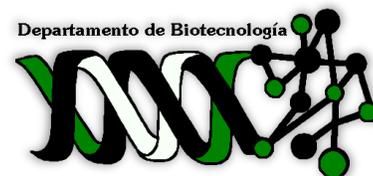




Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA



DEPARTAMENTO DE
BIOTECNOLOGÍA

División De Ciencias Biológicas Y De La Salud

Efecto del metabolismo de bacterias ácido lácticas en la extracción biológica de desperdicio de camarón para la obtención de quitina y quitosano

Tesis

Que para obtener el grado de

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta:

I.B.I. Jennyfer Hernández Alcántara

Matricula:

2192802272

Directora de tesis

Dra. C. Keiko Shirai Matsumoto¹

Asesores:

Dr. Laurent David²

M. en C. Marco Antonio Vera Ramírez³

¹Departamento de Biotecnología, Laboratorio de Biopolímeros y Planta Piloto de Procesamiento de Desperdicios Orgánicos

² Departamento de Ingeniería de Materiales y Superficie, Universidad de Claude Bernard Lyon I, Francia

³Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana

El H. Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la comunicación de resultados que presentó:

I. B. I Jennyfer Hernández Alcántara

El día 11 de junio de 2021

Comité tutorial:

Directora de tesis:

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Departamento de Biotecnología, Laboratorio de Biopolímeros y Planta Piloto de Procesamiento de Desperdicios Orgánicos.

Asesores:

Dr. Laurent David

Departamento de Ingeniería de Materiales y Superficie

Universidad de Claude Bernard Lyon I, Francia

M. en C. Marco Antonio Vera Ramírez

Departamento de Química,

Universidad Autónoma Metropolitana

H. Jurado

Presidente:

Dra. Elsa Bósquez Molina

Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana.

Secretario:

Dra. Carmen Hernández Valencia

Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

Vocal:

Dr. Marco Polo Carballo Sánchez

Área de Microbiología, Edafología, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados.

Vocal:

Dra. Diana Alonso Segura

División de Ingeniería en Biotecnología, Universidad Tecnológica de Corregidora.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00287

Matricula: 2192802272

Efecto del metabolismo de bacterias ácido lácticas en la extracción biológica de desperdicio de camarón para la obtención de quitina y quitosano.



Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 11:00 horas del día 17 del mes de junio del año 2021 POR VIA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DRA. ELSA BOSQUEZ MOLINA
DR. MARCO POLO CARBALLO SÁNCHEZ
DRA. DIANA ALONSO SEGURA
DRA. CARMEN HERNÁNDEZ VALENCIA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

DE: JENNYFER HERNÁNDEZ ALCÁNTARA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

JENNYFER HERNÁNDEZ ALCÁNTARA
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. ELSA BOSQUEZ MOLINA

VOCAL

DR. MARCO POLO CARBALLO SÁNCHEZ

VOCAL

DRA. DIANA ALONSO SEGURA

SECRETARIA

DRA. CARMEN HERNÁNDEZ VALENCIA

El presente documento cuenta con la firma –autógrafa, escaneada o digital, según corresponda- del funcionario universitario competente, que certifica que las firmas que aparecen en esta acta – Temporal, digital o dictamen- son auténticas y las mismas que usan los c.c. profesores mencionados en ella

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana forma parte del Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465”.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biopolímeros y Planta Piloto de Procesamiento de Desperdicios Orgánicos del Departamento de Biotecnología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto. Este trabajo fue financiado por la Secretaría de Educación, Ciencia, Tecnología e Innovación de la Ciudad de México (No. SECTEI / 196/2019).

Agradecimientos

Agradezco a la Dra. Keiko Shirai por los consejos e importantes comentarios para este trabajo, pero sobre todo por la paciencia y confianza depositada en mí para realizar la parte experimental aun en condiciones tan difíciles como lo fue esta pandemia. Gracias por demostrarme que la dedicación y el trabajo duro son las herramientas más importantes para el éxito.

Al Dr. Marco Vera por toda la paciencia y dedicación al transmitirme los secretos de RMN.

Al Dr. Jesús Rojas y la Dr. Mariana Quintana por la enseñanza y buena vibra al siempre responder mis dudas.

A mi compañera de laboratorio Tania por hacer más divertidas y amenas las largas horas de trabajo en esta pandemia.

A mi gran amigo Manu, gracias por ayudarme en cada duda, por los buenos consejos sobre mis experimentos y sobre todo por ser ese buen amigo con el que siempre puedes contar.

En especial a mi colega, mejor amiga y hermana la Bíol. Jossephlynt, gracias por cada porra y palabra de aliento brindado a lo largo de este camino, por ser mi confidente y mi paño de lágrimas, te quiero.

Por último, al Ing. Yahir que además de ser mi compañero es mi mejor amigo, sin ti todo este camino no fuese lo mismo, gracias por alentarme a entrar en la maestría, por compartir esta vida tan bonita y por llenarme de amor y apoyo en todo momento.

A mi madre, por ser la mujer más fuerte, trabajadora y valiente que conozco, por apoyarme en cada decisión que he tomado y por nunca soltarme la mano, muchas gracias por siempre apostar por mí ma.

A mi padre, por todo el increíble esfuerzo que logro traerme hasta donde hoy estoy, por acompañarme en las madrugadas mientras trabajaba y por siempre escucharme, aunque no entendieras todo lo que decía.

Dedicatoria

La presente tesis es dedicada a mis amados padres, Gladys Alcántara y Saul Hernández por ser el mejor ejemplo que seguir en esta y todas las vidas, los amo.

Índice de contenido

Índice de tablas.....	8
Índice de Fig. S.....	8
Resumen	11
Abstract	12
1. Introducción.....	13
1.1 Quitina.....	13
1.1.1 Extracción de quitina.....	14
1.2 Fermentaciones ácido-lácticas	15
1.2.1 Bacterias ácido-lácticas.....	15
1.2.2 Metabolismo de BAL	16
1.2.3 <i>Lactobacillus</i>	18
1.3 Pigmentos	19
1.4 Color.....	20
1.4.1 Espacio CIE (Commission Internationale de l'Éclairage) L*a*b	20
1.4.2 Espacio CIE L*C*H°	21
1.5 Quitosano.....	22
1.5.1 Producción de quitosano.....	23
1.5.2 Patrón de Acetilación	23
2. Antecedentes.....	23
3. Justificación.....	24
4. Hipótesis.....	25
5. Objetivos.....	25
5.1 Objetivo general	25
5.2 Objetivos específicos.....	25
6. Metodología.....	26
6.1 Obtención de quitina biológica.....	26
6.1.1 FAL escala 4.5 kg	26
6.1.2 FAL escala 25 kg	27
6.1.3 Cuenta de microorganismos.....	28
6.1.4 Purificación de quitina	28
6.2 Producción de quitosanos (desacetilación de quitina)	29

6.2.1 Método químico heterogéneo	29
6.2.2 Método químico homogéneo	29
6.3 Caracterización de los productos obtenidos	29
6.3.1 Acidez total titulable y pH	29
6.3.2 Determinación de humedad	29
6.3.3 Determinación de cenizas	30
6.3.4 Determinación de peso molecular (PM).....	30
6.3.5 Azúcares totales.....	31
6.3.6 Astaxantina total.....	31
6.4 Ajuste al modelo no lineal de Gompertz.	31
7. Resultados y discusión	32
7.1 FAL 4.5 kg.....	32
7.2 FAL 25 kg.....	33
7.2.1 pH y ATT.	33
7.2.2 Crecimiento celular y azúcares totales.	38
7.3 Caracterización de quitina y quitosano	41
7.3.1 Color.....	41
7.3.2 Caracterización químico-proximal.....	44
8. Conclusiones	47
9. Perspectivas	47
10. Referencias.....	48
Anexos	52
1. Curva estándar para determinación de azúcares totales por la técnica fenol-sulfúrico.....	52
2. Curva estándar para cuantificación de astaxantina total.....	52
3. Pruebas estadísticas.....	53

Índice de tablas

Tabla 1. Características metabólicas de lactobacillus (adaptada de Amorocho, 2011). ..	19
Tabla 2. Parámetros P_{min} , b, K y R del ajuste de Gompertz a los datos de pH de todos los cultivos.....	34
Tabla 3. Parámetros P_{max} , b, K y R del ajuste de Gompertz a los datos de ATT de todos los cultivos	36
Tabla 4. Nomenclatura de muestras y método de obtención de quitinas y quitosanos.....	44
Tabla 5. Caracterización químico-proximal de quitinas y quitosanos	45
Tabla 6 . Determinación de contenido soluble de quitinas crudas y quitosanos.	46

Índice de Fig. S

Fig. 1. Vía metabólica homofermentativa desde glucosa (PeñaFlor,2007).....	17
Fig. 2. Vía metabólica heterofermentativa desde glucosa (PeñaFlor, 2007).....	18
Fig. 3. Escala de color CIELAB, L^* representa la luminosidad, a^* las tonalidades verde-rojo y b^* las tonalidades azul-amarillo (Konica Minolta).	21
Fig. 4. Representación de las cadenas de (A) celulosa; (B) quitina totalmente acetilada y (C) quitosano totalmente desacetilado, para evidenciar su similitud estructural (Ramírez y col., 2010).....	22
Fig. 5: Mapa sintético de etapas experimentales en el desarrollo del trabajo experimental. 26	
Fig. 6. Sistema de fermentación 5 L conectado a una purga de CO_2 , a 25°C.	27
Fig. 7. A) Sistema de fermentación conectado a una purga de CO_2 con sensor de OD a 25°C y B) biorreactor de 70 L.....	28
Fig. 8. Perfil de pH ajustado al modelo de Gompertz para el cultivo FAL-2 de <i>L. plantarum</i> a 30°C en una escala de 4.5 kg, realizando determinaciones cada 24 h.	33
Fig. 9. Ajustes al modelo de Gompertz de los datos de pH en los cultivos de FAL de <i>L. plantarum</i> (∇) y <i>L. brevis</i> (\bullet), a 30°C realizando determinaciones cada 24h	35
Fig. 10. Perfil de acidez total titulable y su ajuste al modelo de Gompertz para los cultivos de <i>L. plantarum</i> (∇) y <i>L. brevis</i> (\bullet) expresada como mmol de ácido láctico por g de desperdicio durante 144 h a 30 °C en una escala de 25 kg. Letras distintas indican diferencia significativa entre los tratamientos mediante comparación múltiple de medias Tukey Kramer ($p < 0.05$).	36
Fig. 11. Disminución de OD en la purga con agua conectada al biorreactor con <i>L. brevis</i> (5%) y desperdicio de camarón adicionado con 10 % de sacarosa	38

Fig. 12. Crecimiento de <i>L. plantarum</i> (▽) y <i>L. brevis</i> (●) en las muestras obtenidas durante 144 h de cultivo a 30°C.....	39
Fig. 13. Porcentaje de consumo de azúcar en cultivos de <i>L. plantarum</i> (▽) y <i>L. brevis</i> (●) durante 144 a 30 °C, letras distintas indican diferencia significativa entre los tratamientos mediante comparación múltiple de medias Tukey Kramer ($p < 0.05$).....	40
Fig. 14. Perfil de acidez, temperatura, crecimiento bacteriano y azúcar disponible durante 144 h del cultivo con <i>L. plantarum</i> (▽) y <i>L. brevis</i> (●) a una escala de 25 Kg.....	41
Fig. 15. Quitina química Sigma C9213 (A) y biológicas obtenidas de FAL-1(B), FAL-2 (C) y FAL-3 (D).....	42
Fig. 16. Parámetros de color L*(A) a* y b* (B) de Q-Q (●), Q-1 (▲), Q-2 (◆) y Q-3 (◇) ...	42
Fig. 17. Cuantificación de astaxantina en las muestras de quitinas biológicas obtenidas por FAL letras distintas indican diferencia significativa entre los tratamientos mediante comparación múltiple de medias Tukey Kramer ($p < 0.05$).	44

Abreviaturas

ABS	Absorbancia
AL	Ácido láctico
ATT	Acidez total titulable
BA	Bacteria
BAL	Bacteria ácido láctica
CIE	Commission Internationale de l'Eclairage
DA	Grado de acetilación
D-GlcN	<i>N</i> -glucosamina y
D-GlcNAc	<i>N</i> -acetil glucosamina
DM	Desmineralización
Dmin	Grado de desmineralización
EMP	Embden-Meyerhof
FAL	Fermentación ácido-láctica
I _{CR}	Índice de cristalinidad
<i>L. brevis</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
m.o.	Microorganismo
PA	Patrón de acetilación
PM	Peso molecular
OD	Oxígeno disuelto

Resumen

Los desperdicios de camarón producidos tras la extracción de la parte comestible son responsables de un impacto ambiental negativo por lo cual, en los últimos años, se han estudiado nuevos métodos para la obtención de quitina a partir del desperdicio de camarón, para así disminuir su impacto en la contaminación. La quitina es un biopolímero biodegradable que se pueden obtener del desecho de camarón, además de proteínas, pigmentos y minerales, teniendo diversas aplicaciones a nivel industrial.

El objetivo del presente trabajo fue determinar si el tipo de metabolismo de BAL tiene algún efecto sobre el proceso de desmineralización y en consecuencia en la purificación de las quitinas obtenidas.

Se llevaron a cabo fermentaciones ácido-lácticas (FAL) de desperdicios de camarón (*Litopeneus vannamei*) inóculos de *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) y *Lactobacillus brevis* (*L. brevis*). Durante la FAL las bacterias producen ácido láctico (AL) permitiendo la purificación del desperdicio, este parámetro fue cuantificado durante todo el proceso, obteniendo para el cultivo con *L. plantarum* a escala de 25 kg 3.19 veces más AL en comparación del cultivo con *L. brevis*, el aumento en la producción de AL genera una disminución del pH desde 7.5 ± 0.21 al inicio del cultivo hasta 3.90 y 4.96 para *L. plantarum* y *L. brevis* respectivamente. Este comportamiento se debe a que *L. plantarum* es una BAL homofermentativa, este tipo de metabolismo produce más del 85% de ácido láctico a partir de glucosa, en contraste las BAL heterofermentativas como *L. brevis* que producen solamente entre el 50% de ácido láctico.

En adición se cuantificó el crecimiento de BAL, donde las poblaciones de BAL se incrementaron hasta las 144 h, en el que se obtuvo el mayor valor con 1.20×10^8 UFC·mL⁻¹ para el cultivo con *L. plantarum*, este mismo punto coincidió con la mayor producción de ácido láctico.

La quitina obtenida del cultivo con *L. plantarum* a escala de 25 kg presenta una mayor disminución del contenido de cenizas en comparación con la quitina del cultivo con *L. brevis*, el aumento en la producción de ácido láctico permitió que una mayor cantidad de CaCO₃ reaccionara, mejorando la purificación de la quitina favorecido por el metabolismo homofermentativo facultativo de *L. plantarum*.

Debido al proceso de obtención (FAL), en todas las quitinas obtenidas fueron conservados los pigmentos. Una alta producción de AL se ve reflejado en una mayor desmineralización, que a su vez permite un aumento en la cantidad de astaxantina extraída.

El tipo de BAL presentó un efecto significativo sobre el PM, siendo mayor para los quitosanos provenientes de quitinas con *L. brevis*. Además, aquellos obtenidos por desacetilación homogénea presentaron un PM menor debido a la disminución en su solubilidad.

Abstract

Chitin is a biodegradable biopolymer that can be obtained from shrimp wastes employing thermochemical and biological methods. The latter are emerging as a green, cleaner, eco-friendly, and economical process. In this regard, lactic acid fermentations (LAF) of shrimp wastes (*Litopeneus vannamei*) were carried out with starters of lactic acid bacteria (LAB), *Lactobacillus brevis* (*L. brevis*) and *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) using 10% of sucrose as carbon source for 144 h at 30 ° C. During the LAF, the bacteria produced lactic acid (LA) allowing the purification of the chitin, LA produced with *L. plantarum* was 3.9-fold higher than that with *L. brevis*. The increase in LA produced a decrease in pH from 7.5 ± 0.21 to 3.90 and 4.96 for *L. plantarum* and *L. brevis*, respectively. This behavior is explained by the homofermentative pattern of *L. plantarum*, since this metabolism produces 85% LA from glucose while with the heterofermentative lactobacilli *L. brevis* generates only 50% of LA from glucose. In addition, LAB growth was quantified, LAB populations increased until 120 h, at that point the highest value was 1.20×10^8 CFU·mL⁻¹ for *L. plantarum*, this same point coincided with the increased production of LA. The organic acids remove minerals from the shrimp wastes as it was evidenced by a greater decrease of ash content in the chitin extracted from *L. plantarum* LAF than that with *L. brevis*, improving the purification of chitin favored by facultative homofermentative metabolism.

Due to the extraction process (FAL), the pigments were conserved in all the biochitins obtained. A high production of LA is reflected in a greater demineralization, which in turn allows an increase in the amount of astaxanthin extracted.

The type of BAL presented a significant effect on molecular weight, being greater for chitosans from chitins with *L. brevis*. In addition, those obtained by homogeneous deacetylation presented a lower MW due to the decrease in their solubility.

1. Introducción

Los polímeros tienen un rol muy importante y variado en la naturaleza y la industria, estos son moléculas de gran tamaño que son constituidas por moléculas repetidas a lo largo de la cadena (monómeros), podemos clasificarlos en dos grandes grupos: polímeros naturales y polímeros sintéticos. Los polímeros naturales forman parte de sistemas estructurales y de información en sistemas vivos. Los polímeros sintéticos son muy utilizados en la industria, sin embargo, son responsables de gran número de problemas ambientales, debido a que la mayoría no son biodegradables (Camacho y col., 2011).

1.1 Quitina

La quitina, es un polímero natural muy abundante en la naturaleza. Este polímero forma parte del sistema estructural en células de bacterias, insectos, crustáceos, hongos, plantas, entre otros (Ramírez y col., 2010).

La quitina está compuesta por moléculas de *N*-glucosamina (D-GlcN) y *N*-acetil glucosamina (D-GlcNAc) unidos mediante enlaces glicosídicos $\beta(1\rightarrow 4)$ que produce una estructura rígida no ramificada. El exoesqueleto de crustáceos además de un 15-40% de quitina contiene entre 30-40% de proteínas estructurales, 30-50% de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ y CaCO_3 , además de contener también algunos lípidos (Abdulkarim y col., 2013).

La quitina presenta una estructura muy similar a la celulosa (Fig. 4A), la diferencia se encuentra en que el carbono 2 al contener un grupo hidroxilo en la celulosa y un grupo acetamida para la quitina (Fig. 4B). Han sido identificados tres polimorfos de quitina en la naturaleza, α -quitina, β -quitina y γ -quitina difiriendo en la orientación de las microfibrillas (Rinaudo y col., 2006; Minke y col., 1978). La α -quitina es la forma más abundante en la naturaleza, con un arreglo antiparalelo que le confiere mayor estabilidad, mientras que la β -quitina posee cadenas que se encuentran en forma paralela proporcionando una fuerza intermolecular más débil, por último, la γ -quitina presenta dos cadenas paralelas en el mismo sentido y la siguiente en el sentido opuesto con características similares a α -quitina (Pastor y col., 2004; Hall, Barrera & Shirai, 2020).

La quitina es insoluble en medios acuosos, debido a la abundancia de enlaces de hidrógeno que se forman entre grupos acetamida en cadenas de polímeros adyacentes, estos son promovidos por los grupos hidroxilos (C-6 y C-3) y el grupo *N*-acetil o amino (en C-2) en las moléculas de quitina y quitosano respectivamente (Prashanth y col., 2007;

Pacheco y col., 2010). Para que pueda ser solubilizada la quitina es necesario el uso de solventes que desestabilicen los puentes de hidrogeno, tal es el caso de la N,N-dimetilacetamida (DMAc) con 5-8 % de LiCl (Pacheco y col., 2010).

Los grupos amino de la quitina se encuentran en forma acetilada, los cuales pueden estar unidos a cadenas proteicas o como aminas libres, sin embargo, durante los procesos comunes de extracción con ácidos y álcalis se produce una inminente desacetilación del polímero (Pacheco y col., 2010). Las muestras de quitina extraídas pueden contener cantidades variables de grupos acetil que dependen del origen y el proceso de extracción del biopolímero, en general los grados de acetilación (DA) de esta se encuentran entre 90 y 95% (Kurita y col., 2006).

El procesamiento de desperdicios de crustáceos da inicio con la extracción de quitina, que implican la molienda del desperdicio, además de desmineralización y desproteínización como etapas de purificación, sin embargo, dependiendo de la aplicación en algunos casos es necesaria una etapa de despigmentación para la remoción de los pigmentos presentes en el exoesqueleto (Rinaudo y col., 2006).

1.1.1 Extracción de quitina

La quitina puede obtenerse a partir de los microorganismos protistas, algas y hongos, en invertebrados inferiores como las esponjas, celenterados, nemátodos y moluscos, así como en vertebrados en las escamas y el intestino de peces y anfibios. Comercialmente se han empleado desechos de crustáceos y hongos para su extracción por métodos químicos o biológicos (Hall, Barrera & Shirai, 2020). Según la fuente de obtención y el método de preparación, las características de la quitina varían.

La obtención de quitina en la industria a partir de crustáceos se genera mediante procesos consecutivos de desmineralización y desproteínización con el uso de altas concentraciones de ácido y álcali respectivamente, sin embargo, dependiendo de la aplicación final también en algunas ocasiones es necesario la remoción de pigmentos mediante el uso de compuestos decolorantes (Synowiecki y col., 2003; Shahidi, 2005).

Las proteínas estructurales son generalmente removidas con ayuda de soluciones alcalinas de NaOH o KOH. Para la etapa de desmineralización, se ha reportado el uso de ácidos como HCl, HNO₃, H₂SO₄, CH₃COOH o HCOOH. Estas metodologías implican altas concentraciones de ácido y álcali que generan una gran cantidad de residuos corrosivos

con un importante impacto ambiental, además de modificar las características estructurales de la quitina resultante, tal como son el índice de cristalinidad (I_{CR}) y peso molecular (PM) (Pacheco y col., 2010).

1.2 Fermentaciones ácido-lácticas

Se ha estudiado el uso de fermentaciones ácido-lácticas (FAL) para la extracción de quitina como una alternativa a los métodos industriales debido a que se evita el uso de ácidos y álcalis concentrados que resultan ser muy nocivos para el medio ambiente; en este proceso, la producción de ácido láctico (AL) por los microorganismos (MO) disminuye el pH del cultivo lo que permite la solubilización del $CaCO_3$ realizando así la desmineralización, simultáneamente una combinación entre las enzimas proteolíticas de estos m.o., el pH y la temperatura llevan a cabo el proceso de desproteización; este método permite la recuperación del biopolímero y otros compuestos de valor agregado de manera más amigable, además de preservar sus características estructurales (Pacheco y col., 2010; Hall, Barrera & Shirai, 2020).

1.2.1 Bacterias ácido-lácticas

Las bacterias ácido lácticas son un grupo de microorganismos capaces de metabolizar azúcares para la producción de ácido láctico y otros productos mediante fermentación.

Este grupo de microorganismos presentan estructura de cocos o bacilos Gram positivos, ácido tolerantes, no esporulados, anaerobios o aerotolerantes, capaces de producir AL como principal producto de fermentación, obteniendo energía mediante la fosforilación de carbohidratos (Carr y col., 2002). Para su crecimiento son necesarios nutrientes tales como aminoácidos, péptidos, vitaminas, sales, ácidos grasos y carbohidratos fermentables (hexosas o pentosas), debido a esto el medio Man Rogosa Sharpe (MRS) es uno de los medios más utilizados para su cultivo (Savadogo y col., 2006).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) pueden ser clasificadas en función a sus características morfológicas, fisiológicas, metabólicas, temperatura de crecimiento, enantiómero de ácido láctico producido, tolerancia ácido-base y crecimiento en salinidad (Axelson, 2004).

Estos microorganismos son generalmente mesófilos, sin embargo, se ha reportado su crecimiento a temperaturas entre $5^{\circ}C$ y $45^{\circ}C$ (Carr y col., 2002). El desarrollo de BAL tienen lugar a valores de pH entre 4.5 y 6, deteniendo su actividad entre 3.2 y 3.8 aunque con rendimientos de ácido láctico diferentes según sean homofermentativas o

heterofermentativas (Ramirez, 2009; Lücke, 1995). Las BAL son ampliamente utilizadas como cultivos iniciadores para la elaboración, conservación y extracción de diferentes productos de interés como es el caso de la quitina biológica.

1.2.2 Metabolismo de BAL

Las BAL pueden ser clasificadas en dos grupos en función de su metabolismo de carbohidratos (hexosas o pentosas): homofermentativas y heterofermentativas.

Las BAL homofermentativas son aquellas que solo producen ácido láctico (>85%), esto debido a que dependen de la presencia o ausencia de enzimas aldolasa y fosfoacetolasa. La presencia de la enzima aldolasa permite la fermentación de glucosa a lactato usando la vía Embden-Meyerhof (EMP), como es el caso de *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, y algunos *Lactobacillus* (Shirai y col., 1999; Carr y col., 2002)

Las BAL heterofermentativas producen otros ácidos orgánicos como ácido acético o etanol y CO₂ además de ácido láctico. Esto debido a que son capaces de fermentar glucosa usando la vía de la fosfoacetolasa, esta vía se presenta en bacterias que no poseen la enzima fructuosa 1,6- fosfo aldolasa, teniendo la necesidad de formar un pentosa, como es el caso de *Leuconostoc* y algunos *Lactobacillus* (Shirai y col., 1999; Carr y col., 2002)

A su vez la BAL se agrupan en tres categorías en función de estas dos vías de fermentación:

- Homofermentativas estrictas
- Heterofermentativas estrictas
- Heterofermentativas facultativas

Las BAL homofermentativas estrictas degradan únicamente hexosas por la vía EMP (Fig. 1) obteniendo como producto final exclusivamente ácido láctico y no son capaces de fermentar pentosas o el gluconato. Los heterofermentativos estrictos degradan las hexosas a ácido láctico, ácido acético, etanol y CO₂, mientras que las pentosas a ácido láctico y ácido acético por la vía de la fosfoacetolasa (Fig. 2). Los heterofermentativos facultativos tienen la capacidad de fermentar los carbohidratos por ambas vías (EMP y fosfoacetolasa) por lo que les permite metabolizar tanto hexosas como pentosas, usando como metabolismo principal la homofermentación (Axelsson y col., 2004; Lyhs, 2002; Shirai y col., 1999).

Este cambio se debe al método de metabolización del piruvato, en donde se produce menos lactato debido a que el piruvato restante se convierte en acetil-CoA. Bajo condiciones de exceso de nutrientes el piruvato se convierte en lactato, por otro lado, en condiciones limitantes de nutrientes una fracción del piruvato se metaboliza hasta llegar a etanol y acetato como una manera de aprovechamiento más eficiente de los carbohidratos.

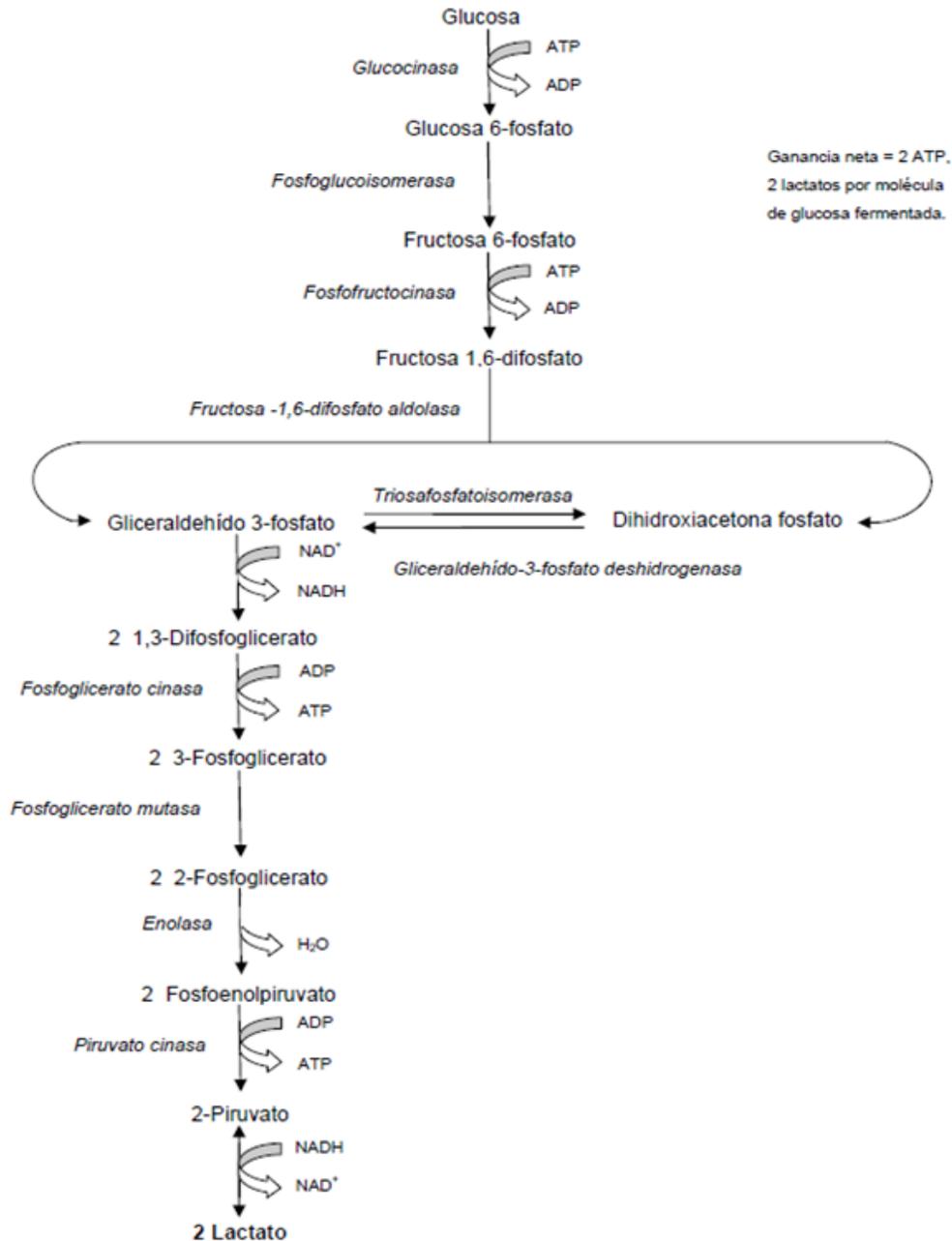


Fig. 1. Vía metabólica homofermentativa desde glucosa (PeñaFlor,2007).

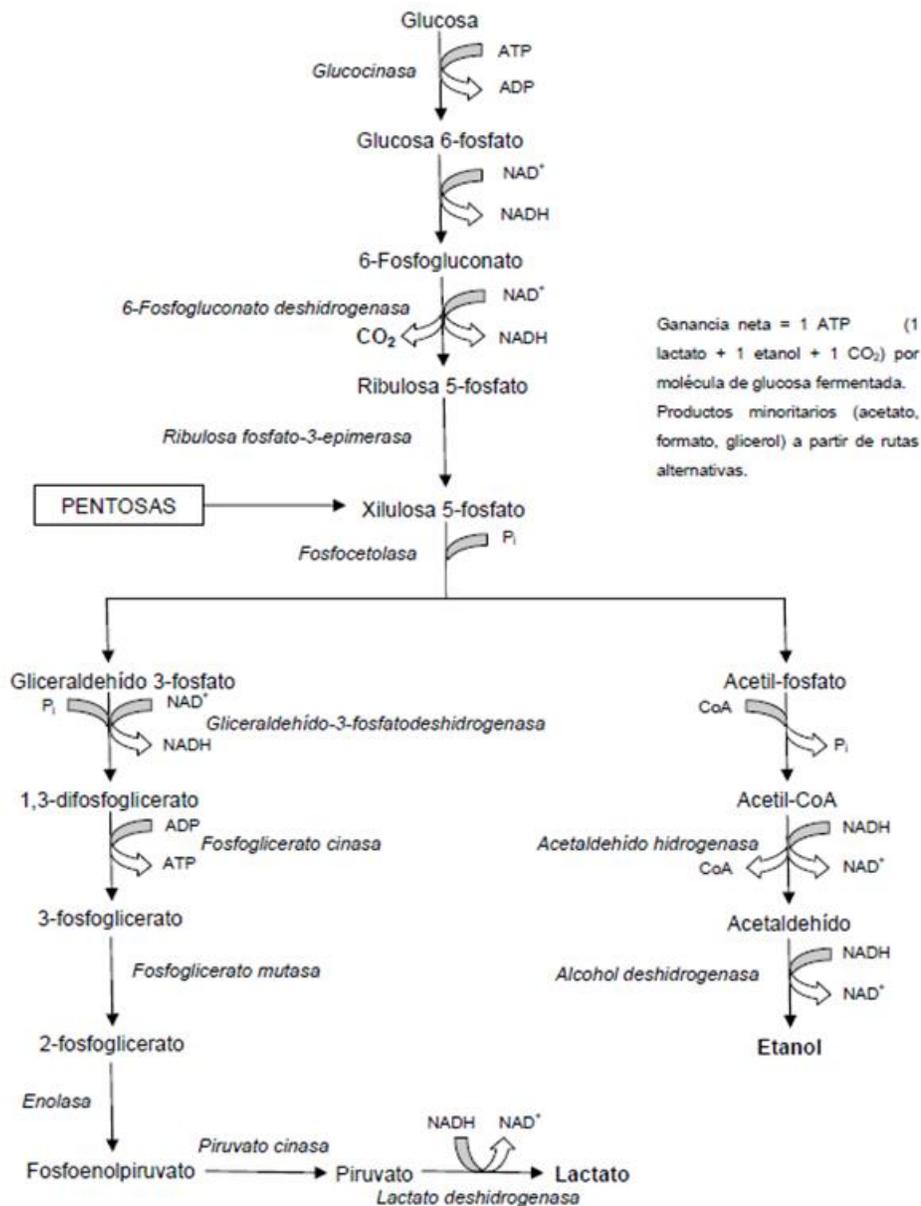


Fig. 2. Vía metabólica heterofermentativa desde glucosa (PeñaFlor, 2007).

1.2.3 *Lactobacillus*

Los *Lactobacillus* son un género de BAL grampositivas, aerotolerantes o anaerobias, baciliforme, no productora de esporas. Son capaces de crecer en valores de pH y temperatura entre 3-8 y 2-53°C respectivamente, generalmente con valores óptimos de crecimiento de 5.5-6.2 para pH y 30-40°C de temperatura, sin embargo, en pH neutro o alcalino disminuye su velocidad de crecimiento. Son bacterias capaces de hidrolizar polisacáridos o disacáridos a carbohidratos más sencillos, pueden ser homofermentadores o heterofermentadores según el tipo de productos finales (Shirai y

col., 1999; Hammes y col., 2009; Salvetti y col., 2012). Las características metabólicas de algunos *Lactobacillus* se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Características metabólicas de *Lactobacillus* (adaptada de Amorocho, 2011).

Características	Homofermentativos obligados	Heterofermentativos obligados	Heterofermentativos facultativos
Fermentación de hexosas	✓	✓	✓
Fermentación de pentosas	-	✓	✓
CO ₂ a partir de glucosa	-	✓	-
CO ₂ a partir de gluconato	-	✓	✓
Presencia de aldolasa	✓	-	✓
Presencia de fosfoacetolasa	-	✓	✓
Especies	<i>L. acidophilus</i> <i>L. delbrueckii</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. salivarius</i>	<i>L. brevis</i> <i>L. buchneri</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. reuteri</i> <i>L. kefir</i>	<i>L. plantarum</i> <i>L. casei</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>L. pentosus</i> <i>L. paracasei</i>

1.3 Pigmentos

Una de las ventajas del uso de FAL para extracción de quitina es la oportunidad de recuperar otros productos de valor agregado tal como son minerales, proteínas y pigmentos (carotenoides) (Aranday-García y col., 2017)

Los desperdicios de camarón contienen grandes cantidades de pigmentos de colores amarillos- naranja, en especial de astaxantina, una xantofila con excelente poder antioxidante y anticancerígeno, es ampliamente utilizada en la industria, en la acuicultura como alimento, colorante alimentario y en cosméticos (Emodi, 1978; Pacheco y col., 2011).

Se ha reportado que el uso de tratamientos más amigables como la FAL de desperdicios de camarón bajo condiciones de 20-30°C permite la preservación de astaxantina en la quitina al final del proceso (Pacheco y col., 2009). Para la extracción de estos carotenoides se ha estudiado el uso de solventes tales como acetona y etanol con porcentajes de recuperación entre el 75 y 80%, encontrándose que el uso de acetona

presenta un mayor rendimiento de extracción. Así mismo, se ha reportado que la extracción se ve favorecida por el proceso de ensilaje (FAL) debido a que los procesos de desmineralización y desproteización durante el proceso permiten que los carotenoides tengan mayor disponibilidad para el solvente (Gimeno y col., 2007).

1.4 Color

El color es un parámetro que a menudo es utilizado para determinar el contenido de pigmentos en un producto o alimento como un índice de calidad. Según algunos autores el color de un alimento puede deberse a la presencia de pigmentos o colorantes naturales, la formación de pigmentos colorantes resultantes de reacciones químicas y enzimáticas, la adición de sustancias colorantes y los efectos fisicoquímicos presentes en el alimento (Bello, 2008; Mathias-Rettig y col., 2014).

El color percibido es debido a la absorción y reflexión de ciertas longitudes de onda dentro de la región visible del espectro electromagnético (380-760nm) (León y col., 2006). Para que el color sea percibido por la vista humana es necesario que los alimentos sean estimulados por la luz; una parte de ésta es absorbida y otra reflejada, la luz reflejada en el alimento es en parte debida a la presencia de grupos cromóforos que son capaces de absorber las radiaciones luminosas (Bello, 2008; Mathias-Rettig y col., 2014).

El color se encuentra descrito en función del observador, siendo el color percibido dependiente de la intensidad y el tipo de luz, debido a estos factores es que se han creado sistemas de color para estandarizar dicho parámetro.

La CIE (Commission Internationale de l'Éclairage) es una organización encargada de la ciencia y el arte de la iluminación, clasificando la gama cromática en espacios de color, los más utilizados son CIE $L^*a^*b^*$ y CIE L^*C^*h (León y col., 2006; Hernández, 2014).

1.4.1 Espacio CIE (Commission Internationale de l'Éclairage) $L^*a^*b^*$

Este es un espacio de color, usado para estandarizar la gama cromática, consta de 3 parámetros bien definidos: L^* , a^* y b^* (Figura 3). El conjunto a^*b^* se conoce como cromaticidad y en unión con L^* definen el estímulo de color.

L^* representa la medida de luminosidad o brillo en un rango de 0 a 100, indicando la oscuridad o claridad de un objeto. Valores de 0 representa el negro mientras que el blanco esta descrito dentro del valor 100 de L^* (León y col., 2006)

a^* representa la escala de color de verde (-a) a rojo (+a) y 0 el neutro. Por el contrario, b^* representa la escala de color azul (-b) a amarillo (+b) con valor de 0 para el neutro, siendo estos parámetros los componentes cromáticos con rango de -120 a 120 (Mathias-Rettig y col., 2014). Sin embargo, este sistema no indica el tono y saturación, por ello fueron definidos los parámetro croma (C^*) y tono (H^*).

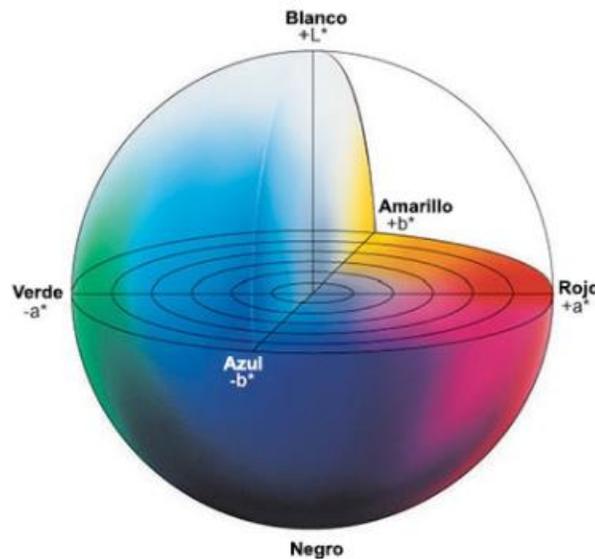


Fig. 3. Escala de color CIELAB, L^* representa la luminosidad, a^* las tonalidades verde- rojo y b^* las tonalidades azul-amarillo (Konica Minolta).

1.4.2 Espacio CIE $L^*C^*H^\circ$

Este es otro espacio de color estandarizado por la CIE; al igual que en el sistema CIE $L^*a^*b^*$, L^* representa la luminosidad tomando valores de 0 a 100.

C^* representa el parámetro croma o pureza del contenido de color, evaluado en proporción a su luminosidad, con valores de 0 (estimulo acromático) a 150 generalmente.

H° se refiere al tono, siendo este el atributo de la sensación visual, tomando valores entre 0 (estimulo acromático) y 360° (Mathias-Rettig y col., 2014). Ambos sistemas pueden ser relacionados mediante las siguientes ecuaciones:

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (1)$$

$$H^\circ = \arctg \frac{b^*}{a^*} \quad (2)$$

1.5 Quitosano

El quitosano es un copolímero de la quitina, que también puede hallarse en la naturaleza u obtenerse de forma sintética, este es un compuesto biodegradable y biocompatible. Se caracteriza por tener monómeros mayormente desacetilados, lo que modifica sus propiedades biológicas y químicas (Fig. 4C). La frontera entre estos biopolímeros se encuentra entre un grado de desacetilación (DA) del 50-60% (Tervojevick y col., 1988; Domard, 1998). Bajo estas características de grupos amino libres el polímero comienza a ser soluble en medios ácidos acuosos. La solubilización ocurre por protonación del grupo funcional $-NH_2$ en el carbono 2 de D-glucosamina, por lo cual en medio ácido el polisacárido es convertido a un polielectrólito (Rodríguez y col., 2000). Debido a la alta reactividad de estos grupos presentes en el quitosano, es que este polímero tiene un numeroso uso en distintas industrias que van desde la remoción de contaminantes en aguas hasta el área cosmética (Velasco-Garduño y col., 2020; Hall, Barrera & Shirai, 2020).

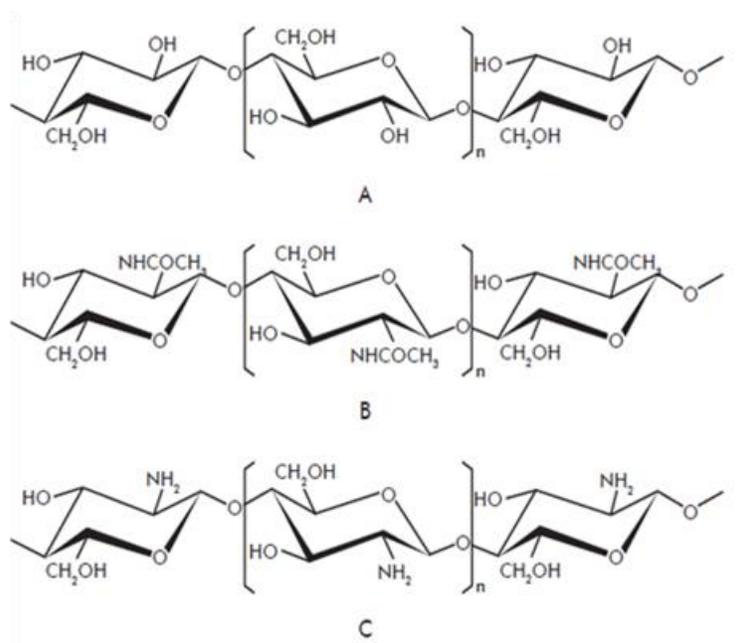


Fig. 4. Representación de las cadenas de (A) celulosa; (B) quitina totalmente acetilada y (C) quitosano totalmente desacetilado, para evidenciar su similitud estructural (Ramírez y col., 2010).

1.5.1 Producción de quitosano

El quitosano puede ser obtenido mediante desacetilación por método homogéneo o heterogéneo, la metodología empleada produce quitosanos con características diferentes.

La desacetilación homogénea se realiza por largos periodos de tiempo en medio álcali a bajas temperaturas generando homogeneidad en la reacción, sin embargo, la distribución de los grupos acetil a lo largo de la cadena resulta ser arbitraria (Nemtsev y col., 2002). En contraste, la desacetilación heterogénea se realiza durante cortos periodos de tiempo a temperaturas elevadas, esto propicia un desacetilación más rápida en las regiones amorfas del polímero que en las regiones cristalinas, permitiendo un alto grado de desacetilación, pero con una reducción en el tamaño de las moléculas (Pacheco y col., 2010).

1.5.2 Patrón de Acetilación

La mayoría de las actividades biológicas asociadas a los quitosanos parcialmente desacetilados parecen depender no solo del grado de polimerización (DP) y DA, sino también del patrón de acetilación (PA) (Wang & Heuzey, 2016). El DA se refiere al porcentaje de grupos acetilos en la cadena del polímero, mientras PA es un parámetro que describe la distribución de D-GlcNAc y residuos de D-GlcN a lo largo de la cadena del polímero (Aiba, 1993). Los quitosanos con DA de 0.45 a 0.55 % son solubles en agua, sin embargo, ha sido reportado que las diferencias entre la solubilidad de los copolímeros de quitosano con un DA de 50% son debidas en gran parte al PA que se ve afectado por el proceso de desacetilación (homogéneo u heterogéneo) (Kurita y col., 1977). Esto debido a la distribución de la parte hidrofóbica (D-GlcNAc) y la parte hidrofílica (D-GlcN) lo que podría limitar su disolución.

2. Antecedentes

La obtención de quitina por FAL se define como un proceso de conservación en el cual los ácidos producidos inhiben el crecimiento de patógenos, este método presenta ciertas ventajas respecto a los químicos, como el permitir la recuperación de productos con valor agregado como minerales, pigmentos y proteínas (Shirai y col., 2001; Cira y col., 2002). Se ha demostrado que los métodos biológicos pueden reducir la contaminación ambiental

de los pasos alcalinos/ácidos utilizados comúnmente, además de evitar cambios estructurales en la quitina (Bajaj y col., 2015).

Aranday-García y col., (2017) removió el 52% de minerales en el desperdicio de camarón con FAL de *Lactobacillus brevis*, sin embargo, demostró que el uso de inoculaciones sucesivas de *L. brevis* y *Rhizopus oligosporus* es una buena alternativa para aumentar la remoción de minerales.

Pacheco y col., (2011) lograron mejorar el %Dmin hasta valores de 67.5 % para cultivos con *L. plantarum*, demostrando que las quitinas obtenidas por FAL presenta características superiores de I_{Cr} y PM sobre aquellas extraídas químicamente.

Se ha reportado que la solubilidad de quitina y quitosanos depende de parámetros estructurales tales como PM, PA e I_{CR} (Domard, 1998; Pacheco y col., 2011). Por otro lado, la desacetilación heterogénea de quitina proveniente de FAL presenta una estructura de cristalinidad conservada, esto sugiere una desacetilación en bloques sobre la parte amorfa, lo que propicia la solubilidad del quitosano en soluciones ligeramente ácidas (Pacheco y col., 2010; Patente No. WO 2012/080772 A1, 2012).

3. Justificación

Los desperdicios de camarón producidos tras la extracción de la parte comestible son responsables de un impacto ambiental negativo por lo cual, en los últimos años, se han estudiado nuevos métodos para la obtención de quitina y su copolímero el quitosano a partir del desperdicio de camarón, para así disminuir su impacto en la contaminación. Debido a la amplia área de aplicaciones que estos biopolímeros representan es que se tiene especial interés en las características específicas que requieren como lo son el grado de purificación, PM, DA y PA.

Ha sido reportado que la producción de AL durante las FAL genera una mayor purificación de la fracción mineral, así mismo debido a los procesos de desproteización y desmineralización en las FAL los carotenoides presentes en el desperdicio de camarón son conservados, permitiendo un alto porcentaje de recuperación (Cira y col., 2002). Una mayor purificación de quitinas disminuye el uso de soluciones ácidas o básicas en los pasos posteriores de purificación lo que reduce la carga ambiental.

Se conoce que el origen y el método de extracción de estos polímeros afecta significativamente sus propiedades, se ha reportado que la quitina obtenida por FAL posee características estructurales, I_{CR} y PM diferentes a aquellas extraídas químicamente (Pacheco y col., 2011).

Sin embargo, en la literatura se han reportado distintos porcentajes de remoción de minerales y proteínas mediante cultivos con diferentes especies de *Lactobacillus* como alternativas para mejorar la eficiencia en FAL. Por tales motivos, en esta tesis se propuso identificar el efecto del tipo de metabolismo de BAL en su uso como cultivo iniciadores de FAL para la recuperación de quitina.

4. Hipótesis

El metabolismo de BAL para la producción de quitina afectará significativamente la fermentación y en consecuencia la desmineralización del desperdicio de camarón para la purificación biológica de quitina y la producción de quitosanos.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Estudiar el efecto del tipo de metabolismo de BAL en la extracción biológica de desperdicios de camarón para la producción de quitina y posterior desacetilación a quitosano.

5.2 Objetivos específicos

- Obtener quitinas mediante extracción biológica empleando BAL hetero y homofermentativa.
- Obtener quitosano mediante desacetilación heterogénea y homogénea.
- Caracterización de los productos obtenidos.

6. Metodología

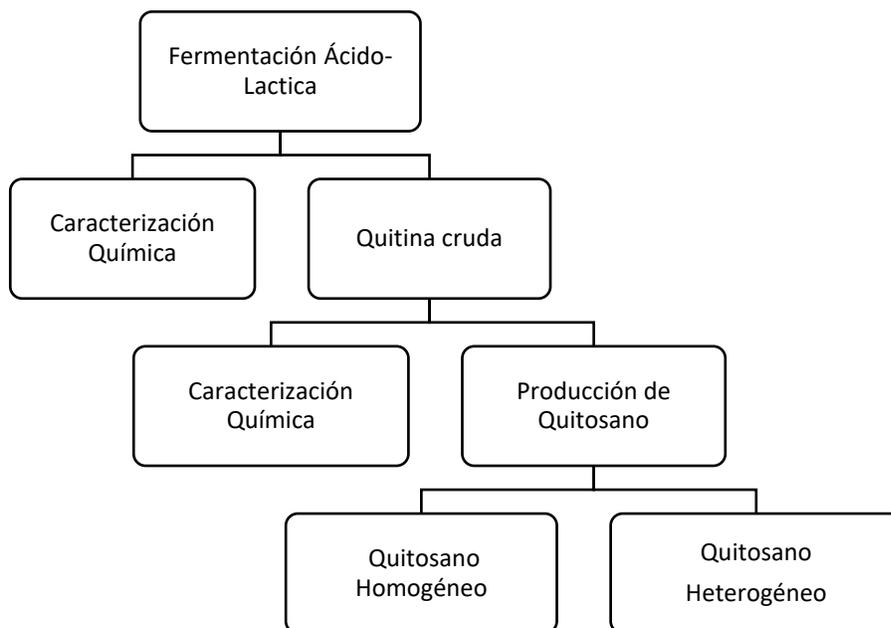


Fig. 5: Mapa sintético de etapas experimentales en el desarrollo del trabajo experimental.

6.1 Obtención de quitina biológica

La quitina fue obtenida mediante un proceso químico-biológico mediante fermentación ácido-láctica de desperdicios de camarón de *Litopenaeus vannamei*. El desperdicio de camarón fue donado del restaurante de mariscos “El Rio de Caracoles” en Ecatepec, Edo. De México. *L. plantarum* y *L. brevis* fueron cultivados en medio de cultivo Man, Rogosa y Sharpe (MRS) a 30°C por 24 h hasta un recuento de 10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC \cdot mL⁻¹). El desperdicio fue molido en un molino de carne (Torrey 32-3) con tamaño de partícula de 5 mm. Posteriormente, fueron colocados en un reactor con 10% (p/p) de sacarosa y 5% (p/v) de inóculo de *L. plantarum* o *L. brevis* durante 144 h a 30 °C (Shirai y col., 2001; Cira y col. 2002; Pacheco y col., 2009, 2011; Hernández V. y col., 2014).

6.1.1 FAL escala 4.5 kg

Se llevó a cabo FAL de 4.5 kg de desperdicios de camarón (FAL-2) con inóculo de *Lactobacillus plantarum* del 5% (p/v) y 10% (p/p) de sacarosa como fuente de carbono durante 144 h. Como sistema de fermentación se utilizó un garrafón con capacidad nominal de 15 L, adaptado a una purga de CO₂ conectada a un recipiente con agua

(Fig.6) monitoreando el pH con un electrodo (HANNA instruments), el fermentador se colocó dentro de una estufa a 30 °C.

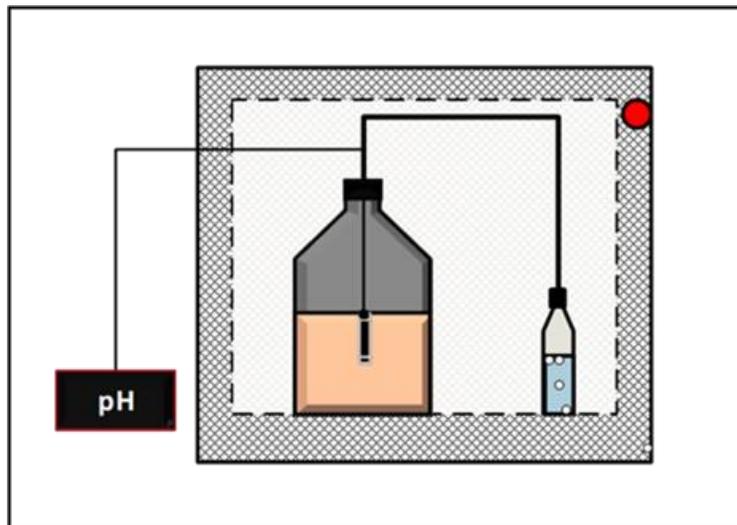


Fig. 6. Sistema de fermentación 5 L conectado a una purga de CO₂, a 25°C.

6.1.2 FAL escala 25 kg

Se realizaron FAL de 25 kg de desperdicio de camarón con inóculos del 5% (p/v) de *L. plantarum* y *L. brevis* (FAL-1 y FAL-3 respectivamente) y 10% (p/p) de sacarosa en un biorreactor con capacidad nominal de 70 L (Fig. 7B) utilizando aproximadamente 75 % del volumen con desperdicio de camarón, fue monitoreado la temperatura y pH durante todo el proceso.

Para el cultivo con *L. brevis* (FAL-1) se adaptó un sensor de OD (oxígeno disuelto) (Applikon, Holanda) en la botella con agua del sistema de purga de CO₂ que fue conectada al biorreactor (Fig. 7A), el agua se mantuvo a 26°C. Esta modificación se realizó para monitorear el O₂ desplazado en la botella de la purga, como parámetro indirecto de la producción de CO₂ en la fermentación. La botella con agua se llevó a la saturación de oxígeno cada 24 h, el cambio de OD (Δ OD) fue calculado según la siguiente ecuación 1.

$$\Delta \text{OD}\% = (C^* - C_L) \quad (1)$$

Donde: C* representa el % OD en la saturación y C_L el %OD a cualquier tiempo (García-Ochoa y col., 2009)



Fig. 7. A) Sistema de fermentación conectado a una purga de CO₂ con sensor de OD a 25°C y B) biorreactor de 70 L.

El resultado de las fermentaciones fue una fracción sólida que contenía la quitina cruda y una fracción líquida (licor) con un alto contenido de proteína, minerales y pigmentos (Shirai y col., 2001; Cira y col. 2002; Pacheco y col. 2009, 2011). La quitina cruda fue secada en una estufa a 40°C durante 24 h.

6.1.3 Cuenta de microorganismos

Para la determinación de microorganismos viables en las muestras se llevó a cabo mediante la técnica de cuenta en placa en medio agar MRS. Se realizaron diluciones seriadas de la muestra de FAL en solución salina isotónica, posteriormente se inoculó 0.1 mL de las diluciones en una caja Petri que contenía el medio de cultivo; las cajas fueron incubadas a 30°C durante 24 h y fueron contadas las unidades formadoras de colonia (UFC) (FDA., 2003).

6.1.4 Purificación de quitina

La quitina cruda debido a la presencia de una fracción mineral se sometió a un proceso de desmineralización empleando HCl (0.4 M) en relación 1g quitina/15mL de HCl durante 1 h, bajo agitación magnética a condiciones de temperatura ambiente (25°C). El producto obtenido fue lavado hasta la neutralidad con agua purificada, posteriormente se dejó secar a 40°C durante 24 h (Cira y col., 2002).

6.2 Producción de quitosanos (desacetilación de quitina)

6.2.1 Método químico heterogéneo

La producción de quitosano por método termoquímico-heterogéneo se llevó a cabo mediante la desacetilación de quitina por hidrólisis alcalina de los grupos acetamida del C-2. La quitina obtenida de FAL se desacetiló con solución de NaOH al 50% (p/v) en una relación 1g quitina/15mL NaOH en un reactor agitado enchaquetado a 100°C por 2 h (Pacheco y col., 2010).

6.2.2 Método químico homogéneo

En este caso la desacetilación de quitina consistió en una hidrólisis alcalina para hacer reaccionar el grupo acetilo. Las quitinas fueron desacetiladas con una solución de NaOH 50% (p/v) en relación 1g quitina/15 ml de solución de NaOH en un reactor agitado a temperatura ambiente por 4 días (Pacheco y col., 2010).

Los quitosanos obtenidos mediante desacetilación homogénea y heterogénea fueron neutralizados mediante lavados con agua y posteriormente secados a 40°C durante 24 h (Rocha- Pino y col., 2008).

6.3 Caracterización de los productos obtenidos

6.3.1 Acidez total titulable y pH

Para la determinación de acidez total titulable (ATT) el licor de FAL fue diluido en agua destilada en proporción 1:10, realizando titulaciones con hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N hasta llegar a pH 8, expresando el resultado como mmol de ácido láctico por gramo de desperdicio mediante la ecuación 2.

$$ATT\% = \frac{(ml NaOH)(N NaOH)}{Peso de muestra} \times 100 \quad (2)$$

6.3.2 Determinación de humedad

Se determinó la cantidad de agua contenida en las muestras por gravimetría. Se llevó a peso constante un crisol de porcelana en una estufa a 95 °C, posteriormente se pesaron 2

g de muestra en el crisol, esta se llevó nuevamente a peso constante en una estufa a 95 °C durante 24 h, registrando el peso y calculando el % de humedad (% H) conforme a la ecuación 3 (AOAC, 1999).

$$\% H = \left(\frac{X_3 - X_1}{X_2} \right) \times 100 \quad (3)$$

Donde:

X_1 = peso constante del crisol (g)

X_2 = peso de la muestra (g).

X_3 = peso constante del crisol con la muestra (g).

6.3.3 Determinación de cenizas

Para cuantificar la fracción mineral total, las muestras se llevaron a peso constante en un crisol de porcelana en una estufa a 100°C. Fueron pesados 2 g de muestra en el crisol, se sometieron a un proceso de calcinación durante 5 h en mufla a 560°C, el crisol fue enfriado en un desecador, se registró el peso y se determinó el porcentaje de cenizas (%C) mediante la ecuación 4 (AOAC, 1999)

$$\% C = \left[\frac{(\text{peso crisol con cenizas} - \text{peso crisol})}{\text{peso muestra}} \right] * 100 \quad (4)$$

6.3.4 Determinación de peso molecular (PM)

El PM promedio de los productos obtenidos se determinó indirectamente por medio de su viscosidad intrínseca (M_v).

Para el quitosano, éste fue disuelto a diferentes concentraciones en ácido acético 2% /acetato de sodio 0.2M. La M_v fue determinada mediante un viscosímetro tipo Oswald sumergido en agua a temperatura ambiente (25°C), el PM se calculó mediante la ecuación de Mark–Houwink-Sakurada (ecuación 5) donde $K = 1.38 \times 10^{-5}$ L/g y $a = 0.85$ para el quitosano (Kjoniksen y col., 1997; Hernández V y col., 2014; Pacheco y col., 2010).

$$\eta = KM_w^a \quad (5)$$

Donde:

Mv = peso molecular viscosimétrico

K y a = constantes asociadas a la configuración del polímero y las condiciones del disolvente respectivamente.

En el caso de la quitina, ésta fue disuelta a diferentes concentraciones en una solución de dimetilacetoforformamida/cloruro de litio (DMAC/LiCl) al 5%. Fue calculado el PM mediante la ecuación 5 usando valores de $K= 2.4 \times 10^{-4}$ L/g y $a= 0.69$ (Pacheco y col., 2010; Aranday y col., 2017).

6.3.5 Azúcares totales

Esta técnica se basó en el principio de que todos los azúcares pueden ser deshidratados mediante la adición de ácido sulfúrico formando furfurales, estos en presencia de fenoles son condensados generando compuestos de color naranja. Se adicionó por cada 1 mL de muestra 1 mL de fenol al 5% (p/v), la mezcla fue agitada durante 30 seg, posteriormente se adicionaron 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, la mezcla se agitó durante 30 seg y se dejó reposar por 10 min para determinar ABS (absorbancia) en un espectrofotómetro (Thermo Scientific, Genesys 6) a 490 nm (Dubois y col., 1956). Se realizó una curva estándar de sacarosa grado reactivo (anexo 1).

6.3.6 Astaxantina total

Para la cuantificación de astaxantina, la quitina cruda fue sometida a un proceso de despigmentación según lo reportado por Gimeno y col., (2007), utilizando acetona grado HPLC. El solvente resultante fue leído en un espectrofotómetro (Thermo Scientific, Genesys 6) a una longitud de onda de 470 nm para determinar ABS. Fue realizada una curva patrona partir de un estándar de astaxantina(anexo 2) (Sigma, 98% de pureza).

6.4 Ajuste al modelo no lineal de Gompertz.

La cinética de acidificación en las FAL es uno de los parámetros más importantes además de ser un indicador de la eficiencia de ésta. El modelo de Gompertz (Tjørve y col., 2017) es utilizado en biología, zoología, ecología y botánica para describir el crecimiento de plantas, árboles, m.o., animales y seres humanos, sin embargo, también ha sido utilizada en el modelamiento de cinéticas de acidificación en FAL (Saucedo- Castañeda y col., 1989; Cira y col., 2000), modelando un comportamiento sigmoideal, es decir que incrementa su tasa de cambio hasta llegar a un punto de inflexión, punto a partir del cual la tasa de cambio decrece hasta aproximarse asintóticamente a un valor final (Cira y col., 2000; Pacheco y col., 2010).

Para evaluar el efecto del tipo de metabolismo de BAL sobre la eficiencia de acidificación en el cultivo se ajustó el modelo de Gompertz es su forma integrada (ecuación 6).

$$P = P_{\max} \text{Exp}[-b \text{Exp}^{(-K t)}] \quad (6)$$

En donde P representa el producto (AL o pH), P_{\max} representa la tasa máxima de concentración de producto (P_{\min} en el caso de los datos de pH) al tiempo $t \rightarrow \infty$, b es una constante relacionada con las condiciones iniciales, K es la constante de acidificación y t el tiempo. Estos parámetros fueron evaluados usando el programa STATISTICA (Statsoft. Inc.). La tasa máxima de producción (V_{\max}) fue calculada de acuerdo con la ecuación 7 (Cira y col., 2002).

$$V_{\max} = 0.368 K P_{\max} \quad (7)$$

7. Resultados y discusión

7.1 FAL 4.5 kg

Se determinaron pH y ATT durante el proceso (Fig. 8) los datos experimentales fueron ajustados al modelo de Gompertz con una $R^2 \geq 0.90$, con parámetros de pH estimados de P_{\min} y tasa de disminución de pH (k) 4.076 y 0.053 h^{-1} respectivamente (Tabla 2), en este cultivo se observó un importante descenso de pH de 7.40 al inicio del cultivo a 4.30 transcurridas 48 h por lo que se infiere que en esta etapa se produjo una mayor cantidad de AL; al final del cultivo se obtuvo un pH de 4.02; valores de pH que son menores a los previamente reportados (Pacheco y col., 2010) esto puede ser debido a que se utilizó como fermentador un garrafón de 15 L adaptado a una purga de CO_2 que fue conectada a un recipiente con agua, este sistema permitió la liberación de CO_2 sin entrada de aire al sistema manteniendo así condiciones anaerobias y favoreciendo el crecimiento bacteriano y la acidificación del cultivo (Fig. 6). Se cuantificó la ATT del sólido y licor al final del proceso, obteniendo valores de 0.15 ± 0.01 y 0.45 ± 0.02 mmol AL g^{-1} respectivamente, los valores de pH para las mismas fracciones fueron determinadas en 5.9 ± 0.02 y 4.4 ± 0.05 de pH. Por otro lado, el cambio en el pH del licor se debe a que durante la FAL se lleva a cabo el proceso de desproteización, por lo cual las proteínas y las sales de calcio removidas se encuentran solubilizadas en el licor generando propiedades amortiguadoras y con ello un aumento del valor de pH (Cira y col.,2002).

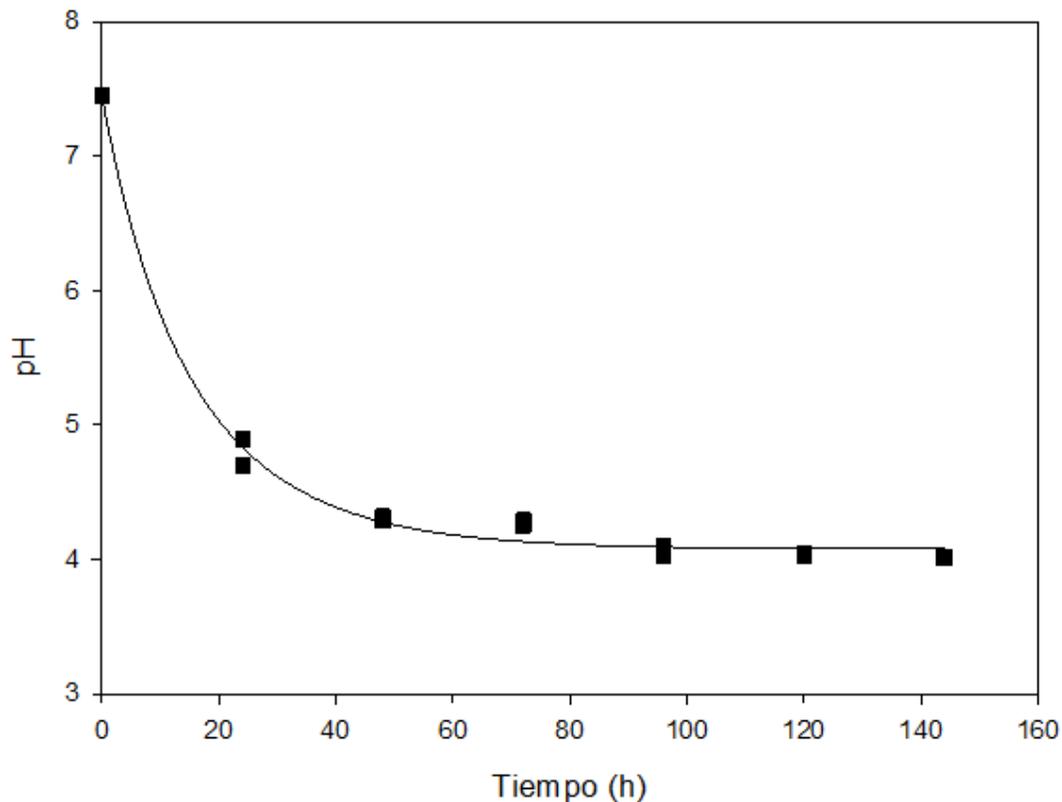


Fig. 8. Perfil de pH ajustado al modelo de Gompertz para el cultivo FAL-2 de *L. plantarum* a 30°C en una escala de 4.5 kg, realizando determinaciones cada 24 h.

7.2 FAL 25 kg

Posteriormente se llevó a una escala de 25 kg de desperdicio de camarón con *L. plantarum* (FAL-3) y *L. brevis* (FAL-1) durante 144 h en un reactor de 70 L, tomando alícuotas cada 24h para realizar análisis de microorganismos viables, ATT, pH y azúcares totales; el porcentaje de inóculo y azúcar fue conservado en todas las fermentaciones.

7.2.1 pH y ATT.

El pH inicial de los cultivos se encontró alrededor 7.5 ± 0.21 . Se realizó un ajuste de los datos al modelo no-lineal de Gompertz ($R^2 \geq 0.90$), en donde ambos cultivos presentan un comportamiento decreciente de pH, para el cultivo con *L. plantarum* se obtuvo una menor tasa de disminución de pH (K) en comparación con *L. brevis* 0.023 y 0.052 h^{-1} respectivamente, con un valor de P_{\min} 1.26 veces más pequeño que con *L. brevis*, esto indica que *L. plantarum* permite una mayor acidez del medio a pesar de disminuir más

lento el pH (Tabla 2). Este comportamiento es importante debido a que mayor acidez del medio inhibe otros m.o. presentes en el desperdicio de camarón generando como microbiota predominante a las BAL, comportamiento similar ha sido reportado en la literatura donde la disminución de coliformes en los cultivos es debida a la presencia de BAL que al generar AL consecuentemente disminuyen el pH del medio (Pacheco y col., 2010; Aranday y col., 2017).

El pH final no fue significativamente diferente, como se mencionó anteriormente esto puede ser debido a la cantidad de proteínas en el desperdicio que lograron ser solubilizadas en el licor, lo que podría presentar propiedades amortiguadoras y generar un valor de pH mayor en los cultivos, sin embargo, el pH fue menor para *L. plantarum* en comparación *L. brevis* (Fig. 9). Estos resultados coinciden con lo previamente reportado por Pacheco y col., (2011) donde el uso de *L. plantarum* con metabolismo homofermentativo logró disminuir el pH del cultivo hasta 4.2 obteniendo valores inferiores de pH a los reportados por Aranday y col., (2017) con el uso de *L. brevis* como iniciador en la FAL, en donde se obtuvo un valor final de pH de 4.48, logrando disminuir este valor mediante la inoculación sucesiva de *L. brevis* y *Rhizopus oligosporus*.

Tabla 2. Parámetros P_{\min} , b , K y R del ajuste de Gompertz a los datos de pH de todos los cultivos.

	Fermentación	P_{\min}	b	$K (h^{-1})$	R^2	$V_{\max} (h^{-1})$	pH 144 h
pH	FAL-3	3.908	-0.660	0.023	0.908	0.033	4.22
	FAL-1	4.961	-0.456	0.052	0.969	0.093	4.81
	FAL-2	4.076	-0.602	0.053	0.998	0.995	4.02

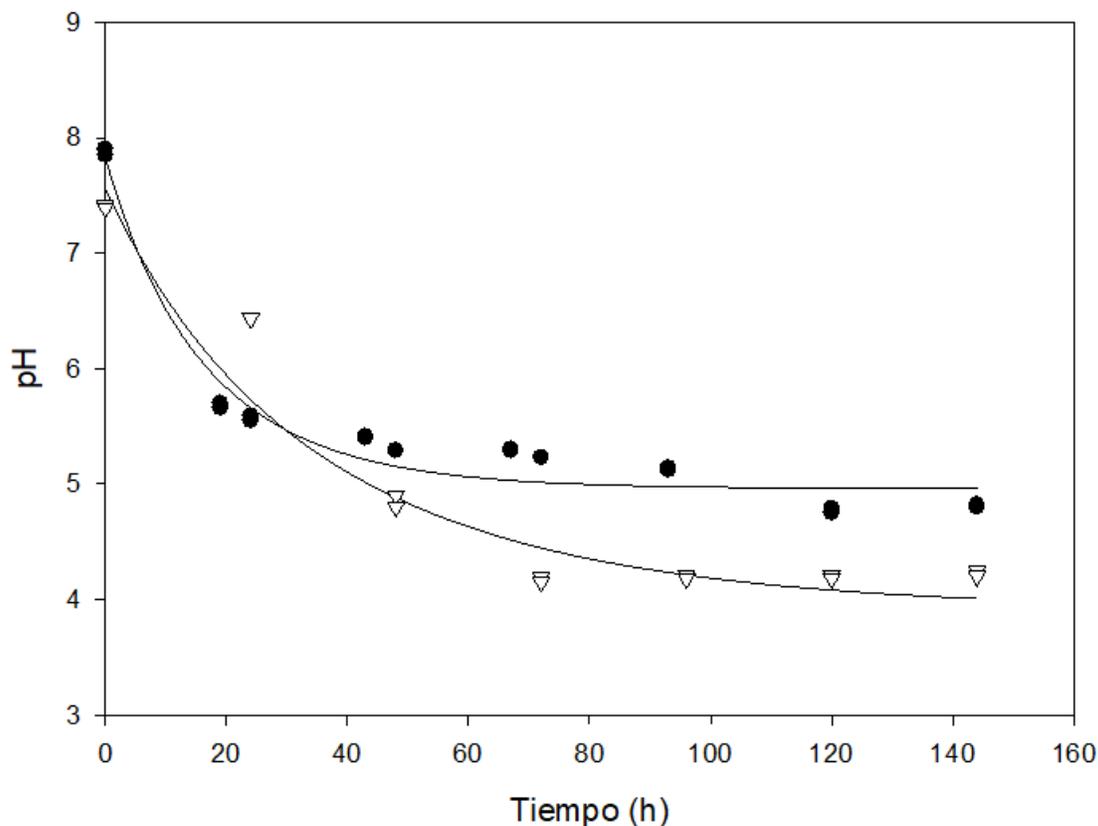


Fig. 9. Ajustes al modelo de Gompertz de los datos de pH en los cultivos de FAL de *L. plantarum* (∇) y *L. brevis* (\bullet), a 30°C realizando determinaciones cada 24h.

Se determinó la cantidad de AL obtenida durante el proceso por medio de ATT del desperdicio, la disminución del pH generado por la producción AL permite que una mayor cantidad de CaCO_3 reaccione produciendo lactato de calcio, que se ve traducido en una mejor purificación de la quitina resultante. El cultivo con *L. plantarum* produjo 3.19 veces más AL que *L. brevis* con valores de P_{max} de 0.438 y 0.137 mmol AL g^{-1} y una tasa máxima de producción (V_{max}) 1.6 veces más grande (Tabla 3), esto indica que *L. plantarum* permite una mayor y más rápida producción de AL durante la FAL.

L. plantarum presentó un aumento en la producción de AL de $0.02 \pm 0.007 \text{ mmol AL g}^{-1}$ a las 24 h hasta $0.415 \pm 0.07 \text{ mmol AL g}^{-1}$ transcurridas 72 h, seguido de una fase estacionaria hasta las 120 h e incrementó la producción al final del proceso con 0.47 mmol AL g^{-1} (Fig.10), este comportamiento puede ser debido a que *L. plantarum* es una

BAL homofermentativa, este tipo de metabolismo produce más del 85% de ácido láctico a partir de glucosa, en contraste las BAL heterofermentativas como *L. brevis* que producen solamente 50% de ácido láctico (Zúñiga y col., 1993).

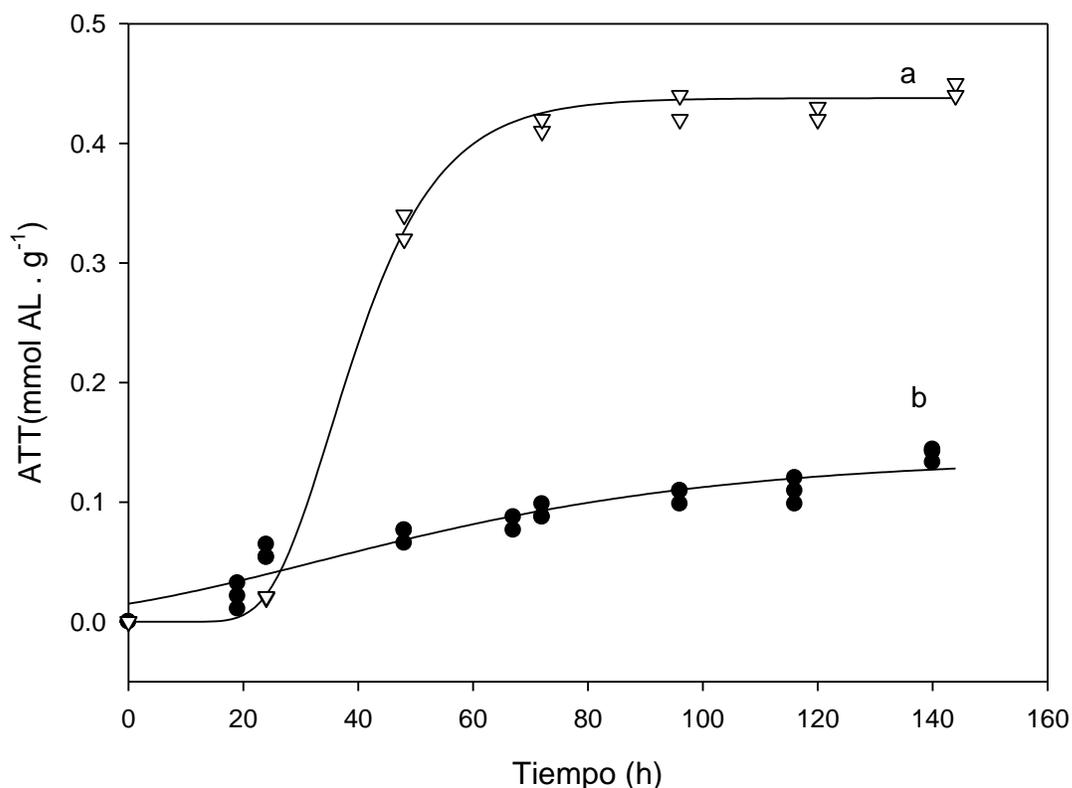


Fig. 10. Perfil de acidez total titulable y su ajuste al modelo de Gompertz para los cultivos de *L. plantarum* (∇) y *L. brevis* (\bullet) expresada como mmol de ácido láctico por g de desperdicio durante 144 h a 30 °C en una escala de 25 kg. Letras distintas indican diferencia significativa entre los tratamientos mediante comparación múltiple de medias Tukey Kramer ($p < 0.05$).

Tabla 3. Parámetros P_{max} , b , K y R del ajuste de Gompertz a los datos de ATT de todos los cultivos

	Fermentación	P_{max} (mmol AL g ⁻¹)	b	K (h ⁻¹)	R^2	V_{max} (mmol AL g ⁻¹ h ⁻¹)	ATT 144 h (mmol AL g ⁻¹)
ATT	FAL-3	0.438	30.038	0.097	0.993	0.016	0.47
	FAL-1	0.137	2.211	0.024	0.921	0.001	0.153

L. plantarum ha sido reportado como homofermentativo facultativo (Delgadillo y col., 1994) teniendo la capacidad de metabolizar los azúcares por ambas vías (EMP y fosfoacetolasa), en presencia de altas concentraciones de glucosa como lo es el caso de las primeras 72 h donde la cantidad de glucosa es significativamente mayor ($p > 0.05$, Fig. 12) toda su producción se centra en ácido láctico durante el cual teóricamente se origina a partir de un mol de glucosa, dos moles de lactato, sin embargo al disminuir la cantidad de azúcar disponible en el medio cambia su metabolismo a heterofermentativo produciendo además de ácido láctico, CO_2 y etanol o ácido acético en proporción equimolar, de esta manera continúa fermentativamente activo aun en condiciones limitantes de azúcares.

Una de las características más notables de *L. brevis* es la alta producción de gas (CO_2), se determinó el porcentaje de oxígeno disuelto (OD) como parámetro indirecto de producción de CO_2 , el CO_2 al ser más soluble en agua desplazó el OD es decir, entre más oxígeno fue desplazado en la purga del fermentador mayor fue la producción de CO_2 en el sistema.

Durante las 144 h la cantidad de oxígeno desplazado fue $< 90\%$ permitiendo corroborar que *L. brevis* tiene un metabolismo heterofermentativo. Se determinó que durante las primeras 48 h fue desplazado la mayor cantidad de O_2 , indicando que en este periodo se encontró la etapa fermentativamente más activa (Fig. 11), este comportamiento concuerda con el perfil de acidez para el mismo cultivo. Entre las 72 a 96 h se registraron los menores desplazamientos de O_2 , en esta etapa también se reportó un menor número de BAL.

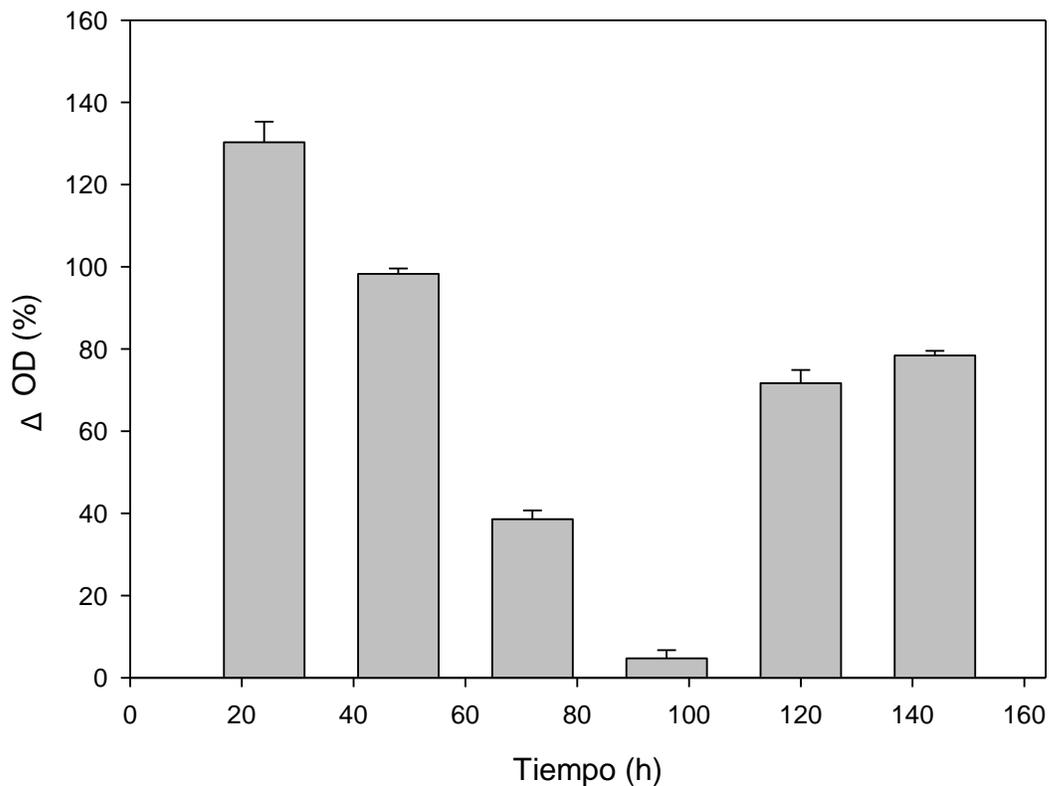


Fig. 11. Disminución de OD en la purga con agua conectada al biorreactor con *L. brevis* (5%) y desperdicio de camarón adicionado con 10 % de sacarosa .

7.2.2 Crecimiento celular y azúcares totales.

Se cuantificó la cantidad de microorganismos viables en el cultivo mediante conteo en placa, para *L. plantarum* durante las primeras 72 h presentó un aumento en el número de m.o., seguido de una fase estacionaria hasta las 120 h (Fig. 12) , esto puede deberse a una inhibición por productos, en donde la disociación de una parte del AL genera iones hidrogeno que inhibe a los m.o. fermentativos, sin embargo, permite aun una ligera producción de biomasa para que esta permanezca constante; comportamientos similares han sido reportados en la literatura donde la producción de AL por largos periodos de tiempo causan inhibición de los m.o. fermentativos (Shirai y col., 1999; Cira y col., 2002).

Para el cultivo de *L.brevis* se observó un importante incremento en el número de microorganismo de 1.0×10^7 UFC mL⁻¹ a 7.0×10^7 durante las primeras 48 h este punto coincide con la disminución de azúcares disponibles en el medio, a partir de este punto se

registró una disminución en el número de m.o. hasta las 72 h dicho cambio puede ser atribuido a la baja producción de AL que podría no inhibir por completo otros m.o. presentes en el cefalotórax de camarón, compitiendo con las BAL dentro del cultivo, el incremento en la temperatura hasta los 38 °C durante las 96 h promovió el crecimiento de las BAL y su consecuente producción de AL (ATT) (Fig. 14B).

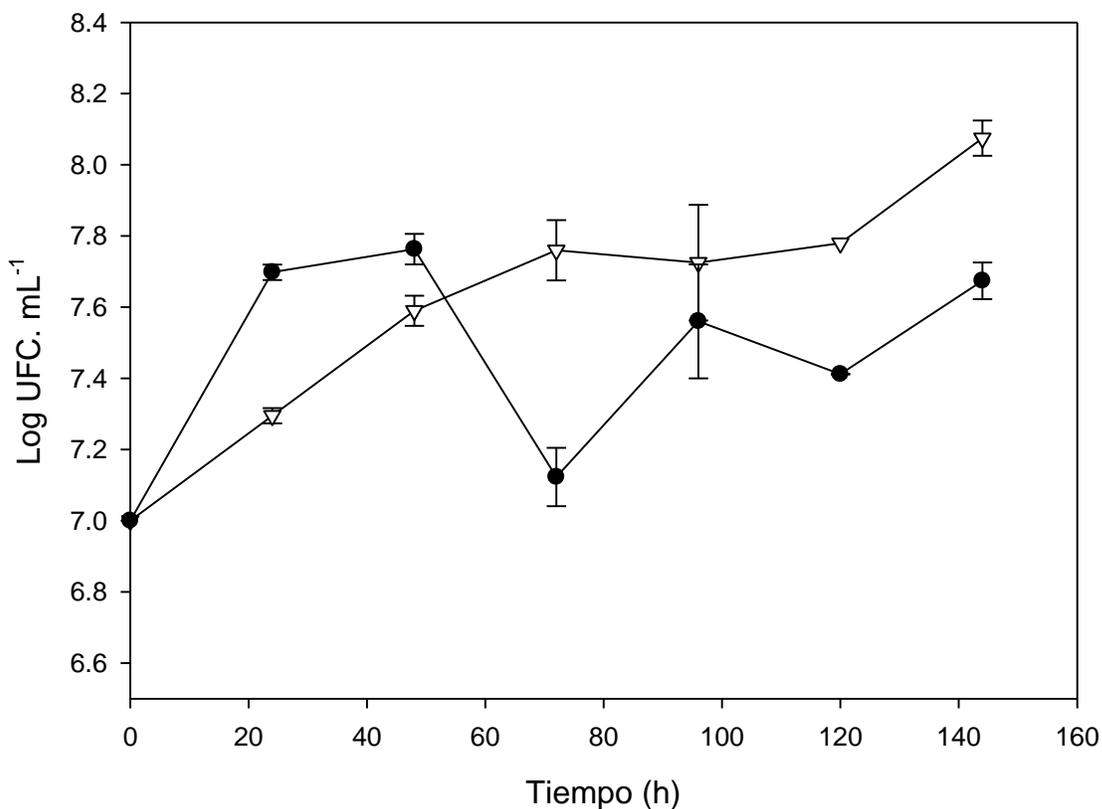


Fig. 12. Crecimiento de *L. plantarum* (▽) y *L. brevis* (●) en las muestras obtenidas durante 144 h de cultivo a 30°C.

Fueron cuantificados los azúcares totales durante el cultivo por medio de la técnica descrita por Dubois y col. (1951) (Fig. 13), para el cultivo con *L. plantarum* se observó un creciente consumo hasta las 72 h, posteriormente el cambio fue disminuyendo hasta el final del cultivo, este punto concuerda con el crecimiento de dicha bacteria donde a partir de las 72 h se observa una evidente fase estacionaria, con una concentración mínima de sacarosa de 10.97 ± 1.27 mg g⁻¹ obtenidas a las 144 h etapa con el máximo número de BAL registrado (1.20×10^8 UFC mL⁻¹). En contraste con *L. brevis* donde se observó un cambio significativo ($p < 0.05$) en el consumo de azúcares durante las primeras 48 h en

este punto también se presenta el mayor número de BAL por lo que el requerimiento energético fue más alto en este punto. Al final de los cultivos se observó una diferencia significativa en la concentración de azúcar residual en el cultivo, siendo mayor para el cultivo con *L. brevis*.

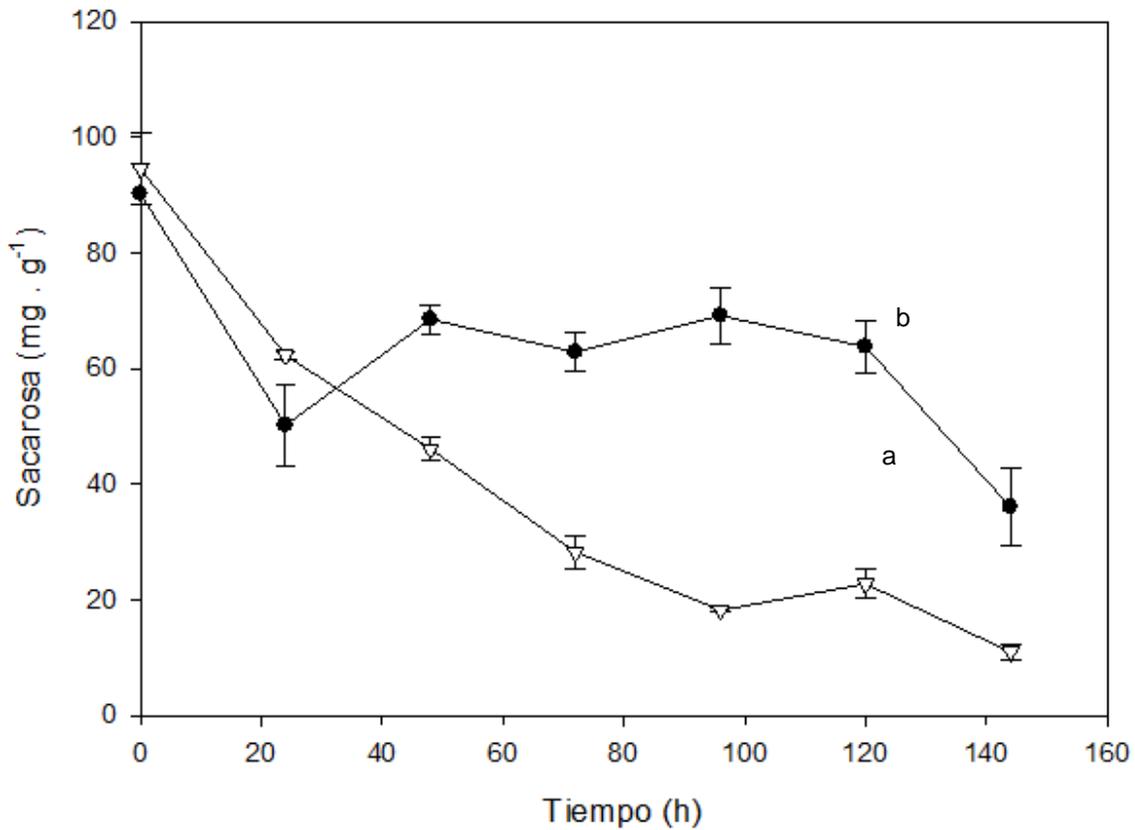


Fig. 13. Porcentaje de consumo de azúcar en cultivos de *L. plantarum* (▽) y *L. brevis* (●) durante 144 a 30 °C, letras distintas indican diferencia significativa entre los tratamientos mediante comparación múltiple de medias Tukey Kramer ($p < 0.05$).

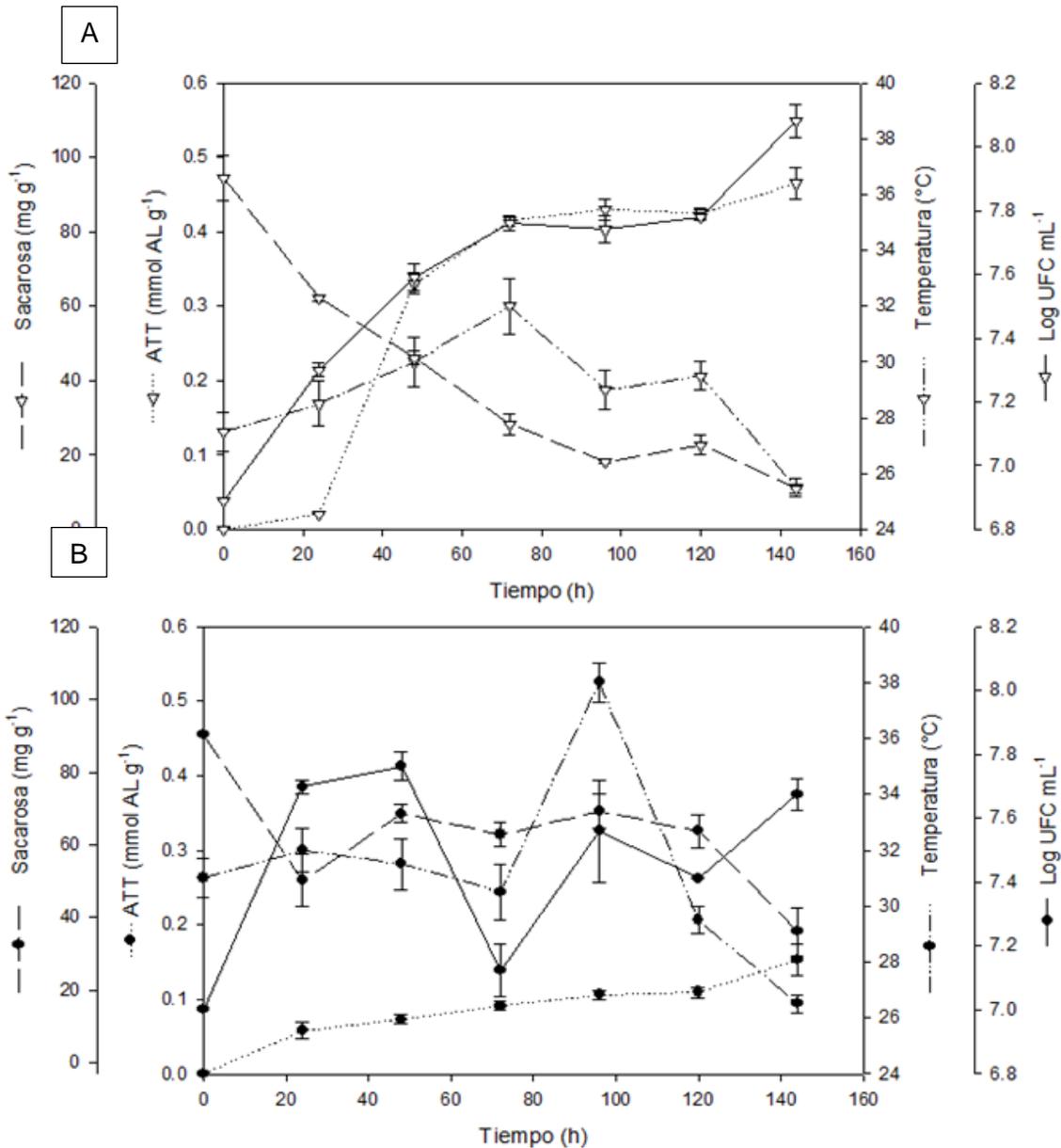


Fig. 14. Perfil de acidez, temperatura, crecimiento bacteriano y azúcar disponible durante 144 h del cultivo con *L. plantarum* (∇) y *L. brevis* (\bullet) a una escala de 25 Kg.

7.3 Caracterización de quitina y quitosano

Se realizó la caracterización de los polímeros obtenidos mediante parámetros de % de ceniza, % de humedad y color como indicadores de la pureza de los materiales, además de la determinación de PM y contenido de solubles.

7.3.1 Color

Se determinó el sistema de color CIELAB con un colorímetro Konica Minolta (CR-200) como indicador de la presencia de pigmentos en las quitinas (Fig. 15).

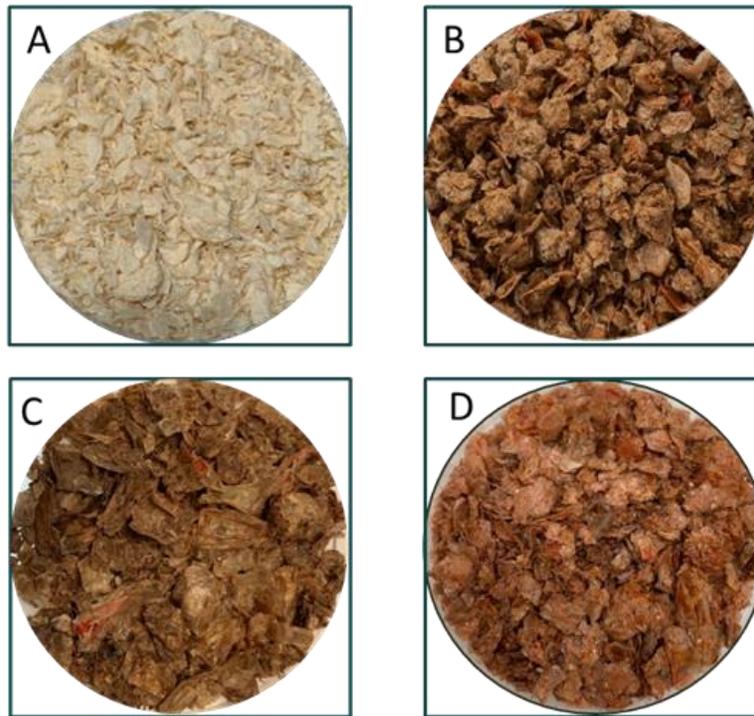


Fig. 15. Quitina química Sigma C9213 (A) y biológicas obtenidas de FAL-1(B), FAL-2 (C) y FAL-3 (D).

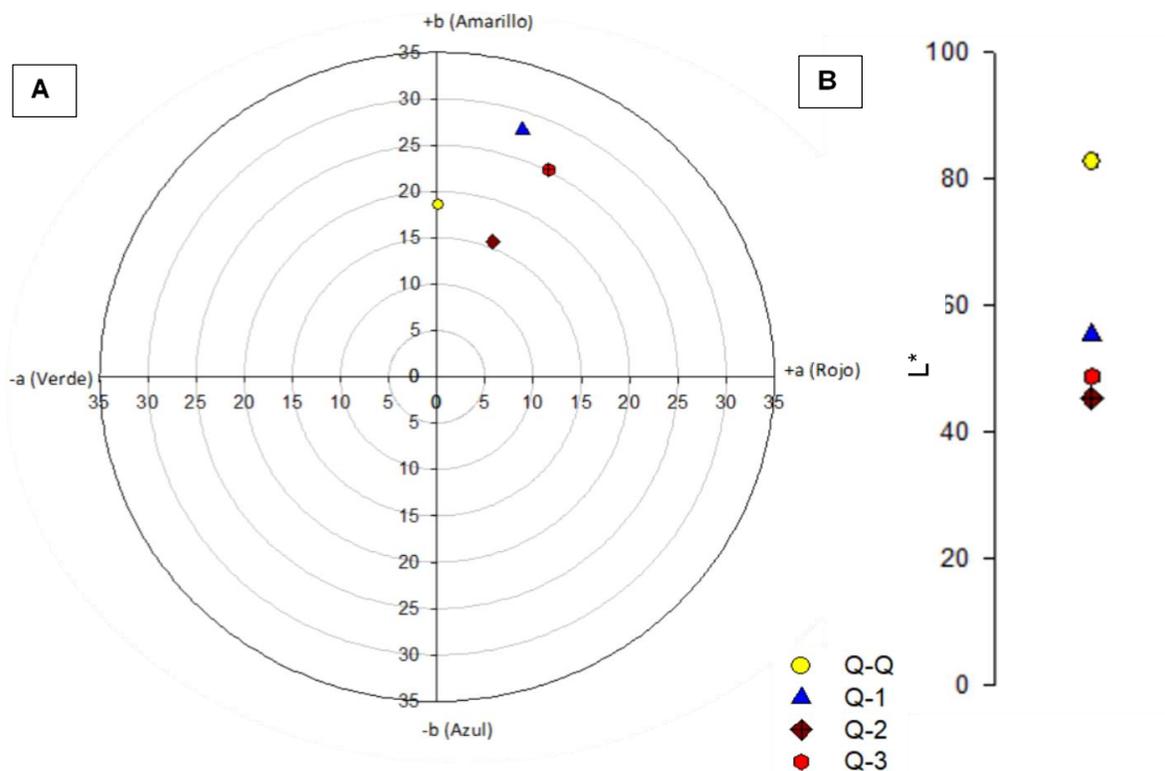


Fig. 16. Parámetros de color L*(A) a* y b* (B) de Q-Q (●), Q-1 (▲), Q-2 (◆) y Q-3 (◇)

La luminosidad (L*) fue significativamente diferente en todas las quitinas, con una media mayor para Q-Q (82.67 ± 1.82) esto indica que emite más luz en comparación con el resto de las quitinas (Fig. 16B) este fenómeno puede ser atribuido a la presencia de una

fracción mineral en las muestras. En cuanto al parámetro a^* que describe la gama de color verde-rojo, la prueba dio evidencia significativa ($p < 0.05$) que las quitinas biológicas presentan una tonalidad más roja en comparación con Q-Q, esto se atribuye a la presencia conservada de carotenoides favorecida por FAL. Entre las quitinas biológicas Q-3 presentó mayor valor de a^* , que Q-1 y Q-2, esto puede ser debido a la presencia de mayor porcentaje de lípidos provocando una oxidación de los carotenoides (Guillou y col., 1995; Cira y col., 2002). Para la gama cromática azul-amarillo (b^*) todas las muestras fueron significativamente diferentes entre sí, Q-1 presentó tonalidades más amarillas (Fig. 16A).

La cuantificación de astaxantina por espectrofotometría confirmó que la muestra Q-3 contiene una mayor cantidad de astaxantina ($3.40 \mu\text{g mL}^{-1} \pm 0.02$) en comparación con las quitina Q-2 y Q-1 (Fig.17) demostrando un efecto de la producción de ácido láctico en la conservación de estos pigmentos durante la FAL favorecida por el metabolismo de las BAL. Sin embargo, como se había mencionado anteriormente Q-2 presentó la menor concentración de astaxantina, esto se adjudica a un procesos de oxidación debido a la luz en el momento de almacenar la muestra.

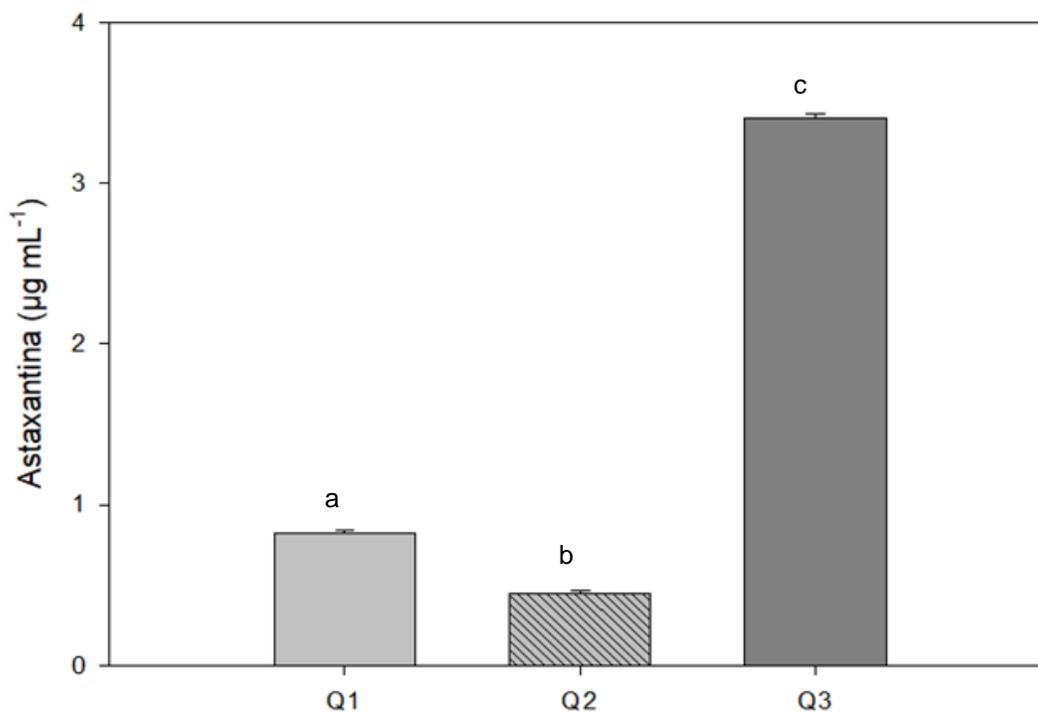


Fig. 17. Cuantificación de astaxantina en las muestras de quitinas biológicas obtenidas por FAL letras distintas indican diferencia significativa entre los tratamientos mediante comparación múltiple de medias Tukey Kramer ($p < 0.05$).

Para facilitar la lectura en la siguiente tabla se registran el código de nomenclatura para los productos obtenidos. Los productos obtenidos de FAL de *L. plantarum* y *L. brevis* fueron desmineralizados según el método descrito por Cira y col. (2001) y posteriormente desacetilados por método químico homogéneo y químico heterogéneo (Tabla 4) con NaOH.

Tabla 4. Nomenclatura de muestras y método de obtención de quitinas y quitosanos

Quitinas		Quitosanos	
Q-1	Quitina de cultivo con <i>L. brevis</i>	QH-E1	Quitosano Heterogéneo
		QH-O1	Quitosano Homogéneo
Q-2	Quitina de cultivo con <i>L. plantarum</i> (4.5 Kg)	QH-E2	Quitosano Heterogéneo
		QH-O2	Quitosano Homogéneo
Q-3	Quitina de cultivo con <i>L. plantarum</i> (25 Kg)		
Q-Q	Quitina química	QH-Q	Quitosano Químico

7.3.2 Caracterización químico-proximal

El porcentaje de ceniza representa la fracción mineral total contenida en la muestra, para el caso de las quitinas, aquellas obtenidas de FAL con *L. plantarum* denotadas como Q-2 y Q-3 presentaron los menores porcentajes de cenizas (14.45 ± 0.5 y 15.52 ± 0.15 % respectivamente) (Tabla 5) en comparación con Q-1 obtenida del cultivo con *L. brevis*, lo que reafirma que entre mayor sea la producción de AL mayor purificación del contenido mineral en el producto, en el caso particular de Q-Q debido a que la obtención de quitina industrialmente se da por procesos de químicos de desmineralización y desproteínización es que se obtiene un contenido de cenizas tan bajo, estos procesos son muy agresivos debido a que se llevan a cabo bajo concentraciones altas de ácidos y álcalis eliminado los pigmentos, proteínas y cenizas presentes en el desperdicio. A partir de estos datos se calculó el porcentaje de desmineralización siendo mayor para los casos de quitina obtenida con *L. plantarum*, sin embargo, este porcentaje es relativo debido a que no se logró cuantificar el porcentaje de proteínas y grasas, por lo que para este cálculo se consideran en el peso de la muestra. Las quitinas biológicas presentaron un mayor PM en comparación con la quitina comercial, con valores similares a los reportados por Pacheco y col., (2011), confirmando que el uso de FAL permite preservar el PM de la quitina teniendo ventaja sobre sus futuras aplicaciones. Como en su posterior desacetilación a

quitosano, según lo reportado por Zheng y col., (2003) la actividad antimicrobiana de quitosanos aumenta a incrementar el PM, debido a que disminuyen la permeabilidad de la membrana celular.

En el caso de los quitosanos, el porcentaje mineral disminuyó para todas las muestras esto es debido a que fueron sometidas a un proceso de desmineralización empleando ácido a bajas concentraciones, sin embargo, aquellos quitosanos sometidos a proceso de desacetilación a temperaturas altas obtuvieron un porcentaje significativamente menor. QH-Q registró un aumento en el % Dmin esto podría deberse a que durante el proceso de neutralización se lavó con agua corriente de grifo que podría contener una fracción mineral elevada. En cuanto al PM, los quitosanos obtenidos con el método de desacetilación homogéneo fueron significativamente más bajos que el obtenido heterogéneamente QH-E1. Esto pudo deberse a que los quitosanos obtenidos por método homogéneo fueron menos solubles en el buffer acético/ acetato (Tabla 6) por tanto afectaron la determinación del peso molecular viscosimétrico, la diferencia en la solubilidad puede ser debida al PA favorecida por el método de desacetilación. El tipo de BAL tuvo un efecto significativo sobre el PM, siendo mayor para los productos obtenidos con *L. brevis* (Q-1, QH-01 y QH-E1), debido posiblemente a las diferencias de actividades enzimáticas, por la cuenta microbiana y de acidificación (Tabla 5)

Tabla 5. Caracterización químico-proximal de quitinas y quitosanos

	Muestra	Humedad (%)	Cenizas (%)	Dmin (%)	PM (kDa)
Quitina	Q-1	86.99 ± 0.32 ^a	18.62 ± 0.01 ^a	52.04 ± 0.02 ^a	1521.2 ± 4 ^a
	Q-2	94.50 ± 0.17 ^b	14.45 ± 0.5 ^b	62.77 ± 0.91 ^b	1200 ± 5 ^b
	Q-3	86.25 ± 0.32 ^a	15.52 ± 0.15 ^b	60.02 ± 1.01 ^c	1095 ± 10 ^c
	Q-Q	29.65 ± 0.43 ^c	0.11 ± 0.05 ^c	99.70 ± 0.06 ^d	666 ± 7 ^d
Quitosano	QH-O1	87.86 ± 0.13	1.43 ± 0.19 ^a	96.32 ± 0.9 ^a	77 ± 13.6 ^a
	QH-O2	90.85 ± 0.25	2.07 ± 0.36 ^b	94.67 ± 2.3 ^b	50 ± 11 ^a
	QH-E1	7.95 ± 1.1	0.59 ± 0.01 ^c	98.46 ± 0.05 ^c	229 ± 5 ^b
	QH-E2	95.16 ± 0.5	0.25 ± 0.03 ^c	99.36 ± 0.07 ^c	102.8 ± 11 ^a
	QH-Q	93.20 ± 0.02	1.06 ± 0.05 ^{ab}	97.27 ± 0.05 ^d	ND

Letras distinta entre cada columna representa diferencia significativa (p<0.05) mediante comparación múltiple de medias de Tukey Kramer. ND representa los valores no determinados.

Se cuantificó el contenido de solubles en los disolventes N,N-Dimetilacetamida y ácido acético/acetato para quitina y quitosano, respectivamente (Tabla 6). Las quitinas

presentaron valores superiores de contenido no soluble en comparación de quitosanos, esto se debe al mayor número de grupos acetilo presentes en las quitinas, mientras que en los quitosanos se presentan grupos amino libres que pueden protonarse en soluciones ligeramente ácidas. Por lo anterior la solubilidad es un parámetro relacionada inversamente con el grado de acetilación del biopolímero (Domard, 1989). Los quitosanos homogéneos tienen menor porcentaje de contenido soluble que aquellos desacetilados heterogéneamente, este comportamiento podría ser explicado en función del PA, debido a que la distribución de los grupos *N*- acetil a lo largo de la cadena podría limitar la solubilidad de este (Pacheco y col., 2010).

Tabla 6 . Determinación de contenido soluble de quitinas
crudas y quitosanos.

Muestra	Contenido soluble (%)	Contenido no soluble (%)
Q1	12.19	87.81
Q2	22.88	77.12
Q3	19.30	80.7
Q-Q	49.66	50.34
QH-O1	90.17	9.83
QH-O2	88.23	11.77
QH-E1	97.08	2.92
QH-E2	96.69	3.31
QH-Q	ND	ND

**Las quitinas fueron disueltas en N, N- Dimetilacetamida LiCl 5.0 % (p/v) mientras que para disolver los quitosanos se utilizó ácido acético al 2 % y acetato de sodio 0.2 M (Pacheco y col., 2011).

8. Conclusiones

- El uso de BAL homofermentativas facultativas como es el caso de *L. plantarum* resultó ser una buena opción para aumentar la producción de AL, ya que produce 3.19 veces más AL que BAL heterofermentativas, demostrando que existe un efecto del tipo de metabolismo sobre la purificación de las quitinas obtenidas.
- El aumento en la producción de AL se ve reflejado en una mayor desmineralización de las quitinas.
- El uso de un sistema de fermentación en condiciones anaerobias favoreció la fermentación, produciendo mayor cantidad de ácido y crecimiento de BAL.
- Los pigmentos presentes en el desperdicio de camarón fueron conservados en las quitinas biológicas.
- Las quitinas obtenidas por FAL presentaron un mayor peso molecular, lo que indica que la FAL es un tratamiento suave que evita la de polimerización del biopolímero.
- Los quitosanos obtenidos mediante desacetilación heterogénea presentaron un mayor PM comparado con aquellos desacetilados homogéneamente.

9. Perspectivas

En el presente trabajo no fue posible determinar la desproteínización del desperdicio por lo cual se propone determinar los contenidos de proteína residual y grasas en las quitinas para determinar su nivel de purificación.

Datos interesantes serían el cuantificar la producción de CO₂, etanol y otros ácidos orgánicos en los cultivos con *L. brevis*, adaptando al sistema de fermentación el uso de sensores de CO₂ para cuantificar el gas liberado permitiendo realizar un balance energético de este tipo de metabolismo. A pesar de los resultados favorables obtenidos en la conservación de pigmentos, se propone cuantificar por HPLC la cantidad de estos carotenoides para confirmar su preservación.

Por otro lado, se propone determinar el DA y PA para confirmar la hipótesis sobre la solubilidad de los quitosanos, debido a que aún no existen reportes del efecto que puede tener la distribución de los grupos D-GlcN y D-GlcNAc (PA) a lo largo de la cadena de quitina y quitosanos biológicos sobre sus propiedades en sus soluciones.

10. Referencias

- Abdulkarim**, A.; Tijani Isa, M.; Abdulsalam, S.; Jaju Muhammad, A.; Opuada Ameh, A. (2013) Extraction and characterisation of chitin and chitosan from mussel shell. *Civ. Environ. Res.* 3, 108–115.
- Aiba, S.** (1993). Studies on chitosan: 6. Relationship between N-acetyl group distribution pattern and chitinase digestibility of partially N-acetylated chitosans. *International Journal of Biological Macromolecules*, 15(4), 241–245.
- Almanza F.**, Barrera E.(1991), *Tecnología de leche y derivados*, Bogotá Unisur. 61-66.
- Amorocho Cruz, C.** (2011)Caracterización y potencial probiótico de bacterias lácticas aisladas de leche de oveja guirra. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Universidad Politécnica de Valencia.
- AOAC:** Official Methods of Analysis (Volume 1). (1999). 771.
- Axelsson, L.** (2004) Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Salminen, S., Wright, A.V. and Ouwehand, A., Eds., *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, 3rd Edition, Marcel Dekker, New York, 1-67.
- Bajaj, M.**; Freiberg, A.; Winter, J.; Xu, Y.; Gallert, C.(2015) Pilot-scale chitin extraction from shrimp shell waste by deproteination and decalcification with bacterial enrichment cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99,9835–9846.
- Blanco, S.**, (2020). Desarrollo de emulsiones tipo pickering a base de quitosano para la microencapsulación de dímero alquilceteno (AKD). Tesis para obtener el grado Maestría en Ciencias UAMI, México.
- Camacho Elizondo**, Melissa, Vega Baudrit, José, & Campos Gallo, Allan. (2011). Uso de nanomateriales en polímeros para la obtención de bioempaques en aplicaciones alimentarias. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 77(4), 292-306.
- Carr**, Frank J.; Chill, Don; Maida, Nino (2002). *The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey.* , 28(4), 281–370. doi:10.1080/1040-840291046759
- Cira L.**, Huerta S., Hall G y Shirai K. (2002). Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemistry*: 37:1359-1366.
- David, L.** Shirai Matsumoto, K. Trombotto, S. Aracely Pacheco Lopez, N. Chitin-Chitosan bloc Co-Polymers, México, Numero de patente : WO 2012/080772 Al, 21 Junio 2012.
- Domard, A.** (1989). Physicochemical properties of chitinous materials. *Advances in chitin science.* 3: 24-37.
- Domard, A.** Denuziere, A., Ferrier, & D., Damour, O (1998). *Chitosan–chondroitin sulfate and chitosan–hyaluronate polyelectrolyte complexes: biological properties.* *Biomaterials*, 19(14), 1275–1285.
- Dubois, M.**; Gilles, K.; Hamilton, J. K.; Rebers, P.; Smith, F. (1951). "A Colorimetric Method for the Determination of Sugars". *Nature*. 168, 167.
- Dweltz, N.E** (1961). The structure of β -chitin. *Biochim. Biophys.* 51, 283–294

- Emodi A.** (1978) Carotenoids: Properties and applications. *Food Technol*; (32): 38-42, 78
- Food and Drug Administration** (2003) "Bacteriological Analytical Manual". 9th ed. Arlington, VA: AOAC
- Garcia-Ochoa**; Emilio Gomez (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. , 27(2), 153–176.
- Gimeno**, Miquel; Ramírez-Hernández, Jessica Yesemite; Martínez-Ibarra, César; Pacheco, Neith; García-Arrazola, Roeb; Bárzana, Eduardo; Shirai, Keiko (2007). One-Solvent Extraction of Astaxanthin from Lactic Acid Fermented Shrimp Wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(25), 10345–10350. doi:10.1021/jf071469h
- Guerra N.**, Rua M. y Pastrana L. Nutritional factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria on why, *International Journal of Food Microbiology*. 2001, 70, 267-280
- Guillou**; Michel Khalil; Lucien Adambounou (1995). Effects of silage preservation on astaxanthin forms and fatty acid profiles of processed shrimp (*Pandalus borealis*) waste. , 130(4), 0–360. doi:10.1016/0044-8486(94)00324-h
- Hall, G.M.**, Barrera, C.H. & Shirai, K. (2020). Alternative methods for chitin and chitosan preparation, characterization, and application. *Handbook of Chitin and Chitosan: Vol-1 Preparation and Properties*. DOI: 10.1016/B978-0-12-817970-3.00008-0
- Hammes** WP, Hertel C (2009) Genus I. *Lactobacillus* Beijerinck, 1901. In: De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer K-H, Whitman WB (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 3, 2nd edn. Springer, Berlin, pp 465–510
- Hernandez**, C., (2014). Microencapsulación de aceite de neem en quitosano, caracterización y evaluación in vivo. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias UAMI, México.
- Hirano**, S. (1999). Chitin and Chitosan as novel biotechnological materials. *Polymer International*. 48(8): 732-734.
- Kafetzopoulos**, D., Thireos, G., Vournakis, J. N. and Bouriotis, V. (1993). The primary structure of a fungal chitin deacetylase reveals the function for two bacterial gene products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 90(17): 8005-8008
- Kjell. M.** Varum, M. W. Anthonsen, H. Grasdalen, and O. Smidsrod, *Carbohydr. Res.*, 211 (1991) 17-23.
- Konica** Minolta , entendiendo el espacio de color L*a*b*. <https://sensing.konicaminolta.us/mx/>
- Kurita**, K. (2006). Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustacean. *Marine Biotechnology mini-review*. 8:203-226.
- Kurita**, K., Sannan, T. and Iwakura, Y., (1977). Preparation of pure chitin, poly(N-acetyl-D-Glucosamine), from the water-soluble chitin. *Macromolecules Chemistry*. 178: 2595-2602.
- Kurita**, K., Sannan, T., & Iwakura, Y. (1977). Evidence for Formation of Block and Random Copolymers of N-Acetyl-D-glucosamine and D-Glucosamine by Hetero- and Homogeneous Hydrolyses *Die Makromolekulare Chemie*, 178(12), 3197–3202.

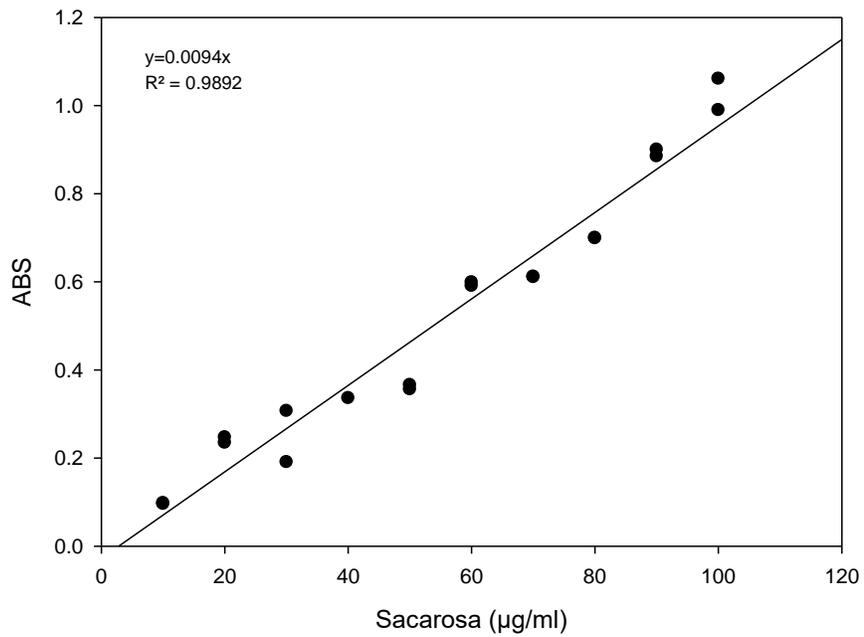
- León, K;** Domingo Mery; Franco Pedreschi; Jorge León (2006). Color measurement in L*a*b* units from RGB digital images. , 39(10), 0–1091. doi:10.1016/j.foodres.2006.03.006
- Lyhs, U.** (2002). Lactic acid bacteria associated with the spoilage of fish products. Academic Dissertation, Department of Food and Environmental Hygiene. Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki. ISBN 952-91-4642-6.
- Minke, R.;** Blackwell (1978), J. The structure of α -chitin. *J. Mol. Biol.* 120, 167–181.
- Nemtsev, S. V.,** Gamzazade, A. I., Rogozhin, S. V., Bykova, V. M. and Bykov, V. P. (2002). Deacetylation of chitin under homogeneous conditions. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 38(6):521-526.
- Pacheco, N ,** Garnica-González, Y. Ramírez-Hernández, Flores-Albino, Gimeno, Bárzana & Shirai, K (2009). Effect of temperature on chitin and astaxanthin recoveries from shrimp waste using lactic acid bacteria, *Bioresource Technology*, 100, Issue 11,2849-2854,
- Pacheco, N.,** (2010). Extracción biotecnológica de quitina para la producción de quitosanos: caracterización y aplicación. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias UAMI, México.
- Pacheco, N.,** Garnica-Gonzalez, M., Gimeno, M., Bárzana, E., Trombotto, S., David, L., & Shirai, K. (2011). Structural Characterization of Chitin and Chitosan Obtained by Biological and Chemical Methods. *Biomacromolecules*, 12(9), 3285–3290.
- Pastor, A.** (2004). Generalidades de Quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones, En Pastor, A. (ed) Pontificia Universidad Católica del Perú, Fondo editorial, pp. 25-71.
- Prashanth, K. V. H.,** and Tharanathan, R. N. (2007). Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential – an overview. *Trends in food sciences and technology* (18):117-131.
- R. Aranday-Garcia, A.** Román Guerrero, K. Shirai, S. (2017). Ifuku, Successive inoculation of *Lactobacillus brevis* and *Rhizopus oligosporus* on shrimp wastes for recovery of chitin and added-value products, *Process Biochem.* 58 17-24.
- Ramírez Arrebato, Miguel & Rodriguez Pedroso, Aida & Alfonso, Luis & Peniche, Carlos.** (2010). La quitina y sus derivados, biopolímeros con potencialidades de aplicación agrícola. *Biotecnología Aplicada.* 27. 270-276.
- Rinaudo, M** (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.*31, 603–632.
- Rinaudo, M.,** Milas, M., & Dung, P. L. (1993). Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. *International Journal of Biological Macromolecules*, 15(5), 281–285.
- Rodríguez M.S;** Albertengo L.E; Agulló E (2000) Emulsification capacity and hypolipidemic effect of chitosan, *Chitosan per os: from dietary supplement to drug carrier.* Editor: R.A.A.
- Salveti E,** Torriani S, Felis GE (2012). The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. *Probiotics Antimicrob Proteins.* Dec;4(4):217-26. doi: 10.1007/s12602-012-9117-8.

- Savado**, Aly & A.T, OUATTARA & Bassolé, Imael & Traore, Alfred. (2006). Bacteriocins and lactic acid bacteria - A minireview. *African Journal of Biotechnology* (ISSN: 1684-5315) Vol 5 Num 9. 5. doi:10.4314/ajb.v5i9.42771.
- Shirai K**, 1999. Utilización de desperdicios de camarón para recuperación de quitina. Proteínas y pigmentos por vía microbiana. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa - México.
- Shirai K**, Guerrero I, Huerta S, Saucedo G, Castillo A, Gonzales R, Hall G. (2001). Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation. *Enzyme and Microbial Technology*. 28:446-452.
- Terbojevich**, M., Carraro, C., Cosani, A. (1988). Solution studies of the chitin-lithium chloride-N-dimethylacetamida system. *Carbohydrate Research*. 180, 73-86.
- Tjørve**, K. M. C., & Tjørve, E. (2017). The use of Gompertz models in growth analyses, and new Gompertz-model approach: An addition to the Unified-Richards family. *PLOS ONE*, 12(6), e0178691. doi:10.1371/journal.pone.0178691
- Vårum**, Kjell. M., Anthonsen, M. W., Grasdalen, H., & Smidsrød, O. (1991). ¹³C-N.m.r. studies of the acetylation sequences in partially N-deacetylated chitins (chitosans). *Carbohydrate Research*, 217, 19–27.
- Velasco-Garduño** O, Manuel E. Martínez, Miquel Gimeno, Alberto Tecante, Ricardo Beristain-Cardoso, Keiko Shirai. (2020) Copper removal from wastewater by a chitosan-based biodegradable composite. *Environmental Science and Pollution Research*.
- Wang**, X.-Y., & Heuzey, M.-C. (2016). Chitosan-Based Conventional and Pickering Emulsions with Long-Term Stability. *Langmuir*, 32(4), 929–936.
- Zheng**, L.Y.; Zhu. J.F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydr. Polym.* 2003, 54, 527–530.
- Zúñiga M**, I. Pardo; S. Ferrer (1993). An improved medium for distinguishing between homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. , 18(1), 37–42.

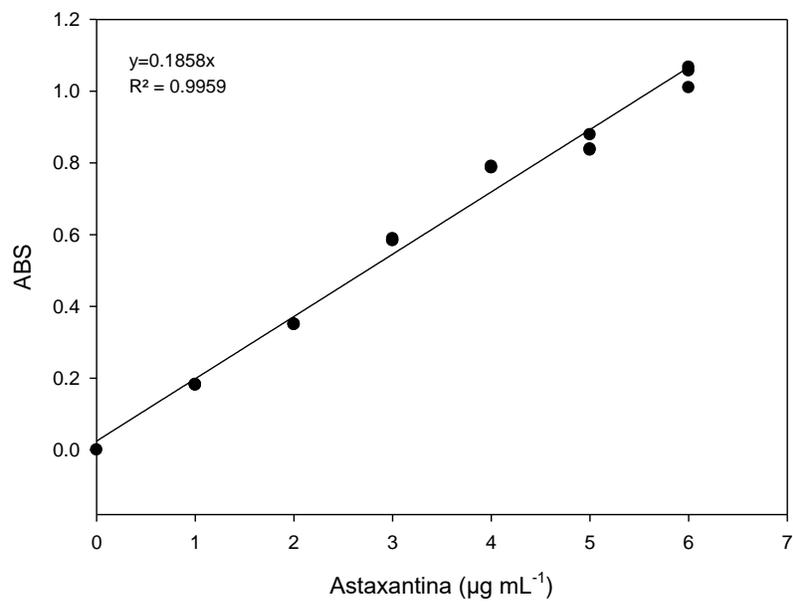
Anexos

1. Curva estándar para determinación de azúcares totales por la técnica fenol-sulfúrico.

Curva estandar de sacarosa



2. Curva estándar para cuantificación de astaxantina total



3. Pruebas estadísticas

Análisis de varianza de pH, ATT, concentración de sacarosa y crecimiento microbiano de las muestras obtenidas después de 144h de fermentación a 30 °C.

ANOVA

- pH (FAL-1 /FAL-3)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1.628	1	1.628	1.483	.232
Dentro de grupos	37.321	34	1.098		
Total	38.949	35			

ANOVA

- AL

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	360.843	1	360.843	36.325	7.9442E-7
Dentro de grupos	337.746	34	9.934		
Total	698.590	35			

att

Tukey B

tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
FAL1,t0	2	.00000							
FAL3,t0	2	.00000							
FAL3,t24	2	.02050							
FAL1,t24	2		.05400						
FAL1,t48	2		.07150	.07150					
FAL1,t72	2			.08800	.08800				
FAL1,t96	2				.10400				
FAL1,t120	2				.11450				
FAL1,t144	2					.14750			
FAL3,t48	2						.33000		
FAL3,t72	2							.41500	
FAL3,t120	2							.42500	
FAL3,t96	2							.43000	
FAL3,t144	2								.47000

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

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 2.000.

Descriptivos

- Sacarosa

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
					L.brevis 25kg	19		
L. plantarum 25kg	14	40.4357	28.52011	7.62232	23.9686	56.9027	10.08	98.87
Total	33	51.7361	23.34501	4.06384	43.4583	60.0139	10.08	98.87

ANOVA

Sacarosa

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3105.113	1	3105.113	6.715	.014
Dentro de grupos	14334.551	31	462.405		
Total	17439.664	32			

ANOVA

- Crecimiento bacteriano

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	699350222222221.800	1	699350222222221.800	1.177	.287
Dentro de grupos	1663558444444440.000	28	594128015873015.800		
Total	1733493466666660.000	29			

- T°C

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	31.394	1	31.394	2.812	.103
Dentro de grupos	379.578	34	11.164		
Total	410.972	35			

- Cenizas quitina

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	15.863	2	7.932	44.220	.006
Dentro de grupos	.538	3	.179		
Total	16.401	5			

Cenizas

HSD Tukey^a

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Q2	2	14.96500	
Q3	2	15.46000	
Q1	2		18.63500
Sig.		.544	1.000

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

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 2.000.

- Cenizas quitosano

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	4.663	4	1.166	86.289	.000084
Dentro de grupos	.068	5	.014		
Total	4.731	9			

Cenizas

HSD Tukey^a

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
QH-E2	2	.26000			
QH-E1	2	.59000	.59000		
QH-Q	2		1.05500	1.05500	
QH-O1	2			1.37500	
QH-O2	2				2.23500
Sig.		.160	.051	.175	1.000

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

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 2.000.

- Dmin quitina

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	2671.008	3	890.336	7849.556	5.4077E-8
Dentro de grupos	.454	4	.113		
Total	2671.461	7			

Dmin

HSD Tukey^a

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
Q1	2	52.0200			
Q3	2		60.4850		
Q2	2			62.7850	
Q-Q	2				99.6000
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

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

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 2.000.

- Dmin quitosano

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	26.690	4	6.673	223.163	0.000008
Dentro de grupos	.149	5	.030		
Total	26.840	9			

Dmin

HSD Tukey^a

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
QH-O2	2	94.5350				
QH-O1	2		96.2100			
QH-Q	2			97.1950		
QH-E1	2				98.3800	
QH-E2	2					99.1800
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

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

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 2.000.

- PM quitina

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	747962.104	3	249320.701	2629.931	4.8137E-7
Dentro de grupos	379.205	4	94.801		
Total	748341.309	10			

PM

HSD Tukey^a

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
Q-Q	2	666.00000			
Q3	2		1095.00000		
Q2	2			1200.00000	
Q1	2				1521.05000
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

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

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 2.000.

- PM quitosano

ANOVA

PM

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	37756.735	3	12585.578	54.341	.001
Dentro de grupos	926.420	4	231.605		
Total	38683.155	7			

PM

HSD Tukey^a

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
QH-O2	2	49.50000	
QH-O1	2	77.00000	
QH-E2	2	102.80000	
QH-E1	2		229.00000
Sig.		.080	1.000

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

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 2.000.

- Humedad quitina

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	5410.984	3	1803.661	8617.589	4.4869E-8
Dentro de grupos	.837	4	.209		
Total	5411.821	7			

Humedad

HSD Tukey^a

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Q-Q	2	29.65000		
Q3	2		86.25000	
Q1	2		86.99000	
Q2	2			94.50000
Sig.		1.000	.462	1.000

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

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 2.000.

- Humedad quitosanos

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	11299.940	4	2824.985	4586.610	4.2878E-9
Dentro de grupos	3.080	5	.616		
Total	11303.020	9			

Humedad

HSD Tukey^a

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
QH-E1	2	7.95000			
QH-O1	2		87.86000		
QH-O2	2		90.85000	90.85000	
QH-Q	2			93.20000	93.20000
QH-E2	2				95.16000
Sig.		1.000	.060	.136	.228

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

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 2.000.

- Parámetros de color

1) L*

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	14062.156	3	4687.719	386.992	5.9765E-41
Dentro de grupos	775.245	64	12.113		
Total	14838.401	67			

L

HSD Tukey^{a,b}

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
Q2	14	45.36929			
Q3	16		48.76938		
Q1	21			55.40714	
Q-Q	17				82.67353
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

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

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 16.641.

b. Los tamaños de grupo no son iguales. Se utiliza la media armónica de los tamaños de grupo. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

2) a*

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1225.164	3	408.388	178.491	4.9598E-31
Dentro de grupos	146.432	64	2.288		
Total	1371.596	67			

a

HSD Tukey^{a,b}

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
Q-Q	17	.1412			
Q2	14		5.8157		
Q1	21			8.9205	
Q3	16				11.5694
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

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

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 16.641.

b. Los tamaños de grupo no son iguales. Se utiliza la media armónica de los tamaños de grupo. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

3) b*

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1367.974	3	455.991	140.477	4.1882E-28
Dentro de grupos	207.745	64	3.246		
Total	1575.718	67			

b

HSD Tukey^{a,b}

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
Q2	14	14.6079			
Q-Q	17		18.5829		
Q3	16			22.3244	
Q1	21				26.6476
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

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

- Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 16.641.
- Los tamaños de grupo no son iguales. Se utiliza la media armónica de los tamaños de grupo. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

- Astaxantina

ANOVA

Astaxantina

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	.538	2	.269	20342.294	.000
Dentro de grupos	.000	6	.000		
Total	.538	8			

Astaxantina

Tukey B

Quitina	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Q2	3	.08233		
Q1	3		.15300	
Q3	3			.63267

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

- Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3.000.