

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA**

**FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL**



**TESIS**

**OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN  
PARA LA HIDRÓLISIS DE PROTEÍNAS EN RESIDUOS DE  
LANGOSTINOS (*Litopenaeus vannamei*) EMPLEANDO UNA  
BACTERIA PROTEOLÍTICA (*Shewanella* sp.)**

PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

**INGENIERO AMBIENTAL**

ELABORADO POR:

**AGUILAR VASQUEZ, ALEXA GABRIELA**

ASESORA:

DRA. MARÍN HUACHACA, NÉLIDA SIMONA

LIMA - PERÚ

2022

**DEDICATORIA**

En memoria de mis padres, quienes fueron en vida G. Yovana Vasquez Hurtado, Chef, y Gabriel F. Aguilar Cori, Ing. Civil, por su apoyo incondicional, su esfuerzo, lo he logrado para que desde el cielo estén más orgullosos.

A mi hermanita, V. Jazumy, quien es mi motor y motivo en esta vida, deseando ser su ejemplo.

A Giancarlo, quien es mi compañero de vida que Dios me puso en el camino, quien me ha dado su apoyo incondicional en todo momento.

## AGRADECIMIENTO

A Dios por darme salud, bienestar, prosperidad y por bendecir a mi familia. A la vida por enseñarme a ser siempre agradecida.

A mis padres quienes fueron en vida, Yovana y Gabriel, ambos ejemplos de vida; por el esfuerzo, por sus consejos, confianza, cariño, apoyo incondicional, su perseverancia y los valores inculcados en mí.

A mi asesora, Dra. Nélide Simona Marín Huachaca por su tiempo, consejos y los amplios conocimientos transferidos.

A mi co-asesor, MSc. Víctor Miguel Albrecht Ruiz por su tiempo, confianza, orientación, sugerencias, paciencia y consejos a lo largo del tiempo que nos conocemos.

A la Universidad Nacional de Ingeniería, en especial a las personas que conforman y son parte de la Facultad de Ingeniería Ambiental quienes apoyaron a mi formación académica y profesional con los que estaré eternamente agradecido.

Al Instituto Tecnológico de la Producción (ITP) por la oportunidad, a los investigadores, Eduardo, Yanina y Vanesa, por el seguimiento, tiempo, conocimientos impartidos, apoyo, confianza, paciencia y la infraestructura concedida, DIDITT – Laboratorio de Biotecnología al ITP, donde se llevaron a cabo los experimentos, para el desarrollo de este trabajo de investigación.

A Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT) por el apoyo financiero de la tesis presentada, que fue parte del proyecto “Obtención de enzimas recombinantes tipo proteasa y lipasa de cepas bacterianas nativas, mediante clonación y expresión de genes, para biorremediación y aprovechamiento de residuos pesqueros” con el Convenio N°161-2017-FONDECYT.

Eternamente agradecida

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo de investigación fue optimizar las condiciones de operación para la hidrólisis de proteínas de residuos de langostinos (RL), que permita, mediante el empleo de una cepa proteolítica, desproteínizar los RL, como paso preliminar para su adecuado manejo obteniendo una variedad de productos como hidrolizados proteicos, quitina, quitosano, astaxantina, sales de calcio, etc.

Se evaluaron dos cepas bacterianas RL-08 y RL-42, de los géneros *Shewanella* sp. y *Bacillus* sp. respectivamente. Estas cepas fueron escogidas por su capacidad proteolítica, las cuales provienen del Laboratorio de Biotecnología del Instituto Tecnológico de la Producción (ITP) el cual, cuenta con un banco de cepas.

Los resultados indicaron que la cepa RL-08 tuvo un mayor crecimiento en residuos de langostinos y fue más efectiva en desproteínizar los mismos en comparación a la cepa RL-42. Se realizó la optimización del bioproceso de DP mediante la metodología de superficie respuesta (MSR) empleando la cepa RL-08, para ello fueron evaluadas tres variables independientes por su efecto sobre el bioproceso de DP de residuos de langostino.

La MSR consideró los efectos individuales y de interacción de las variables independientes temperatura (30, 35 y 40°C), tiempo (30, 42 y 54 horas) y cantidad de residuo de langostino (10, 17 y 24 p/v); mientras que las respuestas fueron porcentaje de desproteínización (%DP) y proteína soluble (mg de albúmina). Los resultados mostraron que la cepa RL-08 en su mejor ensayo (35°C, 42 horas y 28.8 p/v) fue capaz de reducir el contenido de proteína de los residuos de langostinos en un 79.5% (%DP), generando 207.4 mg de proteína soluble (mg de albúmina); sin embargo, el proceso no logró ser optimizado mediante la MSR.

Palabras clave: Residuos de langostinos, desproteínización, optimización de bioprocesos.

## ABSTRACT

The objective of the present investigation was to optimize the operating conditions for the hydrolysis of shrimp waste proteins (LR), which allows, through the use of a proteolytic strain to deproteinize the LR, as a preliminary step for their adequate management, obtaining a variety of products such as protein hydrolysates, chitin, chitosan, astaxanthin, calcium salts, between others.

Two bacterial strains RL-08 and RL-42, of the genera *Shewanella* sp. and *Bacillus* sp. respectively were evaluated. The strains were chosen for their proteolytic capacity and come from the Biotechnology Laboratory of the Instituto Tecnológico de la Producción (ITP), which has a bank of strains.

The results indicated that RL-08 strain had a higher growth in shrimp waste and was more effective in desproteinizing them than when the RL-42 strain was used. The optimization of the DP bioprocess was carried out using the RL-08 strain through the use of the response surface methodology (RSM), for which three independent variables were evaluated for their effect on the DP bioprocess of shrimp waste.

The RSM considered the individual and interaction effects of the independent variables temperature (30, 35 and 40°C), time (30, 42 and 54 hours) and amount of shrimp waste (10, 17 and 24 w/v); while the responses were percentage of desproteinization (%DP) and soluble protein (mg albumin). The results showed that RL-08 strain in its best assay (35°C, 42 hours and 28.8 w/v) was able to reduce the protein content of shrimp waste by 79.5% (%DP), generating 207.4 mg of soluble protein (mg of albumin); however, the process could not be optimized by RSM.

Keywords: Shrimp waste, deproteinization, bioprocess optimization.

## PRÓLOGO

El presente trabajo de investigación, sirve como Tesis de grado para obtener el título de Ingeniero Ambiental y queda enmarcado dentro del Proyecto: “Obtención de enzimas recombinantes tipo proteasa y lipasa de cepas bacterianas nativas, mediante clonación y expresión de genes, para biorremediación y aprovechamiento de residuos pesqueros” y fue financiado por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico e Innovación Tecnológica (FONDECYT) con Convenio N° 161-2017-FONDECYT. Fue realizado en el Laboratorio Biotecnología de la Dirección de Investigación, Desarrollo, Innovación y Transferencia Tecnológica (DIDITT) del Instituto Tecnológico de la Producción (ITP), bajo la supervisión del personal que labora en dicho proyecto.

En trabajos previos realizados en el laboratorio de Biotecnología de la DIDITT se aislaron cepas microbiológicas con algunas características que pueden ser aprovechadas en procesos bioquímicos industriales disminuyendo a la vez el uso de sustancias químicas contaminantes.

Parte de la problemática actual en el norte de Perú es la contaminación generada por los residuos provenientes del cultivo de langostinos. Estos residuos contienen algunas moléculas de interés comercial, sin embargo, para ser extraídas es necesario el uso de sustancias químicas que también podrían afectar el medio ambiente; buscándose así nuevas alternativas eco-amigables de extracción.

El contenido de proteína en los residuos de langostino es una barrera para la obtención de quitina u otras moléculas por lo que una desproteínización previa a la extracción es un paso importante.

La desproteínización enzimática resulta ser menos contaminante, por lo que se ha buscado optimizar las condiciones de operación para la hidrólisis de proteínas en residuos de langostinos (*Litopenaeus vannamei*) empleando una cepa de *Shewanella* sp. que presentó una elevada actividad proteolítica a nivel de laboratorio,

a la vez que se le comparó con otra cepa de *Bacillus* sp. (género de reconocida actividad proteolítica). Las condiciones de trabajo encontradas podrían servir para tratar residuos de langostinos con estas cepas microbiológicas y así facilitar la obtención de quitina u otras moléculas de alto valor en el mercado.

## ÍNDICE

DEDICATORIA .....	II
AGRADECIMIENTO .....	III
RESUMEN.....	IV
ABSTRACT.....	V
PRÓLOGO.....	VI
ÍNDICE.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XII
ÍNDICE DE GRÁFICOS .....	XIV
ÍNDICE DE TABLAS .....	XVI
ÍNDICE DE ANEXOS .....	XVIII
CAPITULO I: INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. TÍTULO.....	1
1.2. ANTECEDENTES .....	1
1.3. PLANTEAMIENTO DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA.....	6
1.3.1. PROBLEMA GENERAL .....	8
1.3.2. PROBLEMAS ESPECÍFICOS .....	8
1.4. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA .....	9
1.5. OBJETIVOS .....	11
1.5.1 OBJETIVO GENERAL.....	11
1.5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	11
1.6 HIPÓTESIS .....	12
1.6.1 HIPÓTESIS GENERAL.....	12

1.6.2 HIPÓTESIS ESPECÍFICAS .....	12
CAPITULO II: MARCO TEÓRICO Y LEGAL .....	13
2.1. CONCEPTOS GENERALES .....	13
2.2. LANGOSTINOS ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) .....	16
2.2.1. CLASIFICACIÓN .....	16
2.2.2. CARACTERÍSTICAS .....	17
2.2.3. PRODUCCIÓN DE LANGOSTINO EN EL PERÚ .....	17
2.3. RESIDUOS DE LANGOSTINOS ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) .....	21
2.3.1. CONCEPTO .....	21
2.3.2. CARACTERIZACIÓN DE EXOESQUELETO DE <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	21
2.3.3. APROVECHAMIENTO DE RESIDUOS .....	22
2.3.4. GENERACIÓN DE RESIDUOS DE LANGOSTINOS Y APLICACIONES DEL REAPROVECHAMIENTO .....	22
2.4. BACTERIAS PROTEOLÍTICAS .....	27
2.5. ANÁLISIS DE FRACCIONES .....	30
2.6. ESTADÍSTICA .....	31
2.6.1. METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA .....	31
2.6.2. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) .....	32
2.6.3. PRUEBA DE TUKEY-KRAMER .....	32
2.6.4. MINITAB Versión 18 .....	32
2.7. MARCO LEGAL .....	33
CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS .....	35
3.1. MATERIALES .....	35

3.1.1.	MATERIAL DE VIDRIO .....	35
3.1.2.	MATERIAL DE PLÁSTICO.....	35
3.1.3.	MATERIAL DE METAL .....	35
3.1.4.	REACTIVOS QUÍMICOS E INSUMOS .....	36
3.1.5.	MATERIAL BIOLÓGICO .....	36
3.1.6.	EQUIPOS .....	37
3.2.	MÉTODOS .....	38
3.2.1.	OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.....	38
3.2.2.	REACTIVACIÓN DE CEPAS .....	39
3.2.3.	CAPACIDAD ENZIMÁTICA E HIDRÓLISIS DE SUSTRATO .....	40
3.2.4.	PRUEBA DE CRECIMIENTO .....	43
3.2.5.	EVALUACIÓN DE CRECIMIENTO DE LA <i>Shewanella</i> sp. ....	44
3.2.6.	BIOPROCESO DE DESPROTEINIZACIÓN DE RESIDUOS DE LANGOSTINOS.....	45
3.2.7.	ANÁLISIS DE FRACCIONES.....	50
3.2.8.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	55
CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIONES (ANÁLISIS DE RESULTADOS Y CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS) .....		56
4.1.	MUESTRA RL .....	56
4.2.	CEPAS DE TRABAJO.....	57
4.3.	CAPACIDAD ENZIMÁTICA E HIDRÓLISIS .....	58
4.4.	COMPARACIÓN DEL CRECIMIENTO MICROBIANO ENTRE LAS CEPAS RL-08 Y RL-42.....	60

4.5. COMPORTAMIENTO DE CRECIMIENTO MICROBIANO DE LA CEPA RL-08 A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AGUA DE MAR .....	63
4.6. ANÁLISIS DEL BIOPROCESO DE DESPROTEINIZACIÓN .....	67
4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	69
4.7.1. Comparación de los bioprocesos de desproteínización (DP) con la cepa RL-08 sobre la respuesta porcentaje de DP (%DP) .....	69
4.7.2. Comparación de los bioprocesos de desproteínización (DP) con la cepa RL-08 sobre la respuesta proteína soluble (mg de albúmina/ mL).....	73
4.7.3. Análisis del diseño de la MSR y búsqueda del modelo de segundo orden en función del %DP. ....	77
4.7.4. Análisis del diseño de la MSR y búsqueda del modelo de segundo orden, en función de la proteína soluble producto de la DP de RL. ....	82
CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	88
5.1. CONCLUSIONES.....	88
5.2. RECOMENDACIONES .....	89
CAPITULO VI: BIBLIOGRAFÍA Y/O REFERENCIA .....	90
ANEXOS.....	99

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Economía circular.....	14
Figura 2.	Litopenaeus vannamei .....	16
Figura 3.	Ciclo de producción del langostino (Litopenaeus vannamei) .....	17
Figura 4.	Recuperación de quitina por métodos químicos .....	26
Figura 5.	Recuperación de quitina por métodos biotecnológicos. ....	26
Figura 6.	Bioproceso de desproteínización .....	46
Figura 7.	Muestra de Residuos de Langostinos (Litopenaeus vannamei) .....	56
Figura 8.	Cepas RL-08 y RL-42 puras en tubo inclinado, matraz y placa .....	57
Figura 9.	Prueba de Catalasa de RL-08 y RL-42 .....	101
Figura 10.	Prueba de Oxidasa de RL-08 y RL-42 .....	101
Figura 11.	Prueba de Tinción Gram de RL-08 y RL-42.....	102
Figura 12.	Hidrólisis de Sustrato en Agar Tributirina (AT) .....	102
Figura 13.	Hidrólisis de Sustrato en Agar Leche (AL) .....	103
Figura 14.	Hidrólisis de Sustrato en Agar Gelatina (AG) .....	103
Figura 15.	Hidrólisis de Sustrato en Agar Quitina (AQ).....	104
Figura 16.	Diagrama de preparación de la muestra RL .....	105
Figura 17.	Diagrama de preparación del Inóculo .....	106
Figura 18.	Diagrama de dilución luego del proceso .....	107
Figura 19.	Diagrama de separación de fracciones.....	108
Figura 20.	Diagrama de conservación de fracción insoluble .....	109
Figura 21.	Diagrama de proceso del sustrato con el método Kjeldahl .....	1098
Figura 22.	Diagrama de proceso de determinación de Cenizas .....	112

Figura 23.	Diagrama de conservación de fracción soluble.....	112
Figura 24.	Diagrama de proceso con el método Lowry .....	113

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b>	Crecimiento de la RL-08 en log UFC/ mL por horas transcurridas.....	61
<b>Gráfico 2.</b>	Crecimiento de la RL-42 en log UFC/ mL por horas transcurridas.....	61
<b>Gráfico 3.</b>	Crecimiento de la RL-08 en UFC a distintas concentraciones de agua de mar .....	64
<b>Gráfico 4.</b>	Gráficos de contorno y de superficies de %DP con respecto a las variables en estudio.....	80
<b>Gráfico 5.</b>	Gráficos de contorno y de superficies de la proteína soluble generada del bioproceso de DP de RL, con respecto de las variables en estudio.....	85
<b>Gráfico 6.</b>	Gráfica de Normalidad – Análisis de Anderson Darling (AD), RL-08 a 48h.....	118
<b>Gráfico 7.</b>	Gráfica de Normalidad – Análisis de Anderson Darling, RL-08 a 72h .....	118
<b>Gráfico 8.</b>	Gráfica de Igualdad de Varianza – Análisis de Barlett, RL-08 a 48h .....	119
<b>Gráfico 9.</b>	Gráfica de Igualdad de Varianza – Análisis de Barlett, RL-08 a 72h .....	119
<b>Gráfico 10.</b>	Análisis de medias – Tratamientos en %DP.....	120
<b>Gráfico 11.</b>	Gráfica de Probabilidad – Análisis de AD, Tratamientos en %DP.....	120
<b>Gráfico 12.</b>	Gráfica de Igualdad de Varianza – Análisis de Barlett, Tratamientos en %DP .....	121
<b>Gráfico 13.</b>	Análisis de medias – Tratamientos en Proteína Soluble.....	122
<b>Gráfico 14.</b>	Gráfico de Probabilidad – Análisis de AD, Tratamientos en Proteína Soluble.	122
<b>Gráfico 15.</b>	Prueba de Igualdad de Varianza, Tratamientos en Proteína Soluble.....	123
<b>Gráfico 16.</b>	Gráfica de probabilidad – Análisis AD; MSR (%DP) vs. Temperatura (°C); Residuos (p/v) y Tiempo (h).....	123

<b>Gráfico 17.</b> Prueba de Barlett: MSR (%DP) vs. Temperatura (°C); Residuos (p/v) y Tiempo (h).....	124
<b>Gráfico 18.</b> Gráfica de probabilidad – Análisis AD; MSR (Proteína Soluble) vs. Temperatura (°C); Residuos (p/v) y Tiempo (h).....	124
<b>Gráfico 19.</b> Prueba de Barlett: MSR (Proteína Soluble) vs. Temperatura (°C); Residuos (p/v) y Tiempo (h).....	125

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Técnicas de engorde en el Perú .....	19
Tabla 2.	Composición química del exoesqueleto de <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	22
Tabla 3.	Comparación por países utilización de residuos de langostinos.....	24
Tabla 4.	Capacidad Enzimática e Hidrólisis del Sustrato de Bacterias Proteolíticas .....	29
Tabla 5.	Variables dependientes e independientes .....	45
Tabla 6.	Niveles de los factores evaluados en modelo experimental de tipo MSR.....	46
Tabla 7.	Matriz experimental de condiciones .....	47
Tabla 8.	Curva de Calibración.....	54
Tabla 9.	Cuantificación de proteínas de la muestra .....	54
Tabla 10.	Pruebas bioquímicas de la RL-08 y RL-42.....	58
Tabla 11.	Hidrólisis de Sustrato de la RL-08 y RL-42 .....	59
Tabla 12.	Conteo en placa de las Cepas RL-08 Y RL-42 en UFC/ mL a las 0, 24 y 48 horas.....	60
Tabla 13.	Conteo en placa de la cepa RL15-08 en UFC a distintas concentraciones de aguas de mar a 24, 48 y 72 horas. ....	63
Tabla 14.	Análisis ANOVA de las UFC/mL a las 48 horas producto de la concentración de agua de mar (0, 75 y 100%). ....	65
Tabla 15.	Análisis de Tukey-Kramer de las UFC/mL a las 48 horas producto de la concentración de agua de mar (0, 75 y 100%). ....	65
Tabla 16.	Análisis ANOVA de las UFC/mL a las 72 horas producto de la concentración de agua de mar (0, 75 y 100%). ....	66
Tabla 17.	Análisis de Tukey-Kramer de las UFC/mL a las 72 horas producto de la concentración de agua de mar (0, 75 y 100%). ....	66

Tabla 18.	Tabla resumen de resultados del proceso de desproteínización .....	68
Tabla 19.	Media de las tasas de desproteínización y desviación estándar de los bioensayos, con la cepa RL-08.....	70
Tabla 20.	ANOVA del porcentaje de desproteínización (% DP), con la cepa RL-08.....	71
Tabla 21.	Análisis secuencial de Tukey-Kramer sobre el porcentaje de desproteínización de residuos de langostino, con la cepa RL-08.....	72
Tabla 22.	Media del contenido de proteína soluble en la FS y desviación estándar de los bioensayos, con la cepa RL-08.....	74
Tabla 23.	ANOVA del contenido de proteína soluble producto de la DP de RL, con la cepa RL-08. ....	75
Tabla 24.	Análisis secuencial de Tukey-Kramer sobre el contenido de proteína soluble producto de la DP de RL, con la cepa RL-08 .....	76
Tabla 25.	Análisis de varianza de la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) en función del %DP. ....	78
Tabla 26.	Análisis de varianza de la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR), sobre la respuesta proteína soluble.....	83
Tabla 27.	Tabla de resultados del proceso de desproteínización .....	114

**ÍNDICE DE ANEXOS**

Anexo 01.	Medios y Reactivos .....	99
Anexo 02.	Pruebas Bioquímicas .....	101
Anexo 03.	Hidrólisis de Sustrato .....	102
Anexo 04.	Bioproceso de Desproteínización .....	105
Anexo 05.	Análisis de Fracciones .....	108
Anexo 06.	Resultados del proceso de desproteínización.....	114
Anexo 07.	Análisis Estadístico .....	118
	Pruebas de la validación de los supuestos de la ANOVA.....	118
	Comparación de los bioprocesos de desproteínización (DP) con la cepa RL-08 sobre la respuesta porcentaje de DP (%DP) .....	120
	Comparación de los bioprocesos de desproteínización (DP) con la cepa RL-08 sobre la respuesta proteína soluble (mg de albúmina/ mL) .....	122
	Análisis del diseño de la MSR y búsqueda del modelo de segundo orden en función del %DP. ....	123
	Análisis del diseño de la MSR y búsqueda del modelo de segundo orden, en función de la proteína soluble producto de la DP de RL. ....	124

## CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

### 1.1. TÍTULO

OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN PARA LA HIDRÓLISIS DE PROTEÍNAS EN RESIDUOS DE LANGOSTINOS (*Litopenaeus vannamei*) EMPLEANDO UNA BACTERIA PROTEOLÍTICA (*Shewanella* sp.)

### 1.2. ANTECEDENTES

Sirvas *et al.* (2021), aislaron treinta y dos cepas bacterianas de residuos de langostinos, estas cepas fueron caracterizadas fenotípicamente e identificadas mediante el sistema API 20 y análisis molecular basado en el ARNr 16S teniendo una potencial aplicación en el tratamiento de estos mismos residuos. Encontraron que el 28.13% tenían capacidad amilolítica, 87.50% lipolítica, 96.88% proteolítica y 28.13% quitinolítica en placas de agar con sustratos específicos. Las cepas con mayor capacidad proteolítica y sin capacidad quitinolítica fueron *Vibrio parahaemolyticus* y *Shewanella* sp.

Se identificaron que 53.13% de las cepas aisladas (17 cepas) eran del género *Shewanella* spp. que podrían ser utilizadas en procesos de desproteización de residuos de langostinos; de manera similar algunas cepas de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus velezensis* deficientes de quitinasa podrían ser empleadas en procesos de desproteización de residuos de langostinos, obteniendo quitina de calidad superior (Waldeck *et al.* 2006).

Sirvas & Perochena (2020) hicieron un trabajo de revisión sobre la obtención de quitina a base de residuos de crustáceos, enfocándose en los procesos de desproteización y desmineralización por métodos biotecnológicos en las que se usaron especies como *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp., *Serratia* sp, *Pseudomonas*

spp., *Streptococcus* spp, etc. concluyendo que aún no se ha conseguido reducir los tiempos de proceso, los cuales compiten con el proceso químico tradicional siendo este ineficiente y perjudicial para el medio ambiente.

Perochena (2019), en su tesis de grado, evaluó cinco consorcios bacterianos constituidos por bacterias procedentes del banco de cepas del ITP siendo escogidas por su capacidad enzimática y de trabajar en consorcio. Se concluyó que los cinco consorcios bacterianos, redujeron el contenido de proteínas de residuos de langostinos a diferentes condiciones de operación por encima del 50% mediante bioprocesos de hidrólisis enzimática y el consorcio bacteriano más eficiente en hidrolizar las proteínas de residuos de langostinos y que podría ser considerado para un escalamiento futuro fue el consorcio bacteriano CB05, el cual alcanzó un 99.5% de desproteínización. Los mejores criterios de operación descritos fueron de 35°C, 16 horas y un volumen de inóculo de  $6 \times 10^7$  UFC/mL.

Liu *et al.* (2020) encontraron elevada actividad para la desmineralización (DM) y desproteínización (DP) de exoesqueletos de langostinos empleando *Lactobacillus rhamnoides* y *Bacillus amyloliquefaciens* (BA01) respectivamente; estableciendo las condiciones óptimas de operación. Concluyeron la factibilidad de preparar quitina a partir de exoesqueleto de langostinos y de cangrejos mediante fermentación microbiana, resultando en un método relativamente simple y respetuoso con el medio ambiente en comparación con los métodos químicos peligrosos y tóxicos, obteniéndose adicionalmente un caldo de fermentación con un alto valor nutricional, que podría usarse como nutriente en la alimentación animal.

Vázquez *et al.* (2017) emplearon un proceso a escala piloto para recuperar quitina del cefalotórax de *Penaeus vannamei*, el tratamiento empleado por ellos fue de tipo secuencial enzimático-ácido-alcálico que produjo un 30% de quitina con una pureza comparable a las comerciales. Las condiciones óptimas se establecieron

aplicando una metodología de superficie de respuesta (MSR) cuyo objetivo era producir quitosano a partir de la desacetilación (DD) de quitina. Sus mejoras se basaron en la reducción de las concentraciones de reactivos alcalinos (NaOH 1 M) y ácidos (HCl 0.4 M), el tiempo (6 h para todo el proceso) y la temperatura de proceso (menos de 65°C). Resolvieron que el quitosano obtenido contiene: 96% de grado de DD; 88% de cristalinidad; y un contenido inferior de cenizas, lípidos, proteínas y metales pesados. Indican que se deberían hacer más estudios que empleen la MSR para producir quitosano a partir de *P. vannamei* con pesos moleculares personalizados.

Sedaghat *et al.* (2017) estudiaron el efecto de la concentración de glucosa, los niveles de inóculo de *Pseudomonas aeruginosa* y el tiempo de fermentación sobre DM y DP de los residuos de langostino e indicaron que la eficiencia de la DM y la DP dependen de estos factores para mejorar la utilización de subproductos que contienen proteína y quitina. Las condiciones óptimas del proceso fueron de 20% de glucosa, 20% de inóculo y 6 días de fermentación para la extracción de quitina, que condujeron a un 82% y 94% de DM y DP respectivamente; en las mismas condiciones el rendimiento de quitina varió del 47 al 74%. La obtención de quitosano, se realizó mediante tres métodos (microondas, autoclave y tradicional), presentando la autoclave el mayor rendimiento (87%). Concluyeron que la fermentación es un método con la capacidad de sustituir los métodos químicos actuales que utilizan ácidos y bases fuertes.

Neves *et al.* (2017) obtuvieron resultados ventajosos de desmineralización y desproteínización, para la obtención de quitina a partir de exoesqueletos de langostino de agua dulce por fermentación con *Lactobacillus plantarum* aislado del residuo de productos cárnicos, como un reemplazo del método químico tradicional. Obtuvieron una desproteínización de aproximadamente 99% y una desmineralización de hasta

87% utilizando fermentación por lotes con un máximo de 72 horas y la estrategia de procesos como ajuste de pH y re-inoculación. Se concluyó que el rendimiento en la extracción de la quitina por procesos fermentativos fue aproximadamente un 40% mayor que en la extracción química. Esta ruta 'verde' reduce el consumo de reactivos químicos y permite una mayor recuperación de quitina, constituyendo una alternativa para la producción de quitosano.

Arbia *et al.* (2013) investigaron la importancia y las aplicaciones de los biopolímeros quitina y quitosano, mostrando sus características biológicas (biodegradabilidad, biocompatibilidad y no toxicidad) y propiedades fisicoquímicas (grado de acetilación y masa molecular). La recuperación de quitina por métodos químicos utilizando ácidos y bases concentrados para desmineralizar y desproteinizar los residuos de crustáceos asociado a elevadas temperaturas de trabajo pueden deteriorar las propiedades fisicoquímicas del polímero, así como sus propiedades biológicas, dando como resultado productos no homogéneos y de diferente calidad.

También se indicó que mediante técnicas biotecnológicas se han hecho uso de bacterias que generen ácido láctico y bacterias proteolíticas las cuales, ofrecen la oportunidad de preservar las cualidades excepcionales de la quitina y sus derivados permitiendo producir una quitina de buena calidad, conduciendo también a la extracción de una fracción proteica y otra de pigmentos, principalmente astaxantina. El método biológico parece ser muy prometedor; el establecimiento de las condiciones óptimas para la desproteinización y desmineralización de residuos, el uso de una bacteria eficaz y una fuente de carbono económica son los principales factores que deben tenerse en cuenta para optimizar la recuperación de quitina a partir de residuos de crustáceos, por ello, el método todavía está limitado a escala de laboratorio (Arbia *et al.*, 2013).

Sánchez (2020) en su tesis de grado determinó la eficiencia en la adsorción de plomo en aguas subterráneas del distrito de Mórrope, utilizando quitosano obtenido por método químico convencional además de tratamientos termo-alcalinos a base de exoesqueleto de langostino. Los mayores niveles de adsorción de plomo se obtuvieron utilizando 2.5 g de quitosano con pH 4.5, 5.25 y 6.3, en 700 mL de solución de  $Pb^{+2}$ , bajo agitación constante de 200 rpm, alcanzando el 94.66%, 72.23% y 84.16% de eficiencia respectivamente.

Contreras & Heredia (2017), en la tesis de grado, obtuvieron quitosano a partir de exoesqueleto de langostino obteniéndose 19.7% de quitosano los cuales estuvieron sometidos a distintos procesos, métodos químicos: desmineralización, desproteínización y desacetilación de la quitina verificándose al producto en sus contenidos de humedad, ceniza y el grado de desacetilación por titulación potenciométrica. Además, se evaluó la efectividad del quitosano en la remoción de nitratos que fue de 86.7% en muestras de agua de pozo de la comunidad de chaullacocha en Cutervo.

Mendoza & Jáuregui (2006), en la tesis de grado, obtuvieron quitosano a partir de cabezas del langostino rojo por métodos químicos para la desproteínización, desmineralización y desacetilación. En el quitosano obtenido se evaluaron su capacidad de adsorción y retención de iones de plata provenientes de efluentes industriales según valores de pH, y también, la desorción de iones plata empleado como efluente ácido sulfúrico 0.1 M. Lograron reducir y recuperar iones de plata de efluentes industriales con una eficiencia del 99%.

### 1.3. PLANTEAMIENTO DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA

La generación de residuos, tanto urbanos como industriales, es uno de los problemas ambientales más grandes que debe enfrentar y solucionar nuestra sociedad debido a los evidentes efectos negativos que produce la acumulación de residuos en el ambiente.

El gran avance de la industria pesquera y acuícola a nivel artesanal e industrial en el Perú genera una cantidad significativa de residuos y pérdidas en el manejo, almacenamiento, distribución y comercialización, los cuales representan alrededor de 29 millones de toneladas de desechos a nivel mundial (FAO, 2009).

La acuicultura en el Perú se incrementó en 14.2% respecto al año 2018, los langostinos son una de las principales especies aprovechadas por el sector, representando en su cosecha, producción y venta interna con el 31.5%, 71.5% y 10.8% respectivamente; asimismo las exportaciones de langostinos aumentaron en un 13.5% (IMARPE; DIREPRO; Produce – OEE, 2019). Entre los principales países consumidores de productos acuícolas peruanos están Estados Unidos, China, España, Vietnam entre otros (Produce, 2019).

El incremento en la producción está en relación directa con la generación de sus residuos. Perú actualmente tiene aproximadamente una producción de 34,000 TM de langostino, esto ocasiona desperdicio de proteína y un aumento de la contaminación ambiental (Dirección General de Acuicultura – Produce, 2017; PROMPERÚ, 2019) siendo una responsabilidad compartida de todos los actores involucrados, sin embargo, usualmente son secados a la intemperie, luego triturados y enterrados, conduciendo así a una inadecuada disposición y gestión de residuos. Como consecuencia, los impactos ambientales serían cada vez más significativos causando una vida útil más corta de los insuficientes rellenos sanitarios (Piura y Tumbes cuentan con un relleno sanitario), aumentando los focos infecciosos que pueden generar enfermedades por vectores y patógenos oportunistas, afectando

también a la población cercana expuesta, a cuerpos de aguas cercanas y al suelo, causando además un impacto paisajístico que afecta directamente al turismo (MINAM; OEFA; PNIPA, 2021).

Los residuos del langostino (RL) representan entre el 60 a 40% del peso del animal los que actualmente no son aprovechados pese a que tienen un valor en el mercado internacional equivalente a los residuos lignocelulosos de la industria maderera (Sirvas *et al.* 2020). Los RL son fuente de quitina y quitosano, los cuales tienen una importante aplicación en la industria de alimentos, bebidas, biomedicina, textil, papel, biotecnología, tratamiento de aguas y en la agricultura (Arbia *et al.*, 2013).

El primer paso de obtención de quitina es la DP la cual se lleva a cabo tradicionalmente mediante el uso de bases que producen sustancias tóxicas, corrosivas y que pueden despolimerizar la quitina, alterando las propiedades del producto final (El Knidri *et al.*, 2018), generando un costo ambiental.

Se ha comprobado que el proceso de DP puede llevarse por técnicas biotecnológicas que empleen enzimas y microorganismos proteolíticos a condiciones moderadas (Sirvas *et al.* 2020), y así se resolvería los problemas; previniendo, minimizando, reciclando e incrementando la valorización de los residuos generados, disminuyendo los costos, lo cual puede contribuir al Perú en su proyección y ejecución de una economía circular con la aplicación de la biotecnología. Sin embargo, estos métodos o técnicas todavía están limitados a escala de laboratorio pues aún falta optimizar la recuperación de quitina a partir de los RL. Por este motivo, se tiene la necesidad de buscar condiciones óptimas de desproteínización de los RL utilizando cepas aisladas de estos residuos con características enzimáticas y proteolíticas (Sirvas *et al.* 2021). Para ello se requiere encontrar las condiciones óptimas del proceso con las cuales se consiga hidrolizar la mayor cantidad de proteínas en el menor tiempo posible a costos moderados.

### 1.3.2. PROBLEMA GENERAL

- ¿Será posible optimizar las condiciones de operación para la hidrólisis de proteínas en residuos de langostinos (*Litopenaeus vannamei*) empleando bacterias del género *Shewanella* sp. aisladas de ese mismo sustrato?

### 1.3.3. PROBLEMAS ESPECÍFICOS

- ¿Las cepas bacterianas de los géneros *Shewanella* serán capaces de desproteínizar los residuos de langostinos? ¿Cuán eficiente es esta desproteínización respecto al uso de bacterias de conocida actividad proteolítica del género *Bacillus* sp.?
- ¿Se podrá determinar el contenido proteico de residuos de langostinos del proceso de desproteínización de residuos de langostinos?
- ¿Se podrá determinar los niveles de desproteínización de residuos de langostinos posterior a los bioprocesos de desproteínización?
- En las condiciones de cultivo de la *Shewanella* sp. ¿será posible poder optimizar la proteólisis de los residuos de langostinos?
- ¿El modelo de predicción mediante pruebas de desproteínización validará la optimización del proceso?

#### 1.4. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

El aumento en la demanda de langostinos genera residuos que no son considerados, no son aprovechados y son dispuestos en el suelo a cielo abierto o colocados en botaderos sin tener ninguna medida de control. Existe un mínimo aprovechamiento por alguna empresa o instituciones que se dedican a recolectar los residuos, así mismo los instrumentos de gestión ambiental aprobados sin rigurosidad han permitido una disposición final inadecuada de estos residuos, generando contaminación al aire, suelo y agua (Produce, 2021).

El presente trabajo de investigación beneficiará al sector productivo en específico a las industrias langostineras peruanas en primera instancia, así como a las poblaciones aledañas, ayudando a evitar la proliferación de patógenos oportunistas, enfermedades en los langostinos al estar expuestos los RL a la intemperie, accidentes como cortes e impacto paisajístico (Del Carpio, 2021; FAO *et al.*, 2004).

El medio ambiente será el más beneficiado, evitando, minimizando, reciclando e incrementando la valorización de residuos generados del cultivo de langostinos, disminuyendo los costos, contribuyendo al país en su proyección y ejecución de una economía circular con la aplicación de la biotecnología y aporte para futura toma de decisiones, y aportando también al crecimiento económico en el sector comercial siendo un área no analizada y rastreada.

Se buscan las condiciones óptimas de hidrólisis de residuos de langostino, utilizando una cepa microbiana aislada de una fuente similar local. Las condiciones óptimas de hidrólisis permitirán tener procesos más eficientes que podrán ser considerados para escalamientos futuros como bioprocesos a nivel piloto o industrial mediante métodos biológicos y/o biotecnológicos dejando así el uso de ácidos y bases fuertes (utilizadas actualmente para la obtención de quitina), que pueden deteriorar las propiedades del polímero y el medio natural (Sanipes, 2020; Sirvas & Perochena,

2020). Se usará como medio de cultivo, un medio natural disminuyendo así costos y mejorando las condiciones operativas de los procesos de desproteinización, tales como el tiempo, la temperatura, salinidad y cantidad de residuos optimizándolas con la metodología de superficie de respuesta (MSR) y que los productos obtenidos del bioproceso de los residuos de langostinos sean comercial y ambientalmente viables.

## 1.5. OBJETIVOS

### 1.5.1 OBJETIVO GENERAL

- Optimizar las condiciones de operación de la hidrólisis de proteínas en residuos de langostinos (*Litopenaeus vannamei*) empleando una bacteria proteolítica (*Shewanella* sp.).

### 1.5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar la bacteria proteolítica para el bioproceso de desproteínización de los residuos de langostinos (*Litopenaeus vannamei*) mediante procesos de hidrólisis enzimática bacteriana.
- Determinar el contenido proteico de residuos de langostinos del proceso de desproteínización de residuos de langostinos.
- Determinar los niveles de desproteínización de residuos de langostinos posterior a los bioprocesos de desproteínización.
- Optimizar el bioproceso de desproteínización mediante la metodología de superficie respuesta (MSR).
- Validar la optimización del proceso, así como el modelo de predicción mediante pruebas de desproteínización.

## 1.6 HIPÓTESIS

### 1.6.1 HIPÓTESIS GENERAL

- Se lograrán optimizar las condiciones de operación para la hidrólisis de proteínas en residuos de langostinos (*Litopenaeus vannamei*) empleando una bacteria proteolítica (*Shewanella* sp).

### 1.6.2 HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

- Se logrará desproteínizar los residuos de langostinos mediante el uso del microorganismo *Shewanella* sp. aislado del mismo sustrato.
- El contenido proteico de residuos de langostinos se podrá determinar con métodos químicos (Método Kjeldahl y Método Lowry).
- Se lograrán determinar los niveles de desproteínización de los residuos de langostinos finalizando los bioprocesos.
- Los procesos de hidrólisis de proteínas empleando *Shewanella* sp. serán optimizados mediante MSR.
- La optimización del proceso se validará mediante pruebas de desproteínización.

## **CAPITULO II: MARCO TEÓRICO Y LEGAL**

### **2.1. CONCEPTOS GENERALES**

#### **BIOTECNOLOGÍA**

Se define como la “utilización de organismos vivos, sus partes, productos y modelos de los mismos para la obtención de conocimiento, bienes y servicios” (OCDE, 2005). La Biotecnología Ambiental es la aplicación a la resolución o remedio, de los problemas ambientales naturales, agrícolas y antrópicas, y la conservación de la calidad ambiental. De los cuatro tipos de perturbaciones que el ser humano realiza en los ecosistemas, a saber, destrucción de hábitats, sobreexplotación, introducción de especies y contaminación, la Biotecnología Ambiental tiene una gran significancia en los procesos de producción y en el tratamiento de la contaminación derivada de una gestión deficiente en el manejo de productos peligrosos o de las acciones intencionadas o fortuitas (Castillo *et al.*, 2005).

#### **SOSTENIBILIDAD**

Satisfacción de las necesidades actuales sin afectar a futuras generaciones ya sea en recursos y servicios ambientales, manteniendo un equilibrio en lo económico, social y ambiental enfocándonos en la acuicultura. El Estado promueve la armonía para la conservación de los recursos y del ambiente considerando la satisfacción de las necesidades sociales y económicas de la población por medio de una actividad acuícola rentable y competitiva (Ley General de Acuicultura).

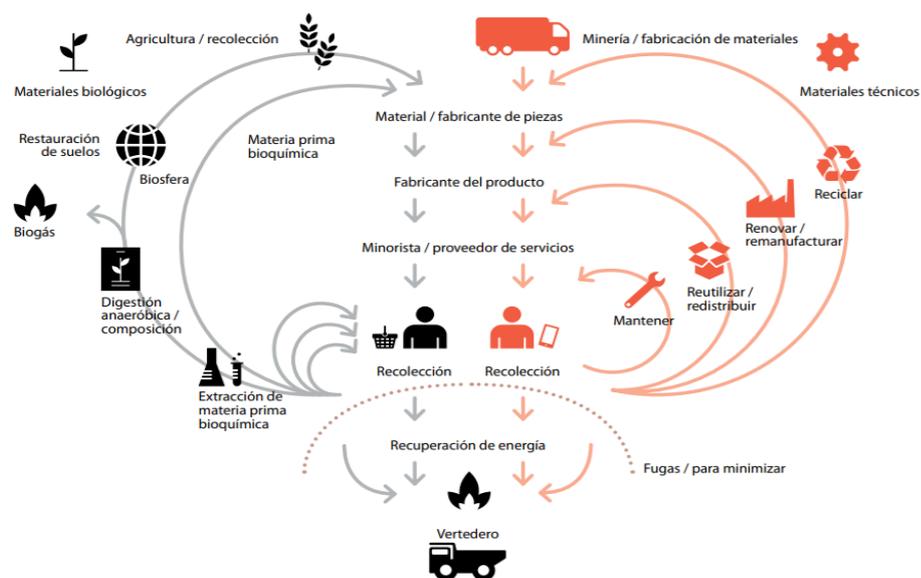
## ECONOMÍA CIRCULAR

Es un modelo económico que pretende conservar los materiales, productos y sus componentes en procesos circulares, mediante los cuales pueden ser reincorporados en la cadena de valor una vez terminada su vida útil. Esto permite optimizar el aprovechamiento de los recursos, los residuos y minimizar la generación de residuos, enfocándose a una sostenibilidad y en la reducción de la huella medioambiental (Marcet *et al.*, 2018).

Para los flujos de los materiales, bienes, productos y recursos dentro de una economía circular, se implementa una clasificación del concepto Cradle to Cradle (de la cuna a la cuna), donde el residuo es un recurso, el cual puede ser aprovechable al final de su vida útil como nutrientes biológicos (se pueden reincorporar de modo seguro a la biósfera los materiales diseñados, transformados, procesados, reciclados, etc.) y técnicos (no pueden reincorporarse a la biósfera, pero sí al proceso circular de producción a través de la reutilización, reciclaje, mantenimiento y renovación que garanticen una alta calidad al volver a insertarse) (Marcet *et al.*, 2018).

**Figura 1.**

### *Economía circular*



*Nota.* Adaptado de Marcet *et al.*, 2018, Qué es la economía circular y por qué es importante para el territorio.

La escasez de recursos que cada vez son más limitados y cuya eliminación supone un alto coste ambiental, sumado a la necesidad del mercado ha obligado a adaptarnos a un modelo lineal, permitiendo satisfacer el modelo consumista de mercado. En el modelo lineal todos los productos generados terminan convirtiéndose en residuos (Dannoritzer, 2011). Para el 2050 se prevé que la población mundial llegará a los 10,000 millones de habitantes, donde una gran parte de éstos alcanzarán un estatus social de clase media, esta situación incrementará tanto el consumo de materias primas como la demanda mundial (ONU, 2013).

Se debe tener, especial énfasis en la innovación y tecnología, las cuales son capaces de influir, intervenir y colaborar a escalar a una economía circular (Martínez & Porcelli, 2018), ofreciendo un amplio abanico de oportunidades para una mayor eficiencia y un consumo responsable, apuntando a emplear los flujos de residuos como fuente de recursos y materia prima, recuperando los residuos para su reutilización y reciclaje (Lazovska, 2019; Marote, 2019).

## **ACUICULTURA**

La acuicultura se define como “el cultivo de organismos acuáticos, que implica la intervención en el proceso de cría para aumentar la producción, como proveedor de alimento, empleo e ingresos, optimizando los beneficios económicos en armonía con la conservación del ambiente y la preservación de la biodiversidad, el manejo óptimo de los recursos naturales y del territorio; garantizando la propiedad individual o colectiva del recurso cultivado” (D.L. N° 1195, 2015).

## 2.2. LANGOSTINOS (*Litopenaeus vannamei*)

El *Litopenaeus vannamei* es nativo del Océano Pacífico, se encuentra distribuido desde el Alto Golfo de California hasta Perú.

### 2.2.1. CLASIFICACIÓN

De conocimiento general de la especie en estudio, *Litopenaeus vannamei* se indica la descripción en específico, a continuación:

Reino: Animalia

Filo: Arthropoda

Subfilo: Crustacea

Clase: Malacostraca

Orden: Decapoda

Suborden: Dendrobranchiata

Infraorden: Caridea

Familia: Penaeidae

Género: *Litopenaeus*

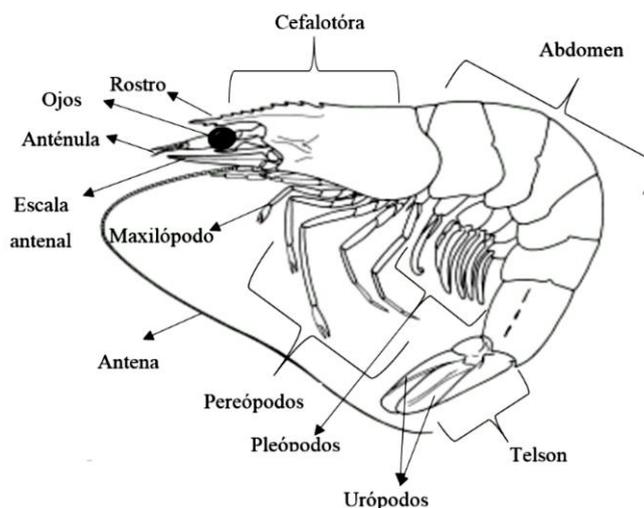
Especie: *P. vannamei*

(Boone, 1931)

Estado de conservación: Preocupación menor (UICN)

### Figura 2.

*Litopenaeus vannamei*



*Nota.* Adaptado de Cultured Aquatic Species Information Programme, por FAO, 2006.

## 2.2.2. CARACTERÍSTICAS

El cefalotórax, abdomen y telson se encuentran recubiertos por el exoesqueleto el cual, cubre todo el cuerpo del langostino. Esta estructura de soporte en el animal, presenta dureza causada por su contenido de quitina y carbonato de calcio.

Esta especie de langostino sobresale del resto por ser más empleada, para el cultivo a nivel mundial y nacional, debido a que se considera como el más resistente a cambios medioambientales (Laffita, 2015).

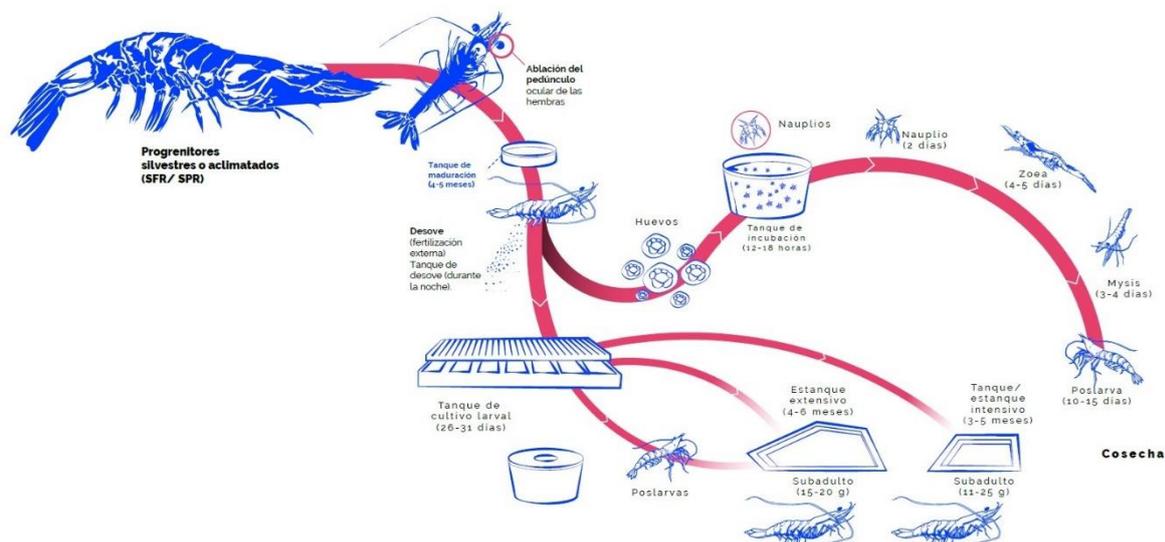
Durante el ciclo de producción, en sus etapas de crecimiento el exoesqueleto se remueve periódicamente, a este proceso se denomina exuviación.

## 2.2.3. PRODUCCIÓN DE LANGOSTINO EN EL PERÚ

En el Perú, en Tumbes y Piura, se emplean sistemas semi-intensivos para el ciclo de producción del langostino, aunque algunas compañías están desarrollando en cultivos intensivos y super-intensivos como en Marinazul, Grupo Camposol, entre otras (Seafood TIP, 2018).

**Figura 3.**

*Ciclo de producción del langostino (*Litopenaeus vannamei*)*



*Nota.* Adaptado de PNIPA, 2021, Cadena de valor del langostino.

### **Técnicas de engorde del langostino**

Se sub-divididen en 4 grandes categorías: super-intensivas, intensivas, semi-intensivas, y extensivas, las cuales se traducen como la crianza de éstos con densidades extremadamente alta, alta, media y baja respectivamente, en la Tabla 1 se observa una descripción detallada de las técnicas empleadas en Perú.

**Tabla 1.***Técnicas de engorde en el Perú*

<b>Tipo de sistema</b>	<b>Descripción</b>	<b>Característica</b>
<b>Semi-intensivo</b>	<p>La mayoría de los camaroneros peruanos utilizan métodos de cultivo semi-intensivos y ocupan un área de alrededor de 6,500 hectáreas. En 2015, la producción total logró las 22 mil ton. de las cuales se exportaron 17 mil ton. Debido a las limitadas posibilidades de expansión, por razones espaciales, ambientales y climáticas, parece que se ha alcanzado el límite de la producción semi-intensiva. El cultivo de camarón en el distrito de Tumbes cubre unas 6,000 hectáreas. Algunas empresas importantes en esta área son Atisa Perú y Marinazul. Más al sur en el distrito de Piura, el cultivo de camarón cubre unas 500 hectáreas y alberga empresas como Eco-Acuicola S.A.C. (Ecosac).</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• N° de cultivos por año: 3-4 en Tumbes y 1 en Piura.</li> <li>• N° de días por cultivo: Aprox. 100 días.</li> <li>• Temporada de cosecha: Todo el año en Tumbes, febrero-abril en Piura.</li> <li>• Tipo de agricultor: De pequeños agricultores a granjas, corporativas a gran escala.</li> <li>• Los estanques tienen una superficie de 1-5 ha con una profundidad de entre 1 y 1.2 m.</li> <li>• Productividad media: 1,300-1,500 kg/ha/año.</li> <li>• Densidad media de población: 15-18 PL / m<sup>2</sup>.</li> </ul>

Tipo de sistema	Descripción	Característica
Intensivo	<p>La acuicultura intensiva todavía está en un período de crecimiento en Perú. Hay algunos senderos en marcha, pero hasta ahora solo la empresa Camposol utiliza este método de producción. Camposol utiliza actualmente 67 ha para agricultura intensiva y apunta a expandirse en el futuro. Se prevé que más agricultores adoptarán métodos de cultivo intensivo si más senderos tienen éxito, ya que aumentaría la producción anual por hectárea de 1,300 a 1,500 kg hasta incluso de 20,000 a 30,000 kg.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• N° de días por cultivo: Aprox. 100 días.</li> <li>• Temporada de cosecha: Todo el año.</li> <li>• Tipo de agricultor: En este momento, solo una empresa a gran escala, Camposol.</li> <li>• Los estanques son pequeños de forma redonda o cuadrada. Su superficie es de 0.1-1.0 ha con una profundidad a 1.5 m.</li> <li>• Productividad media: 92 toneladas/ <math>m^2</math>/año</li> <li>• Densidad media de población: 220 PL / <math>m^2</math></li> <li>• N° de cultivos por año: 3-4</li> </ul>

*Nota:* Adaptado de Seafood TIP, 2018; PNIPA, 2021.

### Enfermedades en langostinos:

Las langostineras han enfrentado diversas enfermedades identificadas en *Litopenaeus vannamei*:

- Virus de la cabeza amarilla (YHV)
- Virus de la mancha blanca (WSSV)
- Virus del síndrome de Taura (TSV)

- La necrosis hepatopancreática aguda (AHPND), síndrome de mortalidad precoz (EMS).
- El microsporidio *Enterocytozoon hepatopenaei* EHP es un parásito intracelular

(Del Carpio, 2021; FAO *et al.*, 2004)

### **2.3. RESIDUOS DE LANGOSTINOS (*Litopenaeus vannamei*)**

#### **2.3.1. CONCEPTO**

Se considera residuo al exoesqueleto, la cabeza y vísceras del langostino generados en el proceso de cultivo, producción y consumo. “Estos desechos están compuesto por minerales (35%), proteínas (40%), quitina (14 al 30%) y pigmentos carotenoides sobre todo astaxantina. Asimismo, proveen de sabores, enzimas, glicosaminoglicanos sulfatados y aminoácidos como metionina, arginina, fenilalanina, valina e histidina” (Curbelo & Palacio, 2021). Los residuos de langostino son fuente de diversos productos entre ellos el biopolímero quitina y su derivado quitosano, de gran importancia debido a su empleo en las industrias farmacéuticas, biomédicas, alimentarias, textiles, cosméticas, agrícolas, ganaderas y en el tratamiento de aguas residuales (Dragland *et al.*, 2016; Mármol *et al.*, 2011; Sirvas & Perochena, 2020).

#### **2.3.2. CARACTERIZACIÓN DE EXOESQUELETO DE *Litopenaeus vannamei***

Se puede caracterizar la composición química de los residuos (exoesqueletos) de langostino *Litopenaeus vannamei* como se indica en la siguiente (Tabla 2) literatura de distintos autores.

**Tabla 2.***Composición química del exoesqueleto de Litopenaeus vannamei*

Parámetros	Exoesqueleto	
	Curbelo & Palacio, 2021	Ortiz, 2013
Húmeda (%)	9.38 ± 0.22	10
Cenizas (%)	27.10 ± 1.43	30
Proteína (%)	41.23 ± 1.50	40.6
Grasa (%)	0.57 ± 0.03	ND
Fósforo total (%P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) mg		
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> /100 g	3.7 ± 0.04	1.57

*Nota:* Adaptado de Curbelo & Palacio, 2021.

### 2.3.3. APROVECHAMIENTO DE RESIDUOS

Es el proceso de recuperar materiales utilizados anteriormente para incorporarlos, temporalmente al ciclo económico y productivo. Con ese fin se vale de la reutilización, el reciclaje, la incineración, o de cualquier otra forma que abarque beneficios ambientales, sanitarios y/o económicos (Martínez & Porcelli, 2018).

### 2.3.4. GENERACIÓN DE RESIDUOS DE LANGOSTINOS Y APLICACIONES DEL REAPROVECHAMIENTO

La muda es parte del crecimiento normal de los artrópodos. Los crustáceos decápodos exhiben un estado dinámico de atrofia continua y restauración de proteínas musculares para facilitar el desprendimiento del exoesqueleto durante la muda, exuviación y formación de un nuevo exoesqueleto de mayor tamaño. El equilibrio entre estos procesos metabólicos determina el crecimiento general del animal (Ecología Azul-Blue Ecology, 2017). En otras palabras, el exoesqueleto es

periódicamente removido y reemplazado durante las etapas de crecimiento del animal permitiendo que éste siga creciendo, lo cual es la principal fuente de generación de residuos de langostinos, los langostinos *Litopenaeus vannamei* realizan 3 ciclos de muda por mes, terminando su ciclo de producción en 5 a 6 meses (Cadena, 2001; A. Gutiérrez, 2001). La muda en los crustáceos está controlada hormonalmente, pero también puede ser influenciada por las condiciones del medio ambiente, estado fisiológico y las etapas de desarrollo (Skinner, 1985; Chan *et al.*, 1988).

Durante el cultivo de langostinos se realiza la remoción de los residuos orgánicos diariamente generados y el recambio de agua, sin embargo, se dejan estos residuos a la intemperie generando una considerable cantidad de residuos sólidos. En el Perú se genera 27,000 TM anuales de residuos de langostinos durante la remoción de residuos de los estanques constituido mayormente por exoesqueletos del cefalotórax, abdomen y telson (Islam *et al.* 2004; Sachindra *et al.* 2006; Amiguet *et al.* 2012; Kaur y Dhilon, 2015; Catastro Acuícola – DGA-PRODUCE, 2017).

Normalmente, la mayoría de los residuos de langostinos se descartan debido a la falta de técnicas de procesamiento y metodología para su reutilización, que no es solo una pérdida de compuestos potencialmente valiosos, sino que también conduce a la contaminación ambiental (Kaur & Dhilon, 2015), lo cual no está siendo identificado como impacto y ni considerado como potencial impacto. Realizando una síntesis de los Instrumentos de Gestión Ambiental (IGA's) aprobados del sector industrial acuícola e industrias langostineras, por el PRODUCE, siendo juez y parte, los IGA's son muy general y superficial con la identificación, descripción y evaluación de los impactos, como ejemplo con respecto a la disposición de residuos generados, hacen referencia que lo realizan con una empresa operadora, o en botaderos sin identificar las consecuencias potenciales, y sin cumplir el enfoque de responsabilidad compartida (Produce, 2021).

Además, la industria del langostino blanco en el Perú solo ha logrado el cierre del ciclo del producto enfocándose en la línea comercial de su carne en estos últimos

20 años, por lo que su exoesqueleto es descartado, desaprovechando la oportunidad de emplearlo como fuente de subproductos tales como proteínas, pigmentos, cenizas, calcio y en especial, un polisacárido llamado quitosano, que en la industria alimentaria se utiliza como espesante, conservante o como envases, entre otras aplicaciones (García-Zavala, 2017). En la tabla 3 se muestra la reutilización y el reciclado de los residuos de langostino en algunos países.

**Tabla 3.**

*Comparación por países utilización de residuos de langostinos*

<b>Factor</b>	<b>Perú</b>	<b>Ecuador</b>	<b>India</b>	<b>Vietnam</b>
<b>Crítico</b>				
Aprovechamiento de residuos	La industria del langostino solo ha cerrado el ciclo, es decir, ha desarrollado la línea comercial de su carne, y su exoesqueleto es desechado.	Desean invertir en la producción de subproductos a partir de los residuos de langostino logrando valorizar estos residuos.	Producen quitina y quitosano. La empresa Mahtani Private Limited, produce anualmente 50 TM de quitosano.	Vietnam utiliza principalmente para la recuperación de quitina y una cantidad muy limitada está reservada para la producción de quitosano a partir de cabezas de langostino.

*Nota:* Adaptado de del Carpio, 2021.

### **Aplicaciones de tecnologías reaprovechando los residuos hidrobiológicos en el Perú**

En nuestro país los establecimientos industriales pesqueros destinados a la actividad de consumo humano directo ocasionan cantidades significativas de residuos hidrobiológicos que se destinan principalmente a las plantas de harina residual; sin

embargo, una parte se dispone inadecuadamente, generando problemas ambientales que impactan al ambiente y la salud.

Existen tecnologías ecoamigables que permiten el reaprovechamiento de los residuos hidrobiológicos con bajos costos de inversión, como fertilizantes, alimento balanceado para animales, entre otros (Ministerio de la producción, 2015). Tienen un caso en particular de “Valorización de desechos blandos del procesamiento de conchas de abanicos mediante el uso de técnicas biotecnológicas”, se logró la producción de un suplemento alimenticio para langostinos (*Litopenaeus vannamei*) a través de un ensilado de estos desechos.

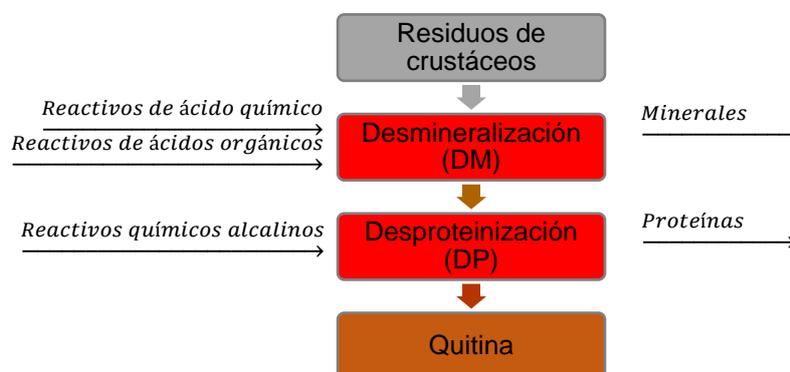
Mediante estas técnicas se ha conseguido otras aplicaciones como componente de compostaje, fertilizantes, medio de cultivo para cepas nematocidas, ensilado biológico y biofertilizantes obteniendo subproductos con alto valor nutricional y económico dirigido a la agricultura y acuicultura (DEGAAMPA Produce, 2017).

Actualmente, los residuos de langostinos se convierten en materia prima para la producción industrial de quitina mediante el uso de químicos inorgánicos, como el hidróxido de sodio (NaOH) para eliminar proteínas y ácido clorhídrico (HCl) para eliminar minerales. Aunque esos métodos han sido comercialmente viables, representan un costo ambiental que debe abordarse. Como alternativa, se han realizado esfuerzos de investigación para contribuir a sustituir los procedimientos químicos por biotecnológicos que son respetuosos con el medio ambiente. Sin embargo, el alto costo de procesamiento de estos métodos se ha visto como una desventaja para su uso en la obtención de quitina, a pesar de ello existen, métodos para recuperar este biopolímero que son de bajo costo y factibles de escalamiento a nivel industrial (Sirvas & Perochena, 2020).

Se puede observar en las siguientes figuras (Figura 4 y Figura 5) los métodos de extracción de quitina a partir de residuos de crustáceos y la valorización de residuos hidrobiológicos.

**Figura 4.**

*Recuperación de quitina por métodos químicos*

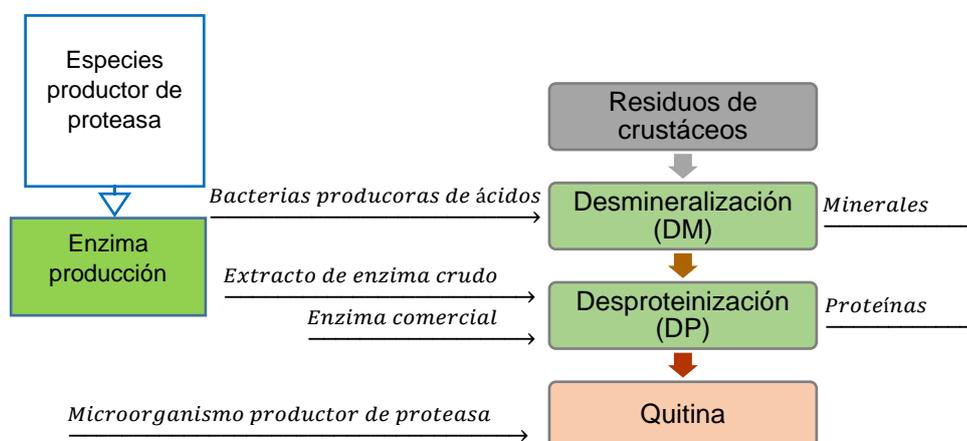


*Nota.* Adaptado de “Biotechnological recovery of chitin from crustacean waste” (p.96), por Sirvas & Perochena, 2020, Revista Peruana de Biología 27(1).

Uno de los procesos más importantes o críticos para la obtención de estos productos es la DP el cual en la actualidad se lleva a cabo con una base inorgánica fuerte, hidróxido de sodio (NaOH) al 4% por 24 horas, a 95°C, donde el NaOH permite remover proteínas, lípidos y pigmentos del residuo. Sin embargo, estos métodos químicos podrían causar la despolimerización de los productos y generar sustancias corrosivas y peligrosas para el ambiente (Vázquez *et al.*, 2017).

**Figura 5.**

*Recuperación de quitina por métodos biotecnológicos.*



*Nota.* Adaptado de “Biotechnological recovery of chitin from crustacean waste” (p.96), por Sirvas & Perochena, 2020, Revista Peruana de Biología 27(1).

La DP puede ser realizada por métodos biotecnológicos que involucran microorganismos o enzimas. Las enzimas proteolíticas catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos de la proteína del exoesqueleto, residuos de langostinos, permitiendo así que las proteínas sean separadas. Sin embargo, el uso de enzimas comerciales representa un mayor costo de producción para la industria siendo éste el mayor inconveniente del método (Benítez *et al.*, 2008; Sirvas & Perochena, 2020).

## 2.4. BACTERIAS PROTEOLÍTICAS

Son bacterias que producen proteasas, las cuales catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos de la proteína. Estas bacterias pueden encontrarse en diferentes fuentes como en residuos de langostinos, tal como en el caso del estudio de Sirvas *et al.* (2021), donde se aislaron e identificaron microorganismos de esta fuente mediante el sistema API 20 y el análisis molecular basado en el ARNr 16S, encontrándose cepas proteolíticas que tienen el potencial de hidrolizar sustratos, además un grupo de éstas no tienen capacidad quitinolítica por lo cual, podrían conducir a una desproteinización más eficiente (Sirvas *et al.*, 2021).

El uso de microorganismos presenta una alternativa que podría ser económica y ecológicamente amigable, aunque esta estrategia es la más viable, los tiempos de bioproceso reportados aún siguen siendo extensos; podemos nombrar algunas bacterias proteolíticas y no quitinolíticas, que son las siguientes:

### ***Shewanella sp.***

- Es de clase Gammaproteobacteria, perteneciente al orden Alteromonadales y familia Shewanellaceae.

- El género está compuesto por más de 60 especies, son bacilos Gram-negativos de 1-3  $\mu\text{m}$  de tamaño y móviles por un flagelo, pueden tener un metabolismo aeróbico o anaeróbico facultativo.
- Pueden vivir en cualquier tipo de ambiente encontrándose en una gran diversidad de hábitats como arena, agua y sedimento marino, minas de carbón, petróleo, entre otros.
- Poseen la capacidad para utilizar una amplia variedad de sustratos como aceptor final de electrones durante la respiración. Los sustratos principalmente usados son elementos tóxicos y metales insolubles.

Las especies del género *Shewanella* han sido identificadas en base a métodos moleculares como el secuenciamiento de los genes 16S rDNA y *gyrB* e hibridación de ADN y en base a características fenotípicas descritas en el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey (Lizárraga, 2019).

### ***Bacillus velezensis***

Llamado así por ser el primer aislado del río Vélez en Torredelmar, Málaga, sur de España.

- Tiene la capacidad de generar endosporas elipsoidales, las cuales se encuentran en posiciones subterminales en esporangios no inflamados.
- No contienen cristales paraesporales, ni acumulan ácido polihidroxi-butírico.
- Son móviles por flagelos peritricos.
- En medio TSA, las bacterias presentan color blanco cremoso, colonias rugosas con bordes ligeramente irregulares. En medio líquido TSB se forma una película delgada en la superficie mientras que el resto del medio es uniformemente turbio.
- Crecen dentro el rango de temperatura de 15 a 45°C y a valores de pH de entre 5 y 10.

- Son expertos disponiendo compuestos inorgánicos reducidos como sustratos para adquirir energía y emplear en el metabolismo respiratorio, es decir quimioorganotróficos (Brock, 1978).
- Su metabolismo es respiratorio (Ruiz-García *et al.*, 2005).

Es una bacteria aeróbica, Gram-positiva, formadora de endosporas. Se ha informado que numerosas cepas de esta especie suprimen el crecimiento de patógenos microbianos, incluidas bacterias, hongos y nemátodos.

Es inofensivo para humanos y animales, y no contamina el medio ambiente. Su metabolito presenta un amplio espectro de sustancias con actividad antibacteriana y gran resistencia al estrés. Esta bacteria tiene buenas características de crecimiento rápido y estabilidad (Ye *et al.*, 2018).

**Tabla 4.**

*Capacidad Enzimática e Hidrólisis del Sustrato de Bacterias Proteolíticas*

Bacteria	Tinción de Gram	ENSAYOS ENZIMÁTICOS EN PLACA (diámetro del halo mm)						
		Catalasa	Oxidasa	Tributirina	Gelatina	Caseína	Almidón	Quitina
<i>Shewanella sp.*</i>	-	+	+	11	35	30	0	0
<i>Bacillus velezensis</i>	+	+	-	13	26	10	27	0

*Fuente:* Adaptado de Sirvas *et al.*, 2021. \* Promedio con respecto a la data observada.

## 2.5. ANÁLISIS DE FRACCIONES

### MÉTODO KJELDAHL

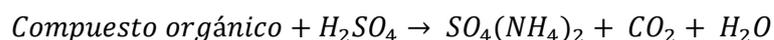
Se aplicó este método para cuantificar el nitrógeno total en la fracción insoluble. Los alimentos contienen una fracción nitrogenada proveniente de las proteínas (también llamada nitrógeno proteico), así como también componentes nitrogenados provenientes de aminoácidos libres (creatina, taurina, betaínas, etc.), de bases volátiles nitrogenadas (amoníaco, trimetilamina, ácido úrico, etc.); esta fracción nitrogenada es llamado nitrógeno no proteico.

La determinación del nitrógeno proveniente de ambos componentes multiplicado por el factor 6.25 (para el caso de carnes), dan los valores de proteína cruda total (Fresenius, 1883; Cohen, 1910).

El método consta de tres etapas:

Digestión:

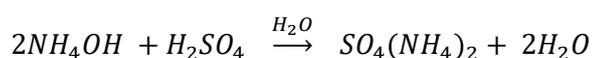
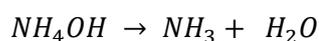
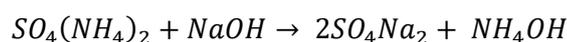
Los compuestos que contienen Nitrógeno son descompuestos por calentamiento con ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ), ocurriendo al mismo tiempo **oxidación y reducción fijándose el nitrógeno** en forma de sulfato de amonio ( $SO_4(NH_4)_2$ ).



Destilación:

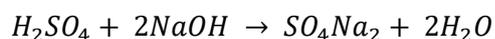
El sulfato de amonio se descompone por acción del Hidróxido de Sodio y calor desprendido Amonio ( $NH_4^+$ ).

El vapor de agua arrastra al amonio que es recibido en un matraz con  $H_2SO_4$  N/100, agua destilada e indicador.



Titulación:

La parte de  $H_2SO_4$  que ha quedado sin reaccionar será titulado con hidróxido de sodio (NaOH) al 0.01 N. La cantidad de  $NH_4OH$  de la muestra es obtenida por la diferencia.



## MÉTODO LOWRY

Este método se utilizó para indicar de manera cuantitativa la proteína presente en la fracción soluble. Posee alta sensibilidad, apto de detectar cantidades del orden de 10 microgramos de proteína; su dificultad o inconveniente es que, al evaluar, los fenoles contenidos en la proteína (esencialmente residuos de tirosina), la intensidad del color resultante varía entre distintas proteínas. Sin embargo, cuando empleamos mezclas biológicas complejas, podemos calibrar el método con alguna proteína comercial, como es la seroalbúmina bovina (Garfield, 1990; Cerna *et al.*, 2010; Lowry *et al.*, 1951).

## 2.6. MÉTODOS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### 2.6.1. METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

La Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) es un diseño experimental que faculta al experimentador evaluar diferentes efectos, productos de las variables sobre la respuesta deseada y calcular las condiciones óptimas de operación del proceso. Esta metodología no busca obtener un mejor tratamiento o tratamiento elegido en el primer experimento, sino que busca las condiciones óptimas para operar el proceso (Gutiérrez & De La Vara, 2008).

En otras palabras, es útil para el modelado y análisis en aplicaciones en las que una respuesta de interés está condicionada por varias variables y el objetivo es optimizar esta respuesta (Stephenson, 1998).

### **2.6.2. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)**

Es un método estadístico, que estudia los efectos de uno o más factores examinando, las diferencias de las medias. De igual manera este es capaz de evaluar las diferencias significativas entre las medias de los grupos.

### **2.6.3. PRUEBA DE TUKEY-KRAMER**

En una herramienta estadística para comparar diferencias de medias muestrales.

### **2.6.4. MINITAB Versión 18**

Programa que puede ejecutar funciones estadísticas simples y complejas.

## 2.7. MARCO LEGAL

- Ley N° 28611, Ley General del Ambiente.
- Ley N° 27446, Ley del Sistema Nacional de Evaluación del Impacto Ambiental.
- Decreto Ley N° 25977, Ley General de Pesca.
- Decreto Supremo N° 010-2019-PRODUCE, Reglamento de la Ley N° 30063, Ley de Creación del Organismo Nacional de Sanidad Pesquera (SANIPES)
- Decreto Supreme N° 012-2013-PRODUCE, Reglamento de la Ley N° 30063, Ley de Creación del Organismo Nacional de Sanidad Pesquera (SANIPES)
- Resolución de Presidencia Ejecutiva N° 053-2021-SANIPES/PE, Reglamento de Organización y Funciones del Organismo Nacional de Sanidad Pesquera (SANIPES)
- Decreto Supremo N° 009-2014-PRODUCE, Reglamento de Organización y Funciones del Organismo Nacional de Sanidad Pesquera (SANIPES)
- Decreto Supremo N° 025-2015-PRODUCE, TUPA del Organismo Nacional de Sanidad Pesquera (SANIPES)
- Resolución de Presidencia Ejecutiva N° 075-2020-SANIPES-PE, Reglamento de Infracciones y Sanciones Sanitarias Pesqueras y Acuícolas del Organismo Nacional de Sanidad Pesquera (SANIPES)
- Decreto Supremo N° 022-2021-PRODUCE, Aprueba Sección Primera del Reglamento de Organización y Funciones del Organismo Nacional de Sanidad Pesquera (SANIPES)
- Ley N° 28846, Ley para el Fortalecimiento de las Cadenas Productivas y Conglomerados.
- Ley N° 29338, Ley de Recursos Hídricos.
- Ley N° 29325, Ley del Sistema Nacional de Evaluación y Fiscalización Ambiental.
- Reglamento de la Ley del Sistema Nacional de Evaluación del Impacto Ambiental, aprobado por Decreto Supremo N° 019-2009-MINAM.

- Reglamento de la Ley General de Pesca, aprobado por Decreto Supremo N° 012-2001-PE.
- Reglamento de la Ley de Recursos Hídricos, aprobado por Decreto Supremo N° 001-2010-AG.
- Decreto Supremo N° 010-2018-MINAM, Aprueban Límites Máximos Permisibles para Efluentes de los Establecimientos Industriales Pesqueros de Consumo Humano Directo e Indirecto.
- Decreto Legislativo N° 1431, que modifica el Decreto Legislativo N° 1195, Decreto Legislativo que aprueba la Ley General de Acuicultura.
- Decreto Supremo N° 003-2016-PRODUCE, Aprueban el Reglamento de la Ley General de Acuicultura, aprobada por el Decreto Legislativo N° 1195.
- Decreto Supremo que aprueba el Reglamento de Gestión Ambiental de los Subsectores Pesca y Acuicultura. D.S. N° 012-2019-PRODUCE.
- Ley General de Residuos Sólidos Ley 27314 Y MODIFICATORIA, SU REGLAMENTO D.S. N° 057-2004- PCM.
- Reglamento para el procesamiento de descartes y/o residuos de recursos hidrobiológicos D.S N° 005-2011-PRODUCE Y MODIFICATORIAS.
- Decreto Legislativo N° 1278 - Ley de Gestión Integral de Residuos Sólidos y modificatoria.
- Decreto Supremo N°014-2017-MINAM - Reglamento del D.L. 1278.
- Decreto Supremo N°017-2011-PRODUCE – Reglamento del procesamiento de descartes y residuos hidrobiológicos.

## CAPITULO III: MATERIALES Y

### MÉTODOS

#### 3.1. MATERIALES

##### 3.1.1. MATERIAL DE VIDRIO

- Placas
- Asas de Digralsky
- Probeta 1000 mL
- Probeta 250 mL
- Probeta 100 mL
- Vaso de precipitado
- Tubo de Ensayo - Borosilicato - 18 x 100 mm
- Botella Tapa Azul - Borosilicato - 500 mL
- Matraz Erlenmeyer - 125 mL
- Pipeta graduada - 25 mL
- Frasco Kjeldahl de 300 mL
- Fiolas de 100 mL
- Embudo
- Pipeta 5 mL
- Crisoles de porcelana

##### 3.1.2. MATERIAL DE PLÁSTICO

- Baldes de 20 L
- Bolsas de polietileno

- Microtubos de 2 mL y 1.5 mL
- Tubos falcón con faldón – 15 mL
- Tubos Falcón con faldón - 50mL
- Puntas de micropipeta de 100, 200 y 1000  $\mu$ L
- Micropipetas 200  $\mu$ L, 100 – 1000  $\mu$ L y 5 – 20  $\mu$ L
- Parafilm
- Piseta 250 mL
- Pipeta de Transferencia Desechable - 1 mL
- Bombilla de pipeta de goma

##### 3.1.3. MATERIAL DE METAL

- Bandejas de Aluminio
- Tamiz de  $\leq 1$  mm y de  $\leq 0.71$  mm
- Gradilla
- Espátula Acero Inoxidable
- Microcuchara y Plano- 180 mm
- Pinza Anatómica - 125 mm
- Pastillas magnéticas
- Cucharita

### 3.1.4. REACTIVOS QUÍMICOS E INSUMOS

- Skim Milk Powder – Oxoid
- Bacto Agar – Becton, Dickinson and Company
- Bacto Peptone, Dickinson and Company
- Gelatine – Oxoid
- Agar Nutritivo (AN) – Liofilchem srl
- Plate Count Agar (APC)
- Tributyrin Agar (AT) – Fluka
- Glicerol
- Caldo TSA (TSA)
- Caldo Nutritivo (CN)
- Yeast Extract Powder - Himedia
- Cloruro de Amonio,  $\text{NH}_4\text{Cl}$
- Di-Sodium Hydrogen-o-Phosphate-Dodecahydrate - Qualikems
- Cloruro de Sodio, Cristal ( $\text{NaCl}$ ) - J.T. Baker
- Fosfato de Potasio Monobásico, Cristal - J.T. Baker
- Quitina Molida - Himedia
- Carbonato de Sódico
- Hidróxido de Sodio
- Sulfato cúprico
- Tartrato Sódico – Potásico
- Albúmina bovina
- Folin-Ciocalteu's phenol reagent – Merck KGaA
- Agua destilada
- Agua de mar
- Sulfato de cobre
- Sulfato de sodio
- Ácido Sulfúrico al 95 – 97%
- Hidróxido de Sodio
- Ácido Sulfúrico
- Rojo de metilo
- Azul de metileno
- Cristal violeta
- Lugol
- Safranina
- Alcohol-acetona
- Aceite de inmersión
- Agua oxigenada
- Dicloruro de Mercurio

### 3.1.5. MATERIAL BIOLÓGICO

- Cepa RL-08: *Shewanella* sp.

- Cepa RL-42: *Bacillus velezensis*

### 3.1.6. EQUIPOS

- Estufa, Memmert
- Licuadora de laboratorio modelo Retsch, Grindomix.
- Destilador de agua de 10 L
- Espectrofotómetro, UV-2700, Shimadzu
- Microondas, Samsung
- Balanza Electrónica Analítica, Mettler Toledo
- Autoclave Vertical 50 L, Yamato
- Paquete De Cámara Digital Panasonic Dmc Gh4
- Salinómetro portátil
- Refrigerador Vertical P/laboratorio
- Vortex Mixer, Wizard – Velp Scientifica
- Mechero Bunsen
- Reactivos y tubos de McFarland
- Swift Sw350t 40x-2500x - Microscopio De Laboratorio Trino
- Incubadoras con agitación, Thermo Scientific – MaxQ 4450, Faithful
- Centrifuga refrigerada, Eppendorf – centrifuge 5804 R
- Centrifuga refrigerada, orto alresa – digtor 21 R
- Digestor, Gerhardt Kjeldatherm
- Destilador de Nitrógeno, Buchi K-350
- Dispensador digital de líquidos o soluciones de 25 mL y de 50 mL, Brand.
- Hornilla eléctrica con campana extractora, NOYS Draft Chamber
- Mufla eléctrica, Nabertherm GmbH, 30 – 3000 °C
- Congeladora
- Pistola de pipeta eléctrica, accu-Jet Pro, Brand
- pH – Bereich 0-14 – Whatman, Panpeh

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

#### OBTENCIÓN DE RESIDUOS DE LANGOSTINOS (RL):

Residuos de langostinos (*Litopenaeus vannamei*) consistentes en exoesqueleto del cefalotórax, abdomen y telson extraídos de los estanques producto del proceso de exuviación durante la etapa de cultivo (ciclo de vida), proveídos por una empresa cooperador al ITP.

#### PREPARACIÓN DE MUESTRA DE RL:

Las muestras fueron almacenadas en baldes de 20 L de capacidad, a continuación, se explica la preparación.

Primero se realizó el lavado, para ello los residuos fueron lavados hasta que el agua del enjuague sea transparente, separando impurezas como algas, arena, u otras impurezas.

Luego, se realizó el secado, descartando el agua sobrante de la muestra para precaver el crecimiento de microorganismos y favorecer su almacenamiento. Consecuentemente, se extendió los RL húmedos en toda el área de las bandejas de aluminio, luego éstos fueron insertados en una estufa a 60°C por 24 horas, evitando así cambios estructurales en el RL por efecto de la temperatura.

Posterior a ello la muestra se trituró, para ello se empleó una licuadora de laboratorio.

Después se tamizó la muestra molida usando un tamiz  $\leq 1$  mm y luego  $\leq 0.71$  mm

Finalmente, las muestras fueron envasadas en bolsas de polietileno (PE) de alta densidad. El proceso se puede observar en el Anexo 4, Figura 16.

### 3.2.2. REACTIVACIÓN DE CEPAS

#### OBTENCIÓN DE CEPAS:

Las cepas bacterianas empleadas en el estudio fueron reactivadas de las identificadas previamente según el sistema API 20 y analizadas molecularmente mediante el ARNr 16S. Estas bacterias fueron aprovisionadas por el banco de cepas del Laboratorio de Biotecnología del ITP y pertenecen a la colección del mismo. Las cepas (RL-42 y RL-08) fueron seleccionadas por recomendación de los investigadores del ITP, se tomó como principal criterio de selección la capacidad enzimática proteolítica y capacidad quitinolítica nula, con el objeto de promover el consumo de proteína en los residuos de langostinos sin alterar la quitina presente en los mismos.

#### REACTIVACIÓN DE CEPA BACTERIANA Y PREPARACIÓN DE INÓCULO

El cultivo y reactivación de las cepas fue realizado en los medios agar nutritivo (AN), caldo nutritivo (CN) y agar plate count (APC).

Para la reactivación las cepas se realizaron de acuerdo al protocolo planteado por Gutiérrez-Jiménez *et al.* (2015). Las cepas fueron cultivadas a 35°C durante 8 a 9 horas en CN, luego estriadas en placas con medio de cultivo, APC y AN e incubadas a 35°C durante 24 horas, el proceso se puede observar en el Anexo 4, Figura 17. Las cepas previo a su uso en los procesos de hidrólisis fueron cultivadas de 8 a 9 horas en CN, luego fueron diluidas con solución salina al 85% hasta alcanzar una concentración de  $1,2 \times 10^9$  UFC/mL, equivalente a la escala de McFarland N° 4.

### 3.2.3. CAPACIDAD ENZIMÁTICA E HIDRÓLISIS DE SUSTRATO

Las cepas de trabajo, RL-08 y RL-42, fueron reactivadas en CN y estriadas en AN de donde se tomó muestras para la verificación de la capacidad enzimática e hidrólisis de sustrato.

#### PRUEBAS BIOQUÍMICAS:

##### OXIDASA

Se seleccionó una placa con una colonia estriada y pura a la cual se le adicionó 4 gotas de reactivo revelador directamente.

El revelado se dio por el cambio de color a los 15 segundos aproximadamente de haber sido adicionado el agente revelador (reactivo de Kovacs) si la reacción era positiva, en caso contrario la reacción era negativo.

El reactivo de Kovacs es una solución acuosa al 1% de diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina.

##### CATALASA

Mediante un mechero se flameó un asa hasta el rojo vivo y se dejó enfriar cerca al mechero. Luego se tomó una colonia aislada de la placa pura de aproximadamente 18 horas de crecimiento y se depositó en un portaobjeto. Se agregó dos gotas de agua oxigenada al 30% sobre el portaobjeto con la muestra y se evidenció la reacción.

La reacción es positiva cuando se observa una reacción inmediata de efervescencia con desprendimiento de burbujas, en caso contrario la reacción será negativa.

##### TINCIÓN DE GRAM

Para el análisis microscópico se realizó una tinción de Gram, permitiéndonos determinar si las cepas eran Gram-positivas (color violeta) o Gram-negativas (color rosa), el método empleado fue adaptado de Wan *et al.* (2017).

Para ello en un portaobjeto en frente del mechero se adicionó una gota de solución salina al 0.85% con la ayuda de una pipeta de Pasteur. Luego un asa de Kolle fue flameada en un mechero hasta el rojo vivo y se dejó enfriar, posteriormente se tomó una colonia de una placa pura aislada previamente en condiciones de esterilidad y se homogenizó con movimientos circulares por toda la superficie del portaobjeto, extendiéndolo. Finalmente, se fijó la muestra pasándolo por la llama del mechero de 1 a 2 segundos.

La tinción se realizó adicionando al portaobjeto con la muestra fijada 2 gotas de cristal violeta con la ayuda de una pipeta de Pasteur, cubriendo el extendido bacteriano y dejando actuar por 1 minuto, luego la muestra fue enjuagada con agua destilada aplicándola de forma inclinada. Se adicionó a continuación 2 gotas de Lugol con la ayuda de una pipeta de Pasteur cubriendo el extendido bacteriano, se dejó actuar por 1 minuto y se enjuagó con agua destilada.

Luego se decoloró la muestra aplicando 2 gotas de alcohol acetona sobre el frotis bacteriano con la ayuda de una pipeta de Pasteur y tras 30 segundos se enjuagó con agua destilada. La muestra fue teñida luego con safranina, para ello se adicionó 2 gotas sobre el frotis bacteriano con la ayuda de una pipeta de Pasteur y se dejó actuar por 1 minuto, tras lo cual se enjuagó con agua destilada. Finalmente, las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente en posición inclinada por 30 minutos y se observaron en el microscopio óptico con un objetivo 100X usando aceite de inmersión.

#### HIDRÓLISIS DE SUSTRATO:

#### HIDRÓLISIS DE CASEÍNA

Se verificó la capacidad proteolítica, siguiendo las recomendaciones del método descrito por Ryden *et al.* (1973). Para ello las cepas en estudio fueron reactivadas en CN por 18 horas, se homogenizó con la ayuda de un vórtex y se tomó

una alícuota de 5  $\mu$ L que fue inoculada cuidadosamente en la placa de agar caseína (Anexo 01) con ayuda de una micropipeta en el centro y/o en 2 puntos de la misma.

Se dejó absorber el inóculo por la placa durante 15 minutos a temperatura ambiente, luego se incubó a 35°C por 5 a 6 días observándose diariamente la formación y crecimiento de halo siempre y cuando la cepa tenga capacidad proteolítica. Finalmente, al 5to y 6to día se observó y anoto el crecimiento final de los halos, asimismo, se observó la pureza de las placas y posteriormente las mismas fueron descartadas.

#### HIDRÓLISIS DE GELATINA

Otro método para verificar la capacidad proteolítica, es la actividad en placas de agar gelatina (Frazier, 1926), para ello las cepas se reactivaron en CN por 18 horas, se homogenizó con la ayuda de un vórtex y se tomó 5  $\mu$ L; esta alícuota fue inoculada cuidadosamente en la placa de agar gelatina (Anexo 01) en el centro de la misma.

Se dejó absorber el inóculo por la placa durante 15 minutos a temperatura ambiente, luego se incubaron a 35°C por 5 a 6 días. Finalmente, al 5to y/o 6to día se adicionó 4 gotas de una solución de Bicloruro de Mercurio, la cual se esparció por toda la superficie de la placa hasta que las colonias estuvieran completamente cubiertas. Se esperó 15 segundos, luego se observó la presencia de halo y se midió el mismo, posteriormente las placas fueron descartadas.

#### HIDRÓLISIS DE TRIBUTIRINA

La verificación de la capacidad lipolítica de las cepas en estudio, se realizó adaptando el método descrito por Cadena *et al.* (2001).

Un cultivo de 18 horas en CN de las cepas en estudio fue homogenizado con la ayuda de un vórtex. Se tomó 5  $\mu$ L del cultivo y se inoculó cuidadosamente con la ayuda de una micropipeta en placas de agar tributirina (Anexo 01), en el centro y/o en 2 puntos. Se dejó absorber el inóculo por la placa durante 15 minutos a temperatura

ambiente, luego se incubaron a 35°C por 5 a 6 días observándose diariamente la formación y crecimiento de halo siempre y cuando, la cepa tenga capacidad lipolítica. Finalmente, al 5to y 6to día se observó y anotó el crecimiento final de los halos, de igual manera se observó la pureza de las placas y posteriormente las mismas fueron descartadas.

#### HIDRÓLISIS DE QUITINA

La verificación de la capacidad quitinolítica de las cepas en estudio, se realizó adaptando el método descrito por Wirth & Wolf (1990).

Un cultivo de 18 horas en CN de las cepas en estudio fue homogenizado con la ayuda de un vórtex. Se tomó 5 µL del cultivo y se inoculó cuidadosamente con la ayuda de una micropipeta en placas de agar quitina a pH 7.0 (Anexo 01), en el centro y/o en 2 puntos, algunas placas contrastando con un control. Se dejó absorber el inóculo por la placa durante 15 minutos a temperatura ambiente, luego se incubó a 35°C por 5 a 6 días observándose diariamente la formación y crecimiento de halo siempre y cuando la cepa tenga capacidad quitinolítica. Finalmente, al 5to y 6to día se observó y anotó el crecimiento final de los halos, de igual manera, se observó la pureza de las placas y posteriormente las mismas fueron descartadas.

#### 3.2.4. PRUEBA DE CRECIMIENTO

Se comparó la capacidad de crecimiento de las cepas RL-42 y RL-08, al ser sometidas a un bioproceso de desproteinización de residuos de langostinos en dos sistemas de crecimiento (matraz y frasco de reacción) a las siguientes condiciones de proceso: 10% de residuos de langostinos (3 g), 10% de inóculo (3 mL) a una concentración equivalente a la escala N°4 de McFarland ( $1.2 \times 10^9$  UFC/mL), 30 mL de agua de mar al 25%, 35°C y aireación a 0.05 vvm (solo en los frascos de reacción).

Se tomó 1 mL de muestra de todos los sistemas a las 0, 24 y 48 horas de proceso, con el fin de determinar y comparar el número de colonias en cada tiempo. Las muestras fueron sometidas a las siguientes diluciones seriadas: directa,  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-10}$  y  $10^{-12}$  para cada cepa y tiempo transcurrido (Anexo 4 y figura 18). Luego, se realizó el cultivo de las diluciones mediante el método de extensión en placa en AN con ayuda de un asa, para ello se tomaron 20  $\mu$ L de las diluciones previamente hechas (Directa,  $10^{-4}$ ,  $10^{-8}$  y  $10^{-12}$ ). Posteriormente, se dejaron las cepas por 15 minutos a temperatura ambiente hasta que las diluciones fueron absorbidas por el medio, luego se incubaron a 35°C por 24 horas.

Finalmente, al día siguiente se realizó el conteo y anotación de las colonias presentes en cada dilución.

### **3.2.5. EVALUACIÓN DE CRECIMIENTO DE LA *Shewanella* sp.**

Se seleccionó la cepa RL-08 como la más apropiada para desproteínizar los residuos de langostinos, se realizó un segundo experimento previo al bioproceso de desproteínización (DP), con el fin de determinar los niveles de las variables en estudio a la que se someterá la cepa en el presente trabajo. Para ello, se evaluó la cepa RL-08 a las siguientes condiciones del proceso: 10% residuos de langostinos (3 g), 10% de inóculo (3 mL) a una concentración equivalente a la escala N°4 de McFarland ( $1.2 \times 10^9$  UFC/mL) y 35°C por 24, 48 y 72 horas de proceso. De igual manera, se evaluó la capacidad de crecimiento de las cepas en 30 mL de agua de mar a diferentes concentraciones (0, 75% y 100%).

Se tomó 1 mL de muestra de cada medio a diferente concentración de agua de mar luego de 24, 48 y 72 horas de proceso. Luego, se realizaron las siguientes diluciones seriadas empleando solución salina al 0.85%: Directa,  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-8}$  por cada tiempo transcurrido (Anexo 4 y figura 18). Luego, se realizó la extensión en

placa en Agar Nutritivo, con ayuda de un asa, para ello se tomó 20  $\mu\text{L}$  de las diluciones  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-8}$  fueron inoculadas.

Posteriormente, se esperó 15 minutos a que las diluciones sean absorbidas por el agar en placa, a temperatura ambiente debidamente cerradas y se incubaron a  $35^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas.

Finalmente, al día siguiente se realizó el conteo de las colonias en cada dilución y se anotaron los resultados.

### 3.2.6. BIOPROCESO DE DESPROTEINIZACIÓN DE RESIDUOS DE LANGOSTINOS

El bioproceso de desproteización fue llevado a cabo considerando las variables dependientes e independientes identificados previamente las cuales, se muestra en la tabla 5 y en la Figura 6 podemos observar el proceso realizado.

**Tabla 5.**

*Variables dependientes e independientes*

<b>Variable Independiente</b>	<b>Tipo por su naturaleza</b>	<b>Indicador</b>	<b>Medio de verificación</b>
Tiempo de proceso	Cuantitativo	Horas	Cronómetro
Temperatura de proceso	Cuantitativa	$^{\circ}\text{Celsius}$	Termómetro digital automático de los equipos
Concentración de Residuos de Langostinos	Cuantitativa	g/mL	Balanza Analítica
<b>Variable Dependiente</b>	<b>Tipo por su naturaleza</b>	<b>Indicador</b>	<b>Medio de verificación</b>
% Desproteización	Cuantitativa	% Desproteización	Método Kjeldahl
Incremento de proteína soluble	Cuantitativa	mg de albúmina/mL	Método Lowry

**Figura 6.***Bioproceso de desproteinización***6.1****6.2**

*Nota:* 6.1 Incubadoras con agitación, Thermo Scientific – MaxQ 4450; 6.2 Incubadoras con agitación, Faithful a 35°C a 180 ppm, las condiciones de tiempo y temperatura descritos en la Tabla 7.

**DISEÑO DEL MODELO EXPERIMENTAL**

Dado que se requiere optimizar las condiciones de operación y realizar una evaluación de los factores que influyen el proceso, se optó por emplear la MSR. Este diseño robusto permitió determinar los efectos que influyen significativamente en el proceso y optimizar la respuesta, permitiéndonos hallar las condiciones óptimas de operación. Se escogió para este diseño 3 factores los cuales se procesaron en 5 niveles como se observa en la tabla 6, se muestran también los valores por nivel de las variables en estudio.

**Tabla 6.**

*Niveles de los factores evaluados en modelo experimental de tipo MSR.*

	<b>Niveles</b>				
	<b>alfa</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>alfa</b>
Tiempo (h)	21.8	30	42	54	62.2
Temperatura (°C)	26.6	30	35	40	43.4
Residuos (p/v)	5.2	10	17	24	28.8

Las condiciones del proceso estáticas o nulas fueron de 10% de inóculo a una concentración equivalente a  $1.2 \times 10^9$  UFC/ mL, según la escala de McFarland 30 mL de agua de mar al 100% y 180 rpm.

Para este tipo de diseño se generó una matriz experimental de 20 ensayos los cuales se muestran en la Tabla 7.

Estos 20 ensayos y 2 blancos, se realizaron por duplicado generando 44 ensayos en total. Las fracciones insolubles obtenidas de todos estos ensayos fueron analizadas en función de la humedad, ceniza y el contenido de nitrógeno total mediante el método gravimétrico, método de incineración en mufla y método de Kjeldahl, respectivamente. Las fracciones solubles de todos los ensayos fueron analizadas en función de la proteína soluble mediante el método de Lowry.

**Tabla 7.**

*Matriz experimental de condiciones*

<b>Código</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Residuos (p/v)</b>	<b>Tiempo (h)</b>
<b>B 1</b>	30	10	30
<b>B 2</b>	40	10	30
<b>B 3</b>	30	24	30
<b>B 4</b>	40	24	30
<b>B 5</b>	30	10	54
<b>B 6</b>	40	10	54
<b>B 7</b>	30	24	54
<b>B 8</b>	40	24	54
<b>B 9</b>	26.59	17	42
<b>B 10</b>	43.41	17	42
<b>B 11</b>	35	5.23	42
<b>B 12</b>	35	28.77	42
<b>B 13</b>	35	17	21.82

<b>Código</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Residuos (p/v)</b>	<b>Tiempo (h)</b>
<b>B 14</b>	35	17	62.18
<b>B 15</b>	35	17	42
<b>B 16</b>	35	17	42
<b>B 17</b>	35	17	42
<b>B 18</b>	35	17	42
<b>B 19</b>	35	17	42
<b>B 20</b>	35	17	42
<b>B 24(-) *</b>	26.59	17	42
<b>B 25(-) *</b>	43.41	17	42

*Nota:* \*; Controles.

Con los datos experimentales obtenidos se obtendrían un modelo matemático el cual generaría una ecuación de predicción de tipo polinomial de segundo orden la cual, calculó las condiciones óptimas de operación. Las condiciones óptimas de operación serían validadas, llevando a cabo el ensayo experimental y comparando el contenido de nitrógeno total por método de Kjeldahl, y la proteína soluble mediante el método de Lowry, con respecto de los datos predichos por el modelo matemático al ser optimizadas las condiciones de DP.

#### PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO CON RL PARA EL BIOPROCESO

Para los bioprocesos de desproteinización (DP), se filtró agua de mar evitando el crecimiento de algas, organismos marinos, arena, etc. Luego, se pesó RL en una balanza analítica para cada tratamiento según y cómo se aprecia en la Tabla 7. Cada ensayo fue preparado en matraces de 125 mL que contenían 30 mL de agua de mar filtrada, estos matraces fueron codificados, taponados y esterilizados por calor

húmedo en una autoclave por 10 minutos a 121°C como se aprecia en la parte final del Anexo 04 y Figura 16.

Los frascos estériles y a temperatura ambiente fueron inoculados con 3 mL de la cepa en estudio como se explica en el punto 3.2.2. reactivación e inoculación de la cepa.

Luego de ello los matraces fueron llevados a una incubadora con agitación a las condiciones de tiempo y temperatura descritos en la Tabla 7 y se observa en la Figura 6.

#### TERMINADO EL PROCESO, TOMA DE MUESTRA

Una vez terminado el bioproceso, el contenido de cada matraz fue vertido en un tubo cónico de 50 mL, el cual fue centrifugado a 11°C, 8500 rpm durante 10 minutos. Se recuperó la fase soluble e insoluble como se aprecia en el Anexo 05 y Figura 19, la fase soluble se vertió en tubos cónicos de 15 mL y se guardó en refrigeración hasta su uso en el método Lowry como se observa en el Anexo 05 y Figura 23. La fase insoluble (RL desproteinizados) fue resuspendida en agua destilada y centrifugada nuevamente a las mismas condiciones enjugando y limpiando la muestra de esta manera. El sobrenadante obtenido del enjuague fue descartado y la muestra húmeda fue secada en una estufa a 60°C por 24h, luego la muestra fue almacenada en bolsas pequeñas de polietileno con sus respectivas codificaciones y conservadas a temperatura ambiente hasta su caracterización como se observa en el Anexo 05 y Figura 20.

### 3.2.7. ANÁLISIS DE FRACCIONES

#### FRACCIÓN INSOLUBLE

Método Kjeldahl

Determinación de nitrógeno total (%Nt), adaptado de Perochena, 2019 y modificado:

Digestión:

Se pesó  $0.5 \pm 0.1$  g de muestra de RL, a la cual se añadió  $6 \pm 1$  g de catalizador (1:9 de sulfato de cobre con sulfato de sodio respectivamente) y 15 mL de ácido sulfúrico al 95 – 97% en tubos de digestión Kjeldahl (300 mL). Luego la muestra fue llevada a un digestor Kjeldahl hasta alcanzar un color verde esmeralda de un color marrón, luego se dejó 1 hora a 200°C después 1 hora a 400°C. Posterior a la digestión se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente alcanzando un color celeste, esta se transfirió a una fiola de 100 mL, la cual se enrasó con agua destilada.

Destilación:

De la digestión se tomó 5 mL de la solución y se colocó en un tubo Kjeldahl (300 mL); luego fue transferido a un destilador Kjeldahl por 2 minutos y 30 segundos. A continuación, se agregó hidróxido de sodio al 20% hasta que el color de la muestra cambie a color marrón o azul. Se recolectó el destilado en un Erlenmeyer de 250 mL, el cual, contenía 5 mL de ácido sulfúrico 0.1 N y 5 gotas de indicador de Tashiro (solución 2:1 de rojo de metilo 0.1% y azul de metileno 0.1%).

Titulación:

La muestra destilada fue titulada con hidróxido de sodio 0.02 N hasta virar a un color verde botella o transparente. El gasto fue anotado.

El proceso (digestión, destilación y titulación) antes mencionado se puede observar en el Anexo 05 y Figura 21.

## CÁLCULOS:

Para calcular el nitrógeno total se empleó la siguiente ecuación descrita por la FAO (1986) y Perochena (2019):

$$\%Nt = \left[ \frac{(Gb - Gm) * N * F * Fd * 14 * 100}{Pm * 1000} \right]$$

Dónde: Gb es el gasto del blanco; Gm es el gasto de la muestra; N es la normalidad del NaOH (0.02); F es el factor del NaOH; Fd es el factor de dilución (5 mL de destilado en 100 mL de agua destilada) y Pm es el peso de la muestra (FAO, 1986; Perochena, 2019).

## MÉTODO TEÓRICO DE DETERMINACIÓN DE PROTEINA Y QUITINA

Determinación de proteína (%P): método teórico descrito por Díaz-Rojas *et al.* (2006). Se estableció la cantidad de proteína en cada muestra cumpliendo el sistema de ecuaciones descrito. Los resultados de humedad, ceniza, grasa, nitrógeno total y grado de acetilación de cada prueba fueron incluidos en el sistema de ecuaciones utilizado y descrito a continuación:

$$\%Q = \left[ \frac{(Nt * Cp + k - 100) * Cq}{Cp - Cq} \right]$$

$$\%P = \left[ \frac{(Nt * Cq + k - 100) * Cp}{Cq - Cp} \right]$$

Donde: Cp y Cq son coeficientes de conversión que relacionan la fracción másica del nitrógeno proteico y nitrógeno quitinolítico; %P es el porcentaje de proteína; %Q es el porcentaje de quitina; y k es la suma de los compuestos no nitrogenados (Díaz-Rojas *et al.*; 2006).

$$k = \%C + \%G + \%H$$

Dónde: %G es el porcentaje de la grasa; %H es el porcentaje de humedad y %C es el porcentaje de ceniza.

$$Cp = 6.25$$

Cp es un factor de conversión para proteínas de productos marinos (Cp = 6.25)

$$Cq = \left[ \frac{(GlcNAc - GlcN) * Fa + GlcN}{N} \right]$$

Dónde: Fa es la fracción molar del monómero acetilado que tiene valores de 0 a 1 (porcentaje de deacetilación, %DD); GlcN es la masa molecular teórica de la glucosamina (179.17); GlcNAc es la masa molecular teórica de N-acetilglucosamina (221.21) y N es el peso molecular del nitrógeno (14.007) (Díaz-Rojas *et al.*; 2006).

En el presente trabajo se tomó el valor de grasa cruda teórico obtenido de los bioprocesos de DP empleando microorganismos como 3.62 a partir de la tesis de Perochena (2019), de igual manera se asumió el Fa como 1, esto debido a que, ninguna de las bacterias empleadas en este trabajo presentaba actividad quitinolítica.

#### Método incineración en mufla

Consiste en la calcinación de la muestra a fin de obtener los minerales que se encuentran en ella, determinando así el contenido de ceniza. El método fue adaptado y modificado a partir de (FAO, 1986 y Perochena, 2019).

Se pesó un crisol limpio y seco previamente, el cual se taró y pesó  $0.5 \pm 0.1$  g de muestra de RL desproteinizada para añadir y la muestra previa a su desproteinización, los pesos fueron anotados en un cuaderno de apuntes con 4 decimales. Luego, el crisol con la muestra fue carbonizado en una hornilla eléctrica en una campana extractora de ácidos por 3 horas. Se dejó enfriar la muestra y se

introdujo en la mufla a 550°C por 16 horas hasta su calcinación. Una vez calcinada la muestra se extrajo el crisol de la mufla y se dejó enfriar a temperatura ambiente en un desecador. Por último, se pesó el crisol con la ceniza hasta obtener un peso constante. El proceso descrito se puede observar en el Anexo 05 y Figura 22.

#### CÁLCULOS:

El contenido de ceniza fue determinado con la siguiente ecuación descrita por la FAO (1986) y Perochena (2019):

$$\%C = \left[ \frac{\text{Peso crisol con cenizas} - \text{Peso crisol}}{\text{Peso muestra}} \right] * 100$$

#### FRACCIÓN SOLUBLE

##### Método Lowry

Consiste el método en la determinación de proteínas en la fase soluble de la muestra del bioproceso; el método fue adaptado y modificado de Lowry, et al. (1951) y Hartree (1972).

La muestra fue diluida diez veces (1:10), tras lo cual se tomó 1 mL de la dilución y se adicionó 5 mL de reactivo Lowry. Se homogenizó la muestra con un equipo vórtex y se dejó reposar por 15 minutos.

Se adicionó a la muestra 0.5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu y se homogenizó en el equipo vórtex, luego se incubó temperatura ambiente por 30 minutos. En la Tabla 9 se puede observar las proporciones que se usaron.

La lectura de la absorbancia de las muestras se realizó en función de la concentración de proteína en el espectrofotómetro con el programa UV Probe 2.70. La pendiente de la recta será el factor que relaciona ambas variables.

Se obtuvo una curva de calibración con una solución estándar de seroalbúmina bovina, como se indica en la Tabla 8, asimismo, fueron preparadas de la misma manera que las muestras en estudio como se indica en la Tabla 9.

El proceso antes descrito se puede observar en el Anexo 05 y Figura 24.

**Tabla 8.**

*Curva de Calibración*

<b>TUBO</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
Albúmina (mL)	0	0.25	0.5	0.75	1
Agua (mL)	1	0.75	0.5	0.25	0
Reactivo Lowry (mL)	5	5	5	5	5
Agitar enérgicamente y dejar 15 minutos					
Folin (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Agitar enérgicamente y dejar 30 minutos					

**Tabla 9.**

*Cuantificación de proteínas de la muestra*

<b>TUBO</b>	<b>1 (A)</b>	<b>1 (A).1</b>	<b>1 (B)</b>	<b>1 (B).1</b>
Muestra 1:10 (mL)	1	1	1	1
Reactivo Lowry (mL)	5	5	5	5
Agitar enérgicamente y dejar 15 minutos				
Folin (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5
Agitar enérgicamente y dejar 30 minutos				

### 3.2.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El tratamiento de los resultados obtenidos fue realizado mediante un análisis de varianza (ANOVA) lineal con un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05 para los siguientes procesos: la hidrólisis del sustrato de las cepas RL-08 y RL-42 (3.2.3), prueba de crecimiento de las cepas RL-08 Y RL-42 (3.2.4) y evaluación de crecimiento de la cepa RL-08 (3.2.5) a diferentes concentraciones de agua de mar, con el objetivo de ver las diferencias entre las medias observando la influencia de los factores sobre las respuestas estudiadas.

Para el análisis de los tratamientos de todos los procesos del presente trabajo de investigación se sometieron a la herramienta Tukey-Kramer que permite ver si un ensayo es significativamente diferente a otro, es decir, se comparó la diferencia de medias entre tratamientos con un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05.

Para el análisis de resultados por cada tratamiento del bioproceso de desproteización de residuos de langostinos, el análisis de fracciones se llevó a cabo mediante un ANOVA de tipo factorial que ve la influencia de los efectos tanto singulares como de interacción sobre las respuestas de porcentaje de desproteización (%DP) e incremento de proteína soluble. Este tipo de ANOVA analizo la superficie generada, al mismo tiempo se realizó un análisis de regresión múltiple con el cual se puede determinar las condiciones óptimas de proceso.

Todos los análisis hechos a lo largo de este trabajo fueron realizados en el programa estadístico Minitab versión 18.

El diseño del modelo experimental esta detallado en el punto 3.2.6 donde se indica también las variables dependientes e independientes usadas.

## CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIONES (ANÁLISIS DE RESULTADOS Y CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS)

### 4.1. MUESTRA RL

La muestra de residuos de langostinos fue tratada previamente a los bioprocesos obteniendo un tamaño de partícula  $\leq 1.7$  mm libre de impurezas como observamos en la figura 7. Esta muestra fue usada como sustrato para todos los bioprocesos del presente trabajo.

#### Figura 7.

*Muestra de Residuos de Langostinos (Litopenaeus vannamei)*



El análisis inicial de composición proximal indicó que la muestra (RL) se encuentra constituida por: 54.6% de ceniza y 3.15% de grasa cruda (dato obtenido de los ensayos realizados por los investigadores en el proyecto); aplicando el factor de conversión para proteínas de productos marinos (6.25) al nitrógeno total se obtuvo 21.62% proteína mediante el método convencional sin embargo, se sabe que el nitrógeno total de la muestra extraído por el Método Kjeldahl es nitrógeno proteico y quitinolítico entonces para realizar esta diferencia se aplicó el método teórico planteado por Díaz-Rojas *et. al.* (2006), asumiendo F.A. igual a 1 obtenemos que el

contenido de quitina fue de 34.19% y la proteína fue de 8.1% en la muestra inicial en base seca.

Los RL empleados en el presente trabajo fueron mudas de langostinos y tuvieron una composición proximal distintas a las reportadas por Perochena (2019), teniendo la siguiente composición promedio algunos lotes de RL provenientes de planta: humedad  $\leq$  9%, proteína  $\leq$  30%, ceniza  $\leq$  30% y grasa  $\leq$  2%; y en los lotes provenientes de las mudas fue: humedad  $\leq$  9%, proteína  $\leq$  13 %, ceniza  $\leq$  27 % y grasa  $\leq$  1.5%; Curbelo & Palacios (2021) reportan una composición química de 9.38% de humedad, 41.23% de proteína , 27.1% de ceniza y 0.57% de grasa.

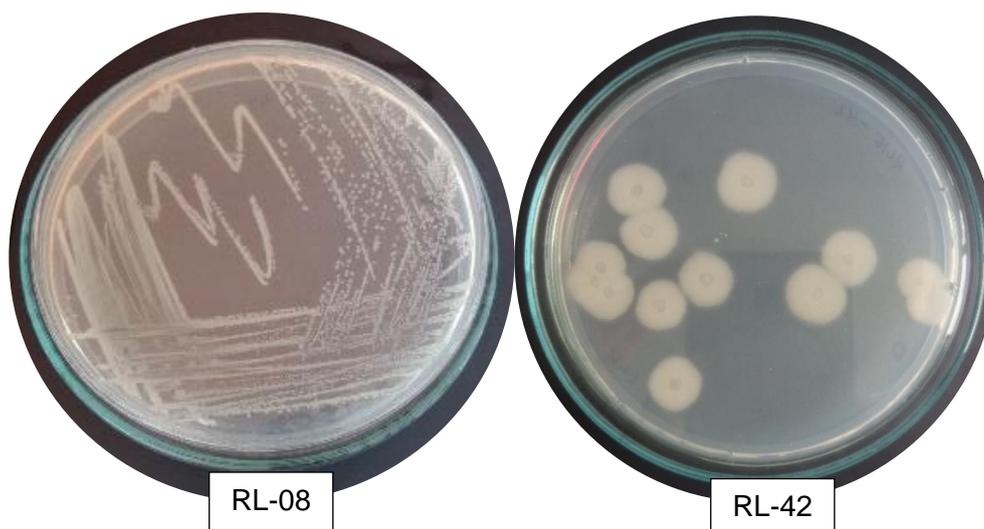
#### 4.2. CEPAS DE TRABAJO

Las cepas de trabajo fueron RL-08, *Shewanella* sp. y RL-42, *Bacillus velezensis*, las cuales fueron aisladas del sustrato a tratar (residuos de langostinos). Estas cepas se mantuvieron puras, aptas y viables en tubos inclinados, en placas estriadas y en matraces con medios de cultivos como se aprecia en la Figura 8, las proporciones se encuentran detalladas en Anexo 01.

#### Figura 8.

Cepas RL-08 y RL-42 puras en tubo inclinado, matraz y placa





### 4.3. CAPACIDAD ENZIMÁTICA E HIDRÓLISIS

#### PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Los resultados de las pruebas bioquímicas indicaron que la cepa RL-42 dio positivo para la prueba de catalasa y negativo para la prueba de oxidasa, esta además fue Gram-positiva (Tabla 10). La cepa RL-08 dio positivo a las pruebas de catalasa y oxidasa, siendo esta Gram-negativa (Tabla 10). Los resultados se pueden observar en el Anexo 02.

**Tabla 10.**

*Pruebas bioquímicas de la RL-08 y RL-42*

CEPA	CATALASA	OXIDASA	TINCIÓN GRAM
RL-08	+	+	-
RL-42	+	-	+

#### HIDRÓLISIS DE SUSTRATO:

Las pruebas de hidrólisis sobre sustratos específicos (tributirina, gelatina, caseína y quitina) indicaron que la cepa RL-08 es más proteolítica dado que, tiene un mayor halo que la cepa RL-42 tanto en agar gelatina y agar leche (caseína), siendo

que ambos medios son específicos para detectar enzimas proteolíticas (Tabla 11) validando lo indicado por Vasconcelos (2021) que cepas del generó *Shewanella* sp. suelen ser las más proteolíticas extraídas de RL.

De igual manera la cepa RL-42 tuvo un mayor halo que la cepa RL-08 en agar tributirina por lo que esta última podría tener una mayor actividad lipolítica, por el contrario esta cepa tenía menor actividad proteolítica que la cepa RL-08. Los resultados se pueden observar en el Anexo 02.

**Tabla 11.**

*Hidrólisis de Sustrato de la RL-08 y RL-42*

HIDRÓLISIS DE SUSTRATO (TAMAÑO DE HALO mm)				
CEPA	TRIBUTIRINA	GELATINA	CASEÍNA	QUITINA
RL-08	14	74	53	0
	18	84	55	0
RL-42	25	53	43	0
	24	63	44	0

Las cepas en estudio tienen una capacidad enzimática similar con respecto a las pruebas bioquímicas reportadas por Sirvas *et al.* (2021) y de igual forma la tendencia de crecimiento del halo en la hidrólisis de los sustratos específicos (caseína, gelatina, tributirina y quitina) es similar a las aisladas e identificadas por Sirvas *et al.* (2021). Sin embargo, las medidas de halos reportadas en este trabajo son mayores, posiblemente debido a la temperatura ya que, al comparar el método usado con el reportado por Sirvas *et al.* (2021) estas medidas solo difieren en la temperatura de 10°C esto debido al objetivo principal de la autora que era el identificar y caracterizar la cepa y lo realizan a 25°C.

Hay bacterias que tienen mayor capacidad proteolítica en placa que reportan mayor capacidad enzimática, superior a las cepas trabajadas en este estudio, sin embargo, las cepas en estudio fueron aisladas del sustrato en estudio del RL por lo

cual, se espera que las enzimas producidas por estas sean específicas para este sustrato y puedan degradar de manera efectiva las proteínas presentes en los RL durante los bioprocesos de DP.

#### 4.4. COMPARACIÓN DEL CRECIMIENTO MICROBIANO ENTRE LAS CEPAS RL-08 Y RL-42

Se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonia (UFC) de las cepas RL-08 y RL-42 a las 0, 24 y 48 horas (Tabla 12), en el Gráfico 1 y Gráfico 2 se podrán visualizar el crecimiento de ambas cepas. Las muestras vinieron de cultivos en 30 mL de 25% agua de mar, 10% de RL y 35°C. Esto se realizó con el objetivo de evaluar la cepa más eficiente en desproteinizar los RL y que se someterá en el bioproceso de desproteinización.

**Tabla 12.**

*Conteo en placa de las Cepas RL-08 Y RL-42 en UFC/mL a las 0, 24 y 48 horas*

Horas	RL-08 (UFC/ mL)			RL-42 (UFC/ mL)		
	M	B1	B2	M	B1	B2
0	$25 \times 10^4$	$18 \times 10^4$	$21 \times 10^4$	$12 \times 10^8$	$8 \times 10^8$	$10 \times 10^8$
24	$29 \times 10^8$	$18 \times 10^8$	$10 \times 10^8$	$4 \times 10^4$	$14 \times 10^8$	$5 \times 10^4$
48	$93 \times 10^8$	$22 \times 10^8$	$50 \times 10^9$	0	$2 \times 10^4$	$4 \times 10^4$

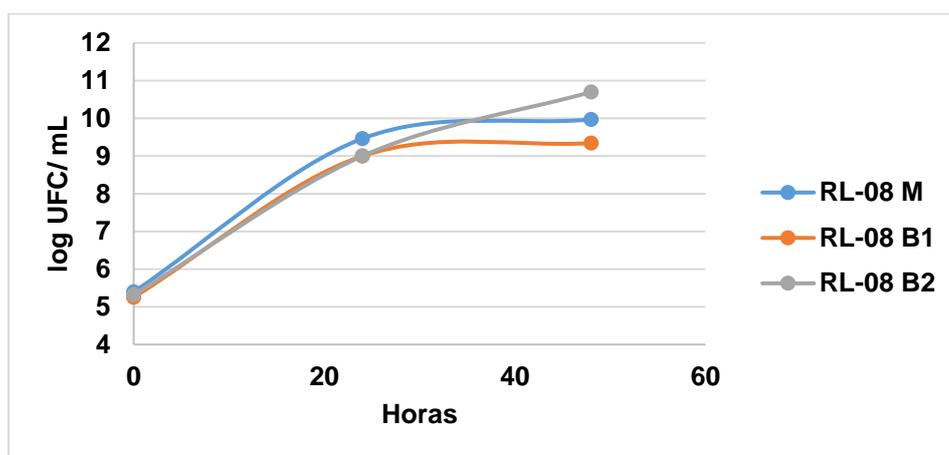
*Nota: Leyenda*

Abreviatura	Recipiente de cultivo	Condiciones de sistema
M	Matraz	Sin adicionar oxígeno
B1	Botella 1	Adición de oxígeno a razón de 0.05 vvm (50 ml/min)
B2	Botella 2	Adición de oxígeno a razón de 0.05 vvm (50 ml/min)

A continuación, en el Gráfico 1 se observa el comportamiento del crecimiento de la cepa RL-08 en estudio en los diferentes recipientes de cultivo a las siguientes condiciones en 30 mL de 25% agua de mar, 10% de RL y 35°C a las 0, 24 y 48 horas en unidades de log UFC/mL.

### Gráfico 1.

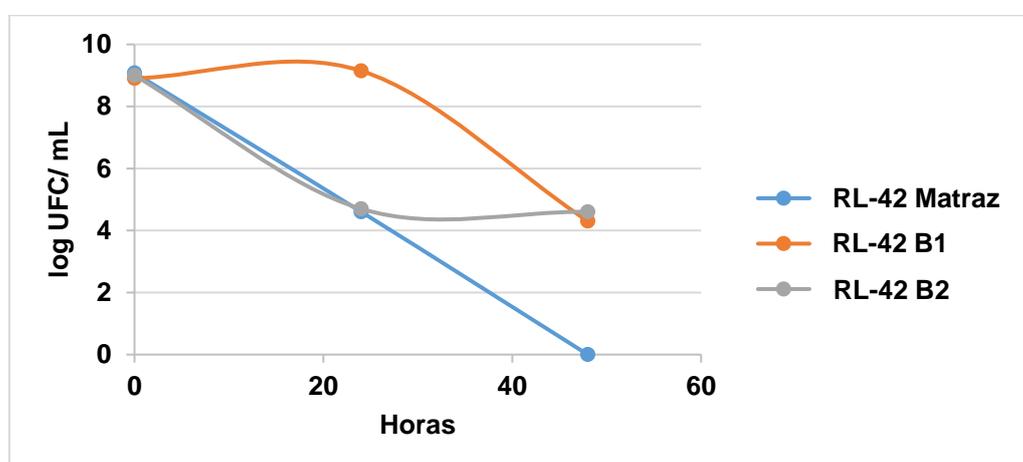
*Crecimiento de la RL-08 en log UFC/ mL por horas transcurridas*



En el Gráfico 2 se observa el comportamiento del crecimiento de la cepa RL-42 en estudio en los diferentes recipientes de cultivo en las siguientes condiciones: 30 mL de 25% agua de mar, 10% de RL y 35°C a las 0, 24 y 48 horas, en unidades de log UFC/mL.

### Gráfico 2.

*Crecimiento de la RL-42 en log UFC/ mL por horas transcurridas*



En el caso de la cepa RL-08 en los tres sistemas hay un crecimiento que se ve evidenciado por el aumento progresivo de las UFC, las cuales se han adaptado al medio y están aprovechando los nutrientes como la grasa y proteína presentes en los residuos de langostinos. De igual manera, no se observa una variación notable entre el uso del matraz y la botella con adición de aireación debido a que la bacteria es anaerobia facultativa (Hau & Gralnick, 2007).

En el caso de la cepa RL-42 el comportamiento en los tres sistemas muestra que hay una reducción de las UFC, por lo que se entiende que la cepa no se ha adaptado al medio y no ha sido capaz de aprovechar completamente los nutrientes presentes en los RL. En los sistemas podemos observar que en el matraz donde no hay inyección de aire la cepa no resiste más de 24 horas en el medio según la Tabla 12, siendo que a las 48 horas ya no hay presencia de UFC, por lo que la oxigenación es un factor importante para la cepa. Sin embargo, de acuerdo con lo reportado por Okaford (2007), la oxigenación representa alrededor del 20% del costo del producto terminado. Si ignoramos este 20% extra en el costo final del producto esperado y procedemos a oxigenar la muestra, como se hizo en los sistemas con aireación a 0.05 vvm (botellas) podemos ver que, si bien mejora el proceso, el número de UFC no se ve incrementado, sino decae, por lo que podemos confirmar de que la cepa RL-42 no pudo adaptarse al medio, esto pudo ocurrir dado que los nutrientes dentro de lo RL son de difícil adquisición tanto la proteína como la grasa contenida en los RL se encuentra unida a estos lo cual, dificulta que las enzimas tipo proteolíticas y lipolíticas de la cepa sean capaces de reducir o hidrolizar los mismos.

#### 4.5. COMPORTAMIENTO DE CRECIMIENTO MICROBIANO DE LA CEPA RL-08 A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AGUA DE MAR

Se evaluó la presencia de las UFC de la cepa RL-08 a las 24, 48 y 72 horas, cuando fue sometida a diferentes concentraciones de agua de mar, evidenciándose los resultados en la Tabla 13 y en el Gráfico 3 se puede observar el comportamiento de la cepa al transcurrir el tiempo. Esto se realizó con el objetivo de evaluar si era posible realizar el bioproceso de desproteínización sin aireación y utilizando agua de mar como medio. Estas dos condiciones permitirían a la planta trabajar con bajos costos de operación, considerando las siguientes asunciones de diseño de planta indicadas por Turton *et al.* (2018): primero la planta debería encontrarse cerca de la zona de cultivo de langostinos permitiendo disponibilidad de la materia prima y reduciendo los costos de transporte; en segundo lugar, emplear agua de mar en vez de agua potable, al igual que reducir o no emplear oxígeno.

**Tabla 13.**

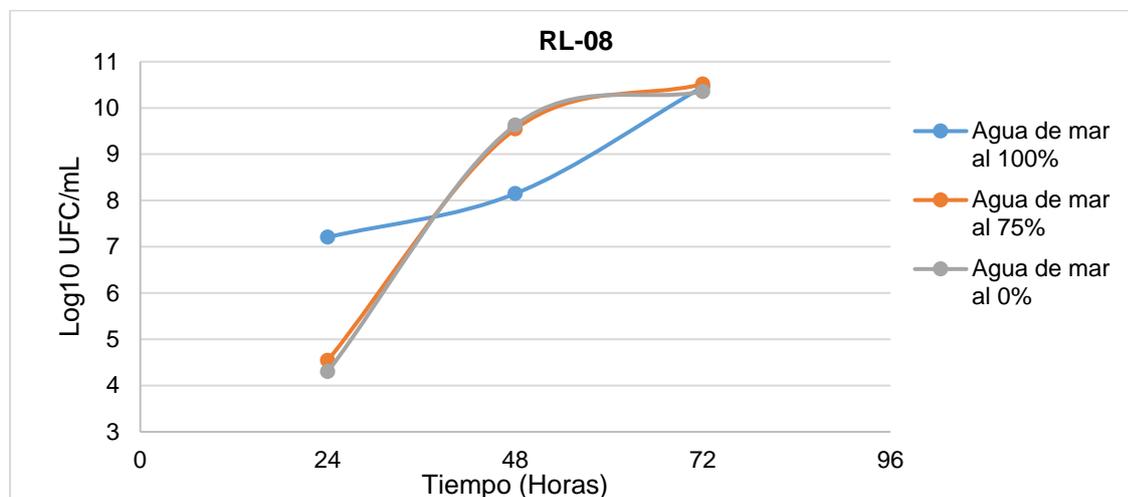
*Conteo en placa de la cepa RL-08 en UFC a distintas concentraciones de agua de mar a 24, 48 y 72 horas.*

Concentración de agua de mar	Agua de mar al 100%	Agua de mar al 75%	Agua de mar al 0%
Tiempo (Horas)	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL
24	$16.1 \times 10^6$	$35 \times 10^3$	$20 \times 10^3$
48	$14.1 \times 10^7$	$35 \times 10^8$	$42.5 \times 10^8$
72	$28.4 \times 10^9$	$32.7 \times 10^9$	$22.5 \times 10^9$

En el Gráfico 3, se observa el comportamiento del crecimiento de la cepa RL-08 en estudio a las siguientes condiciones: 30 mL de agua de mar al a 0, 75 y 100%, 10% de RL y 35°C a las 24, 48 y 72 horas, la cual se encuentra expresada como log UFC/ mL

**Gráfico 3.**

*Crecimiento de la RL-08 en UFC a distintas concentraciones de agua de mar*



Se observó que en todas las concentraciones de agua de mar hubo un incremento en el número de UFC lo que indica que la cepa se adaptó de manera exitosa a los medios y permitió aprovechar los nutrientes en los RL. De igual manera, hubo una mayor concentración de las UFC a las 24 horas en los ensayos con agua de mar al 100%, por el contrario, a las 48 horas los ensayos con agua de mar al 75 y 0% superaron a los ensayos que empleaban agua de mar al 100%. A pesar de esto a las 72 horas de crecimiento se observó que en todos los ensayos se alcanzó una concentración de orden  $10^9$  UFC/mL (Tabla 13).

Si bien a las 24 horas de crecimientos podemos evidenciar que usar el agua de mar al 100% parece incrementar la concentración de UFC/mL, en el caso de las 48 y 72 horas de proceso, esta diferencia no se ve claramente. Debido a esto se decidió realizar un ANOVA y un análisis de Tukey sobre las UFC/mL a las 48 y 72 horas de crecimiento con el fin de evaluar si existía una diferencia significativa entre las diferentes concentraciones de agua de mar.

El ANOVA sobre las UCF/mL a las 48 horas indicó que no existía diferencia significativa entre las diferentes concentraciones de agua de mar al ser su valor-p de

0.696 (Tabla 14). El análisis de Tukey de igual manera nos indicó que las medias de las UFC/mL a las 48 horas eran cercanas y no se evidencia una diferencia significativa entre los tratamientos (Tabla 15).

**Tabla 14.**

Análisis ANOVA de las UFC/mL a las 48 horas producto de la concentración de agua de mar (0, 75 y 100%).

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
Concentración de agua de mar	2	$1.583 \times 10^{18}$	$7.917 \times 10^{17}$	0.41	0.696
Error	3	$5.785 \times 10^{18}$	$1.928 \times 10^{18}$		
Total	5	$7.6 \times 10^{18}$			

*Nota:* GL: Grados de Libertad; SC: Suma de Cuadrados; y Valor-F: valor de relación de varianzas y Valor-p: valor de probabilidad.

**Tabla 15.**

Análisis de Tukey-Kramer de las UFC/mL a las 48 horas producto de la concentración de agua de mar (0, 75 y 100%).

<b>Tratamientos</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>
Agua de mar al 0%	2	4250000000	A
Agua de mar al 75%	2	3500000000	A
Agua de mar al 100%	2	3000000000	A

*Nota:* Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Con el fin de validar los resultados de ambos análisis se realizó la evaluación de los supuestos sobre los residuos lo cual se puede observar en el Anexo 07, se evaluó **la normalidad** mediante un **análisis de Anderson-Darling** en el cual se obtuvo un valor-p de 0.606 (Gráfico 6) aceptándose que los datos provienen de una población normal; se evaluó la **homocedasticidad** mediante un **análisis de Bartlett** obteniéndose un valor-p de 0.158 (Gráfico 8) aceptándose *la igualdad de varianzas*; finalmente se evaluó la **independencia de los errores** graficando los mismos, observándose que estos errores eran independientes uno de otro aceptándose el supuesto.

Con respecto del ANOVA de las UFC/mL a las 72 horas, se observó que no existía diferencia significativa entre las diferentes concentraciones de agua de mar al ser su valor-p de 0.439 (Tabla 16). El análisis de Tukey, de igual manera, nos indicó que las medias de las UFC/mL a las 72 horas eran cercanas y no se evidencia una diferencia significativa entre los tratamientos (Tabla 17).

**Tabla 16.**

*Análisis ANOVA de las UFC/mL a las 72 horas producto de la concentración de agua de mar (0, 75 y 100%).*

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Sec.</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
Tratamientos	2	$1.059 \times 10^{20}$	$1.060 \times 10^{20}$	$5.299 \times 10^{19}$	1.10	0.439
Error	3	$1.447 \times 10^{20}$	$1.447 \times 10^{20}$	$4.823 \times 10^{19}$		
Total	5	$2.507 \times 10^{20}$				

*Nota:* GL: Grados de Libertad; SC: Suma de Cuadrados; y Valor-F: valor de relación de varianzas y Valor-p: valor de probabilidad.

**Tabla 17.**

*Análisis de Tukey-Kramer de las UFC/mL a las 72 horas producto de la concentración de agua de mar (0, 75 y 100%).*

<b>Tratamientos</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>
Agua de mar al 75%	2	32700000000	A
Agua de mar al 100%	2	28400000000	A
Agua de mar al 0%	2	22450000000	A

*Nota:* Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Con el fin de validar los resultados de ambos análisis se realizó la evaluación de los supuestos sobre los residuos, se evaluó la normalidad mediante un análisis de Anderson-Darling en el cual se obtuvo un valor-p de 0.146 (Gráfico 7) aceptándose que los datos provienen de una población normal; se evaluó la homocedasticidad mediante un análisis de Bartlett obteniéndose un valor-p de 0.899 (Gráfico 9) aceptándose la igualdad de varianzas; finalmente se evaluó la independencia de los errores graficando los mismos, observándose que estos eran independientes uno de otro aceptándose el supuesto.

A partir de los análisis anteriormente descritos podemos ver que no hay una diferencia significativa entre usar agua de mar al 0, 75 y 100%, por lo que se decidió emplear la concentración al 100% en los siguientes ensayos, con el fin de abaratar los costos del proceso.

#### **4.6. ANÁLISIS DEL BIOPROCESO DE DESPROTEINIZACIÓN**

El bioproceso de desproteización (DP) como se observa en el Anexo 04 generó 2 fracciones, una fracción soluble (FS) conformada por restos y productos proteicos en solución en fase líquida, y una fracción insoluble (FI) compuesta por los RL desproteinizados.

La FS de la desproteínización de los RL, analizada mediante el método de Lowry, presentó valores de productos proteicos equivalente a albúmina que oscilaban desde 19.94 a 227.30 mg de albúmina en 30 mL (Tabla 18).

Las FI se analizó mediante el método Kjeldahl obteniendo los valores de Nitrógeno Total luego de aplicar las ecuaciones planteadas por Diaz Rojas *et. al.* (2006) para la determinación de proteína y quitina como se observa en la Tabla 18. Se obtuvieron valores de proteína remanente que oscilaban entre 1.7% a 7.95% en base seca alcanzando valores de DP que oscilaban de 1.89% a 78.99% (Tabla 18 y Anexo 06). Se describe y menciona a mayor detalle el análisis de fracciones en el Anexo 05.

**Tabla 18.**

*Resumen de resultados del proceso de desproteínización*

Bioensayo	Cenizas %	Lowry (mg de albúmina equivalente)	Nitrógeno total (%)	Quitina base seca (%Q)	Proteína base seca (%P)	%DP
B1	58.22	122.07	2.59	36.36	1.80	77.78
B2	56.33	115.63	2.84	36.86	3.18	60.69
B3	58.20	207.02	2.67	35.60	2.59	68.09
B4	58.61	199.42	2.89	32.61	5.16	36.30
B5	58.86	104.25	2.71	34.11	3.41	57.88
B6	57.64	127.64	2.69	36.30	2.44	69.85
B7	61.09	183.29	3.07	23.60	7.95	1.89
B8	59.33	227.30	2.69	33.52	3.53	56.39
B9	57.89	113.21	2.88	33.96	4.53	44.05
B10	58.13	88.50	2.88	33.47	4.78	41.05
B11	58.51	19.94	2.93	32.38	5.50	32.17

Bioensayo	Cenizas %	Lowry (mg de albúmina equivalente)	Nitrógeno total (%)	Quitina base seca (%Q)	Proteína base seca (%P)	%DP
B12	57.67	207.44	2.62	37.00	1.70	78.99
B13	56.85	166.90	2.77	36.74	2.80	65.48
B14	60.88	188.68	2.42	33.68	1.83	77.45
B15	58.71	132.19	2.59	35.54	2.13	73.74
B16	58.47	148.09	2.90	32.74	5.17	36.17
B17	59.66	104.97	2.80	31.78	4.94	39.02
B18	56.08	49.13	2.76	38.19	2.11	73.99
B19	57.57	152.16	2.65	36.84	1.97	75.68
B20	59.33	136.47	2.77	32.67	4.38	45.94
B24	59.03	118.26	2.83	32.51	4.84	40.26
B25	56.99	151.68	3.00	34.20	5.19	35.94

En los siguientes subcapítulos del 4.7 se realizará el análisis estadístico de la fase soluble e insoluble con respecto a los resultados en función a la proteína soluble y el %DP, respectivamente. Además, se contrastará con otros autores con respecto a la variabilidad de tiempo, %DP, etc.

## 4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### 4.7.1. Comparación de los bioprocesos de desproteización (DP) con la cepa RL-08 sobre la respuesta porcentaje de DP (%DP)

Los porcentajes de DP obtenidos con la cepa RL-08 a diferentes condiciones de proceso fueron analizados observándose una desviación estándar promedio de 13.6 (Tabla 19) lo cual, si bien nos indica que los valores no se ajustan a los valores

esperados por el modelo, tampoco se encuentren dispersos ni alejados de la media global. De igual manera, estos datos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) el cual indicó que existía diferencia significativa entre los mismos (Tabla 20), siendo el valor de probabilidad (valor-p) menor al valor de significancia escogido de 0.05.

Se evaluó, de igual manera, los supuestos de normalidad (Anexo 07), homocedasticidad e independencia de los errores observándose que todos fueron cumplidos, permitiendo dar validez a los resultados obtenidos en el ANOVA (Tabla 19). Los datos tuvieron una distribución normal, siendo el valor de la prueba de AD de 0.275 y una P de 0.642 mayor a 0.05 (Gráfico 11). La evaluación de homocedasticidad, igualdad de varianza o dispersión, indicó que los datos no continúan una secuencia siendo el P obtenido de la prueba de Bartlett de 0.834 mayor a 0.05 (Gráfico 12). Finalmente, la prueba de independencia indicó que los residuos no seguían una secuencia definida, por lo que se aprobó la hipótesis de independencia en los residuos.

**Tabla 19.**

*Media de las tasas de desproteinización y desviación estándar de los bioensayos, con la cepa RL-08.*

<b>Bioensayos</b>	<b>Número de replicas</b>	<b>Media del porcentaje de DP</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Intervalos de Confianza (99% IC)</b>
B1	2	77.78	9.18	(53.90; 101.65)
B10	2	41.05	10.45	(17.17; 64.93)
B11	2	32.2	14.6	(8.3; 56.0)
B12	2	79.0	25.9	(55.1; 102.9)
B13	2	65.5	15.1	(41.6; 89.4)
B14	2	77.4	14.2	(53.6; 101.3)
B15	2	73.7	30.4	(49.9; 97.6)

Bioensayos	Número de replicas	Media del porcentaje de DP	Desviación estándar	Intervalos de Confianza (99% IC)
B16	2	36.17	5.82	(12.29; 60.04)
B17	2	39.02	11.17	(15.15; 62.90)
B18	2	74.0	30.0	(50.1; 97.9)
B19	2	75.7	14.8	(51.8; 99.6)
B2	2	60.69	11.74	(36.82; 84.57)
B20	2	45.9	22.1	(22.1; 69.8)
B3	2	68.1	22.8	(44.2; 92.,0)
B4	2	36.296	0.723	(12.419; 60.174)
B5	2	57.88	7.28	(34.00; 81.76)
B6	2	69.85	8.00	(45.98; 93.73)
B7	2	1.892	0.000	(-21.985; 25.770)
B8	2	56.39	1.42	(32.52; 80.27)
B9	2	44.1	16.2	(20.2; 67.9)

**Tabla 20.**

*ANOVA del porcentaje de desproteínización (% DP), con la cepa RL-08.*

Fuentes de variación	GL	SC	MC	Valor-F	Valor-p	R <sup>2</sup> aj
Bioensayos	19	15944	839.1	3.20	0.006	
Error	20	5241	262.1			
Total	39	21185				51.76

*Nota:* GL: Grados de Libertad; SC: Suma de Cuadrados; y Valor-F: valor de relación de varianzas; AD: Anderson-Darling y Valor-p: valor de probabilidad; P.

El análisis de Tukey-Kramer sobre el %DP permitió determinar que el bioensayo B12 fue el que tuvo el %DP más alto seguido de B1 (78.99 y 77.78 %DP

respectivamente), de igual manera se observó que el bioensayo B7 fue el que alcanzó el menor valor de %DP (1.89 %DP). Todos los bioensayos con excepción del bioensayo B7 no fueron significativamente diferentes entre sí (Tabla 21).

**Tabla 21.**

*Análisis secuencial de Tukey-Kramer sobre el porcentaje de desproteización de residuos de langostino, con la cepa RL-08.*

<b>Bioensayos</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>	
B12	2	79.0	A	
B1	2	77.78	A	
B14	2	77.4	A	
B19	2	75.7	A	
B18	2	74.0	A	
B15	2	73.7	A	
B6	2	69.85	A	
B3	2	68.1	A	
B13	2	65.5	A	B
B2	2	60.69	A	B
B5	2	57.88	A	B
B8	2	56.39	A	B
B20	2	45.9	A	B
B9	2	44.1	A	B
B10	2	41.05	A	B

<b>Bioensayos</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>	
B17	2	39.02	A	B
B4	2	36.296	A	B
B16	2	36.17	A	B
B11	2	32.2	A	B
B7	2	1.892		B

*Nota:* Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Se puede apreciar esta tabla en el Gráfico 10 (Anexo 07).

#### **4.7.2. Comparación de los bioprocesos de desproteización (DP) con la cepa RL-08 sobre la respuesta proteína soluble (mg de albúmina/ mL).**

Los valores de proteína soluble obtenidos con la cepa RL-08 a diferentes condiciones de proceso fueron analizadas observándose una desviación estándar promedio de 27.01 (Tabla 22) la cual, si bien nos indica que los valores no se ajustan a los valores esperados por el modelo, tampoco se encuentren dispersos ni alejados de la media global. De igual manera, estos datos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) el cual indicó que existía diferencia significativa entre los mismos (Tabla 22 y Anexo 06), siendo el p menor al valor de significancia escogido de 0.05.

**Tabla 22.**

*Media del contenido de proteína soluble en la FS y desviación estándar de los bioensayos, con la cepa RL-08.*

<b>Bioensayos</b>	<b>Número de réplicas</b>	<b>Media de la proteína soluble</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Intervalos de Confianza (99% IC)</b>
B1	2	122.07	10.45	(68.89; 175.25)
B10	2	88.5	19.7	(35.3; 141.7)
B11	2	19.9	14.7	(-33.2; 73.1)
B12	2	207.44	5.83	(154.26; 260.62)
B13	2	166.0	3.38	(113.72; 220.08)
B14	2	188.68	13.51	(135.50; 241.86)
B15	2	132.19	7.25	(79.01; 185.37)
B16	2	148.1	87.7	(94.9; 201.3)
B17	2	105.0	76.9	(51.8; 158.1)
B18	2	49.1	18.4	(-4.1; 102.3)
B19	2	152.16	12.95	(98.98; 205.34)
B2	2	115.63	12,40	(62.45; 168.81)
B20	2	136.5	64.2	(83.3; 189.6)
B3	2	207.0	23.8	(153.8; 260.2)
B4	2	199.42	12.44	(146.24; 252.60)
B5	2	104.2	47.5	(51.1; 157.4)
B6	2	127.6	46.9	(74.5; 180.8)
B7	2	183.29	11.01	(130.11; 236.47)
B8	2	227,3	26,3	(174,1; 280,5)
B9	2	113.2	24.8	(60.0; 166.4)

**Tabla 23.**

*ANOVA del contenido de proteína soluble producto de la DP de RL, con la cepa RL-08.*

<b>Fuentes de variación</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>MC</b>	<b>Valor-F</b>	<b>Valor-p</b>	<b>R<sup>2</sup>aj</b>
<b>Bioensayos</b>	19	110120	5796	4.46	0.001	
<b>Error</b>	20	25998	1300			
<b>Total</b>	39	136118				62.76

*Nota:* GL: Grados de Libertad; SC: Suma de Cuadrados; y Valor-F: valor de relación de varianzas y Valor-p: valor de probabilidad; P.

Se evaluó de igual manera los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia de los errores (Anexo 07) observándose que todos fueron cumplidos, permitiendo dar validez a los resultados obtenidos en el ANOVA (Tabla 23). Los datos tuvieron una distribución normal, siendo el valor de la prueba de AD de 0.623 y un P de 0.098 mayor a 0.05 (Gráfico 14). La evaluación de homocedasticidad indicó que los datos no continúan una secuencia siendo P obtenido de la prueba de Bartlett de 0.452 mayor a 0.05 (Gráfico 15). En conclusión, los residuos no continuaban una secuencia definida se difiere de la prueba de independencia por lo cual, se aprobó la hipótesis de independencia en los RL.

El análisis de Tukey-Kramer sobre el contenido de proteína soluble determina que el bioensayo B8 fue el que generó la mayor cantidad de proteína soluble seguido de B12 (227.3 y 207.44 mg de albúmina/mL), de igual manera se observó que el bioensayo B11 fue el que alcanzó el menor valor de proteína soluble (19.9 mg de albúmina/mL). Todos los bioensayos con excepción del bioensayo B18 y B11 no fueron significativamente diferentes entre sí (Tabla 24).

**Tabla 24.**

*Análisis secuencial de Tukey-Kramer sobre el contenido de proteína soluble producto de la DP de RL, con la cepa RL-08*

<b>Bioensayos</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>		
B8	2	227.3	A		
B12	2	207.44	A		
B3	2	207,0	A		
B4	2	199.42	A		
B14	2	188,68	A	B	
B7	2	183.29	A	B	
B13	2	166.90	A	B	
B19	2	152.16	A	B	C
B16	2	148.1	A	B	C
B20	2	136.5	A	B	C
B15	2	132.19	A	B	C
B6	2	127.6	A	B	C
B1	2	122.07	A	B	C
B2	2	115.63	A	B	C
B9	2	113.2	A	B	C
B17	2	105.0	A	B	C
B5	2	104.2	A	B	C
B10	2	88.5	A	B	C
B18	2	49.1		B	C
B11	2	19.9			C

*Nota:* Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Se puede apreciar esta tabla en el Gráfico 13 (Anexo 07).

#### **4.7.3. Análisis del diseño de la MSR y búsqueda del modelo de segundo orden en función del %DP.**

Se diseñó una MSR con respecto a las variables temperatura, residuo y tiempo donde se evaluó el %DP. Durante la elaboración de este diseño la etapa I o cribado de las variables no fue necesaria, dado que se trabajó con solo 3 variables. Con respecto a la segunda etapa o búsqueda del modelo de primer orden tampoco fue requerida, dado que los investigadores del proyecto principal habían realizado estudios previos, encontrando curvatura en el sistema producto del bioproceso de DP en RL empleando la cepa RL-08.

A partir de información previa y de los resultados obtenidos en las etapas de crecimiento y comportamiento de la cepa RL-08 (Punto 4.4 y 4.5), se completó los diseños anteriores permitiendo obtener un Diseño Central Compuesto (DCC) cuyos resultados fueron sometidos a un ANOVA (Tabla 21). La evaluación de los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia de los errores fueron aceptados dando así validez al ANOVA y al modelo de segundo orden. La normalidad indicó una distribución normal, siendo el valor de la prueba de Anderson Darling de 0.283 y el valor-p 0.616 mayor a 0.05 (Anexo 07, Gráfico 16); la homocedasticidad indicó que los residuos no continuaban una secuencia, donde la prueba de Bartlett dio un valor-p de 0.676 mayor a 0.05 (Anexo 07, Gráfico 17). La evaluación de independencia de los errores indicó que los RL no continuaban una secuencia definida aceptándose el supuesto.

Se observó en el ANOVA que el efecto de integración tiempo\*temperatura fue significativo en explicar el comportamiento de la DP con la cepa RL-08, mientras que todos los demás efectos tanto singulares, cuadráticos y de interacción no fueron significativos en explicar el comportamiento de la DP (Tabla 21).

**Tabla 25.**

*Análisis de varianza de la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) en función del %DP*

<b>Fuentes de variación</b>	<b>SC</b>	<b>Valor-F</b>	<b>Valor-p</b>	<b>Efecto</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>R<sup>2</sup>aj</b>
<b>Interacciones individuales</b>	310.4	0.20	0.894			
Temperatura (°C)	23.1	0.05	0.833	0.92		
Residuos (p/v)	90.0	0.18	0.677	-1.82		
Tiempo (h)	197.3	0.39	0.539	-2.69		
<b>Interacciones cuadráticas</b>	1738.3	1.14	0.350			
Temperatura(°C)*Temperatura (°C)	1107.8	1.94	0.174	-5.86		
Residuos (p/v)*Residuos (p/v)	83.2	0.09	0.767	-1.26		
Tiempo (h)*Tiempo (h)	547.3	1.07	0.309	4.36		
<b>Interacciones dobles</b>	3832.5	2.50	0.078			
Temperatura (°C)*Residuos (p/v)	193.5	0.38	0.543	3.48		
Temperatura (°C)*Tiempo (h)	3326.4	6.52	0.016	14.42		
Residuos (p/v)*Tiempo (h)	312.6	0.61	0.440	-4.42		
<b>Error</b>	15303.4					
<b>Total</b>	21184.6				27.76	6.09

*Nota:* GL: Grados de Libertad; SC: Suma de Cuadrados; y Valor-F: valor de relación de varianzas y Valor-p: valor de probabilidad.

Posterior al ANOVA y adicionalmente se ejecutó el análisis de regresión lineal múltiple, obteniéndose así la siguiente ecuación:

$$\%DP = 198 + 4.8A - 0.65B - 10.28C - 0.235A^2 - 0.0257B^2 + 0.0303C^2 + 0.099AB + 0.2403AC - 0.0526BC.$$

Donde: A es la Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), B es la proporción de residuos (p/v) y C es el tiempo (horas).

Si bien el análisis permitió obtener el modelo matemático éste no se ajustó dado que el coeficiente de determinación ajustado ( $R^2_{aj}$ ) fue de 6.09 y de acuerdo con lo explicado por Gutiérrez y de la Vara (2012), para poder aceptar que la ecuación de segundo orden sea capaz de predecir tanto la región experimental como operacional, el valor debió ser al menos 70% para optimizar el sistema.

Al observarse que el modelo no fue capaz de optimizar la respuesta, se decidió realizar los gráficos de superficie y contorno. En los gráficos de superficie (Gráfico 4), se observó que todas superficies fueron de tipo minimax o silla de montar, las cuales y según Gutiérrez y de la Vara (2012), nos indican que el punto máximo y mínimo de %DP se encuentran próximos, pero no fueron encontrados. De igual manera, en los gráficos de contorno (Gráfico 4), observamos que el gráfico de %DP vs residuos y temperatura se delimitó la zona donde se alcanzaba los mayores valores de %DP, mientras que, en los otros gráficos se aprecia las zonas cercanas tanto al punto mínimo como máximo.

**Gráfico 4.**

Gráficos de contorno y de superficies de %DP con respecto a las variables en estudio.

Gráfica de superficie de %DP vs. Tiempo (h) y Temperatura (°C)

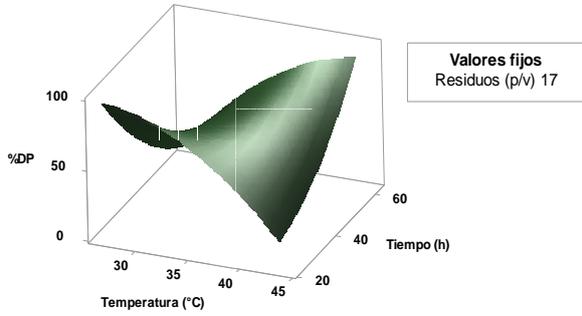
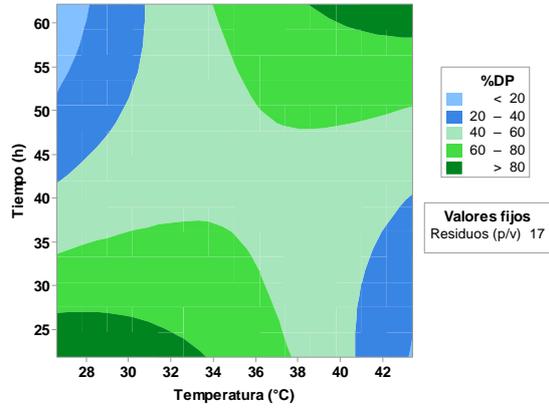


Gráfico de contorno de %DP vs. Tiempo (h) y Temperatura (°C)



Gráfica de superficie de %DP vs. Residuos (p/v) y Temperatura (°C)

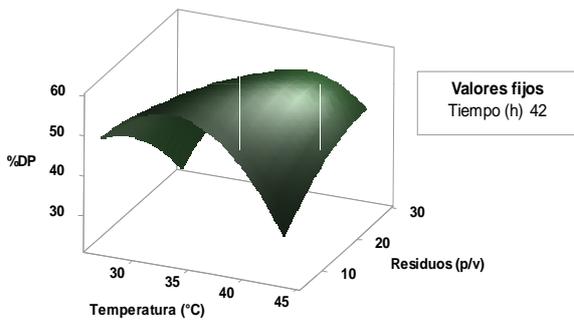
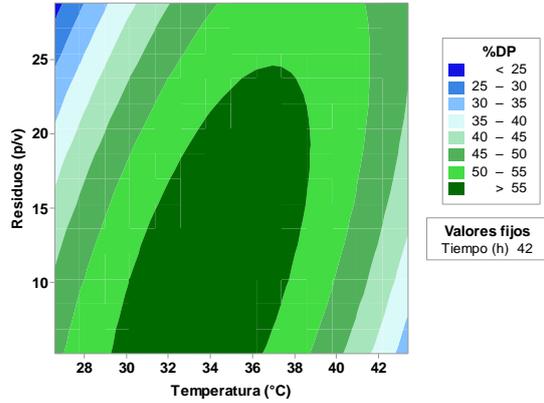


Gráfico de contorno de %DP vs. Residuos (p/v) y Temperatura (°C)



Gráfica de superficie de %DP vs. Tiempo (h); Residuos (p/v)

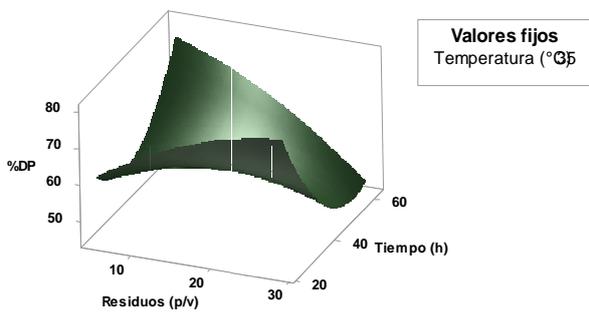
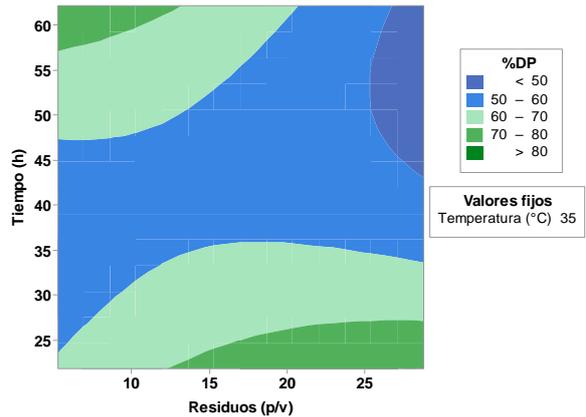


Gráfico de contorno de %DP vs. Tiempo (h) y Residuos (p/v)



Finalmente, a pesar de que con la MSR no se logró optimizar, sin embargo, en el bioproceso se encontró que el mejor ensayo fue el B12 seguido del B1, que alcanzaron un %DP de 79.45 y 78.22% respectivamente. El mejor bioensayo (B12) se realizó a 35 °C con una proporción de residuo (p/v) de 28.77% y se incubó por 42 horas.

Se obtuvo un mejor tiempo de proceso respecto al porcentaje de desproteínización (%DP) para la recuperación de quitina comparado a lo reportado por Sirvas & Perochena, 2020, a pesar de que se incrementan las fuentes nutricionales, también se ha obtenido un mejor %DP que Sedaghat *et al.*, (2015), Younes *et al.*, (2014), Arbia *et al.*, (2013) y Khorrami *et al.*, (2012) esto debido al comportamiento de los microorganismos sometidos, usados por los autores antes mencionados (*Bacillus sp.*, *Lactobacillus sp.* entre otros).

Sin embargo, hay autores que han obtenido mejores tiempos de procesos y una mejor %DP como Hamdi *et al.* (2017) (50°C, relación E/S de 5U/mg, conchas de camarón, conchas de cangrejo y pH 8.); Mhamdi *et al.* (2017) (pH 10, 60 °C y relación E/S de 10 U/mg); Younes *et al.* (2016) (7.75 U/mg A21, 60°C; 10 U/mgS. scrofa, 50°C.); Hongkulsup *et al.* (2016) (Relación E/S de 55 U/g, pH 7 y 37°C.); Pachapur *et al.* (2015) (Residuos de crustáceos 18g/L, 10 g/L glucosa, pH inicial 7, *Bacillus subtilis* y Bacilo 40°C y 150 rpm.); Younes *et al.* (2012) (Tasa E/S de 7.75 U/mg, 60°C y pH 9); Giyose *et al.* (2010) (37°C) y Manni *et al.* (2010) (Relación cáscaras/agua 1:2 (p/v), 40°C). Esto se debe a condiciones de proceso dependientes del medio de cultivo, el cual a su vez depende de la demanda de insumos como las fuentes de carbono tales como melaza, glucosa o sacarosa. También se ha visto una mejora en el proceso por parte de estos autores usando técnicas mixtas que empleaban proteasas de distintas especies, sustancias químicas como ácidos y bases, etc. Estas estrategias de proceso demandan mayores costos operativos, por otro lado, el proceso implementado en el presente estudio se ha realizado con los microorganismos del mismo sustrato, usando 100% agua de mar y residuos de langostinos como medio de cultivo abaratando

costos, el proceso biotecnológico estudiado no requirió de insumos químicos y trabajó a condiciones moderadas y eficientes.

#### **4.7.4. Análisis del diseño de la MSR y búsqueda del modelo de segundo orden, en función de la proteína soluble producto de la DP de RL.**

Empleando la MSR anteriormente construida, se evaluó la proteína soluble producto del bioproceso de DP. De manera similar a la etapa I o cribado, la etapa II o búsqueda de primer orden no fueron necesarias. El diseño fue completado obteniendo un DCC cuyos resultados se evaluaron mediante un ANOVA (Tabla 26). Se aceptó el ANOVA y la ecuación de segundo orden siendo validado por los supuestos de homocedasticidad, normalidad e independencia de los errores. La normalidad indicó una distribución normal, siendo el valor de la prueba de AD de 0.170 y el P 0.927 mayor a 0.05 (Anexo 07, Gráfico 18); la homocedasticidad indicó que los RL no continuaban una secuencia, donde la prueba de Bartlett dio un valor-p de 0.515 mayor a 0.05 (Anexo 07, Gráfico 19). La evaluación de independencia de los errores indicó que los RL no continuaban una secuencia definida aceptándose la hipótesis.

Se observó en el ANOVA que el efecto individual, la proporción de residuos es significativo y en el efecto cuadrático, fue significativo en tiempo los cuales pueden explicar el comportamiento de la DP y la generación de proteína en la FS con la cepa RL-08. Los demás efectos singulares, cuadráticos y de interacción no fueron significativos en explicar el comportamiento de la DP y la generación de proteína en la FS con la cepa RL-08 (Tabla 26).

Posterior al ANOVA y adicionalmente se ejecutó el análisis de regresión lineal múltiple, obteniéndose la ecuación matemática:

$$\text{Proteína soluble} \left( \frac{\text{mg de albumina}}{\text{mL}} \right) = 599 - 6.1 A + 1.2B - 21.41C - 0.029A^2 + 0.078B^2 + 0.1838C^2 + 0.07AB + 0.170AC - 0.015BC.$$

Donde: A es la Temperatura (°C), B es la proporción de residuos (p/v) y C es el tiempo (horas)

**Tabla 26.**

*Análisis de varianza de la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR), sobre la respuesta proteína soluble.*

<b>Fuentes de variación</b>	<b>SC</b>	<b>Valor-F</b>	<b>Valor-p</b>	<b>Efecto</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>R<sup>2</sup>aj</b>
<b>Interacciones individuales</b>	<b>64529</b>	<b>13.11</b>	<b>0,000</b>			
Temperatura (°C)	20	0.01	0.912	0.86		
Residuos (p/v)	64329	39.20	0.000	48.53		
Tiempo (h)	179	0.11	0.743	2.56		
<b>Interacciones cuadráticas</b>	<b>20579</b>	<b>4.18</b>	<b>0.014</b>			
Temperatura (°C)*Temperatura (°C)	353	0.01	0.923	-0.74		
Residuos (p/v)*Residuos (p/v)	40	0.25	0.618	3.80		
Tiempo (h)*Tiempo (h)	20186	12.30	0.001	26.46		
<b>Interacciones dobles</b>	<b>1778</b>	<b>0.36</b>	<b>0.781</b>			
Temperatura (°C)*Residuos (p/v)	95	0.06	0.812	2.4		
Temperatura (°C)*Tiempo (h)	1658	1.01	0.323	10.2		
Residuos (p/v)*Tiempo (h)	25	0.02	0.903	1.2		
<b>Error</b>	<b>49232</b>					
<b>Total</b>	<b>136118</b>				<b>63.83</b>	<b>52.98</b>

*Nota:* GL: Grados de Libertad; SC: Suma de Cuadrados; y Valor-F: valor de relación de varianzas y Valor-p: valor de probabilidad.

El análisis para obtener un modelo matemático muestra que el coeficiente de determinación ajustado (R<sup>2</sup>aj) fue de 52.98 y no se aproxima al valor mínimo de 70%

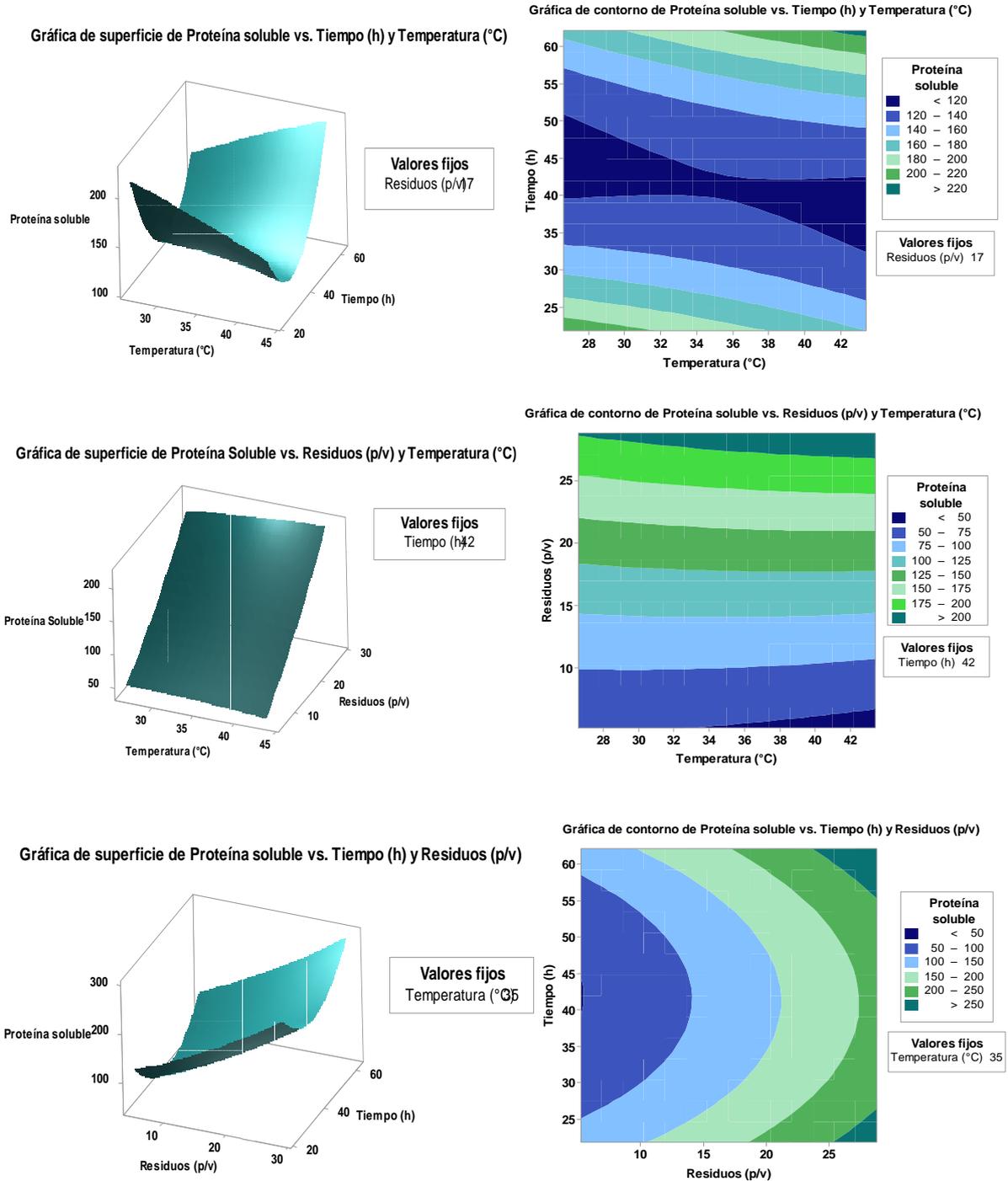
requerido para aceptar su capacidad de predicción y optimizar el sistema, a pesar de ser superior al obtenido con la respuesta de %DP.

Al observarse que el modelo no fue capaz de optimizar la respuesta se decidió realizar los gráficos de superficie y contorno, con el fin de evaluar la superficie obtenida. En los gráficos de superficie (Gráfico 5), se observó que solamente el gráfico de proteína soluble vs tiempo y temperatura presentó una superficie de tipo minimax o silla de montar las cuales y según Gutiérrez y de la Vara (2012) nos indica que el punto máximo y mínimo de proteína soluble se encuentra próximo. Con respecto de las otras dos superficies se puede observar que fueron de tipo plano, lo que nos indica que las regiones experimentales y operacionales no fueron adecuadas para esta respuesta.

Asimismo, en los gráficos de contorno (Gráfico 5), observamos que solamente los gráficos de proteína soluble respecto al tiempo y residuos; y el gráfico de proteína soluble respecto al tiempo y temperatura, mostraron una aproximación a la zona mínima de producción de proteína soluble. El gráfico de contorno de proteína soluble respecto a residuos y temperatura no indicó ninguna de las zonas máximas o mínimas delimitadas.

**Gráfico 5.**

Gráficos de contorno y de superficies de la proteína soluble generada del bioproceso de DP de RL, con respecto de las variables en estudio.



Finalmente, a pesar de que con la MSR no se logró optimizar el bioproceso se encontró que el mejor ensayo fue el B8 seguido del B12, que alcanzaron un contenido de proteína en la fracción soluble equivalente a 227.3 y 207.4 mg de albúmina/mL. El

mejor bioensayo (B8), para esta respuesta se realizó a 40°C con una proporción de residuo (p/v) de 24% y se incubó por 54 horas. Comparando las MSR generadas de la fase soluble con la fase insoluble apreciamos que no hay un comportamiento de dependencia (Gráfico 5 y Gráfico 6) esto se induce del comportamiento del microorganismo lo cual también se ve reflejado en el análisis estadístico explicado anteriormente (Tabla 25 y Tabla 26).

No se logró la optimización posiblemente porque no se evaluaron todos los factores que regían el proceso o los niveles no fueron los indicados. Los factores que tienen valores de probabilidad alto no deberían considerarse, sin embargo, siempre se debe considerar que la temperatura es primordial por estar ligada directamente a las funciones biológicas de los microorganismos.

Realizando un análisis adicional, se proyectó que pasaría si procesáramos los residuos de langostinos generados anualmente (Perú actualmente tiene una producción de 34,000 TM de langostino anual), el análisis determinó que obtendríamos un equivalente de 1,698.9 TM de proteínas solubles producto de la hidrólisis microbiana con los microorganismos empleados en este estudio, esta al igual que en los estudios experimentales que conformaron el marco de esta tesis consistirían en una fase soluble rica en proteínas (proteína soluble- resultados por el método de Lowry), los cuales podrían ser comercializados como suplemento animal. Asimismo, se usa como alimento en la industria acuícola, pues su contenido proteico es comparable con la caseína, que al ser agregado a dietas de soja mejoran en un 74% (Barbosa, 2010).

A través del bioproceso estudiado en el presente trabajo, seríamos capaces de aprovechar los residuos de langostinos generando residuos de langostinos parcialmente desproteinizados (fracción insoluble) como paso preliminar para la obtención de quitina y subproductos tales como hidrolizados proteicos (la fracción insoluble rica en proteínas), lo cual permitiría reducir la cantidad de materia orgánica en descomposición que se produce actualmente contribuyendo a proteger el medio

natural, los cuerpos acuáticos receptores y los espacios de turismos. De igual manera estos productos podrían ser comercializados debido a que poseen un valor en el mercado internacional, por lo que se recomienda realizar estudios de mercado de los mismos. Este proceso, por lo tanto, permitiría la implementación de un bioproceso amigable con el medio ambiente y que valorizaría los residuos de langostinos.

## CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. CONCLUSIONES

- La cepa elegida del género *Shewanella* sp. (RL-08) logró hidrolizar las proteínas de los residuos de langostinos. Al compararla con la cepa del género *Bacillus* sp., la proteólisis en la *Shewanella* sp. prevalece y aumenta en el transcurso de las horas en el proceso, sucediendo lo contrario con la *Bacillus* sp (RL-42).
- Se logró desproteínizar los RL en un 79% y 77.8% en los bioensayos B12 y B1, siendo estos los mejores resultados obtenidos en los ensayos de DP sobre la fracción insoluble.
- Se logró obtener un hidrolizado proteico cuyo contenido de proteína soluble fue de 227.3 y 207.4 mg de albumina/mL en los bioensayos B8 y B12, siendo estos los mejores resultados obtenidos sobre la fracción soluble.
- Las condiciones de 35°C, 28.77% RL y 42 horas de proceso alcanzaron un %DP de 79.45% siendo el mejor tratamiento (B12). El 60% de tratamientos propuestos logró desproteínizar más del 50%.
- Las condiciones de 40°C, 24% de RL y 54 horas de proceso generaron en la fracción soluble, un contenido de proteína soluble equivalente a 227.3 mg de albumina/mL siendo este el mejor tratamiento (B8)
- Las condiciones utilizadas en el presente trabajo no permiten optimizar las condiciones de operación debido al comportamiento de la bacteria, impidiendo a su validación.

## 5.2. RECOMENDACIONES

- A partir de los datos obtenidos de la MSR, se debe realizar un análisis canónico o de cordillera con el fin de corregir los puntos axiales del modelo DCC, diseño central compuesto, permitiendo generar una matriz experimental en la cual se encuentre el punto óptimo dentro de la región experimental del modelo, permitiendo de esta manera optimizar el proceso para posteriores investigaciones, tener en cuenta que no fue parte del presente trabajo el desarrollarlo.
- A la luz de los resultados obtenidos, se recomienda en próximos estudios considerar factores como volumen de inóculo y concentración de oxígeno, los cuales no fueron considerados en este estudio debido a la diversidad respiratoria con la que cuenta las cepas del género *Shewanella sp.* el cual, fue extraído del mismo sustrato en estudio.
- Antes de escalar el bioproceso, se debe optimizarlo a nivel laboratorio, con respecto al %DP, teniendo en cuenta los tiempos de procesamiento a fin de que sea eficiente y viable.
- Realizar estudios sobre la fase soluble generada, a fin de conocer su valor nutricional y elaborar piensos animales que pueda ser utilizado como un nutriente en la alimentación animal, para futuras investigaciones.
- Seguir con esta línea de investigación para soluciones y acciones preventivas a la generación de residuos en el sector acuícola. Innovar hacia tecnologías ambientalmente sustentables para transformar desechos de crustáceos en productos como biopolímeros, péptidos e hidrolizados de proteínas, entre otros que tienen un potencial alto valor de mercado.

## CAPITULO VI: BIBLIOGRAFÍA Y/O REFERENCIA

Arbia, W., Arbia, L., Adour, L., & Amrane, A. (2013). Chitin extraction from crustacean shells using biological methods -A review. *Food Technology and Biotechnology*, 51(1).

Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones Protein hydrolysates: processes and applications. *Resumen. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 42(2).

Cadena, E. (2001). Relación entre el ciclo de Muda y la actividad de las Enzimas digestivas y su efecto en la Tasa de alimentación y el Crecimiento del juvenil *Penaeus vannamei*. ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL.

Castillo, F., Roldán, M., Blasco, R., Huertas, M., Caballero, F., Conrado, V., & Manuel, R. (2005). *Biotecnología Ambiental* (R. Irazábal (ed.); EDITORIAL).

Catastro Acuicola - Produce.gob.pe. (2017). Gob.pe. Recuperado el 30 de agosto de 2021, de <http://catastroacuicola.produce.gob.pe/web/>

Cerna, E., Ochoa, Y., Mendoza, R., Badii, M. H., Gallegos, G., & Landeros, J. (2010). Evaluación de métodos de cuantificación de proteínas en *Tetranychus urticae* para su uso potencial en la detección de resistencia a plaguicidas. *REVISTA INTERNACIONAL DE BOTÁNICA EXPERIMENTAL INTERNATIONAL JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY*, 147–152.

Cohen, J. B. (1910). *Practical Organic Chemistry*. Macmillan Collector's Library. <https://archive.org/details/PracticalOrganicChemistry/page/n23/mode/2up>

Contreras, K., & Heredia, V. (2017). Aplicación del Quitosano obtenido de los exoesqueletos de langostinos (*Litopenaeus vannamei*) en la reducción de la concentración de nitratos de aguas de pozo de la comunidad de Chaullacocha – Cutervo”. In Repositorio

Institucional - UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO. UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO.

Curbelo Hernández, C., & Palacio Dubois, Y. (2021). TRATAMIENTO QUÍMICO DE RESIDUOS DE CAMARÓN PARA LA OBTENCIÓN DE QUITINA. Centro azúcar, 48(2). [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2223-48612021000200103](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2223-48612021000200103)

Dannoritzer, C. (2011). Comprar, tirar, comprar - documental. <https://www.youtube.com/user/polidigitalgmailcom>

DEGAAMPA Produce (2017). "Manejo y Reaprovechamiento de Residuos Hidrobiológicos Generados en el Cultivo y Procesamiento de la Especie Concha de Abanico - Sechura". <https://www.produce.gob.pe/documentos/pesca/dgsp/notas-informativas/sechura-05072017.pdf>

Del Carpio, O. (2021). Cadena de Valor del Langostino (A. Castellacci, F. Flores, H. Gómez, & M. Luján (eds.); Primera ed). Programa Nacional de Innovación en Pesca y Acuicultura - PNIPA.

Díaz-Rojas, E. I., Argüelles-Monal, W. M., Higuera-Ciapara, I., Hernández, J., Lizardi-Mendoza, J., & Goycoolea, F. M. (2006). Determination of chitin and protein contents during the isolation of chitin from shrimp waste. *Macromolecular Bioscience*, 6(5). <https://doi.org/10.1002/mabi.200500233>

Dragland, I. S., Rukke, H. V., Stenhagen, I. S. R., Lönn-Stensrud, J., & Kopperud, H. M. (2016). Antibacterial and Antibiofilm Effect of Low Viscosity Chitosan against *Staphylococcus epidermidis*. *International Journal of Microbiology*, 2016(5), 712–715. <https://doi.org/10.1155/2016/9159761>

Ecología Azul-Blue Ecology, V. T. las E. (2017, April 17). Crecimiento y muda en crustáceos. Ecologiaazul.Com. <https://ecologiaazul.com/2017/04/17/crecimiento-y-muda-en-crustaceos/>

FAO. 2009. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2008. Roma, Departamento de Pesca y Acuicultura (disponible en <http://www.fao.org/docrep/011/i0250s/i0250s00.htm>).

FAO Pesca *Penaeus vannamei*. (2006, April 7). Fao.Org. [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus\\_vannamei/es](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus_vannamei/es)

FAO, Matthew Briggs, Funge-Smith, S., Subasinghe, R., & Phillips, M. (2004). Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. RAP Publication 2004/10, 75(January), 1–100. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3119427&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Frazier, W. C. (1926). A method for the detection of changes in gelatin due to bacteria. *Journal of Infectious Diseases*, 39(4), 302–309. <https://doi.org/10.1093/infdis/39.4.302>

Fresenius, C. R. (1883). Zeitschrift für analytische Chemie. J. F. Bergmann. <https://books.google.at/books?id=6ePmAAAAMAAJ>

Garfield, E. (1990). Current Comments. *Journalology*, 13, 45. <http://www.garfield.library.upenn.edu/essays/v13p045y1990.pdf>

Giyose, N. Y., Mazomba, N. T., & Mabinya, L. V. (2010). Evaluation of proteases produced by *Erwinia chrysanthemi* for the deproteinization of crustacean waste in a chitin production process. *African Journal of Biotechnology*, 9(5). <https://doi.org/10.5897/AJB09.1262>

- Gutiérrez, A. (2001). Producción de Ecdiesteroides durante el Ciclo de Muda y Maduración de Reproductores *Penaeus Vannamei*. Escuela Superior Politecnica del Litoral.
- Gutiérrez, H., & De La Vara, R. (2008). Análisis y diseño de experimentos (P. Roig (ed.); Segunda). McGRAW-HILL/INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V.
- Gutiérrez-Jiménez, J., Luna-Cazás, L. M., Mendoza-Orozco, M. I., Díaz-Marina, G. de J., Burguete-Gutiérrez, J. C., & Feliciano-Guzmán, J. M. (2015). Organización, mantenimiento y preservación de la Colección de Cultivos Bacterianos del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH), México. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 35(2). [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562015000200007](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562015000200007)
- Hamdi, M., Hammami, A., Hajji, S., Jridi, M., Nasri, M., & Nasri, R. (2017). Chitin extraction from blue crab (*Portunus segnis*) and shrimp (*Penaeus kerathurus*) shells using digestive alkaline proteases from *P. segnis* viscera. *International Journal of Biological Macromolecules*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.103>
- Hartree, E.F (1972). Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry* 48: 422-427.
- Hau, H. H., & Gralnick, J. A. (2007). Ecology and biotechnology of the genus *Shewanella*. *Annual Review of Microbiology*, 61. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093257>
- Hongkulsup, C., Khutoryanskiy, V. V., & Niranjani, K. (2016). Enzyme assisted extraction of chitin from shrimp shells (*Litopenaeus vannamei*): Enzyme assisted extraction of chitin from shrimp shells (*L. vannamei*). *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* (Oxford, Oxfordshire: 1986), 91(5). <https://doi.org/10.1002/jctb.4714>

IMARPE. (2019). ANUARIO CIENTÍFICO TECNOLÓGICO IMARPE (V. Valdivieso Milla (ed.)). PRODUCE.

INFORMES NACIONALES SOBRE EL DESARROLLO DE LA ACUICULTURA EN AMERICA LATINA. (1984). Fao.org. Recuperado el 26 de agosto de 2021, de <http://www.fao.org/3/ad020s/AD020s15.htm>

El Knidri, H., Belaabed, R., Addaou, A., Laajeb, A., & Lahsini, A. (2018). Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, 1181–1189. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.139>

Lazovska, D. (2019). Estrategias de economía circular. *Expoknews.com*. <https://www.expoknews.com/estrategias-de-economia-circular/>

Liu, Y., Xing, R., Yang, H., Liu, S., Qin, Y., Li, K., Yu, H., & Li, P. (2020). Chitin extraction from shrimp (*Litopenaeus vannamei*) shells by successive two-step fermentation with *Lactobacillus rhamnoides* and *Bacillus amyloliquefaciens*. *International Journal of Biological Macromolecules*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.124>

Lizárraga, W. (2019). Caracterización fenotípica y análisis genómico de dos cepas de *Shewanella* sp. nativas con capacidad de degradar colorantes azoicos (Universidad Nacional Mayor de San Marcos). <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/11522>

Lowry, O.H., N.J. Rosbrough, A.L. Farr & R.J. Randall (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 265-275.

Mao X, Guo N, Sun J, & Xue C. 2016. Comprehensive utilization of shrimp waste based on biotechnological methods: A review. *Journal of Cleaner Production*, 143, 814–823. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.12.042>.

- Manni, L., Ghorbel-Bellaaj, O., Jellouli, K., Younes, I., & Nasri, M. (2010). Extraction and characterization of chitin, chitosan, and protein hydrolysates prepared from shrimp waste by treatment with crude protease from *Bacillus cereus* SV1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8846-y>
- Marcet, X., Marcet, M., & Vergés, F. (2018). Qué es la economía circular y por qué es importante para el territorio (4th ed.). Asociación Pacto Industrial de la Región Metropolitana de Barcelona.
- Mármol, Z., Páez, G., Rincón, M., Araujo, K., & Aiello, C. (2011). Chitin and Chitosan friendly polymer. A review of their applications. *Revista Tecnocientífica URU*, August 2016.
- Marote, D. (2019). La tecnología y la economía circular: catalizadores del consumo responsable del plástico. *EL PAÍS*. [https://elpais.com/retina/2019/05/28/tendencias/1559017246\\_013181.html](https://elpais.com/retina/2019/05/28/tendencias/1559017246_013181.html)
- Martínez, A. N., & Porcelli, A. M. (2018). Estudio sobre la economía circular como una alternativa sustentable frente al ocaso de la economía tradicional (primera parte). *Lex*, 16(22). <https://doi.org/10.21503/lex.v16i22.1659>
- Mendoza, E., & Jáuregui, J. (2006). EXTRACCIÓN DE QUITINA A PARTIR DEL LANGOSTINO (*Penaeus brevis*) PARA LA OBTENCIÓN DE QUITOSANO Y SU APLICACIÓN EN LA ADSORCIÓN DE IONES PLATA [UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA]. [http://cybertesis.uni.edu.pe/bitstream/uni/1130/1/lopez\\_gj.pdf](http://cybertesis.uni.edu.pe/bitstream/uni/1130/1/lopez_gj.pdf)
- Neves, A. C., Zanette, C., Grade, S. T., Schaffer, J. V., Alves, H. J., & Arantes, M. K. (2017). Otimização de fermentação láctica para extração de quitina de resíduos de camarão de água doce. *Acta Scientiarum - Technology*, 39(2). <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v39i2.29370>
- OCDE (2005), A Framework for Biotechnology Statistics, OECD, París.

- Okafor, N. (2007). Modern Industrial. In Industrial (Vol. 3, Issue 12).  
[http://www.socgenmicrobiol.org.uk/pubs/micro\\_today/book\\_reviews/MTNOV07/MTN07\\_12.cfm](http://www.socgenmicrobiol.org.uk/pubs/micro_today/book_reviews/MTNOV07/MTN07_12.cfm)
- ONU. (2013). World Population Prospects, the 2012 Revision. Naciones Unidas.  
<https://www.un.org/en/development/desa/publications/world-population-prospects-the-2012-revision.html>
- Pachapur, V. L., Guemiza, K., Rouissi, T., Sarma, S. J., & Brar, S. K. (2016). Novel biological and chemical methods of chitin extraction from crustacean waste using saline water: Novel biological and chemical methods of chitin extraction. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* (Oxford, Oxfordshire: 1986), 91(8).  
<https://doi.org/10.1002/jctb.4821>
- Perochena, E. (2019). EVALUACIÓN DE CONSORCIOS BACTERIANOS Y CONDICIONES DE OPERACIÓN, PARA REDUCIR EL CONTENIDO DE PROTEÍNAS EN RESIDUOS DE LANGOSTINOS (*Litopenaeus vannamei*) MEDIANTE BIOPROCESOS DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA. Universidad Católica de Santa María Facultad.
- Produce (2019). Anuario estadístico Pesquero y Acuícola. Ministerio de la Producción.
- Ruiz-García, C., Béjar, V., Martínez-Checa, F., Llamas, I., & Quesada, E. (2005). *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1), 191–195. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63310-0>
- Ryden AC, Lindberg M, Philipson L. 1973. Aislamiento y caracterización de dos mutantes productores de proteasa de *Staphylococcus aureus*. *Revista de Bacteriología* 116 (1): 25–32.

- Sanipes. (2020). Informe de la Subdirección de Sanidad Acuícola 2017 - 2019. Ministerio de Producción, Perú, 162. <https://www.sanipes.gob.pe/difusion-informe-sanidad-acuicola/archivos/INFORME-DE-SANIDAD-APROBADO-JUNIO-2020.pdf>
- Sánchez, E. (2020). Adsorción de plomo en aguas subterráneas del distrito de Mórrope utilizando quitosano obtenido del exoesqueleto de langostino. In Repositorio Institucional - UCV. UNIVERSIDAD CESAR VALLEJO.
- Seafood Trade (2018). Shrimp in Perú. Obtenido de Seafood Trade Intelligence Portal: <https://seafood-tip.com/sourcing-intelligence/countries/peru/shrimp/>
- Sedaghat, F., Yousefzadi, M., Toiserkani, H., & Najafipour, S. (2017). Bioconversion of shrimp waste *Penaeus merguensis* using lactic acid fermentation: An alternative procedure for chemical extraction of chitin and chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.099>
- Sirvas, S., & Perochena, E. (2020). Biotechnological recovery of chitin from crustacean waste *Revista Peruana de Biología*, 27(1), 95–102. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v27i1.17586>
- Sirvas, S., Buleje, V., Salvatierra, L., & Jaramillo, M. L. (2021). Isolation and identification of proteolytic, amylolytic, lipolytic, and chitinolytic bacteria from shrimp waste. *Revista Peruana de Biología*, 28(1). <https://doi.org/10.15381/RPB.V28I1.18353>
- Stephenson, P. L. (1998). Applied Statistics and Probability for Engineers. In *Journal of Quality Technology* (Vol. 30, Issue 1). <https://doi.org/10.1080/00224065.1998.11979825>
- Turton, R., Shaeiwitz, J., Bhattacharyya, D., & Whiting, W. B. (2018). Analysis, Synthesis, and Design of Chemical Processes (P. Hall (ed.); FIFTH EDIT).

- Vasconcelos, V. (2021). Abstracts of the 1st International Congress of Biotechnology and Bioengineering-V COPEBIOT 2021 (C. I. de I. M. e A. – CIIMAR (ed.)).
- Vázquez, J. A., Ramos, P., Mirón, J., Valcárcel, J., Sotelo, C. G., & Pérez-Martín, R. I. (2017). Production of chitin from *Penaeus vannamei* by-products to pilot plant scale using a combination of enzymatic and chemical processes and subsequent optimization of the chemical production of chitosan by response surface methodology. *Marine Drugs*, 15(6). <https://doi.org/10.3390/md15060180>
- Waldeck J, Daum G, Bisping B, Meinhardt F. 2006. Aislamiento y caracterización molecular de cepas de *Bacillus licheniformis* deficientes en quitinasa capaces de desproteinizar los desechos de cáscara de camarón para obtener quitina altamente viscosa. *Microbiología Aplicada y Ambiental* 72 (12). <https://doi.org/10.1128/AEM.00938-06>
- Wan, S., Mak, M. W., & Kung, S. Y. (2017). Gram-LocEN: Interpretable prediction of subcellular multi-localization of Gram-positive and Gram-negative bacterial proteins. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 162, 13. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.chemolab.2016.12.014>
- Ye, M., Tang, X., Yang, R., Zhang, H., Li, F., Tao, F., Li, F., & Wang, Z. (2018). Characteristics and Application of a Novel Species of *Bacillus*: *Bacillus velezensis*. *ACS Chemical Biology*, 13(3), 500–505. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00874>
- Younes, I., Ghorbel-Bellaaj, O., Nasri, R., Chaabouni, M., Rinaudo, M., & Nasri, M. (2012). Chitin and chitosan preparation from shrimp shells using optimized enzymatic deproteinization. *Process Biochemistry* (Barking, London, England), 47(12), 2032–2039. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.07.017>

## ANEXOS

### Anexo 01. Medios y Reactivos

Agar Tripticasa de Soya (TSA)	
Insumos	Cantidad 1000 mL
Tripticasa	15 g
Peptona de soya	5 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar	15 g
pH	7.3 ± 0.2
Autoclavar a 121°C / 15 min	

Caldo Tripticasa de Soya (TSB)	
Insumos	Cantidad 1000 mL
Tripticasa	17 g
Peptona de soya	3 g
Cloruro de sodio	5 g
Fosfato di potásico	2.5 g
Glucosa	2.5g
pH	7.3 ± 0.2
Autoclavar a 121°C / 15 min	

Plate Count Agar (APC)	
Insumos	Cantidad 1000 mL
Agar	23.5 g
pH	7.0 ± 0.2
Autoclavar a 121°C / 15 min	

Agar Tributirina (AT)	
Insumos	Cantidad 1000 mL
Glicerol	10mL
Agar	20 g
pH	7.5 ± 0.2
Autoclavar a 121°C / 15 min	

Agar Nutritivo (AN)	
Insumos	Cantidad 1000 mL
Agar	28 g
pH	7.4 ± 0.2
Autoclavar a 121°C / 15 min	

Agar Leche (AL)	
A (3K)	
Skim Milk Powder	4.5 g
Agua destilada	45 mL
Autoclavar a 121°C / 5 min	

B (7K)	
Bacto Agar (1.5% (A+B))	2.1 g
Tris (5%x(A+B))	7mL
Agua destilada	88 mL
pH	7.3 ± 0.2
Autoclavar a 121°C / 15 min	

Agar Gelatina (AG)	
Insumos	Cantidad 1000 mL
Extracto de carne	10 g
Peptona	10 g
Bacto Agar	15 g
Agar	15 g
pH	7.2 ± 0.2
Autoclavar a 121°C / 15 min	

Reactivos de Lowry	
Insumos	Cantidad 1000 mL
A: Carbonato Sódico al 2% en NaOH	
Carbonato Sódico	20 g
NaOH	4 g
B: Sulfato cúprico al 1%	
Sulfato cúprico	10 g
C: Tartrato Sódico - Potásico al 2%	
Se conserva en refrigeración	

Reactivos de Lowry	
Tartrato Sódico - Potásico	20 g

Reactivo Lowry	
Insumo	Cantidad (mL)
A	50
B	0.5
C	0.5

Folin	
Insumo	Cantidad (mL)
Reactivo Folin	10
Agua destilada	30

Standard	
Insumo	Cantidad
Albúmina Bovina	0.05 g
Agua destilada	50 mL

**Anexo 02. Pruebas Bioquímicas****Figura 9.**

*Prueba de Catalasa de RL-08 y RL-42*



RL-08 (+)



RL-42 (+)

**Figura 10.**

*Prueba de Oxidasa de RL-08 y RL-42*



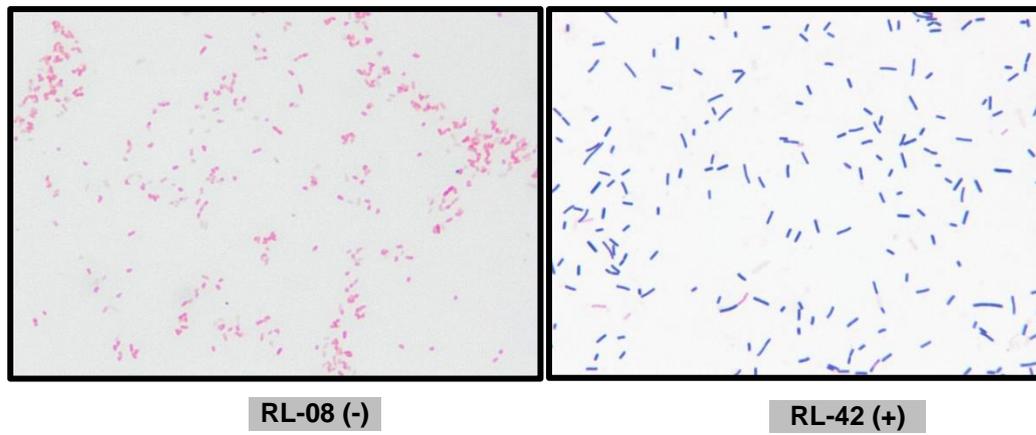
RL-08 (+)



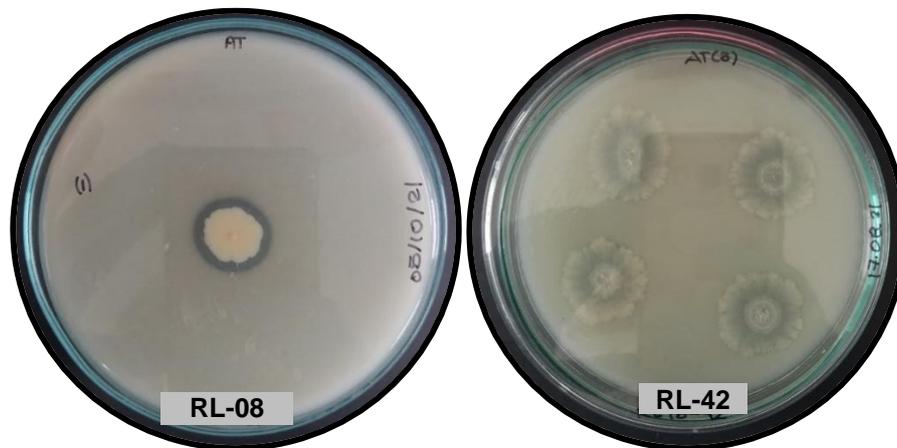
RL-42 (-)

**Figura 11.**

*Prueba de Tinción Gram de RL-08 y RL-42*

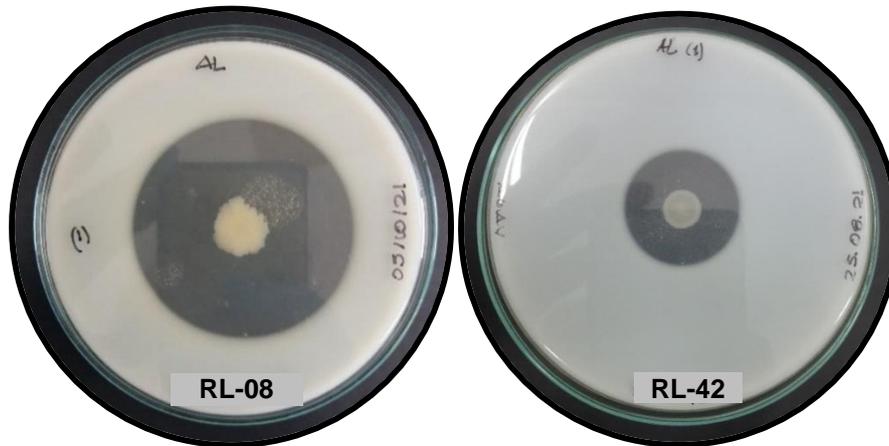
**Anexo 03. Hidrólisis de Sustrato****Figura 12.**

*Hidrólisis de Sustrato en Agar Tributirina (AT)*

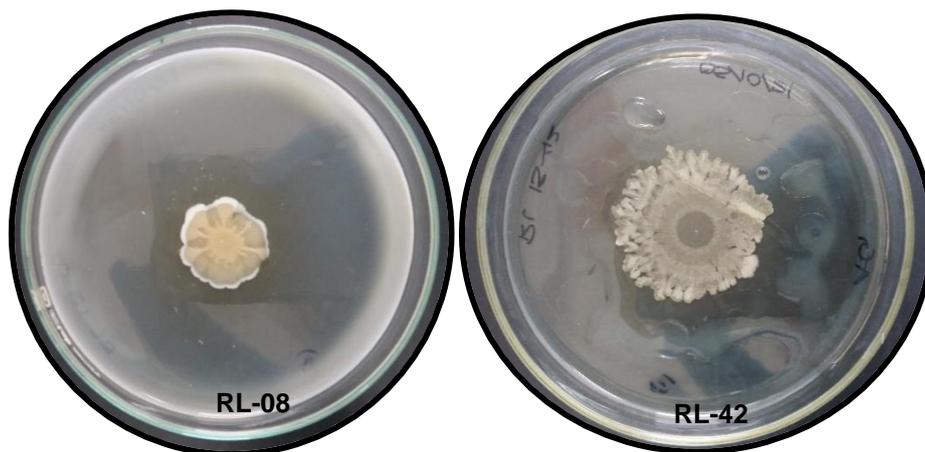


**Figura 13.**

*Hidrólisis de Sustrato en Agar Leche (AL)*

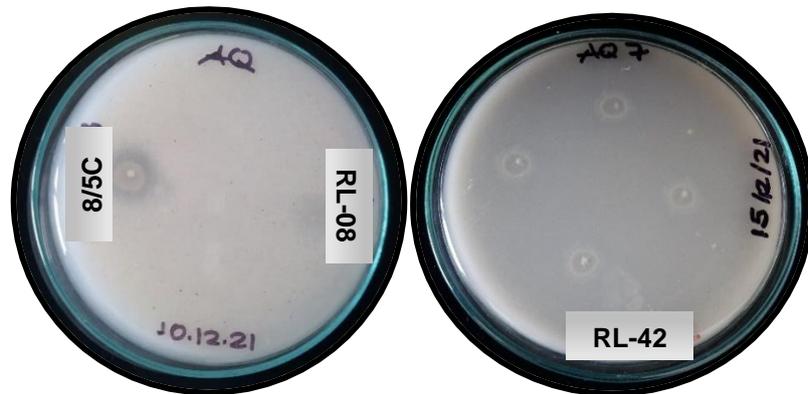
**Figura 14.**

*Hidrólisis de Sustrato en Agar Gelatina (AG)*



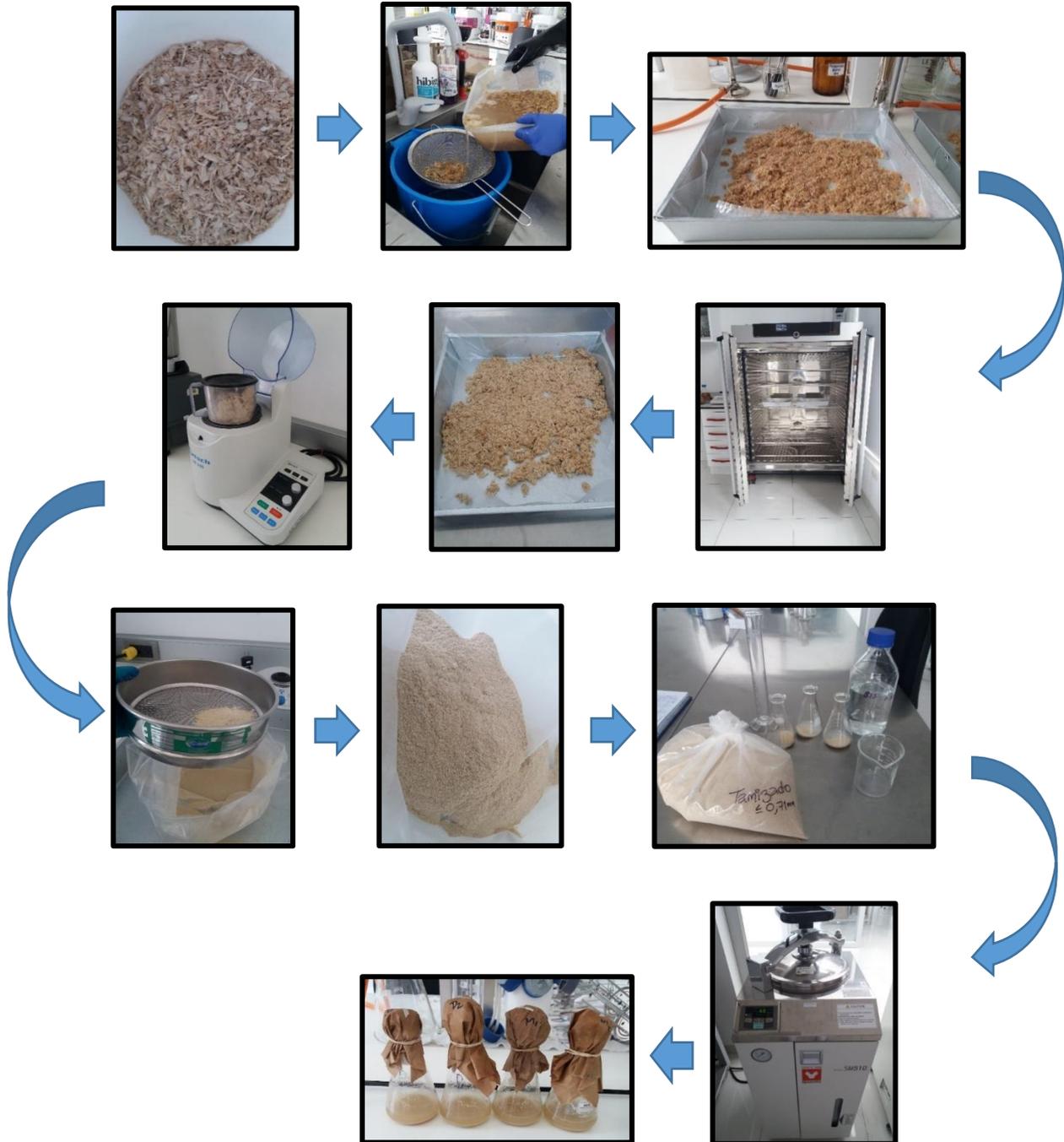
**Figura 15.**

*Hidrólisis de Sustrato en Agar Quitina (AQ)*



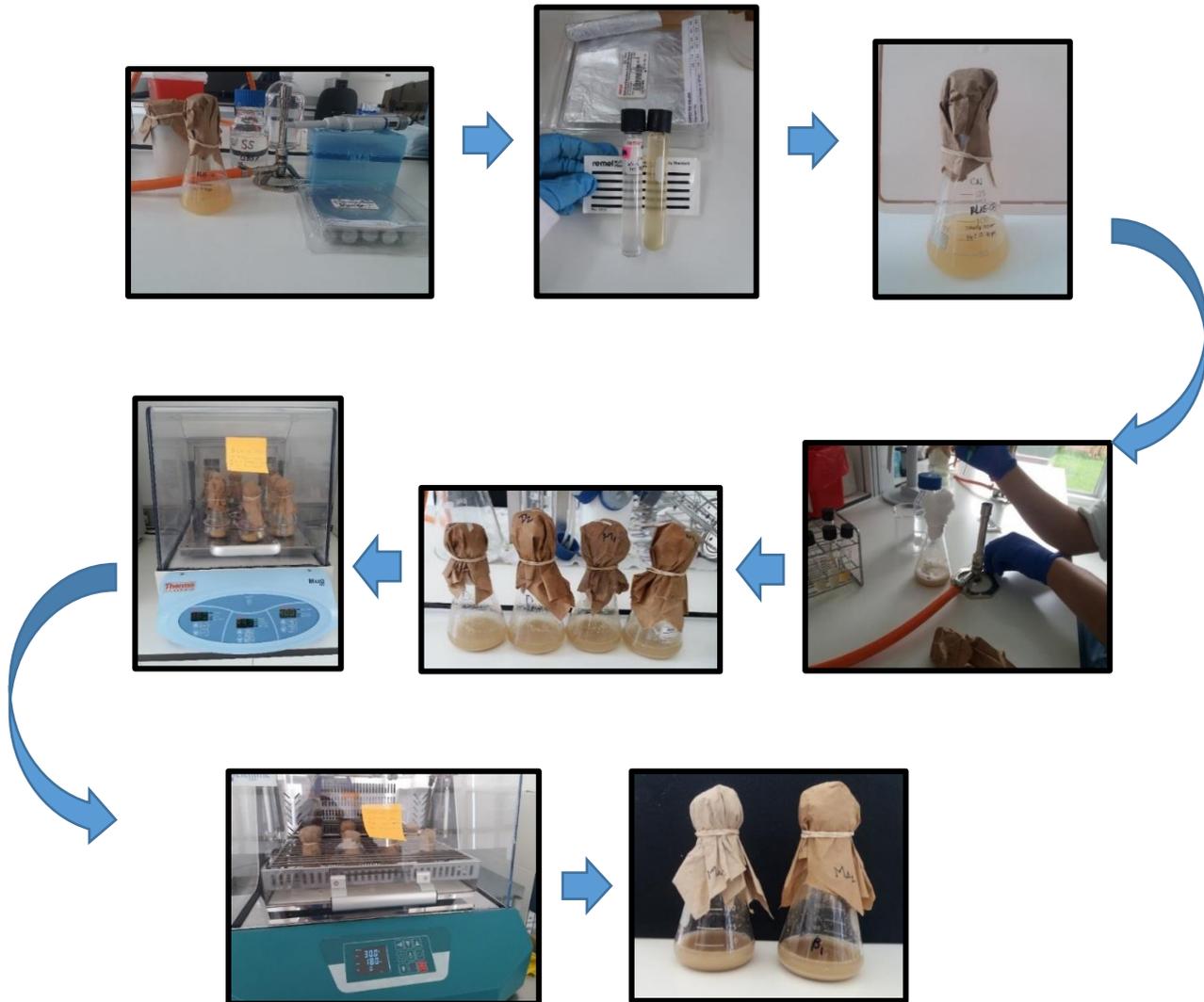
*Nota:* En la primera placa se inoculó la cepa RL-08 y el control 8/5C, el cual es quitinolítico.

En la segunda placa se inoculo cuatro veces la cepa RL-42.

**Anexo 04. Bioproceso de Desproteínización****Figura 16.***Diagrama de preparación de la muestra RL*

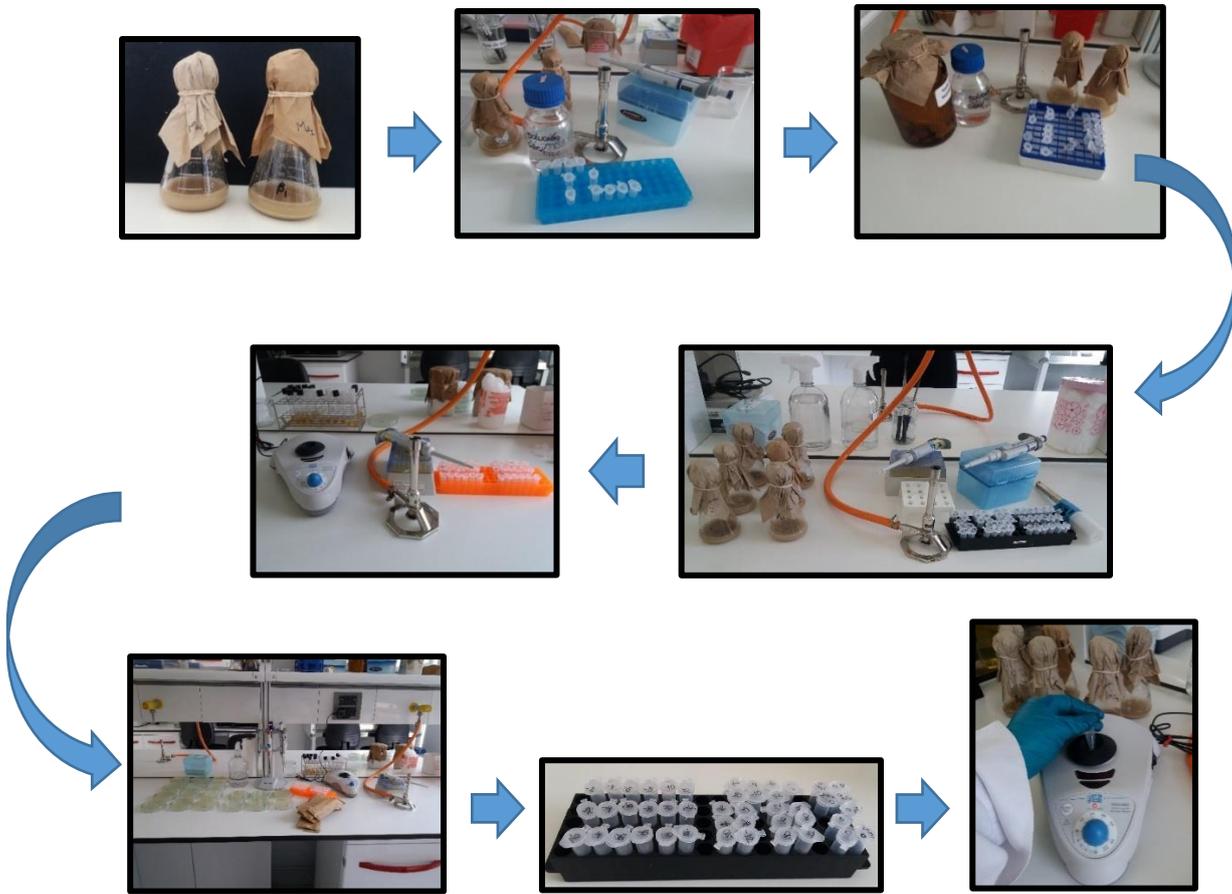
**Figura 17.**

*Diagrama de preparación del Inóculo*



**Figura 18.**

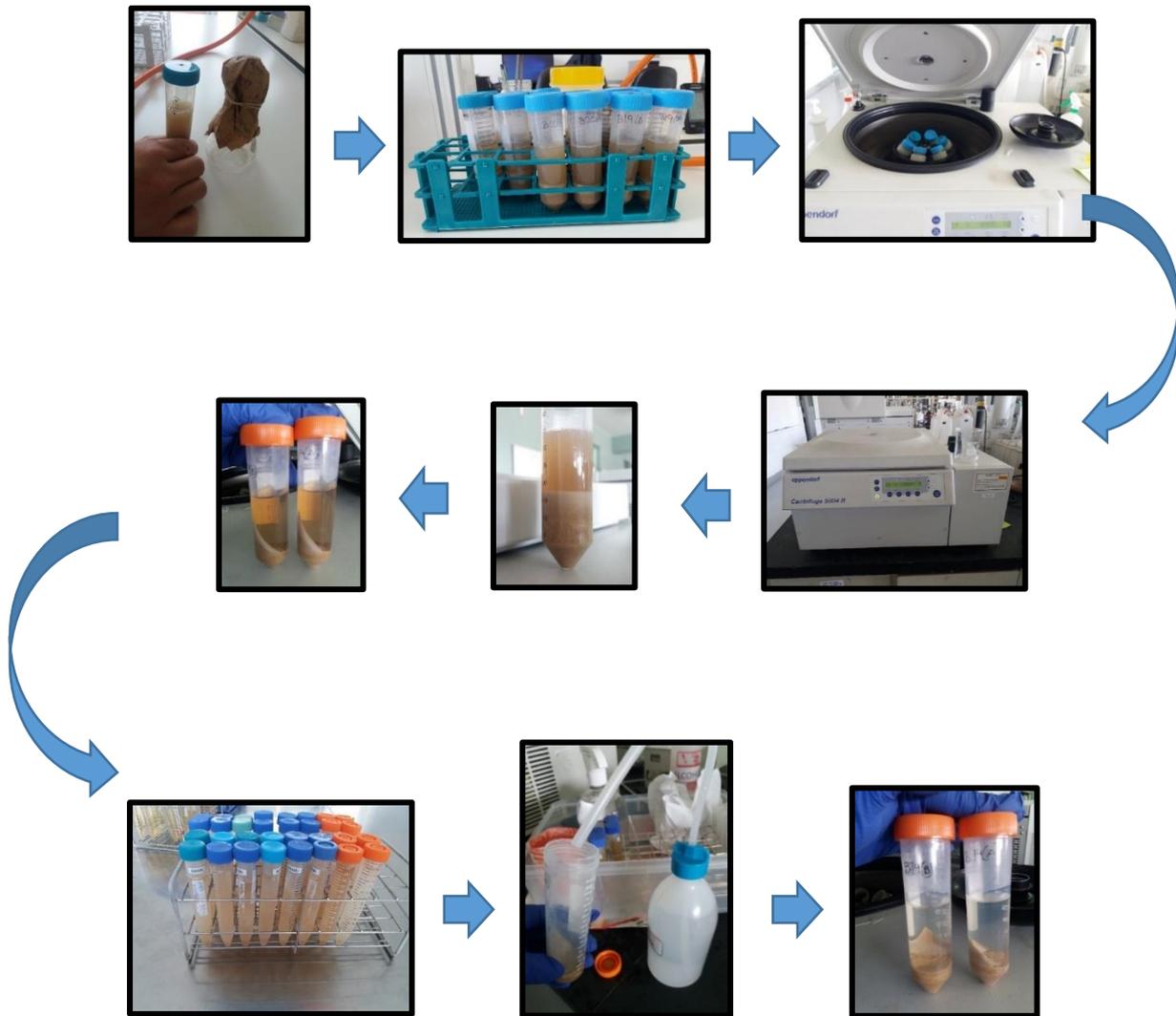
*Diagrama de dilución luego del proceso*

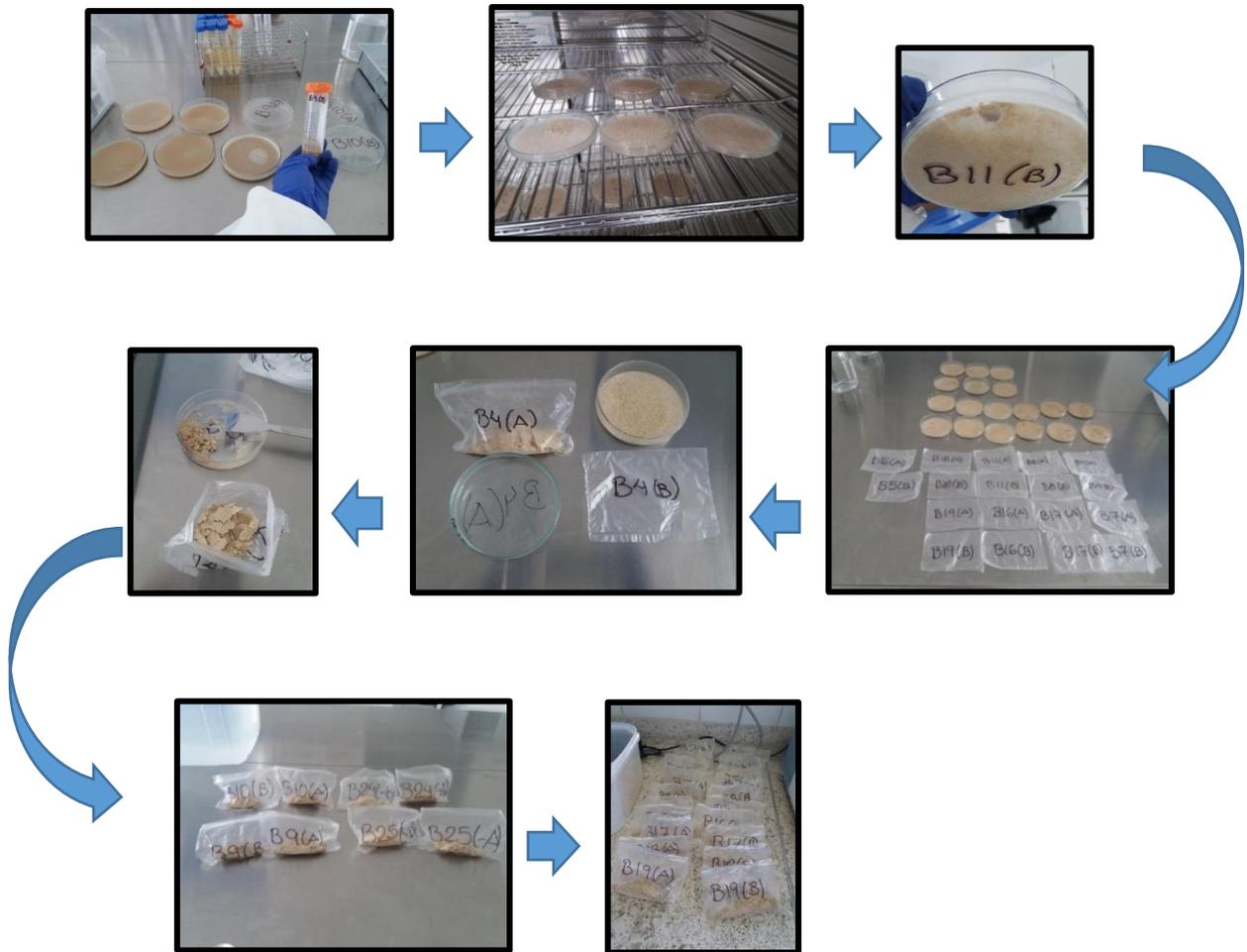


Anexo 05. Análisis de Fracciones

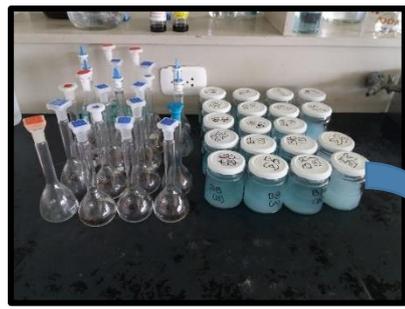
Figura 19.

Diagrama de separación de fracciones



**Figura 20.***Diagrama de conservación de fracción insoluble*





Destilación



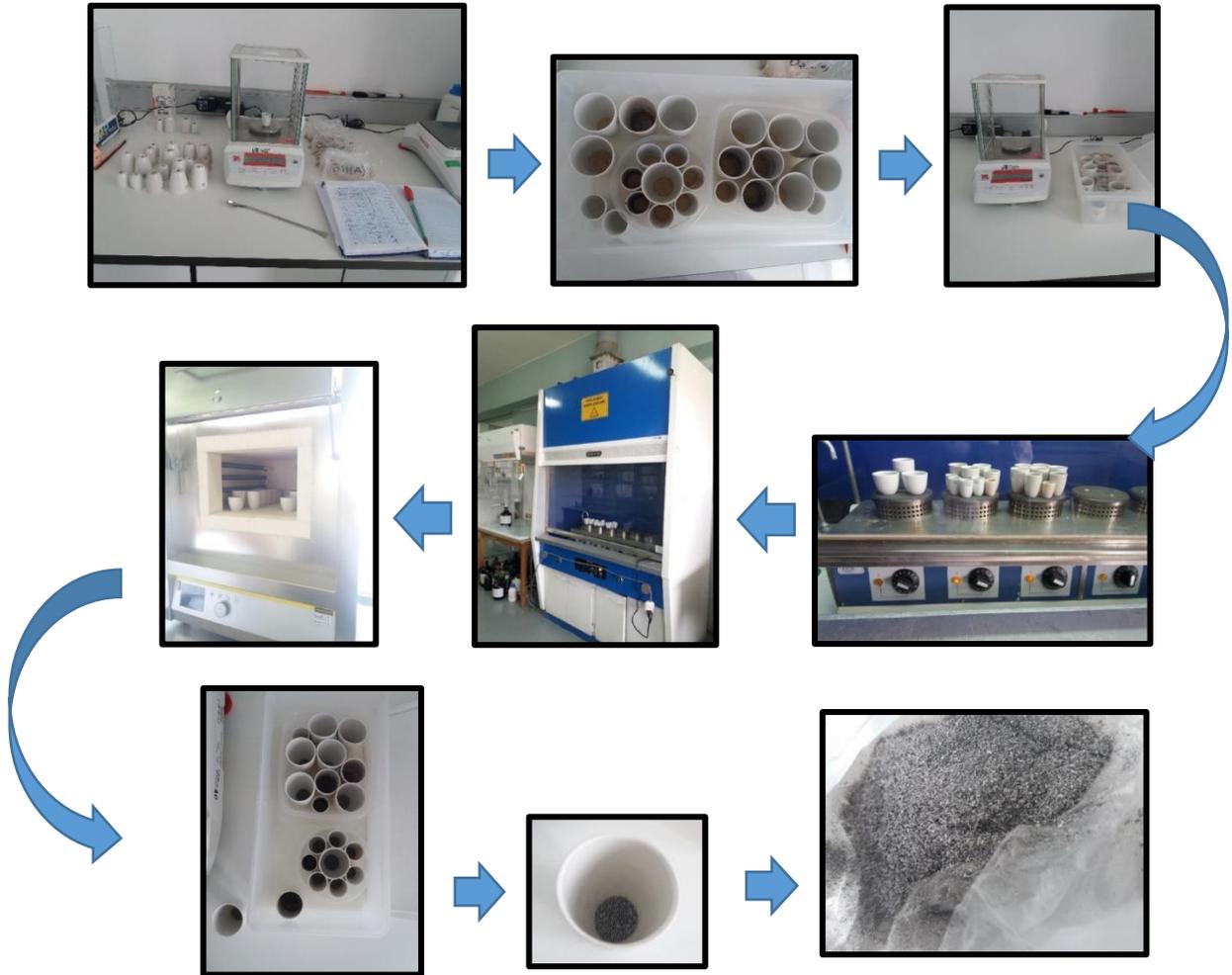
Titulación



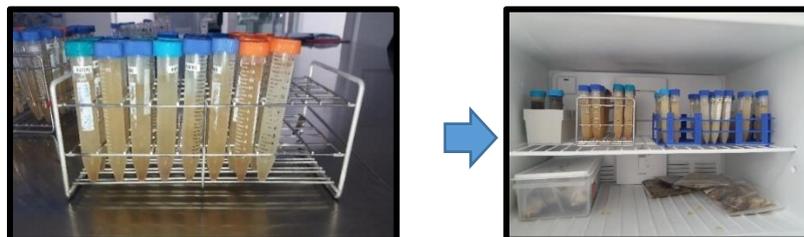
Titulado

**Figura 22.**

*Diagrama de proceso de determinación de Cenizas*

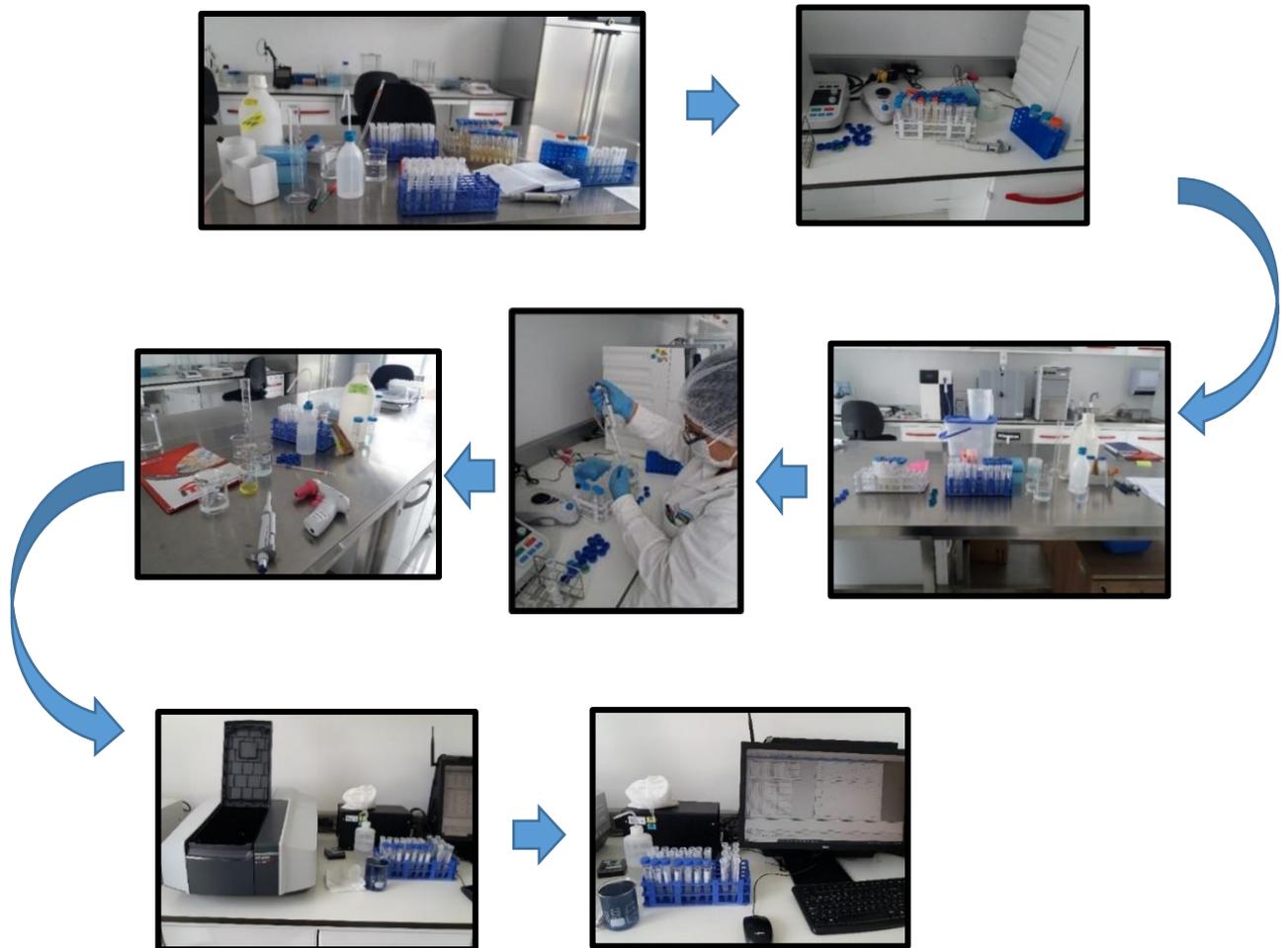
**Figura 23.**

*Diagrama de conservación de fracción soluble*



**Figura 24.**

*Diagrama de proceso con el método Lowry*



### Anexo 06. Resultados del proceso de desproteínización

**Tabla 27.**

*Consolidado de condiciones y resultados del proceso de desproteínización por tratamiento*

Bioensayos	Temperatura (°C)	Residuos (p/v)	Tiempo (h)	% ceniza	%Grasas cruda (Teórica)	Lowry (mg de albúmina equivalente)	Nitrógeno total (%NT)	Proteína base seca (%P)	Quitina base seca (%Q)	%DP
B1(A)	30.00	10.00	30.00	57.52	3.62	114.68	2.69	2.33	36.54	71.29
B1(B)	30.00	10.00	30.00	58.92	3.62	129.46	2.50	1.27	36.19	84.26
B2(A)	40.00	10.00	30.00	57.94	3.62	124.40	2.81	3.86	34.58	52.39
B2(B)	40.00	10.00	30.00	54.72	3.62	106.86	2.88	2.51	39.15	69.00
B3(A)	30.00	24.00	30.00	55.69	3.62	190.18	2.70	1.28	39.41	84.22
B3(B)	30.00	24.00	30.00	60.71	3.62	223.86	2.64	3.89	31.78	51.96
B4(A)	40.00	24.00	30.00	58.86	3.62	190.62	2.87	5.12	32.40	36.81
B4(B)	40.00	24.00	30.00	58.36	3.62	208.21	2.91	5.20	32.82	35.79
B5(A)	30.00	10.00	54.00	57.81	3.62	137.86	2.73	3.00	35.57	63.03
B5(B)	30.00	10.00	54.00	59.90	3.62	70.64	2.68	3.83	32.65	52.73
B6(A)	40.00	10.00	54.00	57.62	3.62	160.79	2.65	1.98	36.78	75.51

Bioensayos	Temperatura	Residuos	Tiempo	% ceniza	%Grasas	Lowry (mg	Nitrógeno	Proteína	Quitina	%DP
	(°C)	(p/v)	(h)		cruda	de albúmina	total	base seca	base seca	
					(Teórica)	equivalente)	(%NT)	(%P)	(%Q)	
B6(B)	40.00	10.00	54.00	57.65	3.62	94.50	2.73	2.90	35.83	64.20
B7(A)	30.00	24.00	54.00	61.09	3.62	175.50	3.14	7.95	19.87	1.89
B7(B)	30.00	24.00	54.00	61.09	3.62	191.07	3.00	7.95	27.34	1.89
B8(A)	40.00	24.00	54.00	58.75	3.62	245.88	2.72	3.45	34.17	57.40
B8(B)	40.00	24.00	54.00	59.90	3.62	208.73	2.66	3.61	32.87	55.39
B9(A)	26.59	17.00	42.00	58.71	3.62	95.64	2.91	5.46	32.20	32.58
B9(B)	26.59	17.00	42.00	57.06	3.62	130.79	2.84	3.60	35.71	55.52
B10(A)	43.41	17.00	42.00	59.41	3.62	74.57	2.86	5.38	31.59	33.66
B10(B)	43.41	17.00	42.00	56.85	3.62	102.43	2.91	4.18	35.35	48.44
B11(A)	35.00	5.23	42.00	59.27	3.62	9.56	2.96	6.33	30.77	21.85
B11(B)	35.00	5.23	42.00	57.74	3.62	30.31	2.90	4.66	33.98	42.49
B12(A)	35.00	28.77	42.00	56.92	3.62	203.31	2.52	0.22	39.24	97.30
B12(B)	35.00	28.77	42.00	58.42	3.62	211.56	2.71	3.19	34.77	60.68
B13(A)	35.00	17.00	21.82	57.43	3.62	169.29	2.82	3.66	35.29	54.78

Bioensayos	Temperatura	Residuos	Tiempo	% ceniza	%Grasas	Lowry (mg	Nitrógeno	Proteína	Quitina	%DP
	(°C)	(p/v)	(h)		cruda	de albúmina	total	base seca	base seca	
					(Teórica)	equivalente)	(%NT)	(%P)	(%Q)	
B13(B)	35.00	17.00	21.82	56.27	3.62	164.51	2.73	1.93	38.18	76.17
B14(A)	35.00	17.00	62.18	59.98	3.62	179.12	2.40	1.02	35.39	87.47
B14(B)	35.00	17.00	62.18	61.78	3.62	198.23	2.45	2.64	31.96	67.42
B15(A)	35.00	17.00	42.00	60.06	3.62	137.31	2.67	3.87	32.45	52.25
B15(B)	35.00	17.00	42.00	57.37	3.62	127.06	2.51	0.39	38.63	95.24
B16(A)	35.00	17.00	42.00	59.89	3.62	86.06	2.84	5.51	30.99	32.05
B16(B)	35.00	17.00	42.00	57.05	3.62	210.13	2.96	4.84	34.49	40.28
B17(A)	35.00	17.00	42.00	61.13	3.62	50.56	2.77	5.58	29.66	31.12
B17(B)	35.00	17.00	42.00	58.18	3.62	159.38	2.83	4.30	33.90	46.92
B18(A)	35.00	17.00	42.00	56.53	3.62	62.13	2.56	0.39	39.47	95.23
B18(B)	35.00	17.00	42.00	55.63	3.62	36.13	2.95	3.83	36.92	52.74
B19(A)	35.00	17.00	42.00	56.63	3.62	143.00	2.63	1.12	38.62	86.12
B19(B)	35.00	17.00	42.00	58.50	3.62	161.31	2.67	2.82	35.07	65.25
B20(A)	35.00	17.00	42.00	58.58	3.62	91.06	2.69	3.11	34.69	61.60

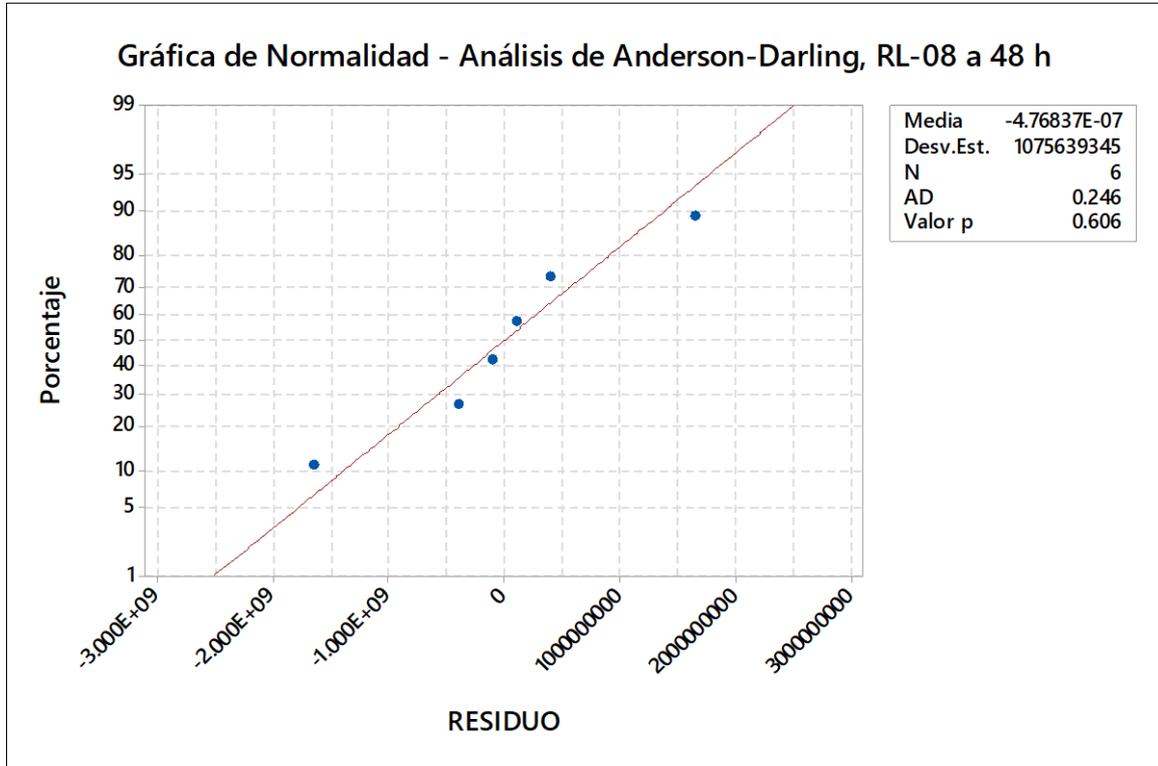
Bioensayos	Temperatura (°C)	Residuos (p/v)	Tiempo (h)	% ceniza	%Grasas cruda (Teórica)	Lowry (mg de albúmina equivalente)	Nitrógeno total (%NT)	Proteína base seca (%P)	Quitina base seca (%Q)	%DP
B20(B)	35.00	17.00	42.00	60.08	3.62	181.88	2.84	5.65	30.66	30.29
B24(-)	26.59	17.00	42.00	61.09	3.62	152.71	2.92	7.07	28.21	12.69
B24(-)	26.59	17.00	42.00	56.96	3.62	83.81	2.75	2.61	36.81	67.84
B25(+)	43.41	17.00	42.00	57.84	3.62	107.07	2.88	4.55	33.99	43.84
B25(+)	43.41	17.00	42.00	56.14	3.62	196.29	3.11	5.83	34.41	28.04

Nota: (+) (-) son controles

**Anexo 07. Análisis Estadístico**

**Pruebas de la validación de los supuestos de la ANOVA**

**Gráfico 6.**



**Gráfico 7.**

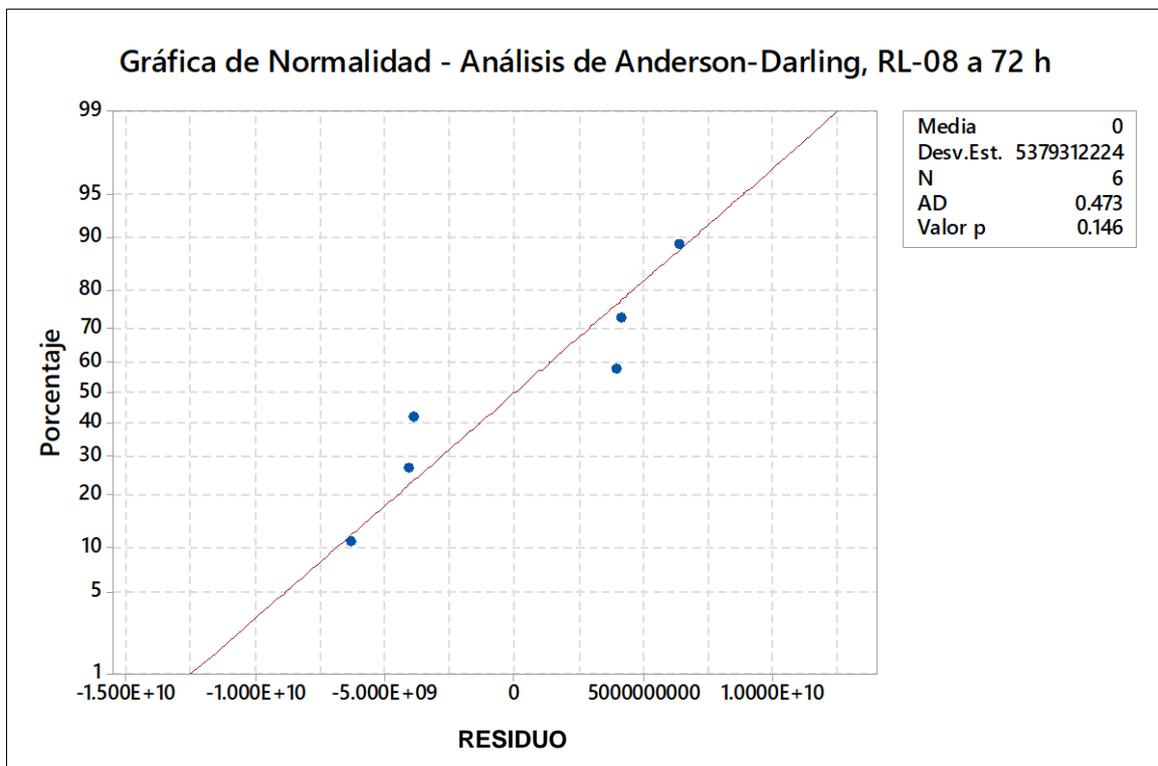


Gráfico 8.

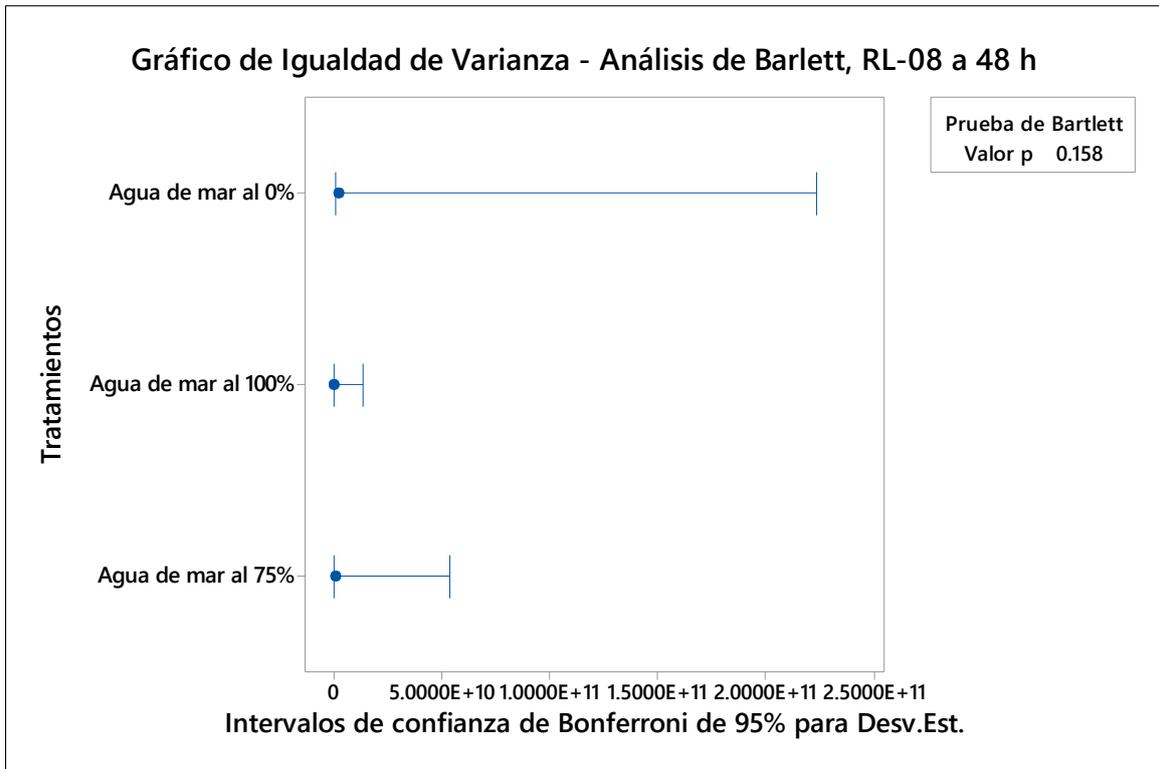
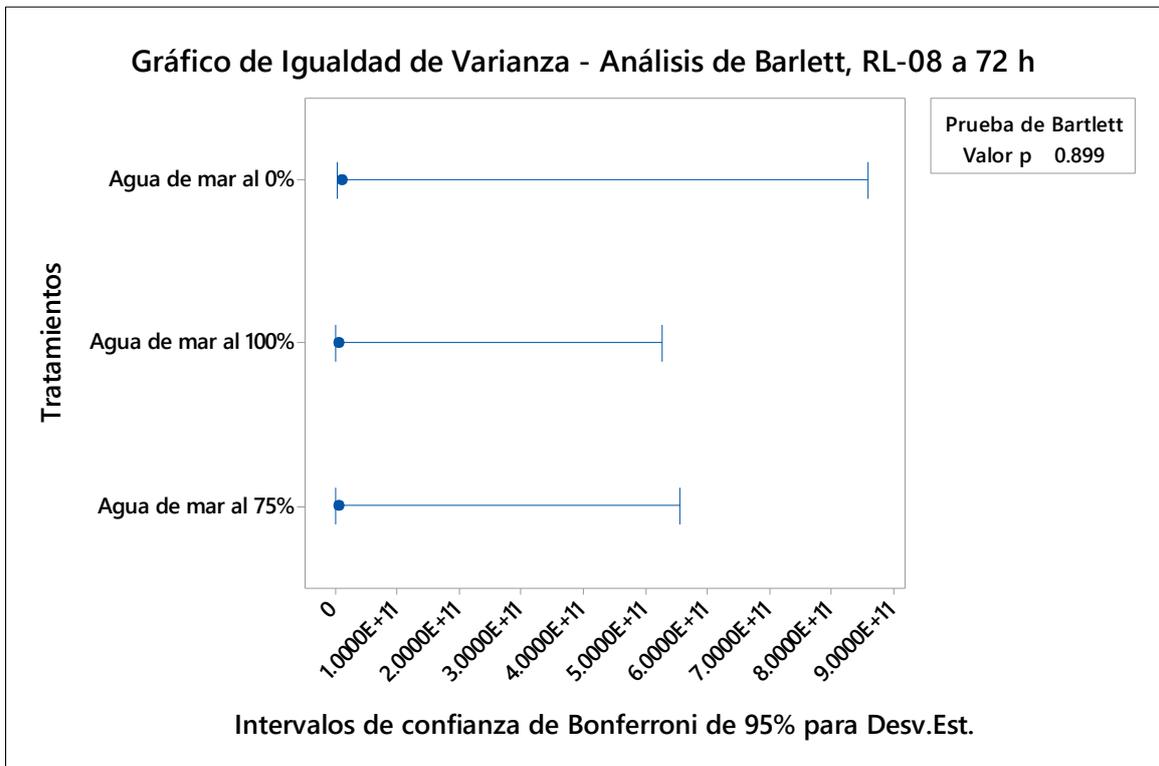
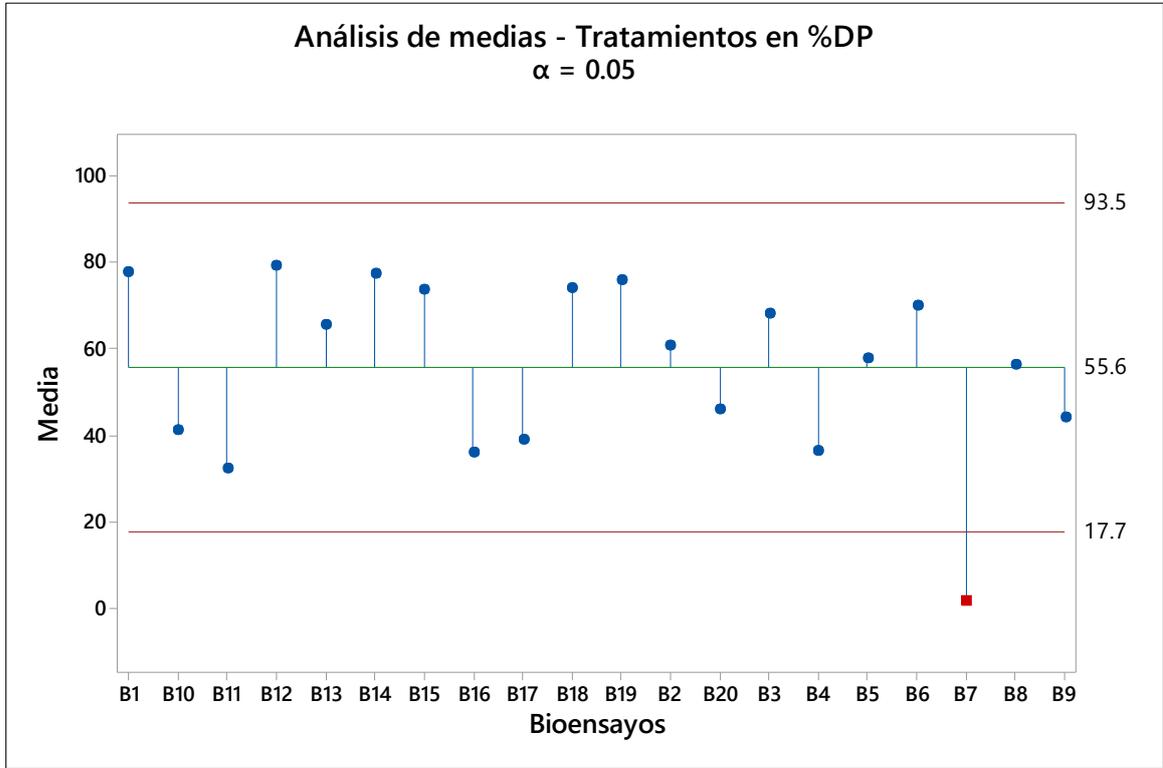


Gráfico 9.



**Comparación de los bioprocesos de desproteínización (DP) con la cepa RL-08 sobre la respuesta porcentaje de DP (%DP)**

**Gráfico 10.**



**Gráfico 11.**

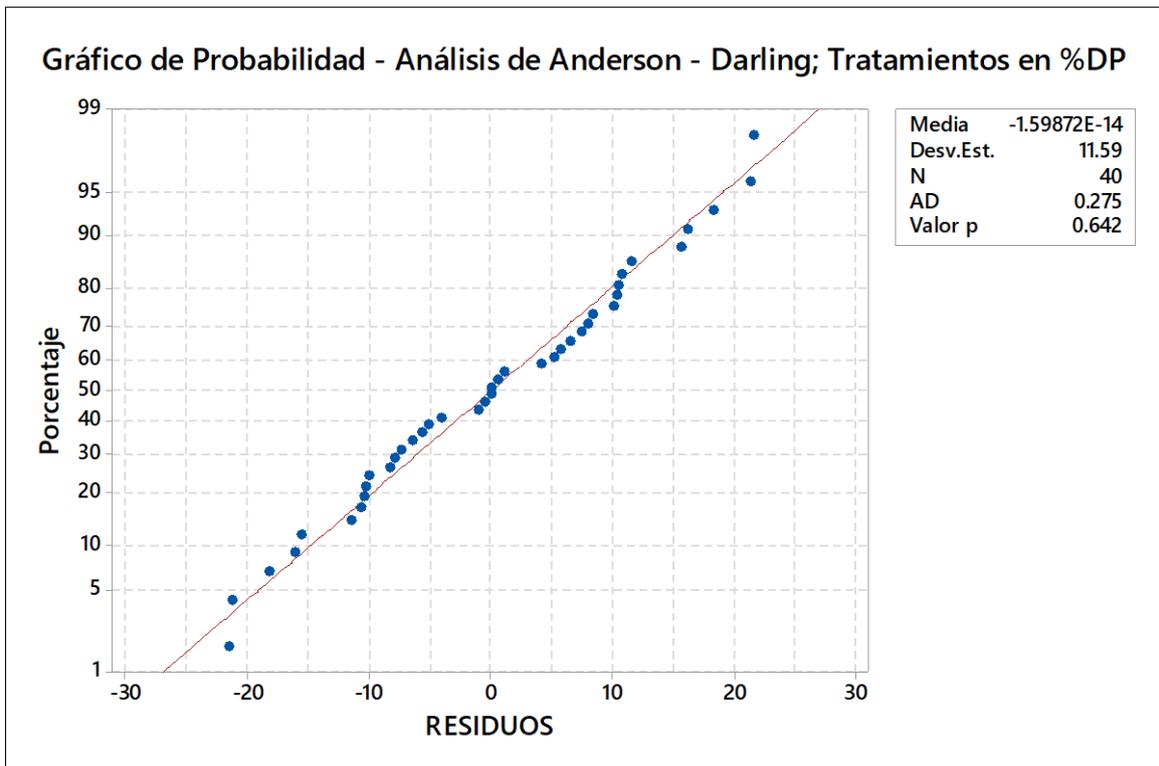
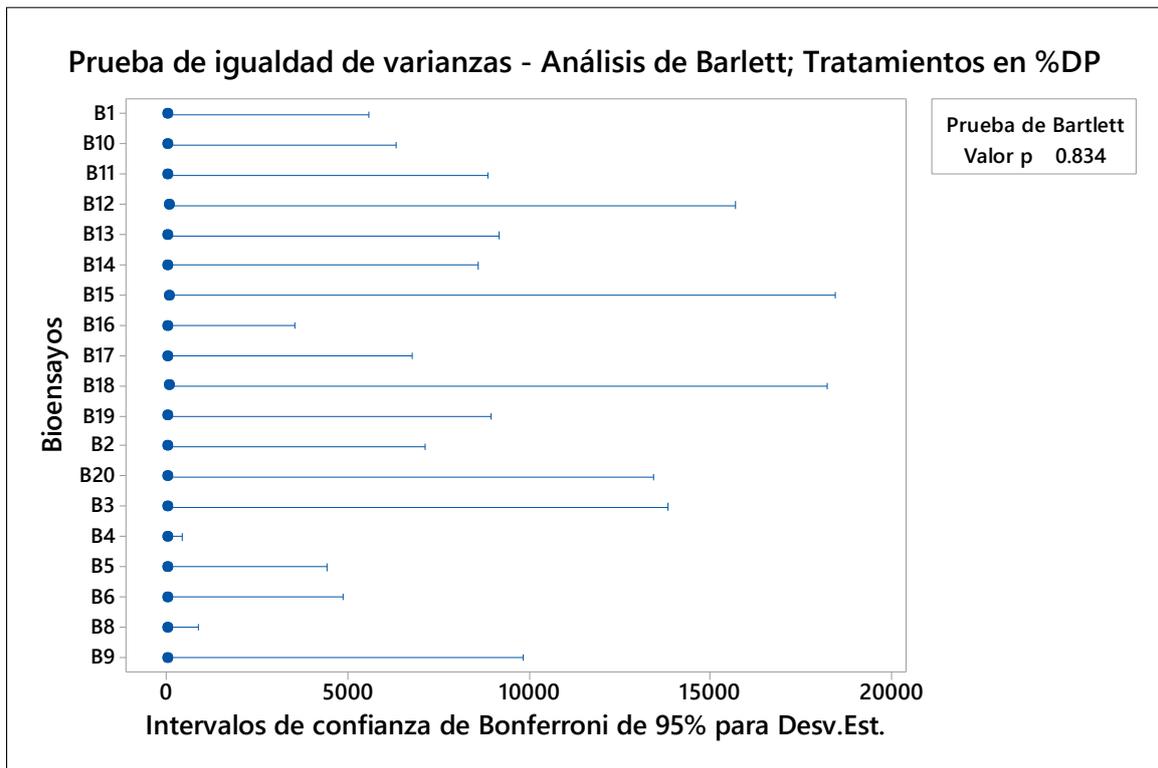
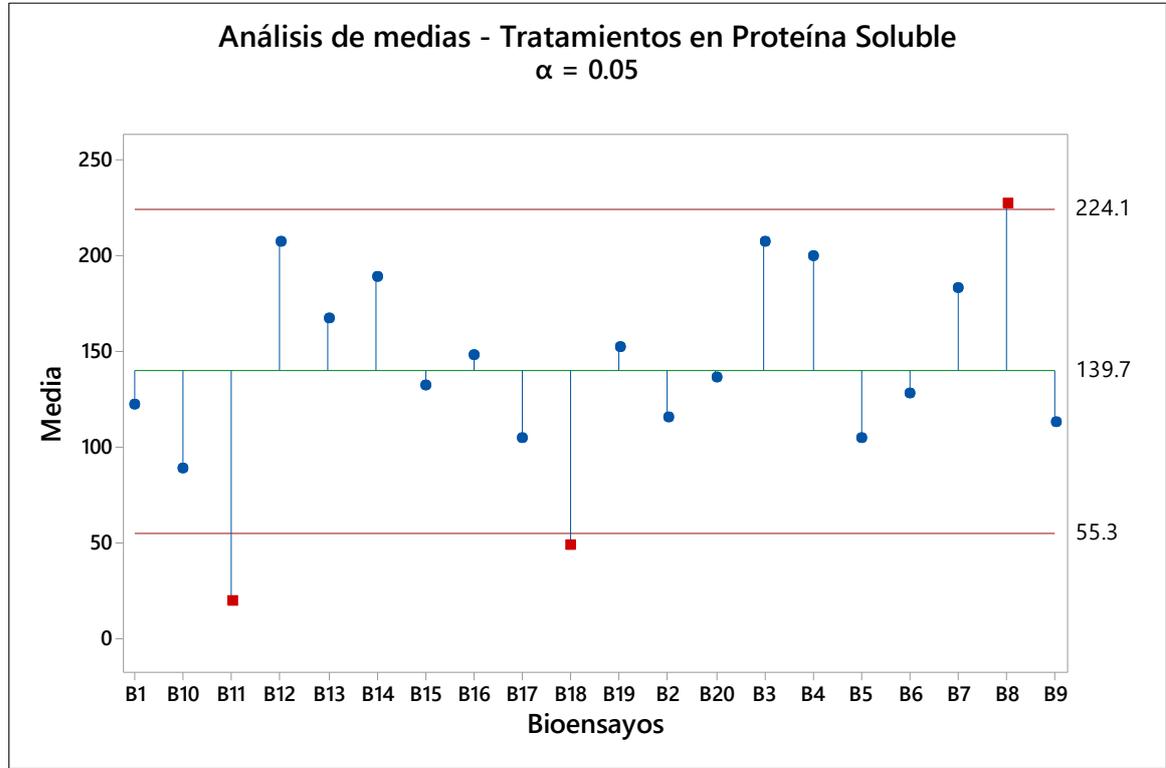


Gráfico 12.



**Comparación de los bioprocesos de desproteínización (DP) con la cepa RL-08 sobre la respuesta proteína soluble (mg de albúmina/ mL)**

**Gráfico 13.**



**Gráfico 14.**

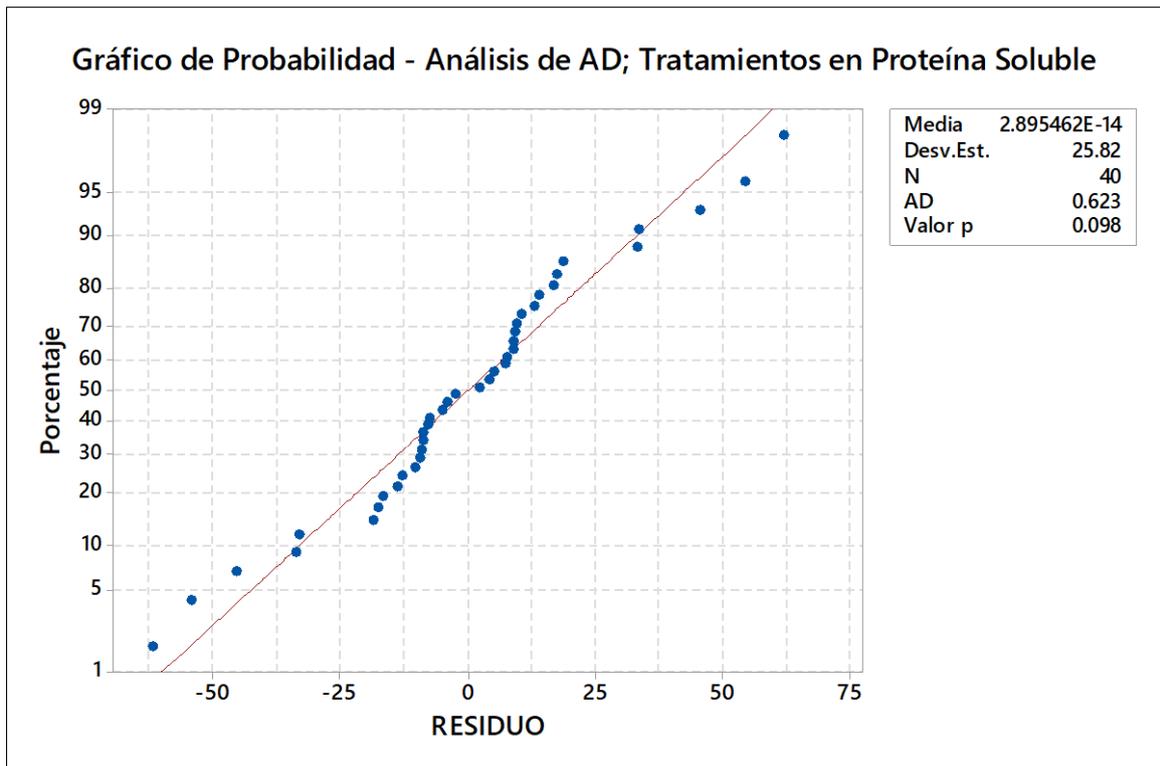
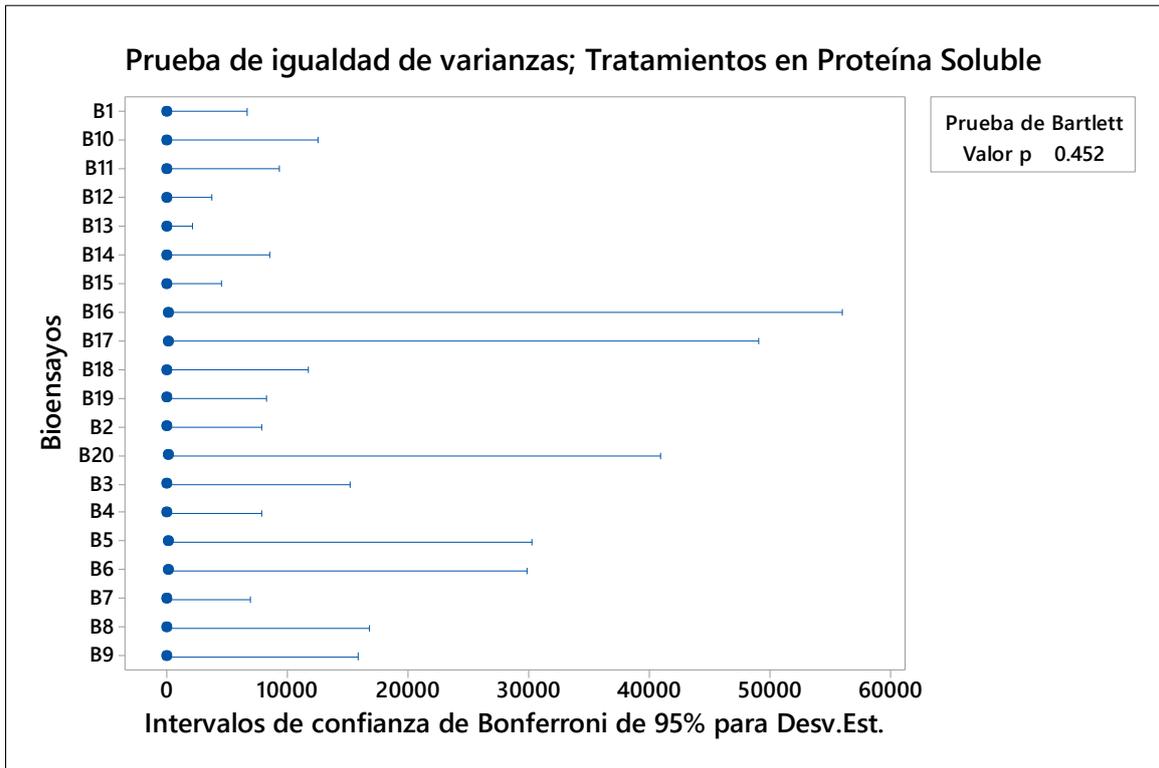
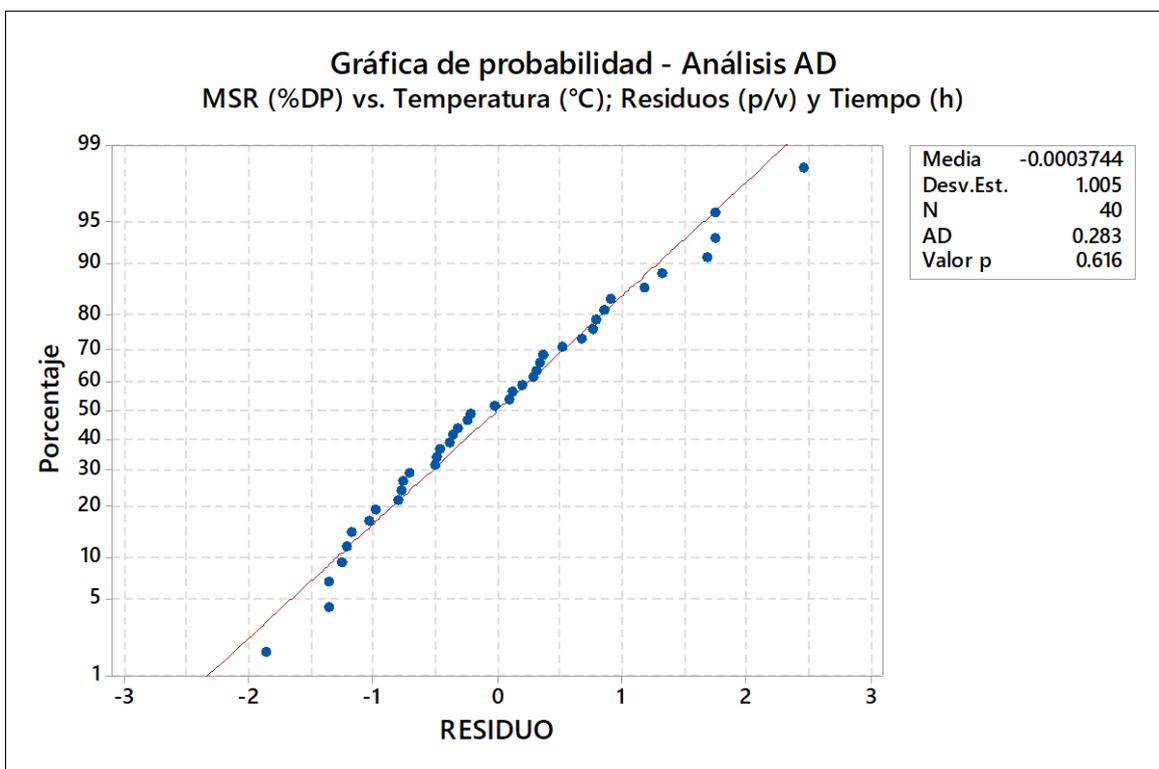


Gráfico 15.

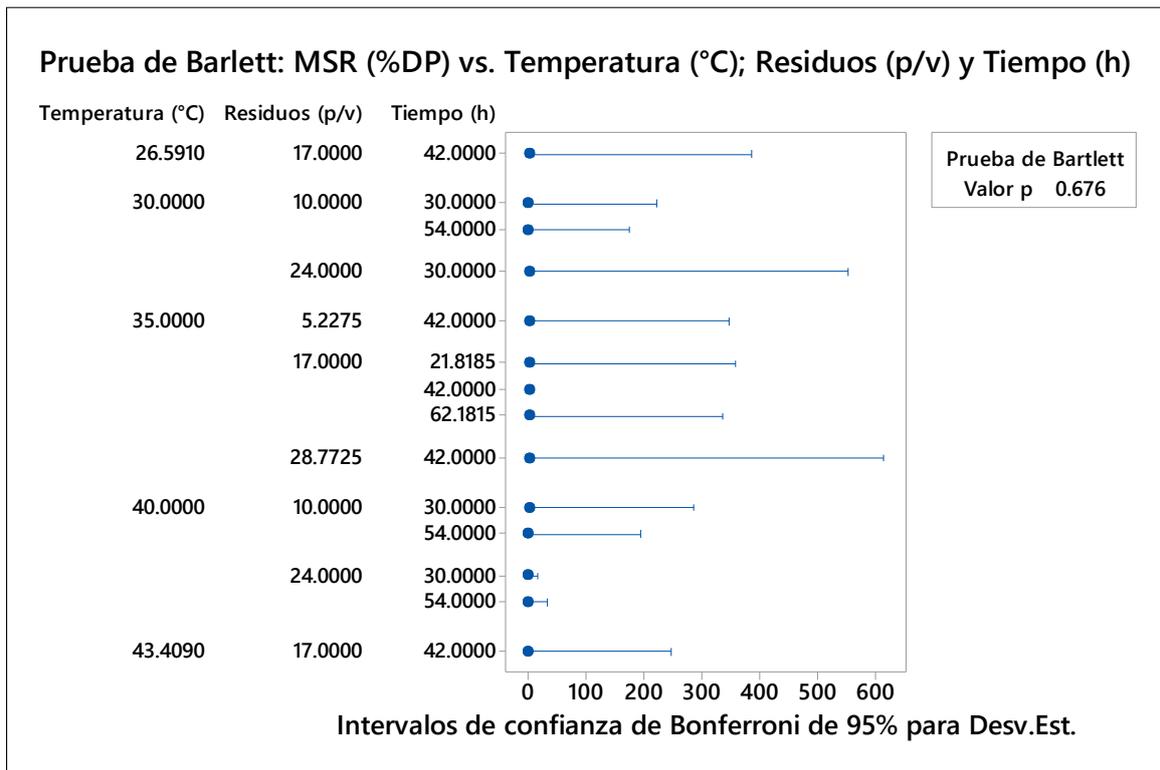


**Análisis del diseño de la MSR y búsqueda del modelo de segundo orden en función del %DP.**

Gráfico 16.

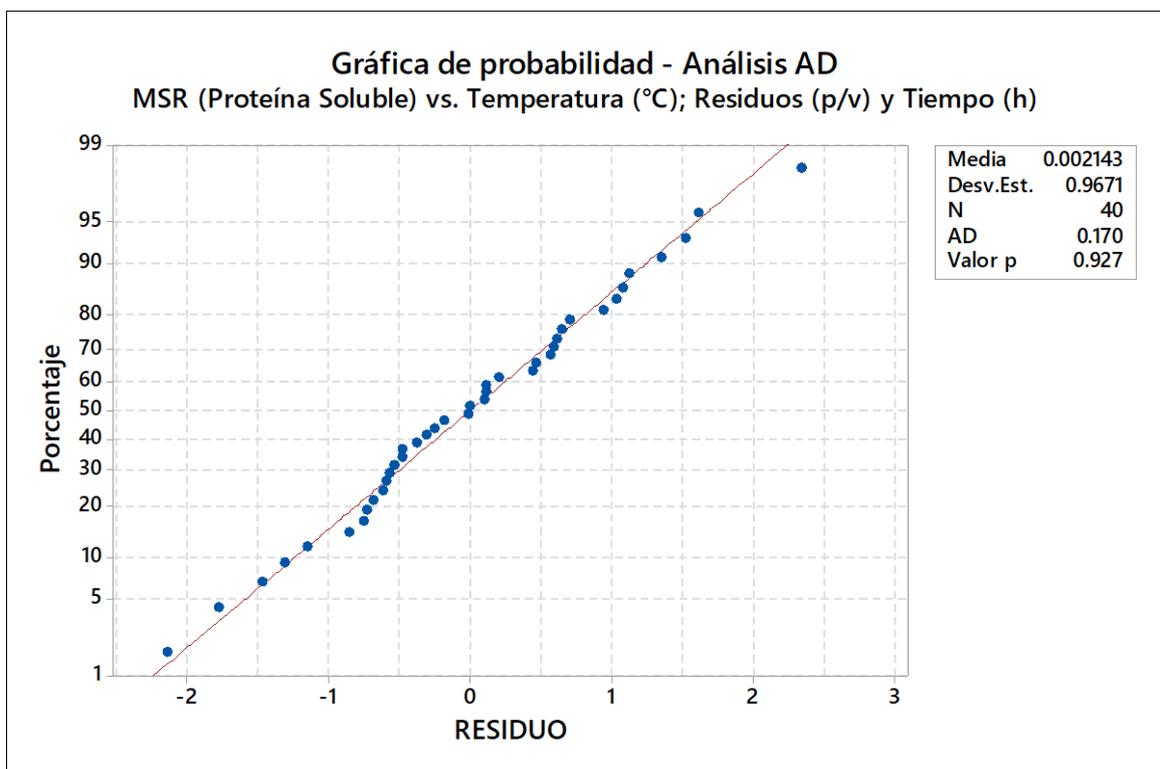


**Gráfico 17.**



**Análisis del diseño de la MSR y búsqueda del modelo de segundo orden, en función de la proteína soluble producto de la DP de RL.**

**Gráfico 18.**



**Gráfico 19.**

