

ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AGROINDUSTRIA

FERMENTACIÓN LÁCTICA DE LA CÁSCARA DE CAMARÓN CON *Lactobacillus delbrueckii* PARA OBTENCIÓN DE QUITINA

PROYECTO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA QUÍMICA

ANDREA PAULINA ARÉVALO ILLESCAS

andrea.arevalo@epn.edu.ec

DIRECTORA: ING. NEYDA ESPÍN, MSc.

neyda.espin@epn.edu.ec

Quito, noviembre 2016

© Escuela Politécnica Nacional (2016)
Reservados todos los derechos de reproducción

DECLARACIÓN

Yo Andrea Paulina Arévalo Illescas, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Escuela Politécnica Nacional puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.

Andrea Paulina Arévalo Illescas

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por Andrea Paulina Arévalo Illescas, bajo mi supervisión.

Ing. Neyda Espín
DIRECTORA DEL PROYECTO

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por ser mi constante guía, fuerza, y compañía, durante toda mi vida, por otorgarme el don de la vida, y una hermosa familia. Gracias Dios mío por ayudarme en la culminación de mis estudios. Por todas las bendiciones recibidas y por poner en mí camino a personas de gran corazón, por mis excelentes profesores que me ha ayudado en mi formación personal y académica.

A la Santísima Virgen María por ser mi constante intercesora, por su maternal protección en cada momento de mi vida y en el de mi familia.

A la Ing. Neyda Espín, por haber creído en mí, por orientarme con sus conocimientos y consejos. Gracias por su apoyo incondicional, sus palabras de aliento, y su infinita paciencia durante todo el desarrollo de mi tesis.

A mis padres Julio y Luz María quienes con su amor y dedicación siempre me inspiraron para cumplir mis metas. Me dieron el mejor ejemplo de superación, perseverancia, gracias papis por todo su sacrificio, por siempre acompañarme en cada momento de alegría y tristeza, por todos sus consejos y palabras ánimo.

A mi hermano Bryan, por todo su apoyo en cada momento de mi vida, sus consejos. Gracias ñañito por siempre escucharme, eres un gran hermano y amigo.

A mis amig@s que tuve la dicha de conocer en todos estos años, gracias por su apoyo, consejos, por siempre estar ahí para mí, porque de cada uno aprendí el valor de una verdadera amistad.

A las Ing. Carlita Molina, Ing. Fernanda Luje, Ing. Jenny Ávila, Doc. Mauricio Mosquera, por su ayuda la cual siempre me brindaron con mucho cariño y disponibilidad, gracias por su apoyo y palabras de aliento.

A la Doc. Florinella Muñoz, por sus consejos, y por su disponibilidad para ayudarme.

A toda mi familia, tíos, primos, abuelita por todo su cariño, sus palabras de aliento y su apoyo.

A todos los que forman parte del departamento de Bioprocesos en especial a los tesisistas que me brindaron su apoyo y amistad muchas gracias.

DEDICATORIA

A Dios por todas las bendiciones de amor recibidas en mi vida, por darme la oportunidad cada día de seguir amando, luchando, perdonando y mejorando.

A mis queridos papitos, con todo mi amor por confiar siempre en mí. Por enseñarme que no importa cuántas veces te caigas sino cuantas veces te levantas y vuelves a empezar con una enseñanza nueva en la mente y en el corazón.

A mis hermanos Diego y Bryan a quienes amo mucho y los llevo siempre en mi corazón.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	PÁGINA
RESUMEN	xiii
INTRODUCCIÓN	xv
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
1.1. Fermentación láctica	1
1.1.1. Tipos de fermentación láctica	3
1.1.2. Bacteria láctica	4
1.1.3. Composición de medios y condiciones de crecimiento del <i>Lactobacillus</i>	7
1.1.4. Aplicaciones de la fermentación láctica	9
1.2. Proceso biológico de la obtención de quitina	13
1.2.1. Quitina	13
1.2.1.1 Propiedades y aplicaciones de la quitina	14
1.2.1.2 Caracterización de quitina	16
1.2.2. Obtención de quitina	17
1.2.2.1 Proceso químico	18
1.2.2.2 Proceso biológico	19
1.2.3. Ventajas y desventajas del método biológico de obtención de quitina	22
1.2.4. La cáscara de camarón como materia prima	23
1.2.4.1 Morfología de camarón <i>Penaeus vannamei</i>	23
1.2.4.2 Composición de la materia prima	24
1.2.4.3 Carga microbiología de la cáscara	26
1.2.4.4 Producción de camarón la contaminación de sus residuos	27
2. METODOLOGÍA	29
2.1. Estudio del efecto del medio de cultivo en la generación del inóculo	29
2.1.1. Materiales	29
2.1.1.1 Conservación de la cepa <i>Lactobacillus</i>	30
2.1.1.2 Reactivación de la cepa <i>Lactobacillus</i>	30
2.1.2. Diseño experimental	31
2.2. Determinación del efecto del sustrato, la temperatura y el pH en la obtención de quitina	34
2.2.1. Diseño experimental del proceso de fermentación	36
2.2.1.1 Preparación de la materia prima	38
2.2.1.2 Fermentación de la cáscara de camarón	38
2.2.2. Proceso de despigmentación	40
2.2.3. Tratamiento con sosa	40

2.2.4.	Caracterización de la quitina obtenida	41
2.2.4.1	Espectrofotometría de Infrarrojo IR	41
2.2.4.2	Peso molecular de la quitina	42
2.3.	Determinación del proceso más adecuado para la obtención de quitina a partir de la fermentación láctica de la cáscara de camarón	44
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
3.1.	Estudio del efecto del mejor medio de cultivo en la generación del inóculo	45
3.2.	Efecto del porcentaje de sacarosa, temperatura y pH durante el proceso de fermentación con la cáscara de camarón	49
3.2.1.	Tratamiento sin control de pH	49
3.2.1.1	Efecto de la temperatura	54
3.2.1.2	Variación de azúcares reductores durante el proceso de fermentación sin control de pH	57
3.2.2.	Tratamiento con control de pH	60
3.2.2.1	Efecto de la temperatura	63
3.2.2.2	Variación de azúcares reductores durante el proceso de fermentación sin control de pH	66
3.3.	Efecto de sustrato temperatura y pH finalizado el proceso de la fermentación	72
3.3.1.	Efecto en el porcentaje de remoción de proteína soluble	72
3.3.2.	Efecto en el porcentaje de remoción de proteína total	76
3.3.3.	Efecto en el porcentaje de remoción de ceniza	78
3.4.	Proceso de despigmentación	82
3.4.1.	Efecto en el porcentaje de remoción de proteína soluble después de la despigmentación	83
3.4.2.	Efecto en el porcentaje de remoción de proteína total después de la despigmentación	86
3.4.3.	Efecto en el porcentaje de remoción de ceniza después de la despigmentación	89
3.5.	Tratamiento con sosa	93
3.5.1.	Remoción de la proteína soluble	93
3.5.2.	Remoción de la proteína total	97
3.5.3.	Remoción de ceniza	101
3.6.	Análisis global	104
3.7.	Caracterización de la quitina obtenida	106
3.7.1.	Peso molecular de la quitina	106
3.7.2.	Espectrofotometría de infrarrojo en las muestras de quitina	107
3.7.3.	Rendimiento de la quitina	120

3.8. Determinación del proceso más adecuado para la obtención de quitina a partir de la fermentación de la cáscara de camarón	121
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	123
4.1. Conclusiones	123
4.2. Recomendaciones	125
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126
ANEXOS	135

ÍNDICE DE TABLAS

		PÁGINA
Tabla 1.1.	Composición del medio para el <i>Lactobacillus</i>	8
Tabla 1.2.	Uso industrial o comercial del producto final de cada tipo de fermentación	10
Tabla 1.3.	Aplicaciones de las reacciones favorables y desfavorables producto de la fermentación láctica	10
Tabla 1.4.	Composición de la quitina comercial	16
Tabla 1.5.	Caracterización de la materia prima con un pH 7-8	24
Tabla 2.1.	Reactivos utilizados en la parte experimental	29
Tabla 2.2.	Composición del medio de enriquecimiento	32
Tabla 2.3.	Composición del ML1	32
Tabla 2.4.	Composición de ML2	33
Tabla 2.5.	Composición de ML3	33
Tabla 2.6	Diseño experimental con 2 repeticiones para cada tratamiento	36
Tabla 2.7.	Concentración de las disoluciones para una muestra de quitina	42
Tabla 3.1.	Parámetros cinéticos del <i>Lactobacillus delbrueckii</i> a 37 °C a 200 rpm con un pH inicial de 6,5 y pH final de 6,2	47
Tabla 3.2.	Resultados de ATT de los tratamientos sin y con control de pH	68
Tabla 3.3.	Resultados de azúcares reductores de los tratamientos sin y con control de pH	69
Tabla 3.4.	Resultados finales para cada tratamiento luego de los procesos de fermentación, despigmentación y tratamiento con sosa	105
Tabla 3.5.	Peso molecular de los tratamientos	106
Tabla 3.6.	Grupo funcional de la quitina	108
Tabla 3.7.	Rendimiento de la quitina obtenida	120
Tabla AIII.1.	Cantidades para la preparación del reactivo DNS	139
Tabla AIII.2.	Curva de calibración de glucosa	140

Tabla AIV.1.	Cantidades para la preparación del reactivo de biuret	142
Tabla AIV.2.	Curva de calibración de proteína	143
Tabla AVI.1.	Porcentaje de amonio no-ionizado con diferentes pH y temperatura	145
Tabla AVII.1	Concentración de microorganismos en función del tiempo para los medios ML1, ML2, ML3, a 37 °C, pH inicial 6,5, agitación 200 rpm	146
Tabla AVIII.1.	Datos de pH y acidez total titulable (ATT) de los tratamientos S1 y S4 con 0 % de sacarosa	147
Tabla AVIII.2.	Datos de pH y acidez total titulable (ATT) de los tratamientos S2, S6, S3, S5, con 5 % y 10 % de sacarosa	148
Tabla AVIII.3.	Concentración azúcares reductores durante el proceso de fermentación	149
Tabla AVIII.4.	Datos de pH y ATT de los tratamientos S3, S7, S9, S5, S11, C1, con 0 %, 5 % y 10 % de sacarosa	150
Tabla AVIII.5.	Concentración azúcares reductores con control de pH	151
Tabla AIX.1.	Resultados de las medias de 2 repeticiones del % de reducción de ceniza, proteína total, proteína soluble	152
Tabla AX.1.	Datos para la curva de viscosidad relativa vs concentraciones de las disoluciones de quitina	156

ÍNDICE DE FIGURAS

		PÁGINA
Figura 1.1.	Diferentes procesos a partir del piruvato	2
Figura 1.2.	Estructura de la quitina	14
Figura 1.3.	Diagrama del proceso de extracción de quitina a) Proceso Químico b) Proceso Biológico	17
Figura 1.4.	Partes de camarón (C. cefalotoráx, Ab. Abdomen, A. Antenas, P Pleópodos, T. Telson)	23
Figura 1.5.	Cáscara de camarón	24
Figura 1.6.	Velocidad del crecimiento microbiano en función de la temperatura	27
Figura 2.1.	Proceso de inoculación del <i>Lactobacillus</i> para determinar el mejor medio de cultivo	31
Figura 2.2.	Proceso general del efecto del sustrato, temperatura y pH de la obtención de quitina	35
Figura 3.1.	Concentración de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> en función del tiempo en los medios ML1,ML2, ML3 a 37 °C, 200 rpm, pH inicial 6,5	45
Figura 3.2.	Efecto del medio de cultivo sobre la concentración de microorganismos (Medias y 95,0 % de Tukey)	48
Figura 3.3.	pH en función del tiempo para los tratamientos sin control de pH	49
Figura 3.4.	ATT en función del tiempo para los tratamientos sin control de pH	50
Figura 3.5.	Efecto del porcentaje de sacarosa sobre el pH en los tratamientos sin control de pH (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)	54
Figura 3.6.	pH en función del tiempo a las temperatura de 37 °C y 45 °C con 5 % de sacarosa	55
Figura 3.7.	pH en función del tiempo a la temperatura de 37 °C y 45 °C con 10 % de sacarosa	56

Figura 3.8.	Efecto de la temperatura sobre el pH, para los tratamientos sin control de pH (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)	57
Figura 3.9.	Azúcares reductores en función del tiempo sin control de pH	58
Figura 3.10.	Control de pH en un rango de 6 a 5 para los seis los tratamientos	60
Figura 3.11.	ATT en función del tiempo para los tratamientos con control de pH	61
Figura 3.12.	Efecto del porcentaje de sacarosa sobre la acidez total titulable (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)	62
Figura 3.13.	ATT en función del tiempo a la temperatura de 37 °C y 45 °C con 0 % de sacarosa	63
Figura 3.14.	ATT en función del tiempo a la temperatura de 37 °C y 45 °C con 5 % de sacarosa	64
Figura 3.15.	ATT en función del tiempo a la temperatura de 37 °C y 45 °C con 10 % de sacarosa	64
Figura 3.16.	Efecto de la temperatura sobre la acidez total titulable para tratamientos con control de pH (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)	65
Figura 3.17	Concentración de azúcares reductores en función del tiempo con control de pH	68
Figura 3.18.	Efecto del porcentaje de sacarosa sobre la acidez total titulable para los tratamientos con y sin control de pH (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)	70
Figura 3.19.	Efecto del porcentaje de sacarosa sobre los azúcares reductores para los tratamientos con y sin control de pH (Medias y 95,0% de Tukey HSD)	71
Figura 3.20.	Porcentaje de reducción ceniza, proteína soluble y total en función de cada tratamiento de fermentación con y sin control de pH	73
Figura 3.21.	Efecto del porcentaje de sacarosa sobre el porcentaje de reducción de la proteína soluble después de la Fermentación (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)	74
Figura 3.22.	Efecto de la temperatura sobre el porcentaje de reducción de la proteína soluble después de la Fermentación (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)	75

Figura 3.23.	Efecto del pH sobre el porcentaje de reducción de la proteína soluble después de la Fermentación (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)	75
Figura 3.24.	Efecto del porcentaje de sacarosa sobre el porcentaje de reducción proteína de la total después de la Fermentación (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)	76
Figura 3.25.	Efecto de la temperatura sobre el porcentaje de reducción de la proteína total después de la Fermentación (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)	77
Figura 3.26.	Efecto del pH sobre el porcentaje de reducción de la proteína total después de la Fermentación (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)	78
Figura 3.27.	Efecto del porcentaje de sacaros sobre el porcentaje de reducción de ceniza después de la fermentación (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)	79
Figura 3.28.	Efecto de la temperatura sobre el porcentaje de reducción de ceniza después de la fermentación (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)	80
Figura 3.29.	Efecto del control de pH sobre el porcentaje de reducción de ceniza después de la fermentación (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)	81
Figura 3.30.	Despigmentación de la cáscara de camarón con 3,8 % de hipoclorito de sodio	82
Figura 3.31	Porcentaje de reducción de la proteína soluble luego del proceso de despigmentación para los tratamientos con y sin control de pH	84
Figura 3.32.	Efecto del porcentaje de sacarosa sobre el porcentaje de reducción de la proteína soluble después de la despigmentación (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)	85
Figura 3.33.	Efecto de la temperatura sobre el porcentaje de reducción de la proteína soluble después de la despigmentación (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)	85
Figura 3.34.	Efecto del pH después sobre el porcentaje de reducción de la proteína soluble después de la despigmentación (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)	86
Figura 3.35.	Porcentaje de reducción de la proteína total luego del proceso de despigmentación a 20 °C por 30 min con y sin control de pH	87

Figura 3.36.	Efecto del porcentaje de sacarosa sobre el porcentaje de reducción de la proteína total después de la despigmentación (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)	88
Figura 3.37.	Efecto de la temperatura después sobre el porcentaje de reducción de la proteína total después de la despigmentación (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)	88
Figura 3.38.	Efecto del pH sobre el porcentaje de reducción de la proteína total después de la despigmentación (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)	89
Figura 3.39.	Porcentaje de reducción de la ceniza luego del proceso de despigmentación para los tratamientos con y sin control de pH	90
Figura 3.40.	Efecto del porcentaje de sacarosa sobre el porcentaje de reducción de ceniza después de la despigmentación (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)	91
Figura 3.41.	Efecto de la temperatura sobre el porcentaje de reducción de ceniza después de la despigmentación (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)	91
Figura 3.42.	Efecto del pH sobre el porcentaje de reducción de ceniza después de la despigmentación (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)	92
Figura 3.43 (a).	Porcentaje de reducción de la proteína soluble del tratamiento con sosa 0,8 %, 90 °C, por 30 min con y sin control de pH	94
Figura 3.43 (b).	Porcentaje de reducción de la proteína soluble del tratamiento con sosa 0,8 %, 90 °C, por 30 min con y sin control de pH	95
Figura 3.44.	Efecto del porcentaje de sacarosa sobre el porcentaje de reducción de la proteína soluble después del tratamiento con sosa (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)	96
Figura 3.45.	Efecto de la temperatura sobre el porcentaje de reducción de la proteína soluble después del tratamiento con sosa (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)	96
Figura 3.46.	Efecto del pH sobre el porcentaje de reducción de la proteína soluble después del tratamiento con sosa (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)	97
Figura 3.47 (a).	Porcentajes de reducción de la proteína total luego del tratamiento con sosa 0,8 %, 90 °C, por 30 min con y sin control de pH	98

Figura 3.47 (b).	Porcentajes de reducción de la proteína total luego del tratamiento con sosa 0.8 %, 90 °C, por 30 min con y sin control de pH	99
Figura 3.48.	Efecto del porcentaje de sacarosa sobre el porcentaje de reducción de la proteína total después del tratamiento con sosa (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)	100
Figura 3.49.	Efecto de la temperatura sobre el porcentaje de reducción de la proteína total después del tratamiento con sosa (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)	100
Figura 3.50.	Efecto del pH sobre el porcentaje de reducción de la proteína total después del tratamiento con sosa (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)	101
Figura 3.51.	Porcentaje de reducción de la ceniza luego tratamiento con sosa al 0,8 % por 30 min con y sin control de pH	102
Figura 3.52	Efecto del porcentaje de sacarosa sobre el porcentaje de reducción de la ceniza después del tratamiento con sosa (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)	103
Figura 3.53	Efecto de la temperatura sobre el porcentaje de reducción de la ceniza después del tratamiento con sosa (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)	103
Figura 3.54.	Efecto del pH sobre el porcentaje de reducción de la ceniza después del tratamiento con sosa (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)	104
Figura 3.55.	Espectro del tratamiento S2 y su repetición tratadas con: 5 % sacarosa, 37 °C, sin control de pH, junto con el espectro de quitina del software	110
Figura 3.56.	Espectro del tratamiento S3 y su repetición tratadas con: 10 % sacarosa, 37 °C, sin control de pH, junto con el espectro de quitina del software	111
Figura 3.57.	Espectro del tratamiento C4 y su repetición tratadas con: 0 % sacarosa, 45 °C, con control de pH, junto con el espectro de quitina del software	112
Figura 3.58.	Espectro del tratamiento S6 y su repetición tratadas con: 10 % sacarosa, 45 °C, sin control de pH, junto con el espectro de quitina del software	113

Figura 3.59.	Espectro del tratamiento C6 y su repetición tratadas con: 10 % sacarosa, 45 °C, con control de pH, junto con el espectro de quitina del software	114
Figura 3.60.	Espectro del tratamiento C1 y su repetición tratadas con: 0 % sacarosa, 37 °C, con control de pH, junto con el espectro de quitina del software	115
Figura 3.61.	Espectro del tratamiento C3 y su repetición tratadas con: 10 % sacarosa, 37 °C, con control de pH, junto con el espectro de quitina del software	116
Figura 3.62.	Espectro del tratamiento S5 y su repetición tratadas con: 5 % sacarosa, 45 °C, sin control de pH, junto con el espectro de quitina del software	117
Figura 3.63.	Espectro del tratamiento C5 y su repetición tratadas con: 5 % sacarosa, 45 °C, con control de pH, junto con el espectro de quitina del software	118
Figura 3.64.	Espectro del tratamiento C2 y su repetición tratadas con: 5 % sacarosa, 37 °C, con control de pH, junto con el espectro de quitina del software	119
Figura 3.65.	Resultado de los mejores tratamiento S3, S2, C4	122
Figura AI.1.	Cámara NEUBAUER BRIGHT LINE para el contaje directo al microscopio	137
Figura AIII.1.	Curva de calibración de la glucosa	141
Figura AIV.1	Curva de calibración de proteína	143
Figura XII.1	Viscosidad reducida vs la concentración de las diluciones de quitina	157
Figura XII.2.	Color que presenta las muestras que identifican la presencia de azúcares reductores. (Izq. t=0 h hacia Der. 144h), de los tratamientos S2, S3, S5, S6	158
Figura XII.3.	Color que presenta las muestras que identifican la presencia de azúcares reductores. (Izq. t=0 h hacia Der. 144h), de los tratamientos C1, C2, C3, C4, C5, C6	159

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO I	
Contaje directo al microscopio	136
ANEXO II	
Determinación de acidez total titulable	138
ANEXO III	
Determinación de azúcares reductores	139
ANEXO IV	
Cuantificación de proteína soluble (método Biuret)	142
ANEXO V	
Determinación de ceniza A.O.A.C 923.23	144
ANEXO VI	
Porcentaje de amonio no-ionizado	145
ANEXO VII	
Efecto del mejor medio de cultivo en la generación del inóculo	146
ANEXO VIII	
Efecto del porcentaje de sacarosa, temperatura y pH durante el proceso de fermentación de la cáscara de camarón	147
ANEXO IX	
Resultados del efecto del porcentaje de sacarosa temperatura y pH después del proceso de fermentación, despigmentación y tratamiento con sosa	152
ANEXO X	
Peso molecular de la quitina	155
ANEXO XIII	
Azúcares reductores del proceso de fermentación sin control de pH	158
ANEXO XIV	
Azúcares reductores del proceso de fermentación con control de pH	159

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue definir el proceso de fermentación láctica de la cáscara de camarón con *Lactobacillus delbrueckii* para la obtención de quitina. Para esto, primero se estudió el efecto del medio de cultivo en la generación del inóculo; se trabajó con tres medios en los que se inoculó el 5 % del *Lactobacillus delbrueckii* y se incubó con agitación a 37 °C por 12 horas. Se determinó la cinética de crecimiento por conteo directo al microscopio (Orozco y Solarte, 2003, pp. 78-88; Rodríguez et al., 2005, p. 744). Se realizaron dos repeticiones y se seleccionó el alcanzó una concentración de 10^8 microorganismos por mililitro en el menor tiempo.

Una vez escogido el mejor medio de cultivo, se determinó el efecto del sustrato, pH y temperatura en el proceso de fermentación láctica, mediante un diseño experimental 3x2x2, con tres sustratos (cáscara + 0 % sacarosa; cáscara + 5 % sacarosa; cáscara + 10 % sacarosa), dos temperatura (37 °C y 45 °C) y dos condiciones de pH (con control, sin control). Para cada tratamiento se determinaron el % acidez total titulable (ATT) y azúcares reductores por los métodos: A.O.A.C 937.05, (1997) y DNS, respectivamente.

Para el proceso de fermentación se colocaron 150 g de cáscara húmeda al 85 %, a 37 °C, con agitación por 144 horas, en el biorreactor (Bigtron Smart GX), se fijaron las condiciones del proceso según el tratamiento correspondiente. Al finalizar el proceso se realizó la despigmentación de la cáscara con hipoclorito de sodio 3,8 % por 30 min, en una relación p/v: 5:1, y finalmente, la cáscara despigmentada pasó a un tratamiento con NaOH al 0,8 % por 30 min a 90 °C.

Se determinó proteína soluble, proteína total y ceniza en la cáscara antes de los tratamientos, y al finalizar la fermentación, la despigmentación y la alcalinización, con el objetivo de determinar los grados de desmineralización y desproteínización sufridos por la cáscara en cada etapa. Con los resultados se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una comparación de medias por el método de Tukey. Finalmente, se determinó el peso molecular de la quitina y se realizó un análisis de infrarrojo para determinar los grupos funcionales característicos de la quitina.

Los tratamientos que presentaron mejores resultados al finalizar el proceso global fueron S3 (sin control de pH a 37 °C y 10 % de sacarosa) con una reducción del porcentaje de ceniza de 98,45 %, proteína soluble 99,89 %, proteína total de 55,26 %, seguida de los tratamientos S2 (sin control de pH a 37 °C y 5 % de sacarosa), C4 (con control de pH, a 45 °C y 0 % de sacarosa), con porcentajes de ceniza de 98,73 %, 91,81 %, de proteína soluble de 83,07 %, 91,86 %, y proteína total de 40,30 %, 44,95 %, respectivamente. El análisis de los espectros infrarrojos sugiere que se obtuvo quitina y que el ensanchamiento de la banda entre los 2000 y 3000 cm^{-1} se debe a que no se logró una desproteinización ni desmineralización total. El peso molecular de la quitina obtenida estuvo entre $1,52 \times 10^6$ y $2,66 \times 10^6$ g/mol. Los tratamientos sin control de pH favorecieron la obtención de quitina con mayor peso molecular.

INTRODUCCIÓN

En el presente trabajo se determinaron las condiciones de fermentación láctica a escala laboratorio como un paso inicial de un proyecto de investigación enfocado a la definición del proceso de obtención de quitina, para contribuir con una posible solución a los problemas ambientales generados por los desechos de camarón.

La quitina se encuentra en el caparazón de diversas especies de crustáceos (cangrejo, langosta, camarón), insectos, paredes de hongo y es considerada el segundo polímero de cadena larga de mayor abundancia en la naturaleza. La quitina está compuesta por pigmentos, proteína, astaxantina y calcio. La cáscara de camarón representa una fuente importante de quitina ya que contiene entre 17% y 33 % de la misma (Merzendorfer y Zinoch, 2003, p. 4 393; Rodríguez et al., 2009, pp. 307-317; Morillo, Montiel, Belandria y Mújica, 2006, pp. 71-83).

La quitina tiene diversas aplicaciones en los campos alimenticios, farmacéutico, polímeros, textiles, tratamiento de efluentes industriales, agricultura, cosmética, agrícola y biotecnología (Synowiecki y Al-Khateeb, 2003, pp. 145-171). Además, es precursor de otro polímero denominado quitosano, cuyos usos tienen relevancia en el campo de la medicina y alimentos (Morillo et al., 2006, pp. 71-83).

En el Ecuador la cáscara de camarón se desecha y apenas el 3 % de estos desechos son usados para la elaboración de harina y balanceado para la dieta alimenticia de los peces y moluscos, el 97 % restante de estos desechos son eliminados en ríos cercanos, aguas costeras, rellenos sanitarios o botaderos, convirtiéndose en un foco de contaminación por su lenta degradación, lo que trae como consecuencia un problema medio ambiental (Luna, 2012, p. 23).

La industria camaronera en el Ecuador ha registrado un crecimiento; en el año 2010 se exportaron 103 750 toneladas y en el 2013 la exportación se incrementó a 204 539 toneladas (Banco Central de Ecuador, 2015, p. 3). Según Morillo et al. (2006), el 36 % de la producción de camarón corresponde a desechos sólidos, de los cuales el 40 % representa la cabeza y la cáscara del camarón (pp. 71-83).

Al incrementarse la producción de camarón, también el problema ambiental se incrementa. Esta situación se reporta en todos los países productores de camarón, por esta razón se han realizado estudios para ocupar el desecho y darle un valor agregado. La obtención tradicional consiste en un proceso químico con: HCl 1,2 M a 100 °C, NaOH 1 M a 110 °C, métodos que han tenido buenos resultados en rendimiento pero son agresivos, producen corrosión de los equipos, y para el proceso se requieren grandes cantidad de agua y de energía (Bajaj, Winter y Gallert, 2011, p. 52; Hernández, Varo, Leyva, Ramírez, Delgado y Andrade, 2008, pp. 659-666).

Se han realizado estudios para desarrollar procesos más amigables con el ambiente. Uno de ellos es la fermentación láctica de los desechos de camarón con el género de bacterias *Lactobacillus*, entre ellas se encuentran *L. helveticus*, *L. plantarum* y *L. paracasei*; este proceso es tecnológicamente flexible y seguro (Adour, Arbita, Amarane y Mamen, 2008, pp.1 664-1 669; Jung, Jo, Kuk y Kim, 2006, pp. 234-237; Prameela, Murali y Hemalatha, 2010, pp. 2 888-2 889). Mediante el proceso de fermentación se busca la reducción del porcentaje de ceniza y proteína que se da por la producción de ácido láctico, presente en la cáscara, para lograr desproteínizar y desmineralizar el sustrato y dejar solo quitina como producto. En este se utilizó como sustrato caparazones de camarón enriquecido con glucosa, jugo de caña, sacarosa, etc; la temperatura de trabajo para realizar este proceso de fermentación estuvo entre 30 °C y 47 °C (Adour et al., 2008, pp. 1 664-1 669). Sin embargo estudios en los cuales el comportamiento de pH y la influencia de temperatura no se habían realizado por lo que en este trabajo se evaluarán.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 FERMENTACIÓN LÁCTICA

Por muchos años, la definición de fermentación se relacionó con la producción de bebidas alcohólicas como la cerveza o el vino, y con la elaboración de yogurt a partir de la leche. El descubrimiento de estas aplicaciones estableció a la fermentación como un proceso que genera productos alimenticios, con características organolépticas especiales, como resultado de la acción de los microorganismos. Aun cuando los productos fermentados fueron descubiertos por civilizaciones como la egipcia, o griega; no fue sino hasta finales de los 1800s que se descubrió que estos cambios organolépticos eran producidos por microorganismos, cuando Pasteur, por requerimiento de unos comerciantes franceses que le pidieron que investigue la producción de acidez en el vino y la cerveza que deseaban transportar en barcos, descubrió los microorganismos llamados levaduras, que convertían los azúcares en alcohol, en ausencia de oxígeno, dando las propiedades organolépticas del vino (Tortora, Funke y Case, 2007, pp. 134-140). A partir de este descubrimiento, apareció el concepto de fermentación, definido como un proceso metabólico totalmente anaeróbico que libera energía por el consumo de azúcar u otros compuestos orgánicos y con la generación de productos específicos como alcohol, CO₂, ácido láctico, etc. dependiendo del microorganismo que actúe. Cuando en el proceso intervienen bacterias lácticas y se obtiene como producto principal ácido láctico; el proceso se denomina fermentación láctica (Tortora et al, 2007, pp. 134 -140).

Cuando surgió la rama de la biotecnología como resultado del estudio de la acción de los microorganismos, se sugirió definir a la fermentación como cualquier reacción bioquímica, que dé como resultado productos de interés industrial, y en los años 80 se trató de reemplazar el término de fermentación por el de biorreacción o biotransformación. Sin embargo, siempre que se habla de fermentación láctica se relaciona directamente con formación de productos por la intervención de las

bacterias lácticas (Gil-Horán, Dominguéz-Espinosa, Pacho-Carrillo, 2008, pp. 79-90).

Para obtener ácido láctico por fermentación se requiere piruvato o ácido pirúvico, que se obtiene por la degradación de la glucosa u otros azúcares, que en la mayoría de los casos se da por glucólisis, en condiciones anaeróbicas o aeróbicas en el citoplasma de las células eucariotas o procariotas (Prescott et al., 2002, pp. 185 - 187).

Una vez obtenido el piruvato, este puede ser metabolizado en ausencia o presencia de oxígeno. Cuando el piruvato toma la ruta metabólica con presencia de oxígeno se produce dióxido de carbono y H_2O , es decir sigue la vía del ciclo de Krebs; pero si las células no requieren oxígeno, entonces el piruvato ingresa al proceso de fermentación láctica dando ácido láctico o al de fermentación alcohólica generando etanol (Prescott et al., 2002, pp. 184-187). Este proceso se esquematiza en la Figura 1.1.

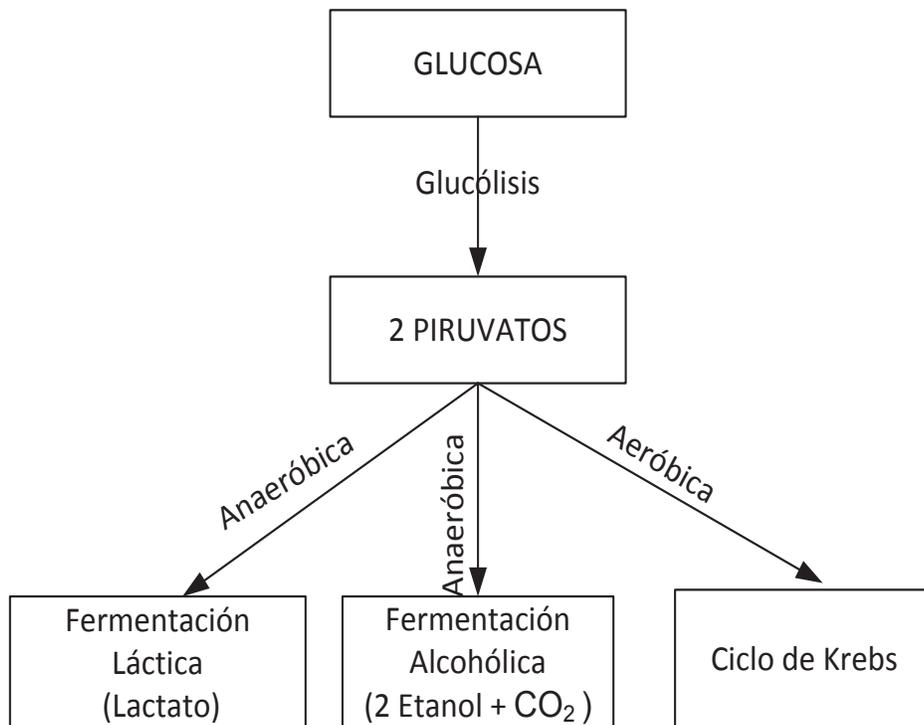


Figura 1.1. Diferentes procesos metabólicos a partir del piruvato

1.1.1 TIPOS DE FERMENTACIÓN LÁCTICA

Existen dos tipos de fermentación láctica:

a) Homoláctica, es aquella en la que se obtiene como producto final del 85 % al 97 % de ácido láctico o lactato, por la reducción del piruvato con la ayuda de la enzima lactato deshidrogenasa. Este tipo de fermentación está dada, generalmente, por las especies de microorganismos *Lactobacillus (delbrueckii, plantarum, bulgaricus, farciminis, gasseri, helveticus, jensenii, ruminis, shapeae, etc)*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Pediococcus*. Existen bacterias homolácticas estrictas, las que requieren condiciones específicas de concentración de azúcares para producir la fermentación (Alais, 2003, p. 360; Madrid, 2001, pp. 79-80; Prescott, 2002, pp. 318-319; Parra, 2010, pp. 1-13).

Según Madrid (2001), la vía de fermentación homoláctica se presenta especialmente en la elaboración de queso fresco, donde la generación de productos adicionales al ácido láctico influyen considerablemente en la calidad (pp. 79-80).

b) Heteroláctica, es aquella en la que no solo se obtiene ácido láctico como producto final, sino también dióxido de carbono, ácidos volátiles, ácido acético y otros compuestos. La producción de ácido láctico es del 50 % y los microorganismos más comunes en este proceso son *L. lycopersici*, *L. manniopoeus*, *L. acidphil-aerogenes*, *L. fermentum*, *L. fructosus*, *L. Kefir*, y *Leuconostoc* (Parra, 2010, pp. 1-13; Prescott, 2002, pp. 318-319).

La vía de fermentación heteroláctica es empleada especialmente en la elaboración de yogurt y queso especial, al fermentar la lactosa se transforma en ácido láctico, diacetilo, anhídrido carbónico, compuestos que dan el sabor y aroma particular del producto. Las bacterias que intervienen en este proceso son los *Streptococcus* y *Leuconostoc citrovorum*. La misma vía de fermentación se presenta en *Leuconostoc* para el curado de productos cárnicos y en los *Streptococcus agalactice* que provoca la mastitis de la vaca (Madrid, 2001, pp. 79-80).

1.1.2 BACTERIAS LÁCTICAS

Se denominan bacterias lácticas aquellas que producen ácido láctico por la fermentación de azúcares. Las bacterias lácticas se caracterizan por ser gram positivas, aerotolerantes, anaerobias facultativos, microaerófilas, no esporuladas, acidotolerantes, de metabolismo quimioorganotrofo. Al verlas al microscopio tienen forma de cocos o bacilos. Este tipo de bacterias no tolera temperaturas mayores a 72 °C durante 15 min. Por miles de años el yogurt y el queso se ha elaborado con la intervención de las bacterias lácticas (Woese, 2006, pp. 3-23).

El estudio de las bacterias lácticas se inició con Joseph Lister, quien aisló un cultivo puro de *Bacterium lactis*. Para el año 1900 Hery Tissier aisló a la bifidobacteria de las heces de un recién nacido y le denominó *Bacillus bifidus*. Estas dos bacterias producían ácido láctico y por eso se les consideró en el grupo de las bacterias ácido lácticas (Woese, 2006, pp. 3-23).

En 1917 se propuso la formación de la familia *Lactobacillaceae* con las siguientes características: bacilos largos, delgados, gram positivos, no esporulados, productoras del ácido láctico por la fermentación de azúcares; pero se comprobó que también producían CO₂ (Woese, 2006, pp. 3-23).

Tanto las *Bifidobacteriaceae* como *Lactobacillaceae* fueron clasificadas como bacterias lácticas, por su capacidad en la producción de ácido láctico; pero se encontraron diferencias a nivel celular y en la composición de la pared celular. Para los años 70 se realizaron estudios de ARN ribosómico que permitieron establecer que las *Bifidobacteriaceae* no tenían las mismas características que las *Lactobacillaceae* (Woese, 2006, pp. 3-23).

Actualmente se acepta la existencia de los dos grupos *Bifidobacteria* y *Lactobacillaceae*; sin embargo, todavía existe la confusión y es común encontrar a los dos tipos como bacterias lácticas (Woese, 2006, pp. 3-23).

Las bacterias lácticas son abundantes y se encuentran en muchos hábitats, en especial en el tracto intestinal, y respiratorio del cuerpo humano. También se encuentran en los alimentos como los cárnicos fermentados, bebidas, vegetales fermentados, aguas residuales, quesos, embutidos, vinos y helados. Estas bacterias han desarrollado un mecanismo de protección natural contra los microorganismos patógenos y por esta razón son consideradas como beneficiosos para la salud (Boyle, Robins y Tang, 2006, p. 1 256).

Existen varias especies de bacterias lácticas, pero entre las más estudiadas se encuentran:

a) *Lactobacillus bulgaricus*, es una bacteria gram positiva, homofermentativa, el rango de temperatura donde presenta un mayor crecimiento se encuentra entre 40 °C y 45 °C, a temperaturas menores a 10 °C el microorganismo se inhibe. Se considera que el *L. bulgaricus* es una bacteria viable a nivel intestinal y es de ayuda en el tratamiento de enfermedades como gastroenteritis aguda o inflamación intestinal (Boyle et al., 2006, p. 1256, Hernández, Alfaro y Arrieta, 2003, p. 71).

b) *Lactobacillus delbrueckii*, Friedman y Gaden (2007), mencionan que el crecimiento se da en ausencia de oxígeno, aunque no lo consideran como un microorganismo anaerobio estricto. Tiene un alto grado de tolerancia a pH menores a 5, y es por esto que la tasa producción de ácido láctico decrece a estos valores de pH pero la fracción de azúcar convertido en ácido láctico incrementa (pp. 961-964).

Según Friedman y Gaden (2007), la temperatura a la que se da un crecimiento del *L. delbrueckii* es entre los 42 °C y 45 °C, a condiciones de pH constante de 5,8 (p. 963).

García et al. (2010) encontraron que el rango de temperatura para el crecimiento de este microorganismo está entre los 20 °C a 40 °C, cuando no existe un control de pH. La mayor producción de ácido láctico se obtiene al trabajar con una temperatura de 37 °C (pp. 1-18).

Para Friedman y Gaden (2007), el *L. delbrueckii* es un microorganismo que requiere en su medio de cultivo cualquiera de los siguientes sustratos: sacarosa, extracto de levadura (que se reducen a monosacáridos) y sales minerales. Un medio altamente enriquecido con suero de sangre de res incrementa la producción de ácido láctico (p. 961).

c) *Lactobacillus farciminis*, su crecimiento se da en presencia de 10 % de cloruro de sodio, en ocasiones requiere 12 % del mismo. Visto al microscopio tiene forma de varilla y se unen en cadenas cortas (Vos, Garrity, Jones, Krieg, Ludwing, Rainey y Whitman, 2011, p. 494).

d) *Lactobacillus casei*, son microorganismos heterolácticos aislados del queso, leche y tracto intestinal. Para su crecimiento en el medio de cultivo se requiere riboflavina, pantotenato de calcio y tiamina. Estos *lactobacillus* vistos al microscopio tienen forma de varilla en un tamaño entre 0,7-1,1 a 2,0-4,0 μm (Vos, Garrity, Jones, Krieg, Ludwing, Rainey y Whitman, 2011, p. 494).

e) *Lactobacillus paracasei subs. Paracasei*, son bacterias en forma de varilla con un tamaño de 0,8 a 4,0 μm . Se los aísla de aguas residuales, y de leche expuesta al sol. El rango de temperatura de crecimiento está entre 10 °C y 37 °C, cuando se sobrepasa los 40 °C el microorganismo se inhibe (Vos et al., 2011, p. 504).

f) *Pediococcus acidilactici*, esta especie presenta un crecimiento en un pH entre 4,2 y 8,0 en un rango de temperatura de 50 °C a 53 °C. Las cepas mueren a los 10 min de estar sometidas a una temperatura mayor a 90 °C. El medio de cultivo de crecimiento requiere de 9 % a 10 % (w/v) de NaCl (Vos et al., 2011, p. 518).

g) *Lactobacillus acidophilus*, son aisladas del vino y tracto intestinal de humanos y animales. Cultivadas en agar, tienen un aspecto áspero y contornos borrosos. Uno de los requerimientos esenciales para su crecimiento es la presencia de calcio y riboflavina en el medio de cultivo (Vos et al., 2011, p. 491).

h) *Lactobacillus helveticus*, la máxima temperatura de crecimiento que puede tolerar es de 52 °C. En agar de lactosa las colonias se muestran grises y viscosas. El *L. helveticus* se aísla del queso gruyere, y del queso emmental (Vos et al., 2011, p. 499).

Las especies de *Lactobacillus* como *L. helveticus*, *Pediococcus acidilactici*, *L. paracasei sub. Paracasei* han sido utilizadas en los últimos años para la fermentación láctica en desechos de crustáceos con buenos resultados en la extracción de quitina (Adour et al., 2008, pp. 1 664-1 669; Bhaskar, Suresh, Sakhare y Sachindra, 2007, pp. 1 427-1 434).

1.1.3 COMPOSICIÓN DE MEDIOS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO DEL *LACTOBACILLUS*

Las condiciones que se deben tomar en cuenta para la fermentación de estas bacterias son: el porcentaje del inóculo (v/w), la composición de los medios, tiempo de incubación, pH, agitación y temperatura (Bhaskar et al., 2007, pp. 1 427-1 434).

Para el crecimiento de los microorganismos el medio debe cumplir con todos los requerimientos nutricionales, para esta especie es necesaria la presencia de nitrógeno orgánico contenido en: proteínas, péptidos, aminos y micronutrientes (Calderón Martínez, Sánchez y Zulatto, 2013, p. 135). Entre los minerales requeridos están: calcio, fósforo, magnesio, y trazas de hierro, sodio, cromo, zinc, níquel (Baati, Roux, Dahhou y Urbalarrea, 2004, pp. 137-140).

Los estudios realizados por Calderón et al. (2013), para determinar la influencia del medio de cultivo en el crecimiento del *Lactobacillus* demuestran que las sales incrementan la masa celular y proponen el uso del medio presentado en la Tabla 1.1.

En este medio las velocidades específicas de crecimiento de *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. lactis*, *L. delburcki*, reporta una velocidad específica de crecimiento 0,24 h⁻¹, 0,30 h⁻¹, 0,22 h⁻¹, 0.30 h⁻¹ respectivamente (p. 142).

Tabla 1.1. Componentes del medio de crecimiento para *Lactobacillus sp.*

Componentes	(g/L)
Extracto de carne	10
Peptona de carne	10
Extracto de levadura	5
Lactosa	60
Acetato de sodio	5
Poliborato 80	1
Fosfato de potasio	2
Citrato de amonio	2
Sulfato de magnesio	0,1
Sulfato de manganeso	0,05

(Calderón, 2013, p. 142)

Otro factor importante en los procesos fermentativos es el porcentaje de inóculo; el mismo que debe estar entre 4 % y 5 % para los géneros de *Lactobacillus*, ya que los estudios demuestran que un incremento del porcentaje de inóculo de 2 % a 5 % disminuye la fase de adaptación en 2 horas (Okpokwasili y Nweke, 2005, p. 305; Gupta, 2010, p. 1 016).

Bhaskar et al. (2007) establecieron que con un 5 % de inóculo, agitación constante de 200 rpm, la fermentación láctica con *Pediococcus acidolactici* es óptima, en 96 horas se alcanza un pH=4,3 (pp. 1 427-1 434).

Así como el inóculo, la temperatura y el pH de trabajo influyen significativamente en la fermentación láctica.

Baati et al. (2004) mencionan que la temperatura de crecimiento del *Lactobacillus* está en un rango de 29-50 °C; así en la fabricación de bebidas la temperatura óptima es de 35 °C, en la obtención de yogurt a nivel industrial se trabaja a 40 °C, y en otros casos las temperaturas de crecimiento son mayores a 45 °C (*Lactobacillus bulgaricus*) y a temperaturas mayores a 35 °C (*L. fermentum*, *L. acidophilus*), cuando la temperatura es menor a este rango la cepa de *Lactobacillus* permanece en la fase de adaptación (pp. 137-140).

Se puede deducir que cada especie de bacteria láctica tiene temperatura de trabajo diferente (Parra, 2010, pp. 1-13).

En cuanto a la influencia del pH en la fermentación láctica, los estudios desarrollados por Vos et al. (2011), demuestran que las especies de *Lactobacillus* disminuyen su crecimiento cuando se tiene un pH menor a 4 o cercano a 7, pero, es óptima cuando el pH del medio está entre 5,5 y 6,2 (pp. 490-520).

1.1.4 APLICACIONES DE LA FERMENTACIÓN LÁCTICA

La fermentación es de gran utilidad en la industria de alimentos tanto como método de conservación porque inhibe las bacterias que producen putrefacción, como en la elaboración de productos alimenticios con características organolépticas únicas (Alais, 2003, p. 360).

La fermentación láctica es un ejemplo de ello, y los microorganismos de varias especies de *Lactobacillus* son los más estudiados para la obtención de nuevos

productos de uso industrial o comercial. En la Tabla 1.2 se presentan los alimentos obtenidos por fermentación láctica.

Tabla 1.2. Uso industrial o comercial del producto final de cada tipo de fermentación

Producto final de la fermentación	Microorganismo	Sustrato	Uso industrial o Comercial
Ácido láctico	<i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> (bacterias)	Leche	Queso, Yogurt
	<i>Lactobacillus delbruckii</i> (bacteria)	Cereal en granos, azúcar	Pan de centeno
	<i>Lactobacillus plantarum</i> (bacteria)	Repollo	Chucrut
	<i>Pediococcus</i> (bacteria)	Carne	Salchicha ahumada

(Tortora et al, 2007, pp. 134 -140)

Cuando se realiza el proceso de fermentación con el uso de microorganismos se presentan reacciones favorables con las que se tienen nuevas aplicaciones, pero también se presentan reacciones desfavorables que deterioran a los alimentos y bebidas, como se muestra en la Tabla 1.3.

Tabla 1.3. Aplicaciones favorables y desfavorables producto de la fermentación láctica

Aplicaciones favorables	Productos de la fermentación láctica
Producción de masa ácida (Industria panadera)	Cerveza y otras bebidas malteadas que tienen sabor de miel, precipitados, agriado, y de aspecto enturbiado
Producción de reacción ácida (Industria de fermentación)	Fermentación butanol-acetona con rendimientos reducidos
Producción de antibióticos	Curado de encurtidos

Tabla 1.3. Aplicaciones de las reacciones favorables y desfavorables producto de la fermentación láctica (**continuación**)

Aplicaciones favorables	Productos de la fermentación láctica
Fermentaciones de salmueras de pepinillo, aceitunas, etc.	Industria de destilación
Levantado de mantequilla	Productos cárnicos (verdeado interior, verdeado superficial, turbideces)
Elaboración de queso	Agriado de la leche
Fabricación de dextrano	Concentrados de jugo de naranja (olor de suero de mantequilla, agriado)
Leches fermentadas (acidófila, búlgara, cultivada, kéfir, kumis, yogurt, etc..)	Formación de mucílagos (en jamones, salchichas, bolonia)
Fabricación de productos cárnicos	Productos encurtidos en vinagre (enturbiamiento)
Valoraciones microbiológicas (aminoácidos, vitaminas del complejo B)	Precipitados, agriado, enturbiamiento (vino)
Elaboración de coles ácidas, fabricación de salsa de soja	Formación de mucílagos (en refinería de azúcares)

(Parra, 2010, pp. 1-13)

Con la producción de reacciones favorables se mejoran las características organolépticas como: sabor, olor, textura de los alimentos producidos por la industria alimenticia (Parra, 2010, pp.1-13).

En la fermentación láctica se produce un compuesto de alto valor comercial que es el ácido láctico, un 90 % de este ácido se da por la producción biotecnológica mediante la fermentación con sustratos como la sacarosa de la remolacha, el suero de leche, caña de azúcar, lactosa, sacarosa refinada, minerales, y otros sustratos no puros, menos utilizados, que se han analizado por su bajo costo y fácil disponibilidad como son: las mazorcas de maíz, residuos de madera, melaza de caña, fibras de alfalfa, almidón de yuca, salvado de trigo entre otras. La

fermentación láctica se da mediante las especies gram positivas como: *Streptococcus*, *Leuconosloc*, *Lactobacillus* que son consideradas bacterias homofermentativas, ya que tienen una producción exclusiva de ácido láctico. Este proceso depende de los siguientes factores: temperatura, pH, agitación y recirculación o inmovilización del microorganismo (Serna y Rodríguez, 2005, pp. 54-65; Jackymec, et al., 2001, pp. 53-59).

Para la producción de ácido láctico a gran escala el microorganismo que se utiliza con mayor frecuencia es *L. delbrueckii* por su efectividad para consumir la glucosa, lactosa y sacarosa. El proceso se optimiza si al medio se añaden suplementos vitamínicos, cuando se finaliza el proceso fermentativo el pH es elevado a 10 para solubilizar el lactato de calcio y la temperatura a 90 °C para coagular la proteína (Serna y Rodríguez, 2005, pp. 54-65).

Como se observa en la Tabla 1.3 el uso tradicional de la fermentación es para la producción de bebidas, alimentos, ácido láctico u otros ácidos que son las más conocidas a nivel comercial e industrial, pero existen otras aplicaciones que se describen a continuación (Tortora et al., 2007, pp. 134-140).

La investigación realizada por Minor-Pérez (2002), destaca la aplicación de la fermentación láctica en la carne de cerdo con el uso de dos bacterias liofilizadas *Staphylococcus carnosus* y *Lactobacillus alimentarius*,, estas dos cepas puras producen compuestos orgánicos y bacteriocinas, que ayudan a inhibir a las bacterias patógenas como la *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* y *Bacillus cereus* (pp. 73-80).

Tradicionalmente, la fermentación láctica se ha empleado para la producción de alimentos; sin embargo existen otras aplicaciones que en los últimos años han sido motivo de varias investigaciones (Tortora et al, 2007, pp. 134 -140); entre ellos se destacan los siguientes: los ensilados que se utilizan para la conservación de cosechas húmedas por la disminución del pH, producto de la fermentación láctica natural a partir de los carbohidratos presentes en los vegetales. Las especies más

empleadas en el ensilaje son: *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Periococcus*, *Lactobacillus Buchneri* (Parra, 2010, pp. 1-13).

La obtención de alimentos probióticos contienen microorganismos activos que ofrecen una serie de beneficios para la salud, entre los que se incluye la contribución al equilibrio de la microflora intestinal, el fortalecimiento del sistema inmune, la disminución del colesterol y la eliminación de toxinas. En 1990 Conway determinó que son microorganismos probióticos *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. Buegaricus*, *L. plantarum*, *streptococcus cremoris*, *S. faecium*, *S. discetylactis*, *S. intermedius*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium*, *B. adolescentis*, *B. infantis* (Parra, 2010, pp. 1-13).

Los estudios realizados por Adour et al. (2008); Bhaskar et al. (2007); Cira et al. (2010); y Jung et al. (2006); muestran la aplicación de la fermentación láctica con diferentes bacterias (*L. Helveticus*, *Pediococcus ácido lactici*, *Lactobacillus sp. Cepa B2*, *L. paracasei*) para la extracción de quitina a partir de desechos de crustáceos como: cáscara de camarón, caparazón del langostino y cangrejos (pp. 1 664-1 669; pp. 1 427-1 434, pp. 1 359-1 366, pp. 234-237).

1.2 PROCESO BIOLÓGICO DE LA OBTENCIÓN DE QUITINA

1.2.1 QUITINA

La quitina es un polímero de cadena larga que se encuentra principalmente en los caparazones de artrópodos, crustáceos (cangrejos, camarón, langostinos), insectos, pared celular de los hongos, algas unicelulares (*Cyclotella cryptica* y *Thalassiosira fluviatilis*), conjuntamente con proteínas, pigmentos, astaxantina y calcio que no se aíslan con facilidad (Merzendorfer y Zinoch, 2003, pp. 4 393-4 396; Rodríguez et al., 2009, pp. 307-317).

Debido a su abundancia en la naturaleza, ocupa el segundo lugar de los polímeros naturales. Las cadenas de la quitina forman una red cristalina de microfibrillas que se encuentra inmersa en una matriz de polisacáridos (Lárez, 2003, pp. 91-109). La estructura química de la quitina se presenta en la Figura 1.2, es una cadena del monómero N-acetil-D-glucosamina, y su estructura es similar a la celulosa (Lárez, 2003, pp. 91-109).

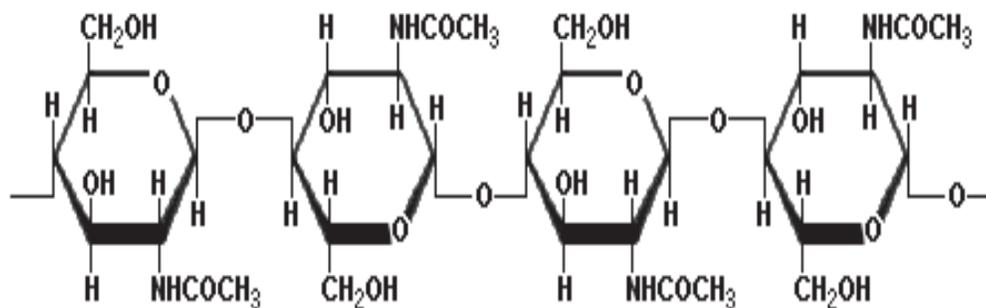


Figura 1.2. Estructura primaria de la quitina

(Harish y Tharanathan, 2007, pp.117-131)

1.2.1.1 Propiedades y aplicaciones de la quitina

La quitina puede tener de aspecto blanco o blanco amarillento, dependiendo de la fuente de obtención, es inelástica, dura, insoluble en algunos disolventes orgánicos, agua, ácidos y álcalis de bajas concentraciones. En los años 70 se encontró que la quitina es soluble en ácido metanolsulfúrico, N-N' - dimetilacetamida con 5 % de LiCl, exafluorisopropanol, y en 1-2 dicloroetano con ácido tricloroacético (35/65) (Cahú, et al., 2012, pp. 570-577).

Tiene gran importancia industrial por sus diversas aplicaciones encontradas y en varias industrias, así (Synowiecki y Al-Khateeb, 2003, pp. 145-171):

a) Medicina y Farmacia: Por su bioactividad, biodegradabilidad y capacidad antibacteriana es usada para cicatrización, como anticoagulante sanguíneo, en

vendajes, en cremas anti-bactericidas, para aliviar quemaduras, como generador de pérdida de peso, en tratamiento de enfermedades de los huesos, y en la fabricación de hilos quirúrgicos absorbible para suturas.

b) Alimenticia: Por sus características funcionales, inocuidad, se emplea como clarificante de jugos, vinos y otras bebidas. Por su actividad antimicrobiana es utilizado como conservante.

c) Polímeros: Una de sus aplicaciones más relevantes es su uso en plásticos biodegradables.

d) Textil: Mejora la textura en las lanas, fija mejor el color en las telas.

e) Tratamiento de efluente industriales: Se usa como resina, ya que tiene carga positiva y por lo tanto atrapa metales pesados y contaminantes como DDT, PCB's, y ciertos colorantes; además se emplea en la detección de fenoles y en la recuperación de metales sólidos como proteínas y polisacáridos (Rinaudo, 2006, pp. 603 - 632).

f) Cosmética: En la elaboración de shampoo, cremas de afeitar, esmalte de uñas, loción de baño, pastas e hilos dentales.

g) Agricultura: En la obtención de fertilizantes para protección de la planta y semillas, y como fungicida.

h) Biotecnología: Principalmente en la Inmovilización de las enzimas y en la obtención de fibras de quitina para usarlas como aglutinantes en la elaboración de papel.

Aun cuando la quitina tiene muchas aplicaciones, esta se emplea principalmente para obtener quitosano, un polímero que tiene más de 200 aplicaciones directas en alimentos, agricultura, medio ambiente, etc., siendo la más destacada medicina por

las propiedades terapéuticas para enfermedades crónicas (Harish y Tharanathan, 2007, pp. 117-131).

1.2.1.2 Caracterización de la quitina

En la Tabla 1.4 se muestra las características de la quitina.

Tabla 1.4. Composición de la quitina comercial

Parámetros	Cantidad
Peso Molecular	1*10 ⁶ a 2,5*10 ⁶ g/mol
Proteína	6-7 %
Humedad	2-10 %
Ceniza	<2 %

(Pillai, et al., 2009, pp. 641-678)

El peso molecular de la quitina se determina fácilmente mediante la determinación de la viscosidad y la aplicación de la ecuación de Mark–Houwink (1.1) que presenta una relación entre la viscosidad intrínseca y el peso molecular.

$$[\eta] = kM^a \quad [1.1]$$

Donde

$[\eta]$ = Viscosidad Intrínseca (dL/g)

k y a = Constantes polímero–disolvente

M = Peso Molecular (g/mol)

La caracterización de la quitina se complementa en el análisis de espectrometría de infrarrojo. El espectrofotómetro utiliza la transformada de Fourier para identificar las vibraciones donde se encuentran los grupos funcionales, en especial carboxilo

y amida, característicos de la quitina de cada muestra, en un rango de 4 000 a 500 cm^{-1} (Cocoletzi, Águila, Flores, Viveros y Ramos, 2009, p. 57-60).

1.2.2 OBTENCIÓN DE QUITINA

La obtención de quitina se puede realizar por un proceso químico o uno biológico, tal como se muestra en la Figura 1.3.

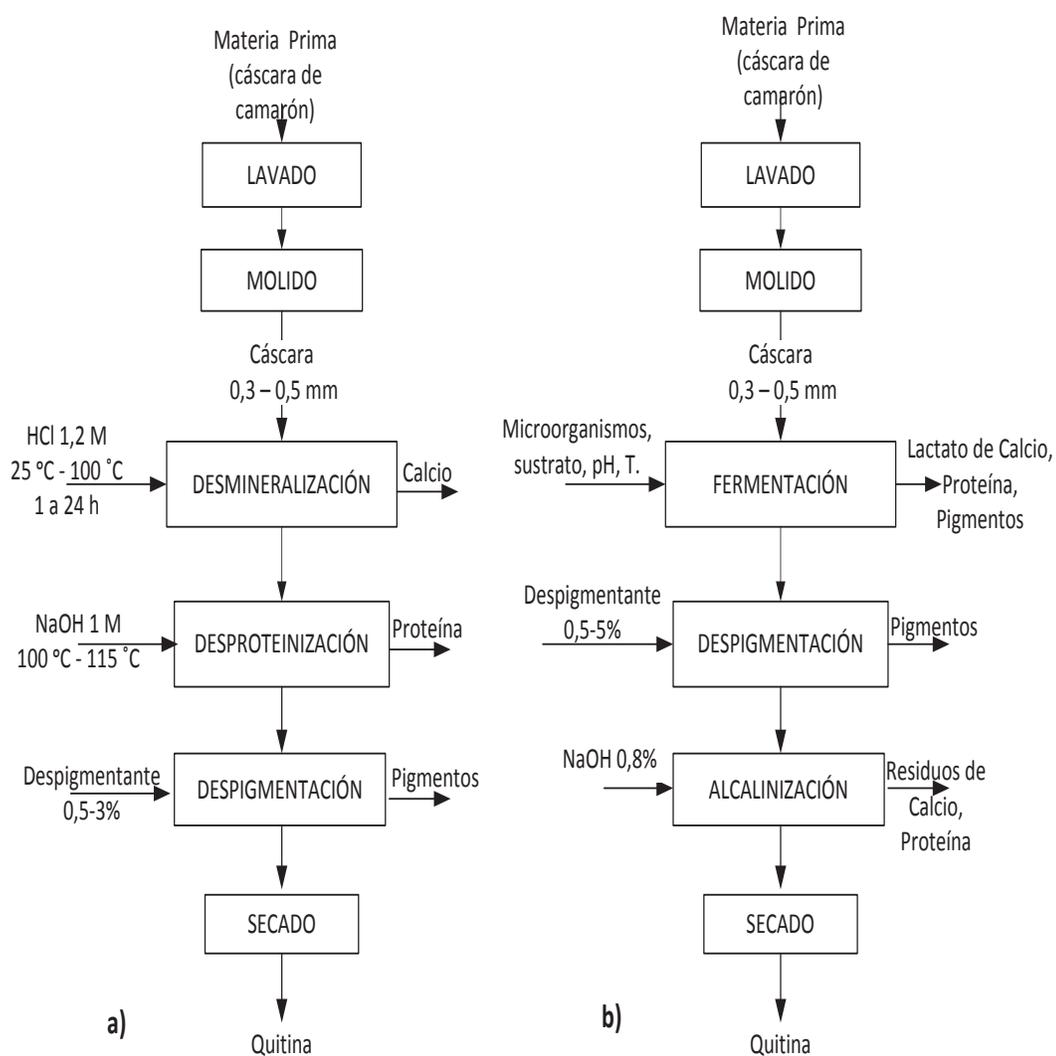


Figura 1.3. Diagrama del proceso de extracción de quitina a) Proceso químico b) Proceso biológico

En los 2 procesos se requiere que la materia prima esté libre de impurezas y tenga un tamaño de partícula de 0,3 – 0,5 mm. De igual manera, en los dos casos se quieren etapas de desproteínización, despigmentación y desmineralización, la diferencia radica principalmente en las condiciones de T y pH de cada proceso.

1.2.2.1 Proceso Químico

Para el proceso químico se cuenta con dos tratamientos principales que se describen a continuación.

- **Desmineralización**

La obtención tradicional consiste en tratar la materia prima con: HCl 1,2 M a 25 °C o 100 °C por 24 horas o 1 hora, respectivamente, dependiendo de la temperatura. Se requiere realizar dos cambios de HCl en tiempos cortos, no se somete a temperaturas más altas ni mayores tiempos para evitar la degradación del polímero. Aunque el ácido clorhídrico es el más investigado para la desmineralización, existen trabajos de investigación que reportan el uso de ácido cítrico, o ácido sulfúrico. Durante la desmineralización se consigue remover el Ca (Colina, 2014, p 21-43).

- **Desproteínización**

La desproteínización se realiza con NaOH 1 M a 100-115 °C, en este paso se logra romper los enlaces de hidrógeno que unen las moléculas de proteína, para así solubilizarlas en el reactor donde ocurre el proceso (Colina et al., 2014, pp. 21-43).

1.2.2.2 Proceso Biológico

Se han realizado estudios para desarrollar procesos de obtención de quitina más amigables con el ambiente. Uno de ellos es la fermentación láctica con *Lactobacillus* sobre los desechos de camarón, este proceso es tecnológicamente flexible y seguro. El producto de la fermentación se encuentra compuesto de una parte sólida rica en quitina y una fracción líquida rica en proteína, minerales y carotenoides (especialmente astaxantina) que al ser purificados, se usan en alimentos para animales o humanos. La fermentación produce una desmineralización y una desproteínización simultánea, ya que por un lado el ácido láctico generado por el consumo de carbohidratos presentes en la materia prima reaccionan con el Calcio produciendo lactato de calcio y, por otro, el microorganismo requiere consumir la proteína de la materia prima ya que esa es su fuente de Nitrógeno (Prameela et al., 2010, pp. 2 888-2 889).

A continuación se presenta el resumen de varios estudios referentes al proceso de obtención de quitina con diferentes microorganismos, condiciones de operación, y materia prima, ya que no se conoce un procedimiento definido en el proceso de obtención de quitina.

- **Fermentación**

El proceso de fermentación ha sido estudiado por varios autores; Bhaskar et al. (2007) trabajaron con una mezcla de cultivos lácticos; *Pediococcus acidolactici* CFR2182, *L. Plantarum* B4496, *L. Acidophilus* B4495, *Lactococcus lactis* B634, en relación 1:1:1:1 (v/v/v/v), con el objetivo de extraer quitina y recuperar el carotenoide de residuos de camarón (*Penaeus monodon*); la fermentación se realizó a 100 rpm con el 5 % de inóculo (v/w), 15 % de glucosa (w/w) y 2 % sal (w/w). La cáscara se mezcló con agua destilada (1:1) w/v en un proceso anaeróbico, a 37 °C, por 72 horas, pasado este tiempo la cáscara se lavó tres veces con agua destilada en una relación 1:10 w/v y posteriormente fue tratada con sosa 0,5 M hasta llegar a un pH de 8 durante 4 horas. Con estas condiciones se logró una

desproteínización del 97,9 %, una desmineralización del 72,5 % y una recuperación de carotenoides del 72,4 % (pp. 1 427-1 434).

Adour et al. (2008) emplearon residuos de la especie de camarón blanco *Parapenaeus longirostris*, para la fermentación con 10 % v/v de *Lactobacillus helveticus*, considerada como una de las bacterias más acidófilas. En este proceso se trabajó con glucosa 300 g/L a una temperatura de 30 °C, para lograr una reducción de proteína y ceniza del 76 % y 53 % respectivamente. Al incrementar la temperatura a 35 °C el porcentaje de reducción de ceniza incrementó en un 8 %. En esta misma investigación se sustituyó la glucosa por jugo de caña, logrando una remoción de proteína del 91 %; sin embargo, no se mejoró la desmineralización, resultado asociado a la presencia de minerales, específicamente del calcio en el jugo de caña que interviene en la difusión del calcio contenido en la cáscara de camarón. En este caso el pH final fue mayor a 6, mientras que para la glucosa el pH final fue menor que 6 (pp. 1 664-1 669).

El uso de bacterias productoras de enzimas en combinación con las bacterias lácticas *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Streptococcus faecium* *Pediococcus acidilactici*, resultaron eficaces en el aislamiento de la quitina de la gamba, un crustáceo parecido a la langosta. Para ello, se trabajó en un biorreactor RUNSWICK SCIENTIFIC Bioflo 3000, con un tamaño de partícula de 0,5 – 1 mm de cáscara gamba, 15 % de glucosa (w/v), a 30 °C y 250 rpm, por 7 días. Posteriormente el proceso de despigmentación se dio con una relación 1:1 v/v de hexano y éter de petróleo. Al finalizar el proceso se obtuvo una desmineralización del 93,8 % (Healy, Green y Healy, 2003, pp. 151-160).

Cira et al. (2010) encontraron que el uso de sacarosa como fuente de carbono en la fermentación da mejores resultados en la producción de ácido láctico, comparado con lactosa y suero de leche. El microorganismo empleado fue el *Lactobacillus sub. paracasei* aislado de los residuos de mariscos. En la investigación de Cira et al., (2010), la obtención de quitina incluyó la purificación con un tratamiento de ácido y álcali para remover los residuos de calcio y proteína presentes (pp. 1359-1356).

Los factores que más influyen en la fermentación de la cáscara de camarón son: el pH que contribuye a la putrefacción de la cáscara; la temperatura, la misma que depende del microorganismo con el que se trabaje, el enriquecimiento del sustrato con fuentes de carbono y el tamaño de la cáscara de camarón (Prameela et al., 2010, pp. 2 888-2 889).

La combinación de estos factores, al igual que la selección de la cepa de bacterias ácido lácticas determinan la efectividad del proceso fermentativo.

- **Proceso de Despigmntación**

El color característico de la cáscara se debe a la presencia de pigmentos, carotenoides como axtaxatina, cantaxantina, astacina, luteína y β caroteno. Para extraer estos pigmentos se usa acetona, cloroformo, acetato de etilo, peróxido de hidrógeno o las mezclas de etanol-eter; etanol-éter- acetato a concentraciones de (0,5-5 %) otra opción es el uso de hipoclorito de sodio a un rango de concentración de (0,32 %-5 %), permanganato de potasio; esto solventes atacan los grupos aminos libres e introducen modificaciones al polímero (Hernández et al., 2008, pp. 659-666).

- **Tratamiento con sosa**

Luego de los procesos de fermentación y despigmntación existen porcentajes de calcio y proteína que se encuentran en los residuos de camarón, y para remover estos compuestos se utilizan ácidos y bases (Cira et al., 2010. pp. 1 359-1 366).

1.2.3 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL MÉTODO BIOLÓGICO DE OBTENCIÓN DE QUITINA

Los métodos químicos tienen buenos resultados en rendimiento, pero son agresivos ya que producen corrosión de los equipos, y para el proceso se requieren grandes cantidades de agua y de energía en comparación con el método biológico (Bajaj et al., 2011, p. 52; Hernández et al., 2008, pp. 659-666).

El proceso químico en la extracción de proteína y pigmentos es eficiente pero estos compuestos proteína y pigmentos se vuelven inútiles para su uso en otras aplicaciones (Bhaskar et al., 2007, pp. 1 427-1 434).

Cuando se trabaja con un proceso biológico, los pigmentos pueden ser recuperados para ser usados como alimento de peces como el salmón, para esto la cáscara de camarón debe ser fresca de manera que se permita una mejor retención de los pigmentos, o debe secarse a temperaturas menores a 120 °C, para que no se degraden los pigmentos ni se degraden las proteínas (Healy et al., 2003, pp. 151-160; López, Rivas, Loaiza y Sabino, M. 2010, pp. 133-143).

Healy et al. (2003) demostraron que al usar bacterias homolácticas la fracción líquida que se produce en la fermentación se logra liberar al medio líquido entre el 50 – 87 % de los carotenoides totales que pueden ser fácilmente recuperados para su posterior utilización (pp. 151-160).

La quitina tiene un mayor número de aplicaciones cuando es obtenida por el método biológico, en especial en el área de la medicina y farmacéutica, ya que el peso molecular y el grado de desacetilización no se ven afectados, lo que permite obtener el quitosano a partir de la quitina con mejores propiedades (Cira et al., 2010, pp. 1 359-1 366).

El bajo costo de las fuentes de carbohidratos que se utilizaron durante el proceso biológico de fermentación como la sacarosa o el suero de leche, ayudaron a que fueran estudiadas para estos procesos (Cira et al., 2010, pp.1 359-1 366).

Cuando se realiza la extracción de quitina por medios fermentativos tiene su olor característico, pero este puede ser de menor o mayor intensidad, debido a la proteólisis podría presenciarse por la formación de mayor o menor cantidad de nitrógeno volátil (Bhaskar et al., 2007, pp. 1 427-1 434; Healy et al., 2003, pp. 151-160).

1.2.4 LA CÁSCARA DE CAMARÓN COMO MATERIA PRIMA

El camarón de la especie (*Penaeus vannamei*) conocido como camarón blanco, se encuentra en las costas del Ecuador y representa el 95 % de su producción debido a una mayor capacidad de supervivencia, mientras que el otro 5 % corresponde a las variedades *Penaeus californiensis*, *Penaeus stylirostris*, *Penaeus monodon* (Departamento de Pesca y Acuicultura, 2015, p. 5).

1.2.4.1 Morfología del camarón *Penaeus vannamei*

La Figura 1.4 muestra las partes del camarón, el cual es de color gris cuando está crudo, y se torna anaranjado en su cocción.

La cáscara seca presenta una tonalidad anaranjada y un poco brillante como se ve en la Figura 1.5 (Shahidi y Synowiecki, 2005, pp. 1 527-1 532).

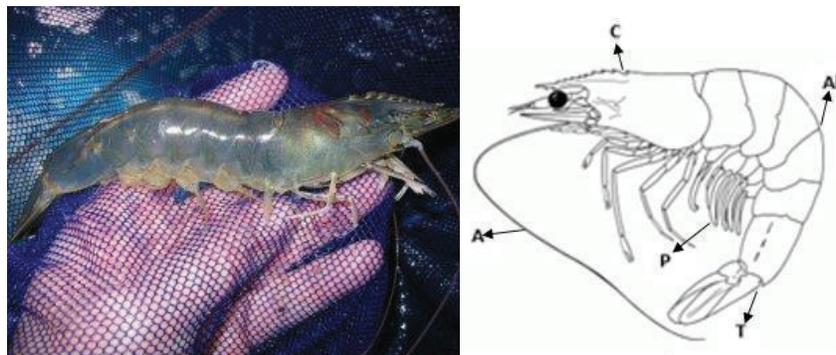


Figura 1.4. Partes del camarón (C. cefalotoráx, Ab. Abdomen, A. Antenas, P Pleópodos, T. Telson.)

(Departamento de Pesca y Acuicultura, 2015, p. 5)



Figura 1.5. Cáscara de camarón seco

1.2.4.2 Composición de la materia prima

La materia prima se obtiene del caparazón, el abdomen, el telson y el celotorác, partes no comestibles del camarón. La caracterización de la cáscara de camarón se presenta en la Tabla 1.5, esta materia prima es rica en proteína, pigmentos y quitina, que pueden ser extraídos o convertidos en subproducto como harina para el consumo animal por su alto valor nutricional (Morillo, 2006, pp. 71-83).

Tabla 1.5. Caracterización de la materia prima

Compuesto	(%)
Proteína	47,9 - 39,17
Cenizas	27,42 - 23,85
Humedad	75 - 85

Tabla 1.5. Caracterización de la materia prima (**continuación**)

Compuesto	(%)
Pigmentos	1 - 14
Quitina	17 - 33

(Morillo, 2006, pp. 71-83)

a) Pigmentos

Los pigmentos de la cáscara de camarón son extraídos con diferentes solventes como metanol 90 % en relación p/v de 1:2, o hipoclorito de sodio del 3,8 % al 5 %. Para obtener un mayor porcentaje de recuperación de pigmentos, el almacenamiento de la materia prima no debe ser superior a los 10 días para obtener un 9,5 % de recuperación de pigmentos; después de 30 días el porcentaje disminuye a 3 % (Chávez y López, 2010, p. 2).

El secado de la cáscara al ambiente produce una despigmentación, mientras que la materia prima fresca es la que tiene una mayor concentración de pigmentos (Bhaskar et al., 2007, pp. 1 427-1 434).

b) Proteína: la cantidad de proteína contenida en los desechos de la cáscara de camarón puede variar entre especies, para el *Penaeus vannamei* se tiene un rango amplio de 39,17 % a 47,9 %. Esto depende del estado de madurez de la especie y/o de las condiciones de almacenamiento de los desechos; ya que si los desechos son almacenados por más de 4 días, el porcentaje de proteína empieza a disminuir progresivamente debido a su degradación (Morillo et al., 2006, pp. 71-83).

c) Cenizas: el porcentaje de cenizas que contiene la cáscara depende de la especie y del hábitat. Se han reportado porcentajes de ceniza de 21,42 %, 24,69 %, 36,65 % hasta 42,12 % según la cantidad de minerales que se encuentran en el hábitat del crustáceo (Morillo et al., 2006, pp. 71-83).

d) Quitina: la cáscara de camarón tiene entre 17 y 33 % de quitina, lo que la hace una fuente importante de este polímero que, como ya se indicó anteriormente, tiene muchas aplicaciones, en la industria (Khateeb, 2003, pp. 145-147).

1.2.4.3 Carga microbiana de la cáscara

La cáscara sufre cambios físicos y microbiológicos que dependen directamente de las condiciones de almacenamiento. Estos cambios afectan al olor, color y textura (Shahidi y Synowiecki, 2005, pp. 1 527-1 532).

La carga microbiana aceptable que debe tener la cáscara de camarón es de 95 ufc/g, y debe estar libre de coliformes para ser convertida en harina para la extracción de quitina. Si la cáscara se almacena a temperaturas entre 0 °C y 25 °C inicia el crecimiento microbiano de hongos, bacterias mesófilas, termófilas y psicrófilas, que producen putrefacción, la misma que se ve favorecida cuando el pH es mayor a 7,5. Para conservar la cáscara, se debe almacenar a 0 °C y bajar el pH a valores menores a 7,5. Conforme aumenta la temperatura, los procesos de putrefacción se ven favorecidos, principalmente por el crecimiento de la carga microbiana, como se aprecia en la Figura 1.6. La putrefacción se da porque la flora microbiana de la materia prima, en condiciones aerobias o anaerobias libera nitrógeno, que a su vez se transforma en amonio no ionizado, producto principal de este proceso. Cuando el pH aumenta de 7,5 a 8,5 y la temperatura está entre 25 °C a 35 °C se incrementa la producción de amonio no ionizado (Chávez y López, 2010, p. 2; Shahidi y Synowiecki., 2005, pp. 1 527-1 532; FAO, 2015, p. 6).

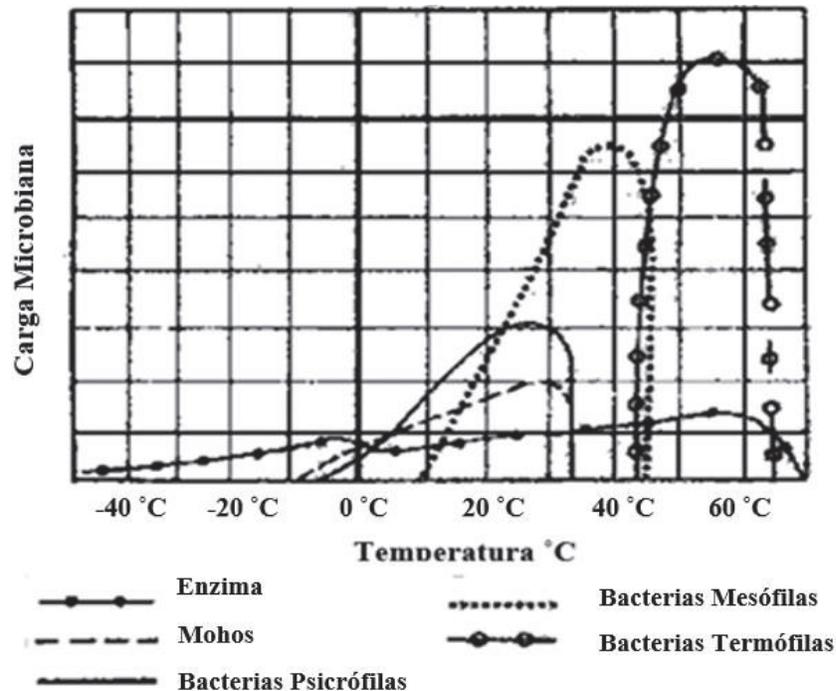


Figura 1.6. Velocidad del crecimiento microbiano en función de la temperatura (FAO, 2015, p. 6)

1.2.4.4 Producción de residuos de camarón en Ecuador

La industria camaronera en el Ecuador ha registrado un crecimiento; en el año 2010 se exportaron 103 750 toneladas y en el 2013 la exportación se incrementó a 204 539 toneladas (Banco Central de Ecuador, 2015, p. 3).

Según Morillo et al. (2006), el 36 % de la producción de camarón corresponde a desechos sólidos, de los cuales el 40 % representa la cabeza y la cáscara del camarón (pp. 71-83). En el Ecuador apenas el 3 % de la cáscara de camarón se emplea para la elaboración de harina y balanceado de la dieta alimenticia de los peces, moluscos y crustáceos, ya que contienen proteína, ácido carboxílicos y minerales, los cuales son asimilados rápidamente por los organismos de las especies acuícolas. El 97 % restante es eliminado en ríos cercanos, aguas costeras, rellenos sanitarios, terrenos, botaderos, convirtiéndose en un foco de contaminación por su lenta degradación, lo que trae como consecuencia un problema medio ambiental (Luna, 2012, p. 23).

Esta situación se reporta en todos los países productores de camarón, por ello se han realizado estudios para ocupar el desecho y darle un valor agregado al extraer la quitina, proteína, astaxantina.

2. METODOLOGÍA

2.1 ESTUDIO DEL EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO EN LA GENERACIÓN DEL INÓCULO

2.1.1 MATERIALES

La cáscara de camarón fue obtenida de las marisquerías del sector de Carapungo. La sacarosa fue de grado comercial (azúcar granulada San Carlos). Los reactivos utilizados para el desarrollo de este trabajo se detallan en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Reactivos utilizados en la parte experimental

Reactivo	Pureza	Marca
Acetato de sodio	99 %	Merck
Ácido clorhídrico	37,3 %	J.T Baker
Ácido 3,5 dinitro salicílico (DNS)	Grado Analítico	Merck
Agar <i>Lactobacillus</i>	Grado Analítico	Becton, Dickinson and Company
Alcohol absoluto	99,5 %	Panrec
Brain Heart Infusion	Grado Analítico	Dickinson and Company
Caseína	>90 %	Merck
Citrato de amonio	98,4 %	Fisher Scientifica
Cloruro de sodio	99,5 %	LobaChemie
Extracto de carne	Grado Analítico	Becton Dickinson
Extracto de levadura	Grado Analítico	Becton Dickinson
Fosfato de potasio monobásico	99,5 %	Merck
Fosfato dibásico de potasio anhidro	97,5 %	Merck
Glicerol	98 %	BDH Chemivcals
Glucosa	Grado Analítico	Merck
Hidróxido de sodio	99 %	Merck

Tabla 2.1. Reactivos utilizados en la parte experimental (**continuación....**)

Reactivo	Pureza	Marca
Hipoclorito de sodio	Grado Técnico	Quimical
Lactosa	99,5 %	BDH Chemivcals
Peptona de carne	Grado Analítico	Becton, Dickinson and Company
Sulfato de cobre	99,5 %	FisherScientific
Sulfato de magnesio	99,5 %	Merck
Sulfato de manganeso II	99,5 %	Merck
Tartrato de sodio y potasio	99 %	Fisher Scientifica
Tween 80	Grado Analítico	Pankcae

El microorganismo *Lactobacillus delbrueckii* fue proporcionado por el laboratorio de Bioprocesos de la Escuela Politécnica Nacional.

2.1.1.1 Conservación de la cepa *Lactobacillus*

El *Lactobacillus delbrueckii* se conservó en congelación a -10 °C en BHI y glicerol. Para esto en 10 tubos de ensayo se colocaron 3 mL de BHI caldo (Brain Heart Infusion) previamente esterilizados por 15 min a 121 °C en un autoclave BOYN LDZX-75KBS; una vez estéril, se inocularon los tubos con la cepa *Lactobacillus delbrueckii* y se incubaron por 24 h a 37 °C en una estufa POLEKO 115ECO. Transcurrido el tiempo se añadieron 3 mL de glicerol previamente esterilizado, se mezcló y se colocó en tubos eppendorf de 1,5 mL y se almacenó en un congelador GENERAL ELECTRIC RGS1540XLCB0 a -10 °C (Prada, Romero, Díaz, Molina, Guzmán, C, 2012, p. 57).

2.1.1.2 Reactivación de la cepa *Lactobacillus*

Para reactivar al microorganismo, se descongeló un tubo eppendorf a 27° C por 1 hora; luego se añadieron 3 mL de BHI (Brain Heart Infusion) previamente

esterilizado a 121 °C por 20 min en un autoclave BOYN LDZX-75KBS, y se incubó por 24 h a 37 °C en una estufa POLEKO 115ECO (Orozco y Solarte, 2003, pp. 78-88).

2.1.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para determinar el efecto del medio de cultivo en el crecimiento del *Lactobacillus delbrueckii*; se trabajó con un diseño experimental completamente al azar (DCA), en el cual la variable de estudio fue el medio de cultivo en tres niveles (ML1, ML2, ML3). En la Figura 2.1 se presenta un diagrama de la estrategia experimental empleada:

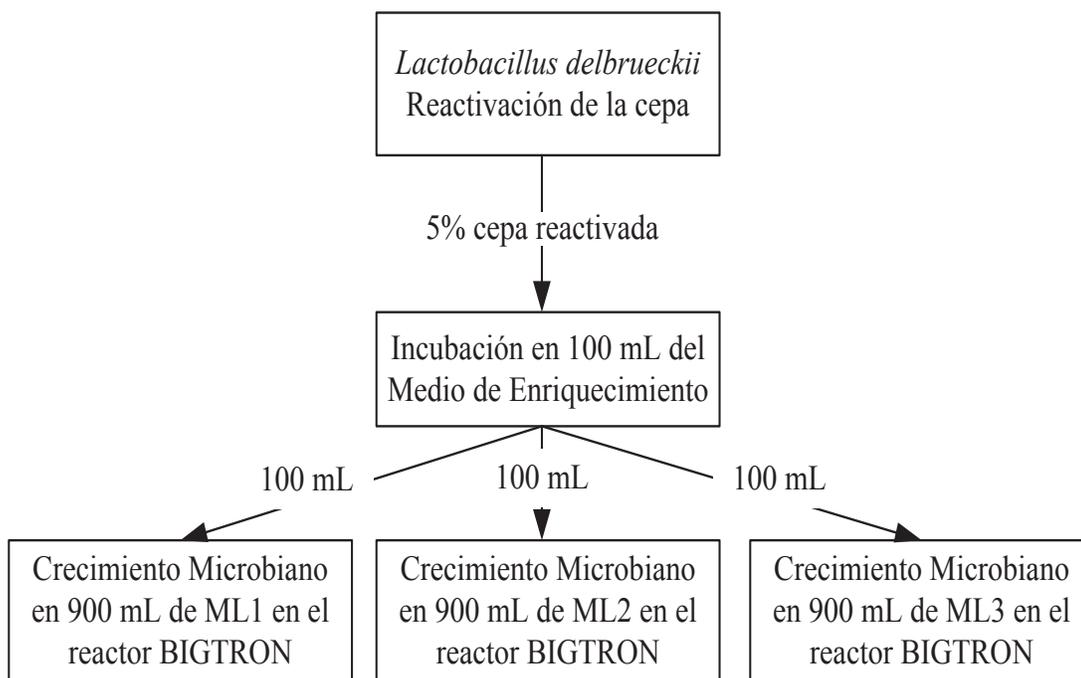


Figura 2.1. Proceso de inoculación del *Lactobacillus* para determinar el mejor medio de cultivo

Una vez reactivada la cepa, se inoculó el 5 % del *Lactobacillus delbrueckii* en un medio de enriquecimiento, cuya composición se presenta en la Tabla 2.2, previamente esterilizado a 121 °C por 15 min, y se incubó en un baño maría con agitación a 37 °C por 18 horas (Orozco y Solarte, 2003, pp. 78-88).

Tabla 2.2. Composición del medio de enriquecimiento

Compuesto	Cantidad
Azúcar blanca	3,0 g
Extracto de levadura	0,4 g
K_2HPO_4	0,05 g
$MgSO_4$	0,05 g
Agua destilada	100 mL

(Orozco y Solarte, 2003, p. 78-88).

Una vez transcurrido el tiempo de enriquecimiento, se colocaron los 100 ml de este medio en 900 mL de cada medio (ML1, ML2, ML3) contenido en un bioreactor BIGTRON SMART GX. El proceso fermentativo se realizó a 37 °C, por 12 horas. La composición de los medios se presenta en las Tablas 2.3, 2.4, 2.5.

Tabla 2.3. Composición del medio de cultivo ML1

Compuesto	Cantidad
Azúcar blanca	27 g
Extracto de levadura	3,6 g
KH_2PO_4	4,5 g
K_2HPO_4	4,5 g
$MgSO_4$	0,27 g
Agua destilada	900 mL

(Orozco y Solarte, 2003, pp. 78-88)

Tabla 2.4. Composición del medio de cultivo ML2

Compuesto	Cantidad
Extracto de carne	9,0 g
Peptona de carne	9,0 g
Extracto de levadura	4,5 g
Lactosa	54,0 g
CH ₃ COONa	4,5 g
Polisorbato	0,9 g
K ₃ PO ₄	1,8 g
Citrato de amonio	1,8 g
MgSO ₄	0,09 g
MnSO ₄	0,045 g
Agua destilada	900 mL

(Calderón et al., 2013, p. 135)

Tabla 2.5. Composición del medio de cultivo ML3

Compuesto	Cantidad
Sacarosa	9,0 g
Suero de sangre de res	9,0 g
KH ₂ PO ₄	0,9 g
Sulfato de amonio	0,9 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,45 g
Tiamina	0,045 g
Agua destilada	900 mL

(Bonilla et al., 2009, p. 19)

Se establecieron como variables de respuesta: la concentración de los microorganismos y la cinética de crecimiento que implica la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de duplicación del *Lactobacillus*.

Para determinar la cinética de crecimiento de *Lactobacillus* en el biorreactor, se midió su concentración cada hora, en una muestra de 1 000 (μl), por el método de conteo directo a microscopio con la ayuda de una cámara NEUBAUER BRIGHT LINE, y un microscopio OLIMPUS CH2 (Rodríguez et al., 2005, p. 744). En el Anexo I se describe paso a paso el método de conteo. Para cada medio se realizaron 2 repeticiones.

Se seleccionó el medio que presentó una concentración de microorganismos del orden de 10^8 en el menor tiempo y el que requirió menor número de reactivos en su composición.

Una vez recolectados los datos de cada medio se realizó un análisis de varianza (ANOVA), y se determinó diferencias significativas por el método de Tukey, con un nivel de significancia del 95 %.

2.2 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL SUSTRATO, LA TEMPERATURA Y EL PH EN LA OBTENCIÓN DE QUITINA

Se estudió el efecto del sustrato, la temperatura y el pH para obtener quitina a partir de la cáscara de camarón con el siguiente proceso: fermentación láctica, despigmentación y tratamiento con sosa al 0,8 %.

En la Figura 2.2 se presentan las variables analizadas en cada uno de los procesos y en la cáscara original.

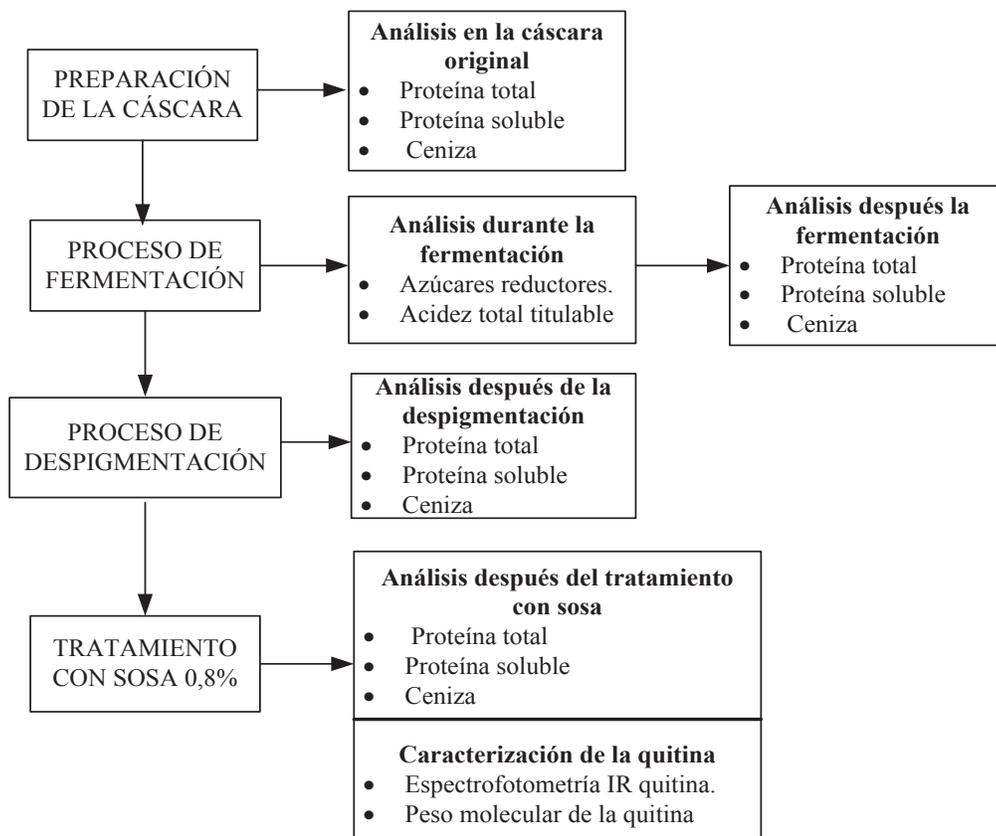


Figura 2.2. Proceso general de determinación del efecto del sustrato, temperatura y pH de la obtención de quitina

En cada proceso se determinó el porcentaje de reducción de proteína total, proteína soluble y ceniza, calculados a partir de la cáscara original, mediante la fórmula (2.1).

$$\% \text{ Reducción} = 100 \% - \frac{\%(P.T, P.S, C) \text{ después de cada proceso}}{\%(P.T, P.S, C) \text{ de la cáscara original}} \quad [2.1]$$

Donde:

P.T = Proteína Total

P.S = Proteína Soluble

C = Ceniza

En cada etapa se realizó un análisis estadístico ANOVA, y una comparación de medias por Tukey al 5 %. Al finalizar el proceso de tratamiento con sosa se

caracterizó la quitina obtenida por espectrofotometría de Infrarrojo (IR) y se determinó el peso molecular (López et al., 2010, p. 137).

2.2.1 DISEÑO EXPERIMENTAL DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN

En la fermentación láctica se determinó el efecto del sustrato, temperatura y el pH mediante un diseño experimental 3x2x2. Para los sustratos se trabajó con 3 niveles: (cáscara + 0 % sacarosa; cáscara + 5 % sacarosa; cáscara + 10 % sacarosa). En el caso de la temperatura se trabajó a 37 °C y 45 °C. Y para el pH: con control de pH (C) y sin control de pH (S). Al aplicar el diseño experimental se obtuvieron 12 tratamientos con 2 repeticiones cada uno, en la distribución que se muestra en la Tabla 2.6.

Tabla 2.6. Diseño Experimental empleado para seleccionar las mejores condiciones del proceso de fermentación

Muestra Nomenclatura	pH	Temperatura	Sustrato
S1	Sin Control	37 °C	0 %
S2	Sin Control	37 °C	5 %
S3	Sin Control	37 °C	10 %
S4	Sin Control	45 °C	0 %
S5	Sin Control	45 °C	5 %
S6	Sin Control	45 °C	10 %
C1	Con Control (5-6)	37 °C	0 %
C2	Con Control (5-6)	37 °C	5 %

Tabla 2.6. Diseño Experimental empleado para seleccionar las mejores condiciones del proceso de fermentación (**continuación...**)

Muestra Nomenclatura	pH	Temperatura	Sustrato
C3	Con Control (5-6)	37 °C	10 %
C4	Con Control (5-6)	45 °C	0 %
C5	Con Control (5-6)	45 °C	5 %
C6	Con Control (5-6)	45 °C	10 %

El proceso fermentativo para cada uno de los tratamientos se llevó a cabo en un biorreactor Bigtron Smart (GX), en un volumen de 1 500 mL, con 150 g de cáscara de camarón. Para todos los casos se empleó el 10 % de inóculo y se trabajó a 120 rpm, sin aireación.

En cada proceso durante la fermentación se midió el pH y la temperatura como parte del control, y se tomaron como variables de respuesta del diseño experimental a los azúcares reductores, acidez total titulable determinados por los métodos: A.O.A.C 937.05, (1997) y DNS, respectivamente. Se tomaron muestras cada 4 horas durante las primeras 12 horas y luego cada 24 horas; la reacción se finalizó a las 144 horas.

Una vez finalizado el proceso de fermentación, en la cáscara se analizaron ceniza por el método de calcinación de minerales A.O.A.C 923.23, (2005), proteína total y proteína soluble, por el método de Kjeldahl A.O.A.C 2001.11, (2005) y Biuret respectivamente, los ensayos se realizaron en la cáscara original y en el producto final de la fermentación (López et al., 2010, pp. 133-143).

Una vez recolectados los datos obtenidos después del proceso fermentativo, se realizó un ANOVA, y la comparación de medias por el método de Tukey, con un nivel de significancia de 95 %.

A continuación se presenta el detalle del proceso de fermentación desde la preparación de la materia prima:

2.2.1.1 Preparación de la materia prima

A la materia prima fresca o almacenada en refrigeración a 4 °C por 2 o 3 días, se le retiraron las impurezas que se encontraron como: pedazos de carne, antenas y pleópodos (patas). Se realizó un lavado con agua en una relación de 2:1 (agua: cáscara) (Adour et al., 2008, pp. 1 664-1 669).

Posteriormente, la materia prima fue sometida a un secado a 60 °C en una estufa POLEKO 115ECO por 8 horas, una vez transcurrido este tiempo se realizó una molienda en un molino WARING 5017 de malla 3 – 5 mm (Adour et. al., 2008, pp. 1 664-1 669; Henández, 2008, p. 662).

2.2.1.2 Fermentación de la cáscara de camarón

En el bioreactor (Bigtron Smart GX), se colocaron 150 g de cáscara seca y los mL de agua destilada necesaria para obtener una humedad del 85 %. El volumen de agua destilada se calculó a partir de la humedad de la cáscara de camarón seca y molida, la misma que se determinó con un medidor de humedad OHAUS MB25, en el que se colocaron 1,5 g de muestra. La cáscara húmeda fue esterilizada a 121 °C por 15 min. El proceso de fermentación se realizó con agitación a 120 rpm, sin aireación, y de acuerdo a cada tratamiento según el diseño experimental que se presentó en la Tabla 2.6.

Las variables de repuesta durante el proceso de fermentación fueron: la acidez total titulable (ATT) medido según el método A.O.A.C 937.05, (1997) y azúcares reductores por el método DNS, los mismos que se encuentran descritos en los Anexos II, III, respectivamente.

Para cada tratamiento, durante las primeras 12 horas, se tomó una muestra de 1 ml cada 4 horas y posteriormente cada 24 horas, hasta que la variación de pH fue insignificante (Morrey y Quinde, 2012, pp. 25-26).

Una vez concluido el proceso de fermentación, se incrementó la temperatura a 90 °C y se dejó por 40 min con el objetivo de matar el microorganismo *Lactobacillus delbrueckii*, presente en el sustrato. La cáscara fermentada se lavó con agua destilada hasta tener un pH de 7 y se secó a 60 °C por 6 horas.

Al finalizar el proceso de secado se tomaron muestras de la cáscara fermentada y se determinó proteína soluble y total por el método de Biuret y Kjeldahl A.O.A.C 2001.11, (2005), respectivamente y cenizas por calcinación de minerales por el método A.O.A.C 923.23, (2005). Estos análisis se describen a continuación:

- **Caracterización de proteína soluble**

La proteína soluble se determinó por el método de Biuret. Se colocaron 2 g de muestra en tubos de ensayo con 10 mL de NaCl al 1 %, se agitó por 2 min en un agitador de tubos de ensayo THERMOLYNE M-37600. Los tubos se colocaron en la centrifuga THERMO ICE CH SII, a 3 500 rpm por 10 minutos.

En tubos de ensayo limpios y secos se colocaron 0,5 ml del sobrenadante, luego se agregaron 5,5 mL NaCl al 1 % y 4 mL de Biuret y se dejaron reposar en oscuridad por 30 min. Se midió la absorbancia a $\lambda=540$ nm en un espectrofotómetro UV-VIS THERMO. Con los datos de absorbancia se cuantificó la proteína soluble de la cáscara. El método A.O.A.C 2001.11, (2005), se describe en el Anexo IV.

- **Caracterización de cenizas**

Se colocaron 2g de la muestra en el crisol y se llevó por 4 horas a 150 °C a una estufa POLEKO 115ECO para eliminar la humedad, transcurrido este tiempo se llevó el crisol a una mufla THERMO FB-1318 a 750 °C por 4 horas. El porcentaje de ceniza se determinó por la diferencia de peso, el método completo A.O.A.C 923.23, (2005), para caracterizar cenizas está en el Anexo V.

- **Caracterización de proteína total**

La caracterización de la proteína total se realizó por el método de Kjeldahl A.O.A.C 2001.11, (2005), en el Departamento de Alimentos y Biotecnología (DECAB) de la Escuela Politécnica Nacional.

2.2.2 PROCESO DE DESPIGMENTACIÓN

Todos los tratamientos pasaron a la etapa de despigmentación, para lo cual se colocaron 80 g de la cáscara fermentada seca en un vaso de precipitación de 250 ml, con hipoclorito de sodio al 3,8 %, en una relación 1:5 (1 g cáscara en 5 ml de hipoclorito), con agitación constante a 800 rpm por 15 min, luego se realizó un lavado con agua destilada. A la cáscara lavada se le sometió a una nueva despigmentación por 15 min en las mismas condiciones descritas anteriormente. Luego, se pasó por un triple lavado con agua destilada y se secó a 60 °C por 6 h en una estufa con flujo HERAEUS UT60-60.

Concluido este proceso se tomaron muestras de cáscara despigmentada para los análisis del porcentaje de reducción de ceniza, proteína total y proteína soluble por los métodos A.O.A.C 923.23, (2005); A.O.A.C 2011.11, (2005) y Biuret (López et al., 2010, pp.133-143).

Una vez recolectados los datos obtenidos después del proceso de despigmentación, se realizó un ANOVA en el programa Statgraphics y la comparación de medias por el método de Tukey con un nivel de significancia del 95 %.

2.2.3 TRATAMIENTO CON SOSA

Todos los tratamientos, después del proceso de despigmentación, pasaron al tratamiento con sosa, para lo cual 25 g de cáscara despigmentada fueron tratados

con NaOH al 0,8 % en una relación 1:12 (p/v). Se mezcló en un vaso de precipitación de 100 ml por 30 min a 90 °C, con agitación constante de 600 rpm, en una plancha de calentamiento THERMO SCIENTIFIC SP131325. Se enfrió y se lavó con agua destilada hasta obtener un pH de 7. La muestra se secó en una estufa HERAEUS UT60-60 a 60 °C por 6 h. Luego se realizaron los análisis del porcentaje de reducción de ceniza, proteína total y proteína soluble por los métodos (A.O.A.C 923.23, (2005); A.O.A.C 2011.11, (2005) y Biuret (Bajaj et al., 2011, p. 52; Hernández et al., 2008, pp. 659-666).

Una vez recolectados los datos obtenidos después del proceso de tratamiento con sosa, se realizó un análisis estadístico ANOVA, y la comparación de medias por el método de Tukey con un nivel de significancia al 95 %.

2.2.4 CARACTERIZACIÓN DE LA QUITINA OBTENIDA

2.2.4.1 Espectrofotometría de Infrarrojo (IR)

La quitina obtenida después del tratamiento con sosa fue analizada por espectrometría de infrarrojo para observar los grupos funcionales característicos de este polímero. Para este análisis se requirieron 20 mg de la muestra molida en un molino WARING 5017 de malla 3 mm, a la cual se le retiró la humedad en una estufa POLEKO 115ECO por 8 h a 80 °C para evitar que en la lectura se reporten bandas de OH por la presencia de agua en la muestra. La muestra seca se mezcló con 180 mg de bromuro de potasio (López et al., 2010, pp. 133-143), y se determinó el espectro de IR en un espectrofotómetro PERKINELMER SPECTRUM ONE. Los análisis se realizaron en el laboratorio del CIAP (Centro de Investigaciones Aplicadas a Polímeros) de la EPN.

2.2.4.2 Peso molecular de la quitina

Para determinar el peso molecular de la quitina se empleó la ecuación (2.1) de Mark-Hownk (Minami et al., 2001, pp. 268-272).

$$[\eta] = kM^a \quad [2.1]$$

Donde:

$[\eta]$ = Viscosidad Intrínseca (dL/g)

k y a = Constantes del polímero – disolvente: (quitina – sosa)

M = Peso Molecular (g/mol)

Los parámetros k y a son constantes que dependen del polímero (quitina) y del disolvente (2,77 M NaOH). Los valores para k y a son $0,1 \cdot 10^4$ dL/g y 0,68 respectivamente (Minami et al., 2001, pp. 268-272).

Los valores de la viscosidad intrínseca se obtuvieron a partir de la ecuación de la recta, al realizar la gráfica viscosidad reducida vs las concentraciones de las diluciones de quitina, ya que la viscosidad intrínseca se define como el límite cuando la concentración tiende a cero de la viscosidad reducida (Ec. 2.2), lo que representa el punto de corte de la ecuación de la recta.

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} [\eta_{red}] \quad [2.2]$$

Se trabajó con las concentraciones de quitina que se muestran en la Tabla 2.7.

Tabla 2.7. Concentraciones de disolución de quitina

Ensayo	(g/dL)
1	0
2	0,202
3	0,399
4	0,608
5	0,810
6	1,000

(Minami et. al, 2001, pp. 268-272)

Para determinar los valores de la viscosidad reducida, se resolvió sucesivamente las ecuaciones 2.3, 2.4 y 2.5, que se presentan a continuación.

La viscosidad relativa se describe como el cociente entre la viscosidad de la disolución y la viscosidad del disolvente puro, o la relación de los tiempos de paso de la disolución al del disolvente puro.

Donde

$$[\eta]_{ref} = \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{t}{t_0} \quad [2.3]$$

t= Tiempo de paso de la disolución (quitina diluida)

t₀= Tiempo de paso del disolvente puro (sosa)

Para obtener estos tiempos de paso se realizaron seis disoluciones de una muestra de quitina en las concentraciones que se presentan en la Tabla 2.7. Para cada disolución se obtuvo un tiempo de paso en un viscosímetro Cannon – Fenske.

Con los tiempos de paso de las distintas disoluciones y el tiempo de disolución del disolvente puro se calculó la viscosidad. La viscosidad específica se define como la resta de una unidad al valor de la viscosidad relativa, como se muestra en la ecuación 2.4.

$$[\eta]_{sp} = [\eta]_{red} - 1 \quad [2.4]$$

La viscosidad reducida se pudo estimar como el cociente entre la viscosidad específica y la concentración del polímero (quitina) en el disolvente (sosa), esta expresión se representa en la ecuación 2.5.

$$[\eta]_{red} = \frac{[\eta]_{sp}}{c} \quad [2.5]$$

2.3 DETERMINACIÓN DEL PROCESO MÁS ADECUADO PARA LA OBTENCIÓN DE QUITINA A PARTIR DE LA FERMENTACIÓN LÁCTICA DE LA CÁSCARA DE CAMARÓN

Para determinar el proceso más adecuado en la obtención de quitina se realizó un análisis de las variables de respuesta del proceso global es decir los resultados obtenidos del porcentaje de reducción de ceniza, proteína total, proteína soluble y quitina después de los procesos de fermentación, despigmentación y tratamiento con sosa. Con los datos obtenidos después del tratamiento con sosa, se realizó un ANOVA en el programa Statgraphics la comparación de medias por el método de Tukey con un nivel de significancia al 95 %.

Adicionalmente, se realizó una comparación entre sí de los espectros IR de la quitina obtenida en cada tratamiento y con el espectro patrón de quitina del banco de espectros del software del espectrofotómetro PERKINELMER SPECTRUM ONE.

Finalmente, se comparó el peso molecular de las muestras de quitina con el peso molecular bibliográfico (Minami, et al., 2001, pp. 268-272).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 ESTUDIO DEL EFECTO DEL MEJOR MEDIO DE CULTIVO EN LA GENERACION DEL INÓCULO

En la figura 3.1 se presentan los resultados de la curva de crecimiento del microorganismo en los medios estudiados. Los datos con los que se obtuvo la gráfica están en la Tabla AVII.1 del Anexo VII.

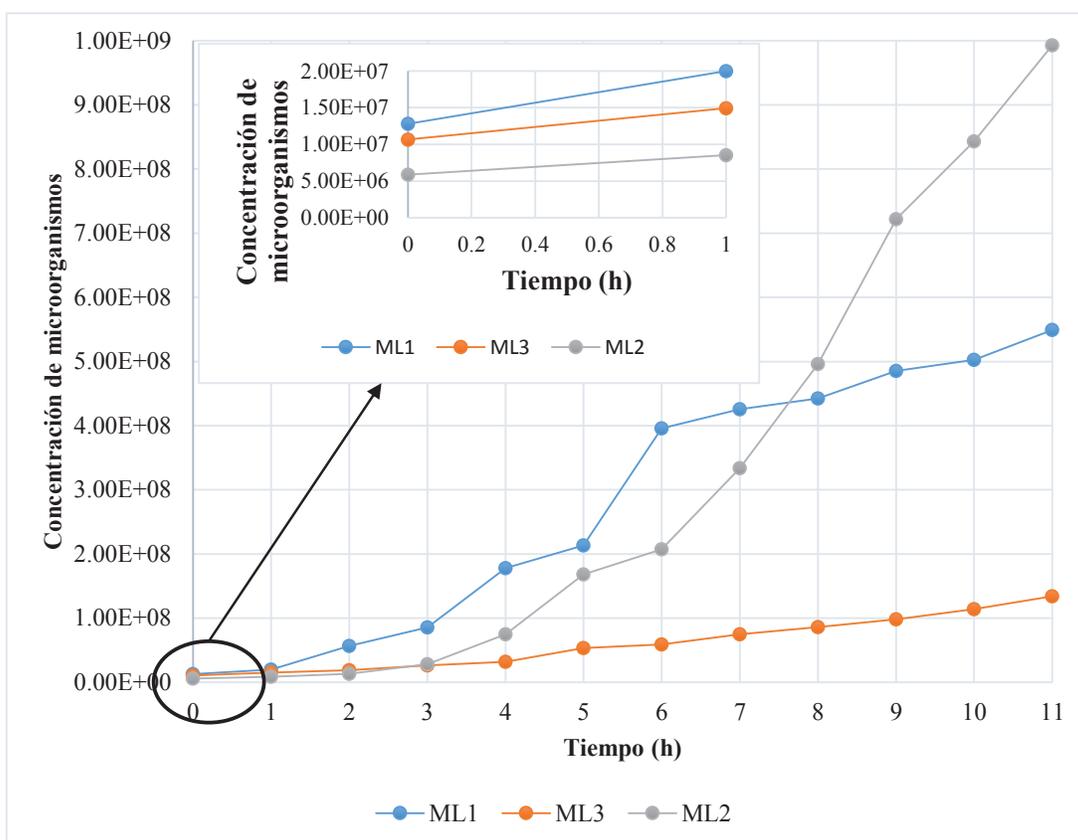


Figura 3.1. Curva de crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii* en los medios ML1, ML2, ML3 a 37°C, 200 rpm, pH inicial 6.5

El crecimiento del microorganismo en los 3 medios es diferente; en el medio ML2 se observa un crecimiento mayor, luego en el medio ML1 y en el ML3 se nota un crecimiento lento porque llega a una concentración de $1,34 \cdot 10^8$ microorganismos por mililitro (mo/mL) a las 11 horas.

Para el proceso de fermentación de la cáscara de camarón, se requiere que el inóculo tenga una concentración de 10^8 (mo/mL); concentración que se obtiene con los tres medios, pero a diferentes tiempos, como se observa en la Figura 3.1. Con el medio ML1 y ML2 la concentración de microorganismos adecuada se obtiene a las 4 y 5 horas respectivamente; mientras que con el medio ML3 se obtiene a las 10 horas de fermentación. Este comportamiento puede deberse a la cantidad y tipo de fuente de carbono con el que se trabajó en cada medio.

Para Friedman y Gaden (2007), el crecimiento del *Lactobacillus* y producción de ácido láctico se ve favorecido por la presencia de lactosa o sacarosa en la composición del medio (pp. 961-974). Agudelo et al. (2010), mencionan que el *Lactobacillus* agota primero la fuente de carbono, en un 77 % las primeras 12 horas, en especial la lactosa y sacarosa, e incrementa su crecimiento rápidamente (pp. 8-16). Este comportamiento se presenta tanto en el medio ML1 como en el medio ML2, medios que tienen 27 g de sacarosa y 54 g de lactosa respectivamente. Si bien el medio ML3 también tiene sacarosa, no se observa el comportamiento descrito por Agudelo, et al. debido a que la concentración de sacarosa es de apenas 9 g, lo que implicaría que la cantidad y tipo de fuente de carbono influye en el crecimiento microbiano. Concentraciones menores de fuente de carbono producen un crecimiento más lento, como se observa en los medios ML1 y ML3.

Otra característica que se observa en la curva de crecimiento, es el tiempo de la fase Agudelo de adaptación (tad), comportamiento que también se podría explicar con base en la concentración y tipo de fuente de carbono.

Agudelo et al. (2010) demostraron que el tad del *Lactobacillus plantarum* es menor cuando se trabaja con concentraciones de sacarosa mayores a 20g/L (p. 8-18), pero incrementa cuando la concentración de la fuente de carbono es mayor a 10 g/L (p. 3-9); por otro lado, con una concentración de lactosa mayor a 50 g/L se tiene un tiempo de adaptación de 3 a 5 horas, que es mayor al obtenido con concentraciones de lactosa menores a 20 g/L (Agudelo et al., 2010, pp. 8 - 16). Es decir, que para obtener una fase de adaptación menor se requieren concentraciones de la fuente de carbono mayores a 10 g/L pero menores a 50 g/L;

comportamiento que se observa en el presente estudio. Así, el medio ML1 que contiene 27 g de sacarosa presentó un td de 1 hora; mientras que el ML2 con 54 g de lactosa tuvo una fase de adaptación de 3 horas y el medio ML3 con 9 g de sacarosa tardó 4 horas en adaptarse (pp. 3-9).

El estudio del efecto del medio en la generación del inóculo se complementó con la determinación de los parámetros cinéticos los mismos que se presentan en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Parámetros cinéticos del *Lactobacillus delbrueckii* a 37 °C a 200 rpm con un pH inicial de 6,5 y pH final de 6,2

Medios	μ (h ⁻¹)	tg (h)
ML1	0,3312	2,0925
ML2	0,3234	2,1430
ML3	0,2059	3,366

Los valores obtenidos tanto de velocidad de crecimiento (μ) como de tiempo de generación, para los tres medios, fueron similares a los reportados por Friedman y Gaden (2007), para las especies de *Lactobacillus*, como: *L. casei*, *L. plantarum*, *L. lactis*, y *L. delbrueckii* cuyas velocidades y tiempos de generación para cada especie fueron de: 0,24 (h⁻¹), 2,9 h; 0,30 (h⁻¹), 2,3 h; 0,22 (h⁻¹), 3,15 h; y 0.35 (h⁻¹), 2,16 h respectivamente (pp. 961- 974).

En el medio ML3 que contiene tiamina se obtiene una velocidad de 0,205 h⁻¹, cuyo valor es parecido al reportado por Friedman y Gaden (2007), de 0,20 h⁻¹, donde se usó caldo con vitaminas, medio apropiado para la especie de *Lactobacillus* (pp. 961-974).

El medio ML2 fue sugerido por Calderón et al. (2013), quien estudió el efecto del enriquecimiento en la concentración de proteína en el crecimiento del *Lactobacillus*

delbrueckii; y obtuvo un tiempo de generación de 2,3 h, similar al obtenido en este estudio que fue de 2,14 h (p. 135).

Finalmente, se realizó el análisis estadístico de comparación de medias por el método de Tukey, resultado que se presenta en la Figura 3.2. Se determinó que no hay diferencias significativas entre los medios ML1 y ML2 en el crecimiento del microorganismo ($p < 0,005$), mientras que el medio ML3 es significativamente diferente.

Con base en los resultados y su análisis, se seleccionó el medio ML1 para el estudio posterior, porque alcanza el valor de concentración deseado de 10^8 (mo/mL) en menor tiempo y además requiere menor cantidad de compuestos para su preparación; a pesar de que el tiempo de duplicación es mayor que el obtenido para el medio ML2, sin embargo la diferencia no es estadísticamente significativa.

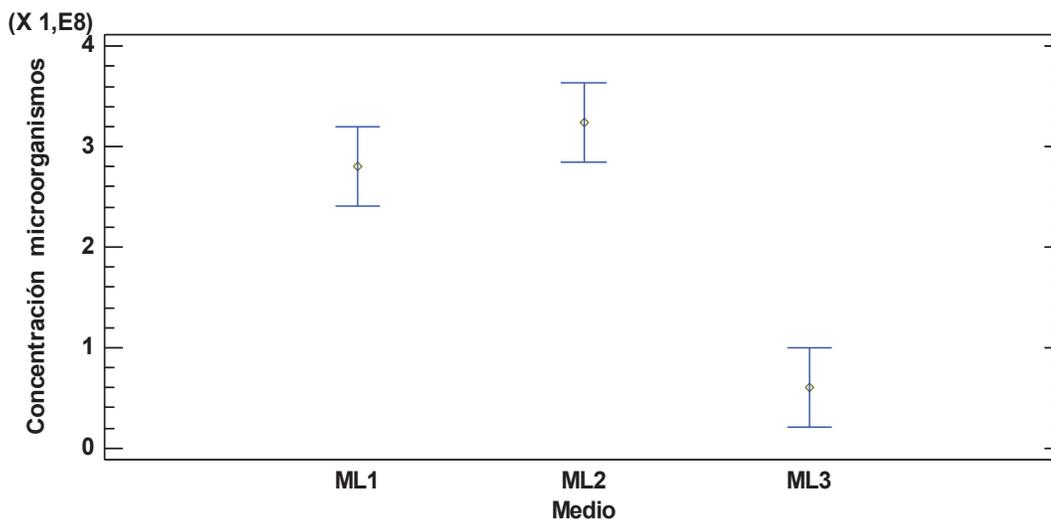


Figura 3.2. Efecto del medio de cultivo sobre la concentración de microorganismos (Medias y 95,0 % de Tukey)

3.2 EFECTO DEL PORCENTAJE DE SACAROSA, TEMPERATURA Y PH DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACIÓN CON LA CÁSCARA DE CAMARÓN

Para el análisis del efecto del porcentaje de la sacarosa, la temperatura y pH, durante el proceso de fermentación, se presentarán los resultados tomando como base el control del pH.

3.2.1 TRATAMIENTO SIN CONTROL DE pH

En las figuras 3.3 y 3.4 se presentan los resultados de la variación del pH y la acidez total titulable (ATT), cuyos datos están en la Tablas AVIII.1 y AVIII.2 del Anexo VIII.

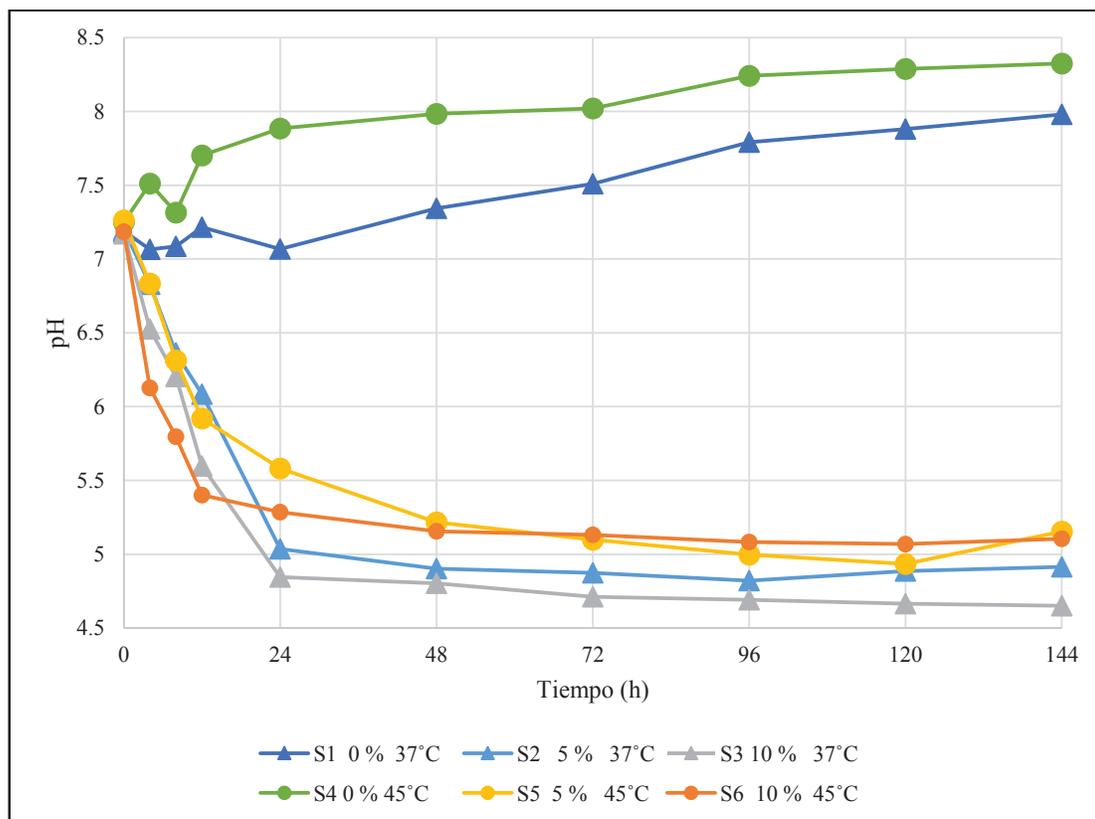


Figura 3.3. pH en función del tiempo para los tratamientos sin control de pH

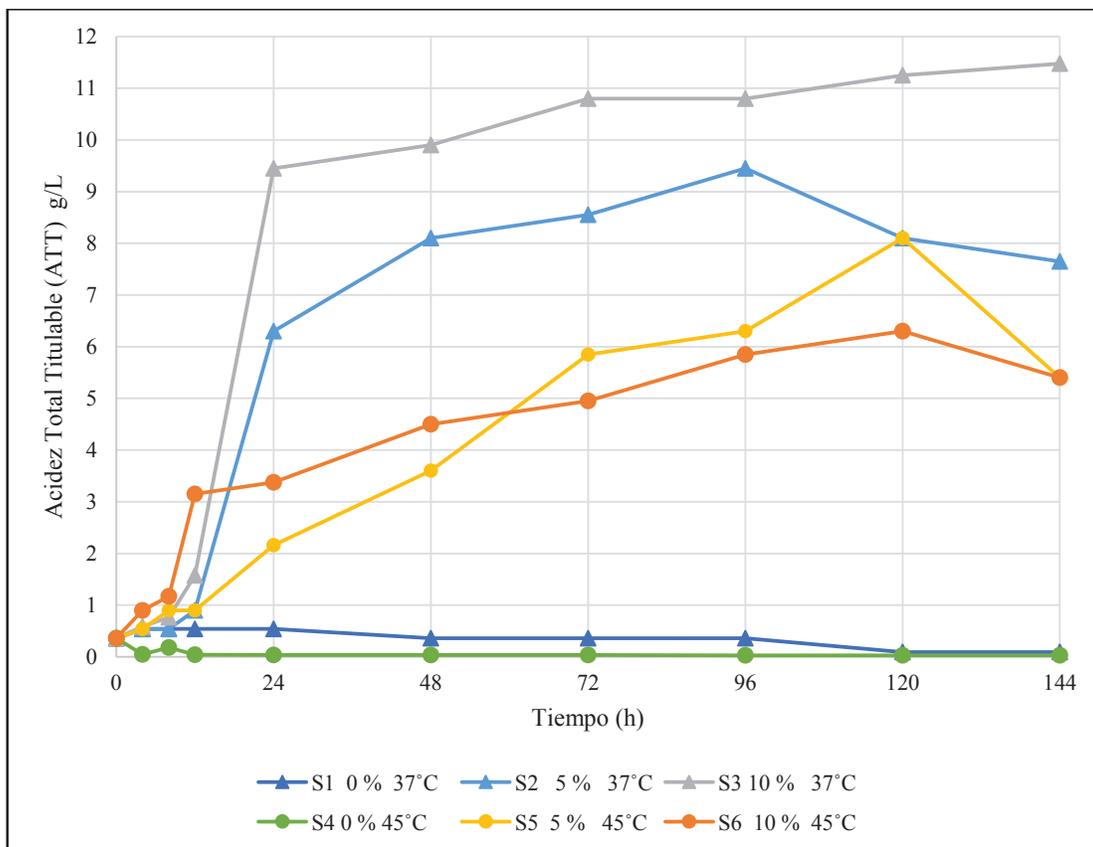


Figura 3.4. ATT en función del tiempo para los tratamientos sin control de pH

Las figuras 3.3 y 3.4 se encuentran relacionadas ya que el factor de pH es inversamente proporcional al comportamiento de la acidez total titulable, se observa que a medida que baja el pH el ácido láctico medido por medio de la acidez total titulable (ATT) se incrementa y viceversa.

De los seis tratamientos de estudio analizados, dos de estos presentaron un comportamiento diferente al esperado. El pH de los tratamientos (S1 y S4) presentó una tendencia creciente a partir de las 24 horas. En las primeras 12 horas se observó un aumento en la producción de ácido láctico de 0,36 g/L hasta 0,54 g/L para el tratamiento S1 y una disminución del pH, mientras que en el tratamiento S4, la ATT fue de 0,1 g/L hasta valores de 0,01 g/L en el mismo periodo de tiempo. A partir de las 24 horas hasta las 144 horas el comportamiento es similar para los dos tratamientos, los pHs de S1 y S4 se incrementaron hasta un valor cercano a 8 al finalizar el proceso.

Estos resultados llevan a pensar que se produjo un proceso de putrefacción de la cáscara de camarón, probablemente, debido a la ausencia de una fuente de carbono a la que fueron sometidos S1 y S4.

El consumo del 77 % de la sacarosa se da en las primeras 12 horas de la fermentación ya que como lo explica Agudelo et al. (2010), la fuente de carbono es primordial para la adaptación del microorganismo y posteriormente la producción del ácido láctico (pp. 3-9). La única fuente de carbono (sacarosa) para los tratamientos S1 y S4 fue la presente en el medio de inoculación que parece que no fue suficiente para la adaptación del microorganismo en el sustrato (cáscara de camarón) y posteriormente en la producción de ácido láctico.

En el tratamiento S1, en el que se trabajó a 37 °C, la cáscara de camarón inició su proceso de putrefacción a las 72 horas con un pH de 7,51 que llegó a un valor de 7,98 a las 144 horas. Mientras que el tratamiento S4 realizado a 45 °C, inició la descomposición aceleradamente a partir de la cuarta hora, con un pH de 7,51 y llegó a un pH de 8,23 al terminar el experimento.

Como se menciona en las investigaciones de Chávez y López (2011), y, Shahidi y Synowiecki (2005), la cáscara de camarón tiene un cultivo iniciador de microorganismos nativos a 25 °C, temperatura a la cual comienza el crecimiento microbiano sin producir la putrefacción de la cáscara; pero si la temperatura aumenta, y existe ausencia de una fuente de carbono, los pHs mayores a 7,5 tienen un efecto putrefactivo en la cáscara, impidiendo el proceso de fermentación láctica (p. 2; pp.1 521-1 532).

Los estudios realizados por Bhaskar et al., (2012), demostraron que en un proceso de extracción de quitina por fermentación de cáscara de camarón con bacterias lácticas, la falta de glucosa en el sustrato produce un incremento del pH de 7,5 a 8 porque estas bacterias quedan en la fase de adaptación por la falta de nutriente, lo que a su vez, produce el crecimiento de la microflora de putrefacción (pp. 570-577).

Adour et al. (2012) usaron caparazones de langostinos y *Lactobacillus helveticus* para la extracción de quitina y encontró que cuando se consumió el 85 % de la glucosa, la cantidad de amonio fue de 2 g/L, y el pH incrementó de 6 a 7,4, indicativo de que se inició el proceso de putrefacción (pp. 1 664-1 669).

Por otro lado, Rivera. (2005) estudió la presencia de amonio no-ionizado, que se da en ausencia o presencia de oxígeno en la cáscara de camarón, durante el proceso de descomposición una vez removida la parte comestible del camarón. El amoniaco no-ionizado aporta al crecimiento de bacterias mesófilas, termófilas y mohos, que son más resistentes que el *Lactobacillus delbrueckii* a temperaturas mayores a 25 °C (p. 482).

El incremento tanto del pH como de la temperatura producen un mayor porcentaje de amoniaco no-ionizado, sus estudios reportaron que a un pH de 7,6 y 30 °C el porcentaje de amoniaco fue de 2,0 %, mientras que a la temperatura de 32 °C con un pH de 8,6 se obtuvo un porcentaje de 27,68 % de amoniaco no-ionizado. El pH llega a niveles tóxicos lo que producen la descomposición de la cáscara (Rivera, 2005, p. 482).

El comportamiento de los tratamientos S1 y S4 respondería a un proceso de putrefacción debido a la falta de fuente de energía y al efecto de la temperatura; obteniéndose una menor putrefacción de la cáscara cuando se trabaja a 37 °C. No obstante, en las dos condiciones de temperatura se da la putrefacción quizá por la presencia de otras bacterias que crecen a temperaturas mayores a 15 °C, como *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Shewanella putrefaciens* (Chávez, 2010, p. 2).

Los tratamientos S2, S5, S3, S6, con porcentajes de sacarosa del 5 % y 10 % presentaron el comportamiento esperado para la obtención de quitina. El pH disminuye con el transcurso del tiempo, lo que indica que el ácido láctico aumenta. Se observa claramente que la presencia de sacarosa favorece la fermentación láctica.

Todas las muestras presentaron una disminución acelerada del pH, en las primeras 24 a 48 horas, esto puede darse por la rápida adaptación del microorganismo y el consumo acelerado de la fuente de carbono.

Agudelo et al. (2010) encontraron que en las primeras 10 horas se consume el 20 % de la sacarosa, se evita la putrefacción del sustrato, y se produce el 1,5 % de ácido láctico; mientras que a las 48 horas se consume el 98 % de la sacarosa que da una producción láctica del 35 % (pp. 8 -16); comportamiento similar muestran los tratamientos S2, S5, S3, S6.

Se observa que para estos tratamientos, a partir de las 48 horas la disminución del pH es pequeña y a partir de las 72 horas prácticamente se mantiene constante; lo mismo sucede con la producción de ácido láctico, es acelerado en las primeras 48 horas y a partir de las 72 horas, es pequeña, comportamiento que se debería a la disminución de la fuente de nutrientes.

Agudelo et al. (2010) manifiestan que una vez agotada la fuente de carbono (sacarosa), el microorganismos recurre a los otros nutrientes presentes en el medio, en este caso la proteína y carbohidratos que se encuentra en la cáscara de camarón. Estos nutrientes son la nueva fuente de energía para que continúe la producción de ácido láctico. Pero el acceso a estos nutrientes es difícil debido a que se encuentran enlazados con otros compuestos de la cáscara como los pigmentos y la quitina, lo que produce una concentración láctica pequeña (pp. 8-16).

Otro factor que impide que el *Lactobacillus delbrueckii* obtenga los nutrientes según Agudelo et al. (2010), es la presencia del lactato de calcio, que se forma durante la fermentación. El lactato retarda o inclusive inhibe el crecimiento de los microorganismos presentes en el medio (pp. 8-9).

Con el análisis estadístico realizado por el método del Tukey, se determinó que no hay diferencias significativas entre los porcentajes de sacarosa de 5 % y 10 % en la disminución del pH ($p < 0,05$), mientras que para 0 % de sacarosa es

significativamente diferente. Este comportamiento se ve representado en la Figura 3.5.

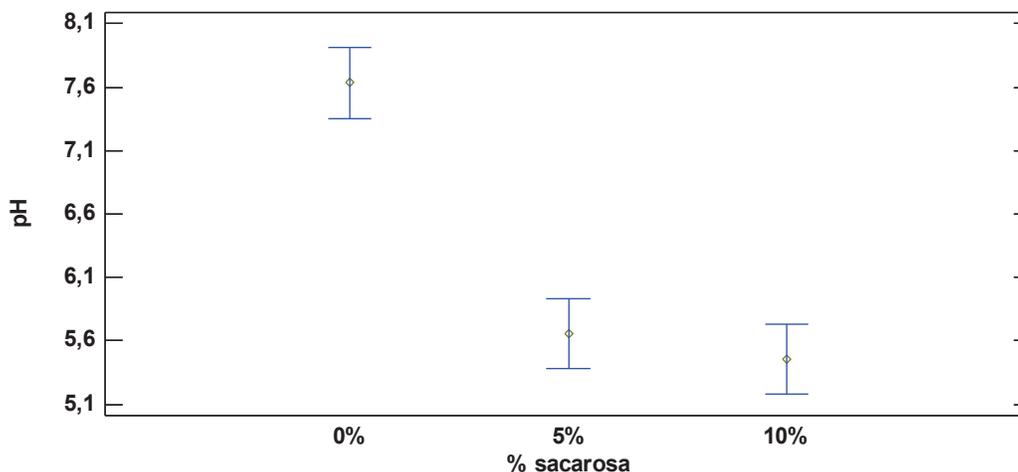


Figura 3.5. Efecto del porcentaje de sacarosa sobre el pH en los tratamientos sin control de pH (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)

3.2.1.1 Efecto de la temperatura

En la Figura 3.6 se presenta la variación del pH en función del tiempo al trabajar con 5 % sacarosa a las temperaturas de 37 °C y 45 °C.

Cuando se trabaja con sacarosa al 5 %, se observa que existe una disminución del pH más acelerada cuando la temperatura es 37 °C que cuando es 45 °C, en las primeras 24 a 48 horas de trabajo. Esto pudo darse debido a que el *Lactobacillus* tuvo una mejor adaptación a la temperatura de 37 °C.

A partir de las 48 horas los tratamientos S2 y S5 tienen valores de pH cercanos conforme transcurre el tiempo, y a las 120 horas tienen el mismo valor de 4.9. Pero a partir de las 120 horas se presenta un incremento del pH para los dos tratamientos pero este incremento es superior para S5 que trabaja a 45 °C, esto pudo deberse a que la fuente de carbono se agotó, también pudo darse este comportamiento ya que a esta temperatura la cáscara presenta una mayor tendencia a la putrefacción como se mostró en los tratamientos con 0 % de sacarosa.

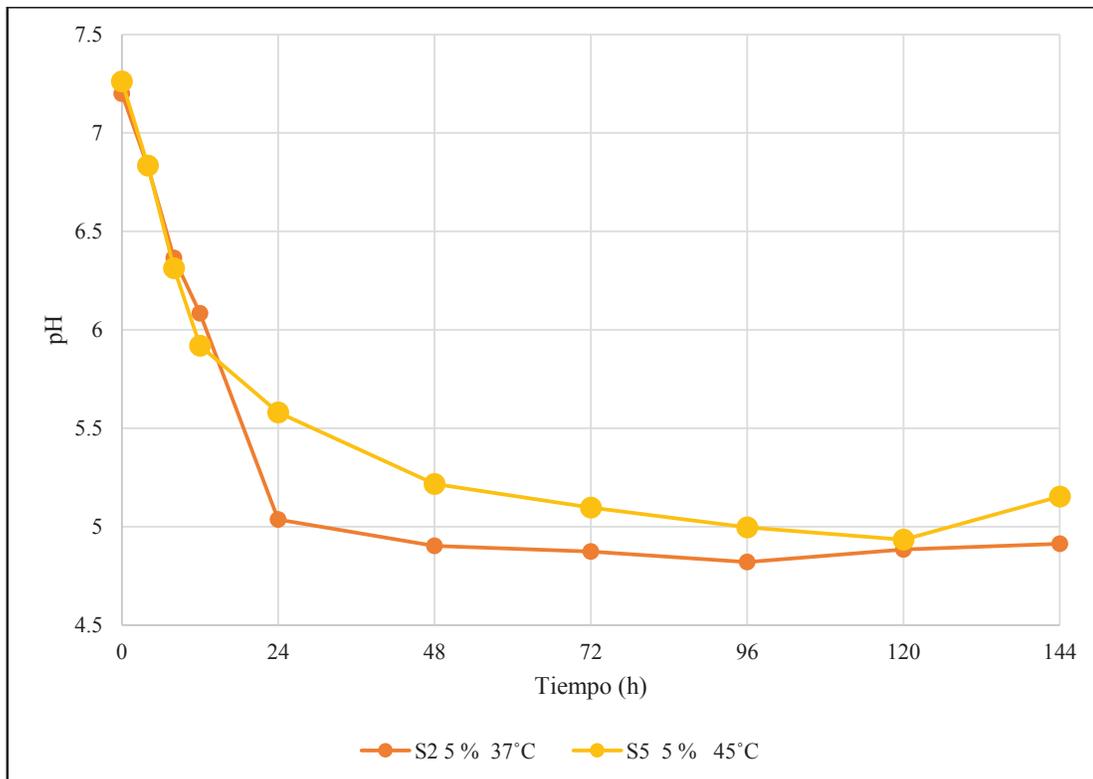


Figura 3.6. pH en función del tiempo a las temperaturas de 37 °C y 45 °C con 5 % de sacarosa

Para Bhaskar et al. (2012), trabajar con temperaturas que se encuentran en el rango de crecimiento del *Lactobacillus*, no garantiza una producción de ácido láctico favorable ya que depende de otros factores como: el porcentaje del inóculo y las fuentes de los nutrientes. Los resultados obtenidos por Bhaskar et al. (2012) reportaron que a 35 °C, la producción láctica con el *Lactobacillus* fue mejor que a 37 °C (pp. 570-577).

En la Figura 3.7 se presenta la variación pH en función del tiempo al trabajar con 10 % sacarosa a las temperaturas de 37 °C y 45 °C.

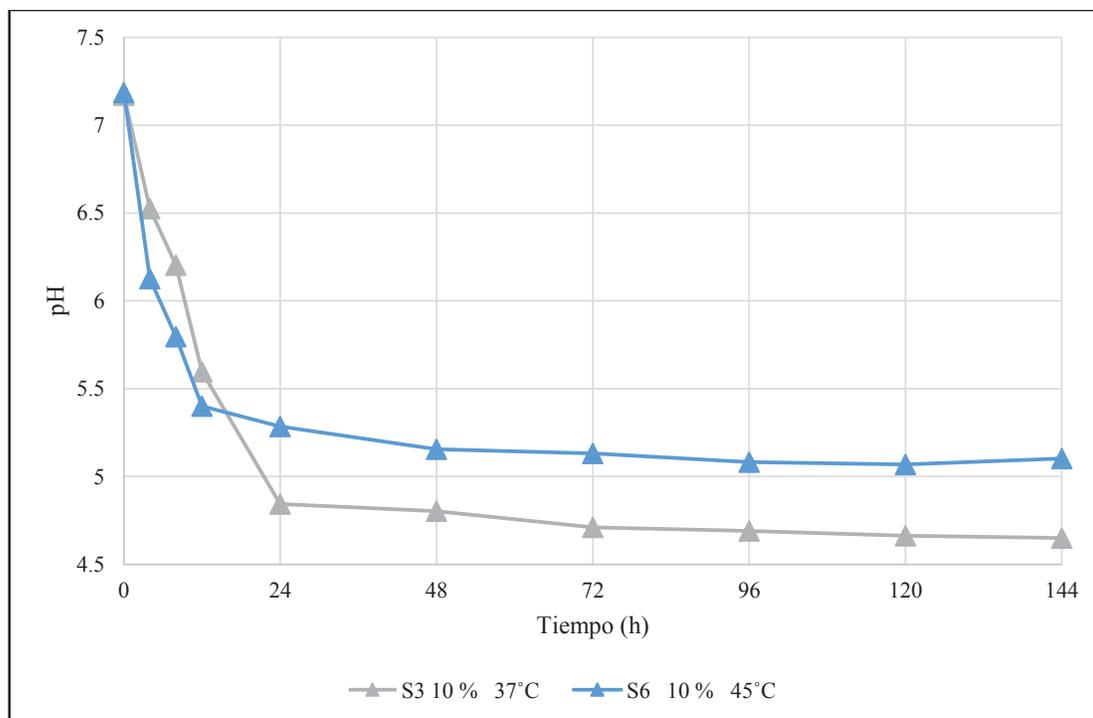


Figura 3.7. pH en función del tiempo a las temperaturas de 37 °C y 45 °C con 10 % de sacarosa

En las primeras 24 horas se observa una mayor disminución del pH para S3, tratamiento con el que se trabajó a 37 °C. Un comportamiento parecido se presenta para S6 pero el pH en las primeras 24 horas llegó a 5,2, este valor fue mayor al obtenido por S3 que fue de 4,8.

A partir de las 24 hasta las 120 horas los dos tratamientos no presentaron una disminución representativa de pH. Pero a partir de las 120 horas de trabajo, para el tratamiento S6 se da un ligero incremento de pH, lo que sugeriría que a 45 °C podría haber una mayor tendencia a la putrefacción.

Según Friedman y Gaden (2007), se presenta una mejor adaptación y crecimiento del *Lactobacillus delbrueckii* a la temperatura de 37 °C y se da una mejor producción de ácido láctico a nivel industrial (p. 961-964).

Se observó que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre 37 °C y 45 °C, por lo que se podría trabajar a 37 °C o 45 °C. El análisis de comparación de medias por el método de Tukey se expresa en la Figura 3.8.

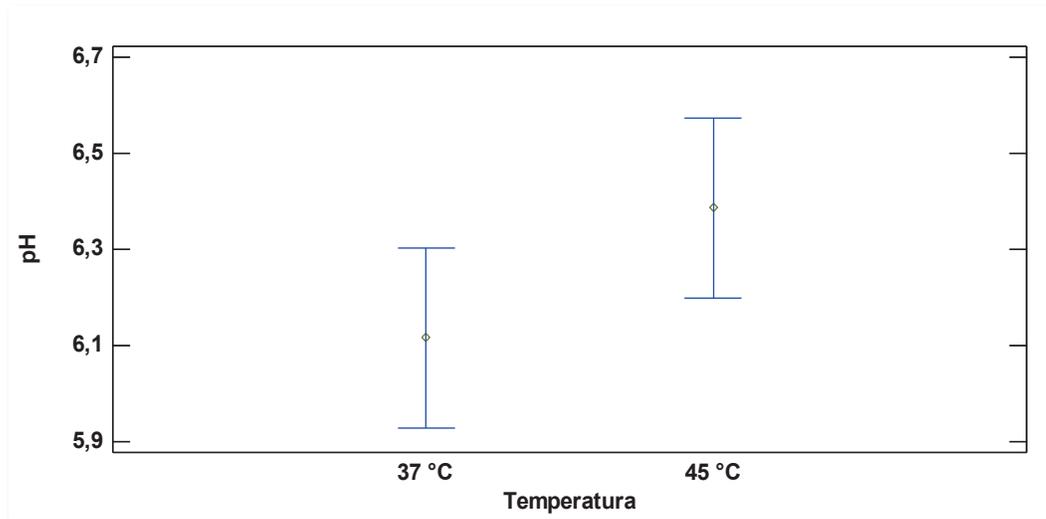


Figura 3.8. Efecto de la temperatura sobre el pH, para los tratamientos sin control de pH (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)

3.2.1.2 Variación de azúcares reductores durante el proceso fermentativo sin control de pH

En los resultados presentados se observa que cuando los medios contienen fuente de carbono independientemente de su concentración y de la temperatura de trabajo, la disminución del pH se da muy rápidamente hasta las 48 horas, lo que significaría que se agotó la fuente de carbono. A partir de las 48 horas hasta las 120 horas el pH prácticamente no disminuye, al igual que la concentración de ácido láctico medida con ATT, que se mantiene casi constante, lo que significaría que continúa el proceso de fermentación láctica y no se da el proceso de putrefacción al agotarse la fuente de energía. Esto implicaría que el microorganismo está recurriendo a los carbohidratos presentes en la cáscara de camarón (Agudelo et al., 2010, pp. 8-16), para lo cual debe desmineralizar y desproteinizar al sustrato, que da como consecuencia la liberación de la quitina, que es lo que se busca en

este estudio. Por esta razón, se determinó la concentración de azúcares reductores en la fermentación para los tratamientos S2, S3, S5 y S6 que fueron los que no sufrieron putrefacción.

En la Figura 3.9 se presentan los resultados de la concentración de azúcares reductores en función del tiempo, obtenidos de los datos del Anexo VIII.

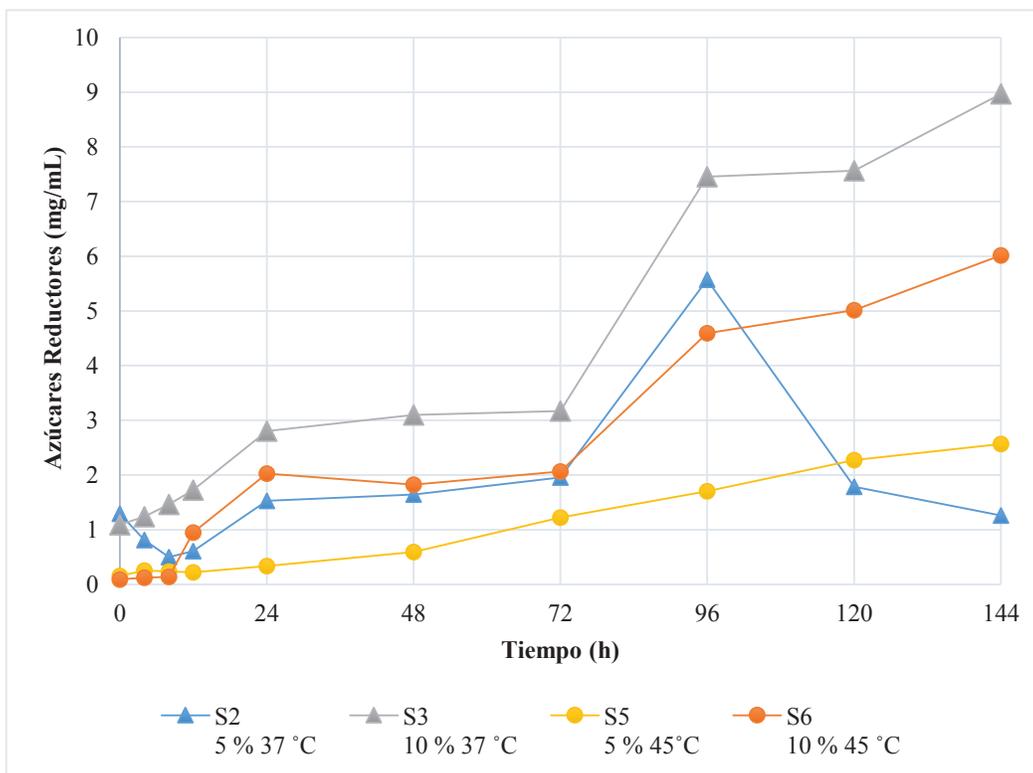


Figura 3.9. Azúcares reductores en función del tiempo sin control de pH

Los tratamientos S6, S3 y S5 presentan la misma tendencia del incremento de azúcares reductores paulatinamente hasta las 72 horas, y posteriormente un incremento pronunciado. El comportamiento durante las primeras 72 horas coincide, aproximadamente con el agotamiento de la sacarosa presente en el sustrato; la sacarosa se hidrolizó produciendo glucosa y fructosa que son azúcares reductores, esta hidrólisis se daría por generación de enzimas por parte del microorganismo (Sánchez, et.al, 2013, pp. 94-102), y se incrementaría por la presencia del ácido láctico, ya que este último hidroliza a la sacarosa durante el

proceso de fermentación (Sánchez y Bárcena, 2007, pp. 1 573-3 417). A partir de las 72 horas, se da un incremento notable de azúcares reductores, esto podría deberse a que, si bien se agotó la sacarosa del medio, el microorganismo logró obtener energía de los carbohidratos y proteínas presentes en la cáscara de camarón y por esta razón se evitaría la putrefacción de la cáscara. Este es un comportamiento esperado ya que se sabe que en estos procesos a medida que se incrementa el ácido láctico, se incrementa la concentración de azúcares reductores (Adour et al., 2008, pp. 1 664-1 669).

El tratamiento S2 (5 % de sacarosa, 37°C) presenta un comportamiento diferente, la concentración de azúcares reductores disminuye durante las primeras 12 horas, este comportamiento se debería a reacciones irreversibles; según Sanchez & Bárcena (2007), esto se puede dar ya que en las primeras horas las reacciones que se producen son reversibles pero posteriormente se vuelven irreversibles y la concentración de los azúcares es más fácil de determinar (pp.1 573-3 417).

A medida que se incrementa la producción de ácido láctico la concentración de azúcares incrementa (Adour et al., 2008, p 1664-1669). Para el tratamiento S3 se muestra este comportamiento ya que la mayor producción de ácido láctico produjo una mayor concentración de azúcares reductores que fue de 8,96 mg/ml. Por lo tanto, el incremento de la concentración de azúcares reductores es directamente proporcional a la producción de ácido láctico.

Finalmente, al terminar el análisis del pH, ATT, Azúcares Reductores, y los resultados estadísticos, se encontró que la concentración de sacarosa 5 % y 10 % y que la Temperatura (37 °C y 45 °C) no presentan diferencias estadísticamente significativas. Lo que indica que las mejores condiciones de trabajo solo se podrán establecer al observar que efecto tuvieron estos factores en la desproteización y desmineralización de la cáscara de camarón al finalizar el proceso fermentativo.

3.2.2 TRATAMIENTO CON CONTROL DE pH

En la figura 3.10, se representan los resultados del rango de pH en el que se mantuvo a los seis tratamientos con control de pH. Los datos de pH de la Figura 3.10 se encuentran en las Tablas AVIII.4 del Anexo VIII.

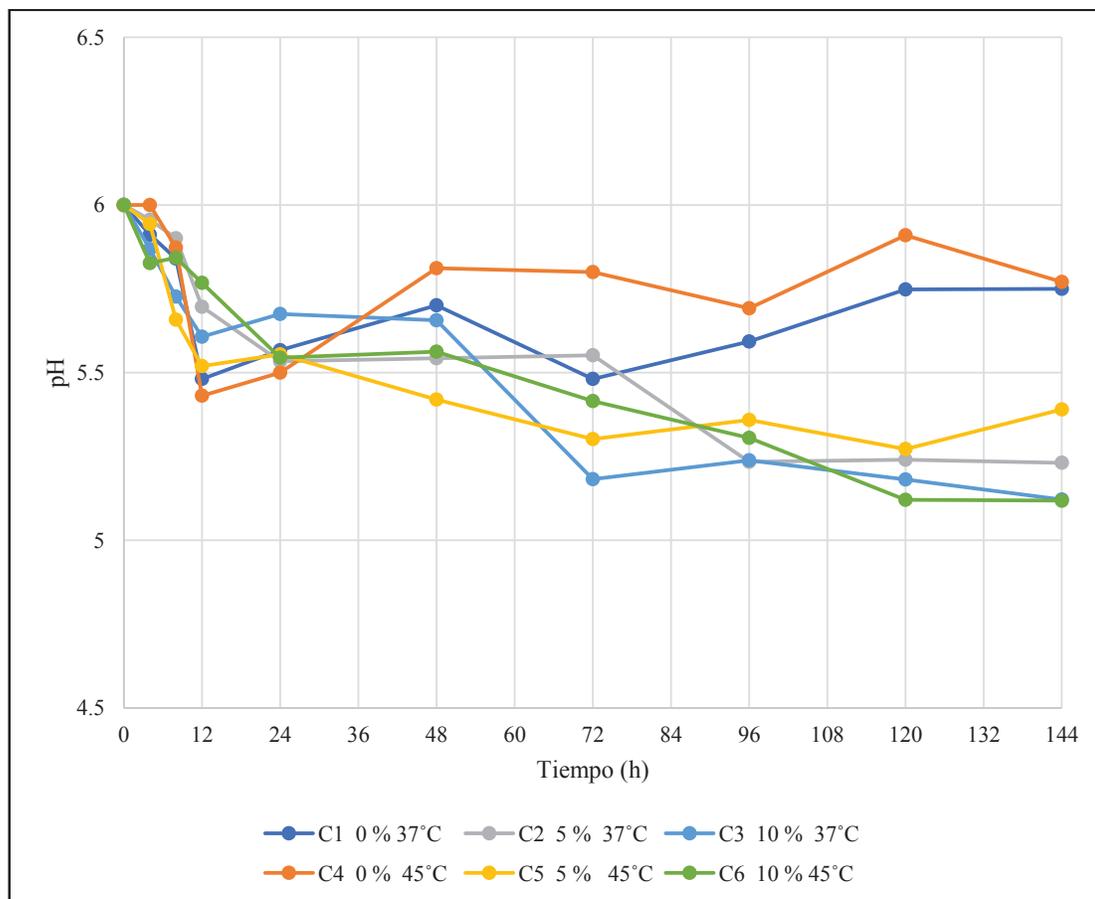


Figura 3.10. Control de pH en un rango de 6 a 5 para los seis los tratamientos

Los tratamientos C1 y C4 presentan un comportamiento diferente al de los otros tratamientos (C2, C3, C5, C6) ya que estos requirieron HCl 0,1 N para mantener el pH entre 5,5 y 6; esta tendencia podría deberse a que C1 y C4 trabajaron con 0 % de sacarosa, comportamiento similar al obtenido con los tratamientos S1 y S4 (sin control de pH) que corresponden al sustrato con 0 % de sacarosa donde se produjo un proceso de putrefacción; pero al controlar el pH, en estos tratamientos se estaría inhibiendo el proceso de putrefacción y no se estaría dando la fermentación láctica

deseada. En cambio para los tratamientos C2, C3, C5, C6, se añadió NaOH 0,1 N para mantener el pH de 5 a 5,5, estos tratamientos trabajaron con porcentaje de sacarosa, lo que produce una disminución de pH debido a la producción de ácido láctico.

La Figura 3.11 corresponde a los resultados de la Acidez total titulable durante el proceso fermentativo con control de pH para los seis tratamientos.

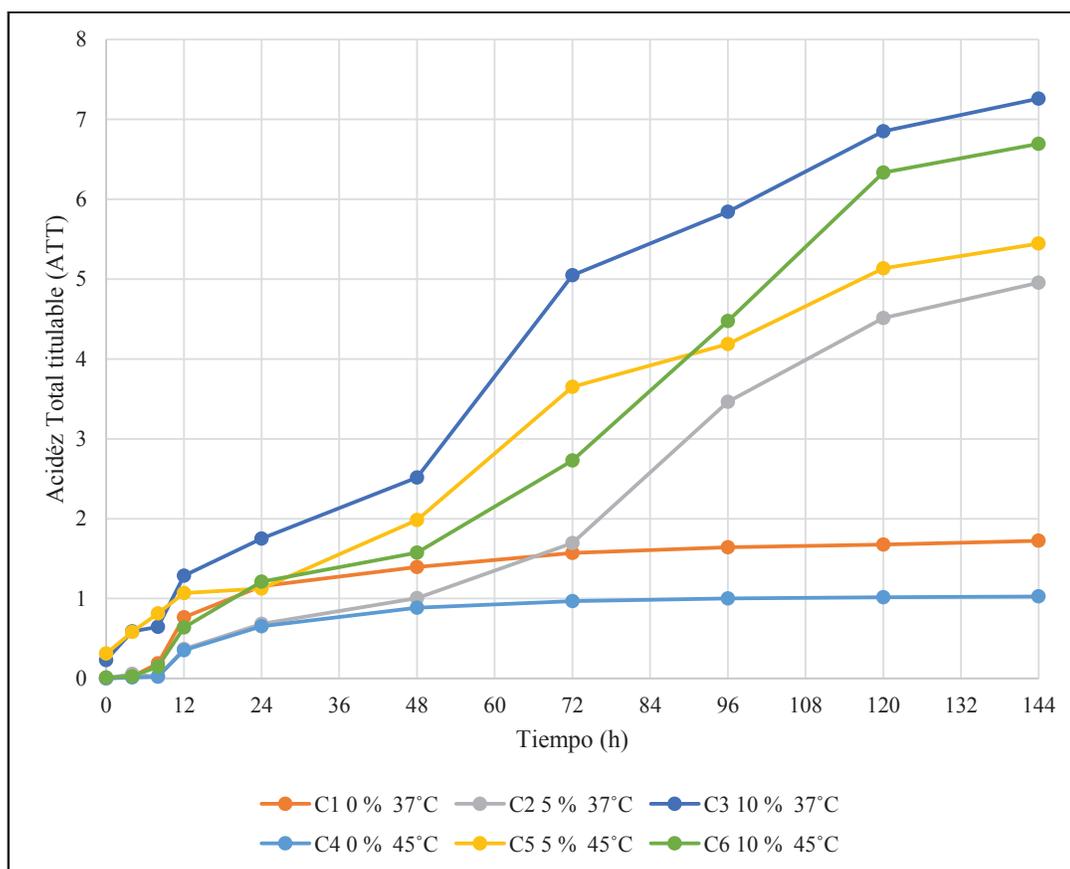


Figura 3.11. ATT en función del tiempo para los tratamientos con control de pH

Todos los tratamientos C2, C3, C5 y C6 presentan la misma tendencia y es similar a la observada en el proceso sin control de pH; pero a diferencia del proceso sin control de pH, no se observa putrefacción de la cáscara de camarón para los tratamientos (C1 y C4) con 0 % de sacarosa; no obstante, para estos tratamientos (C1 y C4) tanto a 37 °C y como a 45 °C se obtiene la menor concentración de ácido láctico y no varía desde las 48 horas de iniciado el proceso.

Los tratamientos C3, y C6 que trabajaron con 10 % de sacarosa presentaron un mayor valor de acidez total titulable correspondiente a 7,25 g/L y 6,69 g/L. Un comportamiento parecido pero con un efecto menor obtuvieron los tratamientos C2 y C5, con 5 % de sacarosa cuyas concentraciones fueron de 4,95 g/L y 5,44 g/L.

Con la gráfica de medias del porcentaje de la acidez total titulable en función de la sacarosa, se establece que no hay diferencia estadísticas significativas al trabajar con 5 % o 10 %, el efecto contrario se presenta con el 0 % de sacarosa que si tiene diferencias y no se obtuvo bueno resultados. Por lo que se podría trabajar a 5 % o 10 % de sacarosa. Estos resultados son similares a los obtenidos en el proceso sin control de pH.

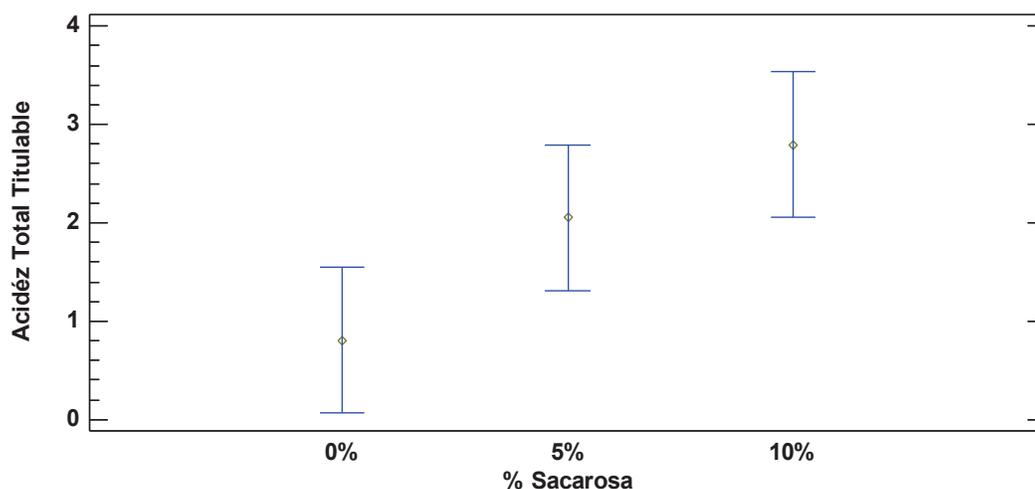


Figura 3.12. Efecto del porcentaje de sacarosa sobre la acidez total titulable (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)

Si bien no hay diferencias estadísticas significativas una mayor concentración de sacarosa favorece el proceso fermentativo, por las razones ya discutidas anteriormente.

3.2.2.1 Efecto de la temperatura

En la Figura 3.13 se presenta la variación de la ATT en función del tiempo al trabajar con 0 % sacarosa a las temperaturas de 37 °C y 45 °C.

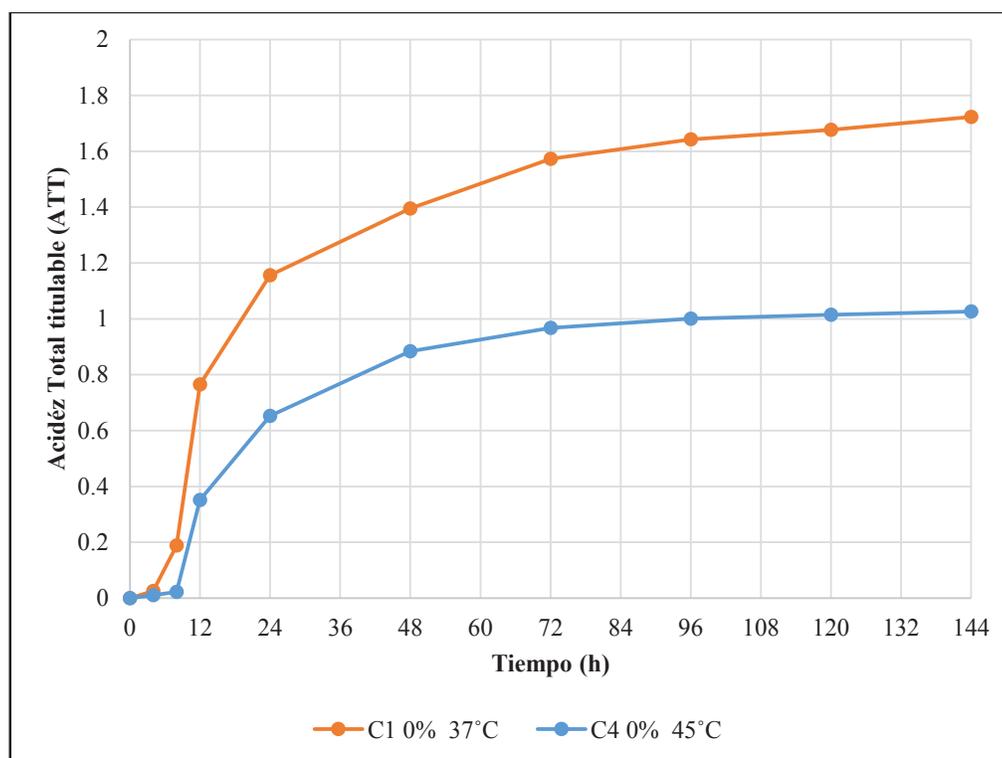


Figura 3.13. ATT en función del tiempo a la temperatura de 37 °C y 45 °C con 0 % de sacarosa

En las primeras 24 horas se tiene un incremento de la producción de ácido láctico que es mayor cuando se trabaja con a 37 °C que a 45 °C, esto debe darse porque el microorganismo se adaptó mejor a la temperatura de 37 °C. Cuando el proceso se encuentra a las 48 horas la producción del ácido ya no es acelerada y tiende a volverse constante con el tiempo, lo cual muestra un agotamiento de la fuente de carbono, que en este caso proviene del sustrato con la cáscara.

En las Figura 3.14 y 3.15 se presenta la variación de la ATT en función del tiempo al trabajar con 5 % y 10 % de sacarosa respectivamente a las temperaturas de 37 °C y 45 °C.

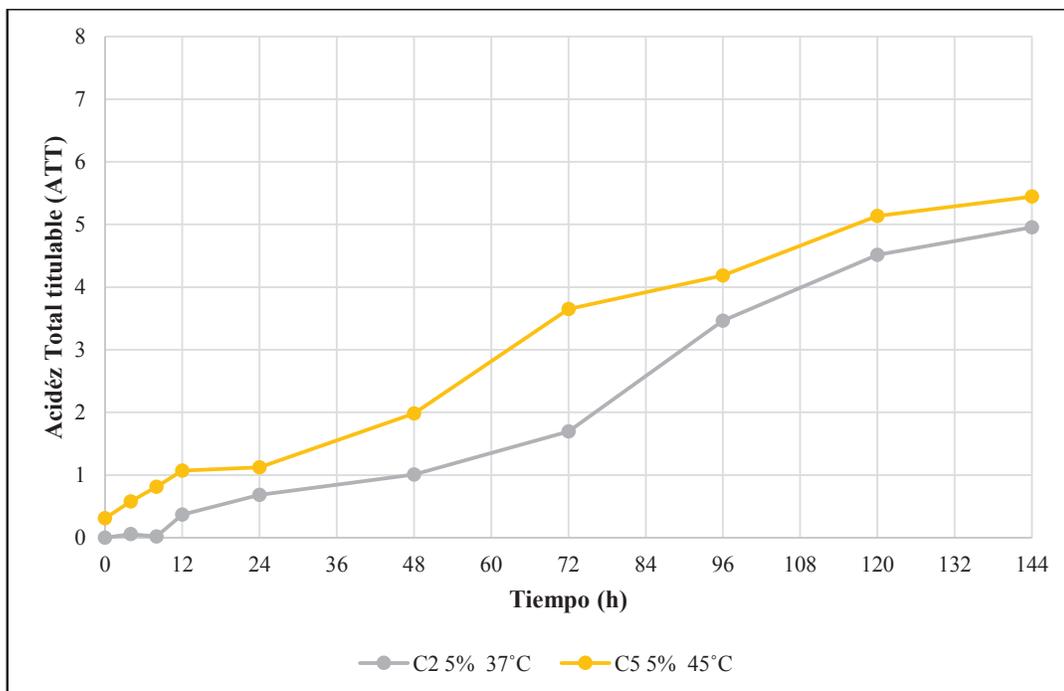


Figura 3.14. ATT en función del tiempo a la temperatura de 37 °C y 45 °C con 5 % de sacarosa

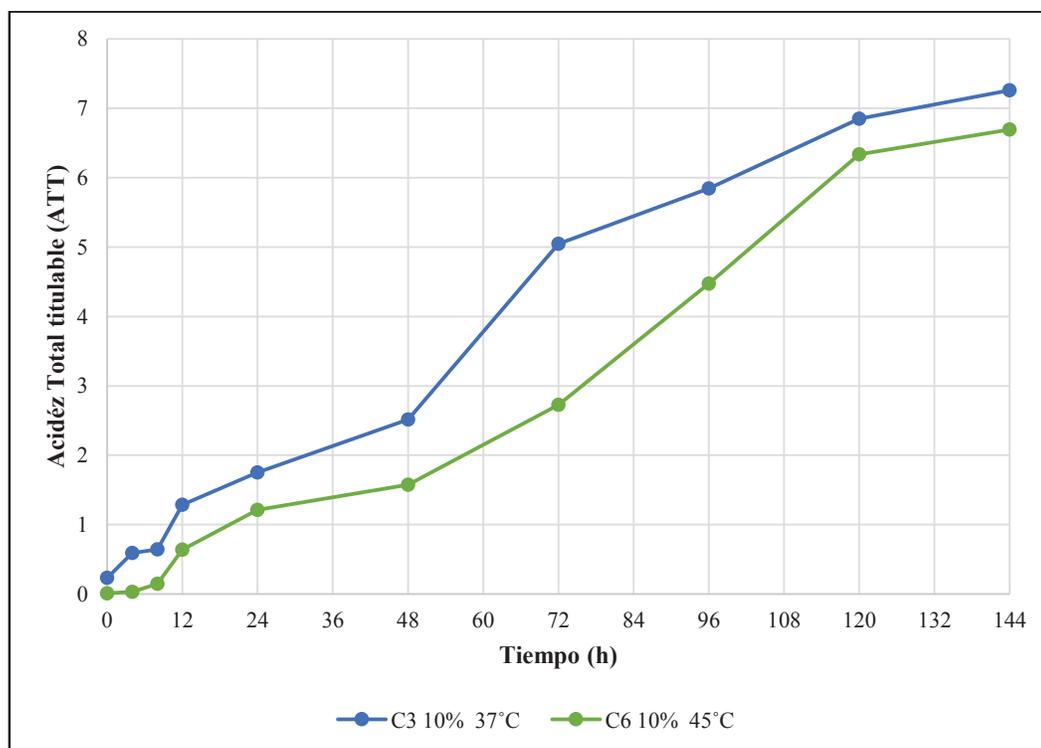


Figura 3.15. ATT en función del tiempo a la temperatura de 37 °C y 45 °C con 10 % de sacarosa

Tanto la Figura 3.14 como 3.15 presentan un comportamiento parecido, donde el incremento del ATT es mayor a las 120 horas para las dos temperaturas de análisis. Para las dos temperaturas se tienen valores cercanos de producción de ácido láctico, lo que se diferencia es que al trabajar a un mayor porcentaje de sacarosa se tiene una mayor producción de ácido láctico.

El análisis de medias realizado por el método de Tukey coincide con el análisis realizado en las gráficas del efecto de temperatura, ya que no hay diferencias estadísticamente significativas, y se podría trabajar tanto a 37 °C como a 45 °C. Sin embargo, a 37 °C se obtiene mayor cantidad de ácido láctico, resultados similares a los presentados por otro trabajos mencionados anteriormente (Friedman y Gaden, 2007, pp. 961-964).

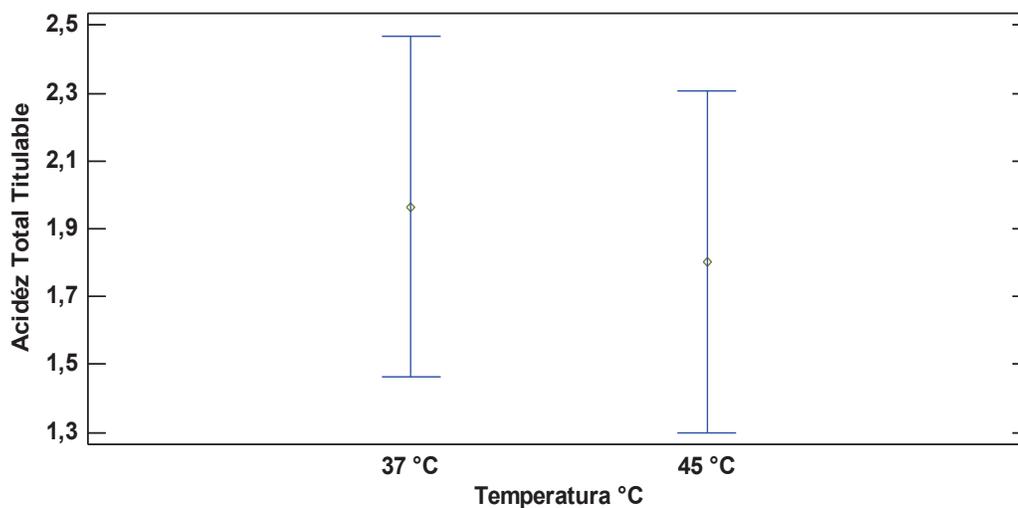


Figura 3.16. Efecto de la temperatura sobre la acidez total titulable para tratamientos con control de pH (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)

3.2.2.2 Variación de azúcares reductores durante el proceso fermentativo con control de pH

Los resultados de la variación en la concentración de azúcares reductores conforme transcurrió el tiempo de fermentación en el proceso, con control de pH se presenta en la Figura 3.17.

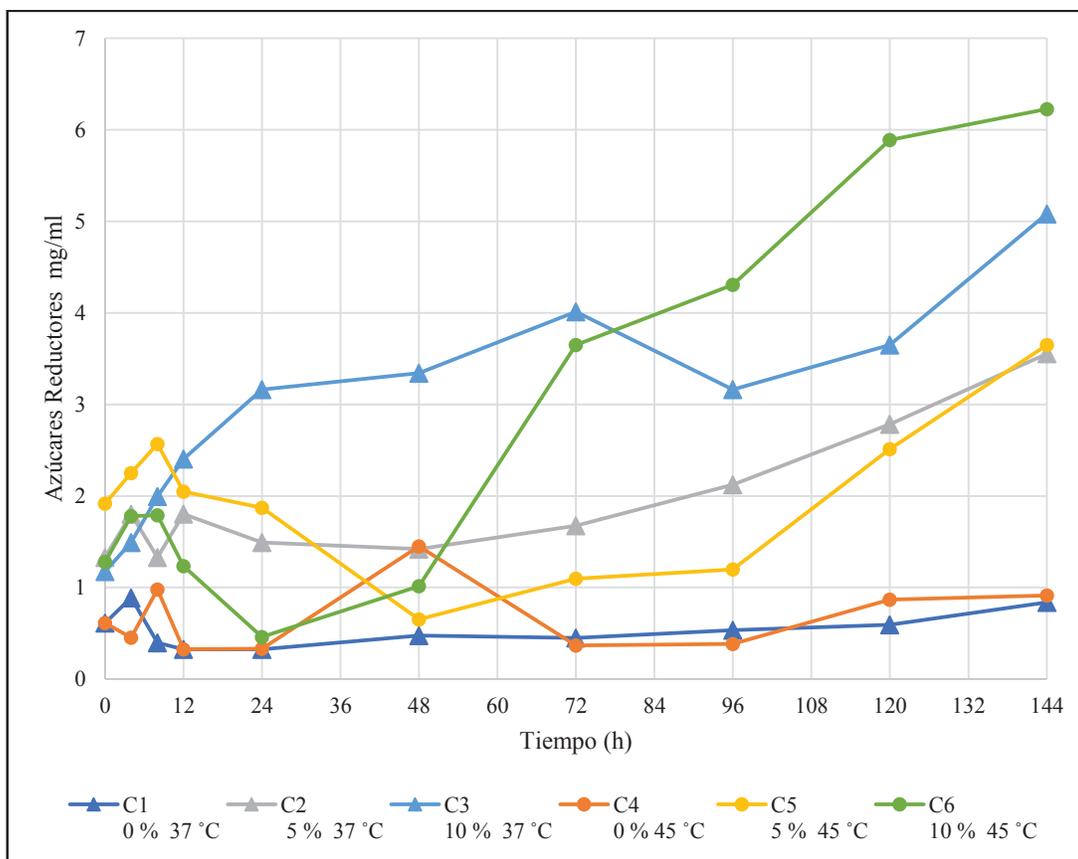


Figura 3.17. Concentración de azúcares reductores en función del tiempo con control de pH

Los tratamientos con 0 % de sacarosa no incrementan la concentración de azúcares reductores, es decir que el microorganismo no logra obtener los carbohidratos de la cáscara de camarón y transformarlo en ácido láctico, por lo tanto no se produce la fermentación deseada y el control del pH inhibiría o retrasaría la putrefacción observada en los tratamientos sin control de pH.

Los estudios realizados por Bhaskar, et al., 2007, destacan que la cáscara de camarón por sí sola en sus características naturales tiende a un estado alcalino entre un pH de 7,5 a 8, lo cual produce una microflora de putrefacción, por lo que no se produce concentraciones de ácido láctico ni azúcares reductores representativos (p. 1 427-1 434), como los resultados que se presentan en este estudio donde al controlar el pH se previene la putrefacción y se obtiene concentraciones de ácido láctico y azúcares reductores.

Para los tratamientos C2, C3, C5, C6, la concentración de azúcares reductores se incrementa, con un comportamiento similar al observado en el proceso sin control de pH. También se observa que a mayor concentración de sacarosa mayor concentración de azúcares reductores. El comportamiento de ATT y de los azúcares reductores es similar en el proceso sin control de pH y con control de pH, sin embargo, los valores obtenidos de ATT y de azúcares reductores son menores para el proceso con control de pH. Estos comportamiento pudo deberse al sustrato y temperatura, ya que en estudios realizados por Serna y Rodríguez (2005) con un control de pH de 5,5 a 6,5, obtuvo una producción de ácido láctico de 1,78 g/L al trabajar con melaza en un rango de temperatura de 45 °C a 46 °C, por 48 horas con el *Lactobacillus delbrueckii* (54-65). Otro análisis realizado por Serna y Rodríguez (2005) expresa que el microorganismo al ser sometido a la sosa para mantener el pH del medio se inhibe por su baja tolerancia a las bases fuertes, por lo recomiendan someter al microorganismo a una mutagénesis que le permitirá obtener una mayor resistencia a la alcalinidad y por lo tanto se obtendrían concentraciones mayores de ácido láctico (pp.54-65).

En las Tablas 3.2 y 3.3 se presentan un resumen de los resultados obtenidos en este trabajo donde, para el proceso sin control de pH y con control de pH. Se observa que tanto la ATT como la concentración de azúcares reductores son mayor para los tratamientos sin control de pH independientemente de la temperatura y de la concentración de sacarosa.

Tabla 3.2. Resultados de ATT de los tratamientos sin y con control de pH

Tratamientos	Acidez Total Titulable (g/L)											
	0 % 37 °C		5 % 37 °C		10 % 37 °C		0 % 45 °C		5 % 45 °C		10 % 45 °C	
	Sin Control S1	Con control C1	Sin Control S2	Con control C2	Sin Control S3	Con control C3	Sin Control S4	Con control C4	Sin Control S5	Con control C5	Sin Control S6	Con control C6
0	0,36	0,00	0,36	0,00	0,36	0,23	0,00	0,36	0,00	0,36	0,36	0,01
4	0,54	0,03	0,54	0,06	0,59	0,59	0,01	0,05	0,01	0,54	0,90	0,03
8	0,54	0,19	0,54	0,02	0,77	0,64	0,02	0,18	0,02	0,90	1,17	0,15
12	0,54	0,77	0,90	0,37	1,58	1,28	0,35	0,04	0,35	0,90	3,15	0,64
24	0,54	1,16	6,30	0,68	9,45	1,75	0,65	0,04	0,65	2,16	3,38	1,21
48	0,36	1,40	8,10	1,01	9,90	2,52	0,88	0,04	0,88	3,60	4,50	1,57
72	0,36	1,57	8,55	1,70	10,80	5,05	0,97	0,04	0,97	5,85	4,95	2,73
96	0,36	1,64	9,45	3,47	10,80	5,84	1,00	0,03	1,00	6,30	5,85	4,47
120	0,09	1,68	8,10	4,51	11,25	6,85	1,02	0,03	1,02	8,10	6,30	6,34
144	0,09	1,72	7,65	4,96	11,48	7,26	1,03	0,03	1,03	5,40	5,40	6,69

Tabla 3.3. Resultados de Azúcares Reductores de los tratamientos sin y con control de pH

Tratamientos	Azúcares Reductores (mg/ml)											
	0 % 37 °C		5 % 37 °C		10 % 37 °C		0 % 45 °C		5 % 45 °C		10 % 45 °C	
	Sin Control S1	Con control C1	Sin Control S2	Con control C2	Sin Control S3	Con control C3	Sin Control S4	Con control C4	Sin Control S5	Con control C5	Sin Control S6	Con control C6
0	0,00	0,61	1,30	1,33	1,09	1,18	0,00	0,61	0,16	1,92	0,09	1,28
4	0,00	0,89	0,81	1,80	1,24	1,49	0,00	0,45	0,25	2,25	0,12	1,78
8	0,00	0,40	0,50	1,33	1,46	2,00	0,00	0,98	0,24	2,57	0,14	1,79
12	0,00	0,32	0,61	1,80	1,72	2,40	0,00	0,33	0,22	2,05	0,95	1,23
24	0,00	0,33	1,53	1,49	2,80	3,16	0,00	0,33	0,34	1,87	2,03	0,46
48	0,00	0,48	1,64	1,42	3,10	3,34	0,00	1,45	0,60	0,65	1,83	1,01
72	0,00	0,45	1,96	1,68	3,17	4,01	0,00	0,37	1,22	1,10	2,07	3,65
96	0,00	0,53	5,57	2,12	7,45	3,16	0,00	0,38	1,70	1,20	4,59	4,31
120	0,00	0,59	1,79	2,78	7,57	3,65	0,00	0,87	2,27	2,51	5,02	5,89
144	0,00	0,84	1,26	3,55	8,97	5,08	0,00	0,91	2,57	3,65	6,02	6,23

La gráfica de medias de la acidez total titulable ATT en función de la sacarosa para los tratamientos con y sin control de pH se analizó en la Figura 3.18. Los resultados muestran que al 0 % de concentración de sacarosa se presenta una diferencia estadísticamente significativa donde la producción de ácido láctico es muy baja por lo que no se realizó el proceso de despigmentación a los tratamientos (S1 y S4) con ausencia de sacarosa. El efecto contrario se obtuvo al trabajar con porcentajes de sacarosa de 5 % y 10 %, donde se obtuvo una producción de ácido láctico parecido en los dos casos, por lo tanto se podría trabajar con 5 % o 10 % de sacarosa.

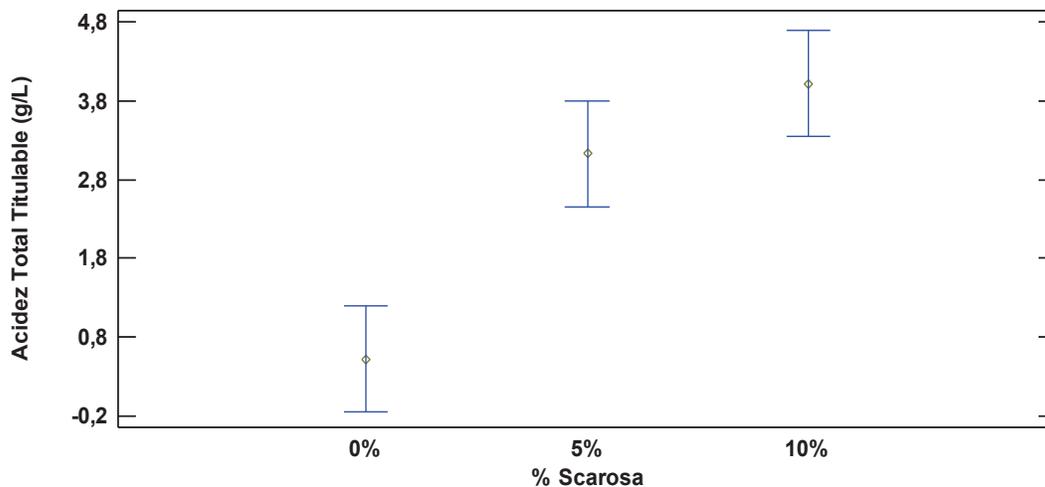


Figura 3.18. Efecto del porcentaje de sacarosa sobre la acidez total titulable para los tratamientos con y sin control de pH (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)

La comparación de medias de los azúcares reductores en función de la concentración de sacarosa presentado en la Figura 3.19, muestra se presentan diferencias estadísticamente significativas, siendo a 0 % la concentración que genera menor cantidad de azúcares reductores, seguida de 5 %. La mayor producción se obtiene al trabajar con el 10 % de sacarosa.

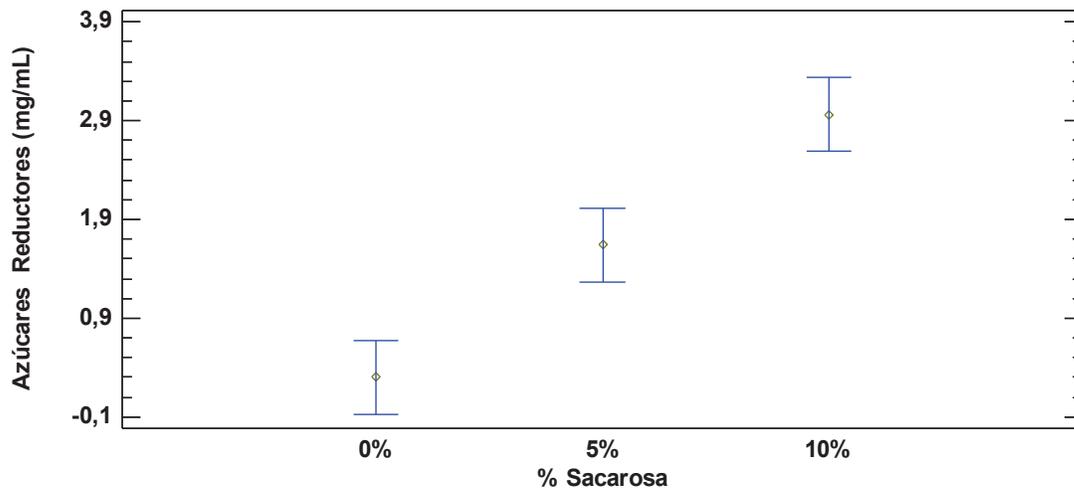


Figura 3.19. Efecto del porcentaje de sacarosa sobre los azúcares reductores para los tratamientos con y sin control de pH (Medias y 95,0% de Tukey HSD)

3.3 EFECTO DEL SUSTRATO, TEMPERATURA Y PH FINALIZADO EL PROCESO DE LA FERMENTACIÓN

Para determinar las condiciones del proceso fermentativo que favorece la obtención de quitina es necesario determinar el grado de desproteización y desmineralización que sufrió la cáscara de camarón durante la fermentación, ya que como se mencionó anteriormente, el microorganismo requiere de nutrientes que los obtiene de las proteínas y carbohidratos presentes en la cáscara de camarón, una vez que se agota la fuente principal de carbohidratos, es decir, la sacarosa que se añadió al medio (Agudelo et al., 2010, pp. 8-16). Es importante mencionar que Agudelo 2010, demostró que un tamaño de cáscara menor o igual a 0,5 cm ayuda a una mejor accesibilidad de esos nutrientes (p 8-16), por esta razón, en este proyecto se trabajó con un tamaño de la cáscara de camarón menor a 0,5 cm.

La desproteización se determinó al medir el porcentaje de remoción de proteína soluble y total; mientras que la desmineralización se midió a través del porcentaje de disminución de ceniza. Estos resultados se presentan en la Figura 3.20, los datos para realizar esta gráfica se muestra en la Tabla AIX.1 del Anexo IX y se analizan uno por uno a continuación.

3.3.1 EFECTO EN EL PORCENTAJE DE REMOCIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE

El porcentaje de remoción de la proteína soluble, para todos los tratamientos, fue mayor al 60 %. Para los tratamientos que trabajaron con el 10 % de sacarosa a 37 °C y 45 °C, se presentó una remoción mayor o igual al 80 %. Estos porcentaje de remoción para la proteína soluble, pueden tener una relación directa con la concentración de ácido láctico, ya que los tratamientos con mayor remoción son los que reportaron una mayor concentración de ácido láctico.

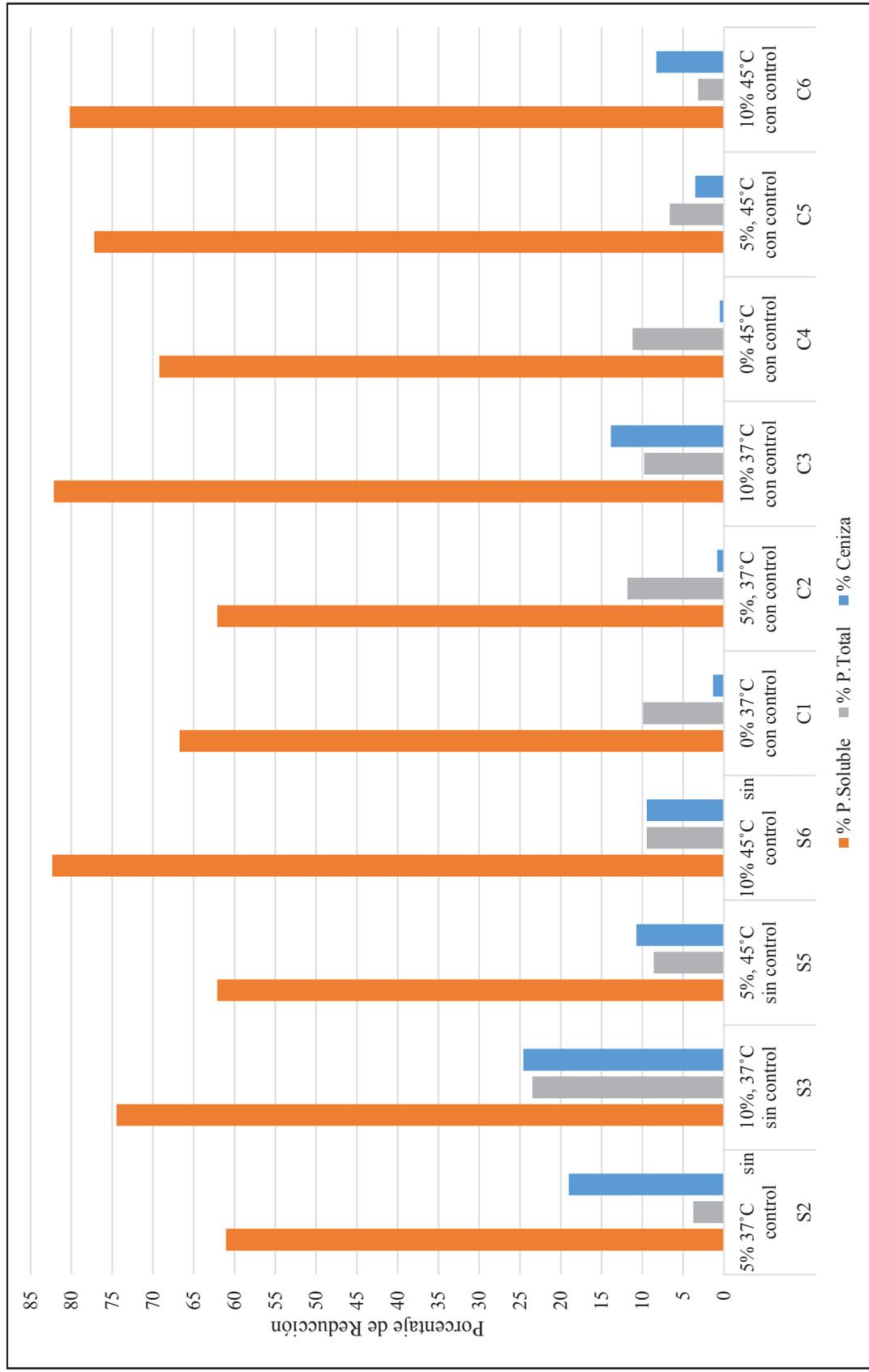


Figura 3.20. Porcentaje de Reducción ceniza, proteína soluble y total en función de cada Tratamiento de fermentación con y sin control de pH

Para Bhaskar et al., (2012), la proteína soluble es de fácil remoción ya que al tener una fuerza iónica débil se favorece la separación de los otros compuestos que se encuentran en la cáscara de camarón, al entrar en contacto con agua o con un ácido; por otro lado, la proteína soluble se hidroliza con el ácido láctico producto de la fermentación, por lo que a una mayor producción láctica mayor cantidad de proteína se hidroliza y se solubiliza (pp. 570-577).

El mayor porcentaje de remoción de proteína soluble se presentó al trabajar con 10 % de sacarosa con un porcentaje de remoción mayor al 80 %, una remoción menor se presentó con el 5 % de sacarosa y para el 0 % se obtuvo la menor remoción. La temperatura que favoreció la remoción es la de 45°C y en condiciones de control de pH.

El análisis de varianza ANOVA presentado en las Figuras 3.21, 3.22, 3.23 determina que el porcentaje de sacarosa, la temperatura y el pH presentan diferencias estadísticamente significativas.

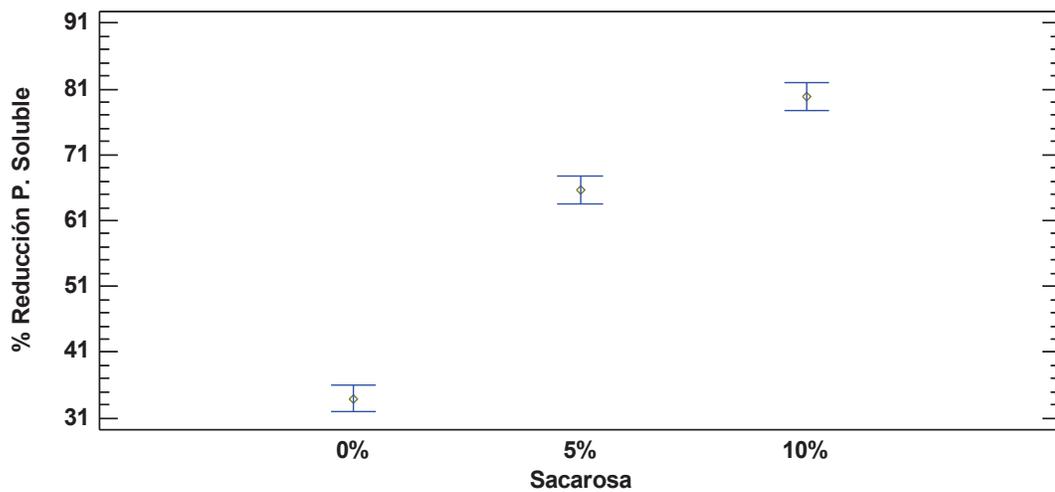


Figura 3.21. Efecto del porcentaje de sacarosa sobre el porcentaje de reducción de la proteína soluble después de la Fermentación (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)

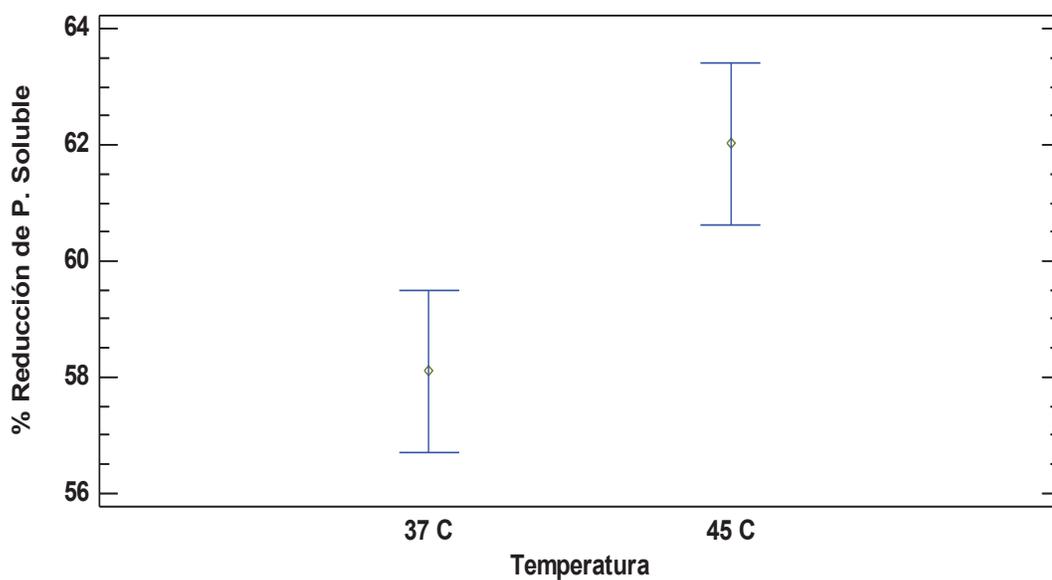


Figura 3.22. Efecto de la temperatura sobre el porcentaje de reducción de la proteína soluble después de la Fermentación (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)

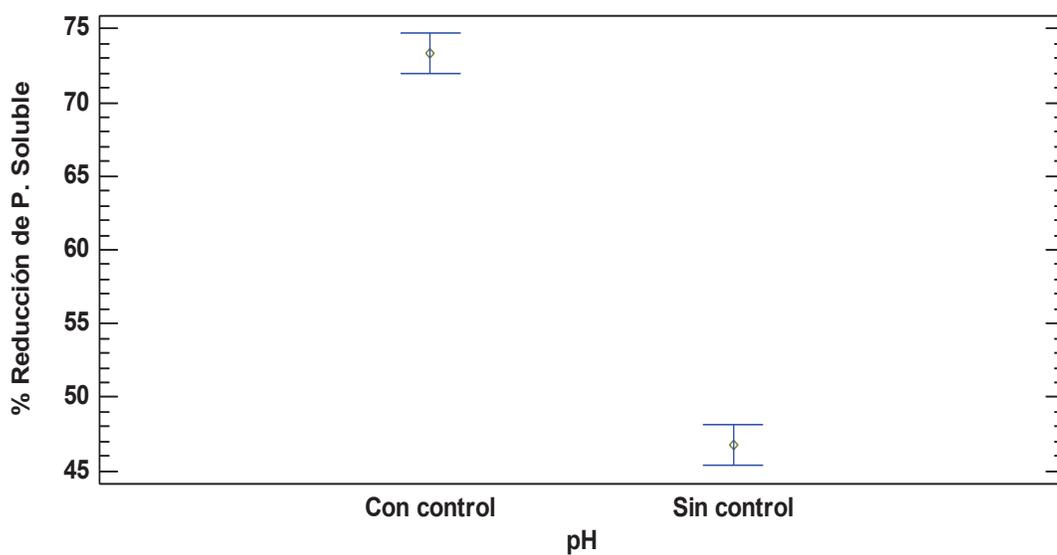


Figura 3.23. Efecto del pH sobre el porcentaje de reducción de la proteína soluble después de la Fermentación (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)

3.3.2 EFECTO EN EL PORCENTAJE DE REMOCIÓN DE LA PROTEÍNA TOTAL

Para la proteína total el mayor porcentaje de remoción fue de 23,59 % para el tratamiento de S3, luego se presentaron porcentajes de remoción menores al 11 % en el resto de los tratamientos como se aprecia en la Figura 3.20. Según Adour et al. (2008), estos bajos porcentajes de remoción podría deberse a la presencia de lactato que inhibe al microorganismo e impide que este obtenga los nutrientes de la cáscara. Otra razón podría ser que la proteína está fuertemente enlazada a otros compuestos de la cáscara como pigmentos, quitina, y minerales que no pueden ser removidos durante la fermentación láctica (pp. 1 664-1 669) dada por el *Lactobacillus delbrueckii*. Estudios realizados por Sorokulova et al. (2009) y Haddar et.al. (2010), con el uso de dos bacterias (*Bacillus cereus* & *Exiguobacterium acetylicum*) y con renovación del inóculo durante la fermentación reportaron un porcentaje de remoción de proteína total del 80 % y reducción de ceniza de 79 % (pp. 1 123-1 126 y pp. 669-678).

El análisis de varianza para determinar el efecto de la concentración de sacarosa en el porcentaje de reducción de materia total se presenta en la Figura 3.24.

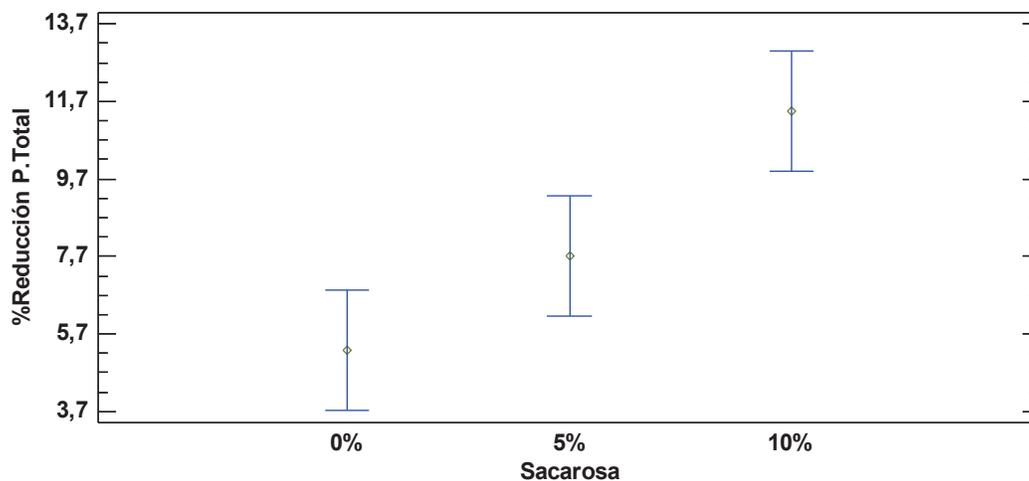


Figura 3.24. Efecto del porcentaje de sacarosa sobre el porcentaje de reducción proteína de la total después de la Fermentación (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)

Para los 3 porcentajes de sacarosa, se observan diferencias significativas ($p < 0,05$). A mayor porcentaje de sacarosa mayor es el porcentaje de proteína total removido. Al igual que para la proteína soluble trabajar con 0 % de sacarosa no da los resultados deseados.

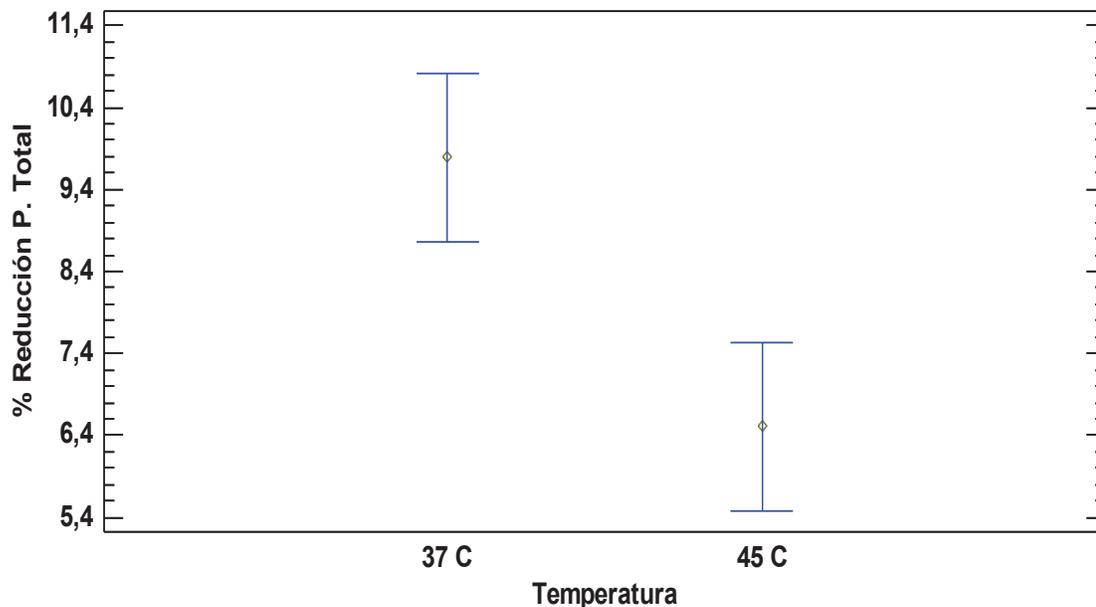


Figura 3.25. Efecto de la temperatura sobre el porcentaje de reducción de la proteína total después de la Fermentación (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)

En la Figura 3.25 se presentan los resultados del análisis estadístico para determinar el efecto de la Temperatura; y en la figura 3.26 el efecto del pH. La temperatura influye significativamente en el porcentaje de remoción de proteína total siendo 37 °C la condición que la favorece.

Mientras que el control del pH no es determinante para la remoción de proteína total, ya que no se muestran diferencias estadísticamente significativas para este factor. Por lo que se puede trabajar con o sin control de pH para la remoción de proteína total.

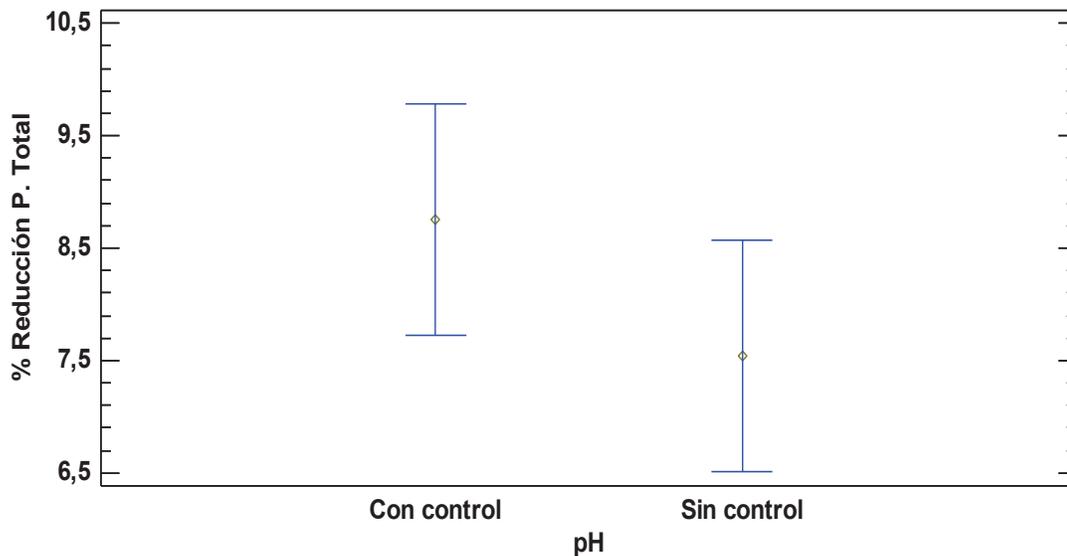


Figura 3.26. Efecto del pH sobre el porcentaje de reducción de la proteína total después de la Fermentación (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)

3.3.3 EFECTO EN EL PORCENTAJE DE REDUCCIÓN DE CENIZAS

Los tratamientos S3 y S2, registraron porcentajes de remoción de ceniza de 24,59 % y 19,01 % respectivamente, seguido de los tratamientos S6, S5 que trabajaron sin control de pH y que tuvieron una remoción de ceniza de 9,44 %, 10,72 %. En cambio, para las muestras con control de pH, C3 y C6, se obtuvo un porcentaje de remoción de 13,84 % y 8,27 % respectivamente. Para el resto de los tratamientos se reportó un porcentaje de remoción menor al 5 %.

Ningún tratamiento tuvo una remoción de ceniza superior al 50 %, que era lo esperado, esto pudo deberse a que la producción de ácido láctico fue insuficiente para desmineralizar la cáscara. Durante la etapa de fermentación se produce la formación lactato de calcio. Según Friedman y Gaden (2007), formación de lactato de calcio actúa como un inhibidor del *Lactobacillus*, lo que impide la producción suficiente de ácido láctico para obtener un porcentaje de remoción de cenizas mayor (pp. 961-974).

La menor remoción de ceniza se presentó en los tratamientos C4, C1, (0 % de sacarosa), que presentaron un porcentaje menor al 2 %. Para estos tratamientos se esperaba una mayor remoción ya que para controlar el pH se añadió HCl que es un ácido fuerte empleando en el proceso de desmineralización (Hernández et al., 2008, p. 659-666). Esto pudo darse por las temperaturas de trabajo que fueron de 37 °C y 45 °C, ya que según Adour et al. (2008), la temperatura para obtener una remoción mayor o igual a 70 %, debe estar en un rango de 70 °C a 80 °C o más al usar ácido clorhídrico para la desmineralización (pp. 1664-1669).

En la figura 3.27, 3.28, 3.29, se presentan los resultados del análisis estadístico para los tres factores de estudio, y su efecto en la reducción de cenizas.

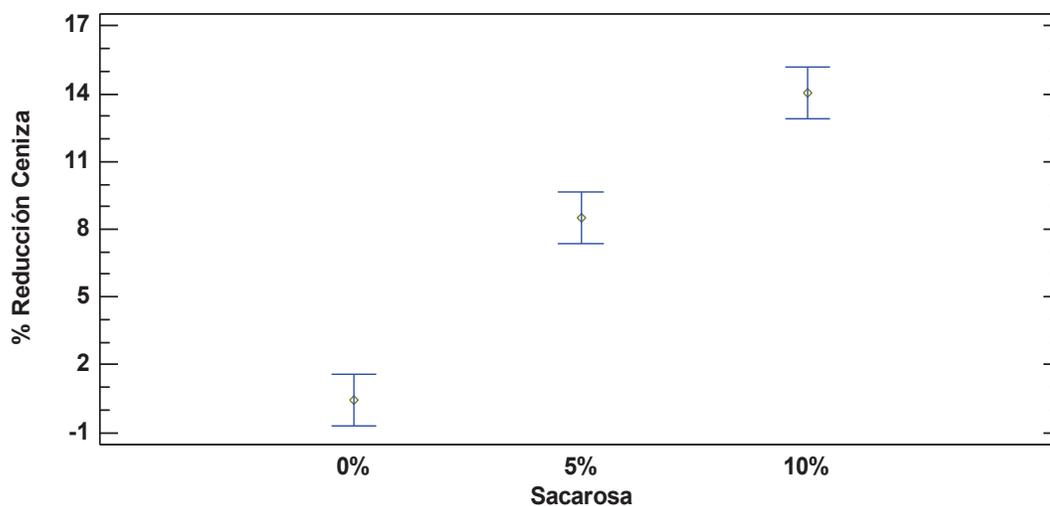


Figura 3.27. Efecto del porcentaje de sacarosa sobre el porcentaje de reducción de ceniza después de la fermentación (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)

Se trabaja con 0 % de sacarosa da como resultado los porcentajes de reducción más bajos, comparados con los resultados al 10 % de sacarosa que fueron más altos; y la diferencia es estadísticamente significativa.

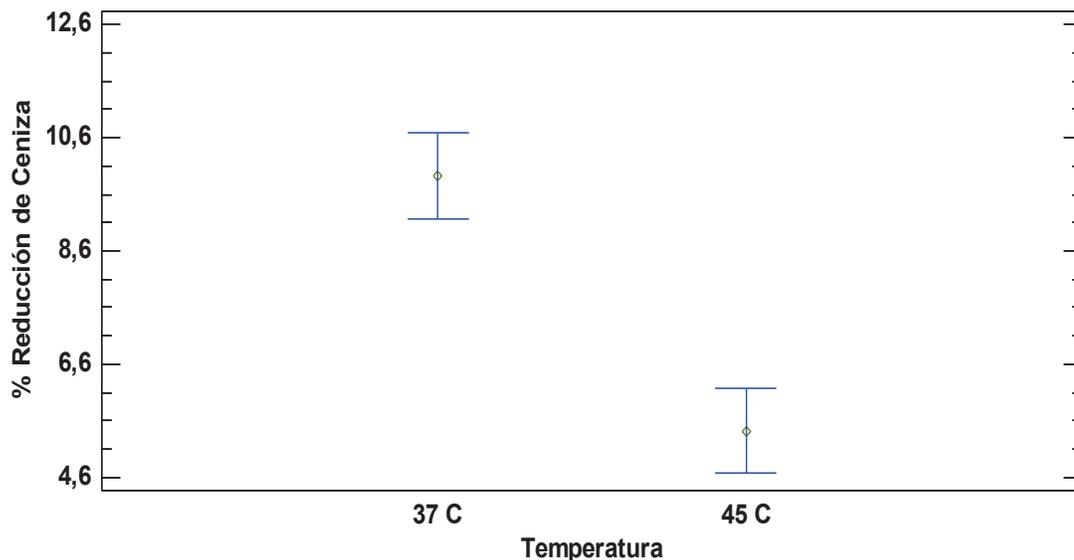


Figura 3.28. Efecto de la temperatura sobre el porcentaje de reducción de ceniza después de la fermentación (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)

Al analizar las Figuras 3.28 y 3.29 se determinó que hay diferencias estadísticas al trabajar con temperaturas de 37 °C y 45 °C ($p > 0,005$), también se evidenció el mismo efecto en los tratamientos con control y sin control de pH.

Estos análisis ayudaron a determinar que los mejores resultados para la reducción del porcentaje de cenizas se obtienen al trabajar a 37 °C, sin control de pH, y con 10 % de sacarosa.

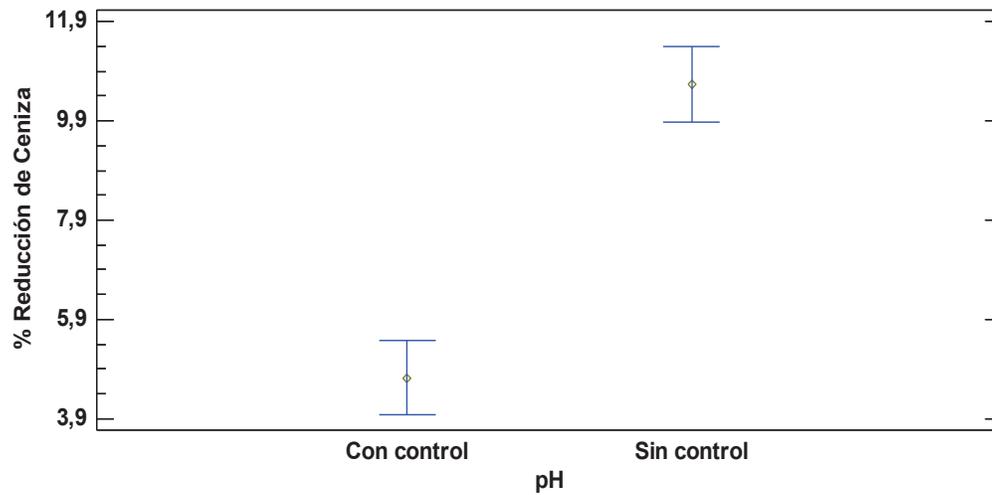


Figura 3.29. Efecto del control de pH sobre el porcentaje de reducción de ceniza después de la fermentación (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)

Una vez analizados todos los resultados, tanto de los parámetros durante la fermentación (ATT y Azúcares Reductores) como de los porcentajes de remoción de proteína total, proteína soluble y ceniza, se llegó a la conclusión que para esta etapa de fermentación los mejores resultados se obtienen cuando se trabaja a 37 °C con 10 % de sacarosa y sin control de pH.

3.4 PROCESO DE DESPIGMENTACIÓN

Los resultados del proceso de despigmentación se presentan en la figuras 3.30, 3.31.

Durante el proceso de despigmentación se produce espuma, y la cáscara presenta diferentes tonalidades desde un color anaranjado hasta un color blanco-amarillento. Como producto de la despigmentación se obtiene una fracción líquida de color amarillento (como se presenta en la figura 3.30). Probablemente por la presencia de pigmentos y carotenoides (Adourc et al., 2008, pp. 1 664-1 669).

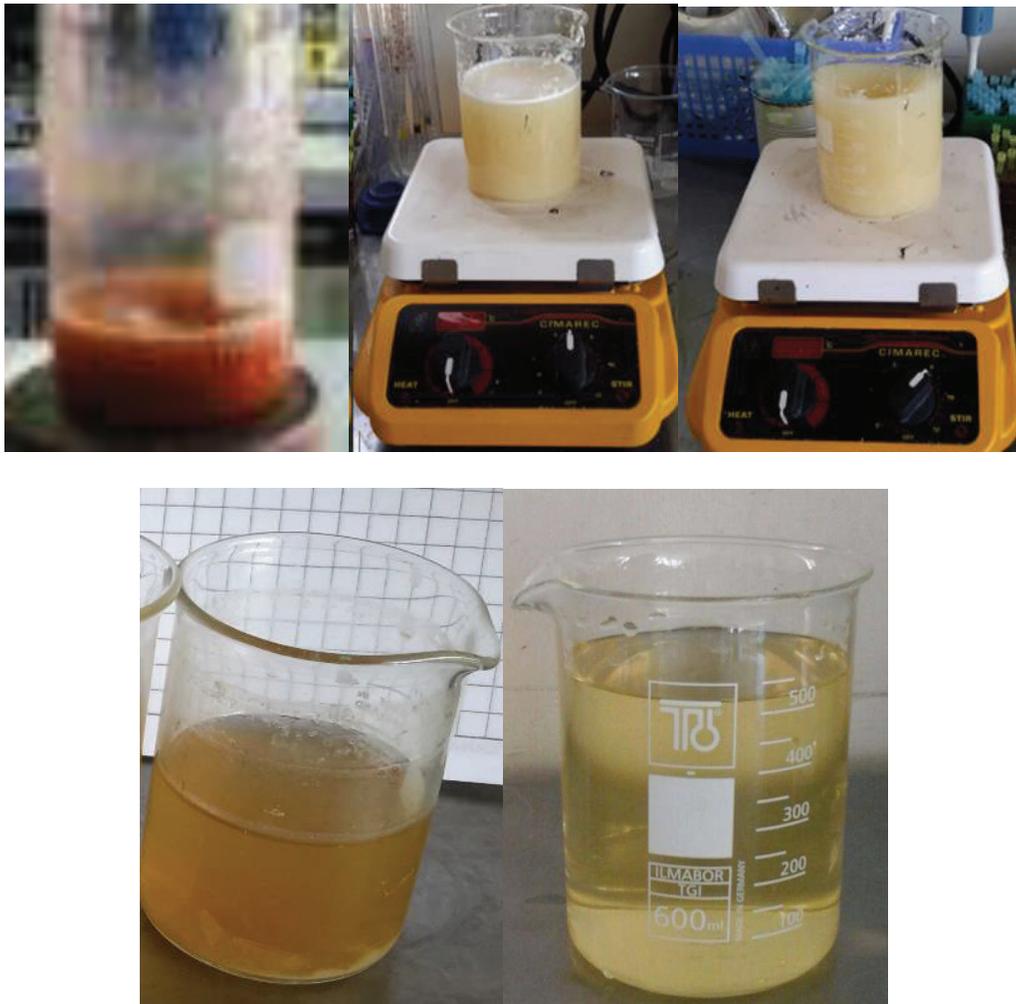


Figura 3.30. Despigmentación de la cáscara de camarón con 3,8 % de hipoclorito de sodio

El resultado de la tonalidad de la cáscara presenta relevancia en este trabajo ya que los estudios realizados por Shirai (2011), demostraron alteraciones en las propiedades físico-químicas de la quitina cuando el tiempo de despigmentación con hipoclorito de sodio era superior a 45 min, y la tonalidad de la cáscara se tornaba blanco-hueso. (p. 1-8), lo que indicaría que se está logrando la obtención de quitina ya que se eliminaron los pigmentos.

Para determinar si la despigmentación mejora el proceso de obtención luego de la fermentación, fue necesario analizar el grado desproteinización y desmineralización que sufrió la cáscara. La desproteinización se determinó con el porcentaje de remoción de la proteína soluble y la proteína total, mientras para la desmineralización se midió con el porcentaje de disminución de la ceniza. Los resultados y si análisis se presentan para cada parámetro a continuación.

3.4.1 EFECTO EN EL PORCENTAJE DE REMOCIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE DESPUÉS DE LA DESPIGMENTACIÓN.

El porcentaje de remoción de las proteínas solubles se incrementó con la despigmentación como se muestra en la figura 3.31. Pero esta remoción fue menor comparada con la remoción producida en el proceso de fermentación. Esto pudo deberse a que en el proceso de fermentación la proteína se hidroliza y solubiliza por estar en contacto con el ácido láctico, en cambio en la despigmentación estuvo en contacto con hipoclorito. Según Adour et al. (2008), la proteína se encuentra fuertemente enlazada con pigmentos y carotenoides al ser sometida a un despigmentante se debilitan los enlaces, y se remueven con mayor facilidad los pigmentos y carotenoides (pp. 1 664-1 669); lo que a su vez incrementaría la proteína soluble.

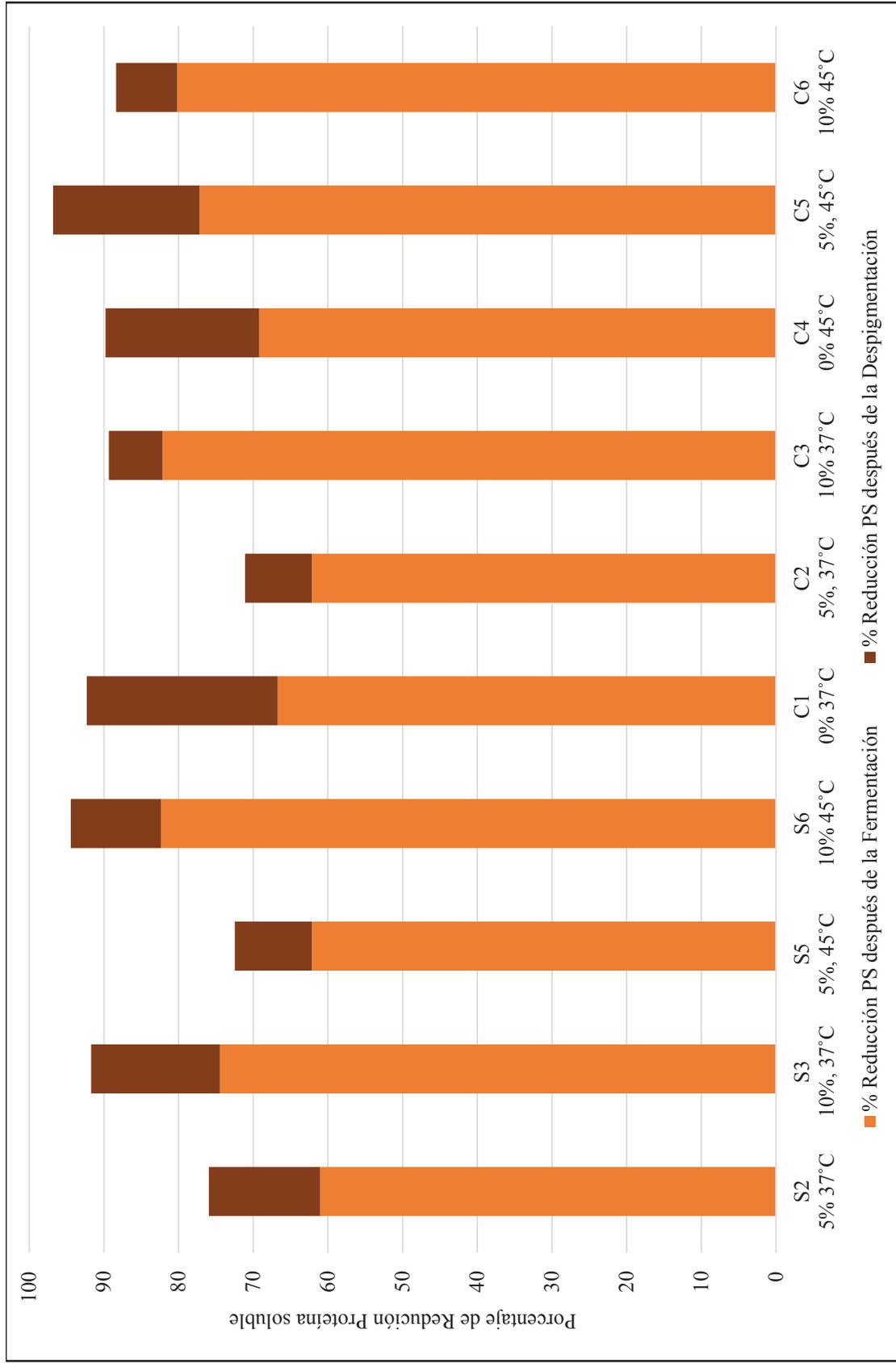


Figura 3.31. Porcentaje de Reducción de la proteína soluble luego del proceso de despigmentación para los tratamientos con y sin control de pH

El análisis de varianza, realizado después de la despigmentación a los tratamientos con y sin control de pH, se representan en las Figuras 3.32, 3.33, 3.34. El porcentaje de sacarosa y el pH presentan diferencias estadísticas significativas, en la reducción de proteína soluble luego del proceso de fermentación y despigmentación, con los mejores resultados al trabajar con 10 % de sacarosa y con control de pH. En cambio, para la temperatura se puede trabajar a 37 °C o 45 °C, ya que no existen diferencias estadísticamente significativas.

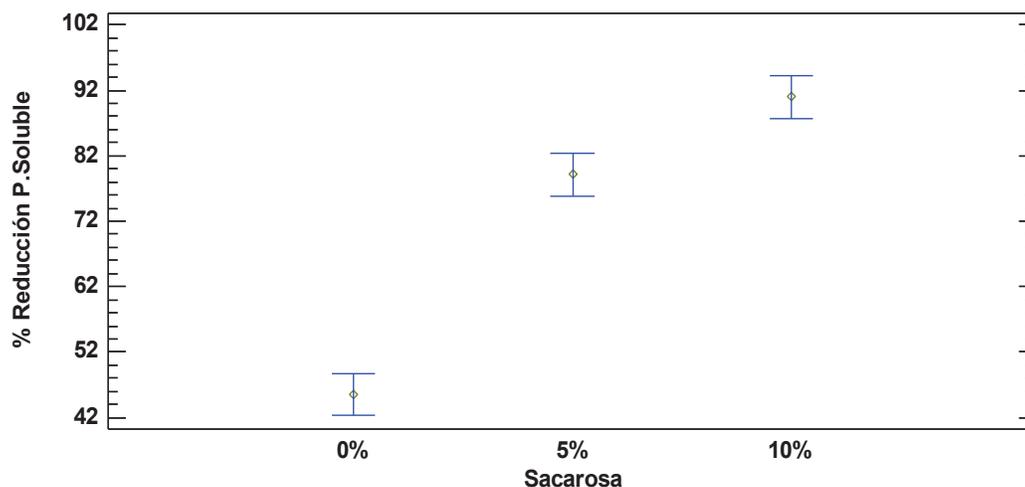


Figura 3.32. Efecto del porcentaje de sacarosa sobre el porcentaje de reducción de la proteína soluble después de la despigmentación (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)

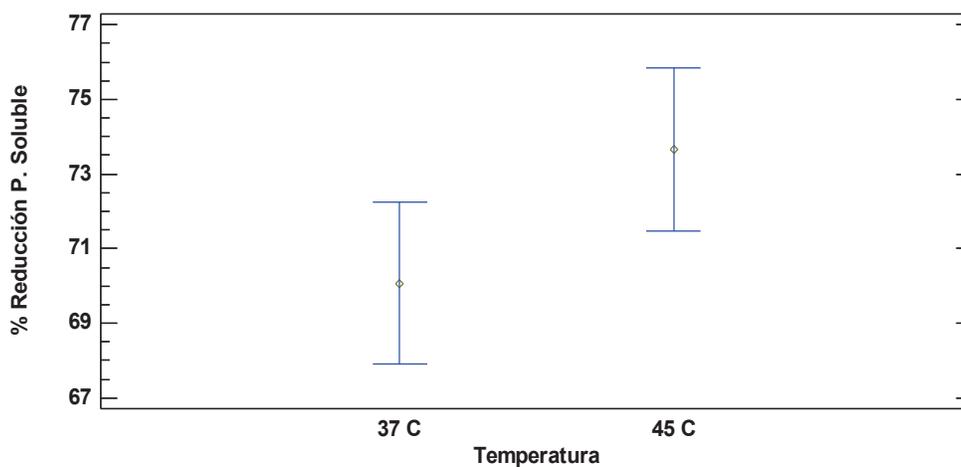


Figura 3.33. Efecto de la temperatura sobre el porcentaje de reducción de la proteína soluble después de la despigmentación (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)

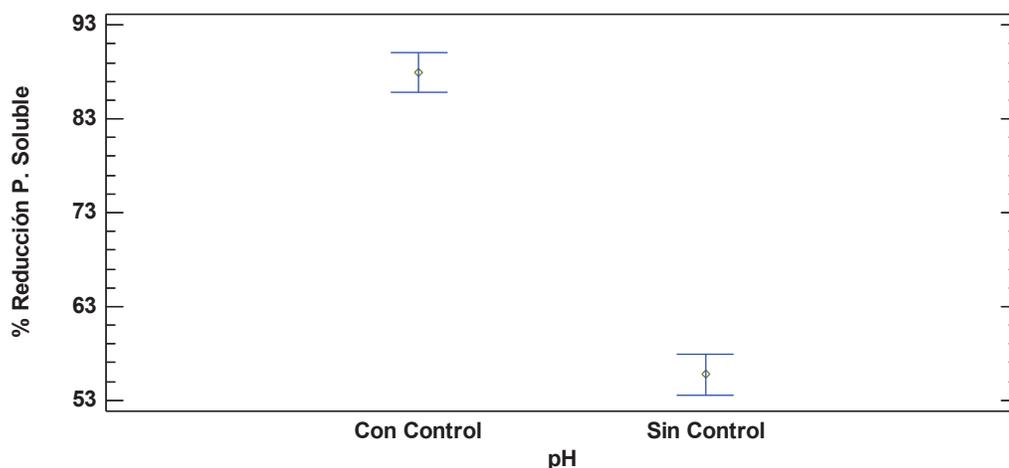


Figura 3.34. Efecto del pH después sobre el porcentaje de reducción de la proteína soluble después de la despigmentación (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)

3.4.2 EFECTO EN EL PORCENTAJE DE REMOCIÓN DE LA PROTEÍNA TOTAL DESPUÉS DE LA DESPIGMENTACIÓN

En la Figura 3.35 se presentan los resultados del porcentaje de remoción de la proteína total para todos los tratamientos luego de la despigmentación. Se observa que la despigmentación da como resultado un porcentaje de remoción de proteína total entre el 20 % y 30 %, que sumado al obtenido en la fermentación se logra un porcentaje de remoción de proteína total, cercano al 50 %. Este incremento era esperado ya que los estudios realizados por Adour et al. (2008) indican que las uniones de los compuestos (pigmentos, quitina, mineral) que se encuentran fuertemente enlazados entre sí, se debilitan con el uso del despigmentante, lo que permite que la remoción de la proteína total se vea favorecida. Este resultado también pudo deberse a que en esta etapa no se tiene la presencia de lactato que se produce durante la fermentación que impide que la proteína total sea removida. Es por esto que Briceño y Morillo (2008), trabajaron primero con una despigmentación antes del proceso de fermentación para la desmineralización y desproteinización (pp. 17-26).

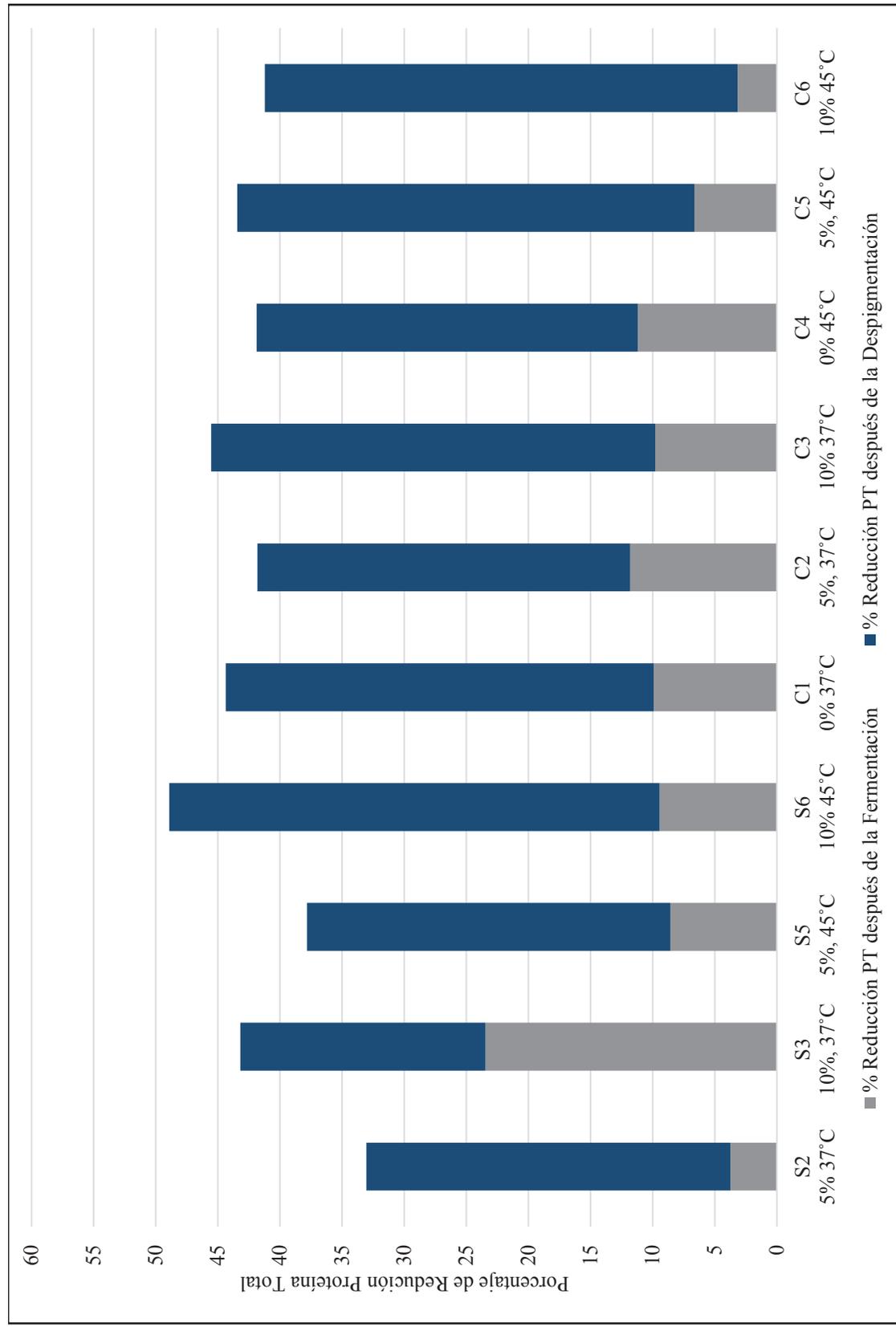


Figura 3.35. Porcentaje de Reducción de la proteína total luego del proceso de despignmentación a 20°C por 30 min con y sin control de pH

El análisis estadístico realizado al porcentaje de remoción de proteína total luego del proceso de fermentación y despigmentación, se representa en las Figuras 3.36, 3.37, 3.38, y se observa diferencias estadísticamente significativas para los tres factores de estudio: porcentaje de sacarosa, la temperatura y pH. Los mejores resultados se presentaron al trabajar con 10 % de sacarosa, a 45 °C y con control de pH, con un porcentaje de remoción de proteína total del 49 %.

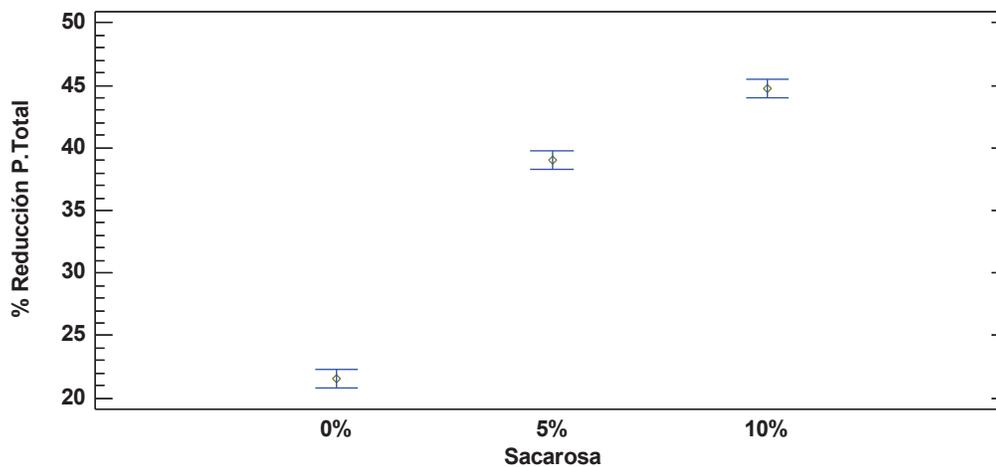


Figura 3.36 Efecto del porcentaje de sacarosa sobre el porcentaje de reducción de la proteína total después de la despigmentación (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)

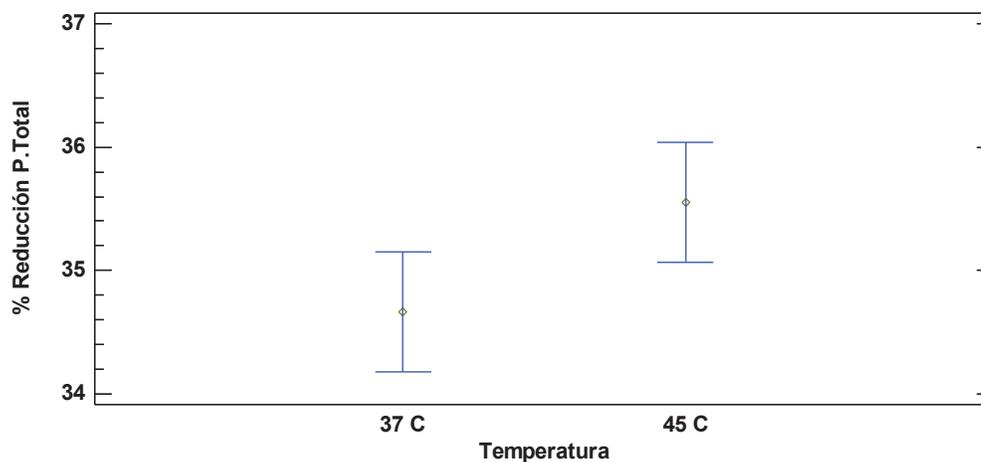


Figura 3.37. Efecto de la temperatura después sobre el porcentaje de reducción de la proteína total después de la despigmentación (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)

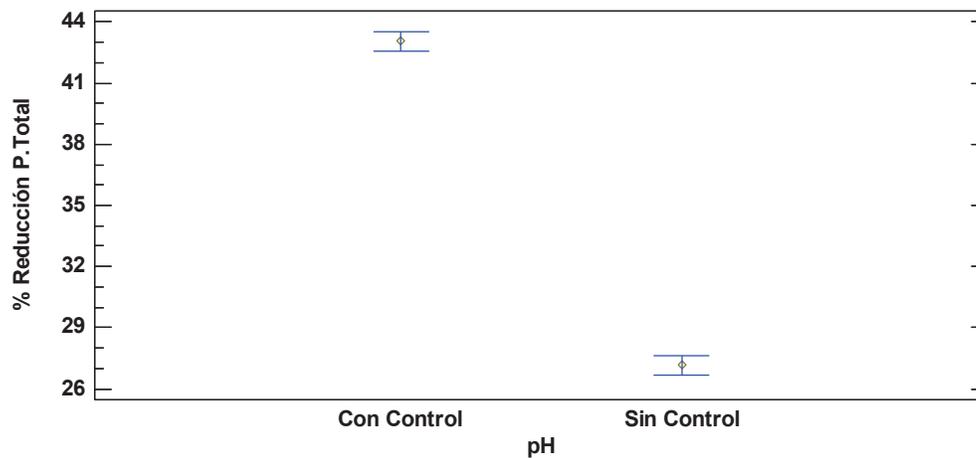


Figura 3.38. Efecto del pH sobre el porcentaje de reducción de la proteína total después de la despigmentación (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)

3.4.3 EFECTO DEL PORCENTAJE DE REDUCCIÓN DE CENIZA DESPUÉS DE LA DESPIGMENTACIÓN

Los porcentajes de reducción de ceniza para todos los tratamientos son negativos como se aprecia en la figura 3.39, es decir que la concentración de ceniza incrementó en lugar de disminuir. Este comportamiento se da por la reacción del hipoclorito de sodio con el carbonato de calcio presente en la cáscara. Para Shirai (2011), el ion sodio del despigmentante hipoclorito de sodio se adhiere a los compuestos que se encuentran en la cáscara de camarón (pp. 1-8), y por lo tanto la cantidad de ceniza en la cáscara aumenta, es importante notar, que la concentración de ceniza aumenta más en aquellos tratamientos que reportaron baja reducción de ceniza durante la fermentación, es decir C1, C2, C4 y C5. El tratamiento S3 es el que presenta la mayor reducción de ceniza durante la fermentación y el menor incremento de ceniza durante el proceso de despigmentación.

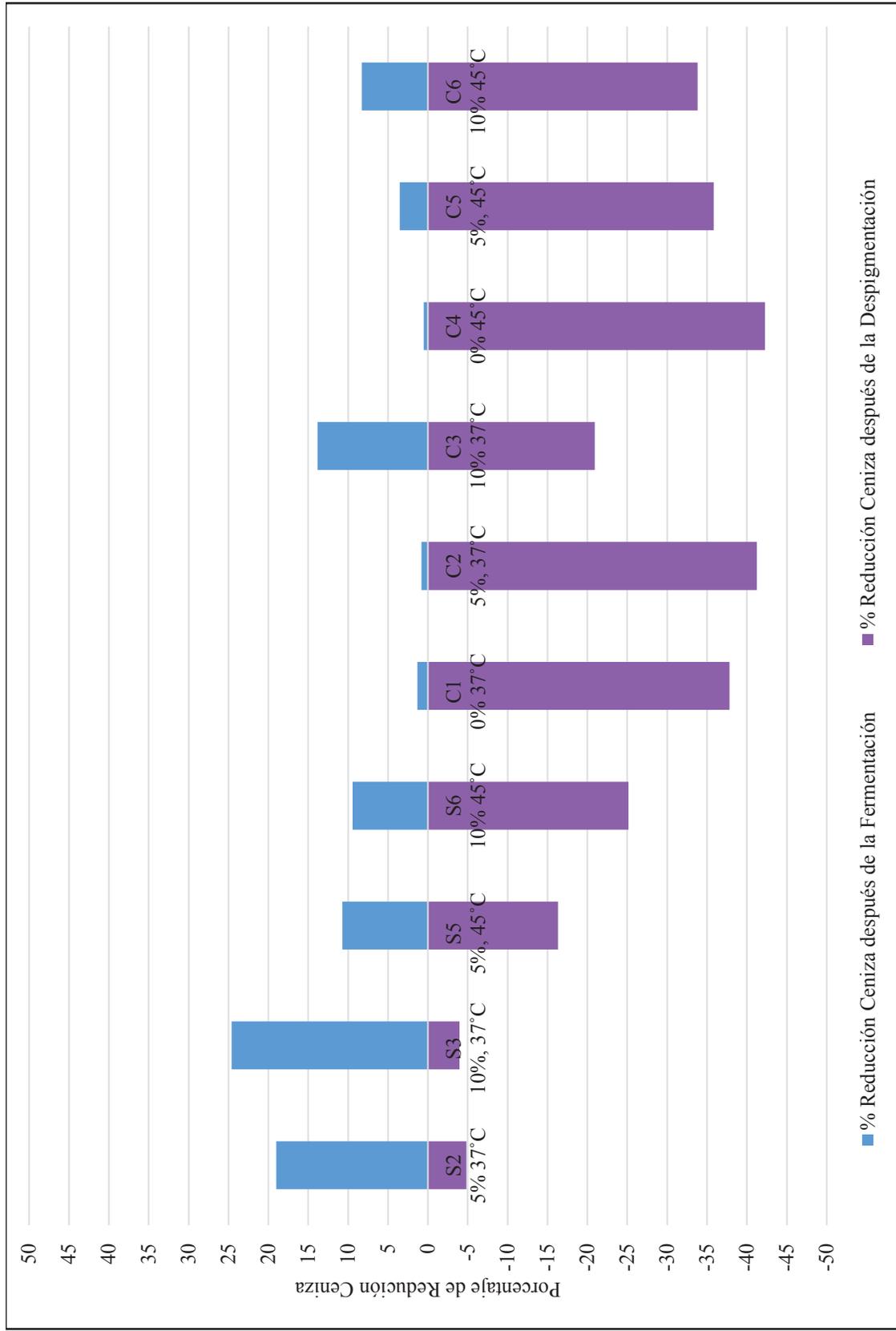


Figura 3.39. Porcentaje de Reducción de la ceniza luego del proceso de despigmentación para los tratamientos con y sin control de pH

En las Figuras 3.40, 3.41, y 3.42 se presentan los resultados del análisis estadístico para los tres factores de estudio, y el efecto que se produjo en la ceniza luego del proceso de fermentación y despigmentación de la cáscara. Se observa que la concentración de sacarosa no presenta diferencias significativas pero la temperatura y el pH sí influyen significativamente en la concentración de ceniza. Desde este punto de vista se podría trabajar con cualquier concentración de sacarosa 37 °C y sin control de pH para obtener la mayor remoción de ceniza.

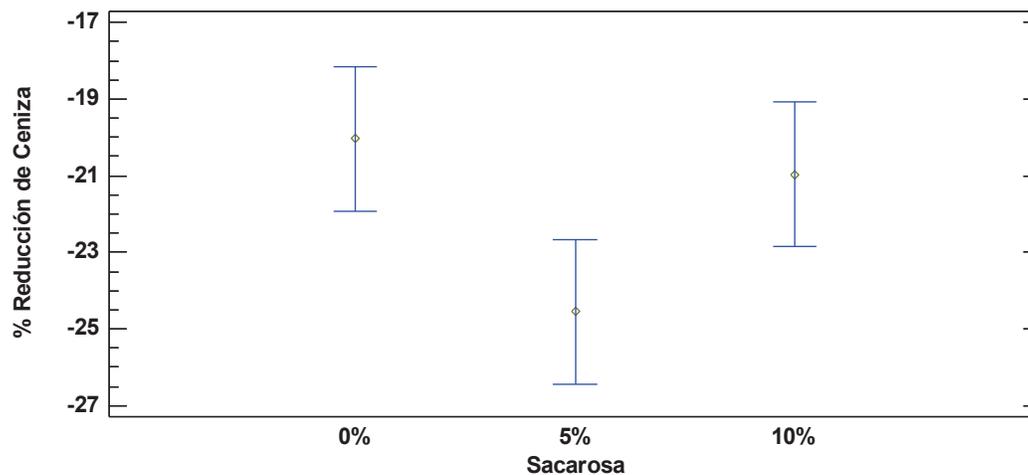


Figura 3.40. Efecto del porcentaje de sacarosa sobre el porcentaje de reducción de ceniza después de la despigmentación (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)

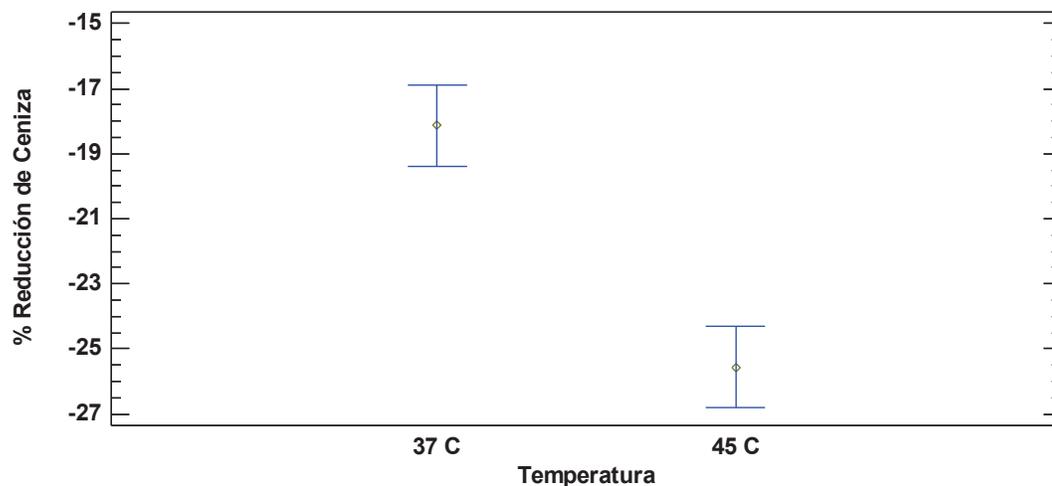


Figura 3.41. Efecto de la temperatura sobre el porcentaje de reducción de ceniza después de la despigmentación (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)

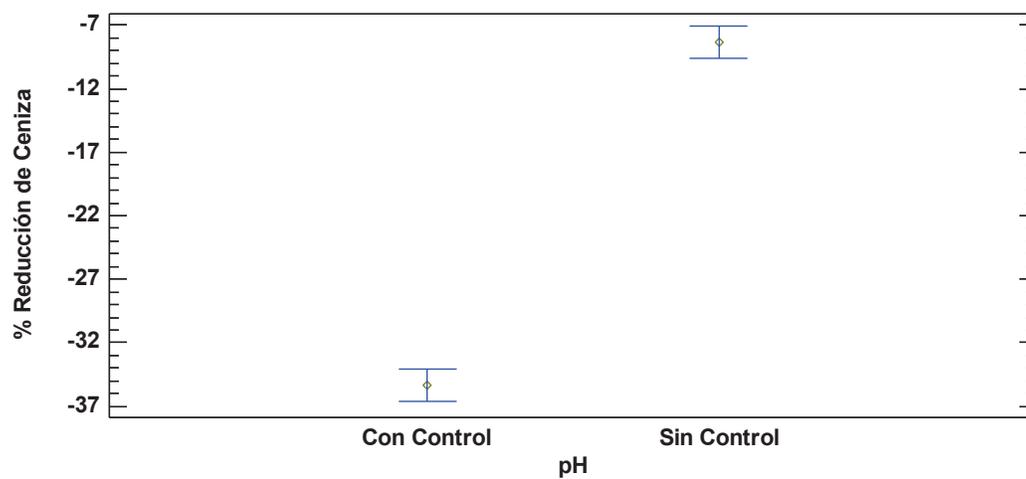


Figura 3.42. Efecto del pH sobre el porcentaje de reducción de ceniza después de la despigmentación (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)

3.5 TRATAMIENTO CON 0.8 % DE SOSA

Esta etapa se realizó después del proceso de despigmentación y de igual manera se determinó el grado de desproteínización con la medida del porcentaje de proteína soluble, proteína total y el grado de desmineralización a través de la determinación del porcentaje de disminución de cenizas. El análisis de resultados se presenta individualmente para cada parámetro determinado.

3.5.1 REMOCIÓN DE LA PROTEÍNA SOLUBLE

En las Figura 3.43 (a y b) se presentan los resultados del porcentaje de remoción de proteína soluble para todos los tratamientos; los datos se encuentran en el Anexo IX. Todos los tratamientos presentaron una remoción de proteína soluble mayor al 80 % e incluso llegaron al 100 % al finalizar en tratamiento con sosa al 0,8 %, observado claramente en los tratamientos S3, C1 y C5. Shirai (2011), reportó que el uso de base o ácidos, permiten una remoción del 50 % de los compuestos que se encuentran enlazados con la quitina en la cáscara de camarón (pp. 1-8), uno de ellos es la proteína que se solubiliza por acción de la base; no obstante, el alto porcentaje de remoción de proteína soluble se da en el proceso fermentativo, ya que en esta etapa se alcanzan valores mayores al 60 %; la etapa de despigmentación aporta entre un 20-30 % de remoción adicional y el tratamiento alcalino completa el proceso de remoción. Para los diferentes tratamientos parecería que no hay alguna relación directa ni con la temperatura, el control de pH o la concentración de sacarosa, factores de estudio de la etapa de fermentación.

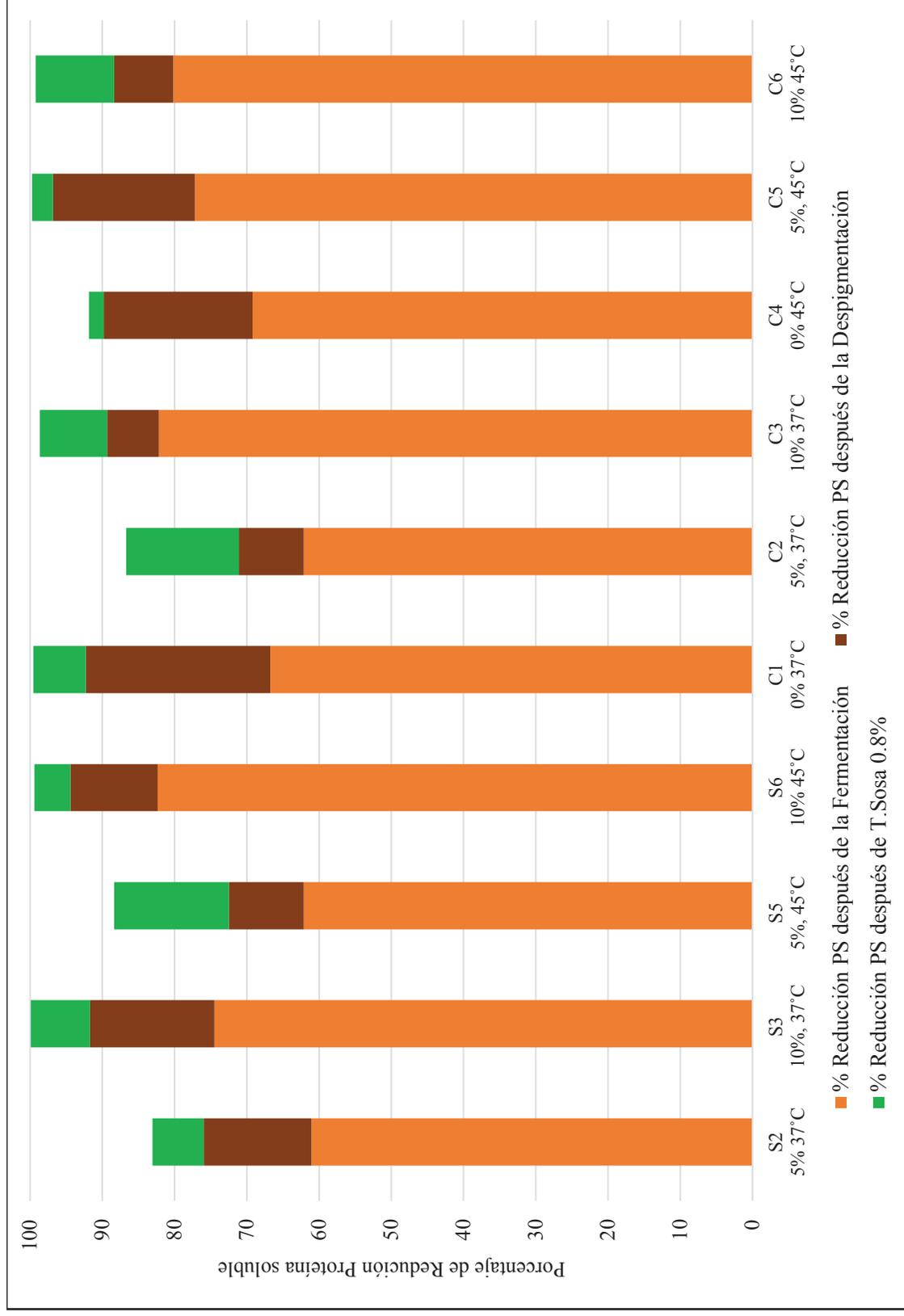


Figura 3.43 a. Porcentaje de Reducción de la proteína soluble del tratamiento con sosa 0,8 % 90°C, por 30 min con y sin control de pH

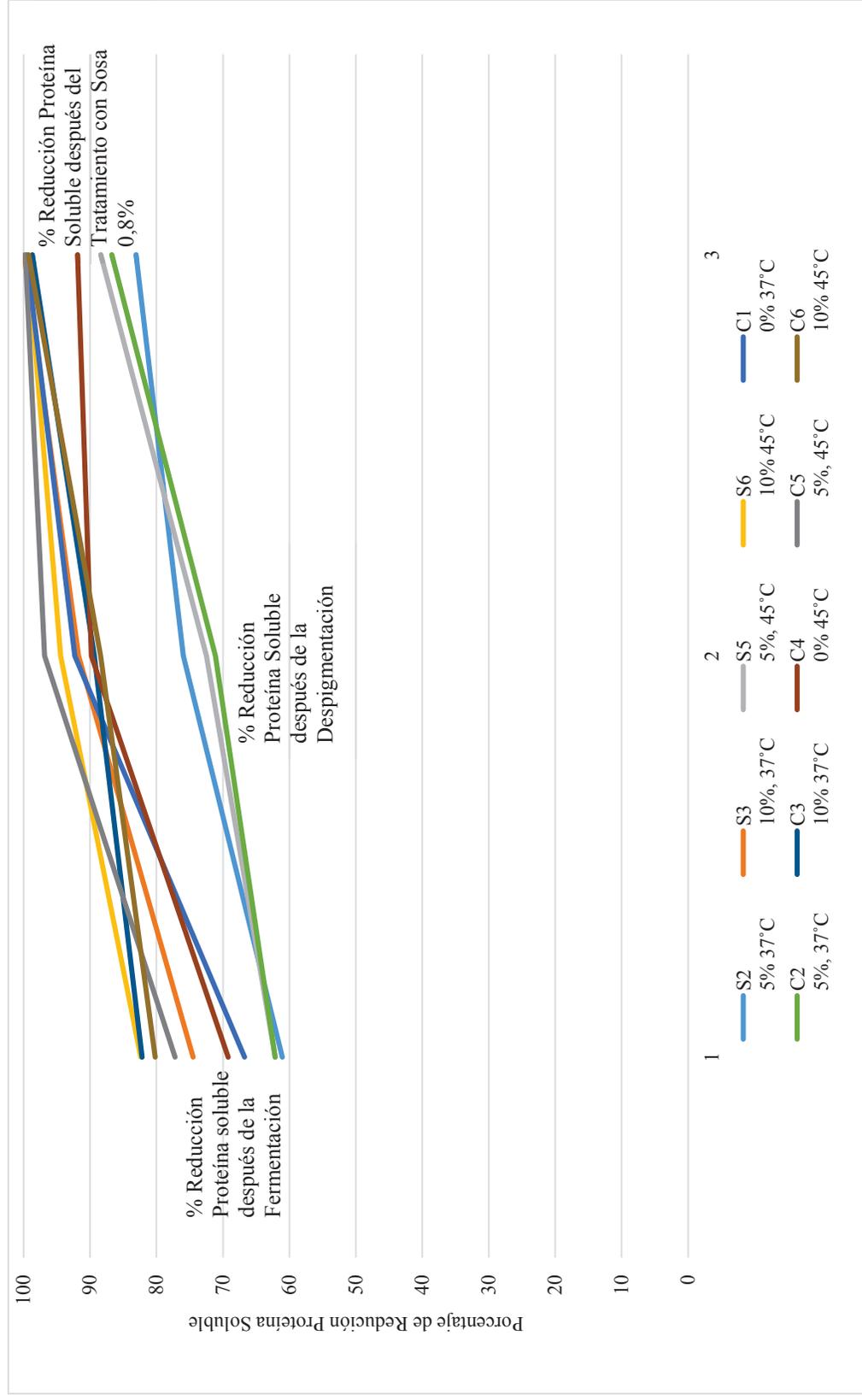


Figura 3.43 b. Porcentajes de Reducción de la proteína soluble del tratamiento con sosa 0,8 % 90°C, por 30 min con y sin control de pH

El análisis de varianza ANOVA que se presenta en las figuras 3.44, 3.45, 3.46, representa el efecto que se produce en el porcentaje de remoción de proteína soluble, luego de que la cáscara pasara por los procesos de fermentación, despigmentación y tratamiento con sosa. Se encontró que la concentración de sacarosa presenta diferencias estadísticamente significativas al igual que el control de pH, pero no la temperatura. Esto significa que para lograr una mayor reducción de la proteína soluble se debe trabajar con control de pH, 10 % de sacarosa y a 37 °C o 45 °C.

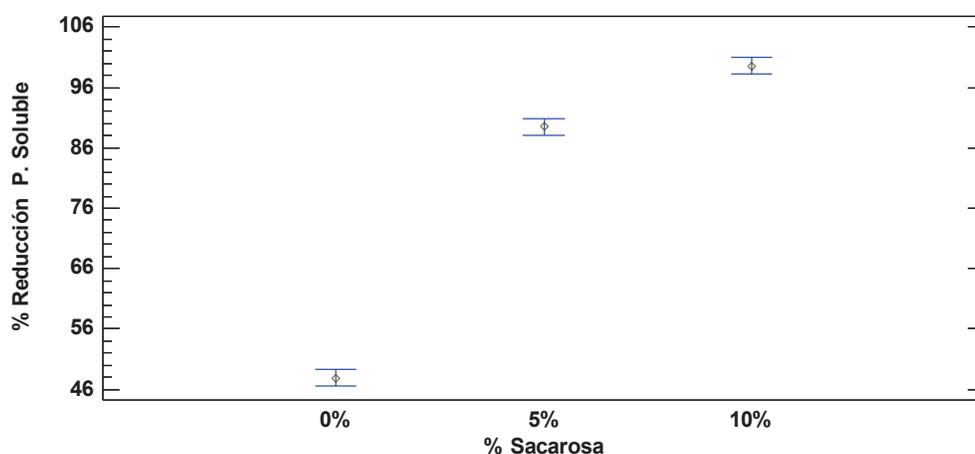


Figura 3.44. Efecto del porcentaje de sacarosa sobre el porcentaje de reducción de la proteína soluble después del tratamiento con sosa (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)

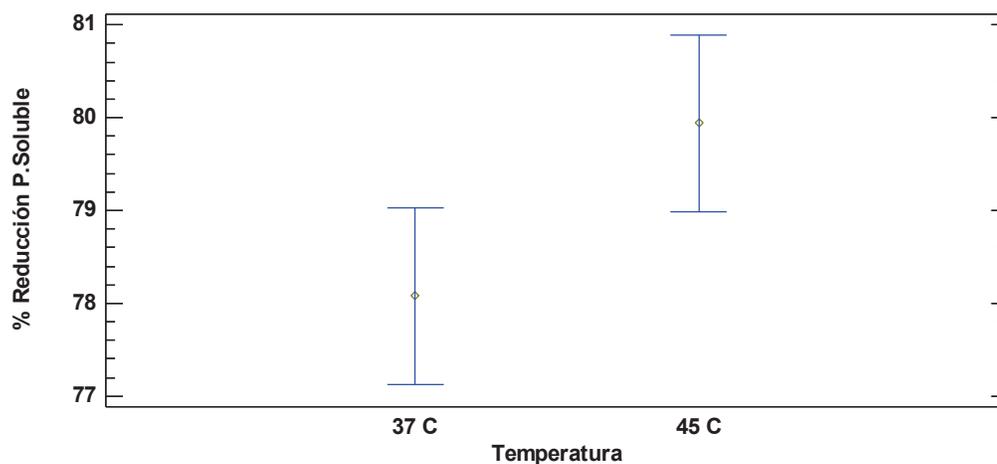


Figura 3.45. Efecto de la temperatura sobre el porcentaje de reducción de la proteína soluble después del tratamiento con sosa (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)

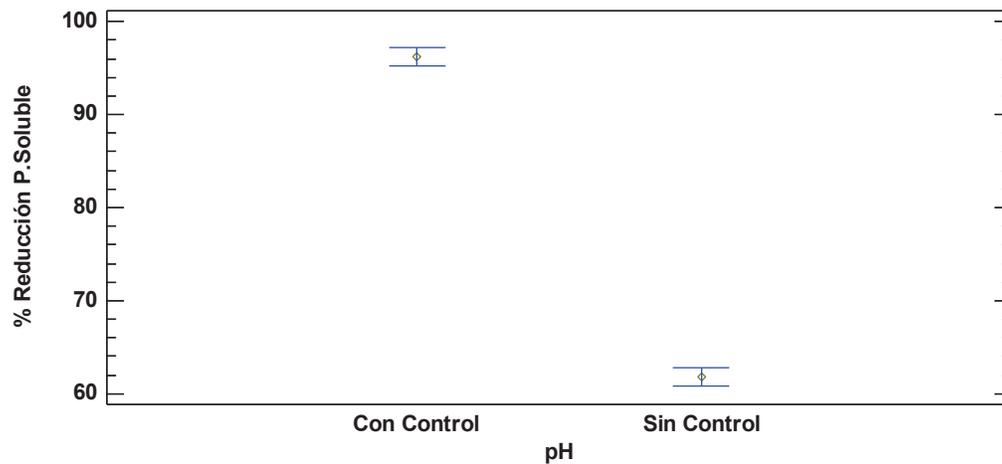


Figura 3.46. Efecto del pH sobre el porcentaje de reducción de la proteína soluble después del tratamiento con sosa (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)

3.5.2 REMOCIÓN DE LA PROTEÍNA TOTAL

Las Figuras 3.47(a y b) presentan los resultados del porcentaje del porcentaje de remoción de proteína total al final del proceso con sosa al 0,8 %. Todos los tratamientos presentaron un porcentaje de remoción de proteína total, menor al obtenido en los procesos de fermentación y despigmentación, pero al realizar el análisis global los porcentajes de remoción fueron mayores al 40 %.

Resultados esperados ya que la concentración de sosa y el tiempo de tratamiento fue menor al aplicado por Suárez, et al., (2000), que reportan porcentajes de remoción mayores al 60 % al trabajar con sosa al 2 %, a 90° C, por dos 2 horas. Sin embargo, se decidió no trabajar a dichas condiciones, ya que los mismos autores encontraron que, en algunos casos, la estabilidad de la quitina se ve afectada (pp. 8-12).

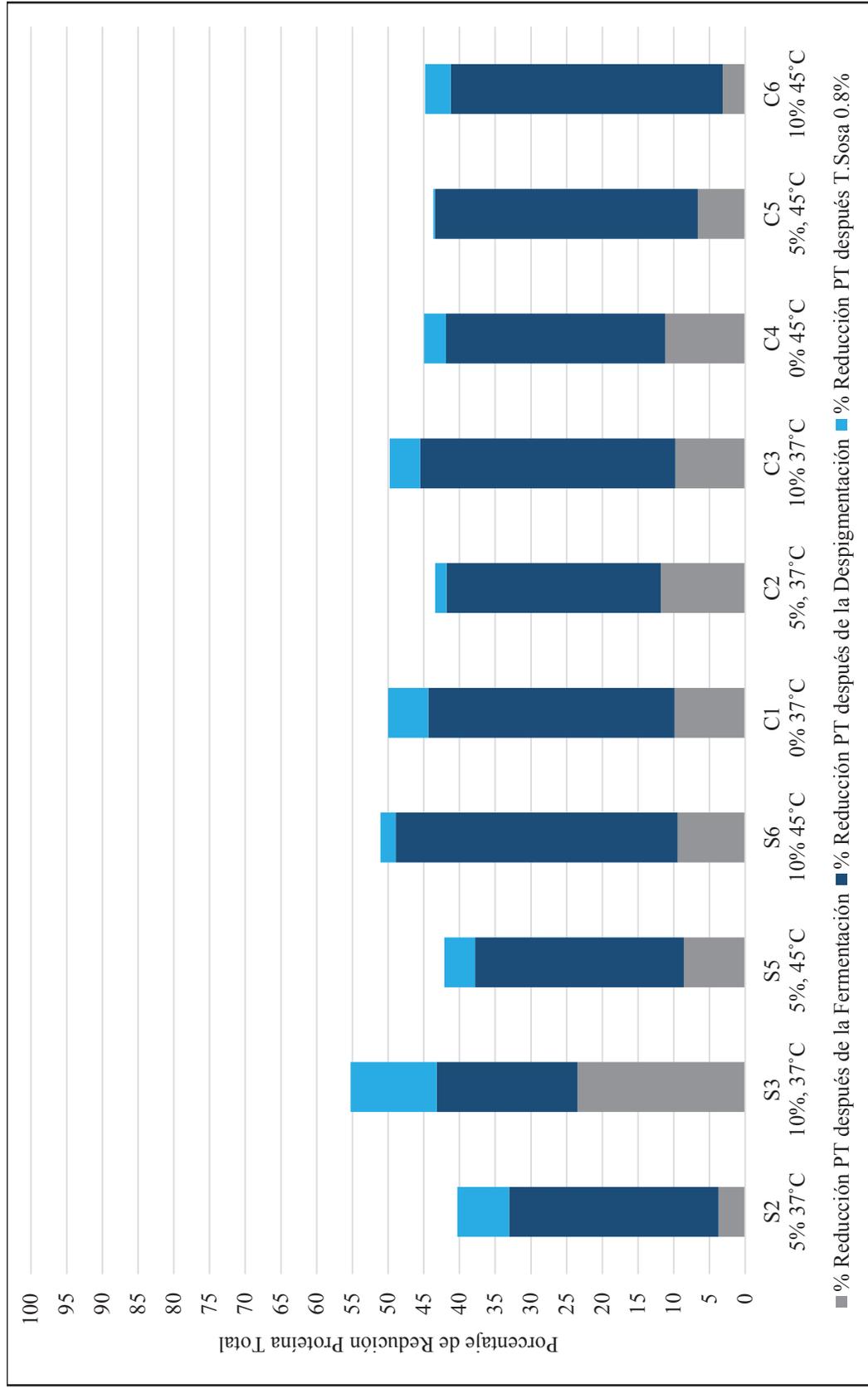


Figura 3.47 a. Porcentajes de Reducción de la proteína total luego del tratamiento con sosa 0,8 % 90°C, por 30 min con y sin control de pH

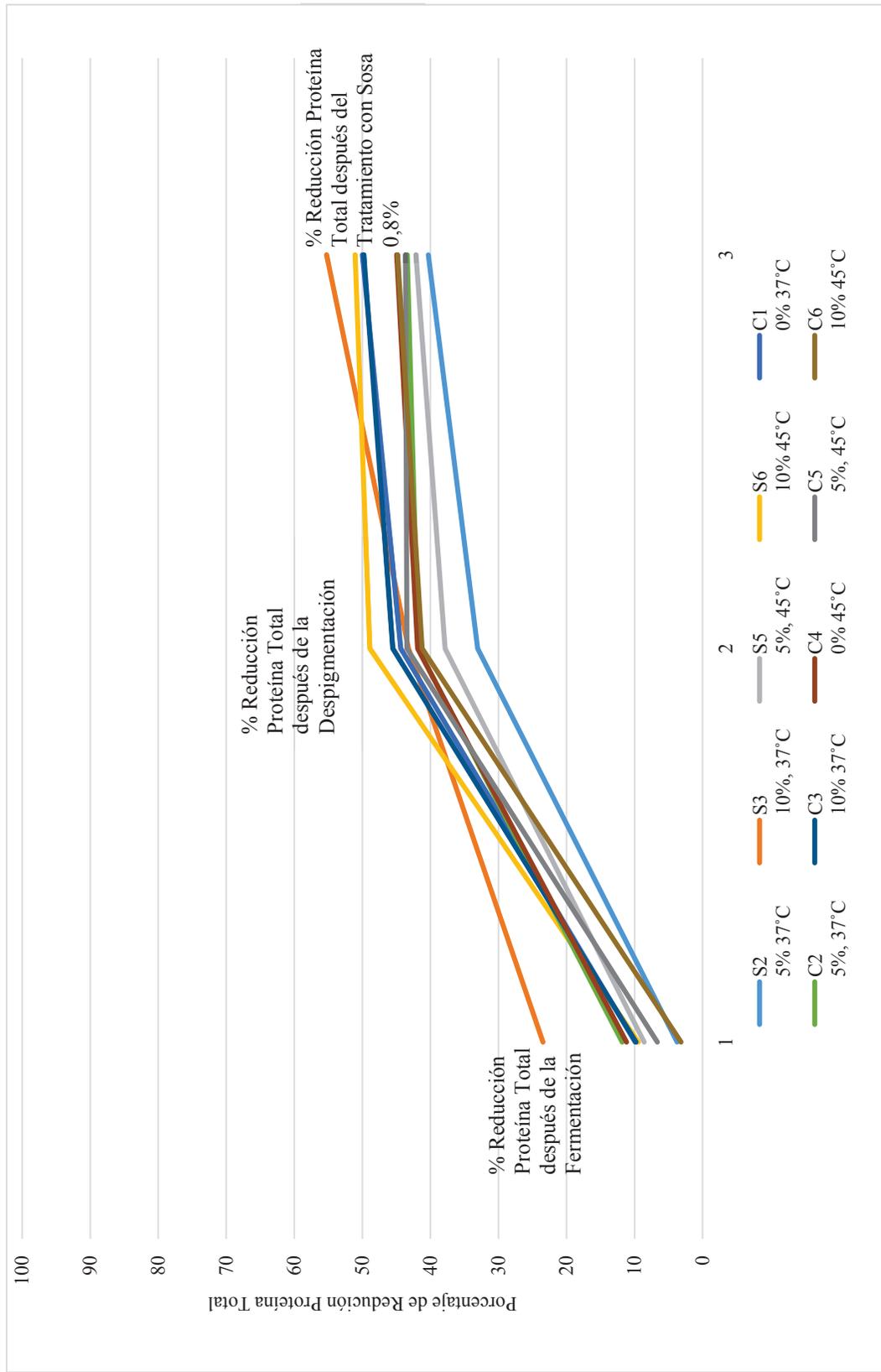


Figura 3.47 b. % de Reducción de la proteína total luego del tratamiento con sosa 0,8 % 90°C, por 30 min con y sin control de pH

Al igual que para la proteína soluble, parecería que no hay una influencia directa de los factores de estudio del proceso fermentativo, control pH, temperatura, y concentración de sacarosa; sin embargo, el análisis de la varianza presentado en las Figuras 3.48, 3.49 y 3.50, muestra que la temperatura no influye significativamente, pero el porcentaje de sacarosa y el control de pH sí. Por lo tanto, realizar la fermentación con control de pH, 10 % de sacarosa y a 37 °C o 45 °C, luego la despigmentación y luego el tratamiento con sosa da como resultados el mayor porcentaje de remoción de proteína total.

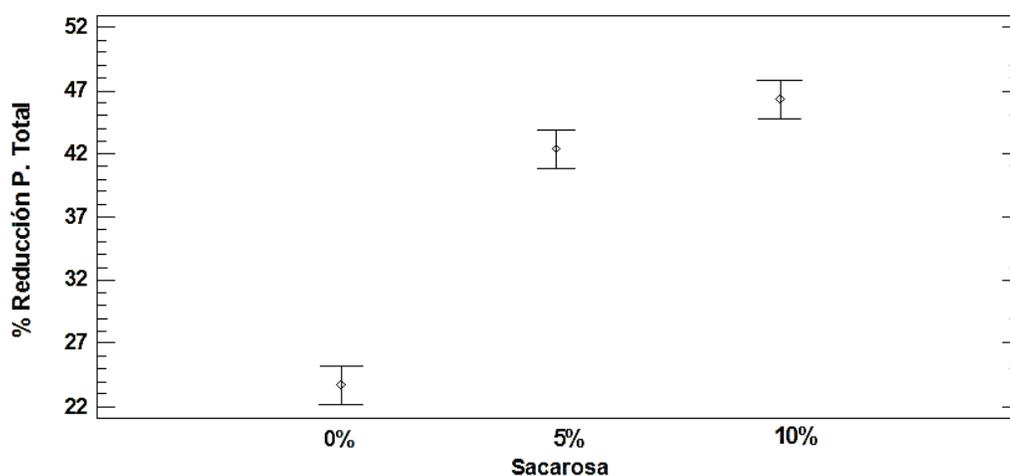


Figura 3.48. Efecto del porcentaje de sacarosa sobre el porcentaje de reducción de la proteína total después del tratamiento con sosa (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)

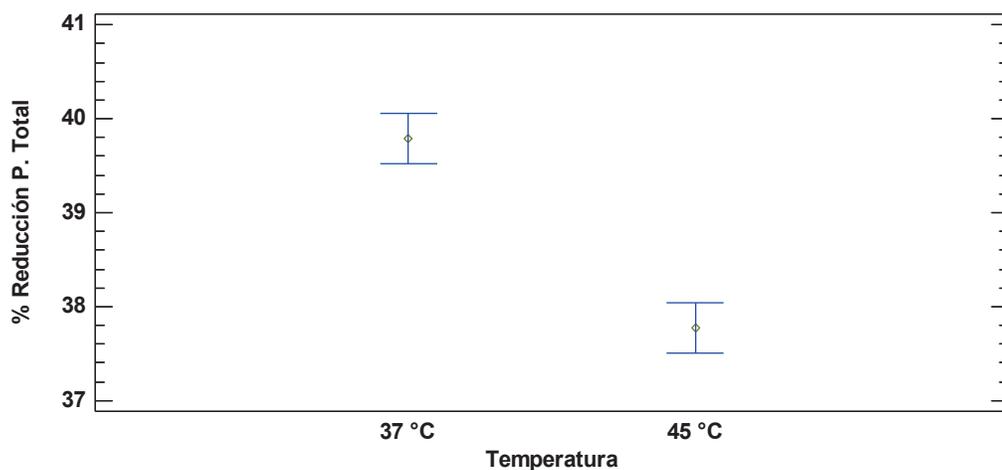


Figura 3.49. Efecto de la temperatura sobre el porcentaje de reducción de la proteína total después del tratamiento con sosa (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)

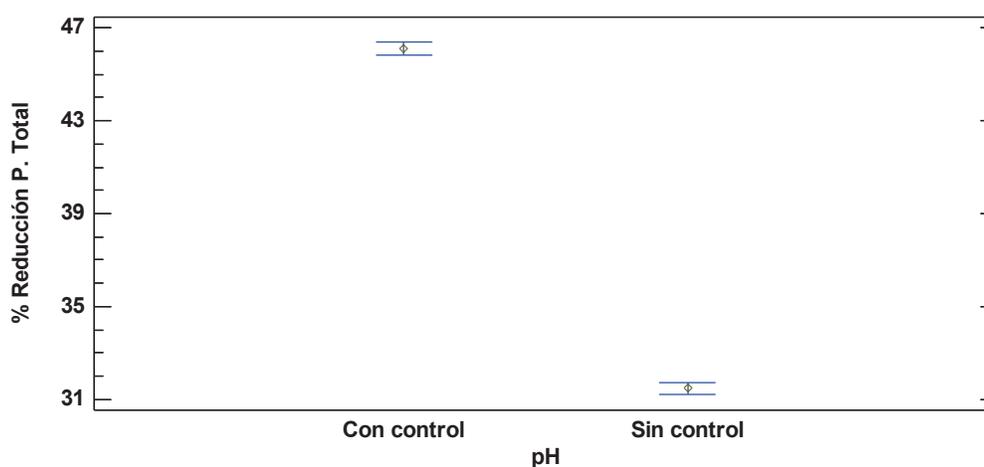


Figura 3.50. Efecto del pH sobre el porcentaje de reducción de la proteína total después del tratamiento con sosa (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)

3.5.3 REMOCIÓN DE CENIZA

En las figuras 3.51 (a y b) se presentan los resultados para la desmineralización. Se observa que los tratamientos S2 y S3 obtuvieron un porcentaje de remoción de ceniza mayor al 90 %, se esperaba este comportamiento ya que estos tuvieron un porcentaje de desmineralización mayor al 19 % durante el proceso fermentación. El tratamiento C4 presentó un comportamiento diferente ya que durante el proceso fermentativo no se obtuvo un porcentaje de remoción significativo; sin embargo, al finalizar el tratamiento con sosa se obtuvo un porcentaje de remoción del 98,76 %. En este tratamiento pudo influir el proceso de despigmentación ya que al separarse los pigmentos, los fuertes enlaces con los que están unidos los compuestos de la cascara de camarón se debilitan y se puede remover con mayor facilidad, como se manifiesta en el trabajo de Adour et al, 2008 (pp.1 664-1 669).

Para el resto de tratamientos se obtuvo una remoción menor al 60 %, este efecto pudo darse debido a que estos tratamientos no presentaron una mayor remoción de ceniza durante el proceso de fermentación láctica o porque el tiempo de exposición y concentración de sosa no fue suficiente para obtener una mayor remoción.

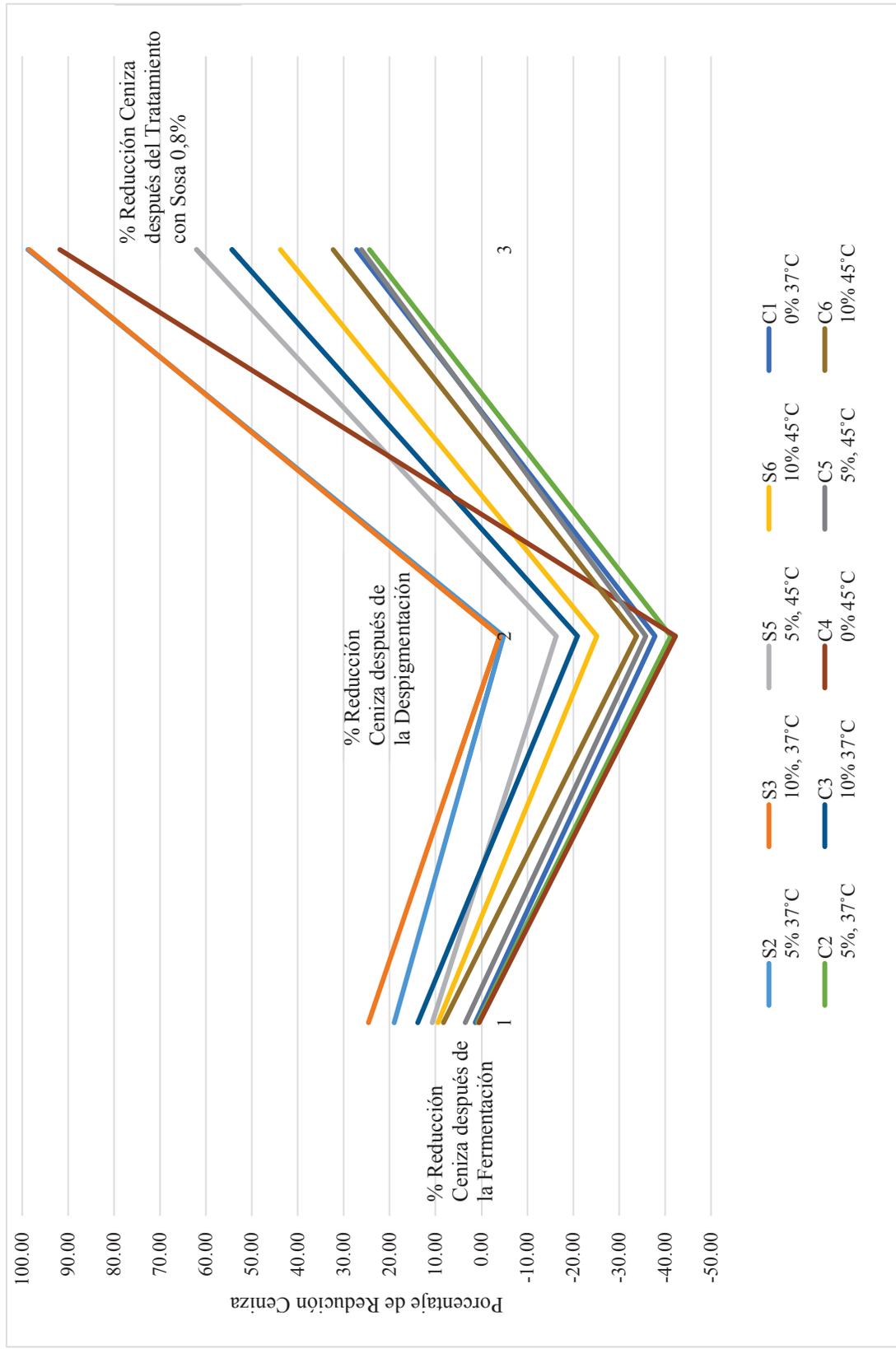


Figura 3.51. Porcentaje de Reducción de la ceniza luego tratamiento con sosa al 0,8 % por 30 min con y sin control de pH

Los resultados del análisis de varianza ANOVA que se presentan en las figuras 3.52, 3.53, 3.54, determinan el efecto en el porcentaje de reducción de ceniza para los tres factores de estudio. Tanto la temperatura como el pH presentan diferencias estadísticamente significativas por lo que trabajar a 37 °C y sin control de pH ayuda a una mejor remoción de ceniza, mientras que la concentración de sacarosa no influye significativamente en la desmineralización.

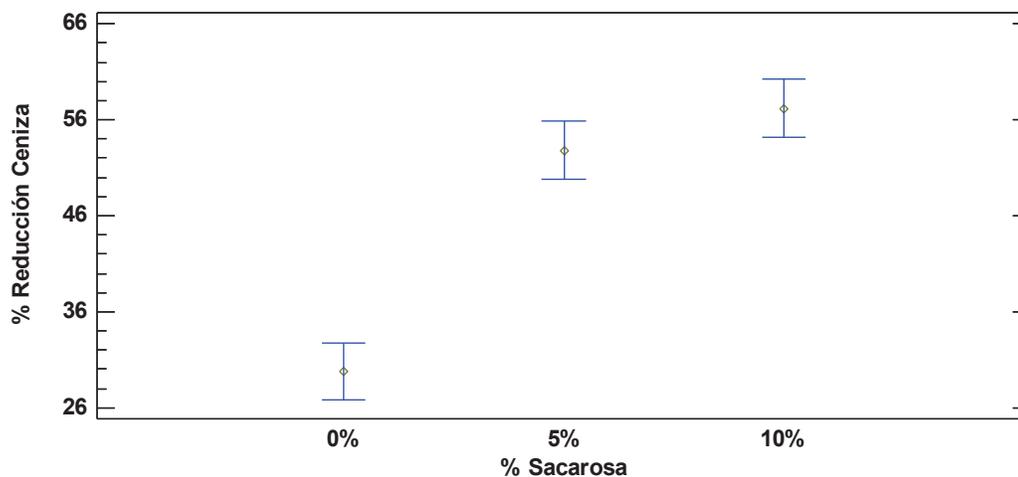


Figura 3.52. Efecto del porcentaje de sacarosa sobre el porcentaje de reducción de la ceniza después del tratamiento con sosa (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)

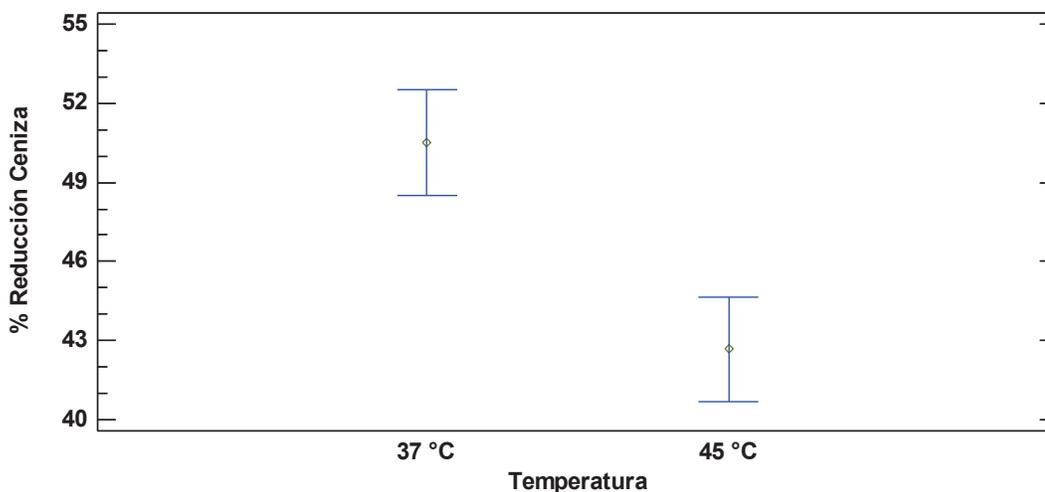


Figura 3.53. Efecto de la temperatura sobre el porcentaje de reducción de la ceniza después del tratamiento con sosa (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)

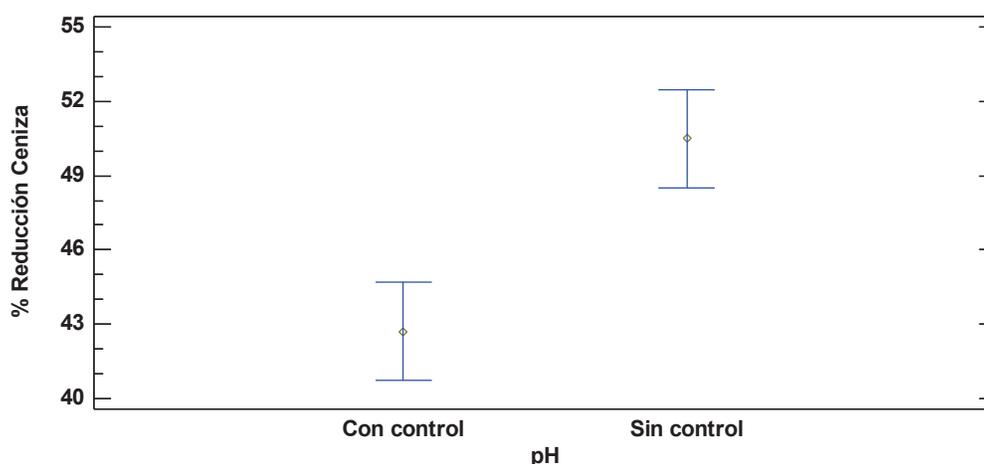


Figura 3.54. Efecto del pH sobre el porcentaje de reducción de la ceniza después del tratamiento con sosa (Medias y 95,0 % de Tukey HSD)

3.6 ANÁLISIS GLOBAL

En la Tabla 3.4 se presentaron los resultados globales de desmineralización y desproteinización para todos los tratamientos. La presencia de sacarosa en el proceso fermentativo influye significativamente en el mismo; ya que el comportamiento de los procesos llevados a cabo sin azúcar son muy diferentes de aquellos que contienen azúcar. Así, sí el proceso fermentativo se lleva a cabo sin control de pH, la cáscara sufre putrefacción y no se logra culminar el proceso; mientras que si el proceso se lleva a cabo con control de pH el incremento de temperatura mejora la desmineralización pero no la desproteinización.

Cuando se emplea sacarosa para enriquecer la cáscara de camarón en el proceso fermentativo, se observa que 10 % de sacarosa favorece tanto desmineralización total como la desproteinización; y mejores resultados se obtienen a 37 °C.

Ningún tratamiento logra una desproteinización superior al 55 %, pero sí se alcanza una desmineralización del 98 %; estos resultados son comparables con los obtenidos por Cira et al., (2005) en un proceso similar pero con *Lactobacillus* spp cepa B2, *Lactobacillus plantarum*, y 10 % de azúcar de caña, reportó un 90 % de reducción de ceniza y 63,65 % de reducción de proteína total por *Lactobacillus* spp

cepa B2 y 89,4 % de reducción de ceniza y 82,5 % de reducción de proteína para *Lactobacillus plantarum* (pp.1 359-1 366). Los resultados reportados por Adour (2008), al trabajar a 30 °C, con microorganismos y con glucosa fueron de 76 % y 53 % para la desproteización y desmineralización respectivamente; y, el porcentaje de desmineralización aumentó a 60 % cuando la temperatura fue de 35 °C (pp. 1 664-1 669).

Tabla 3.4. Resultados finales para cada tratamiento luego de los proceso de fermentación, despigmentación y tratamiento con sosa

Tratamientos	Después de la fermentación			Después de la despigmentación			Después del Tratamiento con sosa 0,8 %		
	P.Soluble (%)	P.Total (%)	Ceniza (%)	P.Soluble (%)	P.Total (%)	Ceniza (%)	P.Soluble (%)	P.Total (%)	Ceniza (%)
S2 5 % 37°C	61,06	3,74	19,01	75,97	33,04	-4,81	83,07	40,31	98,76
S3 10 %, 37°C	74,49	23,46	24,60	91,71	43,20	-3,97	99,90	55,26	98,46
S5 5 %, 45°C	62,14	8,59	10,72	72,49	37,83	-16,31	88,37	42,13	62,03
S6 10 % 45°C	82,36	9,44	9,45	94,43	48,93	-25,15	99,40	51,07	43,77
C1 0 % 37°C	66,74	9,91	1,32	92,30	44,37	-37,82	99,57	50,00	27,20
C2 5 %, 37°C	62,14	11,82	0,81	71,11	41,82	-41,24	86,71	43,41	24,38
C3 10 % 37°C	82,16	9,79	13,84	89,34	45,53	-20,93	98,68	49,79	54,32
C4 0 % 45°C	69,21	11,18	0,51	89,81	41,89	-42,28	91,87	44,96	91,81
C5 5 %, 45°C	77,20	6,65	3,51	96,83	43,45	-35,82	99,72	43,66	26,13
C6 10 % 45°C	80,19	3,17	8,28	88,38	41,23	-33,82	99,24	44,82	32,30

3.7 CARACTERIZACIÓN DE LA QUITINA OBTENIDA

3.7.1 PESO MOLECULAR DE LA QUITINA

El peso molecular de la quitina obtenida en cada tratamiento al final del proceso, se muestra en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Peso molecular de los tratamientos

Muestra	Condiciones	Peso Molecular (g/mol)
S2	5 % 37 °C Sin control pH	2,11*10 ⁶
S3	10 %, 37 °C Sin control pH	3,07*10 ⁶
S5	5 %, 45 °C Sin control pH	2,05*10 ⁶
S6	10 % 45 °C Sin control pH	2,66*10 ⁶
C1	0 % 37 °C con control	1,57*10 ⁶
C2	5 %, 37 °C con control	1,73*10 ⁶
C3	10 % 37 °C con control	1,95*10 ⁶
C4	0 % 45 °C con control	1,52*10 ⁶
C5	5 %, 45 °C con control	1,86E*10 ⁶
C6	10 % 45 °C con control	1,58E*10 ⁶

Para todos los tratamientos se obtuvo un peso molecular mayor a 1×10^6 g/mol, condición requerida, según Pillai et al. (2009), para comprobar que lo obtenido es quitina (pp. 641-678). Los tratamientos sin control de pH presentaron los pesos moleculares más altos, mientras que los tratamientos tratados con control de pH, dieron quitina con menor peso molecular. Se esperaba este comportamiento ya que al usar ácidos o bases concentrados para controlar el pH, se presenta una disminución del peso molecular como lo reportan las investigaciones de Shirai (2011). El mismo estudio reporta que el incremento de temperatura da quitina de menor peso molecular; igual a lo observado en este trabajo. Quitinas con bajos PM son susceptible de una mayor desproteización de las cadenas, efecto no deseado, si la aplicación que se requiere para la quitina es en el área de la medicina, o si se requiere obtener quitosano con mejores propiedades (Cira et al., 2010, pp. 1 359-1 366 y Shirai, 2011, pp. 1-8); es por esto que se debe buscar procesos que generen quitina con alto peso molecular.

El peso molecular reportado en el trabajo realizado por Keiro, C, (2010), fue de 4.5×10^6 g/mol, donde se la cáscara fue sometida a un proceso biológico-químico en donde se trabajó con 10 % de glucosa, 5 % (v/p) *Lactobacillus spp. (B2)* y *Lactobacillus casei*, a 30°C, por 120 h. Este valor fue superior a los obtenidos en este trabajo. Esto puede darse por el tipo de *Lactobacillus* empleado y/o por todas las condiciones de temperatura, sustrato, ácido o bases usados durante el proceso, o la combinación de todos estos factores que influyeron en el peso molecular de la quitina obtenida (p. 57).

3.7.2 ESPECTROFOTOMETRÍA DE INFRARROJO EN LAS MUESTRAS DE QUITINA

Los espectros de Infrarrojo para la quitina obtenida en cada tratamiento se presentan en las figura 3.55 a 3.64, en estos se reporta el estándar de color verde, rojo la primera repetición y azul la segunda repetición. La quitina presenta los grupos funcionales presentados en la Tabla 3.6, que son los característicos y esperados en el espectro IR.

Tabla 3.6. Grupos funcionales de la quitina

Región (cm ⁻¹)	Grupo Funcional
3750 - 3500	NH-OH
3500-3600	-OH
3410-3450	NH
2880-2950	C-H
Grupo Amida y carboxilo 1680-1630 y 1640-1550	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_3\text{C} - \text{C} - \text{N} - \text{R} \\ \\ \text{H} \end{array} $
1650	C = C
1300-1480	C-H
1110-1200	O-H
1020-1073	C-O-C
578 Y 1000	Estructura del polisacarido

(Lavall, 2007, p. 75)

Las gráficas de los infrarrojos IR muestran en su mayoría una repetitividad favorable, excepto en los tratamientos S2, C4, C6, donde la primera repetición difiere de las segunda, esto puede deberse a que no se logra un control exacto y preciso de las condiciones de fermentación; por otro lado, la forma de muestrear y/o la adición de la base para el control del pH pudieron afectar el proceso.

Los espectros de las figuras 3.55 al 3.64, presentaron las bandas características de la quitina que se muestran en la Tabla 3.6, con ciertas particularidades que se analizan a continuación.

El grupo funcional -OH que de la región 3 500 a 3 600, se encuentra de una manera más acentuada en las Figuras 3.55, 3.57, 3.58, 3.59, 3.63, 3.64, esto se presenta cuando la muestra han adquirido humedad y el espectrofotómetro de Infrarrojo lo detecta reportando uno o varios picos pequeño en esta región.

Los enlaces -NH de la región 3 450 a 3 410 y los grupos alifáticos -CH o grupos alcanos que se presentan en la región 2880 a 2950, tienen un espectro muy semejante al de la quitina comercial, este mismo comportamiento se presentó en los grupos amida I (N-H) y amida II (C=O) característicos de la α -quitina que se presentan con intensidad en las bandas de la región 1 680-1 630 y 1 640-1 550 respectivamente.

Los grupos funcionales que se presentan en la región 2 000 a 3 000, son los C-H. Se observa que todos los tratamientos presentan un ensanchamiento mayor con respecto a la quitina comercial, esto pudo darse a que el porcentaje de remoción de proteína total apenas llegó al 60 %.

Todos los tratamientos registraron un pico con la misma tendencia del espectro de quitina comercial en el rango 578-1 000 correspondiente a la estructura del polisacárido. Estos picos, sin embargo son más altos en las muestras analizadas, este efecto pudo darse por presencia de una mayor cantidad de polisacáridos enlazados con la quitina de la cáscara (Lavall, R. et al., 2007, p. 75).

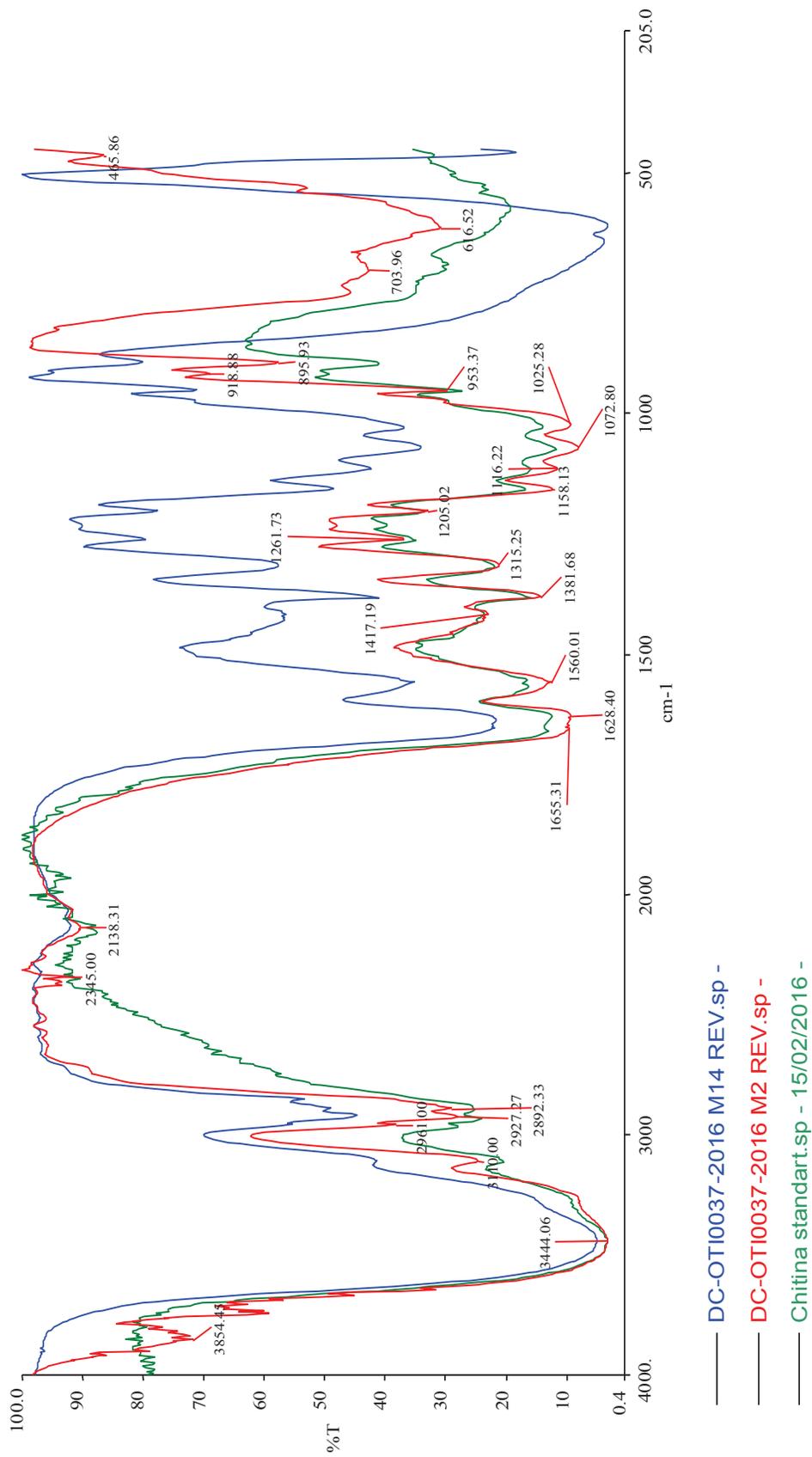


Figura 3.55. Espectro del tratamiento S2 y su repetición tratadas con: 5 % sacarosa, 37 °C, sin control de pH, junto con el espectro de quitina del software.

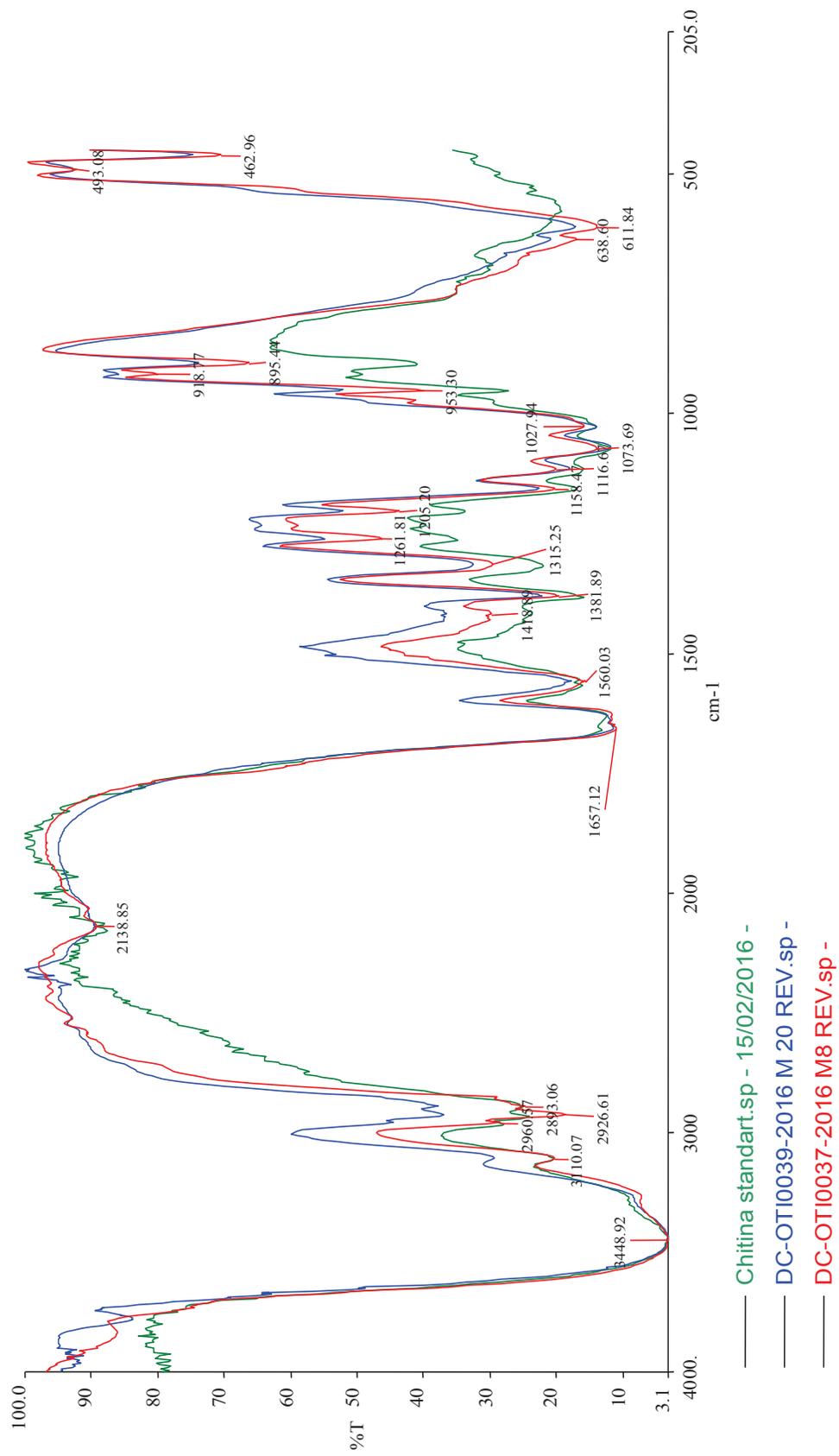


Figura 3.56. Espectro del tratamiento **S3** y su repetición tratadas con: 10 % sacarosa, 37 °C, sin control de pH, junto con el espectro de quitina del software

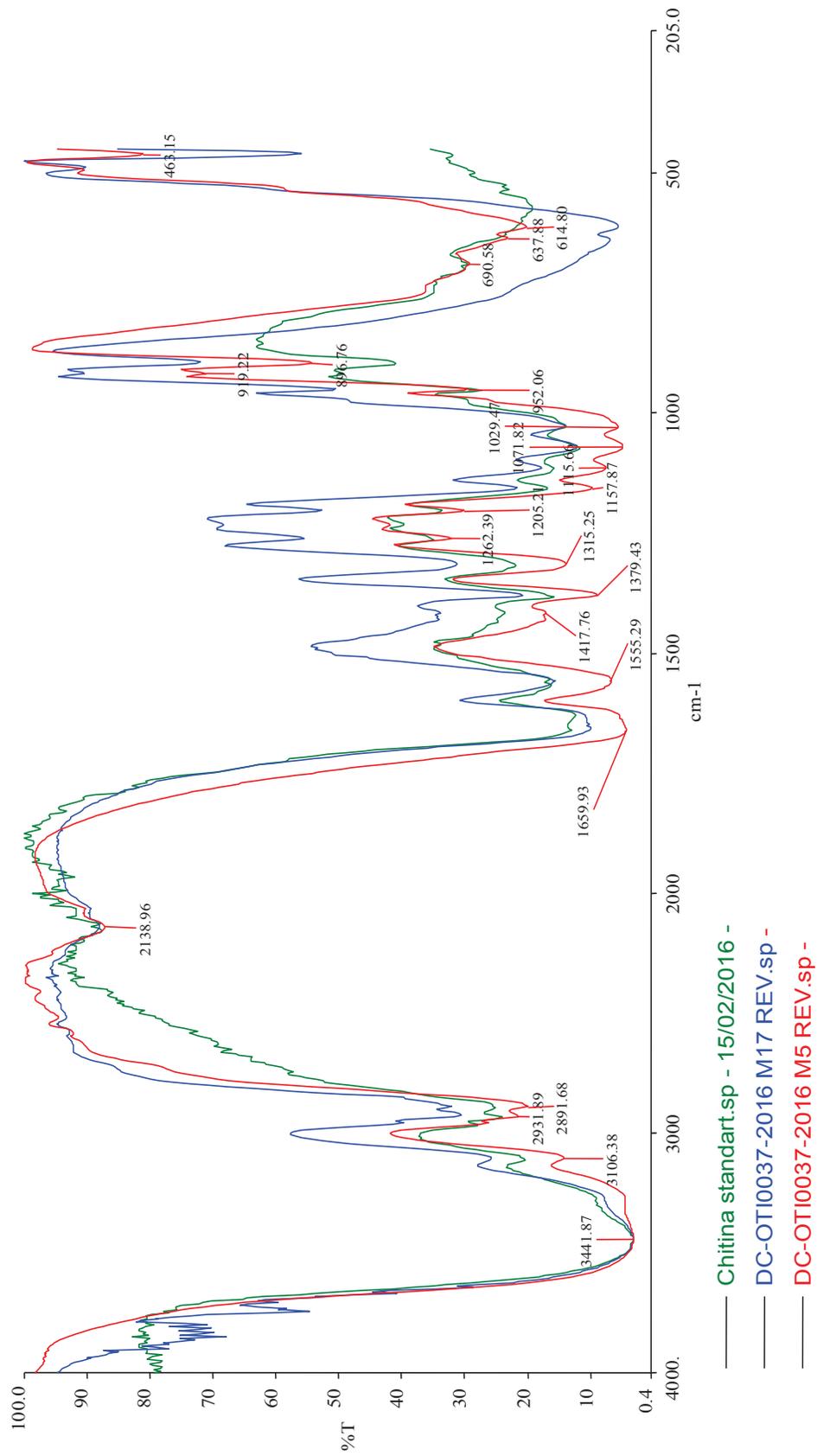


Figura 3.57. Espectro del tratamiento C4 y su repetición tratadas con: 0 % sacarosa, 45 °C, con control de pH, junto con el espectro de quitina del software

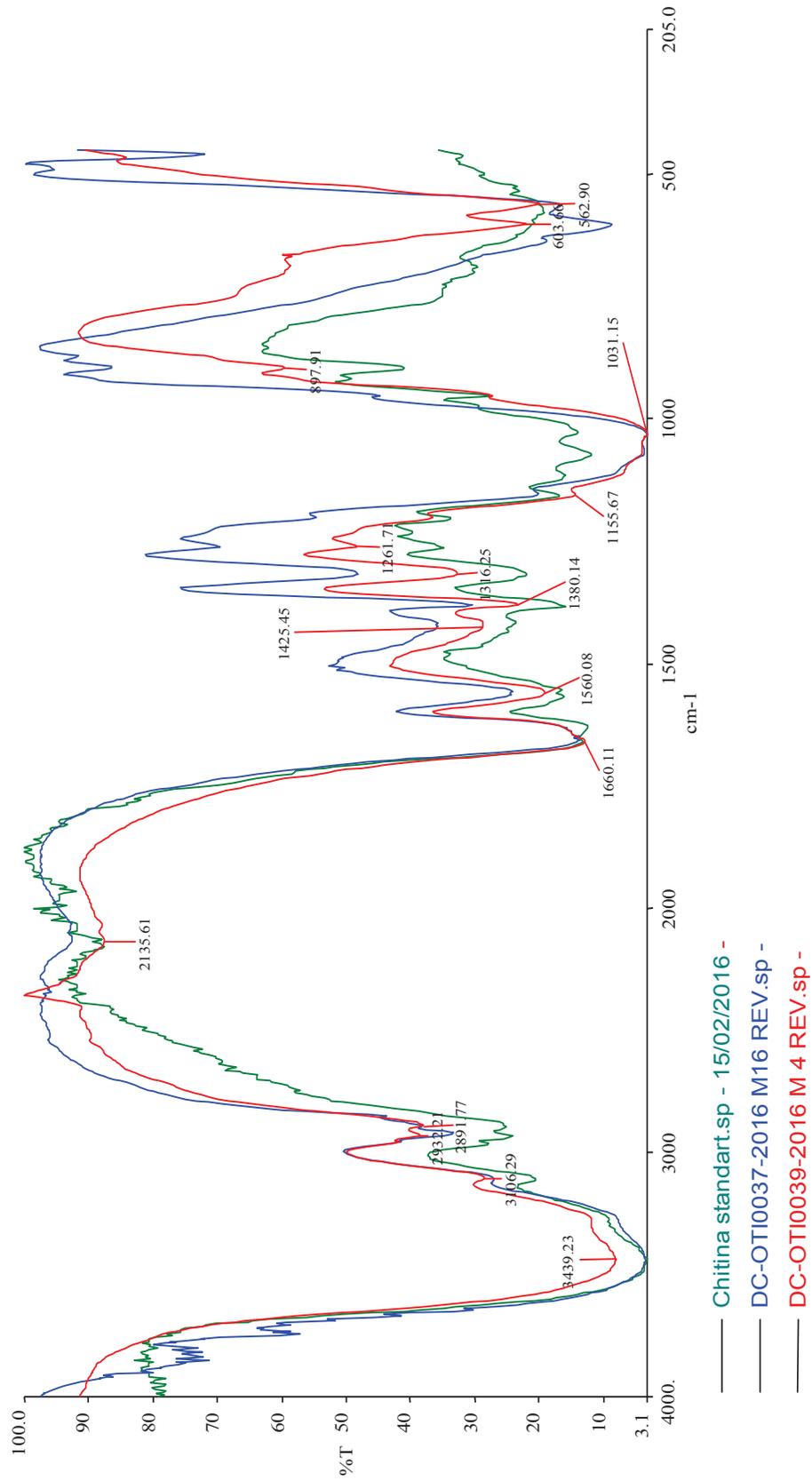


Figura 3.58. Espectro del tratamiento S6 y su repetición tratadas con: 10 % sacarosa, 45°C, sin control de pH, junto con el espectro de quitina del software.

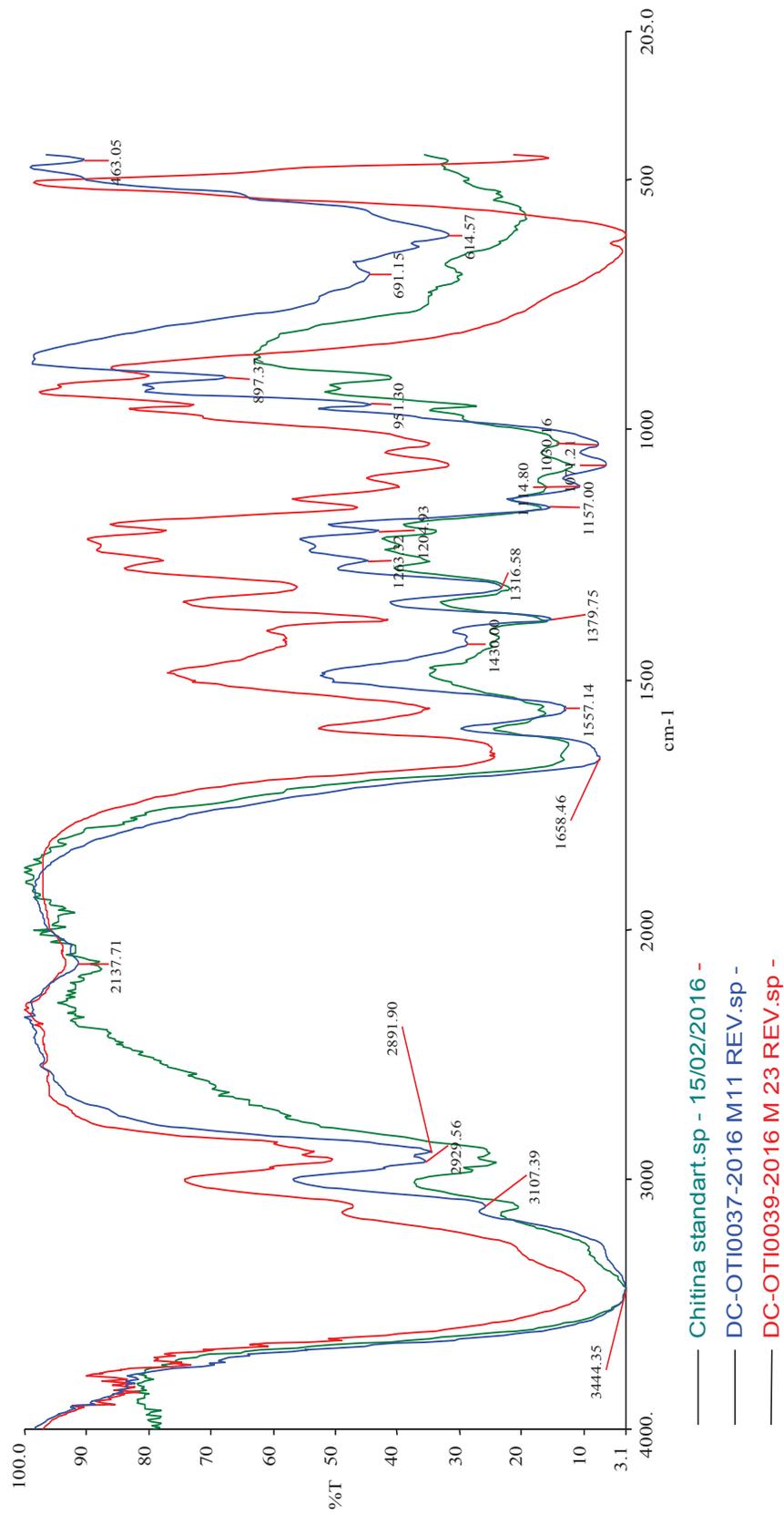


Figura 3.59. Espectro del tratamiento C6 y su repetición tratadas con: 10 % sacarosa, 45°C, con control de pH, junto con el espectro de quitina del software.

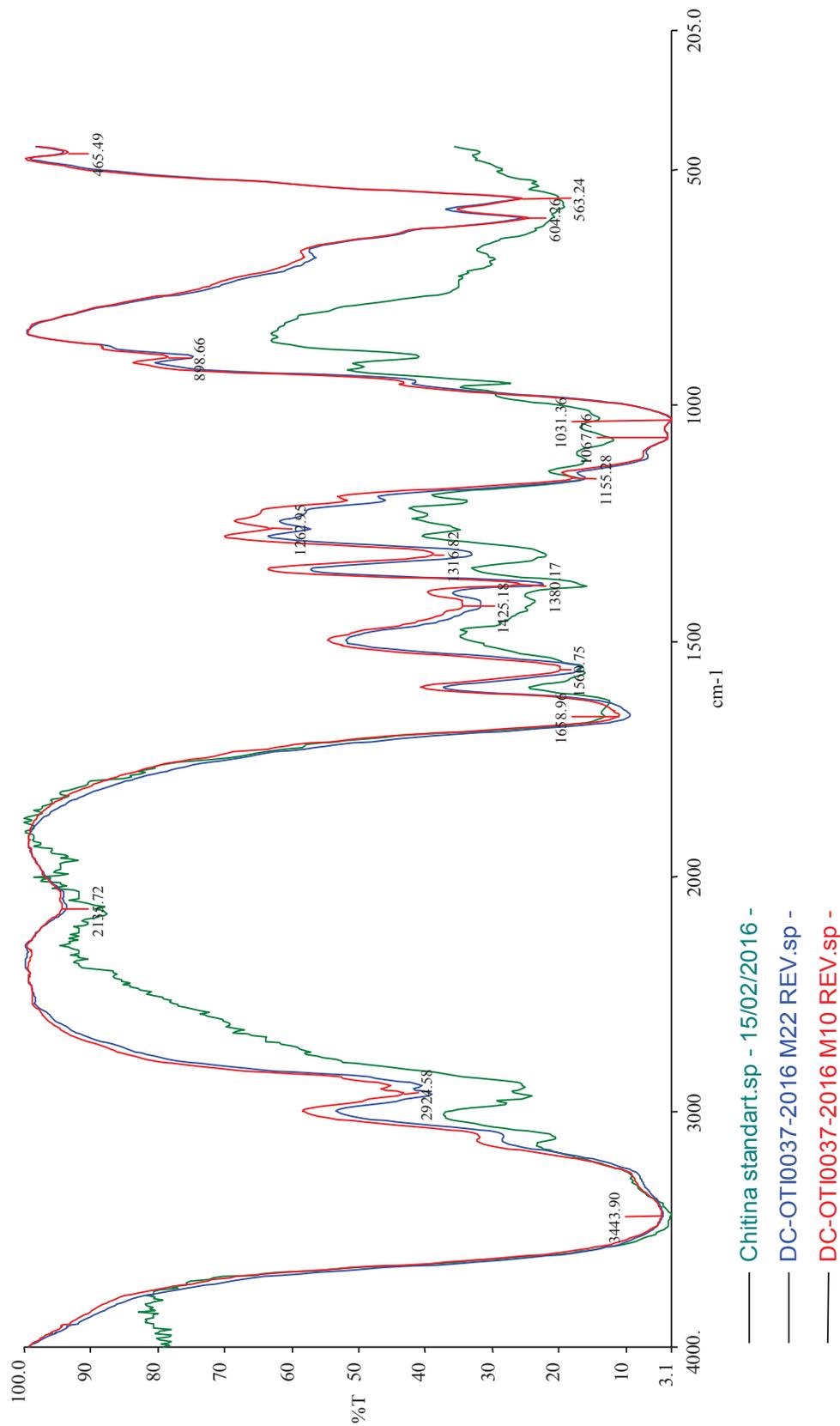


Figura 3.60. Espectro del tratamiento C1 y su repetición tratadas con: 0 % sacarosa, 37°C, con control de pH, junto con el espectro de quitina del software.

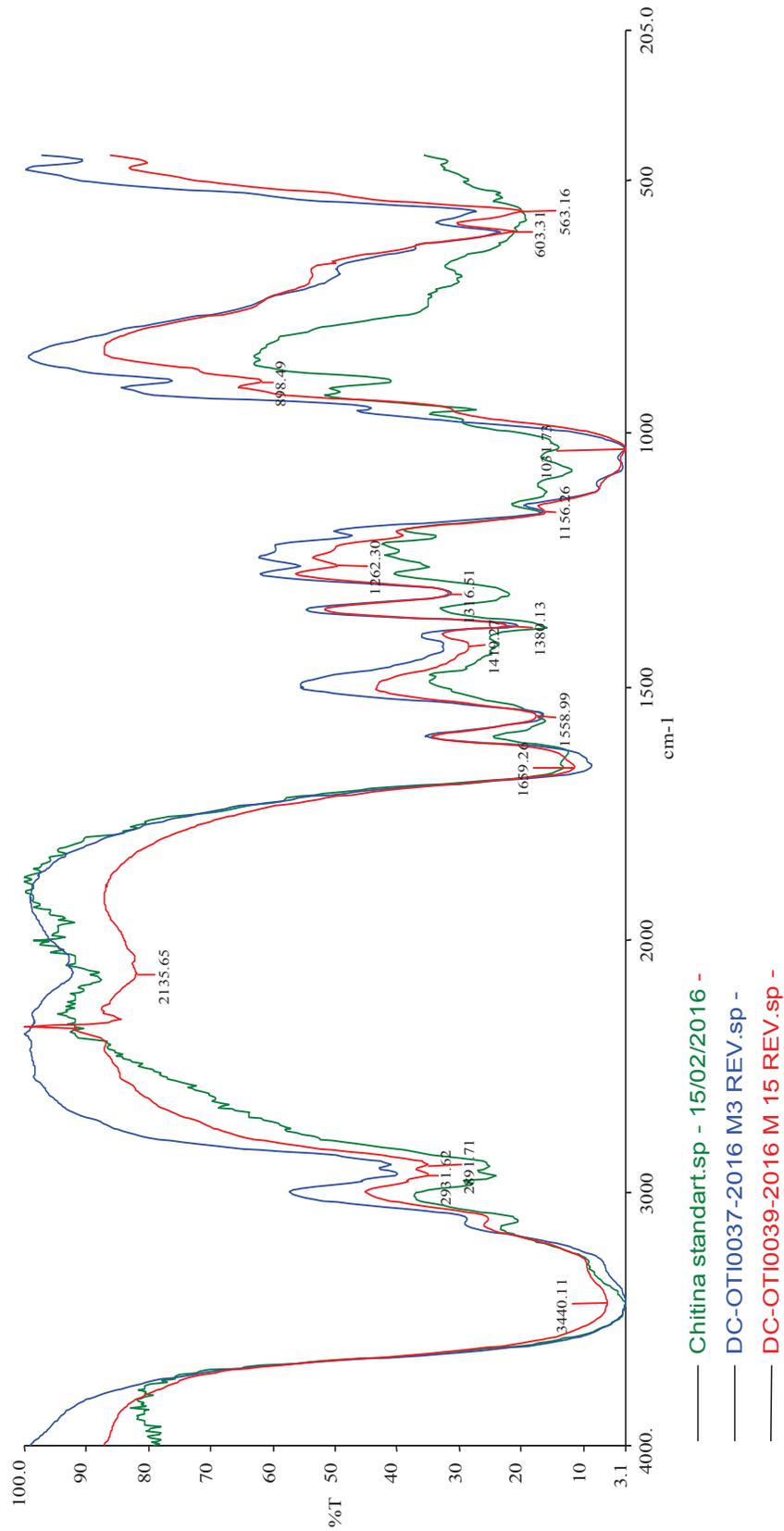


Figura 3.61. Espectro del tratamiento C3 y repetición tratadas con: 10 % sacarosa, 37°C, con control de pH, junto con el espectro de quitina del software.

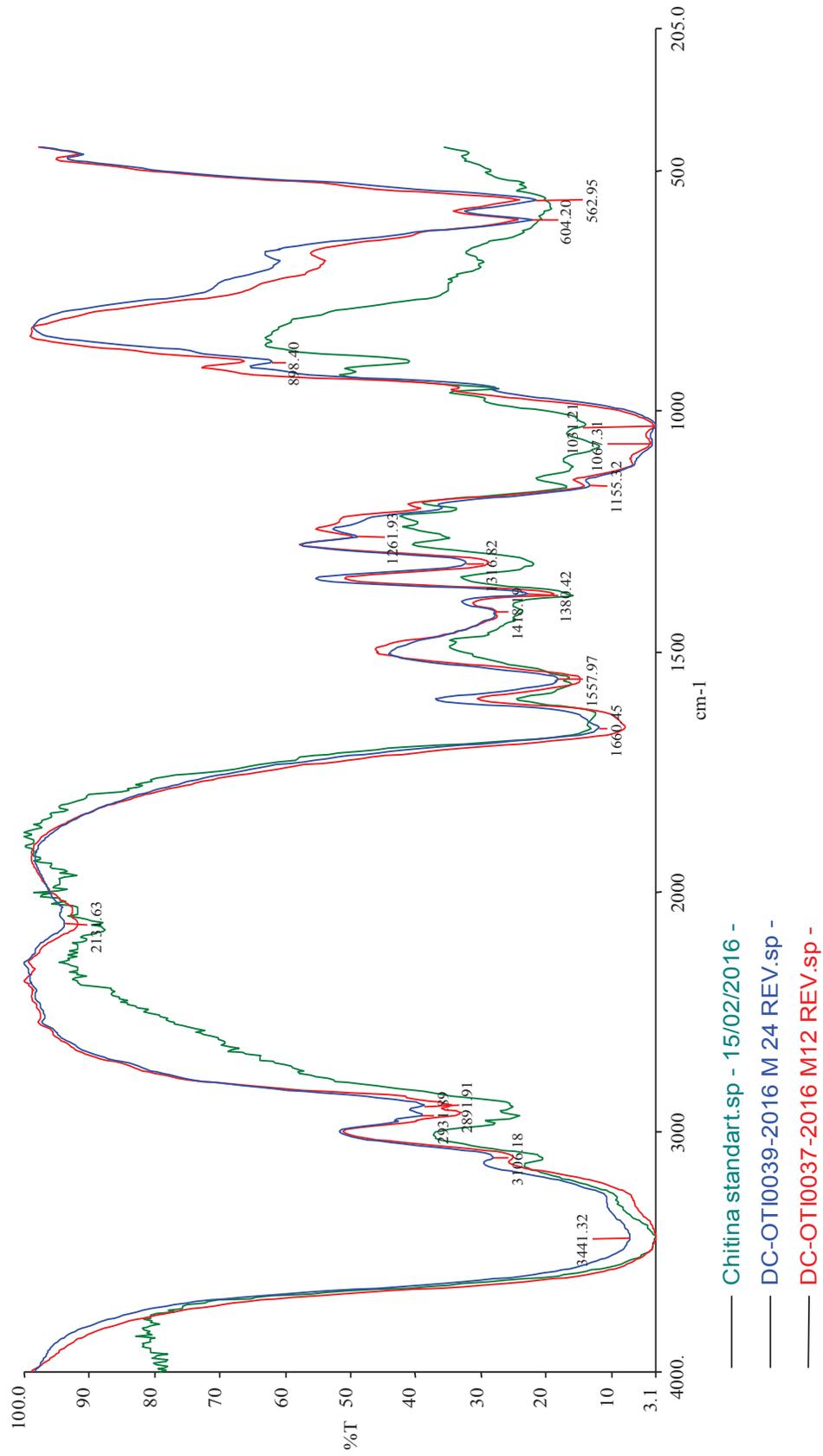


Figura 3.62. Espectro del tratamiento **S5** y su repetición tratadas con: 5 % sacarosa, 45°C, sin control de pH, junto con el espectro de quitina del software

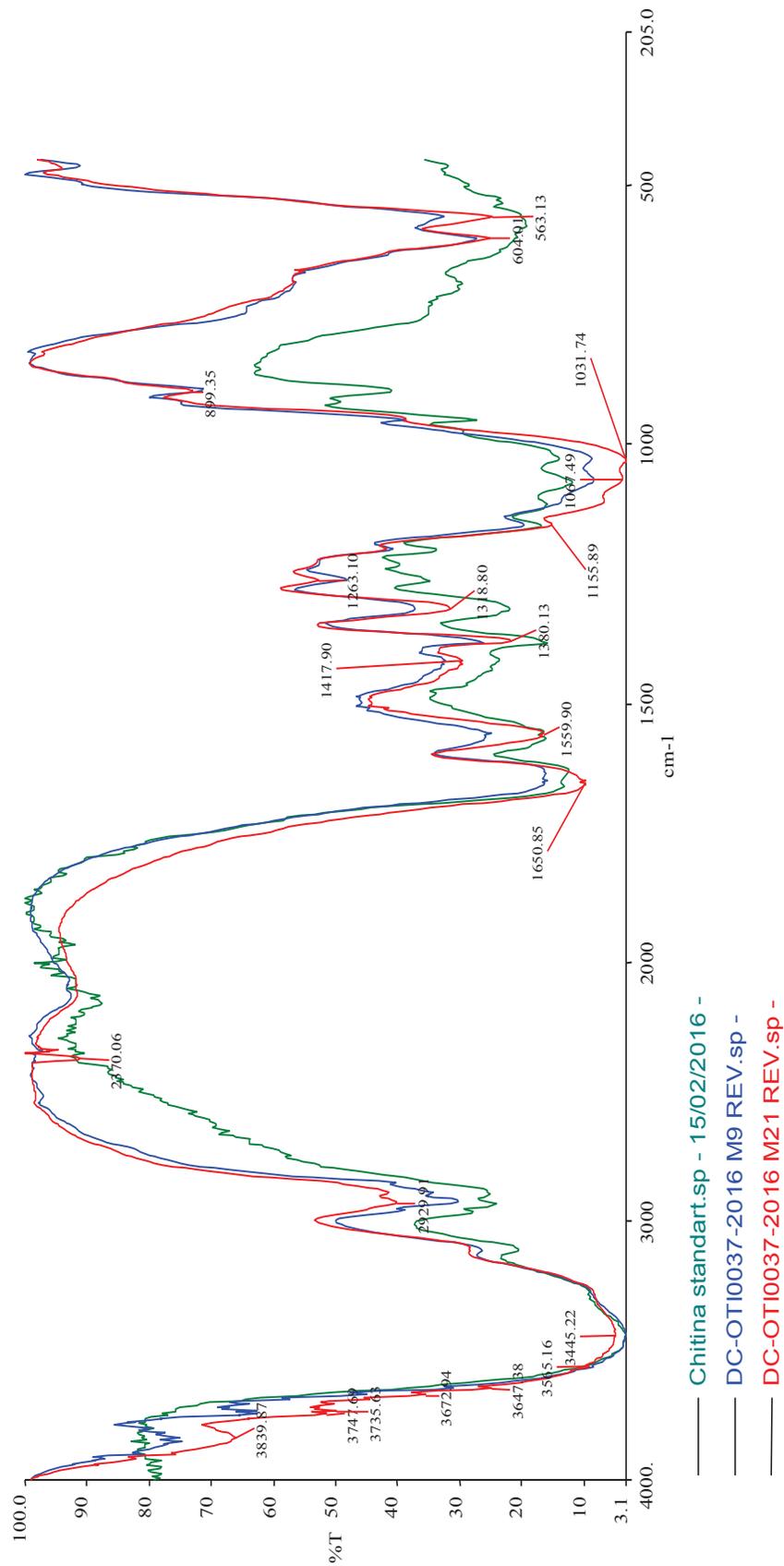


Figura 3.63. Espectro del tratamiento C5 tratadas y su repetición con: 5 % sacarosa, 45 °C, con control de pH, junto con el espectro de quitina del software

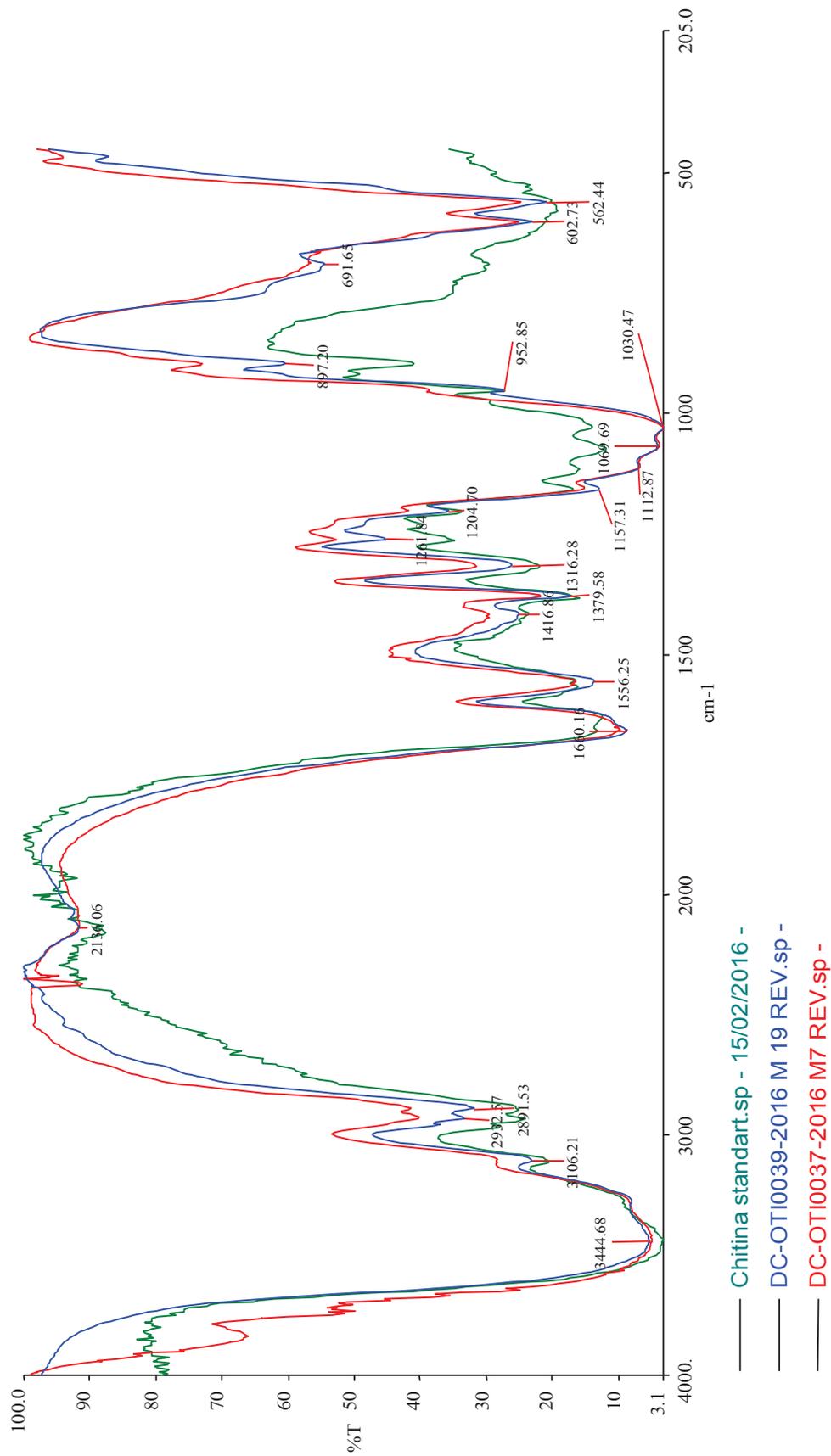


Figura 3.64. Espectro del tratamiento C2 y su repetición tratadas con: 5 % sacarosa, 37 °C, con control de pH, junto con el espectro de quitina del software.

3.7.3 RENDIMIENTO DE LA QUITINA

Se presenta en la Tabla 3.7 los rendimientos obtenidos para cada tratamiento.

Tabla 3.7. Rendimiento de la quitina obtenida

Tratamientos	Rendimiento Quitina peso húmedo (%)	Rendimiento Quitina peso seco (%)
S2 5 %, 37°C, sin control pH	47,5	43,23
S3 10 %, 37°C, sin control pH	48,2	43,86
S5 5 %, 45°C, sin control pH	46,4	42,22
S6 10 %, 45°C, sin control pH	49,5	45,05
C1 0 %, 37°C, con control pH	59,85	54,46
C2 5 %, 37°C, con control pH	60,5	55,06
C3 10 %, 37°C, con control pH	57,1	51,96
C4 0 % , 45°C, con control pH	54,85	49,91
C5 5 %, 45°C, con control pH	62,05	56,46
C6 10 %, 45°C, con control pH	61,3	55,78

Los rendimientos en base húmeda obtenidos en este estudio, fueron menores al 50 % en los tratamientos sin control de pH, en cambio para los tratamientos con control de pH se obtuvieron porcentajes mayores al 50 %. Los porcentajes obtenidos en este proyecto fueron mayores a los reportados por Flores, et al., (2012); Khanafari, et al., (2013); y Jung et al., (2006), cuyos porcentajes fueron 33 %, 53,7 %, 38,67 %, quienes trabajaron con una o más cepas de microorganismos en un proceso netamente biológico (pp. 1193-1200; pp.19-24; p.746-750). La obtención de quitina mediante un proceso químico reportó rendimientos del 39 % y 24,5 % en base seca (Khanafari, et al., 2013, pp.19-24; Escoria, et al., 2009, pp.45-55). Y se reportó un porcentaje de rendimiento del 13,46 % (base seca) en el estudio realizado por Keiro (2012, p.35). Hay que tomar en cuenta que en los trabajos realizados por estos autores el porcentaje de desproteinización fue mayor al 90 %, en especial el de Keiro, quien reportó un 93,3 % de remoción de proteína total, es por ellos que sus rendimientos fueron menores. En cambio en este estudio el mayor porcentaje de remoción de proteína total fue del 55,26 %.

3.8 DETERMINACIÓN DEL PROCESO MÁS ADECUADO PARA LA OBTENCIÓN DE QUITINA A PARTIR DE LA FERMENTACIÓN LÁCTICA DE LA CÁSCARA DE CAMARÓN

Con la finalidad de determinar el proceso más adecuado obtenido en este estudio para la obtención de quitina a partir de la fermentación láctica, se trabajó con el medio ML1 en la generación del inóculo para iniciar el proceso fermentativo en la cáscara de camarón.

Posteriormente, se analizaron varios parámetros para determinar cuál fue el tratamiento más adecuado para obtener quitina. Como se observa en los análisis anteriores tanto el peso molecular, como el estudio de los espectros de infrarrojo de la quitina obtenida ayudaron a determinar el mejor tratamiento para la obtención del polímero. En un principio solo se descartó el tratamiento con 0 % de sacarosa y sin control de pH porque se produce putrefacción de la cáscara de camarón. En cuanto al rendimiento existe una diferencia entre los tratamientos sin control de pH cuyos rendimientos fueron menores al 50 %, se podría escoger los tratamientos con mayor rendimiento, pero los tratamientos sin control de pH también obtuvieron buenos resultados y presentan una ventaja ya que al no utilizar ácido clorhídrico para el control del pH, no se produce una contaminación ambiental y se evita la corrosión de los equipos. Sin embargo, este criterio solo se podría considerar válido si es que al darle una aplicación a la quitina obtenida se presentan los mismos resultados.

Por lo tanto, el análisis recae en la desmineralización y desproteínización de la cáscara, los tratamientos que presentaron mejores porcentajes de remoción trabajaron en la siguientes condiciones, para S3 a 10 %, 37 °C, sin control de pH; para S2 a 5 %, 37°C, sin control de pH y para C4 a 0 %, 45 °C, con control de, cuyos porcentajes de reducción fueron: 98,76 %, 98,45 %, 91,81 % para ceniza, 83,07 %, 99,89 %, 91,86 %, proteína soluble, 40,30 %, 55,26 %, 44,95 % de proteína total respectivamente; resultados que se representan en la figura 3.65. Se sugiere

trabajar con el tratamiento S3, ya que obtuvo los mayores porcentajes de remoción en comparación con los otros dos tratamientos, y además produjo la quitina con mayor peso molecular $3,07 \cdot 10^6$ g/mol.

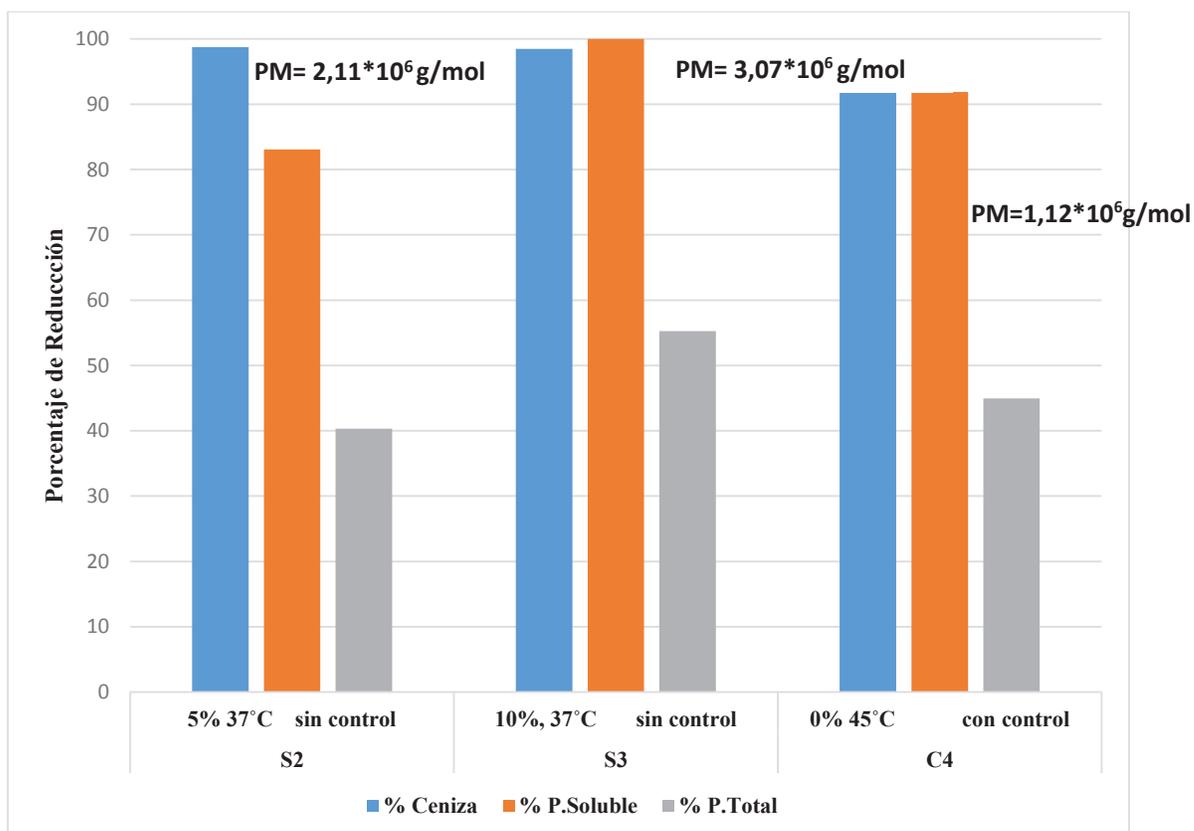


Figura 3.65. Resultado de los mejores tratamientos S3, S2, C4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

1. Los medios ML1 y ML2 son los más propicios para la generación de inóculo al alcanzar en menor tiempo (4 y 5 horas respectivamente), la concentración de 10^8 (mo/mL) requerida para este estudio, en comparación con el ML3 que requirió 11 horas. Las velocidades de crecimiento para los medios ML1 y ML2 fueron de $0,3312 \text{ h}^{-1}$ y $0,3234 \text{ h}^{-1}$ respectivamente, valores que fueron mayores a la velocidad del medio ML3 que fue de $0,2059 \text{ h}^{-1}$.
2. La combinación de 0 % de sacarosa sin control de pH a las temperaturas de 37°C o 45°C obtuvo una baja producción de ácido láctico que fue de $0,54 \text{ g/L}$ y $0,1 \text{ g/L}$ en los tratamientos S1, S4 respectivamente. En estos tratamientos se produjo la putrefacción de la cáscara dando como resultado un incremento de pH a 8.
3. Se presenta una mayor producción de ácido láctico para el tratamiento con 10 % de sacarosa, 37°C , y sin control de pH, en comparación con los otros tratamientos de estudio.
4. Durante el proceso de fermentación se favoreció la remoción de la proteína soluble, ya que todos los tratamientos presentaron una reducción mayor al 60 %, mientras que para la proteína total y las cenizas se reportaron porcentajes menores al 30 %. Al finalizar el proceso fermentación láctica se reportó una mayor remoción de proteína total y ceniza al trabajar con el 10 % de sacarosa sin control de pH y a 37°C .
5. En la etapa de despigmentación continuó la desproteinización de la cáscara, en la mayoría de los tratamientos se llegó a una remoción mayor del 80 %. La proteína total también presentó un incremento pero este no fue mayor al 50 %.

Sin embargo, no se logró determinar el porcentaje de desmineralización ya que el hipoclorito incremento el porcentaje de ceniza medido.

6. La remoción de ceniza, proteína total y proteína soluble se incrementó al finalizar el tratamiento con sosa, esta tendencia se presentó en todos los tratamientos. Y el análisis final reportó que los tratamientos S2, S3, C4, presentaron las mejores remociones de proteína soluble.

7. Las condiciones que presentaron una mayor remoción de proteína total y soluble fueron: 10 % sacarosa y con control de pH, y 37 °C o 45 °C. En cambio para la reducción de ceniza las condiciones más favorables se presentaron al trabajar sin control de pH, a 45 °C, y con una concentración de sacarosa del 10 %.

4.2 RECOMENDACIONES

1. Estudiar para el medio ML1 otras fuentes de carbono como la glucosa, lactosa o la combinación de estas fuentes para conocer el efecto que estas tendrían en la generación del inóculo, también se podría conocer la influencia de las vitaminas como la tiamina.
2. Realizar un análisis de datos por un tiempo superior a las 12 horas con la finalidad de conocer el tiempo en que la fuente de carbono se ha consumido y el microorganismo llega a su fase estacionaria de crecimiento.
3. Para reducir el tamaño de la cáscara de camarón se recomienda moler en húmedo para aprovechar el porcentaje de agua que contiene la cáscara. Si se trabaja con un tamaño de cáscara menor a 0,5 mm se podría observar si el microorganismo tiene una mayor accesibilidad a los nutrientes de la cáscara.
4. Analizar el efecto que tendría el incrementar del porcentaje de inóculo del 5 % (v/p) a porcentajes del 7 %, 10 % o 15 % (v/p) para el proceso de fermentación láctica.
5. Se reportó que la producción de ácido láctico mantiene una tendencia constante a partir de las 72 horas por lo que se debería investigar el efecto que produciría una nueva inoculación del microorganismo *Lactobacillus delbrueckii* u otro microorganismo de la familia del lactobacillus con la finalidad de obtener una mayor producción de ácido láctico.
6. Estudiar el efecto de uso de ácidos débiles en el proceso fermentativo con control de pH.
7. Analizar la composición de las fracciones líquidas para determinar la factibilidad de extraer componentes como astaxantina, calcio y proteína.
8. Realizar estudios del uso de otros despigmentantes como acetona, una aplicación de la quitina y un estudio de escalado del proceso obtenido.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adour, L., Arbia, W, Amrane, A y Mamen, N. (2008). Combined use of waste materials recovery of chitin from shrimp shells by lactic fermentation supplemented with date juice waste or glucose *Journal homepage Process Biochemistry*, 8 (3), 1 664-1 669.
2. Agudelo, C., Ortega, R. y Hoyos, J. (2010). Determination of kinetic parameters of two lactic inoculums: *Lactobacillus plantarum* A6 and Lactic Acid bacterias of yogurt. *Ciencias Agropecuarias*, 8(2), 8-16.
3. Alais, A. (2003). *Ciencia de la Leche: Principios de técnica lechera*. (4ta.ed.). Barcelona, España: Reverté.
4. A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemists). (1997). *Official methods of Analysis of A.O.A.C.* (17th ed.). Washington, DC: A.O.A.C International.
5. A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemists). (2005). *Official methods of Analysis of A.O.A.C.* (18ava ed.). Maryland, USA: A.O.A.C International.
6. Arévalo, F. y Quispe, A. (2008). Control and Redulation of pH in a Lactic Fermentation using calcium carbonate as a regulator and microbiota of kefir grains as biological agent. *Ciencias DES* ,1(9), 5-10.
7. Baati, L., Roux, G., Dahhou, B. y Urlbelarrea, J. (2004). Unstructured modeling growth of *Lactobacillus acidophilus* as a function of temperature. *Journal of Pharmacy research*, 65 (12), 137-145.
8. Bajaj, M., Winter J. y Gallert C. (2011) Effect of deproteination and deacetylation conditions viscosity of chitin and chitosan extracted from Crangon crangon shrimp waste. *Biochemical Engineering Journal*, 2(56), 51- 62.

9. Banco central del ecuador (2015). Base de datos estadístico de Comercio Exterior. Recuperado de [http://www.portal.bce.fin.ec/vto_bueno/seguridad/ ComercioExteriorEst.jsp](http://www.portal.bce.fin.ec/vto_bueno/seguridad/ComercioExteriorEst.jsp), (Mayo, 2015), p.3.
10. Bhaskar, N, Suresh, P, Sakhare, P. y Sachindra, N. (2007). Shrimp biowaste fermentation with *Pediococcus acidolactici* CFR2182: Optimization of fermentation conditions by response surface methodology and effect of optimized condition on deproteination / demineralization and carotenoid recovery. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(1), 1 427-1 434.
11. Bonilla, M., Escobar, C. y Marín, R. (2009). Obtención de ácido láctico por fermentación con *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*. *Revista colombiana de ciencias químico – farmacéuticas*, 1(23), 18-24.
12. Boyle, R., Robins –Browne, R. y Tang, M. (2006). Probiotic use clinical practice: what are the risk. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83(6), 1 256-1 264.
13. Briceño, J. y Morillo, N. (2008). Recuperación de quitina a partir de los residuos sólidos generados del procesamiento industrial de crustáceo. *Instituto Nacional de Investigaciones Agrícola*, 20 (3), 1-10.
14. Cahú, T., Santos, S., Mendes, A., Córdula, C., Chavante, S., Carvalho, L., & Bezerra, R. (2012). Recovery of protein, chitin, carotenoids and glycosaminoglycans from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste. *Process Biochemistry*, 47(4), 570-577.
15. Calderón, B., Martínez, A., Sánchez, M., y Zulatto, A. (2013). Formulation and optimization of an economic broth culture for *Lactobacillus* with probiotic potential isolated from pulque. *Revista Universidad Simón Bolívar*, 69(2), 135.

16. Chávez, R. y López, M. (2010). Factibilidad técnica para el aprovechamiento integral del camarón de la especie *Penaeus Vannamei*. Recuperado de <https://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/11339>. (Mayo 2015).
17. Cira, L., Huerta, S., Hall, G. y Shirai, K. (2010). Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp waste for chitin recovery. *Process Biochemistry*, 37(1), 1 359-1 366.
18. Cocolletzi, H., Águila, E., Flores, O., Viveros, E. y Ramos, E. (2009), Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficies y Materiales, 22(3), 57-60.
19. Colina, M., Ayala, A., Rincón, D; Molina, J., Medina, J., Ynciarte, R., Vargas, J. y Montilla, B. (2014). Evaluación de los procesos para la obtención química de quitina y quitosano a partir de los desechos de cangrejo. Escala piloto e Industrial. *Revista Iberoamericana de polímeros*, 15(1), 21-43.
20. Departamento de pesca y acuicultura (2015). Visión general del sector acuícola nacional Ecuador. Recuperado: http://www.fao.org/fishery/country-sector/naso_ecuador/es#tcN70085. (Diciembre 2015), p5.
21. Escorcia, D., Hernández, D., Sánchez, M., Benavente, M. (2009). Diseño y montaje de una planta piloto para la extracción de quitina y proteína. *Revista Científica*, 22(2), 45-55.
22. FAO (2015). Cambios en la calidad y duración en almacén del pescado enfriado. Recuperado: <http://www.fao.org/docrep/v7180s/v7180s07.htm>. (Diciembre 2015), p.6.
23. Flores, B., Arias, L., Gómez, J., Castillo, A., Gimeno, M., Shirai, K. (2012). Chitin and L(+)-lactic acid production from crab (*Callinectes*

- bellicosus*) wastes by fermentation of *Lactobacillus sp. B2* using sugar cane molasses as carbon source. *Bioprocess Biosyst Eng*, 35(7), 1 193-1 200.
24. Friedman, M. y Gaden, E. (2007). Growth and Acid Production by *Lactobacillus* (L.) *delbrueckii* in a Dialysis Culture System. *Biotechnology and Bioengineering*, 12 (1), 961-974.
 25. García, C., Arrázola, G. y Durango, A. (2010). Biotechnological production of Lactic Acid. *Journal Food*, 1(1), 1-18.
 26. Gil –Horán, R.; Dominguéz – Espinosa, R.; Pacho –Carrillo, J. (2008). Lactic acid bioproduction from orange rind: separation and purification processes. *Tecnology Ciencia*, 23(2), 79-80.
 27. Guzmán, G., García, A. y Larios, E. (2013). Determinación de azúcares reductores método DNS. *Journal of Pharmacy research*. 20(53), 2886-2891.
 28. Gupta, S., Abu-Ghannam, N. y Scannell, A. (2010). Growth and kinetics of *Lactobacillus plantarum* y *L. casei*. *Cienc. Tecnol. Aliment*, 6(2), 152-157.
 29. Haddar, A., Hmidet, N., Ghorbel, O., Frkhfakh. N., Sellami, A. y Narsi, M. (2010). Alkaline Proteases produced by *Bacillus Licheniformis* RP1 grown on shrimp wastes: application in chitin extraction, chicken feather-degradation and as dehairing agent. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 16(1), 669-678.
 30. Harish, K. y Tharanathan, R., (2007). Chitin/Chitosan: modifications and their unlimited application potential an overview. *Food science & Technology*, 18 (1), 117-131.
 31. Healy, M., Green, A. y Healy. A., (2003). Bioprocessing of Marine Crustacean Shell Waste. *Acta Biotechnol*, 23 (2), 151-160.

32. Hernández, A., Alfaro, I., Arrieta, R. (2003). *Microbiología Industrial*. (1ra. ed.). Costa Rica, Costa Rica: Editorial EUNED.
33. Hernández, C., Varo-Arguello W., Leyva-Reyes N., Ramírez-Barragán C, Delgado-Fornué E. y Andrade-Ortega J. (2008). Utilización de residuos de camarón para la obtención de quitina blanqueada propuesta de una metodología a base de tratamientos alcalino-ácidos y ozono. *Avances en la investigación científica en el CUCBA*. 1(1), 659-669. Recuperado de [http://www.cucba.udg.mx/sites/default/files/publicaciones1/avances/avances2008/Otrasinstituciones/Hernandez-Nunez CarlosManuel\(pp659-666\)/659-666.pdf](http://www.cucba.udg.mx/sites/default/files/publicaciones1/avances/avances2008/Otrasinstituciones/Hernandez-Nunez%20CarlosManuel(pp659-666)/659-666.pdf). (Junio 2015).
34. Jung, W., Jo, H., Kuk, J y Kim, K. (2006). Extraction of chitin from red crab shell waste by cofermentation with *Lactobacillus paracasei* subsp. tolerant KCTC – 3074 and *Serratia marcescens* FS – 3. *Applied microbiology and biotechnology*. 71(2), 2 34-2 37.
35. Kamala, K., Sivaperumal, P. y Rajaram, R. (2013). Extraction and characterization of water soluble chitosan from parapeneopsis stylifera shrimp shell waste and its antibacterial activity. *International Journal of Scientific and Research Publications*. 3(4), 1-8.
36. Keiro, C., (2010). *Tratamiento microbiológico de residuos de camarón para obtención de quitina y astaxantina*. (Proyecto de Titulación previo al obtención del título de maestría no publicado). Universidad de Veracruz, Veracruz, México).
37. Khanafari, A., Marandi, R., Sanatei, S. (2013). Recovery of chitin and chitosan from shrimp waste by chemical and microbial methods. *J. Environ Health Sci. Eng.* 5(1), 19-24.
38. Kurita, K., (2006). Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans. *Marine Biotechnology*, 8(3), 203-226.

39. Lárez.C. (2003). Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Iberoamericana de Polímeros*, 4(2), 91-109.
40. López, A., Rivas, J., Loaiza, M. y Sabino, M. (2010). Degradación de películas plastificadas de quitosano a partir de conchas de camarón. *Revista de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Central de Venezuela*, 25(2), 133-143.
41. Luna, Y. (2012). *Obtención de quitosano a partir de quitina para su empleo en conservación de frutillas y moras*. (Trabajo de graduación para la obtención del título de Ingeniero Químico). Recuperado del Repositorio de la Universidad Central del Ecuador. (25000/427).
42. Madrid, A., Madrid, J. (2001). Nuevo manual de industrias alimentarias. Microbiología de los alimentos. (3ra. ed.). Madrid, España: Mindi-Prensa Libros, S.A.
43. Minami, S., Raj, K. D., Miytake, K., Okamoto, Y., Tanioka, S., Sasai, S., y Shigemasa, Y. (2001). Biological Effect of Chitosan-Lactose Mixture and it's Clinical Application. *Chitin and chitosan research*, 7(3), 268-272.
44. Merzendorfer, H. y Zimoch, L. (2003). Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *The Journal of Experimental Biology*, 20(6), 4393-4396.
45. Ming – Tsung. Y., Joan-Hwan. Y. y Leun. M. 2009. Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. *Journal ScienceDirect*. 72(1), 15-21.
46. Minor-Perez, H., Ponce-Alquicira, E., Marcias-Bravo, S., y Guerrero-Legarrete, I. (2002). Conservación de la carne fresca de cerdo por fermentación láctica: efecto sobre el color, la textura y la formación de

los ácidos grasos libres. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 1(1), 73-80.

47. Morillo, N., Montiel, N., Belandria, J., y Mújica, F. (2006). Caracterización proximal de los desechos del procesamiento de los crustáceos (cangrejo y camarón) en el estado Zulia. *Veterinaria Trop*, 31(2), 71-83.
48. Morrey, A. y Quinde, A. (2012). *Obtención de quitosano y su aplicación en recubrimientos comestibles en mezcla con Almidón*. Proyecto de titulación previo a la obtención del título de Ingeniera Química). Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador.
49. Okpokwasili, G. y Nwekw, C. (2005). Microbial growth and substrate utilization kinetic. *African Journal of Biotechnology*, 5(4), 305-317.
50. Orozco, M. y Solarte, J. (2003). *Búsqueda del mejor medio de cultivo y modelamiento cinético para la obtención del ácido láctico a partir de glucosa por vía fermentativa*. (Proyecto de titulación previo a la obtención del título de Ingeniera Química). Universidad nacional de Colombia. Manizales. Colombia.
51. Parra, R. (2010). Review Bacterias Acido Lácticas: Papel Funcional en los alimentos. *Ciencias Agropecuarias*, 8(1), 1-13.
52. Pillai, C., Paul, W. y Sharma, C. (2009). Chitin and chitosan polymers: chemistry solubility and fiber formation. *Progress in polymer science*, 34(1), 641-678.
53. Prada, Y., Romero, M., Díaz, P., Molina, D., Guzmán, C. (2012). Lactic Acid production by *Lactobacillus sp.* from biodiesel derived raw glycerol, 5(1), 57-66.
54. Prameela, K., Murali, Ch. y Hemalatha, K. (2010). Optimization of fermentation of shrimp biowaste under different carbon sources for

recovery of chitin and carotenoids by using Lactic acid bacteria. *Journal of Pharmacy research*, 3(12), 2 888-2 889.

55. Prescott, L., Harley, J., Klein, D. (2004). Microbiología. (5ta. ed.). Madrid, España: McGRAW-HILL- HILL-Interamericana de España.
56. Rinaudo, M. (2006). Quitina y Quitosano propiedades, aplicaciones. *Artículo en prensa*, 31 (1), 603-632.
57. Rivera, R. (2005). Amoniaco en estanques de producción camaronera. Birmingham Publishing Co, 1(1), 482.
58. Rodríguez, A., Ramírez, M., Rivero, D., Bosquez, E., Barrera, L. y Bautista, S., (2009). Propiedades químico-estructurales y actividad biológica de la quitosana en microorganismos fitopatógenos. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 15(3), 307-317.
59. Rodríguez, E., Gamboa, M, Hernández, F y García, J. (2005). Bacteriología General principios y prácticas de laboratorio. (1ra.ed.). Costa Rica, Costa Rica: Universidad de Costa Rica.
60. Sánchez, I., Martín, L., Gracia, Y., Abad, Z., Franco, R., Ramírez, Y., Zamora, J., Basulto, R., Moreira, A., Arenal, A. (2013). Efecto de *Lactobacillus sp.* Aislado de col fermentada, sobre el peso y los marcadores inmunológicos del camarón blanco *Litopenaeus Vannamei*. *Revista Salud Anim*, 35(2), 94-102.
61. Serna, L. y Rodríguez, A. (2005). Producción Biotecnológica de Ácido Láctico: Estado del arte. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5(1), 54-65.
62. Shahidi, F. y Synowiecki, J. (2005). 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), 1 527-1 532.

63. Shirai, K. (2011). Nuevos procesos biotecnológicos para la obtención de quitina y quitosano. *ScienceDirect*. 1(1). Recuperado de: <http://www.vinculacion.uam.mx/pdf/quitosano.pdf>. (Febrero 2016).
64. Sorokulova, I., Krumnow, A., Globa, L. y Vodyanoy, V. (2009). Efficient decomposition of shrimp shell waste using *Bacillus cereus* and *Exigobacterium acetylicum*. *J and Microbiol Biotechnol*. 36(1), 1123-1126.
65. Suárez, Y., Almirall, I., González, H., Bilbao, O. y Nieto, O. (2000). Metodología de la estabilidad química en formulaciones de quitina. *Revista Cubana Farm*, 34(1), 8-12.
66. Synowiecki J., Al-Khateeb N. (2003). Production, properties and some new applications of chitin and its derivatives. *Critical Reviews in food Science and nutrition*, 43(2), 145-171.
67. Tortora, G., Funke, B., Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología*. (9a ed.). Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana
68. Urzagastu, H., Gonzales, I., Ramos, L. (2003). Determinación del porcentaje de proteína soluble en agua (Método Biuret) en semillas de Quinoa, Taiwi y Carne de pollo. *J. Biol. Chem*, 1(1), 751-766.
69. Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N., Ludwig, W., Rainey, F., Whitman, W. (2011). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. (2da). New York, USA: Editorial Board.
70. Woese, Carl. (2006). How we do, do not and should look at Bacteria and Bacteriology. *Springer Science and Business Media*, 1(3), 3-23.

ANEXOS

ANEXO I

CONTAJE DIRECTO AL MICROSCOPIO

Para determinar el número de microorganismos por mililitro, Rodríguez et al, (2005), recomienda el conteo directo al microscopio con una cámara NEUBAUER BRIGHT LINE que tiene una lámina cuadrículada como se observa en la figura Al.1 (p. 475).

Para el conteo de microorganismos es necesario tomar una muestra en cantidad de microlitros (μl) que se deposita en el centro de la figura Al.1 sección B, sobre la muestra se coloca el cubre objetos y de -manera distribuye de manera uniforme la muestra.

En un microscopio OLIMPUS HC2 se enfoca a un tamaño de 100 X, luego de colocar la cámara NEUBAUER BRIGHT LINE, por medio de los oculares del microscopio se observa una cuadrícula como la que se muestra en la sección C de la figura Al.1 se escogerá 5 distintos campos para realizar el conteo de microorganismos cada hora por 11 horas.

Se realizan diluciones a la muestra, cuando los microorganismos se encuentra muy unidos y no se puede realizar el conteo, estas diluciones son (1:4, 1:6, 1:8, 1:10; 1:20, 1:30, 1:40, 1:50) a partir de la cuanta hora.

Con los datos recopilados se conocerá el número total de microorganismos por mililitro al emplear la fórmula el volumen en ml se calcula con profundidad de 0,1 mm que viene inscrito en la cámara y el área se calcula al conocer el valor de lado de 0,05 mm (Rodríguez et.al., 2005, p. 744).

Nt= Número total de microorganismos.

CC= Número de cuadrados contados.

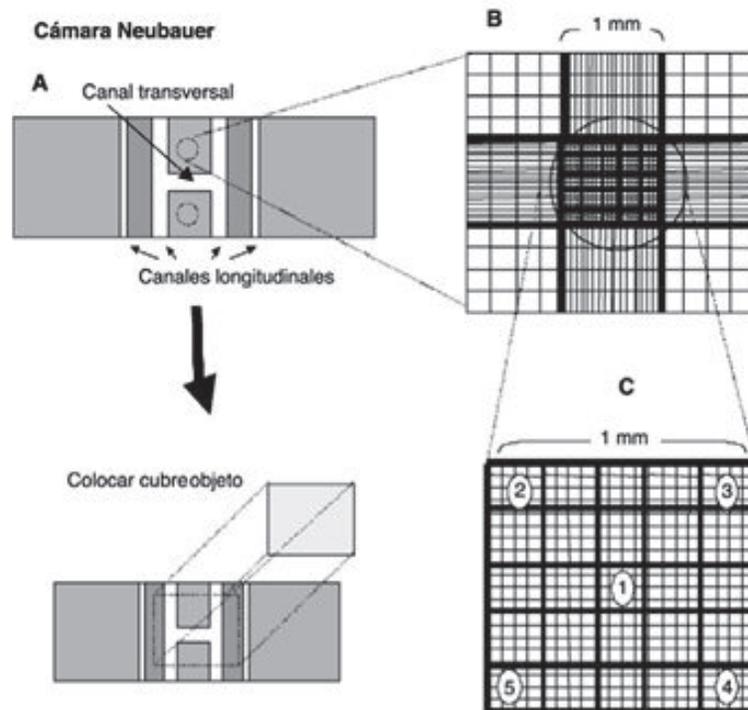


Figura AI.1. Cámara NEUBAUER BRIGHT LINE para el contaje directo al microscopio
(Rodríguez et.al, 2005, p.174)

ANEXO II

DETERMINACIÓN DE ACIDEZ TOTAL TITULABLE

Para determinar la Acidez total titulable por el método A.O.A.C 937.05, (1997), se requiere preparar una solución 0,1 N NaOH, la solución indicadora (0,5 g de fenolftaleína en 100 ml de alcohol etílico de 95 % v/v), y se usó un pHmetro WTW PH 3210.

A continuación se muestra el procedimiento para determinar ATT:

Tomar 1 ml de la muestra en un vaso de precipitación de 50 ml, mezclar con 25 ml de agua destilada, añadir 3 a 4 gotas del indicador.

Al titular se agrega gota a gota la solución de NaOH 1N hasta que la apariencia de la muestra sea rosada y perdure por más de 30 s, tomar el valor de sosa empleado en la titulación.

La cantidad de ATT en g/L se calcula con la ecuación [AII.1]

$$ATT = \frac{PM \cdot N \cdot Vg}{Vm} \quad [AII.1]$$

ATT =Acidez titulable en gramos por litro

Vg= Volumen gastado de la solución de hidróxido de sodio 1N

N= Normalidad del hidróxido de sodio

PM= Peso molecular del ácido de referencia

Vm= Volumen de la muestra tomada para el análisis

ANEXO III

DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

Para determinar los azúcares reductores se usa el método DNS, para esto se requiere prepara el reactivo Ácido 3,5 dinitrosalicílico, hacer una curva de calibración con una solución de glucosa (Guzmán, García y Larios, 2013, p.2886-2891).

En la Tabla AIII.1. se muestra las cantidades para preparar el reactivo DNS, una vez se finaliza la preparación se almacena en un frasco ámbar a 4 °C (Guzmán et al., 2013, pp.2886-2891).

Tabla AIII.1. Cantidades para la preparación del reactivo DNS

Reactivo	Cantidad (g)
NaOH	1,6
Tartrato de sodio y potasio	30
Ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS)	1
Agua destilada	100

(Guzmán, 2013, p. 20)

Disolver con 50 ml de agua destilada 1,6 g de NaOH en un balón aforado de 100 ml, con agitación constante, se agregó 30 g de tartrato de sodio y potasio hasta disolverlo por completo y se poco a poco se agregó el 1g de DNS hasta que se torne de color naranja si queda pequeños brumos del reactivo se centrifuga, y se afora con agua destilada hasta 100 ml, todo el proceso se realiza a temperatura ambiente.

Para construir la curva de calibración se prepara la solución patrón 1 gramo de glucosa en 1 litro de agua destilada, y realizar las siguientes diluciones, junto con el reactivo DNS que se muestra en la Tabla AIII.2, se realiza las lecturas de absorción a una longitud de onda de $\lambda=540$ nm en el espectrofotómetro THERMO SPECTRONIC GENESYS20400 (Guzmán et al., 2013, pp. 2 886-2 891).

Al obtener los datos de absorbancia se realiza la gráfica mg de glucosa vs absorbancia, para establecer la línea de tendencia con un $r^2 = 0,9964$ y la ecuación de la recta que se encuentra en la figura AIII.1

Tabla AIII.2. Curva de calibración de glucosa

Tubo	Glucosa (mg)	Glucosa μL s/n estándar (4g/L)	Agua (μL)	DNS (μL)	λ
1 B	0	0	500	500	0
2 S	0,1	25	475	500	0,088
3 S	0,2	50	450	500	0,200
4 S	0,3	75	425	500	0,309
5 S	0,4	100	400	500	0,398
6 S	0,5	125	375	500	0,492
7 S	0,6	150	350	500	0,629
8 S	0,7	175	325	500	0,735
9 S	0,8	200	300	500	0,929
10 S	0,9	225	275	500	0,942
11 S	1	250	250	500	1,044
12 S	1,1	275	225	500	1,179
13 S	1,2	300	200	500	1,373
14 S	1,3	325	175	500	1,376
15 S	1,4	350	150	500	1,569
16 S	1,5	375	125	500	1,668
17 S	1,6	400	100	500	1,767

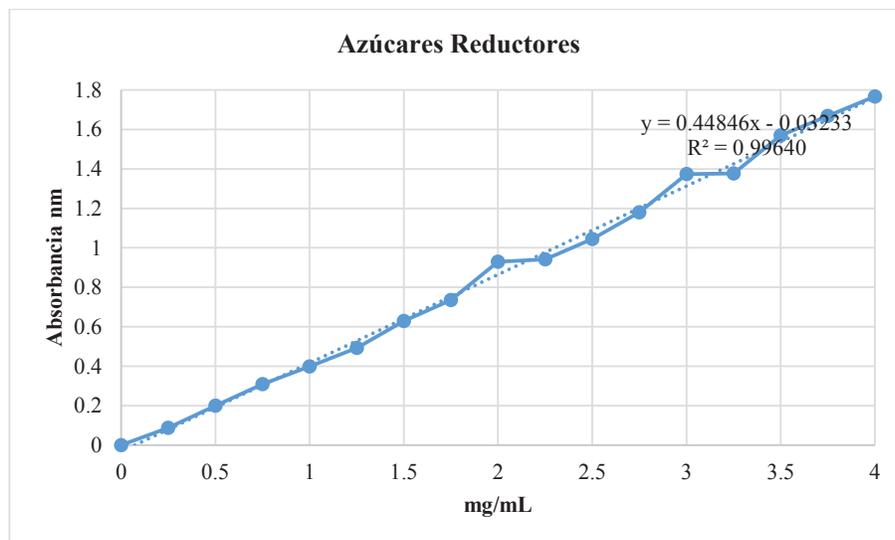


Figura AIII.1. Curva de calibración de la glucosa

Preparación de la muestra

Tomar 1 ml de la muestra que se requiere determinar la concentración de azúcares reductores, y colocar en los tubos eppendorf para centrifugar a 1200 rpm durante 7 min en la MICROCENTRÍFUGA FISHER D-37520 a 1200 rpm. Al finalizar la centrifugación se toma 0,5 ml del sobrenadante y se adiciona 0,5 ml de la solución DNS y llevar a ebullición por 10 min para que se dé la reacción con DNS.

Posteriormente al enfriar los tubos se adiciona agua destilada en una relación 5:1, es decir 5mL de agua por cada ml de solución (muestra+DNS) para detener la reacción, la presencia de azúcares reductores se puede evidenciar por el cambio de color amarillo a naranja o rojo ladrillo, La intensidad del color está relacionada con la concentración de azúcares reductores en la muestra.

Se procede a medir la absorbancia en un espectro a una $\lambda=540$ nm en un espectrofotómetro uv-vis LABOMED (Morrey y Quinde, 2012, pp. 25-26).

ANEXO IV

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE (método biuret)

Para cuantificar la proteína soluble se requiere prepara una solución de NaCl al 1 %, el reactivo de biuret, realizar una curva de calibración, y una solución estándar de caseína. Las cantidades para la preparación del reactivo de biuret se presentan en la Tabla AIV.1.

Tabla AIV.1. Cantidades para la preparación del reactivo de biuret

Reactivo	Cantidad
Sulfato de cobre II	1,5 g
Tartrato de sodio y potasio	6,0 g
Agua Destilada	500 mL
NaOH 10 %	300 mL
KI	1 g

(Urzagastu, 2003, pp. 751-766)

Se mezcló 1,5 g de CuSO_4 , con 6,0 g de tartrato de sodio y potasio en 500 mL de agua destilada hasta su completa dilución, luego se adiciona los 300 mL de NaOH al 10 % con 1 g de KI y se aforo a 1L con agua destilada, al ser un reactivo sensible a la luz se conserva en un frasco ámbar en refrigeración.

Para preparar el estándar de caseína se requiere 200 mg de caseína patrón con 30 ml de una solución de NaCl al 1 % que al mezclarse tienen una apariencia blanquecina. Posteriormente se agrega gota a gota 10 ml de NaOH al 40 % hasta que la solución se vuelve transparente y se afora a 50 ml con agua destilada.

Una vez preparada la solución de caseína, el reactivo de biuret y una solución NaCl al 1 %, se adiciona en 8 tubos de ensayo las cantidades que se muestra en la Tabla All.4, se deja reposar por 30 min en la oscuridad los tubos con la solución para que se desarrolle por completo el color, medir la absorbancia en el espectrofotómetro LABOMED a $\lambda=540$ nm, con estos datos se realiza la curva de calibración que se

muestra en la figura AIV.1, para determinar la ecuación de la recta y su correlación de $r = 0,9984$.

Tabla AIV.2 Curva de calibración de proteína

Tubo	Muestra mL (caseína)	NaCl 1 % (mL)	Biuret (mL)	Proteína (mg)	Λ	Proteína (mg/ml)
1	0	6	4	0	0	0,00
2	0,25	5,75	4	1	0,022	0,57
3	0,5	5,5	4	2	0,043	1,14
4	0,75	5,25	4	3	0,063	1,71
5	1	5	4	4	0,088	2,29
6	1,25	4,75	4	5	0,109	2,86
7	1,50	4,50	4	6	0,127	3,43
8	1,75	4,25	4	7	0,145	4

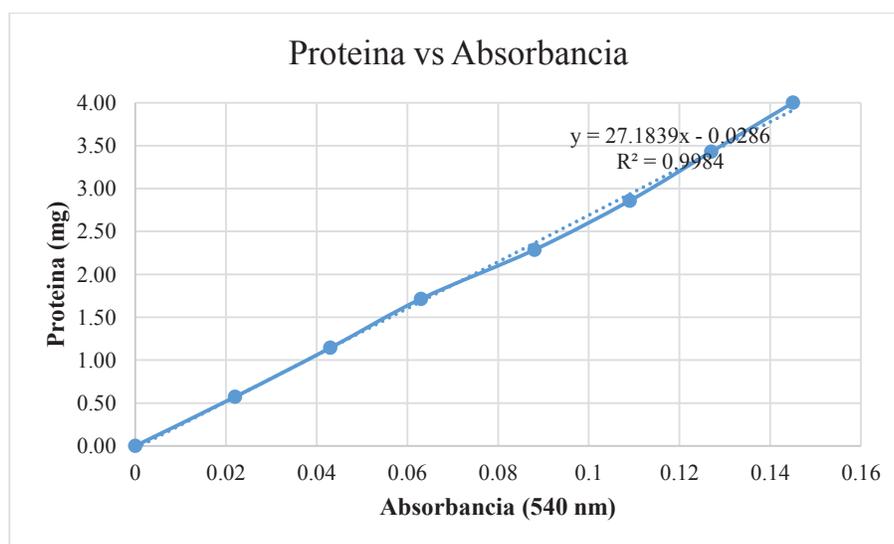


Figura AIV.1. Curva de calibración de la proteína

ANEXO V

DETERMINACIÓN DE CENIZA A.O.A.C 923.23

- Tarar los crisoles en una estufa a 100 °C por 1 hora
- Pesar los crisoles vacíos con tapa
- Pesar el crisol más la muestra
- Colocar las muestras en la estufa para eliminar la humedad, por 4 horas.
- Volver a pesar la muestra hasta que el peso sea constante.
- Colocar la muestra en la mufla a 750 °C por 4 horas
- Enfriar las muestras en el desecador por 1 hora
- Pesar la muestra y realizar el cálculo de % de cenizas por diferencia de pesos, de la ecuación AV.1

$$\% \text{ Cenizas totales} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \quad [\text{AV.1}]$$

M2 = masa en gramos capsula + ceniza

M1 = masa en gramos de la capsula con la muestra

M0 = masa en gramos de la capsula vacía

ANEXO VI

PORCENTAJE DE AMONIO NO-IONIZADO

Los porcentajes de No-Ionizados de amoniaco aumentan con el incremento de la temperatura y el pH como lo vemos en la Tabla AIII.1

Tabla AVI.1. Porcentaje Amonio No-Ionizado con diferentes pH y temperatura

pH	Temperatura °C								
	16	18	20	22	24	26	28	30	32
7,0	0,30	0,34	0,40	0,46	0,52	0,60	0,70	0,81	0,95
7,2	0,47	0,54	0,63	0,72	0,82	0,95	1,10	1,27	1,50
7,6	0,74	0,86	0,99	1,14	1,30	1,50	1,73	2,00	2,36
7,8	1,17	1,35	1,58	1,79	2,05	2,35	2,72	3,13	3,69
8,0	2,88	3,32	1,83	4,37	4,99	5,71	6,55	7,52	8,77
8,2	4,49	5,16	5,94	6,76	7,68	8,75	10,00	11,41	13,22
8,4	6,39	7,94	9,09	10,30	11,64	13,20	14,98	16,96	19,46
8,6	10,56	12,03	13,68	15,40	17,28	19,42	21,83	24,45	27,68
8,8	15,76	17,82	20,08	22,38	24,88	27,64	30,68	33,90	37,76
9,0	22,87	25,57	28,47	31,37	34,42	37,71	41,23	44,84	49,02
9,2	31,97	35,25	38,69	42,01	45,41	48,96	52,65	56,30	60,38
9,4	42,68	46,32	50,00	53,45	56,86	60,33	63,79	67,12	70,72
9,6	54,14	57,77	61,31	64,54	67,63	70,67	73,63	76,39	79,29
9,8	65,17	68,43	71,53	74,25	76,81	79,25	81,57	83,68	85,85
10,0	74,78	77,46	79,92	82,05	84,00	85,82	87,52	89,05	90,58
10,2	82,45	84,48	86,32	87,87	89,92	90,56	91,75	92,80	93,84

(Rivera, 2005, p.482)

ANEXO VII

EFECTO DEL MEJOR MEDIO DE CULTIVO EN LA GENERACIÓN DEL INÓCULO

Tabla AVII.1. Concentración de microorganismos en función del tiempo para los medios ML1, ML2, ML3, a 37 °C, pH inicial 6,5, agitación 200 rpm

CONTAJE HORAS	ML1			ML3			ML2			Promedio	
	# mio/mL	# mio/mL	# mio/mL	Promedio	# mio/mL		# mio/mL				
0	13600000	14400000	10400000	12800000	12000000	9600000	10400000	5600000	6400000	5600000	5866667
1	22400000	23200000	14400000	20000000	20000000	11200000	13600000	8800000	9600000	7200000	8533333
2	50400000	54400000	65600000	56800000	25600000	16800000	14400000	15200000	14400000	10400000	13333333
3	92000000	83200000	81600000	85600000	28800000	24800000	25600000	32800000	27200000	24800000	28266667
4	182400000	169600000	182400000	178133333	31200000	32000000	32000000	76000000	76000000	72000000	74666667
5	248000000	188000000	204000000	213333333	51200000	67200000	42400000	158400000	151200000	194400000	168000000
6	414400000	420000000	352800000	395733333	54400000	72000000	51200000	218400000	184800000	218400000	207200000
7	424800000	468000000	384000000	425600000	70400000	86400000	68000000	345600000	319200000	336000000	333600000
8	448800000	475200000	403200000	442400000	76800000	96000000	84800000	545600000	520800000	421600000	496000000
9	475200000	510400000	470400000	485333333	82400000	115200000	97600000	721600000	754400000	688800000	721600000
10	484000000	528000000	496000000	502666667	116800000	120000000	104800000	775200000	816000000	938400000	843200000
11	547200000	554400000	545600000	549066667	151200000	129600000	121600000	979200000	1020000000	979200000	992800000

ANEXO VIII

EFECTO DEL PORCENTAJE DE SACAROSA TEMPERATURA Y PH DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE LA CÁSCARA DE CAMARÓN

- Tratamiento sin control de pH

Tabla AVIII.1. Datos de pH y acidez total titulable (ATT) de los tratamientos S1 y S4 con 0 % de sacarosa

Tiempo	Condiciones	0 % sacarosa a 37 °C		0 % sacarosa a 45 °C	
		S1 pH	S1 ATT (g/L)	S4 pH	S4 ATT (g/L)
0		7,19	0,36	7,256	0,1
4		7,065	0,54	7,512	0,05
8		7,086	0,54	7,315	0,01
12		7,215	0,54	7,703	0,05
24		7,067	0,54	7,885	0,02
48		7,344	0,36	7,985	0,02
72		7,51	0,36	8,021	0,02
96		7,7915	0,36	8,241	0,01
120		7,88	0,09	8,289	0,01
144		7,98	0,09	8,325	0,01

Tabla AVIII.2. Datos de pH y acide total titulable (ATT) de los tratamientos S2, S6, S3, S5, con 5 % y 10 % de sacarosa

Tiempo	5 % 37 °C		10 % 45 °C		10 % 37 °C		5 % 45 °C	
	S2 pH	S2 ATT (g/L)	S6 pH	S6 ATT (g/L)	S3 pH	S3 ATT (g/L)	S5 pH	S5 ATT (g/L)
0	7,2	0,36	7,1855	0,45	7,1705	0,36	7,2625	0,36
4	6,828	0,54	6,1265	0,9	6,525	0,585	6,8345	0,54
8	6,3645	0,54	5,796	1,17	6,2035	0,765	6,314	0,9
12	6,0845	0,9	5,4005	3,15	5,5975	1,575	5,919	0,9
24	5,036	6,3	5,2855	3,375	4,844	9,45	5,5805	2,16
48	4,902	8,1	5,1555	4,5	4,8025	9,9	5,217	3,6
72	4,8735	8,55	5,1315	4,95	4,7105	10,8	5,098	5,85
96	4,8205	9,45	5,082	5,85	4,69	10,8	4,997	6,3
120	4,885	8,1	5,069	6,3	4,664	11,25	4,934	8,1
144	4,913	7,65	5,1035	5,4	4,6505	11,475	5,1535	5,4

Tabla AVIII.3. Concentración azúcares reductores durante el proceso de fermentación

Concentración Tiempo	S2 5 % 37 °C	S6 10 % 45 °C	S3 10 % 37 °C	S5 5 % 45 °C
	(mg/ml)	(mg/ml)	(mg/ml)	(mg/ml)
0	1,29621371	0,09209294	1,09329706	0,15675869
4	0,81233555	0,12331089	1,24046738	0,25264238
8	0,50015609	0,14114971	1,4634527	0,23926326
12	0,6094189	0,94947152	1,72434554	0,22142443
24	1,5303483	2,02537573	2,80359452	0,3373768
48	1,64407082	1,82691879	3,09793516	0,59603978
72	1,95736521	2,06774294	3,16929046	1,22262855
96	5,57084244	4,59193685	7,4528386	1,70427686
120	1,78901128	5,01560897	7,56656112	2,27065959
144	1,26276591	6,01792802	8,96913883	2,56723008

- **Tratamiento con control de pH**

Tabla AVIII.4. Datos de pH y ATT de los tratamientos S3, S7, S9, S5, S11, C1, con 0 %, 5 % y 10 % de sacarosa

Tiempo	10 % 37 °C		5 % 37 °C		5 % 45 °C		0 % 45 °C		10 % 45 °C		0 % 37 °C	
	S3 pH	S3 ATT (g/L)	S7 pH	S7 ATT (g/L)	S9 pH	S9 ATT (g/L)	S5 pH	S5 ATT (g/L)	S11 pH	S11 ATT (g/L)	C1 pH	C1 ATT (g/L)
0	6,00	0,72	6,000	0,9	6,000	0,9	6,005	0,9	6,000	0,9	6,000	0,9
4	5,868	0,94	5,956	0,9	5,9435	0,9	5,44	2,025	5,8265	1,035	6,000	0,9
8	5,727	1,39	5,900	1,125	5,658	1,575	5,619	1,575	5,8425	1,125	5,9585	0,9
12	5,607	2,07	5,696	1,71	5,5195	1,8	5,684	1,575	5,7675	1,35	5,483	2,475
24	5,674	1,84	5,533	1,8	5,5545	1,575	5,748	1,35	5,545	1,8	5,4985	2,25
48	5,656	2,16	5,543	1,8	5,4195	2,475	5,5535	2,025	5,5625	1,575	5,483	3,285
72	5,182	4,27	5,552	2,16	5,3015	3,375	5,7095	1,125	5,4155	2,475	5,4355	2,925
96	5,238	4,05	5,234	3,825	5,359	2,7	5,7495	1,125	5,3055	3,15	5,708	1,35
120	5,698	2,02	5,45	2,475	5,249	4,275	5,7545	1,575	5,121	5,4	5,878	1,485
144	5,121	4,95	5,266	3,15	5,3905	3,15	5,7355	1,575	5,1185	5,4	5,6405	1,35

Tabla AVIII.5. Concentración azúcares reductores con control de pH

Concentración	S3	S5	S7	S9	C1	C6
	10 % 37 °C	0 % 45 °C	5 % 37 °C	5 % 45 °C	0 % 37 °C	10 % 45 °C
Tiempo	(mg/ml)	(mg/ml)	(mg/ml)	(mg/ml)	(mg/ml)	(mg/ml)
0	1,17580163	0,6116487	1,32966151	1,91611292	0,61387861	1,28060474
4	1,4924408	0,4533291	1,8023904	2,25059091	0,88815056	1,77786202
8	1,99638764	0,9795745	1,32966151	2,56723008	0,39535299	1,78901128
12	2,40445079	0,3262275	1,8023904	2,04767426	0,32399768	1,23377782
24	3,1626009	0,3306872	1,4924408	1,87151585	0,32622753	0,46001873
48	3,34321902	1,4500735	1,42108549	0,65178611	0,4756277	1,01302234
72	4,012175	0,3663648	1,67528877	1,09775677	0,44886946	3,64870891
96	3,1626009	0,3819738	2,12125942	1,19587031	0,53360389	4,30651563
120	3,64870891	0,8658520	2,78352584	2,51148374	0,59380993	5,8874816
144	5,08250457	0,9126789	3,55282522	3,64870891	0,83909379	6,2264193

ANEXO IX

RESULTADOS DEL EFECTO DEL PORCENTAJE DE SACAROSA TEMPERATURA Y PH DESPUÉS DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN, DESPIGMENTACIÓN Y TRATAMIENTO CON SOSA.

Tabla AIX.1. Resultados de las medias de 2 repeticiones del % de reducción de Ceniza, Proteína Total, Proteína Soluble

Muestra	Tratamiento	Ceniza (%)	P. Soluble (%)	P. Total (%)
S2 5 %, 37°C, sin control pH	Inicial	0,000	0,000	0,000
	D. Fermentación	19,011	61,061	3,744
	D. Despigmentación	-4,812	75,971	33,040
	D. NaOH	98,761	83,071	40,308
S3 10 %, 37°C, sin control pH	Inicial	0,000	0,000	0,000
	D. Fermentación	24,599	74,487	23,465
	D. Despigmentación	-3,971	91,709	43,202
	D. NaOH	98,455	100,109	55,263
S5 5 %, 45 °C, sin control pH	Inicial	0,000	0,000	0,000
	D. Fermentación	10,720	62,136	8,589
	D. Despigmentación	-16,307	72,492	37,832
	D. NaOH	62,031	88,371	42,127
S6 10 % 45 °C, sin control pH	Inicial	0,000	0,000	0,000
	D. Fermentación	9,447	82,361	9,442
	D. Despigmentación	-25,154	94,431	48,927
	D. NaOH	43,772	99,401	51,073

Tabla AIX.1. Resultados de las medias de 2 repeticiones del % de reducción de Ceniza, Proteína Total, Proteína Soluble (**continuación...**)

C1 0 %, 37°C, con control pH	Inicial	0,000	0,000	0,000
	D. Fermentación	1,320	66,741	9,910
	D. Despigmntación	-37,824	92,301	44,369
	D. NaOH	27,196	100,111	50,000
C2 5 %, 37 °C, con control pH	Inicial	0,000	0,000	0,000
	D. Fermentación	0,814	62,136	11,818
	D. Despigmntación	-41,241	71,111	41,818
	D. NaOH	24,380	86,714	43,409
C3 10 %, 37°C, con control pH	Inicial	0,000	0,000	0,000
	D. Fermentación	13,841	82,158	9,787
	D. Despigmntación	-20,933	89,340	45,532
	D. NaOH	54,320	98,676	49,787
C5 5 %, 45°C, con control pH	Inicial	0,000	0,000	0,000
	D. Fermentación	3,512	77,203	6,653
	D. Despigmntación	-35,817	96,831	43,451
	D. NaOH	26,133	101,411	43,659

Tabla AIX.1. Resultados de las medias de 2 repeticiones del % de reducción de Ceniza, Proteína Total, Proteína Soluble (**continuación...**)

C6 10 %, 45 °C, con control pH	Inicial	0,000	0,000	0,000
	D. Fermentación	8,279	80,190	3,171
	D. Despigmntación	-33,825	88,385	41,226
	D. NaOH	32,296	101,262	44,820
C4 0 %, 45 °C, con control pH	Inicial	0,000	0,000	0,000
	D. Fermentación	0,508	69,210	11,184
	D. Despigmntación	-42,277	89,808	41,886
	D. NaOH	91,810	91,868	44,956

ANEXO X

PESO MOLECULAR DE LA QUITINA

Para determinar el peso molecular de la quitina, se realizan disoluciones a la quitina como se presenta en la Tabla AX.1, también se requiere conocer el tiempo que ha tardado en pasar la disolución por las distintas marcas de tiempo del viscosímetro capilar que están relacionados con las viscosidades del disolvente y de las disoluciones, para estimar el peso molecular del polímeros se utilizan las técnicas de viscosimetría capilar para obtener los parámetro de concentración y tiempo, a partir de información se aplica la ecuación de Mark –Hownk que se detalla a continuación: (Minami, Raj, Miytake, Okamoto, Tanioka, Sasai y Shigemasa, 2001, pp. 268-272)

$$[\eta] = kM^a \quad [2]$$

Donde

$[\eta]$ = Viscosidad Intrínseca

k y a = Constantes polímero – disolvente cte

M = Peso Molecular

Para calcular la viscosidad intrínseca para resolver la expresión de Mark –Hownk de se resuelve las siguiente ecuaciones [1,2,3,]y se gráfica $[\eta_{red}]$ vs concentraciones los resultados se muestra en la Tabla.

Expresiones de viscosidad

Intrínseca

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} [\eta_{red}] \quad [3]$$

Reducida

$$[\eta_{red}] = \frac{[\eta]_{sp}}{c} \quad [4]$$

Específica

$$[\eta]_{sp} = [\eta]_{rel} - 1 \quad [5]$$

Relativa

$$[\eta]_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{t}{t_0} \quad [6]$$

Se presenta los datos para obtener la viscosidad intrínseca de la gráfica de la muestra C7 como ejemplo de cálculo.

Tabla AX.1. Datos para la curva de viscosidad relativa vs concentraciones de las disoluciones de quitina

Ensayo	c(g/dL)	t(s)	nrel	$[\eta]_{sp}$	$[\eta]_{red}$
1	0	9,45	0	0	
2	0,202	9,85	1,04232804	0,04232804	0,14023213
3	0,399	10	1,05820106	0,05820106	0,18293217
4	0,608	10,11	1,06984127	0,06984127	0,20713899
5	0,81	10,36	1,0962963	0,0962963	0,27182962
6	1	10,52	1,11322751	0,11322751	0,30115925

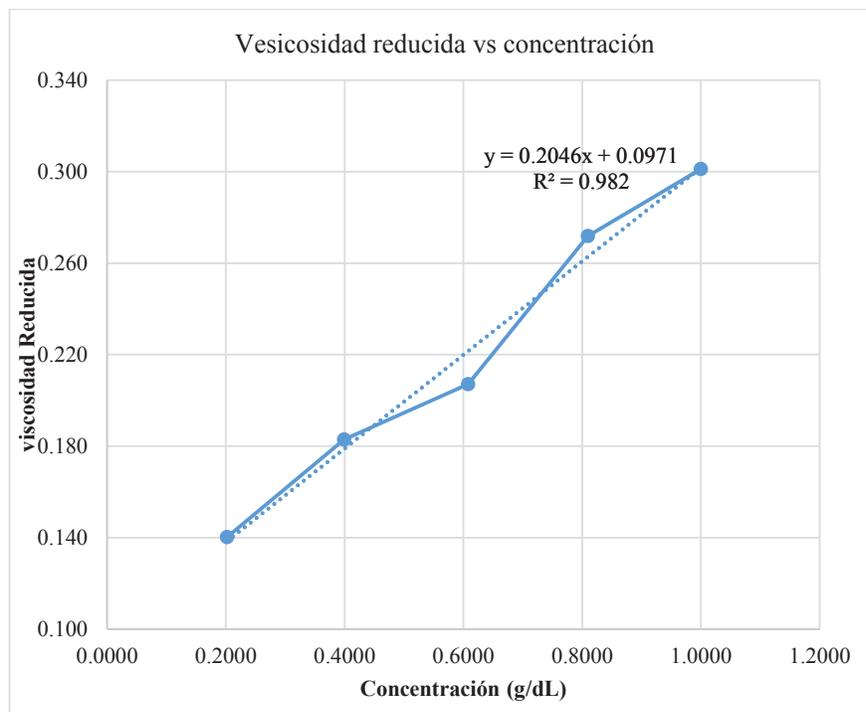


Figura XII.1. Viscosidad reducida vs la concentración de las diluciones de quitina

Con la ecuación de la recta a una correlación de $r^2 = 0,98$ se encuentra la viscosidad reducida cuando la concentración tiende a cero, con este dato se reemplaza en la ecuación [X.1] y obtenemos el peso molecular para cada muestra.

ANEXO XIII

AZÚCARES REDUCTORES DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN
SIN CONTROL DE PH

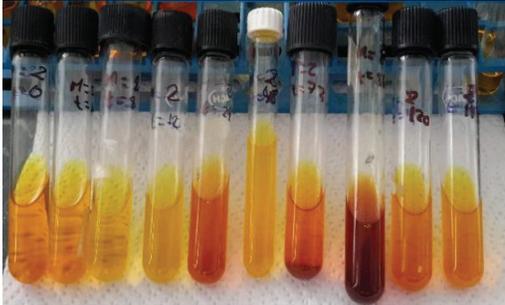
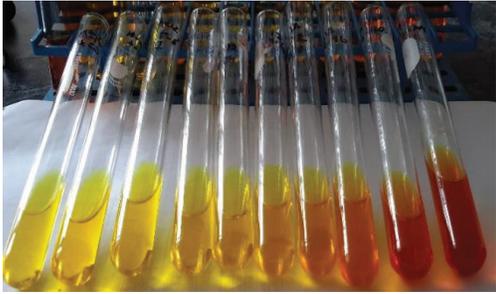
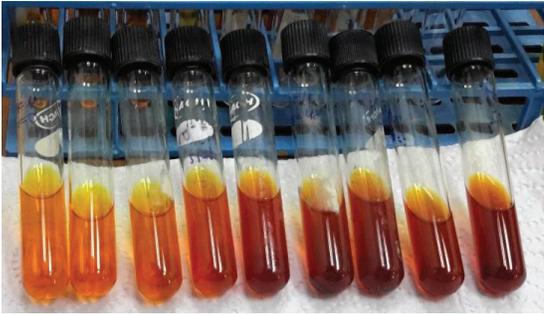
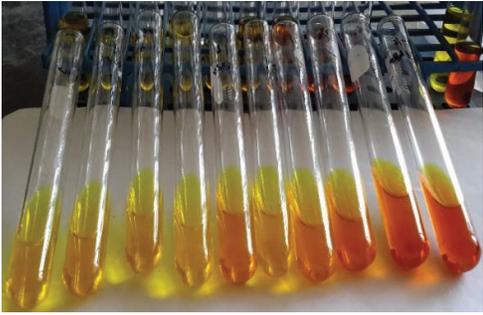
 A row of ten test tubes containing liquids of varying colors from yellow to dark red, representing different stages of fermentation for treatment S2.	 A row of ten test tubes containing liquids of varying colors from yellow to dark red, representing different stages of fermentation for treatment S5.
a) S2 5 % sacarosa 37 °C	b) S5 5 % sacarosa 45 °C
 A row of ten test tubes containing liquids of varying colors from yellow to dark red, representing different stages of fermentation for treatment S3.	 A row of ten test tubes containing liquids of varying colors from yellow to dark red, representing different stages of fermentation for treatment S6.
c) S3 10 % sacarosa 37°C	d) S6 10 % sacarosa 45 °C

Figura XII.2. Color que presenta las muestras que identifican la presencia de azúcares reductores. (Izq t=0 h hacia der.144h), de los tratamientos S2, S3, S5, S6.

ANEXO XIV

AZÚCARES REDUCTORES DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN
CON CONTROL DE PH

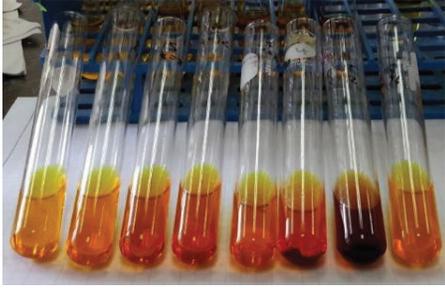
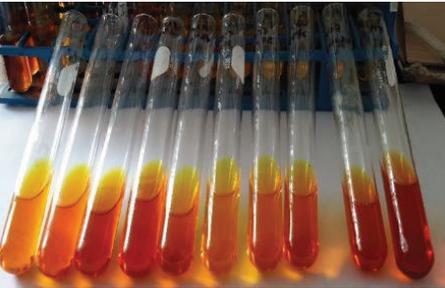
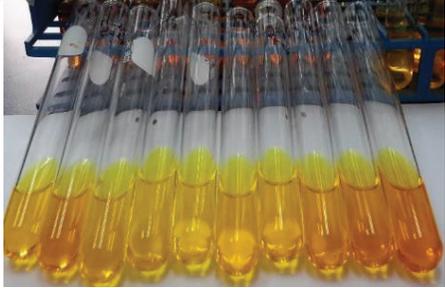
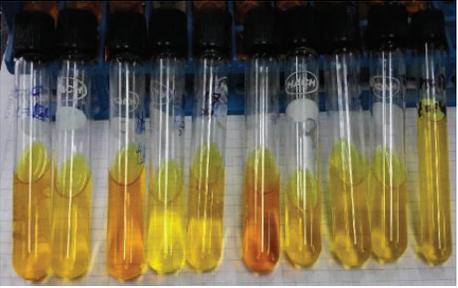
	
a) C3 10 % sacarosa 37 °C	b) C6 10 % sacarosa 45 °C
	
c) C2 5 % sacarosa 37 °C	d) C5 5 % sacarosa 45 °C
	
e) C1 0 % sacarosa 37 °C	f) C4 0 % sacarosa 45 °C

Figura XII.3. Color que presenta las muestras que identifican la presencia de azúcares reductores. (Izq t=0 h hacia der.144h), de los tratamientos C1, C2, C3, C4, C5, C6