



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Desproteínización y Descalcificación de la  
Cabeza de Camarón Vía Fermentativa con  
Bacillus Coagulans como paso para la  
obtención de Quitina.

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
INGENIERO QUÍMICO

P R E S E N T A

ISMAEL ABASOLO ESTRADA

ASESORA: DRA. ABIGAIL MARTÍNEZ ESTRADA

CO ASESOR: DR. MARTÍN ROGELIO CRUZ DÍAZ



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## AGRADECIMIENTOS

---

A la UNAM por ser una puerta abierta, para llegar a esta meta en mi vida, y por brindar esta misma oportunidad a cualquier persona que sueñe con tener un grado.

A la Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán, por que llego a ser mi segunda casa en este periodo formativo.

A mi familia por el soporte brindado, a mis papas, Lilia y Gil y a mis hermanas Abigail, y Esmeralda.

Al Doctor Martin y a la doctora Abigail, por su apoyo, asesoría y disposición para conmigo desde el inicio hasta el final de este proyecto.

A la Doctora Patricia Miranda Castro, y a la profesora María del Rosario, por su colaboración prestada, para lograr culminar con este proyecto.

Al Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec (TESE) y en especial a la Doctora Aurora, a los estudiantes de la maestría de Biotecnología, así como a Lupita, Damian, y los demás estudiantes de biorreactores por darme de su tiempo y conocimientos, para tener las bases experimentales, necesarias de bioquímica.

A Dani, por quedarse más tiempo para que pudiera acabar con la parte experimental programada, así también a las personas que conocí en el laboratorio, y me hicieron más agradable mi estancia, Gaby, Sam y los estudiantes del taller.

A la Dra. Alicia por su ayuda, durante el transcurso de la experimentación.

A mis amigos, Guadalupe Juárez, Claudia Linares, Lilia Trejo, Lupita Osorio, Eduardo Morquecho, Javier Molina, Guadalupe Osorio, Alonso Guerrero, Jessica Carrillo, Rosario Chiquito, Andrea Sánchez. Y a los demás de mi generación por Hacer de este periodo de mi vida algo que siempre recordare.

A mis profesores, por su preparación y empeño para transmitirnos, su conocimiento, Carlos Orozco, Paula Álvarez, Ismael Núñez, Lupita Franco, Miguel Ángel Vázquez, José de Jesús Pérez, Julio Morales, María de Jesús, Margarita Castillo, Dalia Bonilla, Georgina Espinoza, Ruth Martínez, Graciela Martínez, y todo los que no recuerdo en este momento pero, inspiraron el amor por la carrera.

El autor de esta tesis agradece al PROGRAMA DE APOYO A PROYECTOS PARA LA INNOVACIÓN Y MEJORAMIENTO DE LA ENSEÑANZA (PAPIME 2017) con número de proyecto PE108017 por el apoyo económico para realizar esta tesis.

## RESUMEN

---

El objetivo del presente trabajo fue realizar el proceso biotecnológico de la desproteínización y descalcificación de las cabezas de camarón limpias mediante fermentación utilizando el microorganismo *Lactobacilos sporogenes*, nombre comercial del *Bacillus coagulans*, microorganismo atípico en fermentaciones lácticas.

La fermentación de los residuos ocurrió bajo condiciones nutricionales ideales para la bacteria, así también a temperatura y agitación que favorecían el crecimiento de la cepa deseada, y nos permitiera tener una abundante cantidad de bacterias, Dicha fermentación se siguió puntualmente en el tiempo, determinando la variación y relación, de los componentes tanto en los residuos sólidos, como en el medio fermentativo, (calcio, proteínas, pH, cantidad de sustrato, biomasa.), i esto mediante análisis químicos y bioquímicos cuantitativos.

Se encontró que el microorganismo *Bacillus Coagulans*, logra efectuar la desproteínización, eficientemente cerca del 100% en condiciones de pH que van de 7.3 a 8, debido a la secreción y actividad de las proteasa (máxima de 2308 U/ml de acuerdo al estudio realizado por Nagalaksh, Rebekkah Shanthakumari y Ramesh, 2010.) en cuanto a la descalcificación, si bien existe, debido a la producción de ácido láctico (5 g/L), el grado en el que actúa, no fue posible determinarlo con precisión, incluso parece carente en comparación a la desproteínización. Finalmente se determinó un modelo matemático de utilidad en el caso de querer predecir la adaptación de la fermentación láctica como etapa, sustituyendo al proceso convencional.

# Contenido

---

OBJETIVO.....	1
HIPÓTESIS .....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES.....	3
1.1 Desechos del mar.....	3
1.2 Los polisacáridos y la quitina.....	4
1.3 Química de la quitina y el quitosano (definición y estructura química) .....	5
1.4 Estructura sólida de la quitina y el quitosano.....	6
1.5 Quitina en los crustáceos.....	8
1.6 Método químico de obtención de quitina y quitosano .....	10
1.6.1 Desmineralización química.....	10
1.6.2 Desproteínización química .....	10
1.6.3Desacetilización por hidrólisis química .....	11
1.7 Método biológico de obtención de quitina.....	13
1.7.1. Descalcificación microbiológica.....	13
1.7.2 Desproteínización microbiológica.....	14
1.8 Aplicaciones de la quitina y el quitosano.....	19
CAPÍTULO 2: METODOLOGÍA.....	21
2.1 Tamaño de partícula.....	21
2.2 Microorganismos.....	22
2.3 Curva de correlación peso seco de masa bacteriana contra absorbancia.....	22
2.4 Desproteínización y descalcificación vía fermentativa en matraces.....	25
2.5 Método de fenol-sulfúrico para determinación de glucosa.....	26
2.5.1 Seguimiento del consumo de sustrato en el tiempo de fermentación.....	27
2.6 Método de cuantificación de calcio.....	27
2.6.1Método (AOAC, 2000) para determinar el contenido de cenizas .....	27
2.7 Método de micro Kjeldahl para determinar proteína .... ¡Error! Marcador no definido.	
Capítulo 3: ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	31
3.1Análisis granulométrico.....	31
3.2 Determinación de una expresión cinética.....	32
3.3 Componentes químicos presentes en la cabeza limpia de camarón.....	40

<b>3.4 Análisis del contenido de Cenizas</b> .....	41
<b>3.5 Contenido de quitina y proteína libre en la muestra</b> .....	44
<b>Conclusiones:</b> .....	50
<b>Perspectivas:</b> .....	51
<b>Bibliografía, y Cibergrafía:</b> .....	52
<b>Anexo</b> .....	58

## OBJETIVO

---

Determinar el mayor grado de desmineralización, y desproteínización en la cabeza de camarón, mediante una fermentación láctica con el microorganismo *Bacillus coagulans* en condiciones ideales, para predecir la incursión de éste, sustituyendo o complementando al proceso químico tradicional, como una alternativa menos contaminante.

### Objetivos particulares

- a) Realizar la cinética de crecimiento de la bacteria *Bacillus coagulans* seguida puntualmente mediante diferentes métodos analíticos. (peso seco, densidad óptica, consumo de glucosa).
- b) Analizar el método fermentativo de desmineralización, determinar su eficiencia y compararlo al método químico tradicional.
- c) Encontrar si hubo desproteínización paralela debido al microorganismo y si hubo en qué grado.

## HIPÓTESIS

---

En condiciones ideales, es decir con un medio nutricionalmente rico, 37°C y 150rpm la cepa de *Bacillus coagulans*, efectuara la desproteínización del exoesqueleto del camarón debido a la producción de proteasas extracelulares, y paralelamente se llevará a cabo el proceso de descalcificación debido a la producción de ácido láctico, el cual solubiliza los minerales presentes en la cascara, ambos procesos en alto grado, dando como resultado una quitina de calidad intermedia.

## INTRODUCCIÓN

---

La quitina, muy similar a la celulosa, considerada el segundo polisacárido estructural en mayor abundancia en la naturaleza, es un copolímero no ramificado constituido por N-glucosamina (D-GlcN) y N-Acetil glucosamina (D-GlcNAc).

Existe un gran interés por este polisacárido, debido a su disponibilidad de grupos funcionales reactivos para reaccionar con las enzimas o susceptibles a modificaciones químicas, para formar estructuras con nuevas características fisicoquímicas; además, el hecho de que el quitosano su principal derivado, es una base débil soluble en soluciones ácidas diluidas que le permite convertir unidades de glucosamina (-NH<sub>2</sub>), en la forma protonada (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) soluble, dando lugar a un polícatión, y por último el hecho de no ser tóxicos y presentar compatibilidad fisiológica. Por todas estas características mencionadas, tiene utilidad en aplicaciones biomédica o la industria de alimentos, entre otras (Salazar y col.,2014).

La principal fuente de la quitina son los exoesqueletos de algunos crustáceos, principalmente del camarón, en este el contenido de quitina es alrededor de un 15-40%. Esto es de gran relevancia ya que México ocupa el noveno lugar en la producción mundial con 158,128 toneladas, aportando un 1% a la producción mundial, siendo el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), la principal especie producida por pesca (captura) y cultivo en el país. Además, el consumo per cápita de camarón en el país alcanzó la cifra de 1.7 kg en 2015, Lo anterior, nos da una idea de la cantidad de residuos generados, y que son aprovechables para la obtención de quitina (servicio de información agroalimentaria y pesquera., 2016).

En las cáscaras de camarón, las estructuras quitinosas están unidas covalentemente a proteínas a través de un aminoácido no aromático, (Moret y Moreau, 2012). Así como a minerales y otros componentes, por lo que se hace necesario su purificación antes de poderlo utilizar. En la industria esta actividad se realiza mediante procesos químicos subsecuentes; la desproteínización se lleva a cabo en medio alcalino, mientras que la desmineralización se realiza en medio ácido, produciendo grandes cantidades de residuos potencialmente contaminantes, así como un gran consumo de agua y energía.

La utilización de métodos biotecnológicos, a través de fermentación con bacterias lácticas para la descalcificación por solubilización y bacterias que producen proteasas que catalizan la desproteínización por hidrólisis, pueden ser una alternativa, al método químico tradicional. Ya que es un método más selectivo asegura una quitina de alta calidad. Además de que no utiliza grandes cantidades de energía, y los residuos son de bajo impacto ambiental.

El objetivo del presente trabajo es realizar el proceso biotecnológico de la desproteínización y descalcificación de las cabezas de camarón limpias mediante fermentación utilizando el microorganismo *Bacillus coagulans*.

La estructura de la presente tesis es la siguiente, en el capítulo uno se informa de los antecedentes de la presente investigación, en ella se reportan los estudios realizados a la fecha del proceso biotecnológico de la desproteínización y descalcificación de la cáscara de camarón, el objetivo es proporcionarle al lector los avances más sobresalientes respecto al tema de estudio. En el capítulo dos se informa sobre los métodos experimentales y teóricos que se utilizaron para alcanzar los objetivos de la presente tesis. En el capítulo tres se presentan los resultados obtenidos de la presente investigación, así como el análisis y discusión de ellos. Por último, se presentan las conclusiones más importantes obtenidas de la presente investigación y se plantean las perspectivas de trabajos futuros que pudieran dar continuidad a la presente investigación.



# CAPÍTULO 1:

## ANTECEDENTES

---

### 1.1 Desechos del mar

La producción alimenticia genera una gran cantidad de residuos, que tienen un impacto negativo hacia el medio ambiente, llegando a ser uno de los principales problemas para la industria de este giro. Sin embargo, dichos residuos pueden ser una fuente para obtener nuevos constituyentes de alto valor.

La industria procesadora de productos del mar, es un claro ejemplo de lo mencionado anteriormente, esta industria genera subproductos, tales como (cabezas, colas, pieles, escamas, vísceras y espinas dorsales). Estos desechos son una fuente rica en proteínas, lípidos, pigmentos, y otras moléculas como la quitina, que se encuentra en gran proporción en los caparazones de los crustáceos (camarón, jaiba, langosta, etc). Es bien conocido que el bio-polímero quitina se puede transformar a quitosano, el cual tiene un amplio uso en las industrias de alimentos, farmacéuticas, medicina y síntesis de biomateriales, entre otras (Hamed y col., 2015).

Se sabe que durante el desarrollo de los crustáceos, existe un ciclo, en donde la misma cutícula vieja, se degrada y se absorbe mediante la acción de numerosas enzimas para pasar a formar una nueva, esto controlado por mecanismos endócrinos, que desencadenan la renovación de la cutícula. Por ejemplo algunas enzimas se encargan de hidrolizar a las proteínas y a la quitina, y otras como la enzima anhidrasa carbónica y algunas fosfatasas, disuelven los minerales contenidos en esta (Petriella 1997).

Lo anterior nos lleva a pensar en un método de extracción de quitina, de los desechos generados de la cáscara de los crustáceos, mediante acción enzimática o bacteriana. La utilización de métodos biotecnológicos en la desmineralización, desproteínización e hidrólisis de la quitina, puede ser una alternativa para sustituir los procedimientos químicos. Además los bio-procesos son tecnologías más limpias y muy selectivas que aseguran una quitina de alta calidad (Pacheco 2010).

En la etapa de descalcificación se utilizan ácidos orgánicos, producidos por las bacterias, para solubilizar el mineral, que se encuentra presente en el desecho del camarón. La etapa de desproteínización ocurre por la acción de enzimas proteasas, producidas también por bacterias (Nagalakshmi, Rebekkah, y Ramesh, 2010).

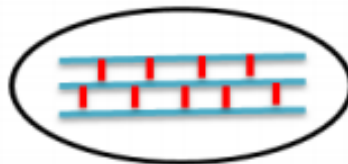
## 1.2 Los polisacáridos y la quitina

La quitina es, un polisacárido que contiene nitrógeno, (Zakaria y col.,1998). Específicamente una poli ( $\beta$ -Nacetil-glucosamina). En cuanto a los polisacáridos existen dos tipos: energéticos, y estructurales, la quitina pertenece al segundo grupo. En general hablamos de un polisacárido, cuando se tiene la unión de 10 a miles de monosacáridos, los cuales se encuentran unidos por un enlace llamado glucosídico. Para ambos tipos de polisacáridos existe una clase particular de enlace (el alfa y el beta).

Para conocer la diferencia en ambos, primero hablaremos del enlace alfa glucosídico. Lo que caracteriza a las moléculas unidas por este tipo de enlace es que les da una estructura helicoidal (como una escalera de caracol), además de que se consideran como una reserva energética, fácilmente digerible por la encima hidrolasa, la cual tenemos en el tracto digestivo, lo que le da aporte nutricional. Ejemplo de este tipo de moléculas son el almidón en los vegetales y el glucógeno presente en la carne de animales almacenados en las células. Dichos polisacáridos no son solubles con la saliva, por lo que no se perciben como dulces. ( Vázquez ,y col., 2005).

La celulosa contiene enlaces beta glucosídicos. Materiales como el algodón se compone de dicho polisacárido en un nivel muy puro. Otro ejemplo es la quitina (Del griego *tunic*, envoltura), es el segundo polisacárido estructural en mayor abundancia, se encuentra distribuida ampliamente en la naturaleza y sus fuentes principales son los exoesqueletos (caparazón) de muchos crustáceos, alas de insectos, paredes celulares de hongos, algas, etc. (Lárez, 2006). Son difícilmente digeribles, excepto por ciertas especies, ya que cuentan con las enzimas: endocelulasa y quitinasas, lo cual les permiten romper ese tipo específico de enlace.

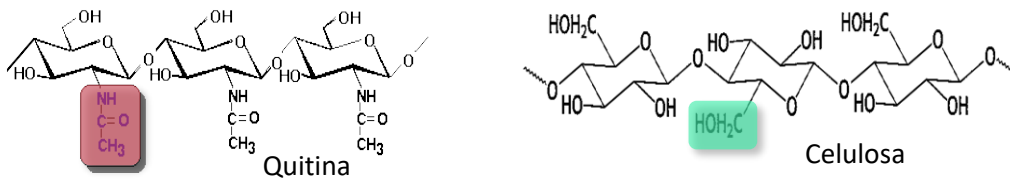
El nombre de polisacáridos estructurales, lo adquieren al tener el enlace beta glucosídico, ya que les permite que la cadena no sea helicoidal sino lineal, propiciando a su vez la formación de puentes de hidrógeno entre cadenas, debido al grupo hidroxilo, generando cadenas compactas y resistentes (ver Fig. 1.1).



**Fig.1.1** Representación estructural de la fibra celulósica unida por puentes de hidrógeno (líneas verticales) con cadenas adyacentes

### 1.3 Química de la quitina y el quitosano (definición y estructura química)

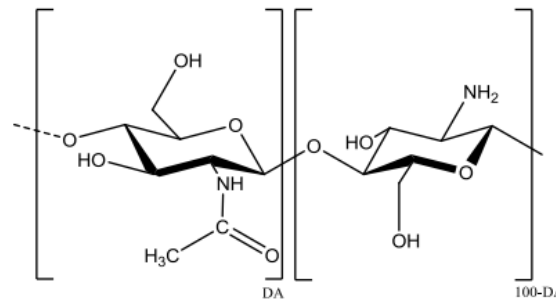
La quitina, biopolímero de origen natural, químicamente descrito como  $\beta$ -1,4-N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucosa es muy similar a la celulosa, al ser ambos polímeros de unidades de glucosa. Además en ambas se cumple que las uniones de los inter-monómeros son del tipo O-1,4. La diferencia entre estos es que el grupo hidroxilo en la segunda posición en celulosa es reemplazado en quitina por un grupo acetamido (-NHCOCH<sub>3</sub>), haciendo de la quitina un polímero de unidades de N-acetilglucosamina (ver Fig. 1.2).



**Fig. 1.2** Estructura química de la quitina y celulosa.

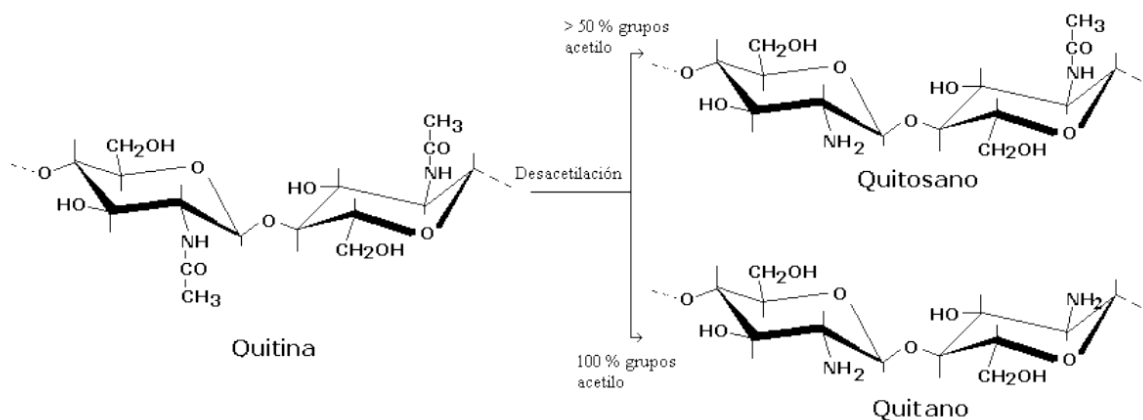
La quitina y el quitosano se pueden definir como copolímeros, no ramificados entre N-glucosamina (D-GlcN) y N-Acetil glucosamina (D-GlcNAc), respectivamente. Estos se encuentran unidos mediante un enlace  $\beta$ -1,4, lo cual a parte de una estructura lineal, les otorga rigidez; ambos monómeros se encuentran distribuidos al azar.

De hecho, no existe una nomenclatura oficial que permita diferenciar la quitina del quitosano, la única diferencia establecida es de acuerdo al porcentaje de grupos acetilados contenidos en la molécula, también llamado grado de acetilación (DA). El límite entre un biopolímero y el otro se encuentra cercano al 50% del DA; sin embargo no es hasta valores de DA menores al 40%, en que las condiciones fisicoquímicas empiezan a cambiar drásticamente; un ejemplo de ello es la solubilidad, ya que el quitosano se define como un copolímero de unidades de repetición D-GlcN y DGlcNAc soluble en soluciones acuosas ligeramente ácidas, mientras que la quitina, solo es soluble en soluciones de dimetilacetamida (DMAc) o N-metilpirolidona (NMP) conteniendo del 5 al 7 % de cloruro de litio (Vander y col., 1998), En la Figura 1.3, se muestra la representación de la estructura primaria de la quitina y el quitosano.



**Fig. 1.3** Representación de la estructura primaria de la quitina y el quitosano (Pacheco, 2010).

La fuente más importante de quitosano a nivel industrial lo constituye la quitina, la cual mediante un proceso de desacetilación química o enzimática, ha permitido producirlo a gran escala. Tras aplicar una hidrólisis a la quitina, obtenemos al quitosano, esto al elimina al menos un 50% de sus grupos acetilo, generando al (poli ( $\beta$ -N-acetil-glucosamina-co- $\beta$ -glucosamina). Cuando el grado de desacetilación alcanza el 100 % el polímero también se conoce como quitano, dicha relación se muestra en la Fig. 1.4. (Lárez 2006).



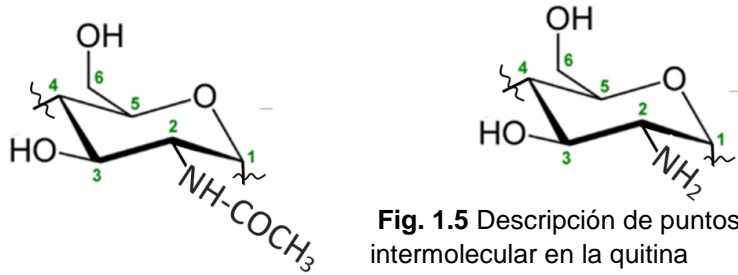
**Fig. 1.4** Relación estructural entre quitina, quitosano y quitano (Lares 2006)

Los derivados desacetilados de la quitina, contienen alrededor de 7% de nitrógeno (Zakaria y col.,1998). Además, posee una distribución regular de los grupos aminos libres, que pueden ser protonados por ciertos ácidos, cargándose positivamente, lo que le confiere un comportamiento de policación.

#### 1.4 Estructura sólida de la quitina y el quitosano.

Como ya se había mencionado al ser polisacáridos estructurales y tener una formación lineal entre sus monosacáridos, se pueden llegar a formar puentes de hidrógeno entre una molécula de polímero y otra adyacente, debido al grupo hidroxilo, amido y amino, los cuales presentan diferencias significativas de electronegatividad, propiciando este tipo de interacción intermolecular que favorece además el ordenamiento cristalino de las cadenas.

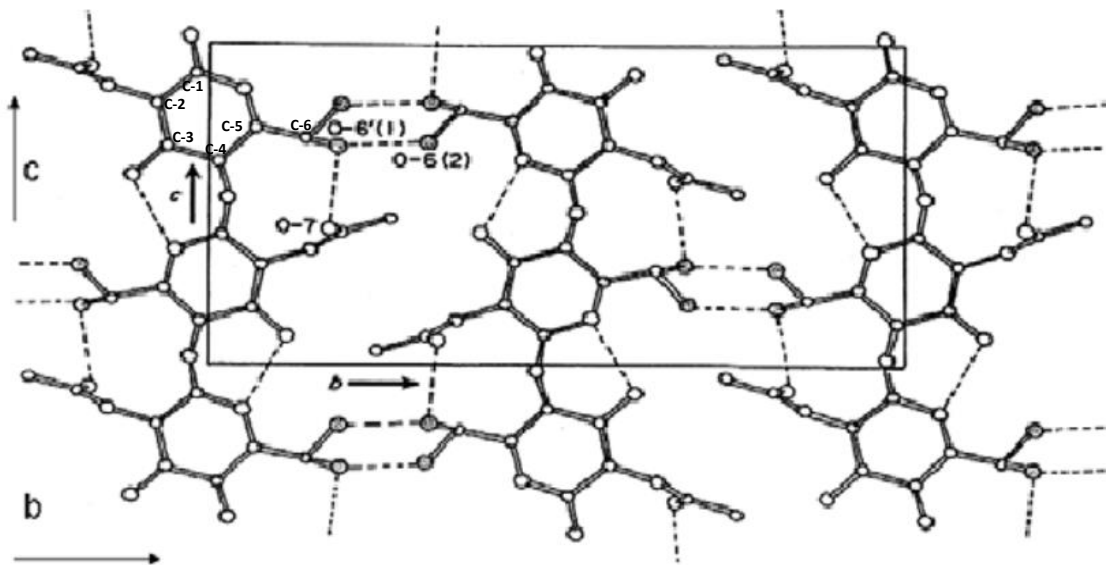
Más específicamente, podemos tener una quitina de alta cristalinidad, debido a la formación de puentes de hidrógeno entre diferentes moléculas, o debido a interacciones intermoleculares provocadas por la presencia y abundancia de grupos hidroxilo (primario en el C-6 y secundario en el C-3 y el grupo N-acetil o amino en C-2), como se representa en la Fig.1.5. (Prashanth, Tharanathan, 2007).



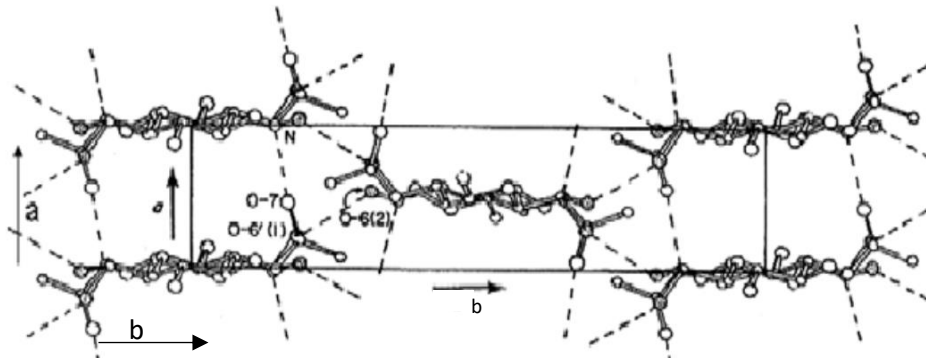
**Fig. 1.5** Descripción de puntos de interacción intermolecular en la quitina

Hablemos sobre los puentes de hidrógeno. Estos se consideran como una fuerza intermolecular, y no como un enlace, aunque se reconoce como una fuerza muy intensa, no alcanza a tener la de un enlace covalente o iónico. Estos ocurren entre un átomo electronegativo en este caso (O o N) y un hidrógeno de la molécula siguiente. En cifras tenemos que la energía promedio de un puente de hidrógeno es de 5 a 150 kJ por mol, variando la energía de interacción con el gradiente de energía del enlace covalente del donador y de la energía del aceptor.

Estudios muestran que las cadenas adyacentes tienen sentido alternado, es decir son anti paralelas. Además, existe una distribución estadística de las orientaciones de las cadenas laterales, de tal manera que todos los grupos hidroxilo forman enlaces de hidrógeno, de igual manera que los grupos (C=O y H-N), los cuales interactúan con el grupo hidroxilo del C-6 correspondiente a los anillos de azúcar vecinos, además de existir interacción entre el oxígeno del anillo y el OH del C-3, proporcionando a la estructura lineal mayor rigidez y ordenamiento (Minke y Blackwell, 1978).



**Fig. 1.6 a** Estructura cristalina de la  $\alpha$ -quitina propuesta por Minke and Blackwell, 1978. Proyección en los planos (bc).



**Fig. 1.6 b** Estructura cristalina de la  $\alpha$ -quitina propuesta por Minke and Blackwel, 1978. Proyección en los planos (ab).

### 1.5 Quitina en los crustáceos.

Los crustáceos, como los demás artrópodos, cuentan con una cubierta rígida protectora e impermeable que les sirve como punto de anclaje de los músculos del animal, de manera que actúa como esqueleto externo (exoesqueleto). Siendo de formación acelular (sin células), pasa a ser el revestimiento más externo del cuerpo y de los apéndices.

Se considera a los crustáceos como la materia prima predilecta para la producción industrial de quitina, ya que datos correspondientes al 2003, señalan una producción de 2,200 Ton. de quitina, con desechos de crustáceos como fuente principal. (Synowiecki y Al-Khateeb, 2003).

El contenido de este biopolímero en los crustáceos está en función de ciertos factores, tales como: la especie, parte del organismo del cual se extraiga, así como la nutrición. Se sabe de manera general que el contenido de quitina varía entre un 2 y 12% del peso total del crustáceo fresco. Si sólo se toma en cuenta el exoesqueleto, el contenido de quitina sería alrededor de un 15-40%, un 20-40% de proteína y entre 20-50% de carbonato de calcio, estos como constituyentes principales, ya que además contiene pigmentos y algunas sales metálicas, pero en mucho menor proporción (Pacheco 2010).

La proteína proviene del tejido conectivo, las cuales además proporcionan resistencia ante las fuerzas de compresión y tensión. El contenido de minerales en la forma de carbonato de calcio, tiene una relación directa con la edad, ya que en ejemplares más viejos presentan exoesqueletos más calcificados y pobres en quitina, también podemos encontrar lípidos provenientes de residuos de músculos y vísceras. En la Tabla 1.1 se presenta una composición química proximal en porcentaje (p/p) en base seca de diferentes exoesqueletos de crustáceos.

**Tabla 1.1** Composición química aproximada en porcentaje (p/p) en base seca del exoesqueleto de crustáceos (Cira 2000; Peniche 2006).

	Fuente de quitina	proteína	Quitina	Ceniza	Lípidos
Cangrejo	<i>Collinectes sapidus</i> (Cangrejo azul)	25.1	13.5	58.6	2.1
	<i>Chionoectes opilio</i> (cangrejo de nieve)	29.2	26.6	40.6	1.3
	<i>Paralithodes</i> <i>Camtschaticus</i> (cangrejo rey de Alaska)	22	31	46	1.0
camarón	<i>Pandalus borealis</i> (camaron boreal o nordico)	41.9	17.0	34.2	5.2
	<i>Crangon crangon</i>	40.6	17.8	27.5	9.9
	<i>Penaeus monodon</i> langostino jumbo	47.4	40.4	23.0	1.3
Langosta	<i>Procambarus</i> Clarkii	29.8	13.2	46.6	5.6
Krill	<i>Euphausia Superba</i>	41.0	24.0	23.0	11.6
Gamba		61.6	33.0	29.4	1.4

Aproximadamente entre el 30-45% del peso total de estos mariscos frescos es considerado como residuo (cáscara), y del 20 al 58% del peso seco de los residuos es quitina (Hall y col. 1998). La cual se puede extraer por métodos químicos o biológicos.

Debido a que la quitina está asociada con otros constituyentes, con incrustaciones de carbonato de calcio, proteínas, astaxantina (pigmento rojo), y residuos de lípidos (grasas), es necesario pasar por un método de purificación para eliminarlos del material quitinoso, y aprovechar estos residuos que de otro modo son tirados en vertederos.

## **1.6 Método químico de obtención de quitina y quitosano**

La obtención de este biopolímero en la industria a partir de crustáceos se lleva a cabo mediante procesos químicos subsecuentes, de desproteínización en medio alcalino, desmineralización en medio ácido y blanqueamiento, mediante agentes decolorantes. El orden de los dos primeros pasos puede variar y dependen de los subproductos que se deseen obtener (Shahidi, y col., 2005).

### **1.6.1 Desmineralización química**

La desmineralización se basa en disolver el carbonato de calcio mediante una solución acida. Para esto se emplean diferentes tipos de ácidos fuertes como: ácido clorhídrico, HCl, nítrico, HNO<sub>3</sub> o sulfúrico, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; también se han utilizado ácidos débiles como el ácido acético, CH<sub>3</sub>COOH o ácido fórmico, HCOOH. Buscando las condiciones óptimas, se han evaluado concentraciones que varían desde 0.2 hasta 6M, en un intervalo de temperaturas de -20°C a 100°C (Percot y col., 2003; Pacheco 2010).

Domard y col. (2003) encontraron una completa desmineralización de la cáscara de camarón en un tiempo de 15 minutos, utilizando una relación sólido-líquido de aproximadamente 1/40 (p/v) a temperatura ambiente con un exceso de HCl 0,25 M. Por otro lado, Sorlier y col., (2001) encontraron que utilizar ácidos inorgánicos tales como HCl en altas concentraciones y durante periodos largos de tiempo, da lugar a efectos perjudiciales, disminuyendo la masa molecular y el grado de acetilación que afectan negativamente a las propiedades intrínsecas de la quitina purificada. La comparación de diferentes quitinas (grado de acetilación, masa molecular, actividad óptica) obtenidas con cuatro ácidos diferentes mostró que la calidad del polímero variaba según el método de extracción utilizado (Arbia y col., 2013).

### **1.6.2 Desproteínización química**

En el caso del camarón, se sabe la quitina en su exoesqueleto, está asociada a diversas proteínas, tanto que estas llegan a representar entre el 17-42 % de la materia orgánica de los caparazones. (Beaney y col., 2005 ). Estudios demuestran que la mayor proporción de proteína se conforma por el tipo escleroproteínas, o proteínas fibrosas. De estas, las principales proteínas del estroma en el exoesqueleto de camarón son: artropodina, esclerotina y resilina, del grupo al cual también pertenece el colágeno, la elastina, la queratina y la fibrina (Moret y Moreau, 2012). En mucho menor cantidad, se encuentran fracciones proteicas miofibrilares, constituyentes de las células musculares, las cuales están ligadas propiamente al residuo cárnico que no fue removido durante el lavado del exoesqueleto de camarón.



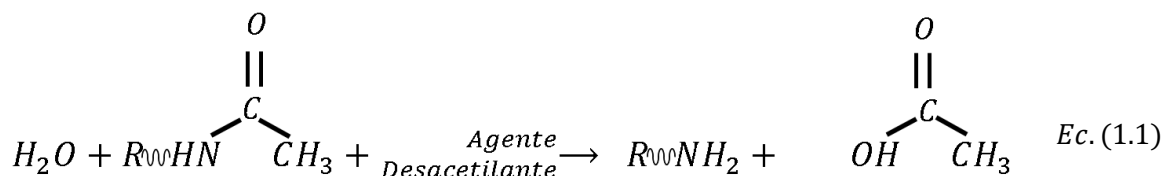
La artropodina propia del exoesqueleto de los artrópodos, es una proteína hidrosoluble, que se encuentra asociada con micro fibrillas y quitina. Durante la formación de la exocutícula de los crustáceos, las moléculas de la artropodina se unen por puentes de ortoquinonas y de esta manera forman esclerotina, las cuales derivan del aminoácido L-tirosina (Moret y Moreau, 2012), la esclerotina es una proteína que ligada a la quitina confiere dureza y soporte mecánico, la resilina se encuentra en regiones especializadas de la cutícula de los artrópodos, y muestran una resistencia única como la elastina (Del Vare 1989).

Por lo general, la desproteínización se realiza en soluciones de NaOH y KOH, debido a que las proteínas se encuentran unidas mediante enlaces covalentes y no covalentes, por lo que su solubilidad se ve afectada por el pH del medio. El pH cumple dos funciones primarias: a) le proporciona carga a las proteínas a un pH alrededor de 8, la mayoría de las proteínas se cargan negativamente, esto dependerá, entre otras cosas, de la cantidad de grupos amino y carboxilo que posea (Sánchez 2005); b) sirve como catalizador para la hidrólisis, por lo cual dicho proceso se lleva a cabo mediante soluciones alcalinas.

La efectividad de este proceso depende tanto de la temperatura, la concentración del álcali y la proporción de proteína en el desecho. De acuerdo a los subproductos que se deseen obtener, se han utilizado otras soluciones como:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ,  $\text{Na}_2\text{S}$ ,  $\text{CaHSO}_3$  y  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  (Charoenvuttitham y col., 2006). Diversas fuentes muestran variaciones que van desde 1M hasta 4M, temperaturas en un rango de 24-100°C, y tiempos que van de 0.5 hasta 72 horas. El estudio para la optimización en el proceso de desproteínización, nos señala que se obtiene convenientemente en solución de NaOH 1 M en 24 horas a una temperatura próxima a 70°C sin incidencia en el peso molecular o en la DA (Domard et al, 2003).

### **1.6.3 Desacetilización por hidrólisis química**

La obtención de quitosano a partir de la quitina extraída del exoesqueleto del camarón, se lleva a cabo al pasar de N-Acetil glucosamina (D-GlcNAc) a N-glucosamina (D-GlcN), es decir pasar de un grupo amido a uno amino en los sustituyentes de la cadena polimérica (Desacetilización/DA), mediante una reacción de hidrólisis, la cual se caracterizan por la división de una molécula de agua en un protón y un hidróxilo con uno o ambos de estos apegándose a un producto orgánico de partida. Por lo general, requiere el uso de un catalizador ácido o base. El término "hidrólisis" significa literalmente dividir con agua.



Como en los procesos anteriores, existen diferentes estudios en los que se han evaluado las condiciones de temperatura, concentración y tiempos, para favorecer y optimizar la reacción; por lo que podemos dividir en dos grupos a la desacetilación, dependiendo de las condiciones bajo las cuales se lleve a cabo la reacción. Sin embargo, estos parámetros deben ser estrictamente controlados, ya que influyen en el grado de acetilación, peso molecular, distribución molecular y por consiguiente en las propiedades y aplicaciones del biopolímero resultante.

*La desacetilación homogénea:* como su nombre lo dice, consiste en disolver la quitina completamente en una solución de NaOH acuosa, llegando a tener una solución homogénea, la completa disolución se logra mediante un proceso de congelación y descongelación, ya que a bajas temperaturas, la quitina se hincha, favoreciendo la solubilidad. Luego se somete a desacetilación a temperaturas cercanas a la del ambiente durante períodos largos de tiempo. Con lo cual podemos, asegurar la uniformidad de la reacción (Nemtsev 2002) y la distribución, de los grupos acetil resultantes, esto permite que la reacción no se localice en determinados lugares de la cadena y que el ataque a los grupos amidas sea más uniforme.

*La desacetilación heterogénea:* Es aquella, en la que las moléculas de quitina, se dispersan en una solución alcalina, generalmente de hidróxido de sodio, a altas temperaturas que van en un rango de (100 a 140° C), las cuales aceleran la velocidad de la reacción. Sin embargo la desacetilación, se da con mayor rapidez en las regiones amorfas expuestas del biopolímero en comparación con las áreas cristalinas, lo que proporcionan una distribución de bloque e impide una mayor desacetilación, además de que estas condiciones pueden reducir la longitud de la cadena; por este motivo, es beneficioso repetir varias veces el tratamiento alcalino por cortos periodos de tiempo, aislando el producto en cada etapa (Cabarcas, 2011).

Para evitar la pérdida de peso molecular del polímero, es necesario la ausencia de oxígeno, ya que la presencia de este durante la desacetilación, influye en la degradación del polisacárido y da como resultado una disminución en la viscosidad y el peso molecular de los productos. Estos cambios pueden ser reducidos mediante la adición de nitrógeno o argón al medio o la presencia de un antioxidante para evitar su despolimerización. (Synowiecki y co., 2003).

Se ha encontrado que el quitosano obtenido en el proceso heterogéneo, presenta cierta polidispersión del grado de acetilación en sus cadenas, mientras que el obtenido por vía homogénea tiene un grado de acetilación uniforme en los sustituyentes de toda la cadena polimérica.

Por último, el producto obtenido se lleva a una etapa de blanqueamiento, con agentes decolorantes, por ejemplo, una solución de  $KMnO_4$  y  $Na_2S_2O_4$ , este último agente altamente reductor. (Cahú y col. 2012), para remover los pigmentos restantes y obtener un producto blanco o crema. Este se realiza solo si es indispensable tener un producto completamente puro, ya que el pigmento no afecta la influencia del comportamiento del polímero en solución, su reactividad o propiedades fisicoquímicas.

Entre las desventajas del método químico para la purificación de quitina, se encuentra un alto consumo de energía, así como una alta demanda de agua en las etapas de enjuague y lavado, además el uso de ácidos y álcalis provoca una degradación considerable del polímero.

## **1.7 Método biológico de obtención de quitina**

Diversos estudios, plantean una alternativa al método químico, mediante la desmineralización, desproteización, e hidrólisis de la quitina, por métodos biológicos, ya sea utilizando ácidos orgánicos secretados por bacterias, capaces de solubilizar a los minerales presentes en el desecho, o mediante la acción de enzimas (Proteasas o deacetilasas).

### **1.7.1. Descalcificación microbiológica**

Los microorganismos que pueden realizar la descalcificación, producen ácidos orgánicos que solubilizan el mineral que se encuentra presente en la cáscara del camarón. Comúnmente se utilizan bacterias lácticas, las cuales producen ácido láctico por vía fermentativa, el ácido láctico reacciona con el carbonato de calcio ( $CaCO_3$ ) presente en el desecho para producir lactato de calcio (Pacheco 2010).



Los microorganismos que producen ácido láctico son las bacterias lácticas (BAL), tales como: cocos y bacilos gram positivos, anaerobios facultativos y catalasa negativo, pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* (Lb), *Carnobacterium*, *Leuconostoc* (Leu), *Pediococcus* (Pd), *Streptococcus* (Str), *Tetragenococcus*, *Lactococcus* (Lc), *Vagococcus*, *Enterococcus* (Ent), *Aerococcus* y *Weissella* (Serna

y Rodríguez-de Stouven 2005). Una característica importante de la mayoría de las especies pertenecientes a estos géneros, es que tienen una tolerancia alta a valores inferiores de  $\text{pH} < 5$ , lo cual les da ventajas de crecimiento frente a otras bacterias. La temperatura óptima para su multiplicación varían de un género a otro y van de  $20^{\circ}\text{C}$  a  $45^{\circ}\text{C}$ . Debido a que las BAL poseen una capacidad limitada para sintetizar aminoácidos y vitamina B, existe la necesidad de formular un medio de cultivo con estos requerimientos nutricionales, (van Niel y Hahn-Hägerdal, 1999). La eficiencia en la producción de ácido láctico durante la fermentación depende de diferentes factores, tales como: cantidad inicial de inóculo, fuente de carbono,  $\text{pH}$  inicial y durante la fermentación ente otras.

### **1.7.2 Desproteización microbiológica**

Las proteasas son enzimas que rompen los enlaces peptídicos entre dos aminoácidos que componen a las proteínas. En el rompimiento del enlace se utiliza una molécula de agua, por lo tanto se clasifican como hidrolasas, también conocidas como enzimas peptil-dipéptido hidrolíticas. Las proteasas pueden ser producidas por todos los microorganismos; sin embargo sólo las especies que producen una cantidad sustancial de proteasa extracelular han sido explotados comercialmente, de éstas las cepas de *Bacillus sp.* Dominan el sector industrial, en su mayoría produce dos clases de proteasas, alcalinas y neutras (Nagalakshmi y col., 2010). Las proteasas comúnmente se utilizan en aplicaciones de lavado de mezclilla, como detergentes y ablandadores de carne, y constituyen 60 a 65% del mercado global de las enzimas (Se-Kwon y Kim, 2011). A pesar de que la hidrólisis enzimática no es capaz de remover el 100% de las proteínas de la cáscara de camarón, el contenido restante es fácilmente removido durante la producción química del quitosano; algunos de los métodos biológicos de extracción de quitina, se han combinado con tratamientos químicos menores con el fin de alcanzar la total purificación de la quitina, conservando sus características (Cira,y col. 2002).

En la Tabla 1.2 se reportan algunos trabajos realizados de descalcificación y desproteización de algunos residuos de crustáceos para la obtención de quitina (Arbia Adou y Amrane, 2013).

**Tabla 1.2** Fermentaciones y Co-fermentaciones para la obtención de quitina.

Fuente de residuos	Las cepas y/o enzimas proteolíticas	Fuente de Carbono	Tiempo de Fermentación (Días)	DP % Eficiencia	DM % Eficiencia	Referencia
<b>Fermentación láctica</b> <i>Penaeus monodon</i> (camarón jumbo)		Suero de sacarosa	6	85	87.6	(Cira, et al.2002).
<i>Nephrrops norvegicus</i> (cigala)desmineralizada	Stabisi: <i>Streptococcus faecium</i> N74, <i>L. plantarum</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i>	Lactosa	7	40	n.d.	(Healy, Romo, Bustos,1994).
<i>Nephrrops norvegicus</i>	Slit-A14x4: <i>L. plantarum</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>S. faecium</i> , <i>P. acidilactici</i>	Glucosa	7	n.d	90.99	(Healy, Green, 2003).
<i>Nephrrops norvegicus</i>	<i>L. paracasei</i> A3	Glucosa	5	77.5	61	(Zakaria, Hall, y Shama, 1997).
Fermentación de camarón un paso	<i>L. plantarum</i> 541	Glucosa	—	75	86	(Rao, Muñoz,Stevens, 2000).
<i>Procambarus clarkii pretalada</i> (cangrejo de río americano)	<i>L. paracasei</i> A3	Dextrosa	3	94	97.2	(Cremades, Ponce, Corpas, Gutiérrez, Jover, Alvarez,2001).
<i>Procambarus clarkii</i>	<i>Lactobacillus pentosus</i> 4023	Suero de leche	2.1	81.5	90.1	(Bautista, Jover, Gutiérrez, Corpas, Cremades, Fontiveros ,2001).
<i>Chionoecetes japonicus</i> (cangrejo araña)	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>tolerans</i> KCTC-3074	Glucosa	1	54.7	55.2	(Jung, Kuk, Kim, Park, 2005).

<i>Parapenaeus longirostris</i> (Camarón blanco)	L. helveticus	Jugo de dátil	14	91	44	(Adour, Arbia, Amrane, Mameri, 2008).
<b>Fermentación no láctica</b>						
<i>Metapenaeus dobson</i> (camaron kardal)	Bacillus subtilis	Jugo de palmera	—	84	72	(Sini, Santhosh, Mathew, 2007).
Cáscara de camarón y cangrejo.	Pseudomonas aeruginosa K-187	—	5	82	—	(Chio y Wang, 1998).
Cáscara de camarón y cangrejo en polvo.	Proteasas de P. aeruginosa K-187	—	7	72,78,45,67	—	(Oh, Shih, Tzeng, Wang, 2000).
Cáscara de camarón	Proteasas inmovilizadas de P. aeruginosa			63	92	(Oh, Kim, Nguyen, Jung, Park, 2007).
Cáscara de camarón pre tratamiento ácido	P. aeruginosa F722		7	47	84	(Jo, Jung, Kuk, Oh, Kim, Park, 2008).
Cáscara de camarón y cangrejo en polvo.	Serratia marcescens FS-3		7	90		
Polvo de concha de cangrejo	Devolase ®			85		

<i>Chionoecetes opilio</i> (residuos de cascara de caparazón de cangrejo)	Convinacion de Devolase® y Serratia marcescens FS-3			81		
Residuos de cáscara de camarón	S. marcescens FS-3			97.1	95	(Sorokulova, Krumnow, Globa, Vodyanoy, 2009).
Residuos de cáscara de camarón	Bacillus cereus			92.8	92	
<i>Squid pen</i>	Exiguobacterium acetylicum			73	n.d.	(Wang, Kao, Yen, Chern, Chen, 2007).
<i>Penaeus morodon</i> (camarón jumbo)	Pediococcus acidilactici CFR2182			97.9+/-0.3	72.5(+/-)1.5	(Bhaskar, Suresh, Sakhare, Sachindra-2007).
cáscara de camarón	Pediococcus sp. L1/2	Sacarosa	1.5	n.d.	83	(Choorit, Patthanamane, Manurakchinakorn, 2008).

**Cofermentaciones**

Fermentación en dos etapas de <i>Penaeus</i> <i>Monodon</i> y <i>Crangon crangon</i>	Primer paso: anaeróbico Desproteínización por Flora de las cáscaras de camarón de Indonesia Y / o bacterias proteolíticas Segundo paso: L. casei MRS 1		97.4,90.8	99.6, 99.7	(Xu, Gallert, Winter, 2008).
Desperdicios de gambas	Lactobacillus lactis Teredinibacter turnerae Co-fermentación de ambas especies		66.5,77.8,95	78.8, 23.3,95	(Aytekin, Elibol, 2010).
Residuos de concha de cangrejo rojo	Fermentación en un solo paso: L. paracasei Ssp. Tolerantes KCTC-3074 y S. marcescens FS-3 Fermentación sucesiva en dos etapas	7	52.6,94.3	97.2,68.9	(Jung, Jo, Kuk, Kim 2006).
	Dos cepas de Bacillus licheniformis con Tratamiento de la fermentación final con ácido láctico 0.9%	2	99	98.8	(Waldeck, Daum, Bisping, Meinhard, 2006)



### **1.8 Aplicaciones de la quitina y el quitosano.**

La gran cantidad de aplicaciones que veremos se basan en el hecho de que el quitosano es una base débil y es insoluble en agua, pero soluble en soluciones ácidas acuosas diluidas por debajo de su pKa (~ 6.3), en el que puede convertir unidades de glucosamina (Glc-NH<sub>2</sub>), en la forma protonada soluble (Glc -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>). Además, los grupos funcionales reactivos presentes en el quitosano, (grupo amino en la posición C2 de cada unidad desacetilada y grupos hidroxilo en las posiciones C6 y C3) pueden someterse fácilmente a derivatización química permitiendo la manipulación de propiedades mecánicas y de solubilidad (Salazar y col.,2014).

Ademas, la quitina y el quitosano pueden existir en diferentes formas aplicadas (hidrogeles, películas, membranas, nanofibras, micro perlas/ nanopartículas, andamios y esponjas; Goy de Britto y Assis, 2009).

La quitina y sus derivados tienen múltiples aplicaciones biológicas, mecánicas, ópticas y fisicoquímicas de interés, tales como: biocompatibilidad inmunológica, claridad óptica, transparencia, permeabilidad, humectabilidad, estabilidad mecánica, flexibilidad, biodegradabilidad y no toxicidad; y con el hecho de que el quitosano de muy bajo peso molecular interacciona con el ADN (I. Hamed y col., 2015).

Se ha demostrado que la quitina, y sus derivados cumplen funciones como antioxidantes y antimicrobianos, por lo cual podrían llegar a ser de uso potencial, para mejorar la inocuidad de los alimentos su vida útil y calidad. Por ejemplo los productos cárnicos así como el pescado, son ricos en lípidos insaturados, y su oxidación causa rancidez. El quitosano pinta como una buena alternativa a los antioxidantes sintéticos como butilados Hidroxitolueno (BHT) y hidroxianisol butilado (BHA), los cuales tienden al debate, llegando a ser considerados peligrosos para la salud (Imen Hamed, Fatih Ozogul, Joe M. Regenstein,2015).

Estudios demuestran que la adición del 1% de quitosano en la carne, da lugar a una disminución en la prueba para determinar el estrés oxidativo (TBARS), del 70% después de la 3 días de almacenamiento a 4°C. (Tharanathan RN, Kittur FS. 2003). La oxidación lipídica es catalizada por las altas concentraciones de pro-oxidantes, tales como hemoglobina, e iones metálicos; por lo tanto, la inhibición del quitosano parece relacionarse con su quelación con el hierro libre. El efecto antioxidante del quitosano varía con su peso molecular, concentración y viscosidad (Jeon, Kamil y Shahidi 2002).

Datos recientes en la literatura describen, al quitosano como bacteriostático; lo cual se atribuye, como teoría aceptada, a la interacción entre los grupos protonados NH<sub>3</sub><sup>+</sup> de las moléculas de quitosano y la membrana celular microbiana cargada

negativamente. Esta interacción electrostática provoca cambios en las propiedades de permeabilidad de la pared de la membrana, y por consiguiente inhibe el crecimiento de microorganismos. Lo anterior depende tanto de la concentración, como del pH, del grado de desacetilización y del peso molecular (Goy, de Britto, y Assis 2009).

La actividad fungistática del quitosano, se asocia con la interferencia en la actividad, de las enzimas responsables del crecimiento de hongos, o alteraciones escitológicas, propiciando la aparición de vesículas o células vacías carentes de citoplasma. Lo cual también depende de la concentración, DA y pH local. (Ayala, Colina, Molina, Vargas, Rincón, Medina, Rosales, Cárdenas, 2014).

Algunas otras aplicaciones se describen a continuación:

**Tabla 1.3.** Diferentes aplicaciones de la quitina y el quitosano

<b>Aplicación</b>	<b>Referencia</b>
Liberación controlada de fármacos	Sinha, Singla, Wadhawan, Kaushik, Kumria, Bansal, Dhawan (2003).
Como membranas y andamios (Estructuras Porosas tridimensionales) para la regeneración de tejidos (huesos, cartílagos, hígados, riñones, y nervios)	Dhandayuthapani, Yoshida, Maekawa, y Kumar, (2011).
La quitina y sus derivados actúan como matrices artificiales de la piel que son capaces de promover una rápida regeneración dérmica	Khor & Lim, (2003).
Desarrollo de puntadas quirúrgicas	Dinesh, Singh y Alok (2000).
Como material para lentes de contacto	Shi Xin-Yuan Tan Tian-Wei (2004).
La quitina se ha utilizado como vehículo activo para productos cosméticos, mejorar la penetración de los ingredientes activos a través de la capa de piel.	Morganti (2010).
Vectores no virales para la entrega de genes	Mansouri, Lavigne, Corsi, Benderdour, Beaumont, Fernandes (2004).
Aditivos conservantes para alimentos y formación de biofilm (empaquetado comestible)	Vásconeza, Flores, Campos, Alvarado, Gerschenson, (2009).
Estabilizantes y compuestos espesantes	Howard J. Dunn, Lomita, and M. Paul (1971).
En confección de ropa para bebés anti microbiana y no alergénica	Pillai, Paul, & Sharma, (2009).
En tratamiento de aguas, como floculante y agentes quelantes para limpiar metales pesados	(Abu Hassan, Pei Li, & Noor, (2009).
Agente de revestimiento de semillas para controlar las plagas Y mejorar las defensas de las plantas contra microorganismos	Lárez Velásquez, Cristóbal. (2008).

# CAPÍTULO 2:

## METODOLOGÍA

---

### 2.1 Tamaño de partícula

La obtención de quitina se realizó por medio de la purificación de la cabeza de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), \* a las cuales se les removió toda la parte proteica formada por los órganos internos (vísceras), se secó en la estufa a 50°C por 24 horas y se trituró por medio de cuchillas en forma de hélice (ver Fig. 2.1).



**Fig. 2.1** Secado de cabezas de camarón limpio (a). Molienda de la cabeza limpia de camarón (b).

Posteriormente, la forma en la que se determinó el tamaño de partícula, obtenido través de la molienda, fue mediante un análisis granulométrico, para lo cual se seleccionó una serie de tamices, de la secuencia USA, y se llevó a cabo de forma no rigurosa (saltando un tamiz subsecuente en tamaño, a lo largo de la serie). Se colocó una muestra de 100g en el tamiz de menor cantidad de orificios por unidad de área, se acomodó la pila de tamices en el rotap, el cual se reprogramó por 12min, propiciando movimientos oscilatorio y trepidatorio. Una vez concluido el proceso de tamizado se pesan nuevamente cada uno de los tamices, anotando su número y masa correspondiente para llenar la tabla de análisis granulométrico y realizar la gráfica de diferencia, que se muestra más adelante en la sección 3.1.

[\*]La lista de materiales y reactivos aparece en el anexo.

## 2.2 Microorganismos

El microorganismo que se utilizó para llevar a cabo la desproteinización-descalcificación de las cáscaras de cabeza de camarón es la bacteria *Bacillus Coagulans*,\* La cual se obtuvo, en su forma comercial *Lactobacilos sporogenes*, en formato de liofilizados micro-encapsulados, de la marca Farmacias del ahorro en presentación de sobres de 200mg. Para obtener masa bacteriana en fase de crecimiento exponencial, se optó por llevar a cabo un pre-inóculo, partiendo del contenido de un sobre de bacterias liofilizadas, el cual se hidrata en un principio con una solución isotónica (NaCl a 0.85% m/v) por dos horas en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente, se propagan en medio de cultivo MRS para obtener abundante cantidad de bacterias. La peptona y la glucosa presente en el medio de cultivo MRS constituyen la fuente de nitrógeno, carbono y otros elementos necesarios para el crecimiento bacteriano.

### 2.3 Curva de correlación peso seco de masa bacteriana contra absorbancia.

Primero se realizó una curva de correlación de peso seco contra absorbancia.\* Se partió de un pre-inóculo de 200 mL con un tiempo de propagación de 12h, al cual se le midió la absorbancia a 620nm, tomando como blanco al medio sin inocular. De este pre-inoculo se inocularon 10mL en diez matraces de 125 mL con 90mL de medio MRS (10% v/v) previamente esterilizado (autoclave a 120°C durante 15min), al medio se le ajustó el pH a 6, con ácido acético glacial, los diez matraces se colocaron en un agitador orbital a 150rpm y temperatura de 37°C.

Cada dos horas se sacrificaba un matraz, se vertía el cultivo en dos tubos de centrifuga de 50mL. El primer tubo se utilizó para medir el peso seco y los otros 50 mL. se utilizaron para determinar la absorbancia de masa bacteriana re-disuelta en solución salina. El tubo que se utilizó para medir absorbancia se colocó en el espectrofotómetro para conocer la absorbancia del cultivo (biomasa más medio de cultivo). Posteriormente ambos tubos se centrifugaron por 10 min a 4000 rpm. A ambos tubos se les retiró el sobrenadante, a los tubos que se asignaron para determinar el peso seco, primero se pesaron y luego se colocaron en la estufa por 48 horas a 60°C, se sacaron y se dejaron enfriar en el desecador, posteriormente se determinó su peso constante. Al otro tubo se le agregó solución salina y, se resolvió la masa bacteriana en solución salina para después medir la absorbancia a 620nm, se tomó como blanco la solución salina. En la Figura 2.2 se muestra una fotografía de la hidratación de la bacteria liofilizada y los tubos utilizados para realizar la centrifugación de la biomasa.

[\*]La lista de materiales y reactivos aparece en el anexo.



**Figura 2.2** a) Hidratación de la bacteria liofilizada y b) tubos de centrifuga de 50mL (Falcon®)

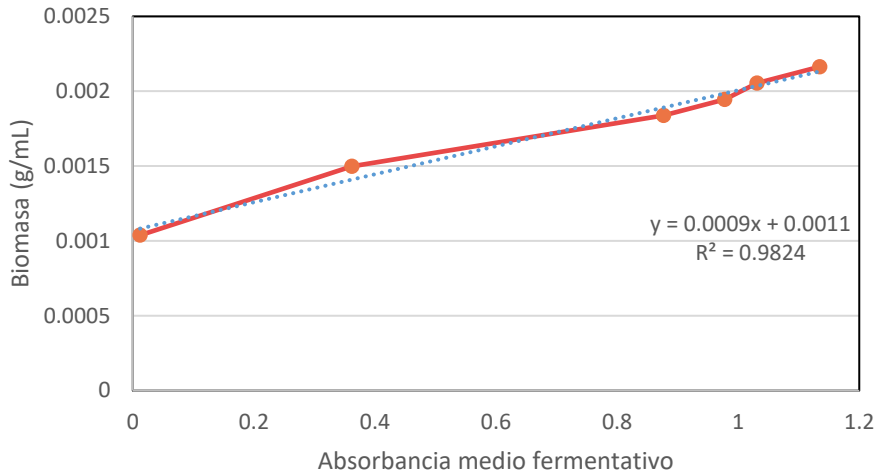
En la Tabla 2.1 se reportan los valores de absorbancia y de peso seco obtenidos de los diferentes matraces de sacrificio a diferentes tiempos. Para determinar la concentración de biomasa por unidad de volumen, se dividió la masa de peso seco entre los 50mL de volumen de cultivo centrifugado (ver última columna de la Tabla 2.1).

$$\text{Concentración Biomasa} \left( \frac{g}{mL} \right) = \frac{\text{Peso seco } g}{50mL \text{ de Volumen total}} \quad \text{Ec. (2.1)}$$

**Tabla 2.1** Datos obtenidos de absorbancia y peso seco.

Tiempo (h)	Absorbancia del medio	Absorbancia masa de disuelta	Peso inicial(g)	Peso final(g)	Peso seco Biomasa (g)	Concentración Bacteriana (g/mL)
Preinóculo	0.331	0.317	9.1773	9.4368	0.02595	0.00052
Blanco	0	0	-----	-----	0	0
0	0.012	0.033	-----	-----	0.0519	0.00104
2	0.362	0.528	10.3484	10.4233	0.0749	0.0015
4	0.877	0.95	10.2750	10.3669	0.0919	0.00184
6	0.978	1.081	10.3009	10.3982	0.0973	0.00195
8	1.031	1.157	10.7252	10.8279	0.1027	0.00205
10	1.135	1.258	10.2702	10.3784	0.1082	0.00216

Una vez que se determinaron los valores de unidades de absorbancia y de peso seco para cada matraz sacrificado, se realizó la gráfica de biomasa (g/mL) versus unidades de absorbancia (ver Fig. 2.2) con el fin de obtener una correlación lineal para estimar el valor de concentración de biomasa a partir de lecturas de absorbancia del medio fermentativo.

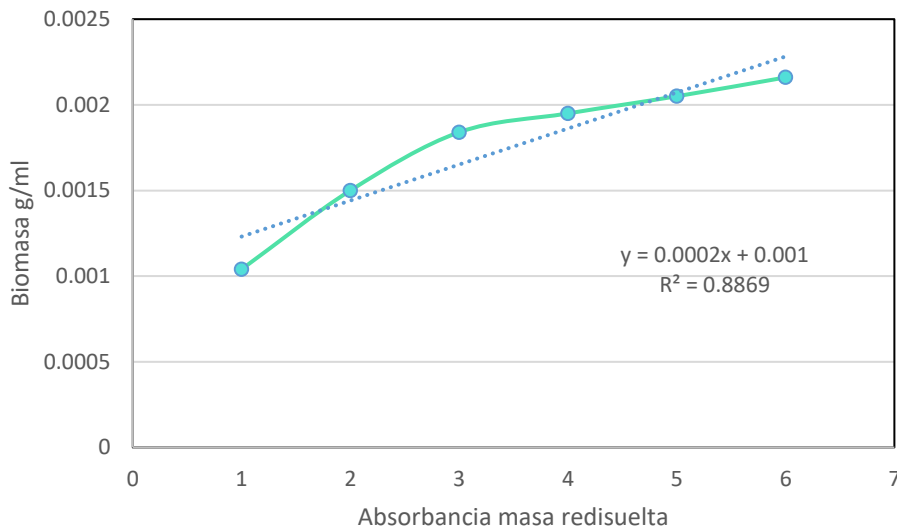


**Gráfica 2.2** recta de calibración de la relación entre absorbancia medio fermentativo a (620nm) y concentración de biomasa g/mL.

La función correspondiente a la curva de calibración es la siguiente.

$$C_{Biomasa} \left( \frac{g}{mL} \right) = 0.0009A(620nm) + 0.0011 \quad Ec. (2.2)$$

Para el caso de querer predecir la cantidad de biomasa, a partir de la medición de absorbancia de una muestra, la cual se haya centrifugado, y su masa re disuelto, tenemos la siguiente gráfica, y su ecuación representativa.



**Gráfica 2.3** recta de calibración de la relación entre absorbancia masa redisuelta a (620nm) y concentración de biomasa g/mL.

La función correspondiente a la curva de calibración es la siguiente.

$$C_{Biomasa} \left( \frac{g}{mL} \right) = 0.0002A(620nm) + 0.001 \quad Ec. (2.3.)$$

#### 2.4 Desproteínización y descalcificación vía fermentativa en matraces.

El estudio experimental para determinar el porcentaje de desproteínización y descalcificación vía fermentativa de las cáscaras de cabezas de camarón, \* se realizó en matraces de 125mL, se prepararon dos tipos de cultivos con medio MRS. Al primero se le adicionó cabeza seca y pulverizada. Al segundo se le adicionó la cabeza procedente de un proceso previo de desproteínización química (NaOH [1M]/10%*m/v*, a 70°C por 24h) después de ser lavada y secada. A estos cultivos se les agregó medio MRS y se les ajustó el pH inicial a 6 con ácido acético glacial, un tercer cultivo se preparó con cabeza seca y pulverizada sin ajustar el pH (valor inicial de pH=8.2).

Se prepararon nueve matraces para seguir cada 24 horas por 72 horas cada condición. A los matraces se les colocaron 20g de polvo de camarón en 90mL de medio MRS, el cual contiene 0.0233g de glucosa/mL. Una vez ajustado el pH se esterilizaron todos los matraces en la autoclave por 15min. A 120°C. Posteriormente, a cada matraz se le agregó un 10% *v/v* de preinoculo de 12h de propagación en medio MRS (ver Fig. 2.4), al cual se le midió la absorbancia a 620nm, tomando como blanco al medio sin inocular, una vez realizado esto se llevó al agitador orbital a 37°C y 150 rpm. Cada 24 horas se sacaba un matraz, se filtraba la parte sólida, la cual se lavaba con agua desionizada y se secaba en la estufa a 50°C para posteriormente determinar el remanente de calcio y proteína (ver Fig. 2.5). A la fase acuosa solo se le determinó el pH



**Figura 2.4** inoculación para la fermentación matraces



**Figura 2.5** Residuos sólidos, lavados y secados de la fermentación a diferentes tiempos.

[\*] La lista de materiales y reactivos aparece en el anexo.

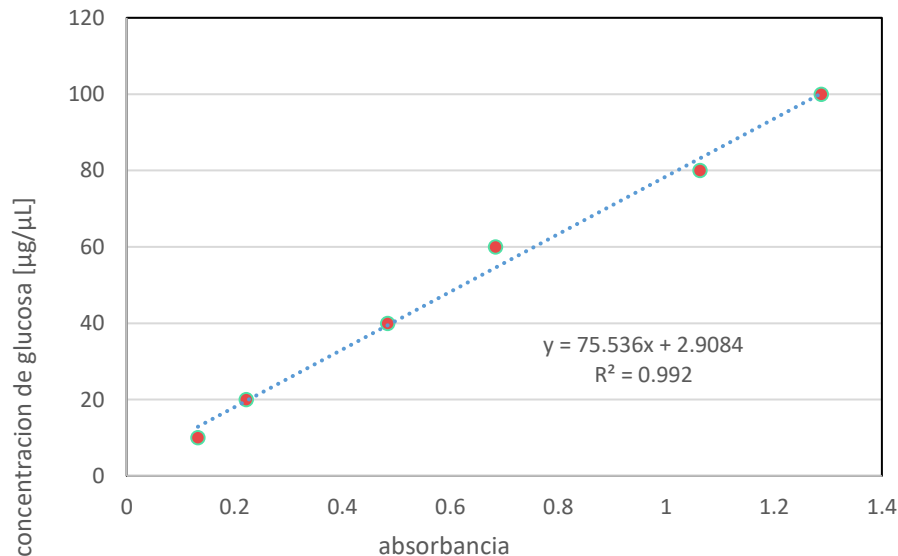


## 2.5 Método de fenol-sulfúrico para determinación de glucosa.

Para determinar la concentración de glucosa en función del tiempo de fermentación se realizó una curva patrón.\* Primero se preparó una solución de glucosa de 20  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , de esta se realizaron diluciones para obtener diferentes concentraciones (0,10, 20, 40, 60, 80 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Después se toma 1mL de cada una de las soluciones y se le adicionan 500 $\mu\text{L}$  de solución de fenol al 5% y 2,500 $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico concentrado, se agita y luego se mantiene en reposo por 10min. Posteriormente, se agita nuevamente y se pone en agua fría (25 a 30°C) por 20 min y se mide la absorbancia a 490nm, tomando como blanco la solución con 0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de glucosa.

Tabla 2.2 Curva patrón glucosa contra absorbancia a 490nm (método fenol-sulfúrico).

[Glucosa] $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Absorbancia
10	0.132
20	0.222
40	0.484
60	0.684
80	1.063
100	1.288



**Grafica 2.6** gráfica de la curva patrón glucosa contra absorbancia y ecuación representativa.

[\*] La lista de materiales y reactivos aparece en el anexo.



### **2.5.1 Seguimiento del consumo de sustrato en el tiempo de fermentación.**

Una vez obtenida la curva patrón pasamos a determinar, la cantidad de sustrato consumido por el microorganismo puntualmente\*, para lo cual se partió de un pre inóculo de 12h al cual se le midió absorbancia, a 620nm, tomando como blanco al medio sin inocular. De este pre inóculo se tomaron 20mL. y se inocularon en 180ml. de medio MRS. (10%v/v), la fermentación ocurrió a 37°C, y 150 rpm.

Se toma una muestra de 500µL a las 0,2,3,4,5,6,7,8,9,10,24, y 25horas, en un ambiente estéril. A cada una se les realiza un proceso de desproteínización, por lo que dicha muestra se coloca en un tubo de centrifuga y se le agregan 250µL de sulfato de Zinc al 10% y 250µL de NaOH 0.05N y dejando reposar durante 10 min. a temperatura ambiente; después de esto se centrifuga a 4000 rpm durante 5min, el sobrenadante se filtra por decantación, hacia otro tubo y de este se realizan las diluciones necesarias para cada muestra y se repite la digestión como se hizo para la curva patrón.

[\*] La lista de materiales y reactivos aparece en el anexo.

## **2.6 Método de cuantificación de calcio**

### **2.6.1 Método (AOAC, 2000) para determinar el contenido de cenizas \***

Se coloca el crisol en la mufla a 550°C, durante 5horas, para propiciar que las impurezas, en la superficie del crisol sean incineradas; después se enfría el crisol en el desecador, por 30min. y se pesa el crisol con tres cifras decimales. Se pesan 2g de muestra que se introducen al crisol y este a su vez a la mufla, se calienta entre 550 y 600°C durante 35horas, una vez completado la incineración, se pasa a enfriar en el desecador por 30min. Por último se pesa el crisol con la ceniza, solo en el caso de que la muestra se haya tornado de color gris claro; de otro modo se devuelve el crisol junto con la muestra a la mufla, para que se efectuó la incineración completa (ver serie de Figuras 2.7 a 2.10).



Figura 2.7 Pesaje del crisol vacío.



Figura 2.8 Muestras listas para la incineración.



Figura 2.9 Temperatura de incineración.



Figura 2.10 Muestras después de la incineración completa

El porcentaje de cenizas se determina a partir de la siguiente expresión.

$$\text{cenizas}(\%) = \frac{\text{peso de las cenizas}}{\text{peso de la muestra}} \times 100 \quad (2.4)$$

Además de determinar el contenido de cenizas a las muestras, de sólido, residual obtenido, a diferentes tiempos de fermentación. Se determinó el contenido de cenizas totales, para lo cual se tomó una muestra de cabeza, que solo había pasado por la etapa de secado y trituración. Por último se determinó el contenido de cenizas a una muestra, que había pasado por un proceso de desproteínización química, y a una que había pasado por ambos métodos: desproteínización y descalcificación química.

[\*] La lista de materiales y reactivos aparece en el anexo.

## 2.7 Método de micro Kjeldahl para determinar proteína\*

El primer paso es realizar la digestión de la muestra sólida, para lo cual se toma una muestra de aproximadamente 20mg de cáscara de camarón, el peso exacto se anota con una precisión de tres decimales; se mezcla con 2g de sulfato de potasio ( $K_2SO_4$ ) y 40mg de óxido de mercurio ( $HgO$ ), como catalizador; finalmente se le adicionan 2mL de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) al 96%. Se llevan a la unidad de digestión Bloc-Digest (ver Fig. 2.11), propiciando la descomposición del nitrógeno contenido en la muestra; el resultado es una solución de sulfato de amonio, la digestión dura 1.5 horas bajo calentamiento hasta que se vuelva transparente.

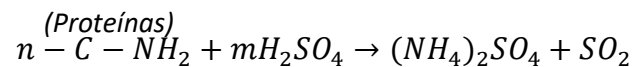
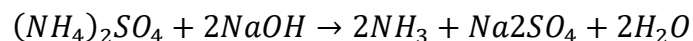


Figura 2.11 Digestión de la muestra con ácido sulfúrico,

una vez enfriada, la mezcla resultante se re-disuelve, agregándole de 1-a 2mL de agua; este proceso se repite de 5 a 6 veces, pasándolo del tubo kjeldahl al depósito del destilador, se neutraliza, agregándole de 8 a 10mL de una solución preparada a partir de 60g de hidróxido de sodio ( $NaOH$ ) y 5g de tiosulfato de sodio penta hidratado ( $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ ) en 100mL de agua, el objetivo es transformar el ion amonio a amoníaco, el cual se destila.



El amoníaco liberado del proceso de destilación es capturado en una solución de ácido bórico al 4% p/v. Para esto se hace burbujear el producto de destilación en un matraz el cual contiene 10mL de solución de ácido bórico, y unas gotas del indicador (Solución verde de metil-rojo-bromocresol). Terminando la destilación al llegar a un volumen total igual a 50mL.(ver Fig, 2.12).

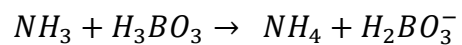
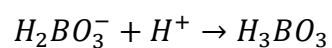


Figura 2.12 destilación de Amoniaco,

El anión borato (proporcional a la cantidad de nitrógeno), es titulado con HCl 0.02N (o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) estandarizado, de acuerdo con la siguiente reacción base-ácido, indicando el final de reacción por un cambio de color de verde a morado.



2.13 Valoración del ion borato con (HCl).

[\*] La lista de materiales y reactivos se encuentra en el anexo

# Capítulo 3: ANÁLISIS DE RESULTADOS

## 3.1 Análisis granulométrico.

En la Tabla 3.1 se presentan los valores del análisis granulométrico realizado a la cáscara limpia y seca de la cabeza de camarón.

Tabla 3.1 Masa retenida y diámetro de orificio correspondiente

No. Tamiz	Abertura (mm)	Masa inicial (g)	Masa Final (g)	Masa Retenida (g)
8	2.38	443.0	444.0	1.0
12	1.68	421.3	423.5	2.2
16	1.19	391.7	406.1	14.4
20	0.84	385.7	406.3	20.6
30	0.59	367.8	390.6	22.8
40	0.42	348.4	364.2	15.8
Charola	----	320.4	338.4	18.0
Suma				94.8

Con base en los resultados presentados en la Tabla 3.1 se determinó el porcentaje de masa retenido como función de número de malla o diámetro de abertura utilizando la siguiente ecuación (3.1).

$$Retenido = \frac{\text{masa retenida}}{\text{masa total}} * 100 \quad (3.1)$$

En la Figura 3.1 se presenta el comportamiento del porcentaje de masa retenida como función del diámetro de abertura. En un intervalo de 0.42 a 0.84mm se observa el mayor porcentaje retenido con un máximo significativo en un tamaño de partícula de 0.59mm.

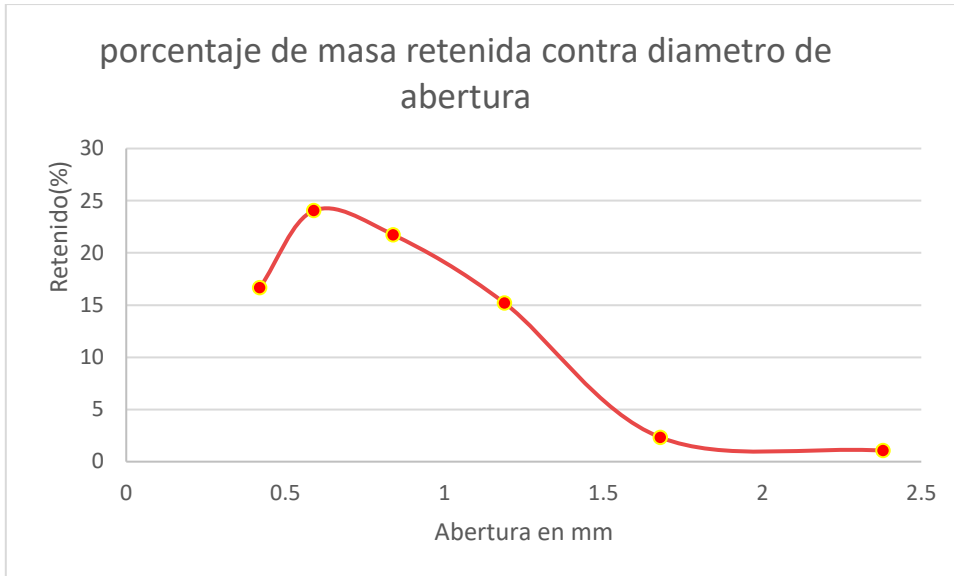


Fig. 3.1 Diámetro de partícula tras la molienda de la muestra de cabeza limpia y seca de la especie *Litopenaeus vannamei*.

En el presente trabajo para realizar la desmineralización y desproteínización por hidrólisis enzimática, se utilizó el diámetro de abertura de 0.59mm. Aunque un menor diámetro de partícula mejoraría la accesibilidad de la enzima a sitios activos de sustrato (a los enlaces peptídicos) debido a un aumento en la relación superficie/volumen efectiva; pero a una malla de 0.42mm, la materia de la cabeza de camarón es no fibrosa, pues en su mayoría es carbonato de calcio, que se encuentra unido a proteínas estructurales y a un porcentaje mínimo de quitina (Chundawat, Balan, E Dale, 2007).

### 3.2 Determinación de una expresión cinética.

En la Tabla 3.2 se reportan los resultados obtenidos de la producción de biomasa como función del tiempo, las cuales se estimaron con la ecuación (3.2) a través de las lecturas de absorbancia, así mismo se muestran la disminución de la glucosa, la cual se estimó con el método de fenol-sulfúrico.

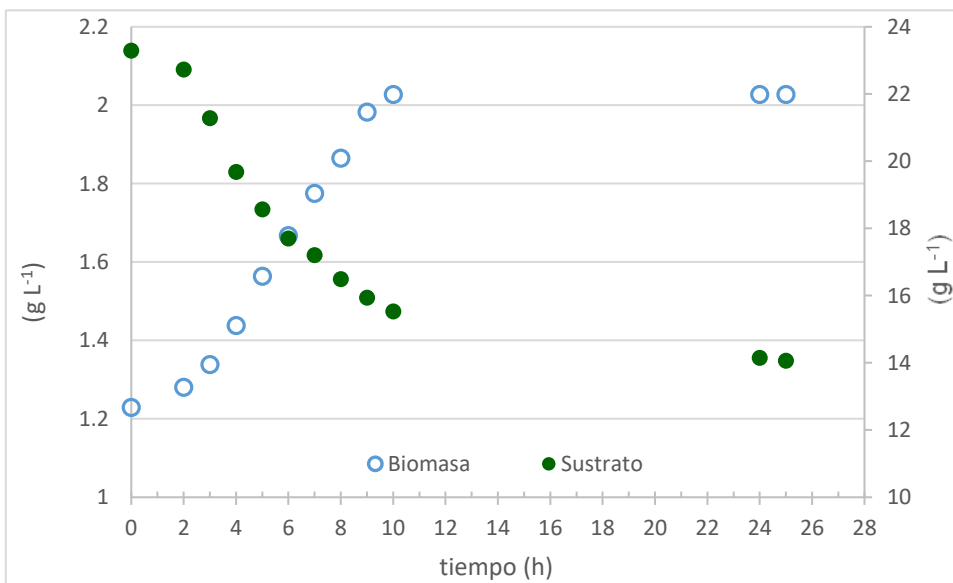
Ecuación de relación entre la absorbancia medida a 620nm y la concentración de la bacteria.

$$C_{Biomasa} \left( \frac{g}{mL} \right) = 0.0009A(620nm) + 0.0011 \quad (3.2)$$

Tabla 3.2 Datos de la curva de crecimiento de biomasa y consumo de sustrato como función del tiempo.

Tiempo (h).	Absorbancia	$C_{(Biomasa)}$ (g/mL)	$C_{(Biomasa)}$ (g/L)	Glucosa (g/L)
0	0.14	0.00123	1.229	23.291
2	0.20	0.00128	1.280	22.732
3	0.27	0.00134	1.339	21.280
4	0.38	0.00144	1.438	19.680
5	0.52	0.00156	1.564	18.570
6	0.63	0.00167	1.667	17.700
7	0.75	0.00178	1.775	17.200
8	0.85	0.00187	1.865	16.490
9	0.98	0.00198	1.983	15.940
10	1.03	0.00203	2.027	15.530
24	1.03	0.00203	2.027	14.149
25	1.03	0.00203	2.027	14.059

En la Figura 3.2 se muestra la gráfica del consumo de sustrato y producción de biomasa como funciones del tiempo de fermentación.



**Fig. 3.2** Resultados experimentales del consumo de sustrato y aumento en la concentración de biomasa como función del tiempo.

En la Fig.3.2 se observa que el microorganismo *bacillus coagulans* presenta una fase de adaptación o lag de aproximadamente 2 horas; posterior a este tiempo la

bacteria inicia su fase exponencial hasta aproximadamente las 9 horas, en este tiempo se observa claramente una tendencia lineal, posteriormente a las 10 horas el microorganismo entra a la fase estacionaria. La duración de la fase estacionaria no se puede determinar con precisión, debido a que la técnica de absorbancia no permite cuantificar cuantas bacterias están vivas o muertas. Una forma de inferir si las bacterias siguen creciendo, es a través de observar el comportamiento del consumo de sustrato, en el periodo de la fase lag, la tasa de consumo de glucosa es lento; una vez que el microorganismo entra en la fase exponencial la tasa de consumo de glucosa se incrementa considerablemente; al entrar en la fase estacionaria se observa que la tasa de consumo de sustrato se desacelera, y al parecer el mínimo consumo de sustrato que utiliza la bacteria es para su mantenimiento, el punto es que no se puede determinar la tendencia de la fase estacionaria, tanto del sustrato como de la biomasa. Por tal motivo, a partir de los datos obtenidos se tratará de desarrollar un modelo cinético que pueda describir el comportamiento experimental del sustrato y biomasa.

### **Modelo matemático de la cinética bacteriana**

El proceso de crecimiento, formación de productos, y el consumo de sustrato, implica múltiples reacciones dentro de la célula, así como la interacción con el medio, por lo tanto si queremos estudiar los mecanismos básicos que representen el comportamiento del microorganismo *b. coagulans*, podría parecer bastante complejo. Sin embargo describir nuestro sistema, no es una tarea imposible, ya que podemos hacer uso de modelos matemáticos no estructurados, que describan la tasa de reacción, implicando una descripción general, bastante simplificada, basadas en parámetros empíricos e hipótesis. (Arellano, 2013).

El modelo cinético que se utilizó en el presente trabajo fue el de Monod, el cual forma parte de los no estructurados, ya que es de los más sencillos, en este se expresa la cantidad de microorganismos en términos de biomasa, en las que se trata al microorganismo como una especie reactante sencilla.

#### ***Deducción del modelo cinético:***

Considerando al sistema fermentativo como a un reactor, un balance de materia se puede expresar de la siguiente forma.

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{Flujo masico} \\ \text{de acumulación} \end{array} \right\} = \left\{ \begin{array}{l} \text{Flujo masico} \\ \text{de entrada} \end{array} \right\} - \left\{ \begin{array}{l} \text{Flujo masico} \\ \text{de salida} \end{array} \right\} + \left\{ \begin{array}{l} \text{Flujo masico} \\ \text{de formacion} \end{array} \right\} - \left\{ \begin{array}{l} \text{Flujo masico} \\ \text{de consumo} \end{array} \right\}$$

Su representación matemática es la siguiente:

$$\frac{d(VC_i)}{dt} = F_1C_{1i} - F_2C_{2i} + Vrf_i - Vrc_i$$



$V$  = volumen del cultivo.

$F_1, F_2$  = flujo de entrada y de salida.

$C_{1i}, C_{2i}$  = concentración de entrada y salida del componente(  $i$ ).

$r_{fi}, r_{ci}$  = Velocidad de formación y de consumo del componente( $i$ ).

Modelo por lotes:

En el sistema fermentativo no tenemos ni flujo de entrada ni de salida, suponiendo que no hay consumo ni muerte de la biomasa ( $x$ ), debido a la técnica empleada para su determinación (peso seco), ya que esta incluye no solo a los microorganismos activos, sino también a los microorganismos muertos. Por lo tanto, la acumulación solo será función de la formación de esta a través del tiempo, por último, si dividimos entre el volumen, se obtiene la expresión de la producción de biomasa en términos de concentración, (ecuación 3.3).

$$\frac{dC_x}{dt} = r_{f_x} - 0 \quad (3.3)$$

Donde  $r_{f_x} = \mu(t)$  es la tasa de crecimiento específica, por lo tanto:

$$\frac{dC_x}{dt} = \mu x \quad (3.4)$$

Suponiendo que el sustrato solo se consume por la formación de la biomasa, entonces un balance de materia del consumo de sustrato se puede expresar con la siguiente ecuación (3.5).

$$\frac{d(Vc_s)}{dt} = -Vrc_s \quad (3.5)$$

Si dividimos entre el volumen y tomamos en cuenta que:  $rc_s = \mu x / Y_{X/S}$ , donde:  $Y_{X/Y}$  es el rendimiento o conversión de sustrato a biomasa, tenemos:

$$\frac{dC_s}{dt} = -\frac{\mu x}{Y_{X/S}} \quad (3.6)$$

Considerando que la tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ) de la biomasa varía en función del periodo de crecimiento en el que se encuentre la bacteria, por ejemplo: fase lag o de adaptación, fase exponencial y fase estacionaria, por lo cual, se tiene que considerar una ecuación cinética que considere el crecimiento en función del consumo de sustrato, pero que además pueda predecir las diferentes etapas del crecimiento de la bacteria, en este momento introduciremos la ecuación de Monod.

$$\mu = \mu_{max} * \frac{S}{K_s+S} \quad (3.7)$$

Donde:  $\mu_{max}$  es la máxima tasa de crecimiento, es decir la correspondiente a la fase exponencial,  $S$  es la concentración de sustrato que cambia en el tiempo y  $K_s$  es una constante que cuantifica la afinidad del microorganismo por el sustrato, en este caso por la glucosa.

Por lo tanto, para describir la variación de biomasa en función del tiempo tenemos la siguiente ecuación diferencial.

$$\frac{dx}{dt} = \left( \frac{\mu_{max} S}{K_s+S} \right) x \quad (3.8)$$

A su vez la ecuación anterior, está en función de la concentración de sustrato, la ecuación dinámica que describe el consumo de este es la siguiente.

$$\frac{dS}{dt} = -Y_{x/s} \left( \frac{\mu_{max} S}{K_s+S} \right) x - m_s x \quad (3.9)$$

Donde:  $m_s$ ; representa el coeficiente de mantenimiento, una tasa específica que describe el consumo de sustrato durante la fase estacionaria.

$$m_s = \left( \frac{g \text{ de sustrato}}{g \text{ de biomasa} \cdot \text{tiempo}} \right) \quad (3.10)$$

Los parámetros en primera instancia se pueden determinar a partir de los datos experimentales de consumo de sustrato y crecimiento de biomasa.

Coeficiente de rendimiento:

$$Y_{S/x} = \left( \frac{S_0 - S_f}{X_f - X_0} \right) \quad (3.11)$$

Donde:  $(S_0, S_f)$  son las concentraciones de sustrato inicial y final

$(X_f, X_0)$  son las concentraciones de biomasa inicial y final

Sustituyendo los valores en la ec. (3.11) .....  $Y_{S/x} = \frac{23.29076 - 15.53}{2.027 - 1.2287} = 9.7216$

Esto no es más que un balance de masa, y si idealmente todo el sustrato se convirtiera a biomasa la relación sería de 9.7216 g de glucosa consumida para formar 1 gramo de Biomasa.

Tasa de mantenimiento correspondiente a la fase estacionaria

$$m_s = \left( \frac{S_{est, inicial} - S_{est, final}}{x_{est} * t_{est}} \right) \quad (3.12)$$

Sustituyendo los valores en la ec. (3.12) .....  $m_s = \left( \frac{15.53 - 14.0588}{2.027 * 15h} \right) = 0.04838(h^{-1})$

Esta es la cantidad necesaria de sustrato para mantener una concentración de microorganismos constante en la fase estacionaria. La determinación de los parámetros del modelo de Monod ( $\mu_{max}$ , y  $K_S$ ) se realizó mediante el arreglo logarítmico presentado por Levenspiel (1985).

$$\mu_{max} * t = (M + 1) \ln \left( \frac{x}{x_0} \right) + M * \ln \left( \frac{S_0}{S} \right) \quad (3.13)$$

Donde M es igual a:

$$M = \frac{K_S}{S_0 + \frac{x_0}{Y_S}} = \frac{g}{L} \quad (3.14)$$

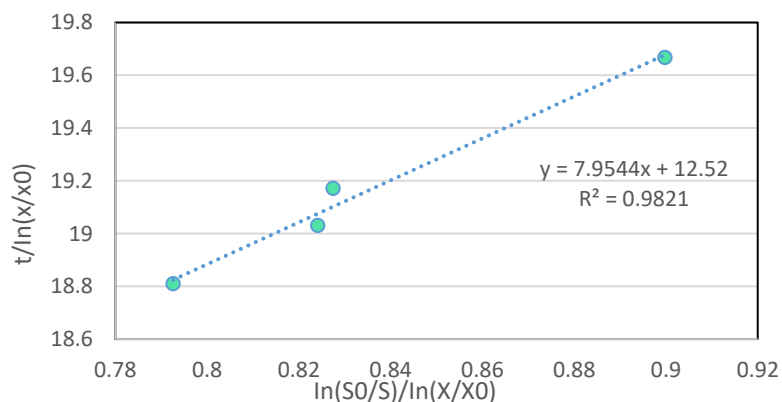
Sustituyendo la expresión M en la ecuación anterior se obtiene:

$$\mu_{max} * t = \left( \frac{K_S}{S_0 + \frac{x_0}{Y_S}} + 1 \right) \ln \left( \frac{x}{x_0} \right) + \frac{K_S}{S_0 + \frac{x_0}{Y_S}} * \ln \left( \frac{S_0}{S} \right) \quad (3.15)$$

Reordenando la expresión obtenemos:

$$\frac{t}{\ln(x/x_0)} = \frac{M+1}{\mu_{max}} + \frac{M}{\mu_{max}} \frac{\ln(S_0/S)}{\ln(x/x_0)} \quad (3.16)$$

La ecuación anterior es una línea recta, la cual nos permite obtener las constantes de una forma sencilla.



**Figura 3.3**, Representación gráfica del arreglo logarítmico presentado por Lévenspiel, y ecuación representativa

Por lo tanto, las constantes se calculan con las siguientes expresiones:

$$\mu_{max} = \frac{1}{b-m} = (h^{-1}) \quad (3.17)$$

$$\mu_{max} = 0.219 \text{ h}^{-1}$$

$$K_s = (\mu_{max}b - 1) \left( S_0 + \frac{x_0}{Y_S} \right) = (g/l) \quad (3.18)$$

$$K_s = 2.659(g/L)$$

En la siguiente Tabla 3.3 se presentan los valores de las constantes del modelo.

Parámetros	Valor
$\mu_{max}$	0.219
$K_s$	2.6598(g/L)
$Y_{S/x}$	9.7216
$m_s$	0.04838(h <sup>-1</sup> )

Tabla 3.3 Parámetros cinéticos determinados por el modelo gráfico.

La máxima tasa de crecimiento obtenida por el método gráfico, es muy cercana a la reportada por Payot y col., (1999), ellos reportan un valor de 0.28.

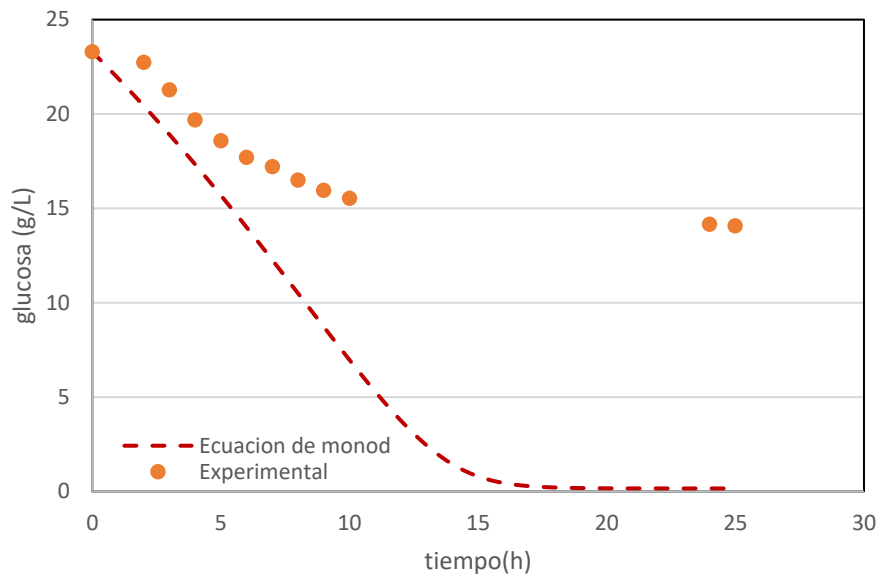
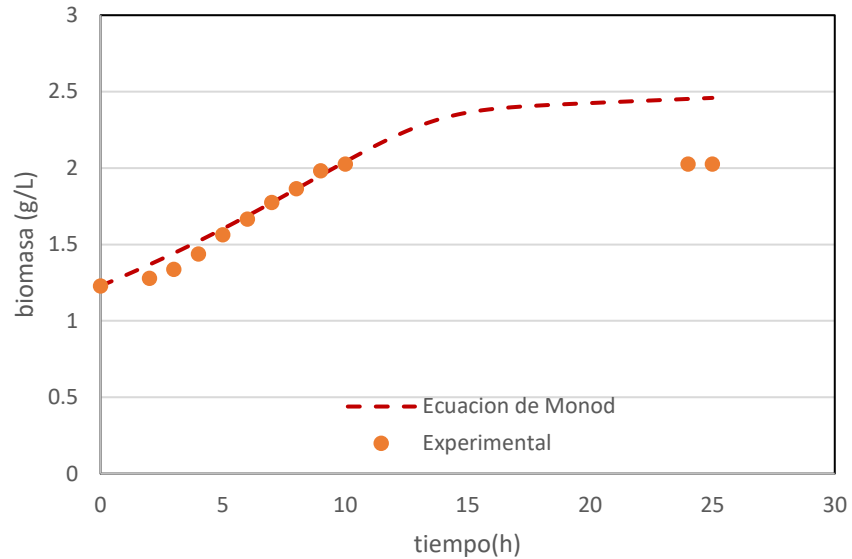
Con el objetivo de estimar la certidumbre de los parámetros obtenidos estos se incorporaron en los balances de materia dinámicos de biomasa y sustrato (ecuaciones 3.8 y 3.9, respectivamente) y se resolvieron ambas ecuaciones con el método de Runge-Kutta de cuarto orden en una hoja de excel, los resultados teóricos se compararon con los experimentales. Los nuevos parámetros reajustados para describir de forma más satisfactoria los datos experimentales son los siguientes.

En la siguiente Tabla 3.4 se presentan los nuevos valores obtenidos de las constantes del modelo.

Parámetro	Valor
$\mu_{max}$	0.11
$K_s$	3.1
$Y_{S/x}$	11.73
$m_s$	0.0479

Tabla 3.4. Parámetros reajustados obtenidos de la resolución de las ecuaciones dinámicas por el método Runge-Kutta

En las Figuras 3.4 y 3.5 se presentan las nuevas predicciones del modelo con los parámetros reajustados (ver Figs. 3.4 y 3.5).



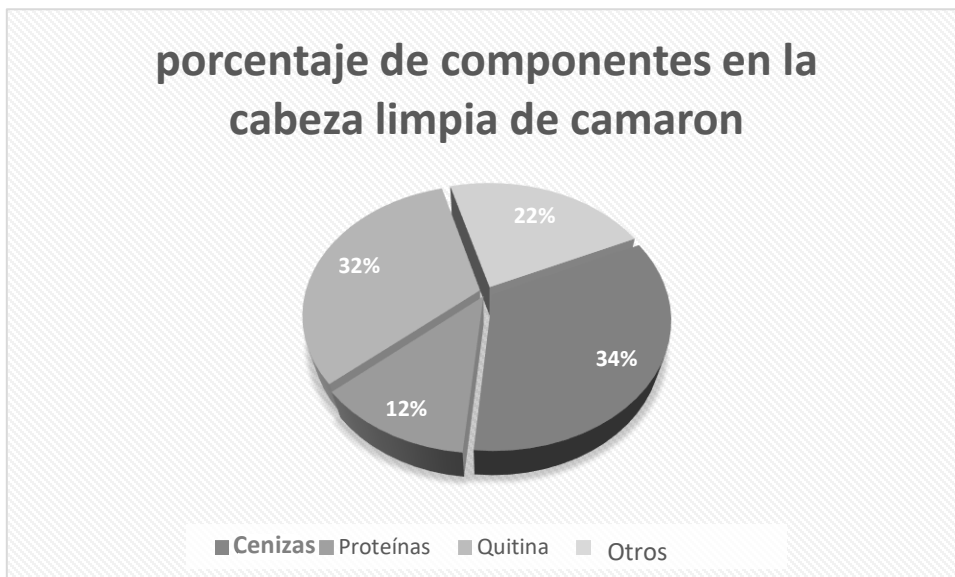
Grafica 3.3 y 3.4 Comparación grafica entre los resultados experimentales y los calculados por el modelo propuesto.

En cuanto a los resultados experimentales, representados en ambas gráficas, se denota que al principio del tiempo de fermentación existe una ligera curvatura, que indica la existencia de una fase lag o de adaptación la cual no se considera en el modelo teórico.

Si bien hasta antes de las 10 horas, el modelo teórico se sobrepone a los datos experimentales para la gráfica de biomasa, esto no ocurre igual con el comportamiento del sustrato, incluso llegando a la fase estacionaria dicha diferencia se marca mucho más; esta disminuye al incrementar el valor del parámetro( $\mu$ ), de acuerdo a la expresión matemática, un incremento en dicho parámetro representa una disminución de la cantidad de biomasa producida en la fase estacionaria, esto indica en primera instancia que es requerido un término de tasa de muerte, y que en esta parte de la curva de crecimiento es donde se lleva a cabo la mayor producción de proteasas, ambos términos, no se toma en cuenta para la expresión teórica. Por lo tanto, el error crece. Estos posibles modelos no se probaron porque no se cuenta con datos experimentales de las otras variables; Sin embargo, el modelo aquí planteado se podría utilizar para describir correctamente la fase exponencial.

### 3.3 Componentes químicos presentes en la cabeza limpia de camarón.

A continuación, en la Figura 3.5, se presentan los resultados, en forma de porcentaje, del análisis proximal realizado a la cabeza limpia del camarón.



Grafica 3.5 Principales componentes en la cabeza limpia de camarón de la especie (*Litopenaeus vannamei*).

En la Fig 3.3 se observa que la muestra tiene un mayor porcentaje de calcio representado por las cenizas, seguido en la misma proporción por la quitina y por último proteínas, la diferencia corresponde a otras sustancias presentes en la cáscara como lípidos y material etéreo. Tanto el contenido de quitina como el del calcio concuerdan con valores reportados en otros trabajos en donde se realizó análisis proximal a la coraza del camarón (Pacheco 2010).

En el presente trabajo se obtuvo un menor valor de la cantidad de proteínas en comparación con el trabajo de Pacheco en 2010, lo cual se atribuye a que el residuo de camarón se lavó previamente, eliminando proteínas residuales del tejido muscular y del tejido conectivo.

### 3.4 Análisis del contenido de Cenizas

En esta sección se presentan los resultados del análisis del porcentaje de calcio presente en la cabeza limpia de la cáscara de camarón, estimada con la ecuación (2.4) después de la etapa de calcinación.

$$\%Ca = \frac{\text{Peso de las cenizas}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

En la Tabla 3.5, se presentan los porcentajes de contenido de calcio para tres situaciones de la cabeza de camarón: a) muestra cruda, b) muestra desproteïnizada con un pretratamiento con NaOH y c) muestra desproteïnizada con un pretratamiento con NaOH y descalcificada con un pretratamiento con HCl.

Tabla 3.5 contenido de calcio en la cabeza de camarón cruda y con pre-tratamiento ácido o álcali.

Muestra	Peso crisol (g)	Muestra (g)	Peso Final (g)	Peso Ceniza (g)	Ca (%)
Cruda	12.9671	4.5479	14.4872	1.5201	33.42422
Desproteïnizada	28.2543	2.0019	29.17	0.9157	45.74155
Desproteïnizada y Descalcificada	12.967	1.0001	12.9744	0.0074	0.739926

En la Tabla 3.5 se observa que la muestra desproteïnizada, por el método químico presenta un mayor porcentaje de calcio, esto se debe, a que este se concentra en la muestra sólida al ser hidrolizadas las proteínas, las cuales pasan al medio fermentativo. Para obtener el peso de ceniza y sustituirlo en la ecuación (2.4), se tiene que restar al peso final, el peso del crisol.

## Fermentación en matraces

Posterior al análisis proximal de las muestra con/sin pre-tratamiento se determinó el calcio residual presente en la cabeza de camarón conforme avanza el tiempo de fermentación en lote.

*pH inicial = 6*

<i>t(horas)</i>	Peso crisol (g)	Muestra (g)	Peso Final (g)	Peso Ceniza (g)	Ca (%)
24	21.0737	2.068	21.8412	0.7675	37.11315
48	22.4966	2.0106	23.2536	0.757	37.65045
100	28.1815	2.0225	29.0015	0.82	40.54388

Tabla 3.6 Contenido de calcio residual por proceso fermentativo por lote a pH<sub>(inicial)</sub> = 6.

*pH inicial = 8.2*

<i>t(horas)</i>	Peso crisol (g)	Muestra (g)	Peso Final (g)	Peso Ceniza (g)	Ca (%)
24	13.6944	2.02821	14.4634	0.769	37.91521
48	20.7769	2.0175	21.5845	0.8076	40.02974
100	27.5001	2.0256	28.3137	0.8136	40.16588

Tabla 3.7. Contenido de calcio residual por proceso fermentativo por lote a pH<sub>(inicial)</sub> = 8.2.

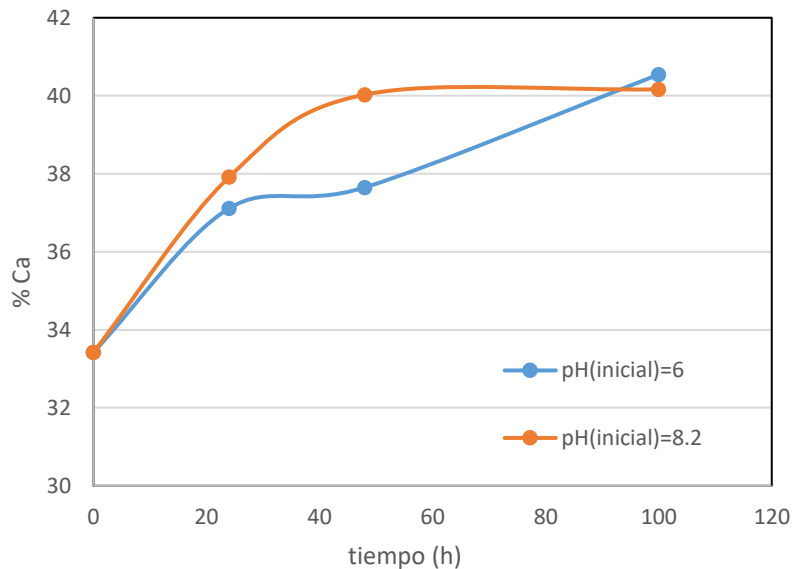
*(Cabeza- Desproteínizada) pH inicial = 6.0*

<i>t(horas)</i>	Peso crisol (g)	Muestra (g)	Peso Final (g)	Peso Ceniza (g)	Ca (%)
24	23.1474	2.007	24.0954	0.948	47.23468
48	24.8631	2.0093	25.812	0.9489	47.2254
100	33.533	2.0293	34.4874	0.9544	47.031

Tabla 3.8 Contenido de calcio residual por proceso fermentativo por lote de la muestra desproteínizada a pH<sub>(inicial)</sub> = 6.0.



En la Fig. 3.6 se presenta la evolución del calcio residual para los tres casos mencionados previamente.



**Figura 3.6** Porcentaje de calcio liberado del residuo sólido por proceso fermentativo.

En la Figura 3.4 se ve un incremento significativo en la cantidad de calcio residual conforme transcurre el tiempo de fermentación. Para el caso de la fermentación a  $\text{pH}_{(\text{inicial})}=8.2$ , se ve un incremento que va del 33.42 % al 40.16% después de 100 horas, mientras que para la fermentación a  $\text{pH}_{(\text{inicial})}=6$  el incremento va de 33.42% a 40.54%. Este aumento se debe a que la bacteria es altamente eficiente en producir proteasas para el proceso de desproteínización, en vez de ácido láctico para el proceso de descalcificación; por consiguiente la proteína se degrada, mientras que el calcio se concentra, debido a su baja solubilidad al pH de fermentación que a las 24h es cercano a 7.5, ver Figura(3.8).

Una forma de comprobar el argumento descrito anteriormente, es a través de analizar el comportamiento del proceso fermentativo en lote de la cáscara de cabeza de camarón con desproteínización previa, en donde el contenido inicial de calcio es de 45.742% y después de 100 horas de fermentación se alcanzó un 47.031%, confirmando que la bacteria *Lactobacillus Coagulans*, a pesar de que se considera como bacteria láctica tiene mayor preferencia por la producción de proteasa. De acuerdo a la Figura (3.6) el mayor grado de concentración de calcio se encontró a la fermentación de  $\text{pH}_{(\text{inicial})}=6$ , por lo tanto bajo estas condiciones se obtiene la mayor tasa de desproteínización.

A continuación se reporta los porcentajes de descalcificación obtenidos con los métodos fermentativos utilizando la bacteria *bacillos coagulans* y químico.

Porcentaje de Descalcificación-bioquímica en un periodo de 76 horas.

$$\text{Descalcificación}(\%) = \frac{\% \text{Calcio inicial} - \% \text{calcio final}}{\% \text{Calcio inicial}} \times 100$$

$$\text{Descalcificación}(\%) = \frac{47.23468 - 47.031}{47.23468} \times 100 = 0.4312\%$$

Porcentaje de Descalcificación Química en tres horas.

$$\text{Descalcificación} = \frac{33.42422 - 0.739926}{33.42422} \times 100 = 97.78\%$$

Se confirma que la bacteria no es eficiente para realizar la descalcificación de la cabeza de camarón.

### 3.5 Contenido de quitina y proteína libre en la muestra.

La determinación de la fracción de quitina en la cabeza de camarón, se determinó a través de estimar el nitrógeno presente en la estructura de la quitina (NQ), para ello se utilizó una muestra previamente desproteínizada con hidrolisis alcalina para eliminar las proteínas libres. Para determinar la proteína libre, primero se determinó el contenido de nitrógeno total (NT) de la muestra; tanto el nitrógeno de la quitina como el de la proteína libre se cuantificaron con el método de micro Kjeldahl.

El contenido de quitina fue determinado a partir de la multiplicación de NQ por el factor de 14.5, reportado para la conversión de porcentaje de nitrógeno a quitina; esto debido a que la quitina contiene alrededor de 6.9% de nitrógeno. El contenido de proteínas corregido fue obtenido por la resta de NT menos NQ y el resultado se multiplica por 6.25, este factor de conversión es para proteínas en general, asumiendo que tiene alrededor de 16% de Nitrógeno. Zakaria, Hall and Shama. (1998).

$$N(NT, NQ) = \frac{[mL(HCl) - mL(\text{blanco}) \times \text{Normalidad}(HCl) \times 14.007 \times 100]}{mg \text{ de muestra}} \quad (3.11)$$

$$\text{Quitina} = NQ * 14.5$$

$$\text{Proteína} = (NT - NQ) * 6.25$$

En las Tabla 3.9 muestran los valores promedio obtenidos de NQ y el porcentaje estimado de quitina presente en la cabeza de camarón.

*Cantidad de quitina*

<i>Muestra</i>	Masa (mg)	Volumen (HCl)	NQ	Quitina (%)
(1)	22	1.4	1.782709	31.38841
(2)	29	2.35	2.2701	32.91645
<i>Promedio</i>			2.217409	32.15243

Tabla 3.8 Contenido promedio de quitina en la muestra.

En las Tabla 3.10 se muestran los valores promedio obtenidos del NT y el porcentaje estimado de proteína libre presente en la cabeza de camarón.

*Cantidad de proteína corregida*

<i>Muestra</i>	Masa (mg)	Volumen (HCl-0.02N)	NT	NT-NQ	Proteína (%)
(1)	17.8	2.7	4.249315	2.031906	12.69941
(2)	26	3.85	4.148227	1.930818	12.06761
(3)	25.9	3.75	4.056081	1.838672	11.4917
<i>Promedio</i>			4.151208	1.933798	12.08624

Tabla 3.9 Contenido promedio de proteínas en la muestra

La Cabeza contiene 32.15% de quitina valor que coincide con el intervalo reportado del 17%.al 40%, Pacheco (2010).

### Fermentación en matraces

A continuación, se presentan los resultados obtenidos del grado de desproteínezación a través del proceso fermentativo con la bacteria *Bacilos Coagulans* a pH iniciales de 6.0 y 8.2 (ver tablas 3.10 y 3.11, respectivamente). El Porcentaje de Desproteínezación se calculó con la siguiente expresión:

$$DP(\%) = \frac{(x_0 * s_0) - (x_R * s_R)}{(x_0 * s_0)} * 100 \text{ (Pacheco, 2010).}$$

Donde  $X_0$  es la proteína en la muestra de camarón.  $X_R$  es la proteína en la muestra fermentada,  $S_0$  es el peso de la muestra de camarón en base seca y  $S_R$  es el peso de la muestra fermentada en base seca. A continuación en la Tablas 3.11y 3.12, se presentan los resultados respecto al porcentaje de proteína y quitina a diferentes tiempos de fermentación, a dos diferentes condiciones iniciales pH(6, y 8.2),obtenidos por el método micro kjeldahl

*Cantidad proteica en el sólido pH=6*

<i>tiempo (h)</i>	<i>Muestra (mg)</i>	Volumen (HCl-0.02N)	NT	NT-NQ	Proteína (%)	Quitina (%)
-------------------	---------------------	---------------------	----	-------	--------------	-------------

0			4.151208	1.933798	12.08624	32.15243
24	26.3	3.7	3.941133	1.723724	10.77327	32.15243
24	20	2.75	3.851925	1.634516	10.21572	32.15243
	<i>promedio</i>		3.896529	1.67912	10.4945	32.15243
48	21	2.8	3.7352	1.517791	9.486193	32.15243
48	19.8	2.7	3.820091	1.602682	10.01676	32.15243
	<i>promedio</i>		3.777645	1.560236	9.751477	32.15243
100	24.1	1.15	1.336768	-0.88064	≈0	19.38313
100	22.1	1.7	2.154923	-0.06249	≈0	31.24638
	<i>promedio</i>				0	25.31476

Tabla 3.11 Seguimiento de proteínas en el sólido para la fermentación por lotes, a pH<sub>(inicial)</sub> = 6.

En la Tabla 3.10 Se observa que en el intervalo de 48 a 100 horas, el porcentaje de proteína pasa de un 9.75% a 0.0%, indicando que en este transcurso de tiempo se aceleró y consumió toda la proteína que no está ligada a la quitina. En este mismo periodo se observa que el porcentaje de proteína ligada a la quitina pasa de 32.15 a 25.31, indicando que antes de cumplir 100 horas de fermentación se ha agotado la proteína libre y el microorganismo comienza a consumir la proteína de la quitina, evento que no es favorable porque el producto deseado se consume. Por lo tanto, el proceso fermentativo a pH inicial de 6.0 se debe de terminar después de las 48 horas o antes de cumplir 100 horas.

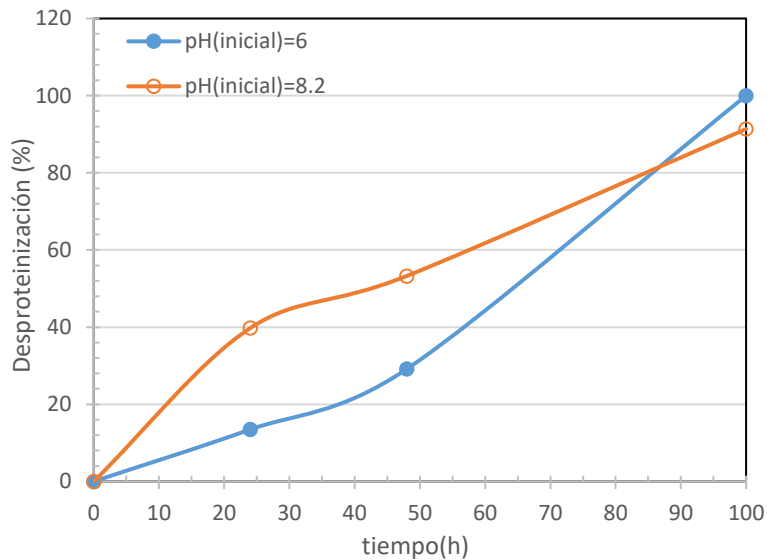
*Cantidad proteica en el sólido pH=8.2*

<i>tiempo h</i>	Muestra (mg)	Volumen (HCl -0.02N)	NT	NT-NQ	Proteína (%)	Quitina (%)
0			4.151208	1.933798	12.08624	32.15243
24	24.1	2.75	3.196618	0.979209	6.120057	32.15243
24	25.2	2.9	3.223833	1.006424	6.290152	32.15243
24	23.8	2.85	3.354618	1.137209	7.107553	32.15243
	<i>promedio</i>		3.210226	0.992817	6.205104	32.15243
48	31.2	3.25	2.918125	0.700716	4.379474	32.15243
48	22.8	2.5	3.071711	0.854301	5.339384	32.15243
	<i>promedio</i>		2.994918	0.777509	4.859429	32.15243
100	18.4	1.7	2.58825	0.370841	2.317756	32.15243
100	23.5	1.6	1.907336	-0.31007	≈0	27.65637
	<i>Promedio</i>				1.158878	29.9044

Tabla 3.12 Seguimiento de proteínas en el sólido para la fermentación por lotes, a pH<sub>(inicial)</sub> igual a 8.2.

En la Tabla 3.12 se observa que a las 100 horas de fermentación el porcentaje de proteína no ligada a la quitina es de 1.16%, indicando que en este periodo de tiempo la bacteria no ha consumido la proteína ligada a la quitina y, por consiguiente el proceso de desproteínización a pH 8.0 es más lento que a pH 6.

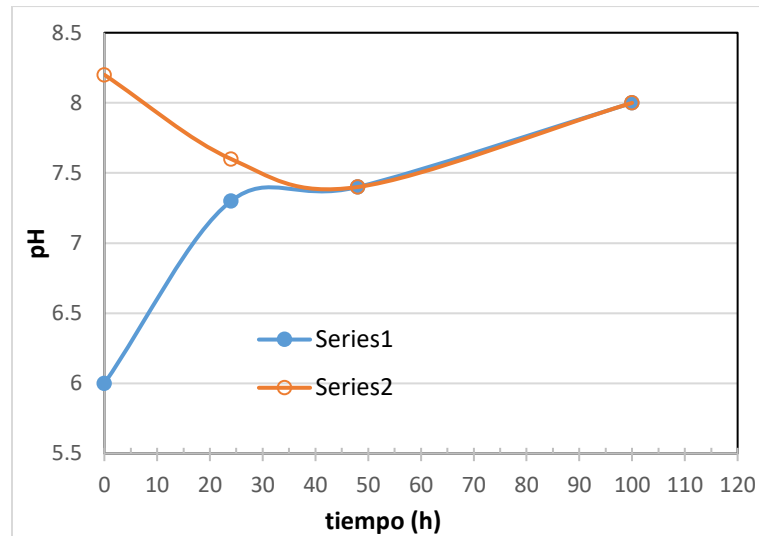
En la Figura 3.7 se muestran las tendencias de porcentaje de consumo de proteína a dos pH iniciales (6.0 y 8.2) como función del tiempo de fermentación.



Grafica 3.7 Desproteínización (%), en función del tiempo para la fermentación por lotes

De acuerdo a la gráfica podemos ver, que en resumen, *Bacillus coagulans*, demostró ser una cepa eficaz en la producción de proteasa, bajo las concentraciones de nutrientes del medio de cultivo, así como las condiciones de temperatura (37°C). El alto grado de desproteínización alcanzado a las 100 horas (100%) a pH inicial de 6.0, demuestra que la fermentación de la cascara de camarón mediante este microorganismo, es idóneo para sustituir a la desproteínización química, dando como resultado un caldo rico en proteínas hidrolizadas con potencial como suplemento alimenticio.

Por último, en la Figura 3.8 se muestra la evolución del pH durante la fermentación para las dos condiciones de pH inicial (6.0 y 8.2).



Grafica 3.8 Seguimiento de la acidez, a través del tiempo para la fermentación de cáscara de camarón, por *Bacillus coagulans*, en medio MRS a 37°C.

En la Fig. 3.8 se observa que cuando la fermentación inicia a un pH ligeramente ácido (pH=6) el valor del pH del proceso tiende a aumentar, mostrando dos cambios de pendiente, indicando que posiblemente hay dos etapas de procesos, mientras que a pH inicial ligeramente básico (pH=8.2) el valor de pH tiende a disminuir y posteriormente llega a un mínimo y aumenta, algo importante de resaltar es que a un tiempo de fermentación de aproximadamente de 40 horas de fermentación, en ambas fermentaciones se alcanza un valor de aproximadamente de 7.4 y en adelante la tasa de cambio de pH es la misma alcanzando el mismo valor de pH al final de la fermentación.

Ya que en la fermentación sin el sustrato, de cabeza de camarón el pH solo tiende a disminuir, este igualamiento en el pH, se debe a que el sustrato forma una solución tampón al irse degradando por la acción bacteriana.

Lo anterior coincide con lo reportado por (Nagalakshmi, y colaboradores,2010.), donde se reporta la producción de proteasas, por parte de la cepa *Bacillus coagulans*. En este se menciona el inicio de la producción de proteasa antes de las 6 h, con un incremento bajo, esto hasta las 10 horas, que es cuando entra a la fase estacionaria, alcanzando, la actividad máxima de proteasa de 2308 U / ml a las 24h. En el mismo estudio, se encontró por electroforesis una única banda de proteína correspondiente a un peso molecular de 36KDa, peso molecular correspondiente a las proteasas (ver Fig. 3.9).

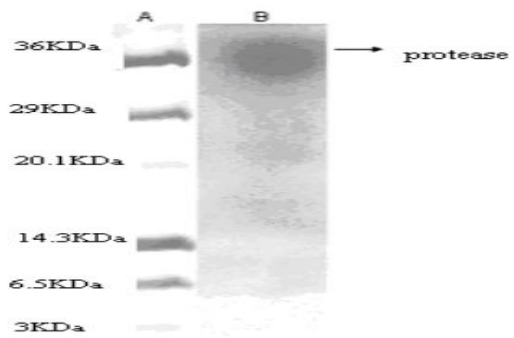


Fig.3.9 Electroforesis para determinar el peso molecular de la enzima proteasa segregada por *Bacillus coagulans* (Nagalakshmi et al, 2010).

## Conclusiones:

- se encontró que, a las condiciones de trabajo, 37°C, 150rpm y composición del medio, la bacteria, es ineficiente en la desmineralización por producción de ácido láctico.
- La bacteria *Lactobacillus sporogenes* efectúa en alto grado la desproteínización, a pH que van de 7.3 a 8, debido a la secreción, y actividad de proteasas, por parte del microorganismo. (Si bien existe un grado de descalcificación debido a la producción de ácido láctico, el grado en el que actúa, no fue posible determinarlo con precisión, incluso, parece carente en comparación a la desproteínización).
- La baja descalcificación se debe a la baja concentración de ácido en el medio y la alta concentración de carbonatos y fosfato de la cabeza, los cuales llegan al equilibrio, propiciando un pH alrededor de 7.5, donde se encuentran disueltos en baja cantidad.
- Utilizar *Bacillus Coagulans* para la desproteínización, como proceso de purificación de la cáscara de camarón hacia la obtención de quitina fue equivalente a una hidrólisis química; sin embargo, a diferencia de esta, el método bioquímico trae ventajas, como la disminución de residuos, y la utilización de los mismos como posibles suplementos alimenticios.
- Se logró proponer un modelo matemático el cual representa, al proceso durante la fase exponencial, es decir hasta las 10h, dicho modelo es indispensable para lograr obtener un escalamiento posterior, de la fermentación por lotes.



**Perspectivas:**

En cuanto a la Cinética, nuestro modelo, así como los parámetros obtenidos son representativos del comportamiento experimental, durante la fase exponencial por lo que para tener una mayor representación de todas las partes del comportamiento bacteriano, es necesario, incluir más factores involucrados, así como sus parámetros correspondientes, por ejemplo, realizar el seguimiento de productos. Sin embargo, para nuestro objetivo de llegar a conocer de manera básica lo que implica la ingeniería bioquímica a la hora de transformar materiales de origen orgánico, es más que suficiente el modelo de Monod.

En cuanto a las condiciones de fermentación, se podría en un principio plantear la idea de una cofermentación con una bacteria láctica como *Lactobacillus acidophilus*, para obtener un grado alto de desmineralización. Otro ajuste experimental es que al ser una bacteria termófila, podemos incrementar la temperatura, para no tener que trabajar en medio estéril, y ver el efecto en la producción de proteasas y ácido láctico.

Otra condición adicional es variar tanto la cantidad como la fuente de carbono y nitrógeno, optimizando el proceso, ya que esto abarataría costos; en el caso que se decidiera escalar, una simple modificación es no limpiar la cabeza y utilizar el alto contenido de proteínas en la harina de cabeza de camarón como fuente de nitrógeno, mientras que se puede optar por la cáscara de frutas y tubérculos hidrolizados, para obtener los azúcares como fuente de carbono (Nagalakshmi et al, 2010).

## **Bibliografía, y Cibergrafía:**

1. Z. Zakaria, G. M. Hall and G. Shama. (1998). Lactic acid fermentation of scampi bwaste in a rotating horizontal bioreactor for chitin recovery. *Process Biochemistry*, 33, 1-6.
2. C.Vázquez,A.I de Cos y C.López-Nomdedeu. (2005). *Alimentación y Nutrición Manual Teórico Práctico*. España: Díaz de Santos.
3. Lárez Velásquez, Cristóbal,(2006) Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances en Química [en línea]* [Fecha de consulta: 19 de enero de 2017] Disponible en:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93310204>> ISSN 1856-5301
4. Peter Vander, Kjell M. Vårum, Alain Domard, Nour Eddine El Gueddari, and Bruno M. Moerschbacher. (1998). Comparison of the Ability of Partially N-Acetylated Chitosans and Chitooligosaccharides to Elicit Resistance Reactions in Wheat Leaves1. *Plant Physiology*, 118, 1353–1359.
5. K.V. Harish Prashanth, R.N. Tharanathan. (2007). Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential—an overview. *Trends in Food Science & Technology*, Volumen 18, Pages 117–131.
6. Minke, John Blackwell. (1978). The structure of  $\alpha$ -chitin. *Journal of Molecular Biology*, volumen 120, Pages 167–181.
7. S. Bartnicki-Garcia ,Walter J. Nickerson.. (1962). Isolation, composition, and structure of cell walls of filamentous and yeast-like forms of *Mucor rouxii*. *Biochimica et Biophysica Acta*, Volume 58, Issue 1, Pages 102-119.
8. George A. F. Roberts. (1992). *Chitin Chemistry*. Reino Unido: Macmillan Education
9. Roció Trinidad Velazquez Cayon. (2005). Tejido óseo, composición y función. En *Estudio del comportamiento in vitro de osteoblastos, cultivados sobre superficies de implantes dentales*(7-25). Sevilla: Universidad de Sevilla.
10. Józef Synowiecki .Nadia Ali Al-Khateeb, (2003). Production, Properties, and Some New Applications of Chitin and Its Derivatives. *Journal Critical Reviews in Food Science and Nutrition* , Volume 43, Pages 145-171.
11. Fereidoon Shahidi, †, Reem Abuzaytoun†. (2005). Chitin, Chitosan, and Co-Products: Chemistry, Production, Applications, and Health Effects. *Advances in Food and Nutrition Research*, Volume 49, Pages 93–135
12. Peralta Lobato Gonzalez,(1992) *Estudio Socioeconómico del Cultivo de Camarón Realizado por Sociedades Cooperativas*. México, D.F.: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
13. Aline Percot , Christophe Viton , and Alain Domard \*. (2003). Optimization of Chitin Extraction from Shrimp Shells. *Biomacromolecules*, 4 (1), pp 12–18
14. P. Sorlier, A. Denuzière, C. Viton, A. Domard,(2001) Relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan, *Biomacromolecules*, pp.765–772.
15. E. Khor,(2001) *Chitin: Fulfilling a Biomaterials Promise*, Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands.
16. Wassila Arbia, Leila Arbia, Lydia Adour, and Abdeltif Amrane.(2013) Chitin Recovery Using Biological Methods, *Food Technol. Biotechnol.* 51 (1) 12–25

17. Charoenvuttitham, Pratyasha, John Mittal, Gauri S. (2006). Chitin Extraction from Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) Waste using Organic Acids. *Separation Science and Technology*, Volume 41, Pages 1135-1153.
18. S. V. Nemtsev, A. I. Gamzazade, S. V. Rogozhin, V. M. Bykova, V. P. Bykov. (2002). Deacetylation of Chitin under Homogeneous Conditions. *Applied Biochemistry and Microbiology*, Volume 38, pp 521–526.
19. Mauricio Cabarcas Lorduy, Wilfredo Marimón Bolívar, Mauricio Miranda Marzola (2011). Marco Teórico en Diseño de un Proceso Económico y Competitivo Para la Extracción de Quitina y Producción de Quitosano a Partir de Exoesqueleto de Camarón. Colombia Universidad de Cartagena Facultad de Ingenierías Ingeniería química. Cartagena.
20. Synowiecki, Józef, and Ali Al-Khateeb Nadia. (2003). Production, Properties, and Some New Applications of Chitin and Its Derivatives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Volume 43, Pages 145-171.
21. Paul Beaney, Jaime Lizardi-Mendoza, Michael Healy. (2005). Comparison of chitins produced by chemical and bioprocessing methods. *Chemical Technology and Biotechnology*, Volume 80, Issue 2, Pages 145–150.
22. Y Moret, J Moreau. (2012). The immune role of the arthropod exoskeleton. *Bio geosciences*, 200-203.
23. Ana M. Petriella y Enrique E. Bosch. (1997). Crecimiento en crustáceos decápodos: resultados de investigaciones realizadas en Argentina. *Investigaciones marinas*, v.25, 135-157.
24. Erard Del Vare, Hebri-Pierre Aberle, Bruno Michel y Alberto Figueroa. (1989). Les insectes D'Afrique et D'Amérique tropicale clés pour la reconnaissance des familles. France : centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement.
25. L. Serna-Cock & A. Rodríguez-de Stouvenel. (2005). Producción Biotecnológica del ácido láctico. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5:1, 54-65
26. E. W. J. van Niel, B. Hahn-Hägerdal. (1999). Nutrient requirements of lactococci in defined growth media. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52:5, 617–627.
27. Se-Kwon Kim. (2011). Chapter 4 Enzymatic Production of chitin from crustacean shell waste. In chitin, chitosan, oligosaccharides and their derivatives (37-46). United States of America: CRC Press Taylor and Francis Group.
28. Luis A. Cira, Sergio Huerta, George M. Hall, Keiko Shirai. (2002). Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemistry*, 37:12, Pages 1359–1366.
29. (Imen Hamed, Fatih Ozogul, Joe M. Regenstein. (2015). Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chito-oligosaccharides): A review. *Trends in Food Science & Technology*, 48, 40-50.
30. Tharanathan RN, Kittur FS. (2003). Chitin--the undisputed biomolecule of great potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(1), 61-81.

31. Jeon, Kamil y Shahidi . (2002). Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and atlantic cod.. *journal of agriculture and*, 50 (18), pp 5167–5178.
32. Rejane C. Goy; Douglas de Britto; Odilio B. G. Assis. (2009). A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros*, vol.19 no.3
33. Andrés Ayala , Marinela Colina, José Molina , José Vargas , Dianela Rincón , Jairo Medina , Lester Rosales , Harvey Cárdenas. (2014). Evaluación de la actividad antifúngica del quitosano contra el *Mycosphaerella Fijiensis* Morelet que produce la Sigatoka negra que ataca el plátano. *Iberoamericana de Polímeros* , Volumen 15(6), 312-338.
34. V.R Sinha, , A.K Singla, S Wadhawan, R Kaushik, R Kumria, K Bansal, S Dhawan. (2003). Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 274, Issues 1–2, Pages 1–33.
35. Brahatheeswaran Dhandayuthapani, Yasuhiko Yoshida, Toru Maekawa, and D. Sakthi Kumar. (2011). Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. *International Journal of Polymer Science*, 2011, 19 pages.
36. Eugene Khora, Lee Yong Limb. (2003). Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*, Volume 24, Issue 13, Pages 2339–2349.
37. Dinesh K. Singh and Alok R. Ray . (2000). Biomedical Applications of Chitin, Chitosan, and Their Derivatives. *journal of Macromolecular, Science, Part C. Polymer Reviews*, 40 issue 1, Pages:69-83.
38. Shi Xin-Yuan Tan Tian-Wei. (2004). New Contact Lens Based on Chitosan/Gelatin Composites. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 19 issue
39. Pierfrancesco Morganti. (2010). Use and potential of nanotechnology in cosmetic dermatology. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, Volume 2010:3 , Pages 5—13.
40. Sania Mansouri, Patrick Lavigne, Karin Corsi, Mohamed Benderdour, Eric Beaumont, Julio C Fernandes. (2004). Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: strategies to improve transfection efficacy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Volume 57, Issue 1, Pages:1-8.
41. María B. Vásconeza, Silvia K. Floresb, Carmen A. Camposb, Juan Alvaradoa, Lía N. Gerschensonb, . (2009). Antimicrobial activity and physical properties of chitosan–tapioca starch based edible films and coatings. *Food Research International*, Volume 42, Issue 7, , Pages 762–769.
42. Dunn H, Farr M 1971. US 3847897 A. Farr, San Pedro, Californ, assignors to Ralston Purina Company, St. (APA, 2010, p.3,847,897 microcrystalline chitin Howard J. Dunn, Lomita, and M. Paul Farr, San Pedro, Calif, assignors to Ralston Purina Company, St. Louis, MO. N Drawing. Filed Sept. 7, 1971, Ser. No. 178,457
43. C.K.S. Pillai, Willi Paul, Chandra P. Sharma. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, Volume 34, Issue 7, Pages 641–678.

44. Mohdariffin Abu Hassan, Tan Pei Li, Zainura Zainon Noor (2009). COAGULATION AND FLOCCULATION TREATMENT OF WASTEWATER IN TEXTILE INDUSTRY USING CHITOSAN. *Journal of Chemical and Natural Resources Engineering*, Vol.4(1), pp.43-53.
45. Lárez Velásquez, Cristóbal. (26-Mar-2008). Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica.. 28/03/2017, de SABER ULA Sitio web: <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/16830/1/udo-agricola2008.pdf>
46. Z. Zakaria, G. M. Hall and G. Shama\*. (1998). Lactic acid fermentation of scampi waste in a rotating horizontal bioreactor for chitin recovery. *Process Biochemistry*, Vol. 33, No. 1, pp. 1-6.
47. M.G. Healy, C.R. Romo, R. Bustos,(1994) Bioconversion of marine crustacean shell waste, *Resour. Conserv. Recycl.* 11 139–147.
48. M. Healy, A. Green, A. Healy, (2003). Bioprocessing of marine crustacean shell waste, *Acta Biotechnol.* 23 151–160.
49. Z. Zakaria, G.M. Hall, G. Shama, (1997) Lactic acid fermentation of scampi waste in a rotating horizontal bioreactor for chitin recovery, *Process Biochem.* 33 1–6.
50. M.S. Rao, J. Muñoz, W.F. Stevens,(2000) Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54 808–813
51. O. Cremades, E. Ponce, R. Corpas, J.F. Gutiérrez, M. Jover, M.C. Alvarez-Ossorio.(2001) , Processing of crawfish (*Procambarus clarkii*) for the preparation of carotenoproteins and chitin, *J. Agric. Food Chem.* 49 5468–5472.
52. J. Bautista, M. Jover, J.F. Guttierrez, R. Corpas, O. Cremades, E. Fontiveros y col(2001)., Preparation of crayfish chitin by in situ lactic acid production, *Process Biochem.* 37 229– 234.
53. W.J. Jung, J.H. Kuk, K.Y. Kim, R.D. Park,(2005) Demineralization of red crab shell waste by lactic acid fermentation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67 851–854.
54. L. Adour, W. Arbia, A. Amrane, N. Mameri,(2008) Combined use of waste materials – Recovery of chitin from shrimp shells by lactic acid fermentation supplemented with date juice waste or glucose, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83 1664–1669.
55. T.K. Sini, S. Santhosh, P.T. Mathew,(2007) Study on the production of chitin and chitosan from shrimp shell by using *Bacillus subtilis* fermentation, *Carbohydr. Res.* 342 2423– 2429.
56. S.L. Wang, S.H. Chio,(1998) Deproteinization of shrimp and crab shell with the protease of *Pseudomonas aeruginosa* K-187 – Waste pretreatment, enzyme production, process design, and economic analysis, *Enzyme Microb. Technol.* 22 629– 633.
57. Y.S. Oh, I.L. Shih, Y.M. Tzeng, S.L. Wang,(2000) Protease produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 and its application in the deproteinization of shrimp and crab shell wastes, *Enzyme Microb. Technol.* 27 3–10

58. K.T. Oh, Y.J. Kim, V.N. Nguyen, W.J. Jung, R.D. Park,(2007) Demineralization of crab shell waste by *Pseudomonas aeruginosa* F722, *Process Biochem.* 42 1069–1074.
59. G.H. Jo, W.J. Jung, J.H. Kuk, K.T. Oh, Y.J. Kim, R.D. Park,(2008) Screening of protease-producing *Serratia marcescens* FS-3 and its application to deproteinization of crab shell waste for chitin extraction, *Carbohydr. Polym.* 74 504–508.
60. I. Sorokulova, A. Krumnow, L. Globa, V. Vodyanoy,(2009) Efficient decomposition of shrimp shell waste using *Bacillus cereus* and *Exiguobacterium acetylicum*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36 1123–1126.
61. . S.L. Wang, T.Y. Kao, C.L. Wang, Y.H. Yen, M.K. Chern, Y.H. Chen,(2006) A solvent stable metalloprotease produced by *Bacillus* sp. TKU004 and its application in the deproteinization of squid pen for b-chitin preparation, *Enzyme Microb. Technol.* 39 724–731
62. N. Bhaskar, P.V. Suresh, P.Z. Sakhare, N.M. Sachindra,(2007) Shrimp biowaste fermentation with *Pediococcus acidolactici* CFR2182: Optimization of fermentation conditions by response surface methodology and effect of optimized conditions on deproteinization/demineralization and carotenoid recovery, *Enzyme Microb. Technol.* 40 1427–1434.
63. W. Choorit, W. Patthanamane, S. Manurakchinakorn,(2008) Use of response surface method for the determination of demineralization efficiency in fermented shrimp shells, *Bioresour. Technol.* 99 6168–6173.
64. . Y. Xu, C. Gallert, J. Winter,(2008) Chitin purification from shrimp wastes by microbial deproteinization and decalcification, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79 687–697.
65. O. Aytekin, M. Elibol, (2010)Cocultivation of *Lactococcus lactis* and *Teredinobacter turnirae* for biological chitin extraction from prawn waste, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 33 393–399.
66. W.J. Jung, G.H. Jo, J.H. Kuk, K.Y. Kim, R.D. Park,(2006) Extraction of chitin from red crab shell waste by cofermentation with *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* KCTC-3074 and *Serratia marcescens* FS-3, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71 234–237.
67. J. Waldeck, G. Daum, B. Bisping, F. Meinhardt,(2006) Isolation and molecular characterization of chitinase-deficient *Bacillus licheniformis* strains capable of deproteinization of shrimp shell waste to obtain highly viscous chitin, *Appl. Environ. Microbiol.* 72 7879–7885.
68. Salazar,Lizardi,Ramírez, García,Ezquerro, Valenzuela,Carvallo, Lugo y Pacheco.(2014). Utilización de materiales a base de quitina y quitosano en la inmovilización de proteasas: efectos en sus estabilización y aplicaciones. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, Vol. 13, No. 1, 129-150.
69. R. Nagalakshmi , A. Rebekkah Shanthakumari and S. Ramesh . ( 2010). Media Optimization and Scaleup of Protease by *Bacillus coagulans* MTCC 492. *Journal of Ecobiotechnology*, 2/2, 1-10.
70. Almudena León Martín. (1999). *Desarrollo de Modelos Cinéticos para Bioprocesos: Aplicación a la Producción de Xantano*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid Facultad de Ciencias Químicas.

71. Shishir Chundawat, Venkatesh Balan, Bruce E Dale. (2007). Effect of particle size based separation of milled corn stover on AFEX pretreatment and enzymatic digestibility. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 96, pp.219-231.
72. T. Payot, Z. Chemaly, and M. Fick. (1999). Lactic acid production by *Bacillus coagulans*—Kinetic studies and optimization of culture medium for batch and continuous fermentations. *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 24, Issues 3–4, Pages 191–199.
73. Yahara Gracia Alvarado. (2007). MODELADO Y ESTIMACION DE PROCESOS DE FERMENTACION. SAN NICOLAS DE LOS GARZA, NUEVO LEON: UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON FACULTAD DE INGENIERIA MECANICA Y ELECTRICA DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO.

## Anexo

### Lista de materiales y reactivos utilizados en la parte experimental

Reactivos	Material
<b>Tamaño de partícula</b>	
<b>cabeza de camarón Limpia sin vísceras</b>	Estufa (de secado por convección gravitacional quincylab)
	Trituradora (MR 430 CA Multiquick mezclador manual)
	Serie de Tamices secuencia IUSA wstyler No.(8,12,16,20,30,40), tapa y charola
	Rotap( modelo Rx-29 wstyler)
	Parrilla de calentamiento con agitador magnético

reactivos	Material	cantidad
<b>Hidratación de bacterias liofilizadas</b>		
<b>Lactobacillus sporogenes, liofilizados, micro encapsulados marca Farmacia del ahorro, 1 sobre 200mg</b>	Autoclave modelo 25x-1 all american	-
<b>NaCl</b>	Mechero bunsen	2
	Matraz Erlenmeyer 50mL	1
	Matraz volumétrico 100mL	1
	Pipeta volumétrica 10mL	2
	Torunda	1
	Parrilla de calentamiento con agitador magnético	1
	Barra de agitación	1
	Propipeta	1
	Vaso de pp 50mL	1

reactivos	Material	cantidad
<b>Preparación del pre-inoculo</b>		
<b>Medio de cultivo MRS, caldo</b>	Autoclave modelo 25x-1 all american	-
<b>Agua destilada</b>	Matraz Erlenmeyer 250mL	1
	Probeta 100mL	1
	Torunda	1
	Parrilla de calentamiento con agitador magnético	1
	Mechero bunsen	2



reactivos	Material	cantidad
<b>Desproteínización y descalcificación vía fermentativa en matraces</b>		
<b>Ácido acético glacial</b>	Autoclave modelo 25x-1 all american	-
<b>NaOH</b>	Matraz Erlenmeyer 125MI	10
<b>Medio de cultivo MRS, caldo</b>	Mechero bunsen	2
<b>Agua desionizada</b>	Torunda	10
<b>Polvo de cabeza de camarón</b>	Probeta 100MI	1
<b>Agua desionizada</b>	Probeta 1L	1
	Agitador orbital con control de temperatura	-
	Medidor de Ph Hanna Instruments HI22091-01	-
	Balanza electronica) OHAUS Scout Pro	-
	Estufa (de secado por convección gravitacional quincylab)	-
	Matraz Erlenmeyer 1L	1
	Papel aluminio	
	Matraz volumétrico 0.5L	1
	Gotero	1
	Vaso de pp 100MI	1
	Matraz Erlenmeyer	

reactivo	Material	cantidad
<b>Método fenol sulfúrico para seguimiento de glucosa</b>		
<b>Glucosa</b>	Matraz volumétrico 100mL	20
<b>fenol</b>	Tubos de ensayo	28
<b>Agua destilada</b>	Gradilla	
<b>Ácido sulfúrico</b>	Espectrofotómetro Thermo scientific(Genesys 10s uv-vis	-
<b>Sulfato de Zinc 10%</b>	Celdas de cuarzo	2
<b>NaOH 0.05n</b>	Micro pipeta 10 a 100µL sartorius	
	Micro pipeta 100 a 1000µL sartorius	
	Balanza electronica) OHAUS Scout Pro	
	Puntas para micro pipeta esteriles	28

reactivo	Material	cantidad
<b>Método de cuantificación de calcio</b>		
Polvo de cabeza de camarón	Crisol	12
Polvo de cabeza de camarón con pre tratamiento químico	Mufla Thermolyne	-
	Balanza electronica OHAUS Scout Pro	-

reactivo	Material	cantidad
<b>Método de cuantificación de proteína</b>		
Oxido de mercurio	Matraz volumétrico 100mL	1
	Matraz volumétrico 0.5L	2
	Matraz kjendhal	6
Sulfato de potasio	Balanza electronica OHAUS Scout Pro	-
Agua destilada	Pipeta graduada 10MI	1
Ácido sulfúrico 96%	Matraz erlenmayer 50mL	24
Ácido bórico	A-50305 Aparato Digestor Micro-Kjeldahl de 6 lugares Scorpion scientific	
NaOH	A-50304 Destilador Micro-Kjeldahl Scorpion scientific	
Indicador verde de metil-rojo-bromocresol	Matraz Erlenmeyer 125mL	24
Ácido clorhídrico	Bureta 10mL	1
	Soporte universal y pinzas	1
	Parrilla de calentamiento con agitador magnético	1
	Micro pipeta 100 a 1000µL sartorius	1