2004). Physicochemical characterization of α -chitin, β -chitin, and γ -chitin separated from natural resources. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 42(14), 3423-3432.
- Kandler, O. 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49, 209-224.
- Khachatourians, G. G. (1994). General microbial genetics and food biotechnology. Chapter 1. *Food Biotechnology: Microorganisms*. YH Hui and GG Khachatourians (ed.). VCH Publishers, New York.
- Kim, S. K. (2010). *Chitin, chitosan, oligosaccharides and their derivatives: biological activities and applications*. CRC Press.

- Kim, S. K. (2013)..Marine proteins and peptides biological activities and applications. New York: John Wiley-Blackwell.
- Knorr, D. (1991). Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. *Food Technology*, 45, 1 14-122
- König, H., Uden, G., Fröhlich, J. 2009. *Biology of Microorganisms on grapes, in must and in wine*. Berlin: Springer.
- Krieg, N., Staley, J., Brown. D., Hedlund, B., Paster, B., Ward, N., Wolfgang, L., Whitman, W..(2010). *Bergey´s Manual of systematic bacteriology*. New York: Springer.
- Kumirska, J., Czerwicka, M., Kaczyński, Z., Bychowska, A., Brzozowski, K., Thöming, J., & Stepnowski, P. (2010). Application of Spectroscopic Methods for Structural Analysis of Chitin and Chitosan. *Marine Drugs*, 8(5), 1567–1636.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227 (5259), 680-685.
- Lemos, D., Ezquerro, J. M., & Garcia-Carreno, F. L. (2000). Protein digestion in penaeid shrimp: digestive proteinases, proteinase inhibitors and feed digestibility. *Aquaculture*, 186(1), 89-105.
- Li, Z. S. Ding; Z. Li & T. Tan. 2006. L-lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation with corn steep liquor-supplemented acid-hydrolysate of soybean meal. *Biotechnology J.* 1(12): 1453 -1458.
- Ljung, A., & Wadström, T. (2006). Lactic acid bacteria as probiotic. *Curr Issues Intest Microbiol*, 7, 73-90.
- *M.R.S. agar*.. (2016). *Britanialab.com.ar*. Retrieved 14 October 2016, from <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/mrsagar.htm>
- Madigan, M., y Martinko J.. (2006). *Brock Biology of microorganisms*. United States: Pearson Prentice Hall.
- Man, J., Rogosa, M. & Sharpe, M., (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. appl. Bact.* 23(1):130-135.

- Mao, S., Augsten, C., Mäder, K., Kissel, T.. 2007. Characterization of chitosan and its derivatives using asymmetrical flow field-flow-fractionation: A comparison with traditional methods. *J of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 45:736-741.
- Martin, A. M., & Bemister, P. L. (1994). Use of peat extract in the ensiling of fisheries wastes. *Waste management & research*, 12(6), 467-479.
- Martone, C., Pérez, O., Sánchez, J. (2004). Fishery by-product as a nutrient source for bacteria and archaea growth media. *Bioresource Technology*, 96, 383-387.
- Mayrén Gutiérrez, A. (2013). *Obtención de quitina y quitosano a partir de desperdicio de camarón por medio de desproteínización enzimática*. Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.
- Melo, V. y Cuamatzi, O.. 2007. *Bioquímica de los procesos metabólicos*. Barcelona: Reverte.
- Mizani, A. M., & Aminlari, B. M. (2007). A new process for deproteinization of chitin from shrimp head waste. In *Proceedings of European Congress of Chemical Engineering (ECCE-6)*,16-20.
- Montie, T.. 1998. *Biotechnology Handbooks. Pseudomonas*. New York: Springer Science+Business Media.
- Munray, P., Rosenthal, K., y Pfaller, M.. (2009). *Microbiología médica*. España: Elsevier.
- Murray, R.(2013). *Harper: bioquímica ilustrada (29a)*. McGraw Hill Mexico.
- Negroni, M. (2009). *Microbiología estomatológica*. Argentina: médica Panamericana.
- Nge, L., Nwe, N., Chandkrachang, S., & Stevens, W.. (2006). Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture. *Plant Science*, 170(6), 1185-1190.

- No, H. K., Meyers, S. P., & Lee, K. S. (1989). Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(3), 575-579.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009, Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba
- Pacheco N. 2007. Efecto de Quitosanos y *Pichia Guillermondii* como agentes de biocontrol contra *Penicillium digitatum*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana–Iztapalapa-México.
- Pacheco, N., Gárnica, M., Ramirez, J., Flores, B., Gimeno, M., Bárzana, E., Shirai, K., (2009). Effect of temperature on chitin and astaxanthin recoveries from shrimp waste using lactic acid bacteria. *Bioresource Technology*, 100 (11), 2849-2854
- Pacheco, N., Larralde, P., Sepulveda, J., Trombotto, S., Domard, A., Shirai, K.. (2008). Evaluation of chitosans and *Pichia guillermondii* as growth inhibitors of *Penicillium digitatum*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 43: 20-26.
- Pacheco, N., Garnica-Gonzalez, M., Gimeno, M., Bárzana, E., Trombotto, S., David, L., & Shirai, K. (2011). Structural characterization of chitin and chitosan obtained by biological and chemical methods. *Biomacromolecules*, 12(9), 3285-3290.
- Pacheco, N., Trombotto, S., David, L., & Shirai, K. (2013). Activity of chitin deacetylase from *Colletotrichum gloeosporioides* on chitinous substrates. *Carbohydrate polymers*, 96(1), 227-232.
- Parín, M. y Zugarramudi, A. (1997). Tratamiento y utilización de residuos de origen animal, pesquero y alimenticio en la alimentación animal. Roma:FAO.
- Percival, S., Chalmers, R., Embrey, M., Hunter, P., Sellwood, J., & Wyn-Jones, P. (2004). *Acinetobacter-2*.

- Peterson, L., (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical biochemistry*. 83, 346-356.
- Plascencia, M., Olvera, M., Arredondo, J., Hall G., Shirai, K., (2002). Feasibility of fishmeal replacement by shrimp head silage protein hydrolysate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L) diets. *Food Sci.* 82 (7), 753- 759.
- Porro, D., Bianchi, M., Brambilla, L., Menghini, R., Bolzani, D., Carrera, V., Lievense, J., Liu, Chi., Ranzi, B. M., Frontali, L & Alberghina, L. 1999. Replacement of a Metabolic Pathway for Large-Scale Production of Lactic Acid from Engineered Yeasts Applied Environmental Microbiology, 65(9), 4211- 4215.
- Prado, A., Rodríguez, G., Figueroa, I., Shirai, K., (2013). Manual de prácticas de laboratorio. Microbiología de los alimentos. México: UAM.
- Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. (2016). 3012-65-5 | C₆H₁₄N₂O₇ - PubChem. [online] Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5284342#section=Top> [Accessed 14 Oct. 2016].
- Ramírez, E., Silva, A., Guevara, M., Nuñez, M., Bauza, R., y Arredondo-Vega B., (2010). Composición bioquímica del camarón dulceacuícula *Macrobrachium jelskii* (Miers, 1877) sometido a condiciones de cultivo. *Zootecnia tropical.*, 28, 65-72.
- Ramos-Puebla, A., De Santiago, C., Trombotto, S., David, L., Larralde-Corona, C. P., & Shirai, K. (2016). Addition of abscisic acid increases the production of chitin deacetylase by *Colletotrichum gloeosporioides* in submerged culture. *Process Biochemistry*.
- Rao, M. S., Munoz, J., & Stevens, W. F. (2000). Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(6), 808-813.

- Ray, B., y Bhunia, A.. (2013). *Fundamental Food Microbiology*. United States: CRC Press.
- Rodríguez, V., Del Blanco, L., y Agullo E.. 2000. Preservación de tomates con aplicación de capas de quitosano. *Información Tecnológica* (11:2) 25-31.
- Roussos, S., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2003). *New Horizons In Biotechnology*. Springer Science & Business Media.
- Sagardoy, M., y Mandolesi, M. (2004). *Biología del suelo*. Argentina: UNS.
- Salas-Durán, C., Chacón-Villalobos, A., y Zamora-Sánchez, L.. (2015). Harina de cefalotórax de camarón en raciones para gallinas ponedoras. *Agronomía Mesoamericana*, 26(2), 333-343.
- Schägger, H., y von Jagow, G.. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*. 166(2), 368-379.
- Shahidi, F., & Synowiecki, J. (1991). Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards. *Journal of agricultural and food chemistry*, 39(8), 1527-1532.
- Shirai K., Guerrero I., Hall G., Quitina: Ourrencia, propiedades y aplicaciones", *Ciencia*. 47/4:317-328 (1996)
- Shirai , K., Guerrero, I., Huerta, S., Saucedo , G., Castillo , A., Gonzalez , R., Hall, G.. (2001). Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation. *Enzyme and Microbial Technology*. (28), 446-452.
- Shuai, H. H., Yang, C. Y., Hans, I., Harn, C., York, R. L., Liao, T. C., & Cheng, C. M. (2013). Using surfaces to modulate the morphology and structure of attached cells—a case of cancer cells on chitosan membranes. *Chemical Science*, 4(8), 3058-3067.
- Shrinivas, M., Stevens, W.. 2005. Chitin production by *Lactobacillus* fermentation of shrimp biowaste in a drum reactor and its chemical

conversion to chitosan. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 80:1080-1087.

- Simpson, B., Nayeri, G., Yaylayan, V., Ashie I.. (1998). Enzymatic hydrolysis of shrimp meat. *Food Chemistry*. (61), 131-138.
- Song, H., & Lee, S. Y. (2006). Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme and microbial technology*, 39(3), 352-361.
- Stanier, R., Ingraham, J., Wheelis, M., Painter, P.. 2005. *Microbiología*. Barcelona: Reverté.
- Stephenson, F.. 2010. *Calculations for molecular Biology and Biotechnology: a Guide to Mathematics in the laboratory*. United States of America: Elsevier.
- Sikorski, Z., (2002). *Chemical and functional properties of food components*. Florida: CRC Press.
- Synowiecki, J., Al-Khateeb, N.A., (2003). Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Food Sci.* (043), 145–171.
- Tacon, A. G. (1989). *Nutricion y alimentacion de peces y camarones cultivados. Manual de capacitacion* (No. F009. 002). FAO.
- Teijón, J., 2001. *Bioquímica estructural*. Madrid: Tébar SL.
- Teixeira, P. (2016). *Lactobacillus brevis*. In: *Food Microbiology*, 2nd ed. Elsevier, pp.417-424.
- Vázquez, J. y Murado, M.. 2008. Enzymatic hydrolyzates from food wastewater as a source of peptones for lactic acid bacteria productions. *Enzyme and microbial technology*. 34, 66-72.
- VELP Scientifica. (13 de octubre de 2016). Eurobusiness , obtenido de http://www.velp.com/es/productos/lines/1/family/50/extraccion_por_solvente/84/serie_ser_148
- Vivek, N., Pandey, A., & Binod, P. (2016). Biological valorization of pure and crude glycerol into 1, 3-propanediol using a novel isolate *Lactobacillus brevis* N1E9. 3.3. *Bioresource technology*.

- Voet, D., Voet, J.. 2006. Bioquímica. Argéntina: Panamericana.
- Voet, D.. 2004. Bioquímica. Argéntina: Panamericana.
- Wolfgang, A.. 2008. Enzymes in industry. Netherlands: WILEY-VCH
- Zakaria, Z., Hall, G. M., & Shama, G. (1998). Lactic acid fermentation of scampi waste in a rotating horizontal bioreactor for chitin recovery. *Process Biochemistry*, 33(1), 1-6.

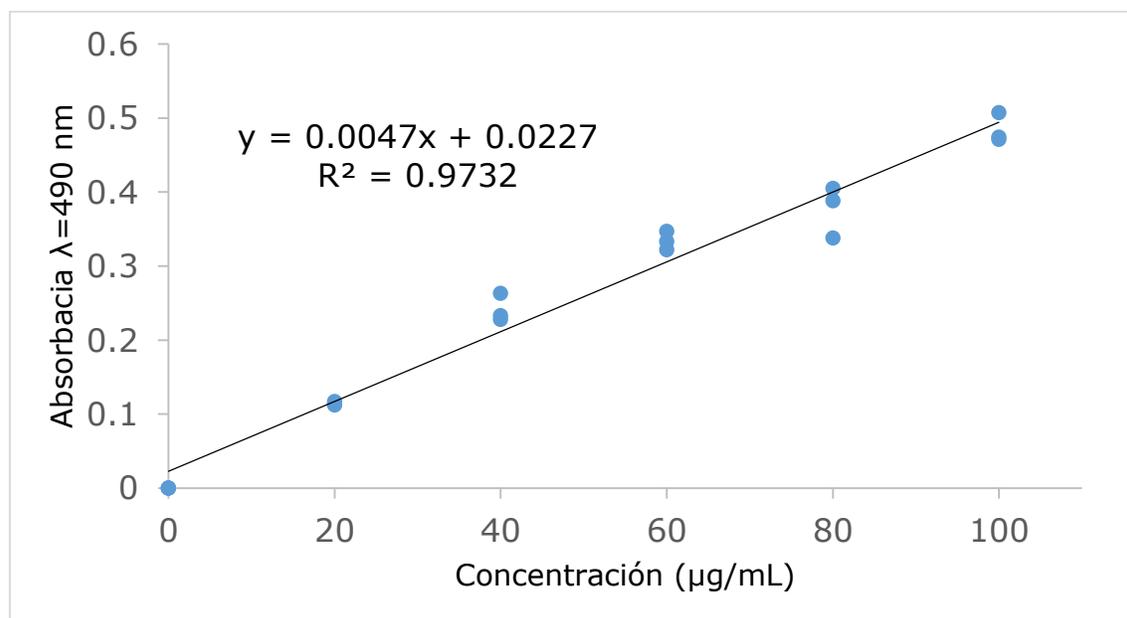
ANEXO

Anexo I. Cálculos para el balance de nitrógeno en MRS y MRS-HPC.

$$\text{Nitrógeno (mmol)} = g_{\text{fuente de nitrógeno}} \times \%_{\text{Nitrógeno en fuente}} \times \frac{1 \text{ mol}_{\text{nitrógeno}}}{14.007 g_{\text{nitrógeno}}} \times \frac{1000 \text{ mmoles}}{1 \text{ mol}}$$

$$\text{masa}_{\text{CPP}} = \text{mmoles de nitrógeno totales}_{\text{MRS}} \frac{1 g_{\text{muestras seca}}}{\text{mmol de nitrógeno}_{\text{muestra seca}}}$$

Anexo II. Curva patrón de azúcares solubles totales y Tratamiento de muestra



Se elaboró una curva de calibración a partir de una solución de sacarosa de 100µg/mL.

Los sobrenadantes de las muestras (previamente centrifugadas a 4°C, 10000 rpm, 10 minutos) fueron disueltas con relación 1:100.

Los resultados fueron interpolados en la curva de calibración y multiplicados por el factor de dilución (FD).

$$y = (0.0047x + 0.0227) \times FD$$

Anexo III. Reactivos para la determinación de Proteína soluble por Lowry-Peterson, y Curva patrón de Seroalbúmina bovina.

Solución A

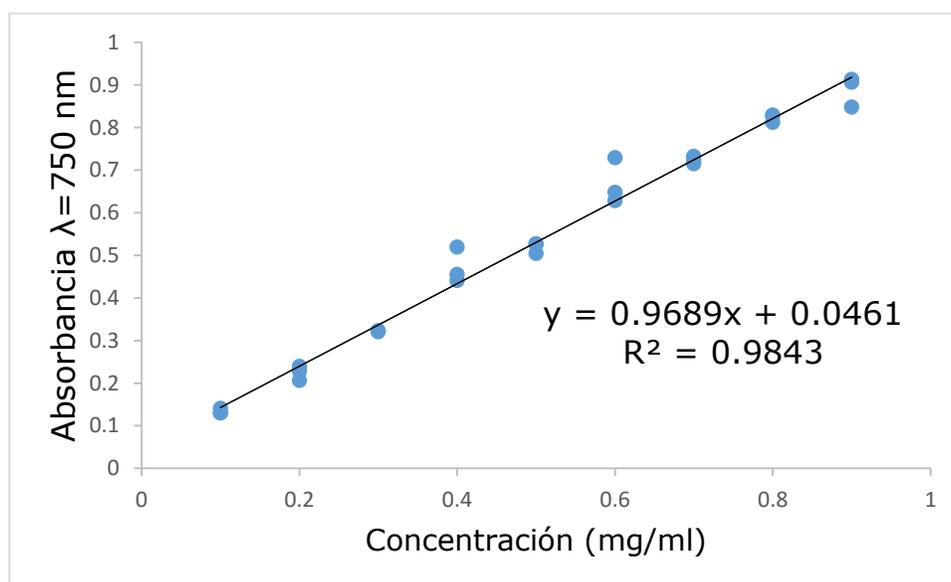
Solución de carbonato de sodio y tartrato de potasio: 25 g de Carbonato de sodio (J.T. Baker, 99.9% de pureza), 0.25 g de sulfato de cobre pentahidratado (J.T. Baker, 100% de pureza), 0.5 g de tartrato de sodio y potasio (Monterrey, 99% de pureza) en 250 mL de agua destilada.

1. Solución de dodecil sulfato de sodio (SDS): 25 g de SDS (Reasol, 99% de pureza) disueltos en 250 mL de agua destilada
2. Solución de hidróxido de sodio: se disolvieron 8 g de NaOH (Meyer, 97% de pureza) en 250 mL de agua destilada.

Solución B

Consta de: Folin-Ciocalteu (HYCEL) y agua destilada en relación 1:1 y debe ser preparado en condiciones de oscuridad minutos antes de su uso.

Curva patrón de seroalbumina bovina.



Tratamiento de la muestra

Para la determinación de proteína soluble en la seroalbúmina bovina de la curva patrón y las muestras, se aplicó la siguiente metodología:

- Dilución de la muestra con agua destilada en relación 1:100.
- Adición de 1 mL de reactivo A un 1 mL de disolución de la muestra, y homogeneización de la muestra.
- Incubación a 30°C durante 10 min en oscuridad.
- Adición de 0.5 mL de reactivo B a la solución de reactivo A y muestra, y homogenización de la muestra.
- Incubación a 30°C durante 30 min en oscuridad.

Lectura de la solución a temperatura ambiente en el espectrofotómetro (Spectronic GENESYS 6, 2006) a $\lambda=750$ nm. El resultado se interpoló en la curva de calibración de seroalbúmina bovina.

$$y = 0.9689x + 0.0461$$

Anexo III. Tratamiento de muestras para determinación de azúcares y ácidos orgánicos por HPLC.

Las muestras fueron diluidas 1:100 con agua desionizada, las disoluciones fueron centrifugadas a 4000 rpm, 5 min, 4 °C (Beckman Coulter y Rotor J2-MC). Una vez centrifugadas las muestras. Se filtraron con membranas Millipore de 0.45 μm .

ANEXO IV. Preparación de buffer, Cromatograma de Gel Standard Filtration y curva patrón

El Buffer destinado para la fase móvil fue elaborado con Trizma base (Sigma) al 0.5 M, NaCl (Reasol con 99% de pureza) al 0.15 M, y se ajustó a pH 7.8 con HCl (Meyer con 36.5% de pureza).

Del cromatograma obtenido se determinó el volumen de elución (V_e), el

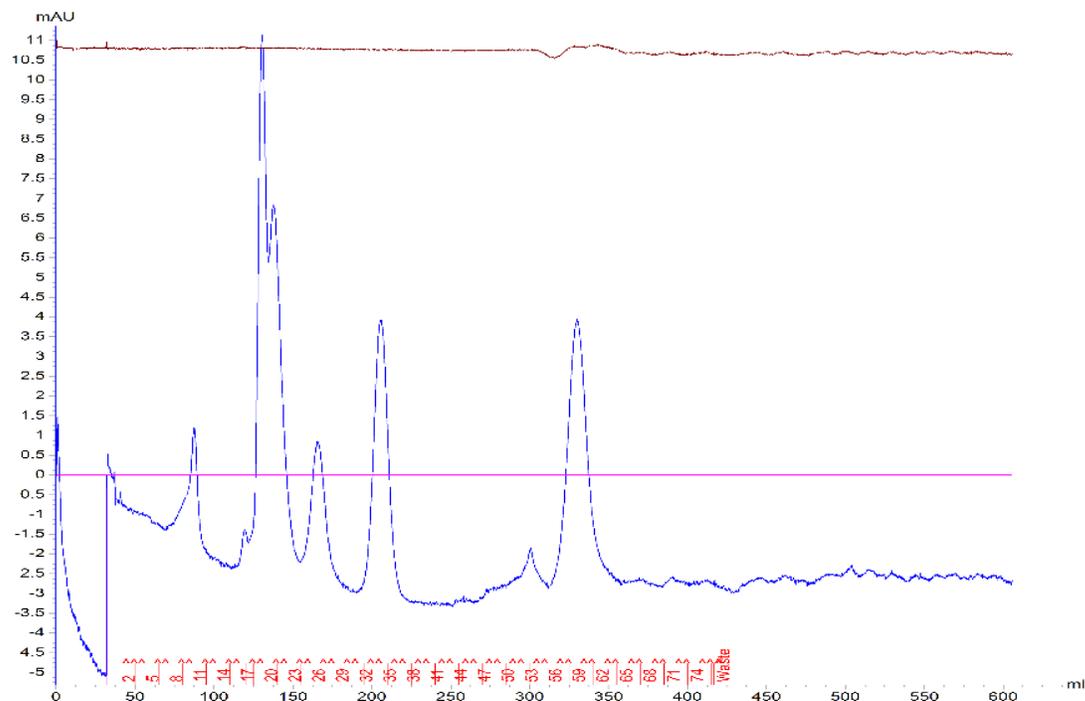
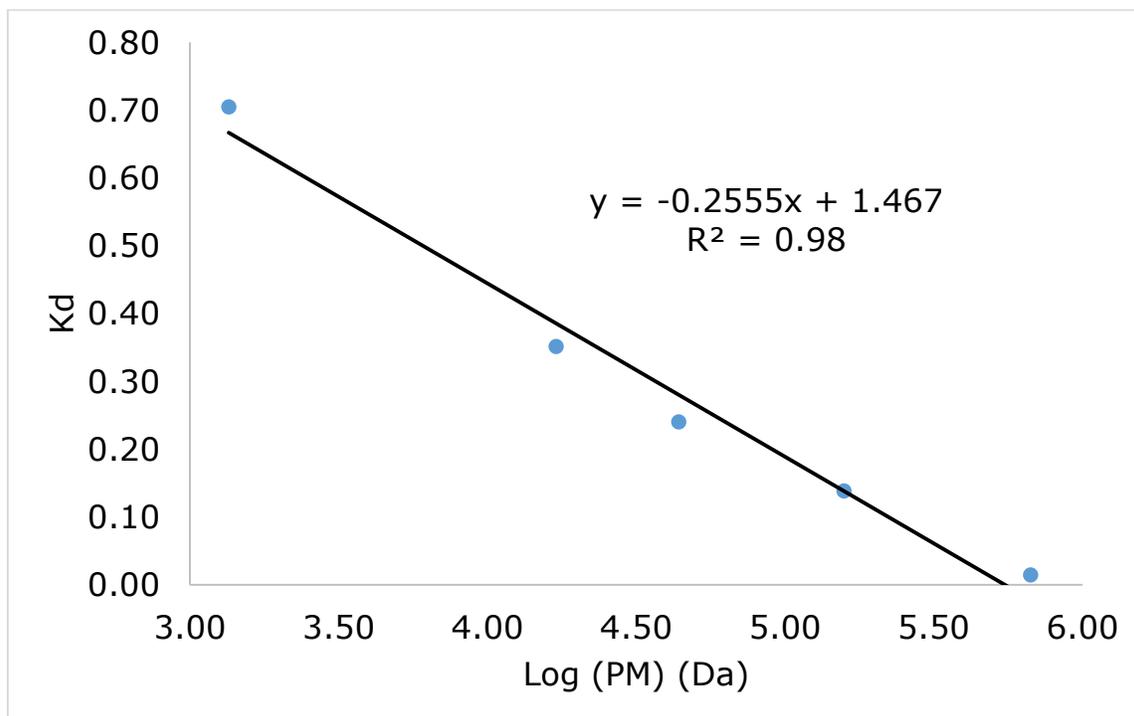


Ilustración 1. Cromatograma de Gel Standard Filtration, con buffer -HCl 0.5 M NaCl 0.15 M, pH 7.8, bajo condiciones de flujo de 1.3 mL/min y volumen equivalente a 320 mL.

Volumen muerto (V_o) y con el volumen de buffer dentro de la columna (V_i) se cuantificó el coeficiente de distribución (K_d) (Ecuación 3), éste se graficó contra el Logaritmo del peso molecular de los estándares para obtener una curva patrón para determinar el peso molecular de los componentes de los HP.

$$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_i} \dots\dots(3)$$

Curva patrón con Gel Filtration Standard de BIO RAD



El análisis de las muestras fue con la curva patrón

$$y = -0.2555x + 1.467 \dots\dots(4)$$

Anexo V. tratamiento de muestras para análisis electroforético.

tratamiento de muestras

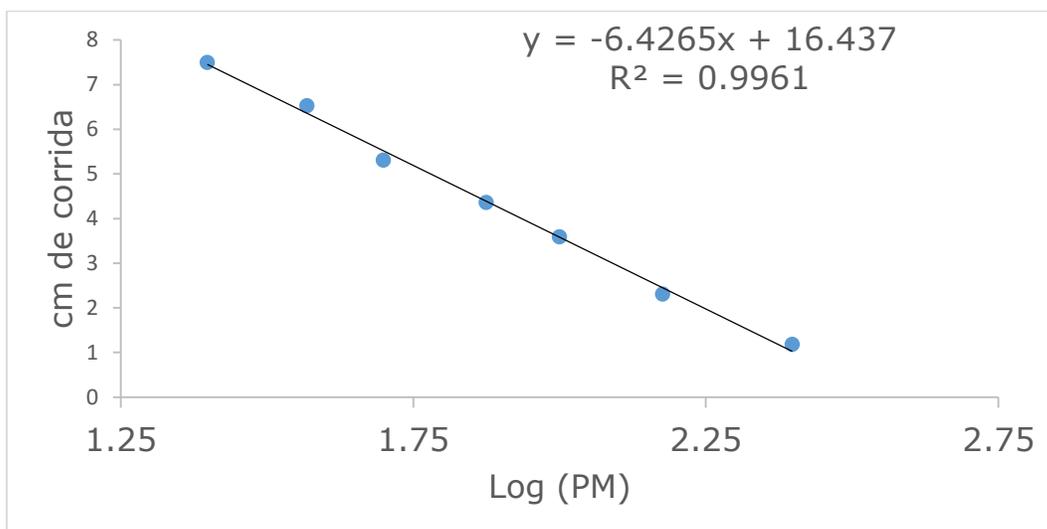
consistió en dializar la muestra en una membrana de diálisis de alta retención de celulosa (SIGMA-ALDRICH), la cual se sumergió en agua desionizada durante 24 horas, a la muestra dializada se le cuantifico proteína soluble por Lowry-Peterson.

Para el análisis se identificaron las bandas del marcador y las muestras (Anexo IV).

Análisis de bandas

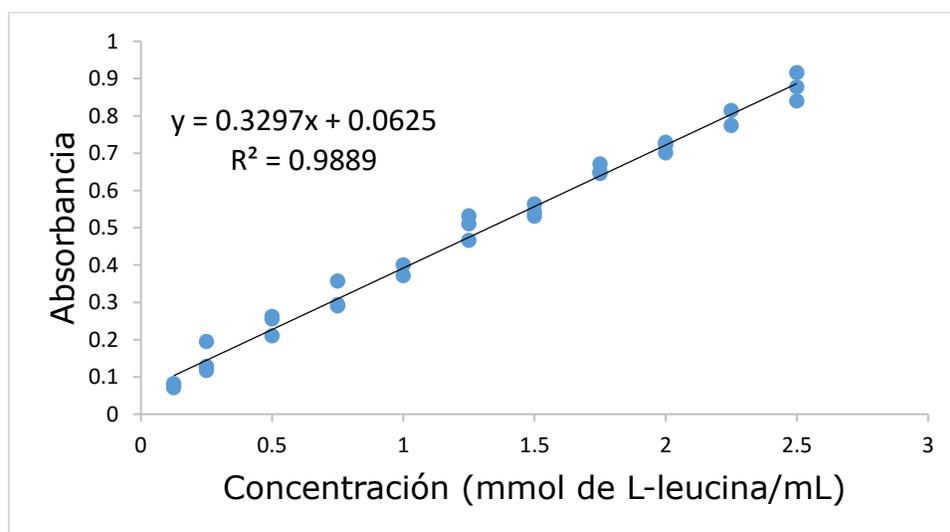
Para el análisis se identificaron las bandas del marcador, y se determinó la distancia de corrida, con ello se realizó una gráfica de cm de corrida, contra el logaritmo peso molecular.

Curva patrón para electroforesis de gel de Tricina-SDS-PAGE.



Anexo VI. Grado de Hidrólisis

Curva patrón de L-Leucina en SDS a 1%



Anexo VII. Tratamiento de la muestra para la terminación de solubles

solubilización de 0.1 g de quitosano en 25 ml de una solución 0.1M de ácido acético glacial (MEYER, pureza 99.7%) con agitación constante a temperatura ambiente durante 96 h, posteriormente se filtró con papel de celulosa de 0.45 micras, este se llevó a peso constante a 80 °C durante 24 horas, finalmente se determinó la cantidad de quitosano soluble por diferencia de peso

Anexo VIII. Tratamiento de la muestra para determinación de peso molecular.

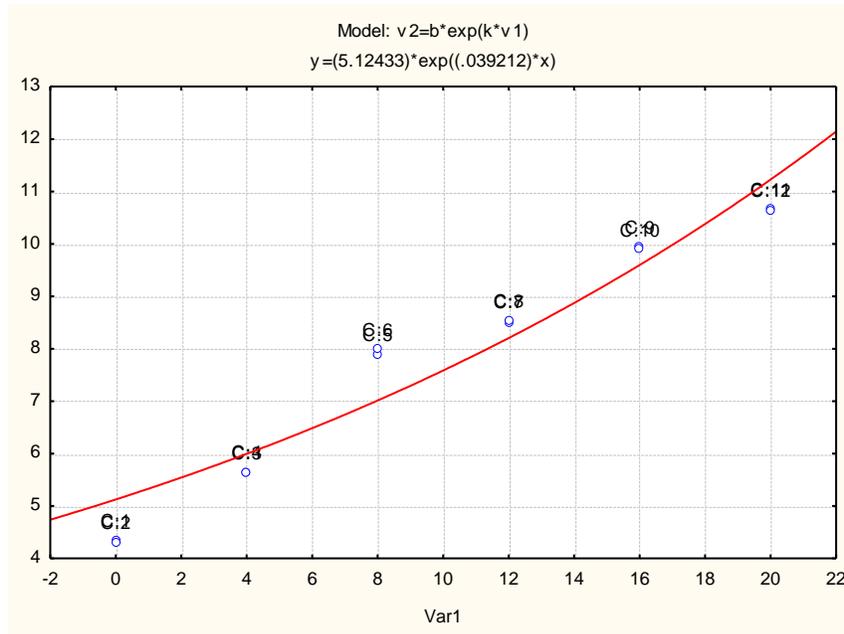
a partir de 0.1g de quitosano disuelto en una solución al 2% de ácido acético glacial (MEYER, pureza 99.7%) y 0.2M de acetato de sodio (MEYER, pureza 90%).

Anexo IX. Tratamiento de la muestra para determinación de grado de acetilación por HRMN

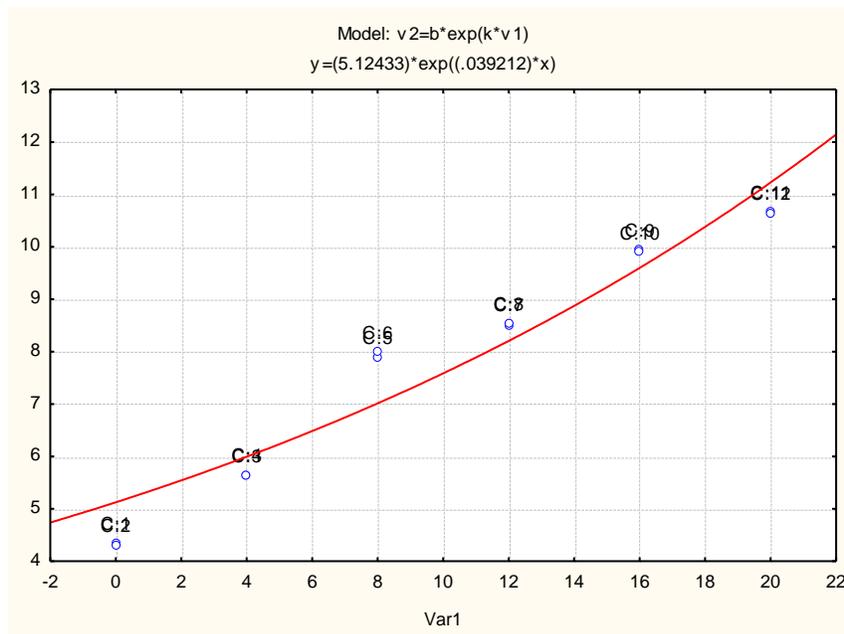
El quitosano fue disuelto en solución de DCl/D₂O (Deuterium chloride solution 35 wt, Sigma) al 20% (p/p) mediante agitación magnética durante 36h, los espectros de RMN¹H se realizaron en un espectrómetro Bruker AC 200 a 200Mhz para ¹H a 25°C.

Anexo X. Modelo de crecimiento para *L. brevis* en MRS y MRS-HPC.

Modelo de crecimiento correspondiente a *L. brevis* en MRS-HPC

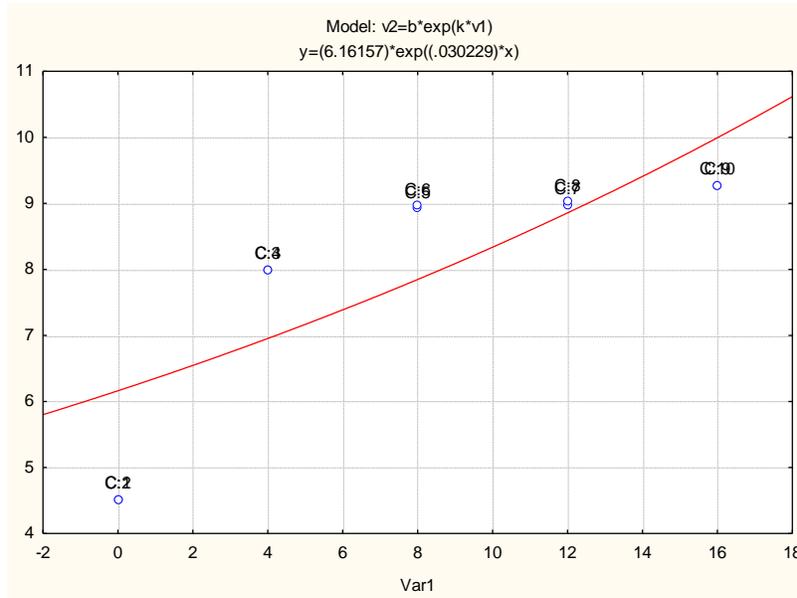


Modelo de crecimiento correspondiente a *L. brevis* en MRS.

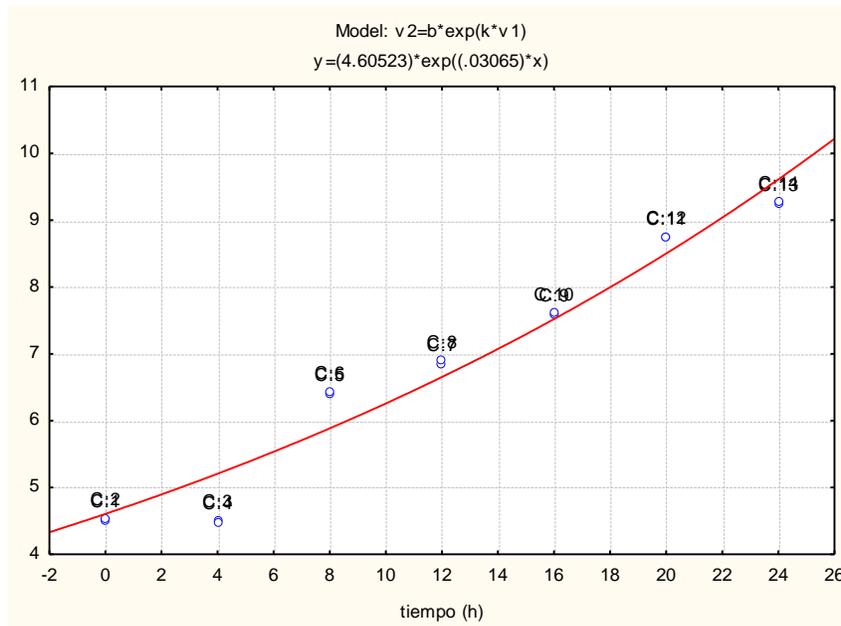


Anexo X1. Modelo de crecimiento para *L. plantarum* en MRS y MRS-HPC.

Modelo de crecimiento correspondiente a *L. plantarum* en MRS-HPC.



Modelo de crecimiento correspondiente a *L. plantarum* en MRS.



Anexo XII. Análisis de varianza en la cinética de crecimiento para *L. brevis* y *L. plantarum*.

Descriptivos*Lactobacillus brevis Log (UFC/g)*

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
MRS	14	8.2521	2.38054	0.63623	6.8777	9.6266	4.32	10.72
MRS-HPC	14	8.9071	3.99878	1.06872	6.5983	11.2160	4.32	13.45
MRS	14	8.2521	2.38054	0.63623	6.8777	9.6266	4.32	10.72
Total	42	8.4705	2.95997	0.45673	7.5481	9.3929	4.32	13.45

ANOVA

Log(UFC/g)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	4.004	2	2.002	0.220	0.804
Intra-grupos	355.214	39	9.108		
Total	359.218	41			

Descriptivos*Lactobacillus plantarum Log (UFC/g)*

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
MRS	14	6.8479	1.80055	0.48122	5.8083	7.8875	4.48	9.28
MRS-HPC	18	8.1267	1.41838	0.33432	7.4213	8.8320	4.52	9.28
MRS	14	6.8479	1.80055	0.48122	5.8083	7.8875	4.48	9.28
Total	46	7.3483	1.74107	0.25671	6.8312	7.8653	4.48	9.28

ANOVA

Log (UFC/g)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	17.918	2	8.959	3.251	0.048
Intra-grupos	118.492	43	2.756		
Total	136.410	45			

Log(UFC/g)
Duncan^{a,b}

Medio de cultivo	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
MRS	14	6.8479
MRS	14	6.8479
MRS-HPC	18	8.1267
Sig.		0.050

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

- Usa el tamaño muestral de la media armónica = 15.120.
- Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.