

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



**“EVALUACIÓN DE CONSORCIOS BACTERIANOS Y CONDICIONES DE OPERACIÓN, PARA REDUCIR EL CONTENIDO DE PROTEÍNAS EN RESIDUOS DE LANGOSTINOS (*Litopenaeus vannamei*) MEDIANTE BIOPROCESOS DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.”**

Tesis presentada por el Bachiller:

Perochena Escalante, Eduardo Alonso

Para optar por el título Profesional de Ingeniero  
Biotecnólogo.

Asesora: PhD. Valderrama Valencia, María  
Rosario.

Co Asesora: PhD. Sirvas Cornejo, Susana.  
(Instituto Tecnológico de la Producción – ITP)

AREQUIPA- PERÚ

2019

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA  
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas  
y Biotecnológicas  
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N°. 20180000004363

N° Trámite en Fac. 377-2018  
Fecha Recep. Fac. 24-01-2018

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: **PEROCHENA ESCALANTE, Eduardo Alonso**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

**"DESPROTEINIZACION DE RESIDUOS DE LANGOSTINO (*Litopenaeus vannamei*) MEDIANTE LA ACCION DE UN PROCESO DE HIDROLISIS ENZIMATICA DE CONSORCIOS MICROBIANOS"**

DICTAMINADORES: **Dr. Fredy Molina Rodríguez** 2) **Mgter. Jaime Barreda del Carpio**

**DICTAMEN DE PLAN:** Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que: hechas las observaciones y subsanadas las correcciones; consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

FIRMAS:

(Devolver antes de 8 días hábiles)

FECHA 05/03/18

ASESOR: **Dra. María Valderrama Valencia**

**DICTAMEN ASESORÍA:** Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesora del trabajo de investigación presentado por el recurrente, tengo a bien informar que luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes y debiendo cambiar el título a: **"EVALUACION DE CONSORCIOS BACTERIANOS Y CONDICIONES DE OPERACIÓN, PARA REDUCIR EL CONTENIDO DE PROTEINAS EN RESIDUOS DE LANGOSTINOS (*Litopenaeus vannamei*) MEDIANTE BIOPROCESOS DE HIDROLISIS ENZIMATICA "**, considero que el presente trabajo está APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad

FIRMA

FECHA 28/01/19

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) **Dr. Jaime Cárdenas García** 3) **Mgter. Jaime Barreda del Carpio**  
2) **Dr. Fredy Molina Rodríguez**

**DICTAMEN FINAL:** Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, atendiendo a su designación como Dictaminadores del presente Borrador de Tesis y luego de hechas las observaciones y correcciones pertinentes, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas para un trabajo de investigación de Tesis profesional, es que consideramos APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

FIRMA

(Devolver antes de 15 días hábiles) FECHA

JURADOS: PRESIDENTE  
VOCAL  
SECRETARIO

**DR. JAIME CARDENAS GARCIA**  
**DR. FREDY MOLINA RODRIGUEZ**  
**MAG. JAIME BARREDA DEL CARRIO**

FECHA

13/11/19

HORA

19.00

LOCAL

C-402

FIRMA DEL DECANO

FECHA

## INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	I
ABREVIATURAS .....	II
RESUMEN.....	IV
ABSTRACT .....	V
INTRODUCCIÓN.....	VI
CAPITULO I: GENERALIDADES.....	- 1 -
1.1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA .....	- 1 -
1.2. OBJETIVOS .....	- 2 -
1.2.1. Objetivo general.....	- 2 -
1.2.2. Objetivos específicos .....	- 2 -
1.3. HIPÓTESIS .....	- 2 -
1.4. VARIABLES E INDICADORES .....	- 2 -
1.5. ALCANCE Y TIPO DE INVESTIGACIÓN .....	- 2 -
1.6. DELIMITACIÓN ESPACIAL Y TEMPORAL.....	- 3 -
CAPITULO II: MARCO TEÓRICO.....	- 4 -
2.1. LANGOSTINOS ( <i>LITOPENAEUS VANNAMEI</i> ).....	- 4 -
2.1.1. Clasificación Taxonómica y Morfología: .....	- 4 -
2.1.2. Composición .....	- 5 -
2.1.3. Ciclo de producción: .....	- 6 -
2.1.4. Situación de la industria langostinera en el Perú: .....	- 8 -
2.1.5. Aprovechamiento de residuos de langostinos ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ):.....	- 10 -
2.2. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA .....	- 11 -
2.2.1. Enzimas.....	- 11 -
2.2.2. Hidrólisis.....	- 11 -
2.2.3 Hidrólisis enzimática de proteínas .....	- 12 -
2.3 DISEÑO EXPERIMENTAL (DISEÑO FACTORIAL) .....	- 13 -
2.3.1. Diseño factorial $2^3$ .....	- 13 -
2.3.1.1. Interpretación del ANOVA .....	- 14 -
2.3.1.2. Análisis de regresión lineal múltiple .....	- 14 -

2.3.1.3. Validación de los supuestos.....	- 16 -
<b>CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>- 18 -</b>
3.1. CAMPO DE INVESTIGACIÓN.....	- 18 -
3.1.1. Ámbito Geográfico .....	- 18 -
3.1.2. Unidades de Estudio .....	- 18 -
3.2 MATERIALES.....	- 18 -
3.2.1. Materia Prima .....	- 18 -
3.2.2. Material Microbiológico .....	- 18 -
3.2.3. Material Enzimático:.....	- 18 -
3.3 MÉTODOS .....	- 19 -
3.3.1. Obtención de la muestra .....	- 19 -
3.3.2. Obtención de cepas para su uso en consorcios bacterianos .....	- 21 -
3.3.3. Reactivación de consorcios bacterianos y preparación de inóculo.....	- 21 -
3.3.4. Diseño y construcción de frascos de Biorreacción .....	- 22 -
3.3.5. Descripción del bioproceso de hidrólisis enzimática bacteriana .....	- 23 -
3.3.6. Ensayos realizados .....	- 24 -
3.3.6.1. Determinación del rendimiento de la materia prima ET. ....	- 24 -
3.3.6.2. Análisis químico proximal .....	- 24 -
3.3.6.3. Análisis bioquímico.....	- 28 -
3.3.6.4. Análisis microbiológico .....	- 29 -
3.3.7. Diseño experimental y Análisis Estadístico.....	- 30 -
3.3.7.1. Selección y construcción del Diseño Factorial .....	- 30 -
3.3.7.2. Análisis del Diseño Factorial .....	- 31 -
<b>CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>- 33 -</b>
4.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA .....	- 33 -
4.2. CONSORCIOS BACTERIANOS ACTIVADOS.....	- 34 -
4.3. BIOPROCESO DE HIDRÓLISIS .....	- 35 -
4.4. ANÁLISIS DE LOS BIOPROCESOS CON CADA CONSORCIO BACTERIANO Y DE LOS EFECTOS DE LAS VARIABLES SOBRE LAS TASAS DE DESPROTEINIZACIÓN. ....	- 37 -
4.4.1. Análisis del modelo experimental para el consorcio bacteriano 1 (CB1)....	- 37 -
4.4.1.1. Comparación de los bioprocesos de desproteínización con CB01.....	- 37 -

4.4.1.2. Análisis del efecto individual y de interacción que las variables ejercen sobre el bioproceso de desproteización con CB01 .....	40 -
4.4.2 Análisis del modelo experimental para el consorcio bacteriano 2 (CB2)....	42 -
4.4.2.1 Comparación de los bioensayos de desproteización con CB02 .....	42 -
4.4.2.2. Análisis del efecto individual y de interacción que las variables ejercen sobre el bioproceso de desproteización con CB02.....	45 -
4.4.3 Análisis del modelo experimental para el consorcio bacteriano 3 (CB3)....	46 -
4.4.3.1 Comparación de los bioprocesos de desproteización con CB03.....	46 -
4.4.3.2. Análisis del efecto individual y de interacción que las variables ejercen sobre el bioproceso de desproteización con CB03.....	49 -
4.4.4 Análisis del modelo experimental para el consorcio bacteriano 4 (CB4)....	51 -
4.4.4.1 Comparación de los bioprocesos de desproteización con CB04.....	51 -
4.4.4.2. Análisis del efecto individual y de interacción que las variables ejercen sobre el bioproceso de desproteización con CB04.....	54 -
4.4.5 Análisis del modelo experimental para el consorcio bacteriano 5 (CB5)....	56 -
4.4.5.1 Comparación de los bioprocesos de desproteización con CB05.....	56 -
4.4.5.2. Análisis del efecto individual y de interacción que las variables ejercen sobre el bioproceso de desproteización con CB05.....	59 -
4.4.6 Discusión de resultados de los bioprocesos y del efecto de las variables sobre las tasas de desproteización de residuos de langostino. ....	60 -
CONCLUSIONES.....	65 -
RECOMENDACIONES .....	66 -
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	67 -
ANEXOS .....	78 -
ANEXO 1.....	78 -
PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.....	78 -
ANEXO 2.....	79 -
ENSAYOS DE DESPROTEIZACIÓN (CONDICIONES DE OPERACIÓN).....	79 -
ANEXO 3.....	84 -
ENSAYOS DE CARACTERIZACIÓN DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS DE LOS BIOPROCESOS DE HIDRÓLISIS.....	84 -

- COMPOSICIÓN QUÍMICA PROXIMAL .....	- 84 -
- CARACTERIZACIÓN DE HIDROLIZADO (FRACCIÓN SOLUBLE) Y FRACCIÓN INSOLUBLE OBTENIDOS. ....	- 89 -
ANEXO 4.....	- 94 -
RESULTADOS ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS .....	- 94 -



## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Variables independientes, dependientes e indicadores del presente trabajo de investigación.....	- 2 -
Tabla 2. Clasificación taxonómica del <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	- 4 -
Tabla 3. Cosecha, producción y exportaciones de langostinos en el Perú del 2006 al 2016 <sup>TM</sup> .....	- 9 -
Tabla 4. Tabla de efectos de un diseño factorial de tipo 2 <sup>3</sup> .....	- 14 -
Tabla 5. Variables independientes, dependientes e indicadores de los bioprocesos de hidrolisis enzimática del presente trabajo de investigación.....	- 23 -
Tabla 6. Variables de estudio y niveles utilizados para el diseño factorial 2 <sup>3</sup> .....	- 30 -
Tabla 7. Matriz experimental del diseño factorial 2 <sup>3</sup> .....	- 31 -
Tabla 8. Cepas bacterianas empleadas para la conformación de los consorcios bacterianos.....	- 35 -
Tabla 9. Características de funcionalidad de los frascos de biorreacción en los bioprocesos en estudio.....	- 35 -
Tabla 10. Media de las tasas de desproteínezación y desviación estándar de los bioensayos, con el consorcio bacteriano 1 (cb01).....	- 38 -
Tabla 11. ANOVA (one way ANOVA) sobre la tasa de desproteínezación (%DP/hora), con el consorcio bacteriano 1 (CB01).....	- 38 -
Tabla 12. Análisis secuencial de Tukey Kramer sobre las tasas de desproteínezación de residuos de langostino, con el consorcio bacteriano 1 (CB01).....	- 39 -
Tabla 13. Análisis de varianza (ANOVA) de los efectos sobre la tasa de desproteínezación (%DP/hora), en el diseño factorial del consorcio bacteriano 01 (CB01).....	- 41 -
Tabla 14. Media de las tasas de desproteínezación y desviación estándar de los bioensayos, con el consorcio bacteriano 2 (CB02).....	- 42 -
Tabla 15. ANOVA (one way ANOVA) sobre la tasa de desproteínezación (%DP/hora), con el consorcio bacteriano 2 (CB02).....	- 43 -

Tabla 16. Análisis secuencial de Tukey Kramer sobre las tasas de desproteínización de residuos de langostino, con el consorcio bacteriano 2 (CB02).....	- 44 -
Tabla 17. Análisis de varianza (ANOVA) de los efectos sobre la tasa de desproteínización (%DP/hora), en el diseño factorial del consorcio bacteriano 02 (CB02). .....	- 45 -
Tabla 18. Media de las tasas de desproteínización y desviación estándar de los bioensayos, con el consorcio bacteriano 3 (CB03).....	- 47 -
Tabla 19. ANOVA (one way ANOVA) sobre la tasa de desproteínización (%DP/hora), con el consorcio bacteriano 3 (CB03). .....	- 47 -
Tabla 20. Análisis secuencial de Tukey Kramer sobre las tasas de desproteínización de residuos de langostinos con el consorcio bacteriano 03 (CB03).....	- 48 -
Tabla 22. Media de las tasas de desproteínización y desviación estándar de los bioensayos, con el consorcio bacteriano 4 (CB04).....	- 52 -
Tabla 23. ANOVA (one way ANOVA) sobre la tasa de desproteínización (%DP/hora), con el consorcio bacteriano 04 (CB04). .....	- 52 -
Tabla 24. Análisis secuencial de Tukey Kramer sobre las tasas de desproteínización con el consorcio bacteriano 04 (CB04).....	- 53 -
Tabla 24. Análisis de varianza (ANOVA) de los efectos sobre la tasa de desproteínización (%DP/hora), en el diseño factorial del consorcio bacteriano 04 (CB04). .....	- 55 -
Tabla 26. Media de las tasas de desproteínización y desviación estándar de los bioensayos, con el consorcio bacteriano 5 (CB05).....	- 56 -
Tabla 27. ANOVA (one way ANOVA) sobre la tasa de desproteínización (%DP/hora), con el consorcio bacteriano 5 (CB05). .....	- 57 -
Tabla 28. Análisis secuencial de Tukey Kramer sobre las tasas de desproteínización de residuos de langostino, con el consorcio bacteriano 5 (CB05).....	- 58 -
Tabla 29. Análisis de varianza (ANOVA) de los efectos sobre la tasa de desproteínización (%DP/hora), en el diseño factorial del consorcio bacteriano 05 (CB05). .....	- 59 -
Tabla 30. Reducción del contenido de proteína en residuos de langostino en los 10 bioensayos que mostraron mejores resultados con los 5 consorcios bacterianos (CB) estudiados. ....	- 61 -

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía externa del langostino.....	- 5 -
Figura 2. Proceso de cultivo y cosecha del langostino. ....	- 7 -
Figura 3. cosecha, producción y exportaciones de langostinos en el Perú del 2006 - 2016 (TM). ....	- 9 -
Figura 4. Residuos de langostinos ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ), tomada de una muestra, donde A. es el exoesqueleto del telson, B. el exoesqueleto del abdomen y C. el exoesqueleto del cefalotórax. ....	- 19 -
Figura 5. Residuos de langostinos ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) congelado y glaseados.....	- 19 -
Figura 6. Separación de restos musculares del exoesqueleto de langostinos ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ). ....	- 20 -
Figura 7. Muestra de ET en bolsa de PE. ....	- 21 -
Figura 8. Representación gráfica de los frascos de biorreacción y sus accesorios. A: salida de CO <sub>2</sub> u off-gas; B: ingreso de oxígeno; C: llave de venoclisis de tres vías y D: ingreso de inóculo y toma de muestra. ....	- 22 -
Figura 9. Frascos de biorreacción construidos bajo un diseño simple. ....	- 22 -
Figura 10. Bioproceso de hidrólisis en operación. ....	- 24 -
Figura 11. Muestra de exoesqueleto total (ET) de residuos de langostinos ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) posterior a su procesamiento inicial. ....	- 33 -
Figura 12. Cepas microbianas reactivadas en medios TSA y TSB de los consorcios bacterianos en estudio.....	- 34 -
Figura 13. Cultivo de cepas de los consorcios bacterianos en estudio. ....	- 35 -
Figura 14. Fracciones obtenidas en los bioensayos de hidrólisis enzimática, donde A representa a la fracción soluble y B a la fracción insoluble. ....	- 37 -

Figura 15. Tasas de reducción de proteínas (%DP/hora) de los bioensayos del CB01.- 40

-

Figura 16. Tasas de reducción de proteínas (%DP/hora) de los bioensayos del CB02.- 44

-

Figura 17. Tasas de reducción de proteínas (%DP/hora) de los bioensayos del CB03.- 49

-

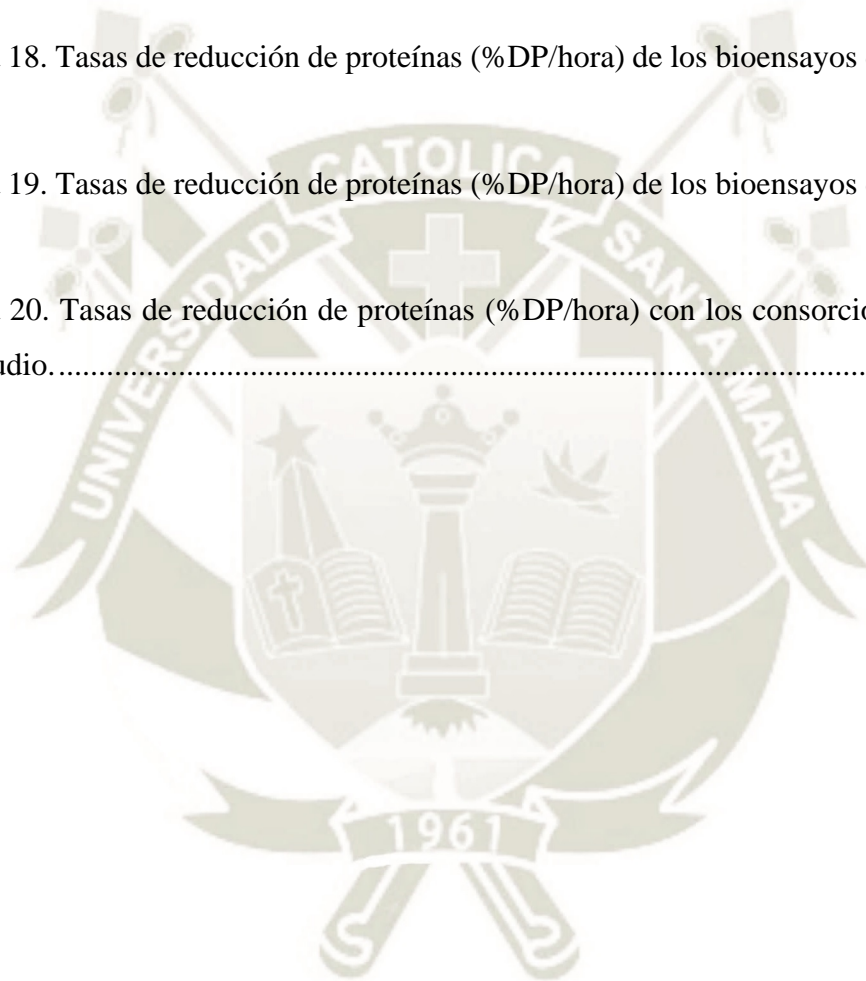
Figura 18. Tasas de reducción de proteínas (%DP/hora) de los bioensayos del CB04.- 54

-

Figura 19. Tasas de reducción de proteínas (%DP/hora) de los bioensayos del CB05.- 58

-

Figura 20. Tasas de reducción de proteínas (%DP/hora) con los consorcios bacterianos en estudio..... - 62 -



## AGRADECIMIENTOS

*A mis padres Eduardo y Ana, ambos ejemplos de vida; por sus consejos, confianza, cariño y todo lo que representan para mí.*

*A mi hermana Ana Carolina por siempre darme su apoyo y cariño.*

*A mi asesora, PhD. María Valderrama Valencia por su tiempo, amistad, consejos, paciencia y los amplios conocimientos transferidos a lo largo de mi formación profesional.*

*A mi Co-asesora, PhD. Susana Sirvas Cornejo por su tiempo, confianza, orientación, sugerencias y consejos a lo largo del tiempo que nos conocemos.*

*A la Universidad Católica Santa María, en especial al Programa Profesional de Ingeniería Biotecnológica y maestros de esta facultad quienes apoyaron a mi formación académica y profesional con los que estaré eternamente agradecido.*

*Al Instituto Tecnológico de la Producción (ITP) y a sus trabajadores, por la oportunidad y la infraestructura concedida donde se llevaron a cabo los experimentos, para el desarrollo de este trabajo.*

*A FONDECYT por el financiamiento de la presente tesis, que fue parte del proyecto “Obtención del biopolímero quitina a través de hidrólisis enzimática microbiana de residuos de langostino” con el Convenio N° 103-2014-FONDECYT, que tuvo como entidad beneficiaria al Instituto Tecnológico de la Producción (ITP).*

*A todos los miembros del proyecto “Obtención del biopolímero de quitina a través de hidrólisis enzimática microbiana de residuos de langostino” con el Convenio N° 103-2014-FONDECYT por su apoyo, compromiso y confianza a lo largo del desarrollo de este trabajo.*

*A mis amigos, por mostrarme su apoyo y cariño siempre.*

*Eternamente agradecido*

*Eduardo Alonso Perochena Escalante*

## ABREVIATURAS

ANOVA: Análisis de varianza

ACS: Grado Reactivo Analítico

AOAC: Association of Official Agricultural Chemists

%C: Porcentaje de Ceniza

°C: Grados Celsius

CB01: Consorcio bacteriano 1

CB02: Consorcio bacteriano 2

CB03: Consorcio bacteriano 3

CB04: Consorcio bacteriano 4

CB05: Consorcio bacteriano 5

DP: Desproteínización

%DD: Grado de deacetilación

%DP: Porcentaje de desproteínización

ET: Exoesqueleto total de residuos de langostinos (*Litopenaeus vannamei*)

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

FIV: Factor de Inflación de varianza

%G: Porcentaje de grasa cruda

%GH: Porcentaje de Grado de Hidrólisis

GL: Grados de Libertad

%H: Porcentaje de humedad

ITP: Instituto Tecnológico de la Producción

KJ: kilojulio

MC: Media Cuadrática

%Nt: Porcentaje de nitrógeno total

%P: Porcentaje de Proteína

PE: Polietileno

pH: Potencial de Hidrógeno

%Q: Porcentaje de quitina

R<sup>2</sup>: coeficiente de determinación

R<sup>2</sup><sub>aj</sub>: coeficiente de determinación ajustado

Rpm: Revoluciones por minuto

SC: Suma de Cuadrados

SC<sub>E</sub>: Suma del cuadrado del error

SC<sub>I</sub>: Suma del cuadrado de los efectos de interacción

SC<sub>N</sub>: Suma de cuadrados del efecto

SC<sub>T</sub>: Suma de cuadrados totales

TE: Tubo de extracción

TSA: Medio de cultivo Agar Tripticasa de soya

TSB: Medio de cultivo Caldo Tripticasa de soya

UFC: Unidades formadoras de colonias

Valor-p: valor de probabilidad

vvm: volúmenes de aire por volumen de líquido por minuto

$\alpha$  : valor de significancia

## RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue evaluar consorcios bacterianos y condiciones de operación en bioprocesos, que permitan reducir el contenido de proteína en residuos de langostinos (*Litopenaeus vannamei*). Se evaluaron cinco consorcios bacterianos conformados por bacterias provenientes del banco de cepas del Laboratorio de Biotecnología del Instituto Tecnológico de la Producción (ITP), las cuales fueron seleccionadas por su capacidad enzimática y de trabajar en consorcio; 5 consorcios bacterianos fueron conformados (CB01, CB02, CB03, CB04 y CB05). Tres variables independientes fueron evaluadas por su efecto sobre el bioproceso de hidrólisis para desproteínizar residuos de langostino. El bioproceso de hidrólisis fue realizado mediante el empleo de un diseño factorial  $2^3$ , el cual consideró los efectos individuales y de interacción de las variables independientes temperatura (25 y 35°C), tiempo (16 y 24 horas) y volumen de inóculo (2 y 6 mL x  $10^7$  UFC/mL). En cada consorcio bacteriano se midió: la tasa de desproteínización (%DP/hora). Los resultados mostraron que el consorcio bacteriano con la mayor capacidad de desproteínización (DP) fue el consorcio bacteriano 5 (CB05). Las mejores condiciones de operación fueron de 35°C, 16 horas y un volumen de inóculo de 6 x  $10^7$  UFC/mL, con las cuales se redujo el porcentaje de proteína de 13.021 a 0.062 %, con un porcentaje de desproteínización de 99.566% y una tasa de reducción de proteína de 0.811 % de proteína/ hora.

**Palabras clave:** Residuos de langostinos, quitina, consorcio bacteriano, tasa de desproteínización.

## ABSTRACT

The aim of the present investigation was to evaluate bacterial consortia and bioprocess operational conditions to reduce the content of protein in shrimp residues (*Litopenaeus vannamei*). Five bacterial consortia including strains from the Biotechnology Laboratory of the Technological Institute of Production (ITP) bacterial strains bank, were evaluated which were selected for their enzymatic capacity and their ability to work in consortia; 5 bacterial consortiums were set up (CB01, CB02, CB03, CB04 and CB05). The effect of three independent variables on the hydrolysis bioprocess to reduce protein in shrimp waste, were also evaluated. The hydrolysis bioprocess was carried out based on a factorial design  $2^3$ , which studied the effects of individual and independent variables interactions, such as temperature (25 and 35 °C), time (16 and 24 hours) and volume of inoculum (2 and 6 mL x  $10^7$  UFC/mL). In each bacterial consortium was measured: the deproteinization rate (%DP / hour). Results showed that the bacterial consortium with the highest deproteinization (DP) capacity was bacterial consortium 5 (CB05). The effectiveness operational conditions were 35 °C, 16 hours and 6 mL x  $10^7$  UFC/mL, to reduce protein content from 13.021 to 0.066%, percentage of deproteinization 99.5% and protein reduction rate 0.81% protein/ hour.

**Key words:** Shrimp waste, chitin recovery, bacterial consortia, deproteinization rate.

## INTRODUCCIÓN

En el Perú, la industria acuícola representa uno de los principales sectores productivos en crecimiento del país (1,2), habiendo alcanzado en los años 2016 y 2017 exportaciones equivalentes a 18 y 23 millones de dólares en productos tradicionales, así como 77 y 65 millones de dólares en productos no tradicionales respectivamente (3).

En el sub sector acuícola las principales especies cosechadas son trucha que representa un 52.16%, concha de abanico con 20.93% y langostino con 20.40% (2,4). Durante el proceso de comercialización del langostino (*Litopenaeus vannamei*) y la concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) se aprovecha del 20 al 40% del animal, siendo el 60 a 80% restante residuo, el cual es desechado al ambiente con la consiguiente contaminación ambiental como eutrofización, aumento en la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), aumento de organismo patógenos y de putrefacción que afectan la salud pública (5–8).

La industria langostinera corresponde al 70.64% de las exportaciones acuícolas del país siendo éstas de 7,311.5 TM en 2003 (9), 19,028 TM en 2014, 22,017 TM en 2015 y 20,062 TM en 2016 aproximadamente (1,2). Los residuos de langostinos son fuente de diferentes productos con valor comercial como astaxantina, quitina, quitosán, carbonato de calcio, entre otros (10–13). Actualmente en el Perú esos residuos son vertidos al ambiente y en algunos casos vendidos como suplemento de alimento animal o como fertilizante (14,15).

Frente al crecimiento en la producción de langostinos (*Litopenaeus vannamei*) en el país, es necesario no solo evitar que los residuos generados sean desechados al ambiente, sino también aprovecharlos de manera integral, mediante técnicas biotecnológicas y eco amigables que reemplacen los procesos químicos actualmente utilizados.

## CAPITULO I: GENERALIDADES

### 1.1 Formulación del problema

Durante el aprovechamiento de residuos de langostinos para la obtención de productos como astaxantina, quitina y quitosano, proteínas y lípidos son removidos mediante un proceso de desproteinización (DP). Actualmente la desproteinización (DP) se realiza por métodos químicos que involucran el uso de soluciones alcalinas como hidróxido de sodio (NaOH), hidróxido de potasio (KOH), carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>), fosfato de potasio (Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), entre otros a altas concentraciones y temperaturas, los cuales podrían contaminar el ambiente debido a que generan sustancias corrosivas y peligrosas (16–18). Por lo tanto, es necesario contribuir al reemplazo de los procesos químicos utilizados actualmente a escala comercial para el procesamiento de residuos de langostino, por métodos biotecnológicos y eco amigables.

El presente trabajo plantea los siguientes problemas de investigación:

- ¿El uso de bioprocesos de hidrolisis enzimática mediante el empleo de consorcio bacteriano y sus mejores condiciones de operación permitirán reducir el contenido de proteínas en residuos de langostinos (*Litopenaeus vannamei*), permitiendo llevar a cabo el proceso de desproteinización?
- ¿Será posible evaluar consorcios bacterianos y condiciones de operación de hidrolisis enzimática, para reducir el contenido de proteínas en residuos de langostinos (*Litopenaeus vannamei*)?
- ¿Es factible seleccionar consorcios bacterianos a ser probados, que permitan hidrolizar residuos de langostinos (*Litopenaeus vannamei*)?
- ¿Es posible hidrolizar residuos de langostinos (*Litopenaeus vannamei*) con cada tipo de consorcio bacteriano a diferentes condiciones de bioproceso?
- ¿Será posible determinar las condiciones de operación que reduzcan mejor el contenido de proteínas con cada consorcio bacteriano?
- ¿Es factible determinar el mejor consorcio bacteriano que mejor hidrolicen los residuos de langostinos para reducir el contenido de proteínas?

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Objetivo general

Evaluar consorcios bacterianos y condiciones de operación para reducir el contenido de proteínas en residuos de langostinos (*Litopenaeus vannamei*), mediante bioprocesos de hidrólisis enzimática.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- Seleccionar los consorcios bacterianos a ser probados en los bioprocesos.
- Hidrolizar residuos de langostinos con cada tipo de consorcio bacteriano a diferentes condiciones de bioproceso.
- Determinar las condiciones de operación que reduzcan mejor el contenido de proteínas con cada consorcio bacteriano.
- Determinar el consorcio bacteriano que mejor hidrolicen los residuos de langostino para reducir el contenido de proteínas.

## 1.3 Hipótesis

La evaluación de consorcios bacterianos a diferentes condiciones de operación en bioprocesos de hidrólisis enzimática de residuos de langostinos (*Litopenaeus vannamei*), permitirá determinar el consorcio y las condiciones que mejor reducen el contenido de proteínas en ese sustrato.

## 1.4 Variables e indicadores

Tabla 1. Variables independientes, dependientes e indicadores del presente trabajo de Investigación.

Variables independientes	Indicadores
Tiempo de biorreacción	Horas
Temperatura de biorreacción	° Celsius
Volumen de Inoculo	UFC/mL
Variables dependientes	Indicadores
Tasa de desproteínización	%Desproteínización / hora
Grado de hidrólisis	g Glicina/ g Muestra

## 1.5 Alcance y tipo de investigación

El presente trabajo de investigación tiene un alcance de tipo descriptivo correlacional y el tipo de investigación es experimental.

### 1.6 Delimitación espacial y temporal

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología y del Laboratorio de Fisicoquímica del Instituto Tecnológico de la Producción (ITP), Callao-Perú. El periodo de trabajo fue de abril del 2018 a febrero del 2019.



## CAPITULO II: MARCO TEÓRICO

### 2.1. Langostinos (*Litopenaeus vannamei*)

El langostino (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931) se encuentra en aguas costeras de hasta 72 metros de profundidad cuya temperatura es superior a 20°C durante todo el año, desde Sonora México hasta el departamento de Tumbes en Perú (19,20). No obstante este también se encuentra siendo cultivado para fines productivos en países como China, Indonesia, Tailandia, Belice, Vietnam, Estados Unidos de América (Hawaii), Malasia, entre otros (19,21).

#### 2.1.1. Clasificación Taxonómica y Morfología:

- Clasificación Taxonómica: Se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2. Clasificación Taxonómica del *Litopenaeus vannamei*

Clasificación Taxonómica	
Reino	Animalia
Phylum	Arthropoda
Subphylum	Crustácea
Superclase	Multicrustácea
Clase	Malacostraca
Subclase	Eumalacostraca
Suborden	Dendobranchiata
Súper familia	Penaeidae
Género	<i>Litopenaeus</i>
Especie	<i>Vannamei</i>
Nombre Científico	<i>Litopenaeus vannamei</i> (Boone, 1931)

Fuente: Buleje (2017), De Grave y Fransen (2015).

- Morfología

El langostino (*Litopenaeus vannamei*) posee dos mandíbulas y varios apéndices frente a la boca que asisten en la alimentación; su cuerpo está dividido en 3 regiones: cefalotórax, abdomen y telson, compuesta por segmentos, 8 para el cefalotórax y 6 para el abdomen (Figura 1). En el cefalotórax se encuentran 5 pares de pereópodos (10 en total) utilizados para caminar y dirigir el alimento a la boca (20,23). De igual manera en el cefalotórax se encuentran las antenas y anténulas que son órganos sensoriales, donde las anténulas contienen sacos con fluido que permiten que el animal se oriente, es similar al oído interno humano. Las antenas son sensibles y altamente móviles, al

moverse en toda dirección permiten que el langostino se desplace aún en aguas oscuras (Figura 1). Cuenta también con un par de ojos ubicados lateralmente y son móviles, compuestos por 7 000 a 30 000 ojos individuales en cada uno, sin embargo el animal se orienta principalmente por el tacto (20,23). En el abdomen o pleon encontramos a los pleópodos (cinco pares de apéndices) cuya función es la de nadar. En el telson encontramos a los urópodos cuya función es también la natación (Figura 1)(20,23).

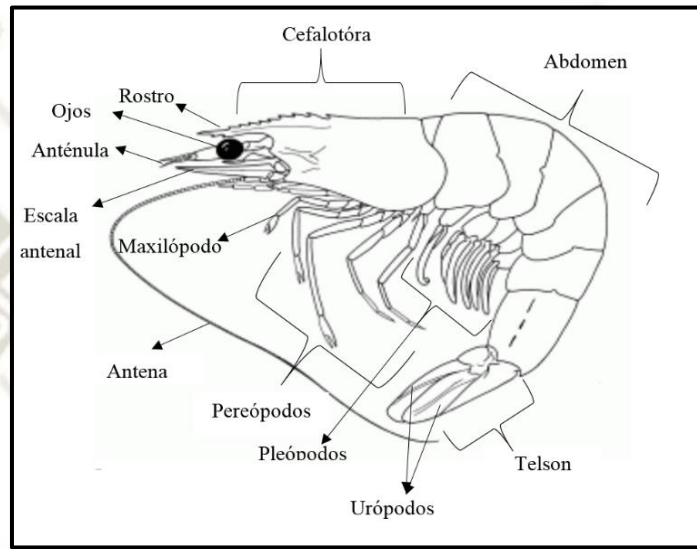


Figura 1. Anatomía externa del langostino.

Imagen extraída del Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO (2006)

El cuerpo del langostino está recubierto por su exoesqueleto el cual está compuesto de quitina y carbonato de calcio que le confiere dureza, esta estructura se encuentra íntimamente unida a los músculos y una capa de piel (23); el exoesqueleto es periódicamente removido y reemplazado durante las etapas de crecimiento del animal permitiendo que este siga creciendo; a este proceso se le denomina exuviación (20).

### 2.1.2. Composición

El abdomen de los langostinos es la parte que generalmente es comercializada y posee un valor calórico de alrededor de 4.5 KJ/g y de 75 a 80% de agua, 18 a 20% de proteína y 1% de grasa; el exoesqueleto contiene 30 a 40% de proteína, 30 a 50% de minerales, 0 a 1% de lípidos y 20 a 30% de quitina (23–25). La parte comestible es la fracción proteica y la grasa, esta última determinante para las propiedades sensoriales del producto como su aroma y sabor; los lípidos además contienen pigmentos

carotenoides, responsables del color típico del langostino tanto en estado vivo como después de cocido (23,26,27).

### **2.1.3. Ciclo de producción:**

#### **- Cultivo**

El proceso de producción de langostinos (Figura 2) se inicia con la reproducción de los progenitores y la captura de nauplios o con el cultivo en incubadora de semillas o nauplios libres de patógenos específicos (SPF) y/o resistentes (SPR); son criados en incubadoras hasta su etapa de post larva (PL) a los 10 a 15 días de cultivo. Luego son transferidos a tanques de cultivo larval donde el cultivo puede ser de tipo extensivo (4 a 10 PL/m<sup>2</sup>), semi-intensivo (10 a 30 PL/m<sup>2</sup>), intensivo (60 a 300 PL/m<sup>2</sup>) y súper intensivo (300 a 450 PL/m<sup>2</sup>); la densidad poblacional de cultivo genera un aumento en la tecnificación y generación de residuos causados por la producción de langostinos. Actualmente en el Perú el cultivo de langostinos se encuentra en crecimiento pasando de cultivo semi intensivo a intensivo, por lo cual la generación de residuos también se encuentra en aumento (19,28).

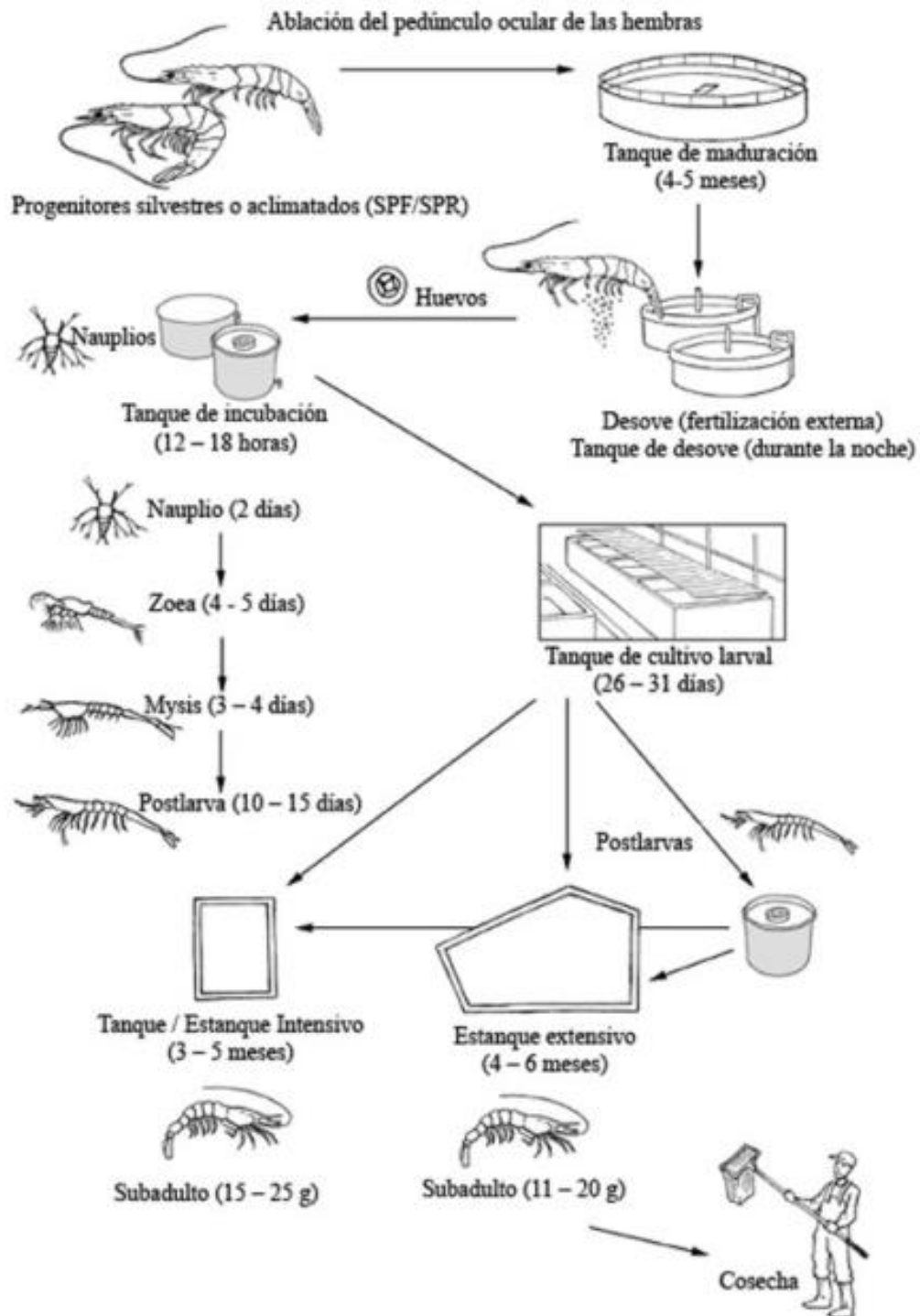


Figura 2. Proceso de cultivo y cosecha del langostino.  
Imagen extraída del Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO (2006)

- Procesamiento

El langostino una vez cosechado es lavado, pesado e introducido en agua helada de 0 a 4°C. Luego se agrega metabisulfato de sodio para evitar melanosis y cabeza roja; puede ser procesado o conservado a -10°C. Durante su procesamiento se separa el abdomen del exoesqueleto y viseras, siendo el abdomen el 40% en peso del animal y las vísceras con el exoesqueleto el 60% del mismo; el abdomen es conservado en refrigeración hasta su empaque y comercialización, mientras que los residuos son almacenados hasta ser desechados al ambiente o en algunos casos vendidos como suplemento de alimento animal o como fertilizante (19,27,28).

**2.1.4. Situación de la industria langostinera en el Perú:**

En el Perú la industria de langostinos se encuentra en constante crecimiento desde el año 2005 como se aprecia en la Tabla 3, alcanzando una cosecha de 20 441 TM, una producción de 15 835.29 TM y exportaciones de 20 062 TM en 2016 (2). Las exportaciones de langostinos representaron el 58% de las exportaciones acuícolas del país en el año 2003 (9) y el 70.64% de las mismas en el año 2016 (2). Durante el procesamiento del langostino el 40% de su peso es comercializado y corresponde al abdomen (comercialmente llamado cola); el 60% restante es considerado residuo (24,29,30) siendo la mayor parte exoesqueletos, mayormente desechados al ambiente. Los residuos son una gran fuente de diferentes productos con valor comercial como astaxantina, quitina, quitosán, carbonato de calcio, entre otros (11,12,29). La industria de langostinos sigue una tendencia creciente de producción y exportaciones (tabla 3, figura 3), por lo tanto, también se ha incrementado la cantidad de residuo generado por este sector industrial.

Tabla 3. Cosecha, producción y exportaciones de langostinos en el Perú del 2006 al 2016<sup>TM</sup>.

Actividad anual	Cosecha (TM)	Producción (TM)	Exportaciones (TM)
2006	9 527	6 434.01	7 555
2007	11 657	8 096.81	9 023
2008	13 314	9 091.67	9 590
2009	13 425	8 313.7	13 370
2010	13 598	8 680.48	9 932
2011	16 379	11 037.65	15 404
2012	17 801	12 449.74	16 385
2013	17 883	10 536.88	16 536
2014	21 484	14 151.79	19 028
2015	21 183	12 549.01	22 017
2016	20 441	15 835.29	20 062

Fuente: PRODUCE (2015-2016)



Fuente PRODUCE (2015-2016)

Figura 3. Cosecha, Producción y Exportaciones de langostinos en el Perú del 2006 - 2016 (TM).

### 2.1.5. Aprovechamiento de residuos de langostinos (*Litopenaeus vannamei*):

Los residuos de langostino son fuente de diversos productos entre ellos el biopolímero quitina y su derivado quitosán, de gran importancia debido a su empleo en las industrias farmacéuticas, biomédicas, alimentarias, textiles, cosméticas, agrícolas, ganaderas y en el tratamiento de aguas residuales (31–33). Uno de los procesos más importantes o críticos para la obtención de estos productos es la desproteinización (DP) el cual en la actualidad se lleva a cabo con una base fuerte, hidróxido de sodio (NaOH) al 4% por 24 horas, a 95°C(16), dado que el NaOH permite remover proteínas, lípidos y pigmentos del residuo(16,34–36). Sin embargo, estos métodos químicos podrían causar la despolimerización de los productos y generar sustancias corrosivas y peligrosas para el ambiente (18,37).

La desproteinización (DP) puede ser realizada por métodos biotecnológicos que involucran microorganismos o enzimas comercialmente puras. Las enzimas proteolíticas catalizan la hidrólisis de los puentes peptídicos de la proteína ligada a los tejidos de los residuos de langostinos, permitiendo así que las proteínas sean separadas. Sin embargo, el uso de enzimas comercialmente puras representa un elevado costo de producción para la industria siendo este el mayor inconveniente del método (38,39).

Por otro lado, el uso de microorganismos presenta una alternativa que podría ser más económica y ecológicamente amigable. Algunas cepas son ya conocidas por tener actividad proteolítica, como *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. marcescens*, entre otras. La acción microorganismos mediante hidrólisis enzimática, permite desproteinizar los residuos y aunque esta estrategia es la más viable, los tiempos de bioproceso reportados aún siguen siendo extensos, de 100 a 144 horas (12,23,40,41).

## 2.2. Hidrólisis Enzimática

### 2.2.1. Enzimas

Las enzimas son moléculas proteicas de alto peso molecular producto de la unión de aminoácidos mediante enlaces peptídicos, que permiten la transformación de sustancias en los sistemas biológicos preservando su funcionalidad e integridad. Cada reacción bioquímica implicada que en el metabolismo celular requiera ser catalizada por un tipo de enzima específica, es por ello que existen enzimas para casi cualquier reacción química descrita (42). Las enzimas actúan como catalizadores biológicos y permiten acelerar procesos igual que los catalizadores químicos, con la diferencia de que estas tienen una alta especificidad, capacidad de ser reguladas y de generar segundos productos sin residuos o un mínimo de ellos, que en su mayoría son biodegradables (43,44). Las enzimas pueden ser obtenidas o aisladas a partir de microorganismos, animales y plantas, entre otros (42,45). Durante la década de los 1900s las enzimas eran extraídas a partir de órganos animales (42). En 1984 se logró la primera producción de enzimas microbianas, siendo Jokichi Takamine quien usó *Aspergillus oryzae* para la producción de takadiastasa una mezcla de amilasas y proteasas (45).

### 2.2.2. Hidrólisis

Hidrólisis es una reacción química, que puede ser ácida y/o básica, durante la cual el agua se separa en ion hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ) y en el ion hidrógeno ( $\text{H}^+$ ) o hidronio ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ), ambos altamente reactivos, lo cuales al encontrarse con compuestos como bases y ácidos reaccionan, dando como resultado la solubilidad, formación y el grado de reacción de sales y otros compuestos (46). En química orgánica, hidrólisis es la reacción por la cual las moléculas de agua separan grandes moléculas al romper sus enlaces covalentes, permitiendo así que dicha molécula se separe en sus componentes de menor tamaño siendo estas moléculas funcionales y contienen los iones provenientes del agua. Como ejemplo se menciona los jarabes de glucosa provenientes de almidón, donde los carbohidratos por medio de hidrólisis son convertidos en moléculas de azúcar formando un jarabe (47).

La hidrólisis de proteínas se puede dar por acción química o por enzimas; en el caso de reacciones químicas los enlaces peptídicos de las proteínas son rotos por acción de

ácidos o bases fuertes, las cuales pueden conllevar a efluentes corrosivos y peligrosos por lo cual su uso es ecológicamente inviable. Además la hidrólisis química de proteínas puede generar productos inespecíficos, reducir la actividad biológica y las cualidades nutricionales del hidrolizado (15,46,48), por lo cual surge la hidrólisis enzimática como alternativa.

### **2.2.3 Hidrólisis enzimática de proteínas**

La hidrólisis enzimática es la ruptura de enlaces químicos por acción de enzimas. Las enzimas que permiten esta acción son las proteasas, esterases y glicosidasas (42); esta forma de hidrólisis presenta ventajas sobre la hidrólisis química ácida o alcalina, dada la selectividad que presentan las enzimas sobre enlaces particulares del sustrato que se desea hidrolizar evitando por lo tanto la formación de productos inespecíficos por efecto de la degradación, los cuales inevitablemente aparecen durante la hidrólisis química y que podrían llegar a ser tóxicos (49,50). La hidrólisis enzimática de proteínas es un proceso en serie que se lleva en las proteínas por acción de proteasas; estas permiten romper los enlaces peptídicos de las proteínas (corte proteolítico o hidrólisis de proteínas) (17). Mediante ese proceso las proteínas son llevadas hasta peptonas, péptidos y aminoácidos, donde cada uno de estos productos difieren por su capacidad de solubilidad, directamente relacionada a su tamaño molecular medio y su relación amino/nitrógeno total (49,50). En la actualidad se cuenta con un gran número de proteasas comerciales que provienen de animales, vegetales y microorganismos, para su uso en desproteínización; un ejemplo de estas son Tripsina, Quimiotripsina, Newlasa, Protamex™ (Novozyme), Neutrasa (Novozyme), Pronasa, Alcalaza®(Novozyme), entre otras (17,50,51).

### 2.3 Diseño experimental (diseño factorial)

El diseño factorial es una de las familias de diseño experimental de mayor eficacia y versatilidad tanto en la industria como en la investigación. Es un diseño robusto que permite estudiar la influencia de los efectos individuales y de interacción de múltiples factores, sobre una o varias respuestas. Este diseño permite determinar qué factores y niveles ejercen un efecto individual o de interacción sobre el proceso en estudio para que se lleve a cabo de la mejor manera (52–54). Este tipo de diseño es usado como un paso previo a la optimización, pues permite evaluar y detectar qué variables o factores (cuantitativos o cualitativos) son los más importantes o los que mayor influencia tienen sobre el proceso en estudio y que deben ser optimizados (52–54). El diseño se realiza seleccionando niveles y factores, siendo que los niveles deben ser al menos 2 y máximo 3, mientras que los factores deben ser al menos 2. El diseño permite incrementar el número de factores sin que aumente el error (53). La familia del diseño factorial se compone de diseños de tipo  $2^k$ ,  $3^k$  y fraccionados, donde el nombre del diseño describe el número de tratamientos a realizarse; en estos el número corresponde a los niveles de los factores y “k” al número de factores a emplearse.

#### 2.3.1. Diseño factorial $2^3$

El diseño factorial  $2^3$  corresponde a tres factores y dos niveles por cada uno. Permite evaluar los efectos principales y de interacción de 3 variables con respecto de 1 o más variables respuesta o dependientes y así investigar siete efectos de interés en la matriz de diseño (Tabla 4). Ello plantea siete hipótesis nulas ( $H_0$ ) emparejadas con sus correspondientes hipótesis alternativas (53–55), que son comprobadas mediante un análisis de varianza (ANOVA). Para validar el diseño se debe cumplir los supuestos de normalidad, varianzas iguales (homocedasticidad), independencia y colinealidad de los factores (multicolinealidad) (52–55). El diseño es además analizado mediante un modelo de regresión lineal múltiple a partir de los datos obtenidos en el ANOVA y la validación de los supuestos permitiendo obtener una ecuación polinomial de primer orden para predecir el comportamiento de la respuesta en estudio, dentro de los niveles de los factores escogidos (área experimental).

### 2.3.1.1. Interpretación del ANOVA

Todos los efectos cuyo valor de probabilidad (valor-p) sea menor que el valor de significancia escogido ( $\alpha$ ) son estadísticamente significativos, aquellos que no sean significativos son ignorados y se realiza un segundo análisis de varianza conservando aquellos efectos que tenían un valor-p por debajo de  $\alpha$  o muy cercano a este. Las repeticiones de los experimentos en los diseños factoriales, sugieren la necesidad de realizar réplicas a la matriz experimental, no obstante, esta se hace cuando interesa calcular la interacción triple ABC, la cual según lo reportado por Gutiérrez y De la Vara (2012) suele tener una influencia muy pequeña en la explicación del proceso, por lo cual puede ser ignorada. Por el contrario, los efectos que explican y tienen mayor influencia sobre los procesos en estudio son los efectos principales y de interacción doble (53,56).

Tabla 4. Tabla de efectos de un diseño factorial de tipo  $2^3$

Factor 1 (A)	Factor 2 (B)	Factor 3 (C)	AB	AC	BC	ABC	Combinaciones de tratamientos (Notación de Yates)
-	-	-	+	+	+	-	(1)
+	-	-	-	-	+	+	a
-	+	-	-	+	-	+	c
+	+	-	+	-	-	-	ac
-	-	+	+	-	-	+	b
+	-	+	-	+	-	-	ab
-	+	+	-	-	+	-	bc
+	+	+	+	+	+	+	abc

### 2.3.1.2. Análisis de regresión lineal múltiple

El análisis de regresión lineal múltiple genera un modelo de regresión que permite predecir el comportamiento de la respuesta en función de los diferentes valores de los factores estudiados. El modelo de regresión está dado por el modelo de los efectos como se aprecia en la ecuación a continuación propuesta por Gutiérrez y de la Vara (2012).

$$\hat{Y} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

Donde  $\hat{Y}$  es la respuesta predicha; i, j y k representan los factores en estudio;  $\mu$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  representan los efectos individuales y la combinación de estos últimos representan los efectos de interacción.

- Coeficientes de determinación

Los coeficientes de determinación permiten conocer la variabilidad del modelo estudiado con respecto a la variación total experimental, y así cuantificar la variabilidad en los datos obtenidos experimentalmente, que es explicada por el modelo (53,54). Los coeficientes de determinación en el diseño factorial son calculados mediante las siguientes ecuaciones descritas por Gutiérrez y De la Vara (2008):

$$R^2 = \frac{SC_T - SC_E}{SC_T} * 100$$

$$R_{aj}^2 = \frac{CM_T - CM_E}{CM_T} * 100$$

En los modelos que emplean múltiples factores como es el caso del diseño factorial, es preferible usar el coeficiente de determinación ajustado ( $R^2_{aj}$ ) en lugar del coeficiente de determinación ( $R^2$ ), debido a que el  $R^2_{aj}$  incrementa o disminuye su valor dependiendo de si los factores en estudio aportan o no a la explicación de la variabilidad de la respuesta. El  $R^2$  no varía en función al aporte de los factores para explicar la variabilidad de la respuesta estudiada; sino,  $R^2$  tiende a incrementarse a medida que se analizan más factores, lo cual podría conllevar a afirmaciones falsas o erróneas. Un coeficiente de determinación ajustado ( $R^2_{aj}$ ) igual o superior a 70% permite afirmar que las variaciones estudiadas, explicarían el comportamiento de los resultados; valores de  $R^2_{aj}$  menores a 70 %, indicarían que el comportamiento de los resultados podría deberse a variables fijas o nulas no incluidas en el modelo (52,53).

### 2.3.1.3. Validación de los supuestos

La validación de los supuestos de normalidad, homocedasticidad (igualdad de las varianzas), independencia y multicolinealidad, se realiza con la finalidad de que las conclusiones e interpretaciones obtenidas del ANOVA y de regresión lineal múltiple, puedan ser validadas. Los residuos, que son la diferencia entre los valores reales y los valores predichos por el diseño, son usados como una muestra aleatoria de una distribución normal, con media cero y varianza constante, para verificar los supuestos (52,53).

- Análisis de normalidad

Determina si el comportamiento de los datos obtenidos sigue una distribución normal. Para ello se realiza el análisis de Anderson-Darling que indica que cuando los residuos siguen una distribución de tipo normal, el valor del estadístico de Anderson-Darling es cada vez menor y el valor de significancia es mayor al valor de probabilidad escogido ( $\alpha=0.05$ ) (52,53).

- Análisis de homocedasticidad o igualdad de las varianzas

Consiste en verificar que todos los tratamientos en estudio tengan la misma varianza y que esta no afecte a la varianza del error, quiere decir que los coeficientes estimados para la regresión lineal múltiple son los más eficientes y no sesgados(52,53). Este supuesto puede verificarse mediante la prueba de Bartlett, la cual solo puede ser usada cuando se haya cumplido el supuesto de normalidad. El supuesto de homocedasticidad es válido cuando el valor de probabilidad es mayor al escogido ( $\alpha=0.01$ )(52,53). Si bien el cumplimiento de este supuesto es importante, su incumplimiento no influye de manera significativa siempre y cuando los valores de probabilidad sean significativamente menores al valor de probabilidad escogido ( $\alpha=0.01$ ) en el análisis de varianza (ANOVA)(53,54).

- Análisis de Independencia

Permite evaluar y detectar deficiencias en la planeación y ejecución del experimento, indica si se aplicó erróneamente el principio de aleatorización en las pruebas experimentales y si factores o variables nulas o fijas afectaron a la respuesta estudiada (52,53,56). Este supuesto puede verificarse mediante el método gráfico, el cual consiste en graficar en el eje horizontal el tiempo (orden de las corridas) con respecto de los residuos (eje vertical); si los puntos se distribuyen formando una tendencia o patrón definido, se determina que existe una correlación entre los errores y que el supuesto no se cumple; si se distribuyen aleatoriamente sin formar un tendencia o patrón (Figura 4) se determina que el supuesto se cumple (56).

- Análisis de multicolinealidad (colinealidad de las variables)

Es un supuesto empleado en la ecuación de regresión y permite determinar si algunas variables incluidas en el modelo están correlacionadas con otras; esta situación puede conducir a errores dado que la multicolinealidad incrementa la varianza de los coeficientes de regresión de la ecuación de predicción haciendo que esta sea inestable, provocando que los coeficientes generados por una variable puedan ser vistos como insignificantes cuando son significativos para explicar la respuesta. Si este supuesto no se cumple puede conducir a defectos en la precisión del modelo. El supuesto se evalúa mediante el factor de inflación de varianza (FIV) que permite determinar hasta qué punto las varianzas de los coeficientes de regresión se incrementan a causa de la colinealidad de los factores y el error (52–54,56). Este es calculado mediante las siguientes ecuaciones descritas por Gutiérrez y De la Vara (2008):

$$FIV (\text{variables}) = \frac{1}{1 - R^2_{aj}} \qquad FIV (\text{modelo}) = \frac{1}{1 - R^2}$$

Si FIV es igual a 1 no existe multicolinealidad; si está entre 1 a 5 la multicolinealidad es moderada; y cuando es igual o superior a 10 la multicolinealidad es alta.

## CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Campo de Investigación

#### 3.1.1 Ámbito Geográfico

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología y del Laboratorio Físico Químico del Instituto Tecnológico de la Producción (ITP), Callao-Perú. El periodo de trabajo fue de abril del 2018 a febrero del 2019.

#### 3.1.2 Unidades de Estudio

Las unidades de estudio para este trabajo fueron residuos de langostinos (*Litopenaeus vannamei*) proveídos por una empresa colaboradora al Instituto Tecnológico de la Producción.

### 3.2 Materiales

#### 3.2.1 Materia Prima

Fueron utilizados como materia prima residuos de langostinos (*Litopenaeus vannamei*) consistentes en exoesqueleto del abdomen y exoesqueleto del cefalotórax.

#### 3.2.2 Material Microbiológico

Las cepas bacterianas empleadas en el estudio fueron previamente aisladas, identificadas y almacenadas (20) en el banco de cepas del Laboratorio de Biotecnología del Instituto Tecnológico de la Producción (ITP) y pertenecen a la colección del mismo. Estas cepas fueron escogidas entre otras de la colección, dadas sus características enzimáticas y su capacidad de crecimiento en consorcio. El cultivo y reactivación de las cepas fue realizado en medios específicos.

#### 3.2.3 Material Enzimático:

La enzima utilizada para realizar los controles positivos en los bioprocesos de hidrólisis de residuos de langostinos en el presente estudio fue Protamex™ (P0029, Sigma-Aldrich). Protamex es un complejo de enzimas proteolíticas de tipo hidrolasa

producida por especies del género *Bacillus*, para hidrólisis de proteínas en la industria alimentaria (57).

### 3.3 Métodos

#### 3.3.1 Obtención de la muestra

Las muestras de residuos de langostinos (*Litopenaeus vannamei*), estaban constituidas por exoesqueleto del cefalotórax, exoesqueleto del abdomen y vísceras (Figura 4). En el cefalotórax se encontraban las vísceras, ojos, antenas, anténulas, maxilópodos y pereópodos del animal (Figura 4-C); en el abdomen se encontraban los pleópodos (Figura 4-B); y en el telson, los urópodos (Figura 4-A). Lotes de aproximadamente de 20 kg de muestras fueron recibidos en bloques de 1 Kg congelados y glaseados (Figura 5) procedentes de una empresa dedicada a la producción y comercialización de productos hidrobiológicos ubicada en Tumbes (Perú). Las muestras fueron mantenidas en una congeladora (Friolux) hasta el momento de su uso.

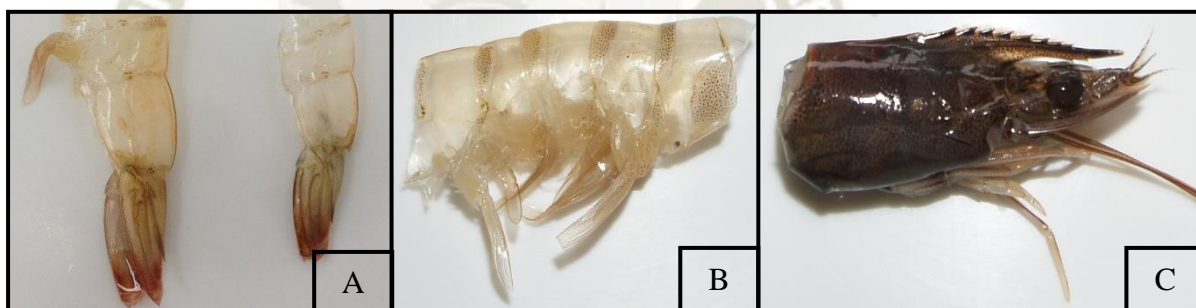


Figura 4. Residuos de langostinos (*Litopenaeus vannamei*), tomada de una muestra, donde A es el exoesqueleto del Telson, B el exoesqueleto del abdomen y C el exoesqueleto del cefalotórax.



Figura 5.- Residuos de langostinos (*Litopenaeus vannamei*) congelados y glaseados.

Las muestras previo a su uso en los bioprocesos fueron limpiadas y preparadas siguiendo el procedimiento descrito a continuación.

- **Descongelado:** Se realizó con una corriente de agua a temperatura ambiente, durante 15 minutos.
- **Separado:** Se realizó para separar las vísceras, antenas y todo tejido blando del exoesqueleto; asimismo, para separar el músculo del exoesqueleto del abdomen y el telson como se aprecia en la figura 6.
- **Triturado:** Se realizó para separar restos musculares y otras partículas remanentes, empleando una licuadora de laboratorio (Waring).
- **Filtrado:** Se realizó para separar partículas no disueltas, empleando un papel filtro de 2 mm (Whatman No. 2).



Figura 6.- Separación de restos musculares del exoesqueleto de langostinos (*Litopenaeus vannamei*).

- **Secado:** Se realizó para eliminar el agua libre de la muestra evitando la proliferación de microorganismos y facilitar su almacenamiento. Se realizó en una estufa marca Binder siguiendo el método gravimétrico para determinación de humedad, descrito por la FAO (1986) y Pacheco (2010) modificando la temperatura de 100°C a 60°C por 16 horas, para evitar alteraciones estructurales en la materia prima por efecto de la temperatura (6).
- **Envasado:** Se realizó en bolsas de polietileno (PE) de alta densidad, selladas herméticamente sin espacio de cabeza como se aprecia en la figura 7.

De las etapas anteriores se obtuvo una materia prima lista para el bioproceso de hidrólisis enzimática, la cual fue denominada ET (Exoesqueleto total).



Figura 7.- Muestra de ET en bolsa de PE.

### 3.3.2 Obtención de cepas para su uso en consorcios bacterianos

Las cepas bacterianas empleadas en los consorcios bacterianos, fueron obtenidas del cepario de microorganismos del Laboratorio de Biotecnología, estudiadas por Buleje en el año 2017. Estas cepas fueron seleccionadas en razón de sus características enzimáticas y su capacidad de crecimiento en consorcio. Se tomó como principal criterio de selección la capacidad enzimática tipo proteolítica y capacidad quitinolítica baja o nula, con el objeto de promover el consumo de proteína en los residuos de langostinos sin alterar la quitina presente en los mismos.

### 3.3.3 Reactivación de consorcios bacterianos y preparación de inóculo

Para la reactivación de los consorcios bacterianos, así como la preparación de inóculo de los mismo se siguió el procedimiento descrito por Gutiérrez-Jiménez y colaboradores (59). Se establecieron 5 consorcios bacterianos (CB01, CB02, CB03, CB04 y CB05), cuyas cepas fueron reactivadas a partir del cepario de microorganismos del Laboratorio de Biotecnología y cuya composición se encuentra en proceso de patente.

El medio de cultivo Caldo Tripticasa Soya (TSB) suplementado con 3% de cloruro de sodio (Anexo 1) fue utilizado para reactivar las cepas que conformaron cada consorcio, estas fueron cultivadas a 35°C durante 9 horas, luego estriadas en placas con medio de cultivo Agar Tripticasa de Soya (TSA) suplementado con 3% de cloruro de sodio (Anexo 1) e incubadas a 35°C durante 9 horas siguiendo las recomendaciones descritas por Gutiérrez-Jiménez y colaboradores. Las cepas que conformaban los consorcios

bacterianos fueron cultivadas hasta una concentración de  $10^7$  UFC/mL para ser consorciadas e inoculadas al bioproceso.

### 3.3.4 Diseño y construcción de frascos de Biorreacción

Frascos de biorreacción fueron construidos siguiendo los modelos propuestos por Whiteley (1997) y Harmand (2017). Para ello frascos de vidrio de 500 mL de capacidad, resistentes al calor y presión fueron adaptados para el ingreso de oxígeno, inóculo, toma de muestra y salida de gases como se aprecia en la figura 8. La entrada de inóculo y toma de muestra fue realizada empleando una llave de venoclisis de tres vías (Figura 8 y 9), la cual permitió que durante estos procesos se mantuviera la esterilidad del sistema evitando así la contaminación cruzada.

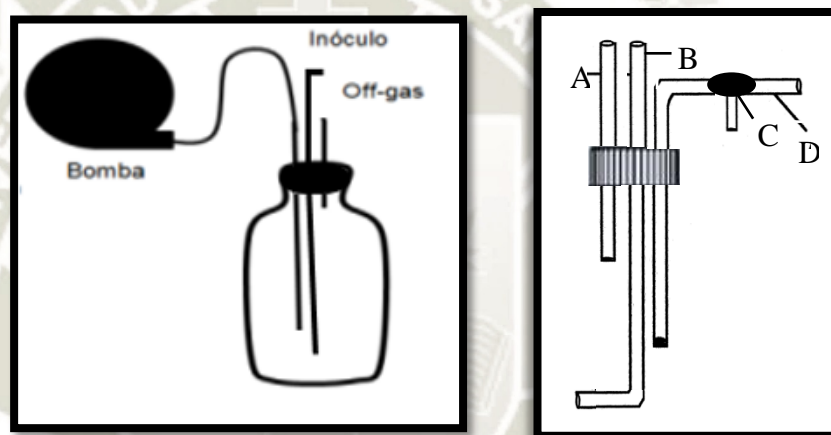


Figura 8. Representación gráfica de los frascos de Biorreacción y sus accesorios. A: salida de  $\text{CO}_2$  u Off-gas; B: ingreso de Oxígeno; C: llave de venoclisis de tres vías y D: ingreso de inóculo y toma de muestra.

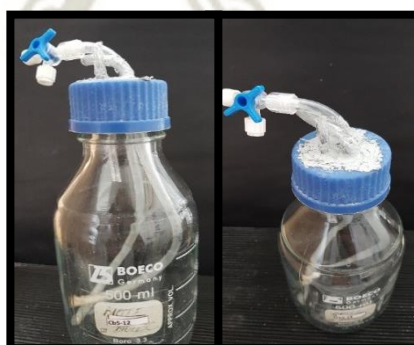


Figura 9.- Frascos de biorreacción construidos bajo un diseño simple.

### 3.3.5 Descripción del bioproceso de hidrólisis enzimática bacteriana

Las condiciones de los bioprocesos de hidrólisis fueron establecidas para cada consorcio bacteriano con respecto de sus variables dependientes (tasa de desproteínización y grado de hidrólisis), bajo un diseño experimental de tipo factorial  $2^3$ , el cual fue formulado en función de las variables independientes: temperatura de biorreacción, tiempo de biorreacción y volumen de inóculo de los consorcios bacterianos CB1, CB2, CB3, CB4 y CB5 (Tabla 5).

Tabla 5. Variables independientes, dependientes e indicadores de los bioprocesos de hidrólisis enzimática del presente trabajo de investigación.

Variables Independientes	Indicadores
Tiempo de biorreacción	Horas
Temperatura de biorreacción	° Celsius
Volumen de Inóculo	mL ( $10^7$ UFC)
Variables Dependientes	Indicadores
Tasa de desproteínización	%Desproteínización / hora
Grado de hidrólisis	g Glicina/ g Muestra

Todas las biorreacciones en estudio fueron llevadas a cabo en un agitador orbital con incubación (Thermo Fisher). Cada frasco de biorreacción contenía  $18 \pm 1$  g de residuos (ET), 126 ml de solución agua de mar al 75% (94.5 mL de agua de mar y 31.5 mL de agua destilada) e inóculo bacteriano correspondiente a cada tratamiento (2 y 6 mL de un consorcio bacteriano a una concentración de  $10^7$  UFC). Los bioensayos fueron llevados a cabo condiciones de tiempo y temperatura predeterminadas para cada tratamiento (16 y 24 h; 25 y  $35^\circ\text{C}$ ) como se observa en la Tabla 6 y a una agitación constante de 170 rpm (Figura 10). Asimismo, se llevó a cabo controles positivos y negativos a las mismas condiciones de tiempo y temperatura (16 y 24 h; 25 y  $35^\circ\text{C}$ ) (Anexo 2). Los controles positivos y negativos contenían básicamente  $18 \pm 1$  g de residuos (ET) y 126 ml de solución agua de mar al 75% (94.5 mL de agua de mar y 31.5 mL de agua destilada); además los controles positivos contenían 3.75 mg de Protamex™ (según indicaciones de la ficha técnica del producto).

Los productos obtenidos de cada bioproceso fueron esterilizados mediante una autoclave (Yamato) a  $121^\circ\text{C}$  por 20 minutos con la finalidad de detener la biorreacción y eliminar la posibilidad de peligro biológico durante los análisis posteriores.



Figura 10. Bioproceso de hidrólisis en operación.

### 3.3.6 Ensayos realizados

#### 3.3.6.1 Determinación del rendimiento de la materia prima ET.

El rendimiento fue determinado mediante una modificación del método gravimétrico para la determinación del contenido de humedad descrito por la FAO (1986). Se pesó la muestra de residuo descongelado, en una balanza electrónica (Ohaus Scout-pro sp202), se depositó en una bandeja de aluminio y se llevó a una estufa (Binder) a 60 °C por 24 horas. Luego, la fracción fue transferida a un vaso de precipitado de 50 mL y llevada a un desecador por 30 minutos hasta alcanzar la temperatura ambiente; finalmente fue pesada hasta obtener peso constante. El rendimiento fue determinado mediante la siguiente ecuación descrita por la FAO en 1986:

$$\text{Rendimiento} = \left( \frac{P_i - P_f}{P_i} * 100 \right) - 100$$

Donde:  $P_i$  es el peso inicial del ET previo al bioproceso de hidrólisis y  $P_f$  es el peso final del ET luego del bioproceso de hidrólisis.

#### 3.3.6.2 Análisis químico proximal

El análisis químico proximal se realizó en los residuos (ET) como en las fracciones insolubles obtenidas del bioproceso, siguiendo los métodos descritos por la FAO (1986) y Pacheco (2010).

- A. Determinación del contenido de humedad (%H): Método gravimétrico modificado (FAO, 1986).

Se pesó de 3 a 4 ± 0.1 g de muestra (ET o producto de hidrolizado) la cual fue depositada en un pesa filtro (PF) por duplicado y llevada a una estufa (Binder) a 60°C por 24 horas. Luego, la muestra fue llevada a un desecador durante 30 minutos para enfriar a temperatura ambiente y finalmente fue pesada hasta obtener un peso constante. El porcentaje de humedad fue determinado por la ecuación a continuación descrita por la FAO (1986) y Pacheco (2010):

$$\%H = \left[ \frac{PF \text{ con muestra húmeda} - PF \text{ con muestra Secca}}{\text{Peso muestra}} \right] * 100$$

- B. Determinación del contenido de cenizas (%C): Método de Incineración en mufla modificado (FAO, 1986; Pacheco, 2010).

Se pesó de 2 a 5 ± 0.1 g de muestra (ET o producto de hidrolizado) en un crisol de porcelana, se llevó a una cocinilla eléctrica (Barnstead) a 100°C durante 30 minutos para carbonización hasta que el contenido del crisol se tornó negro; luego fue incinerada en una mufla (Barnstead) a 550 °C durante 8 horas. La muestra fue llevada a un desecador durante 30 minutos hasta que alcanzó temperatura ambiente; fue pesada hasta obtener peso constante. El contenido de ceniza fue determinado con la siguiente ecuación descrita por la FAO (1986) y Pacheco (2010):

$$\%C = \left[ \frac{\text{Peso crisol concenizas} - \text{Peso del crisol}}{\text{peso muestra}} \right] * 100$$

- C. Determinación del contenido de grasa cruda (%G): Método de extracción Ácida-Soxhlet modificado (AOAC, 1990).

La muestra fue tratada previamente a la extracción por Soxhlet (AOAC, 1990). Se pesó de 2 a 5 g de muestra (ET o producto de hidrolizado) en un matraz al cual se le adicionó 10 mL de agua destilada y 10 mL de ácido clorhídrico (HCl) 6N con algunas perlas de ebullición. El matraz fue llevado

a una cocinilla eléctrica (Barnstead) y conectado a un sistema refrigerante; se calentó por 45 minutos con intervalos de agitación cada 10 minutos; se adiciono 1 g de celite, se agitó y se filtró empleando un papel filtro de 2 mm de diámetro (Whatman No. 2). El papel filtro con celite y grasa absorbida fueron depositados en una placa de Petri y llevados a una estufa (Binder) a  $100 \pm 2$  °C por 1 hora. Luego, se realizó la extracción por Soxhlet; el papel filtro con celite seco fueron envueltos en otro papel filtro de 2 mm de diámetro y depositado en un tubo de extracción (TE) del equipo Soxthern; se adicionó 40 mL de hexano a cada TE; se colocó en el equipo y se extrajo la muestra con el solvente por un periodo de 6 a 8 horas. Luego, el TE fue llevado a una campana de extracción para evaporar el resto de hexano. Se llevó a secar en una estufa a  $100 \pm 2$  °C por 30 minutos, se dejó enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente y se pesó hasta obtener un peso constante. El contenido de grasa cruda fue determinado por la siguiente ecuación descrita por la AOAC en 1990:

$$\%G = \left[ \frac{\text{Peso TE solo} - \text{Peso TE con grasa}}{\text{Peso de la muestra}} \right] * 100$$

D. Determinación de nitrógeno total (%Nt): método semi micro Kjeldahl (Pacheco, 2010).

Se pesó de 2 a  $3 \pm 0.1$  g de muestra (ET o producto de hidrolizado), se añadió 25 mL de ácido sulfúrico y 15 g de catalizador (1:10 de sulfato de cobre con sulfato de sodio respectivamente). La muestra fue llevada a digestión en un digestor Kjeldahl (Gerhardt) hasta alcanzar un color transparente; luego se dejó enfriar al ambiente y se transfirió a una fiola de 100 mL enrasada con agua destilada. Se tomó 5 mL de la solución digerida, se depositó en un tubo Kjeldahl y se agregó 5 mL de hidróxido de sodio al 40%; esta mezcla fue llevada a un destilador Kjeldahl (Gerhardt) y colectada en un erlenmeyer de 100 mL conteniendo 5 mL de ácido sulfúrico 1 N con 6 a 8 gotas de indicador de Tashiro (solución 2:1 de rojo de metilo 0.1% y azul de metileno 0.1%); la solución fue titulada con hidróxido de sodio 0.02 N hasta alcanzar

un color verde botella. El nitrógeno total fue calculado mediante la siguiente ecuación descrita por la FAO (1986) y Pacheco (2010):

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

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

E. Determinación de proteína (%P): método teórico descrito por Díaz-Rojas y colaboradores (2006).

Se determinó el contenido de proteína en cada muestra siguiendo el sistema de ecuaciones descrito por Díaz-Rojas y colaboradores (2006). Los resultados de contenido de humedad, ceniza, grasa, nitrógeno total y grado de acetilación de cada muestra fueron incluidos en el sistema de ecuaciones utilizado y descrito a continuación:

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

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

Donde: %Q es el porcentaje de quitina; %P es el porcentaje de proteína; Cp y Cq son coeficientes de conversión que relacionan la fracción másica del nitrógeno proteico y nitrógeno quitinolítico; k es la suma de los compuestos no nitrogenados.

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

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

$$Cp = 6.25$$

Cp es un factor de conversión para proteínas de productos marinos (Cp = 6.25) (58).

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

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

### 3.3.6.3 Análisis bioquímico

#### A. Determinación del grado de hidrólisis (%GH): método del 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno (DNFB).

Se realizó basándose en los métodos descritos por Sanger (1949) y reportados por Dumay (2004). Las fracciones solubles obtenidas en los bioprocesos de hidrólisis fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos en una centrifuga (Sigma). Se tomó 1 mL del sobrenadante, fue diluido en 10 mL de agua destilada; 1 mL de esa dilución fue transferido a un tubo nuevo. Luego, se agregó 1 mL de tetra borato de sodio al 2% y 250 uL de 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno (DNFB). Se homogenizó en un agitador de tubos (Barnstead) y se llevó a incubar en baño maría (J. P Selecta) durante 10 minutos a 60°C. Se añadió 2 mL de HCL 6N para detener la reacción; finalmente la muestra fue leída a 410 nm en un espectrofotómetro (Shimadzu). Se elaboró una curva de calibración empleando glicina a 0, 10, 25, 50, 100, 250 y 500 uL. Los resultados fueron expresados como equivalente de glicina.

#### B. Determinación del Grado de deacetilación (%DD): Método de Titulación potenciométrica.

Se realizó basándose en los métodos reportados por Czechowska-biskup y colaboradores (2012), Hidalgo y colaboradores (2008), y Hernández y colaboradores (2009). Se pesó 0.2 g de muestra la cual fue disuelta en 20 mL de ácido clorhídrico (HCl) 0.1 M y 25 mL de agua destilada; esta mezcla fue llevada a baño maría (J. P Selecta) por 1 hora a 55°C con agitación constante. Luego, fue retirada y titulada con hidróxido de sodio (NaOH) 0.1

M con 3 a 5 gotas de indicador naranja de metilo. Con los puntos de inflexión mayor y menor, la cantidad de grupos amino que se habían protonado fue calculada mediante la siguiente ecuación descrita por Hidalgo y colaboradores (2008), y Hernández y colaboradores (2009):

$$\%NH_2 = \frac{16.1(y - x)}{\%H} * M$$

Donde: 16.1 es un factor asociado al tipo de proteína; y es el punto de inflexión mayor; x es el punto de inflexión menor; %H es el porcentaje de humedad en la muestra; y M es la molaridad del NaOH (0.1).

Luego, se calculó el grado de deacetilación (%DD) por la siguiente ecuación descrita por Czechowska-biskup y colaboradores (2012):

$$\%DD = \frac{\%NH_2}{9.94\%} * 100$$

Donde: 9.94 es el porcentaje teórico de NH<sub>2</sub> en quitosán.

#### 3.3.6.4. Análisis microbiológico

El análisis microbiológico se realizó basándose en el método de conteo en placa descrito por Madigan y colaboradores (2004); este ensayo se realizó con el fin de verificar la viabilidad de las cepas de los consorcios bacterianos inoculadas en los bioprocesos. Para ello se tomó 1 mL de la fracción soluble obtenida de la biorreacción previo a la etapa de esterilización por calor húmedo en autoclave (Yamato), en micro tubos de 1.5 mL, con solución salina, llevando las concentraciones a valores de 10<sup>-6</sup> y 10<sup>-7</sup> UFC. Luego, las muestras fueron sembradas en placas de TSA con 3% de NaCl a 35°C durante 8 horas. Finalmente, se realizó el conteo de colonias.

### 3.3.7. Diseño experimental y Análisis Estadístico

Un diseño experimental tipo factorial  $2^k$  permitió medir el efecto de cada variable de manera individual y de su interacción sobre la respuesta, dada por la tasa de desproteínización (reducción del contenido de proteína por hora) en los residuos de langostinos. Es decir, el diseño permitió evaluar los bioprocesos de hidrólisis, la selección del mejor consorcio microbiano y las mejores condiciones de operación. El tratamiento de los resultados fue realizado mediante análisis de varianza (ANOVA) y regresión múltiple (52,54,56). Asimismo, las tasas de desproteínización obtenidas en cada consorcio bacteriano, fueron comparadas con respecto de los controles positivos y negativos, mediante un análisis de varianza (ANOVA) y comparaciones múltiples de Tukey-Kramer. El procesamiento de datos fue realizado con el programa estadístico Minitab 17.

#### 3.3.7.1. Selección y construcción del Diseño Factorial

El modelo factorial fue seleccionado de acuerdo a la cantidad de variables en estudio, considerándose 3 variables: Tiempo (A), Temperatura (B) y Volumen de Inóculo (C), optando así por un modelo factorial de tipo  $2^3$ , similar al modelo utilizado por Sedaghat y colaboradores (2016), Younes y colaboradores (2012), Bashandy y colaboradores (2016), y Pacheco (2010). Las variables de estudio fueron establecidas en 2 niveles (-1, +1), así como el número de tratamientos para el diseño factorial  $2^3$ , siguiendo las recomendaciones de Montgomery (2009) y Gutiérrez y De la Vara (2012). La Tabla 6 muestra los valores de cada nivel de las variables en estudio.

Tabla 6. Variables de estudio y niveles utilizados para el diseño factorial  $2^3$ .

Variables	Unidades	Niveles de las variables en estudio	
		-1	+1
Tiempo (A)	Horas	16	24
Temperatura (B)	°C	25	35
Volumen de Inóculo (C)	$10^7$ UFC/mL	2	6

Considerando que existe linealidad entre los niveles extremos para este tipo de diseño, se generó una matriz de 8 ensayos a realizar con 3 variables que estudia 7 efectos, 3 efectos principales (A, B, C); 3 interacciones dobles (AB, AC, BC)

y 1 interacción triple (ABC), como se aprecia en la tabla 7. La matriz experimental fue aplicada a cada consorcio microbiano a ser estudiado (Tabla 7 y Anexo 2).

Tabla 7. Matriz experimental del diseño factorial  $2^3$ .

Ensayo	Tiempo (Horas)	Temperatura (°C)	Volumen de Inóculo ( $10^7$ UFC/mL)	Combinaciones de tratamientos (Notación de Yates)
1	16	25	2	(1)
2	24	25	2	a
3	16	35	2	b
4	24	35	2	ab
5	16	25	6	c
6	24	25	6	ac
7	16	35	6	bc
8	24	35	6	abc

\* La notación en Yates representa el total o la suma de las observaciones en cada tratamiento y se expresa en letras minúsculas cuando el factor o factores se encuentran en su nivel alto.

### 3.3.7.2. Análisis del Diseño Factorial

#### A. Análisis de varianza (ANOVA)

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para cada consorcio microbiano, evaluando el efecto principal y de interacción de las variables de estudio sobre la tasa de desproteínización. El ANOVA consideró que los efectos serían significativos cuando el valor de probabilidad (valor p) fuera menor al nivel de significancia elegido de  $\alpha = 0,01$  lo cual permitió determinar cuál fue el mejor tratamiento.

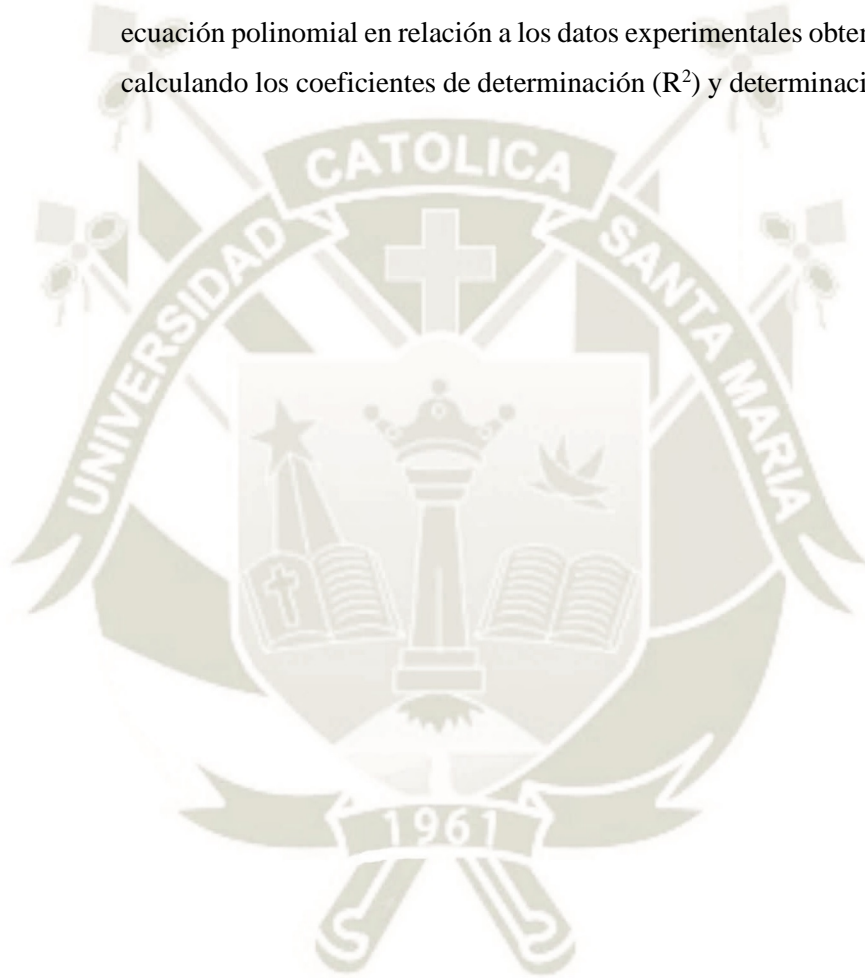
#### B. Estimación del modelo matemático de primer orden

El diseño experimental factorial  $2^3$  permitió la construcción de una ecuación polinomial de primer orden para predecir la tasa de desproteínización dentro del rango de los niveles seleccionados para cada variable. La ecuación fue obtenida mediante análisis de regresión múltiple (análisis de mínimos cuadrados) de los valores promedio de la tasa de desproteínización (y) obtenidos experimentalmente, observándose como influían las variables

tiempo, temperatura y volumen de inóculo, sobre la variable respuesta (tasa de desproteínización). La ecuación se presenta a continuación:

$$\hat{y} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3$$

Donde  $\hat{y}$  es igual a la tasa de desproteínización por hora;  $\beta_0$  es el término independiente;  $\beta_1, \beta_2, \beta_3$  son los coeficientes de regresión lineal;  $X_1, X_2, X_3$  son las variables en estudio Tiempo, Temperatura y Volumen de Inóculo. El ajuste de la ecuación polinomial en relación a los datos experimentales obtenidos, fue evaluado calculando los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) y determinación ajustado ( $R^2_{aj}$ ).



## CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Preparación de la muestra

Se obtuvo una matriz uniforme con un tamaño de partícula  $\leq 1.7$  mm de diámetro, limpia de restos musculares y viseras, denominada exoesqueleto total (ET) (figura 11). El rendimiento inicial de la muestra del estado húmedo al estado seco y procesado fue 10 %, es decir que de 5 Kg de residuos de langostinos congelados y escurridos (húmedos) se obtuvo 0.5 Kg de residuos seco (ET).



Figura 11.- Muestra de exoesqueleto total (ET) de residuos de langostinos (*Litopenaeus vannamei*) posterior a su procesamiento inicial.

Los lotes de residuos de langostino estudiados, presentaron características diferentes entre sí, observándose que algunos exoesqueletos eran más blandos y transparentes que otros. La composición proximal en algunos lotes fue: humedad  $\leq 9\%$ , proteína  $\leq 30\%$ , ceniza  $\leq 30\%$  y grasa  $\leq 2\%$ ; y en otros lotes fue: humedad  $\leq 9\%$ , proteína  $\leq 13\%$ , ceniza  $\leq 27\%$  y grasa  $\leq 1.5\%$  (Anexo 3). Las variaciones observadas entre 10 y 30% en el contenido de proteína, podría haberse debido a la edad y estadio de desarrollo de los langostinos al momento de su cosecha, ya que los exoesqueletos de menor tamaño, tenían una consistencia más frágil y transparente que aquellos de mayor tamaño. Ello podría significar que fueron cosechados poco después de haber pasado por un proceso de exuviación o muda, habiéndose observado que aquellos lotes con residuos de menor tamaño y mayor fragilidad poseían un menor contenido de proteínas (12%) que los más grandes (30%). Esas características concuerdan con lo reportado por Chan y colaboradores

en 1988, quienes reportan que durante el inicio de las etapas de muda (ecdysis) y la etapa de muda en sí (metecdysis), el contenido de proteína tanto en el animal como en el exoesqueleto se reduce y al final de la muda (metecdysis) el exoesqueleto se muestra blando (73). Asimismo, Chan y colaboradores (1988) y De Oliveira y colaboradores (2006) reportaron que durante las etapas posteriores a las mudas (anecdysis), el contenido proteico en el animal aumenta paulatinamente a lo largo de su vida hasta alcanzar su tamaño adulto, existiendo una relación directa entre el contenido de proteína y la edad del animal (73–75). Las muestras de lotes con diferente composición proximal fueron estudiadas con la finalidad de generar conocimiento sobre los niveles de desproteización que se obtendrían con diferentes características de muestra; esos resultados servirán como base para futura aplicación en la industria donde todo tipo de residuo generado debería ser procesado. Goma (2007) y Turton y colaboradores (2018), mencionan los residuos usados como materias primas en la industria, no pasan por un control calidad por lo cual su composición varía entre lotes; se recomienda su análisis previo a su procesamiento (76,77).

#### 4.2. Consorcios bacterianos activados

Un total de 12 cepas bacterianas con capacidad de ser consorciadas y una alta actividad proteolítica fueron seleccionadas (Tabla 8), conformándose 5 consorcios bacterianos (CB01, CB02, CB03, CB04 y CB05) los cuales se encuentran en proceso de patente. Las cepas fueron utilizadas en los bioprocesos, manteniéndose viables y puras como se aprecia en la figura 12.

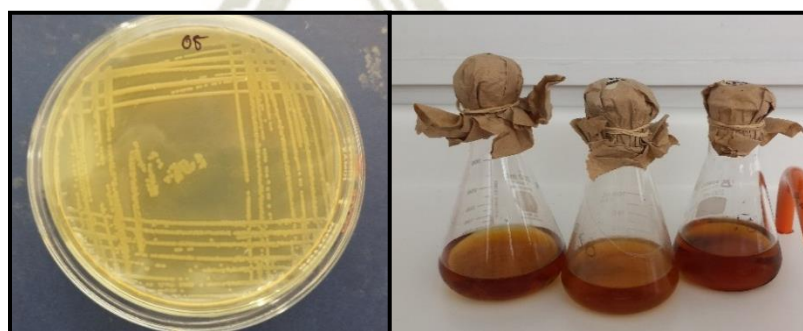


Figura 12.- Cepas microbianas reactivadas en medios TSA y TSB de los consorcios bacterianos en estudio.

Tabla 8. Cepas bacterianas empleadas para la conformación de los consorcios bacterianos.

Consortio Bacteriano	Código de cepas
CB1	RI15-C01, RI15-C02, RI15-C03
CB2	RI15-C03, RI15-C04, RI15-C05
CB3	RI15-C04, RI15-C05, RI15-C06
CB4	RI15-C05, RI15-C07, RI15-C08, RI15-C09
CB5	RI15-C10, RI15-C02, RI15-C11, RI15-C12

### 4.3. Bioproceso de Hidrólisis

Las cepas mostraron crecimiento equivalente a  $10^7$  UFC/mL (Figura 13), medido según procedimientos descritos previamente.



Figura 13.- Cultivo de cepas de los consorcios bacterianos en estudio.

Producto del bioproceso de hidrólisis enzimática a las condiciones de funcionalidad de los frascos de biorreacción (Tabla 9), se obtuvo dos fracciones en cada biorreacción; una de hidrolizado soluble y otra insoluble como se aprecia en la figura 15.

Tabla 9. Características de funcionalidad de los frascos de biorreacción en los bioprocesos en estudio.

Condiciones de Operación	
Temperatura de biorreacción (°C)	25 y 35 (De acuerdo al diseño factorial $2^3$ )
Tiempo de biorreacción o residencia (horas)	16 y 24 (De acuerdo al diseño factorial $2^3$ )
Volumen de Inóculo ( $10^7$ UFC/mL)	2 y 6 (De acuerdo al diseño factorial $2^3$ )
Aireación (vvm)	0.5
Agitación (rpm)	170
Volumen del cultivo (mL)	126
Cantidad de residuo (g)	18
Relación altura/diámetro (H/D)	2

La fracción soluble (Figura 14–A) se encontraba constituida por restos y productos proteicos en solución; y la fracción insoluble (Figura 14–B) conformada por residuos de langostino o ET desproteinizados. Se tomó 2mL de la fracción soluble con una jeringa estéril, a través de la llave de venoclisis para su posterior análisis microbiológico, tras lo cual se comprobó que las cepas empleadas en los consorcios bacterianos mantenían su viabilidad al final de los bioprocesos (Anexo 4). Las fracciones obtenidas fueron esterilizadas por calor húmedo y separadas mediante filtración empleando un papel filtro de 2 a 5 mm de diámetro (Whatman No. 2 y 5) para su posterior análisis. La fase soluble fue rotulada y almacenada en dos tubos cónicos (Falcón) de 50 ml y la fase insoluble en bolsas de polietileno (PE), selladas herméticamente sin espacio de cabeza.

La fracción insoluble fue analizada mediante ensayos de composición proximal (% H, % C, % G y % Nt) y grado de deacetilación (% DD) (Anexo 3). La ecuación propuesta por Díaz-Rojas y colaboradores (2006) permitió determinar los valores reales de proteína remanente en cada muestra; la fracción soluble en cambio fue analizada mediante el ensayo de grado de hidrólisis (% GH) (Anexo 3), para medir la cantidad de productos proteicos en solución, por lo tanto constituyó una forma indirecta de medir la cantidad de proteína remanente en los residuos de langostinos.

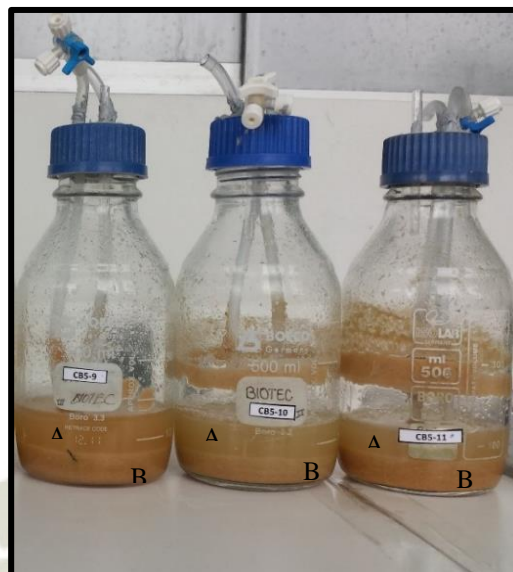


Figura 14. Fracciones obtenidas en los bioensayos de hidrólisis enzimática, donde A representa a la fracción soluble y B a la fracción insoluble.

#### **4.4. Análisis de los bioprocesos con cada consorcio bacteriano y de los efectos de las variables sobre las tasas de desproteinización.**

##### **4.4.1 Análisis del modelo experimental para el consorcio bacteriano 1 (CB1)**

##### **4.4.1.1. Comparación de los bioprocesos de desproteinización con CB01.**

Las tasas de desproteinización de residuos de langostino, obtenidas con el consorcio bacteriano 1 (CB01) fueron analizadas, observándose mediante la desviación estándar (Tabla 10), que los datos se ajustaban a los valores esperados por el modelo. Asimismo, fueron analizadas mediante un análisis de varianza (ANOVA), el cual mostró que existía diferencia significativa entre los bioensayos y los controles en estudio (Tabla 11), donde el valor de probabilidad (valor-p) es menor que el valor de significancia escogido de 0.01.

Tabla 10. Media de las tasas de desproteínización y desviación estándar de los bioensayos, con el consorcio bacteriano 1 (CB01).

Ensayos	Número de replicas	Media de las tasas de desproteínización	Desviación estándar	Intervalos de Confianza (99% IC)
C1-	2	0.09753	0.0000	(0.08668, 0.10837)
C1+	2	0.1979	0.0000	(0.1871, 0.2088)
C2-	2	0.09436	0.0000	(0.08351, 0.10520)
C2+	2	0.2682	0.0000	(0.2573, 0.2790)
CB01-1	2	1.09015	0.0105	(1.07930, 1.10099)
CB01-2	2	0.56291	0.0027	(0.55206, 0.57375)
CB01-3	2	0.97174	0.0081	(0.96090, 0.98259)
CB01-4	2	0.76245	0.0061	(0.75161, 0.77329)
CB01-5	2	1.33460	0.0023	(1.32376, 1.34545)
CB01-6	2	0.58899	0.0067	(0.57815, 0.59983)
CB01-7	2	1.34733	0.0048	(1.33648, 1.35817)
CB01-8	2	1.14980	0.0031	(1.13895, 1.16064)

Tabla 11. ANOVA (one way ANOVA) sobre la tasa de desproteínización (% DP/hora), con el consorcio bacteriano 1 (CB01).

Fuentes de variación	GL	SC	MC	Valor-F	Valor-p	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> aj
Bioensayos CB01	11	4.90627	0.44603	17693.2	0.000		
Error	12	0.00030	0.00003				
Total	23	4.90657				99.99	99.99

Los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia fueron aceptados, dando así validez a los resultados del análisis ANOVA (Tabla 11); las tasas de DP seguían una distribución normal, siendo el valor de Anderson-Darling 0.781 y el valor de probabilidad mayor al valor de significancia escogido de 0.01; la evaluación de homocedasticidad mostró que las tasas de DP no seguían un patrón determinado entre sí; asimismo la prueba de Bartlett dio un valor de probabilidad de 0.909 mayor al valor de significancia escogido de 0.01; finalmente la prueba de independencia, mostró que los residuos no seguían un patrón definido, por lo cual se aceptó el supuesto de independencia en los residuos.

El análisis de Tukey Kramer sobre las tasas de DP del CB01, permitió determinar que todos los bioensayos eran significativamente diferentes de los controles positivos y

negativos (Tabla 12 y Figura 15), evidenciando que la hidrólisis de proteínas en los bioensayos fue el resultado de la aplicación del CB01. El contenido de proteína disminuyó de 30.750% a 9.193 y a 9.396 en los bioensayos CB01-7 y CB01-5 respectivamente. Además, esos bioensayos presentaron la mayor tasa de desproteínización con el CB01, 1.347 y 1.335 % DP/hora respectivamente (Tabla 30, Figura 15 y 20). Es decir, se redujo el contenido de proteína de los residuos en 70.105 y 69.443 % en cada bioensayo. Asimismo, se observó en los mismos bioensayos (CB01-7 y CB01-5) un grado de hidrólisis de 18.886 y 15.742 gGLY/g ET (%GH) correspondientes a los productos proteicos solubles obtenidos a partir de los residuos de langostinos. Las tasas de DP en los controles negativos no fueron significativamente diferentes entre sí; mientras que en los controles positivos si lo fueron; esto debido a que la temperatura óptima de la enzima Protamex™ (control positivo) es 50°C y no 25°C (17,57).

Tabla 12. Análisis secuencial de Tukey Kramer sobre las tasas de desproteínización de residuos de langostino, con el consorcio bacteriano 1 (CB01).

Ensayos	Número de Replicas	Medias de las Diferencias Observadas (99.82%)	Grupos formados
<b>CB01-7</b>	2	1.34733	A
<b>CB01-5</b>	2	1.33460	A
<b>CB01-8</b>	2	1.14980	B
<b>CB01-1</b>	2	1.09015	C
<b>CB01-3</b>	2	0.97174	D
<b>CB01-4</b>	2	0.76245	E
<b>CB01-6</b>	2	0.58899	F
<b>CB01-2</b>	2	0.56291	G
<b>C2+</b>	2	0.2682	H
<b>C1+</b>	2	0.1979	I
<b>C1-</b>	2	0.09753	J
<b>C2-</b>	2	0.09436	J

\*Aquellos ensayos que no comparten una letra son significativamente diferentes, con respecto de los demás.

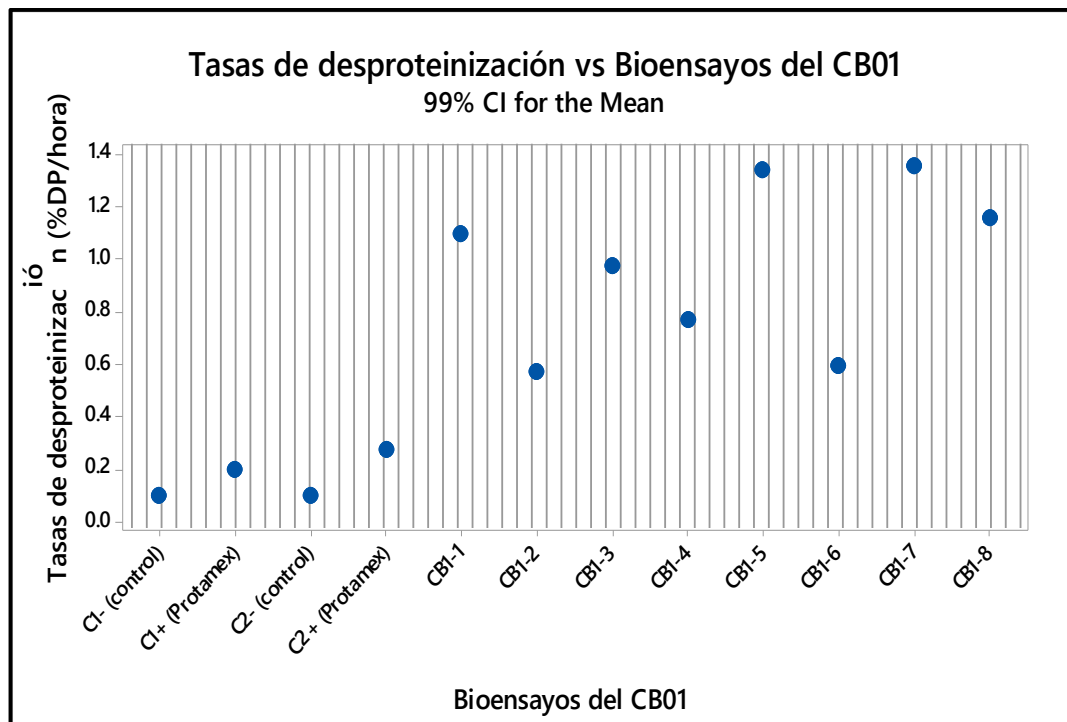


Figura 15. Tasas de reducción de proteínas (%DP/hora) de los bioensayos del CB01.

#### 4.4.1.2. Análisis del efecto individual y de interacción que las variables ejercen sobre el bioproceso de desproteínización con CB01

El efecto de las variables sobre el bioproceso con el consorcio bacteriano CB01, en el diseño factorial, fue analizado mediante un análisis de varianza (ANOVA). El efecto de todas las variables fue significativo para explicar el bioproceso en estudio (Tabla 13), donde los valores de probabilidad (valores-p) de los efectos individuales como los de interacción, fueron menores que el valor de significancia escogido de 0.01, por lo cual se rechaza las hipótesis nulas ( $H_0$ ) (Tabla 13). Asimismo, los efectos más importantes del modelo fueron tiempo y volumen de inóculo, seguidos del efecto de la interacción doble tiempo y temperatura, en concordancia con lo reportado por Montgomery (2009) y Gutiérrez y De la Vara (2008) (52,56).

Tabla 13. Análisis de varianza (ANOVA) de los efectos sobre la tasa de desproteínización (%DP/hora), en el diseño factorial del consorcio bacteriano 01 (CB01).

Fuentes de variación	GL	SC	Valor-F	Valor-p	Efecto	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> aj
<b>Interacciones individuales</b>	3	1.0795	9516.02	0.000			
Tiempo (horas)	1	0.70533	18653.0	0.000	-0.4199		
Temperatura (°C)	1	0.10715	2833.61	0.000	0.1637		
Volumen de Inóculo(10 <sup>7</sup> UFC/mL)	1	0.26701	7061.4	0.000	0.2584		
<b>Interacciones dobles</b>	3	0.25879	2281.26	0.000			
Volumen de Inóculo*Tiempo	1	0.01067	282.22	0.000	-0.0517		
Volumen de Inóculo*Temperatura	1	0.06061	1602.92	0.000	0.1231		
Temperatura * Tiempo	1	0.1875	4958.64	0.000	0.2165		
<b>Interacciones triples</b>	1	0.01324	350.16	0.000			
Volumen de Inóculo*Tiempo*Temperatura	1	0.01324	350.16	0.000	0.0575		
<b>Error</b>	8	0.00030					
<b>Total</b>	15	1.35182				99.98	99.96

La evaluación de los supuestos de normalidad, homocedasticidad, independencia y multicolinealidad del modelo, permitió validar al modelo y la ecuación de predicción del análisis de regresión lineal múltiple. La evaluación de normalidad con los resultados del CB01, mostró que los residuos seguían una distribución normal, siendo el factor de Anderson-Darling 0.291 y el valor de probabilidad mayor al valor de significancia escogido de 0.01. La evaluación de la homocedasticidad (igualdad de las varianzas), mostró que los residuos no seguían un patrón definido, siendo el valor de probabilidad según la prueba de Bartlett 0.909, mayor al valor de significancia (0.01), por lo cual se acepta el supuesto de que los datos obtenidos tenían varianzas iguales. La evaluación de independencia sobre los residuos del CB01, mostró que los residuos no seguían un patrón definido, por lo cual se aceptó el supuesto de independencia en los residuos. Finalmente, los factores de inflación de varianza fueron iguales a 1, mostrándose que no existe colinealidad entre los factores.

Los análisis de varianza y de regresión lineal múltiple mostraron un coeficiente de determinación ajustado (R<sup>2</sup>aj) de 99.96 (Tabla 13), el cual indica que el modelo explica el 99.96% de la tasa de desproteínización (%DP/hora) con el CB01 en los residuos. Se obtuvo la siguiente ecuación de predicción, mediante análisis de regresión lineal múltiple:

$$\text{Tasa (\%DP/hora)} = 3.278 - 0.11566 A - 0.05897 B + 0.3760C + 0.002536 A*B - 0.02480 A*C - 0.008229 B *C + 0.000719 A*B*C$$

Donde: A es la variable Tiempo (horas), B es Temperatura (°C) y C es Volumen de Inóculo ( $10^7$ UFC/mL)

A partir de la ecuación de predicción se obtuvo las mejores condiciones de operación para el CB01 (16 horas, 35°C y 6 mL inóculo de  $10^7$ UFC).

#### 4.4.2 Análisis del modelo experimental para el consorcio bacteriano 2 (CB2)

##### 4.4.2.1 Comparación de los bioensayos de desproteínización con CB02

Las tasas de desproteínización de residuos de langostino, obtenidas con el consorcio bacteriano 2 (CB02) fueron analizadas, observándose mediante la desviación estándar (Tabla 14), que los datos se ajustaban a los valores esperados por el modelo. Asimismo, fueron analizadas mediante un análisis de varianza (ANOVA), el cual mostró que existía diferencia significativa entre los bioensayos y los controles en estudio (Tabla 15), donde el valor de probabilidad (valor-p) es menor que el valor de significancia escogido de 0.01.

Tabla 14. Media de las tasas de desproteínización y desviación estándar de los bioensayos, con el consorcio bacteriano 2 (CB02).

Ensayos	Número de replicas	Media de las tasas de desproteínización	Desviación estándar	Intervalos de Confianza (99% IC)
C1-	2	0.1000	0.0000	(0.0925, 0.1075)
C1+	2	0.2400	0.0000	(0.2326, 0.2475)
C2-	2	0.1000	0.0000	(0.0925, 0.1075)
C2+	2	0.2488	0.0000	(0.2413, 0.2563)
CB02-1	2	1.52469	0.00593	(1.51724, 1.53215)
CB02-2	2	0.93674	0.00384	(0.92928, 0.94420)
CB02-3	2	1.42808	0.00488	(1.42062, 1.43553)
CB02-4	2	0.55052	0.00376	(0.54306, 0.55798)
CB02-5	2	1.91285	0.00014	(1.90539, 1.92031)
CB02-6	2	1.08929	0.00617	(1.08183, 1.09675)
CB02-7	2	1.90817	0.00113	(1.90071, 1.91563)
CB02-8	2	0.93871	0.00398	(0.93126, 0.94617)

Tabla 15. ANOVA (one way ANOVA) sobre la tasa de desproteínización (% DP/hora), con el consorcio bacteriano 2 (CB02).

Fuentes de variación	GL	SC	MC	Valor-F	Valor-p	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> aj
<b>Bioensayos CB02</b>	11	10.0184	0.91076	76376.2	0.000		
<b>Error</b>	12	0.0001	0.00001				
<b>Total</b>	23	10.0185				99.99	100

Los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia fueron aceptados, dando así validez a los resultados del análisis ANOVA (Tabla 15); las tasas de DP seguían una distribución normal, siendo el valor de Anderson-Darling 0.782 y el valor de probabilidad mayor al valor de significancia escogido de 0.01; la evaluación de homocedasticidad mostró que las tasas de DP no seguían un patrón determinado entre sí; asimismo la prueba de Bartlett dio un valor de probabilidad de 0.541 mayor al valor de significancia escogido de 0.01; finalmente la prueba de independencia, mostró que los residuos no seguían un patrón definido, por lo cual se aceptó el supuesto de independencia en los residuos.

El análisis de Tukey Kramer sobre las tasas de DP del CB02, permitió determinar que todos los bioensayos fueron significativamente diferentes de los controles positivos y negativos (Tabla 16 y figura 16), evidenciando que la hidrólisis de proteínas en los bioensayos fue el resultado de la aplicación del CB02. El contenido de proteína disminuyó de 30.7% a 0.094 y a 0.169 % en los bioensayos CB02-5 y CB02-7 respectivamente. Además, esos bioensayos presentaron la mayor tasa de desproteínización con el CB02, 1.913 y 1.908 % DP/hora respectivamente (Tabla 30, Figura 16 y 20). Es decir, se redujo el contenido de proteína de los residuos en 99.694 y 99.450 %DP en cada bioensayo. Asimismo, se observó en los mismos bioensayos (CB02-5 y CB02-7) un grado de hidrólisis de 25.159 y 19.487 gGLY/g ET (%GH) correspondientes a los productos proteicos solubles obtenidos a partir de los residuos de langostinos. Los bioensayos CB2-8 y CB2-2 no fueron significativamente diferentes entre sí, esto pudo deberse al efecto que ejerce el tiempo sobre el comportamiento del CB02.

Tabla 16. Análisis secuencial de Tukey Kramer sobre las tasas de desproteínización de residuos de langostino, con el consorcio bacteriano 2 (CB02).

Ensayos	Número de Replicas	Medias de las Diferencias Observadas (99.82%)	Grupos formados
CB2-5	2	1.91285	A
CB2-7	2	1.90817	A
CB2-1	2	1.52469	B
CB2-3	2	1.42808	C
CB2-6	2	1.08929	D
CB2-8	2	0.93871	E
CB2-2	2	0.93674	E
CB2-4	2	0.55052	F
C2+	2	0.2488	G
C1+	2	0.2400	G
C1-	2	0.09703	H
C2-	2	0.07949	H

\*Aquellos ensayos que no comparten una letra son significativamente diferentes, con respecto de los demás.

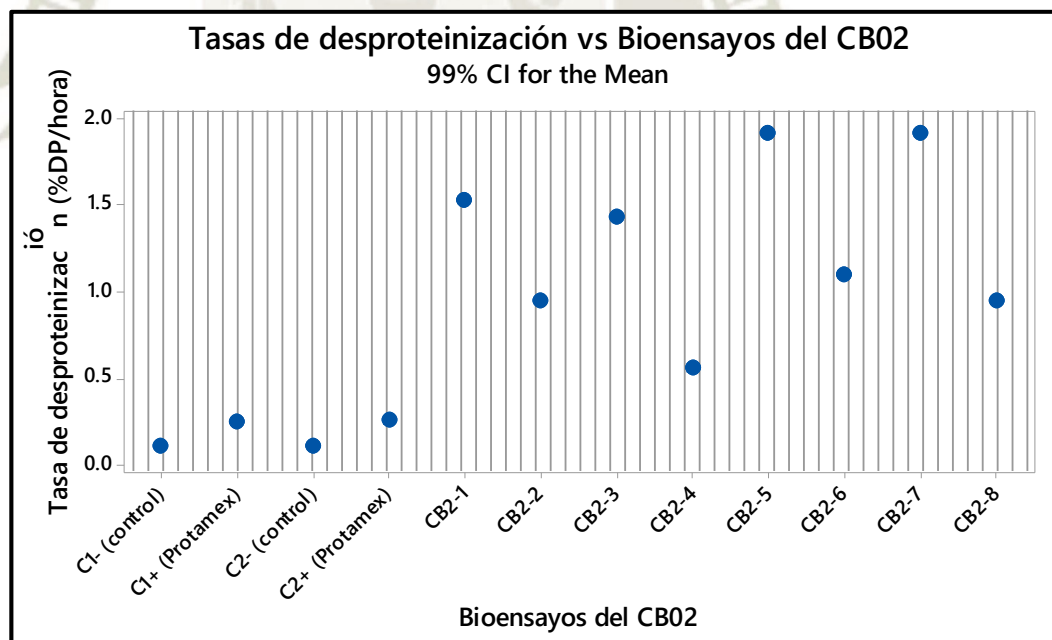


Figura 16. Tasas de reducción de proteínas (%DP/hora) de los bioensayos del CB02.

#### 4.4.2.2. Análisis del efecto individual y de interacción que las variables ejercen sobre el bioproceso de desproteínización con CB02

El efecto de las variables sobre el bioproceso con el consorcio bacteriano CB02, en el diseño factorial, fue analizado mediante un análisis de varianza (ANOVA). El efecto de todas las variables fue significativo para explicar el bioproceso en estudio (Tabla 17), donde los valores de probabilidad (valores-p) del efecto individual de cada variable como los de interacción, fueron menores que el valor de significancia escogido de 0.01, por lo cual se rechaza las hipótesis nulas ( $H_0$ ) (Tabla 17). Asimismo, los efectos más importantes del modelo fueron los de tiempo y volumen de inóculo, seguidos del efecto de la interacción doble tiempo y temperatura, en concordancia con lo reportado por Montgomery (2009) y Gutiérrez y De la Vara (2008) (52,56).

Tabla 17. Análisis de varianza (ANOVA) de los efectos sobre la tasa de desproteínización (%DP/hora), en el diseño factorial del consorcio bacteriano 02 (CB02).

Fuentes de variación	GL	SC	Valor-F	Valor-p	Efecto	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> aj
<b>Factores principales</b>	3	3.2526	60613.2	0.000			
Tiempo (horas)	1	2.6545	148402	0.000	-0.8146		
Temperatura (°C)	1	0.10179	5690.9	0.000	-0.1595		
Volumen de Inóculo(10 <sup>7</sup> UFC/mL)	1	0.49632	27747.3	0.000	0.3523		
<b>Interacciones dobles</b>	3	0.10106	1883.3	0.000			
Volumen de Inóculo*Tiempo	1	0.02680	1499.1	0.000	-0.1089		
Volumen de Inóculo*Temperatura	1	0.02683	1499.9	0.000	-0.0819		
Temperatura * Tiempo	1	0.04742	2650.9	0.000	0.0819		
<b>Interacciones triples</b>	1	0.00516	288.63	0.000			
Volumen de Inóculo*Tiempo*Temperatura	1	0.00516	288.63	0.000	0.0359		
<b>Error</b>	8	0.00014					
<b>Total</b>	15	3.35896				100	99.99

La evaluación de los supuestos de normalidad, homocedasticidad, independencia y multicolinealidad del modelo, permitió validar al modelo y la ecuación de predicción del análisis de regresión lineal múltiple. La evaluación de normalidad con los resultados del CB02, mostró que los residuos seguían una distribución normal, siendo el factor de Anderson-Darling 0.507 y el valor de probabilidad mayor al valor de significancia escogido de 0.01. La evaluación de la homocedasticidad (igualdad de las varianzas), mostró que los residuos no seguían un patrón definido, siendo el valor de

probabilidad según la prueba de Bartlett 0.541, mayor al valor de significancia (0.01), por lo cual se acepta el supuesto de que los datos obtenidos tenían varianzas iguales. La evaluación de independencia sobre los residuos del CB02, mostró que los residuos no seguían un patrón definido, por lo cual se aceptó el supuesto de independencia en los residuos. Finalmente, los factores de inflación de varianza (FIV) fueron iguales a 1, mostrándose que no existe colinealidad entre los factores.

Los análisis de varianza y de regresión lineal múltiple mostraron un coeficiente de determinación ajustado ( $R^2_{adj}$ ) 99.99 (Tabla 17), el cual indica que el modelo explica el 99.99% de la tasa de desproteínización (%DP/hora) con el CB02 en los residuos. Se obtuvo la siguiente ecuación de predicción, mediante análisis de regresión lineal múltiple:

$$\text{Tasa (\%DP/hora)} = 0.8201 - 0.05419 A - 0.05803 B + 0.3370C + 0.004518 A*B \\ - 0.018589 A*C - 0.004887B *C + 0.000449 A*B*C$$

Donde: A es la variable Tiempo (horas), B es Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) y C es Volumen de Inóculo ( $10^7\text{UFC/mL}$ )

A partir de la ecuación de predicción del CB02 se obtuvo las mejores condiciones de operación (16 horas,  $25^{\circ}\text{C}$ , 6 mL inóculo de  $10^7\text{UFC}$ ).

#### **4.4.3 Análisis del modelo experimental para el consorcio bacteriano 3 (CB3)**

##### **4.4.3.1 Comparación de los bioprocesos de desproteínización con CB03.**

Las tasas de desproteínización de residuos de langostino, obtenidas con el consorcio bacteriano 3 (CB03) fueron analizadas, observándose mediante la desviación estándar (Tabla 18), que los datos se ajustaban a los valores esperados por el modelo. Asimismo, fueron analizadas mediante un análisis de varianza (ANOVA), el cual mostró que existía diferencia significativa entre los bioensayos y los controles en estudio (Tabla 19), donde el valor de probabilidad (valor-p) es menor que el valor de significancia escogido de 0.01.

Tabla 18. Media de las tasas de desproteínización y desviación estándar de los bioensayos, con el consorcio bacteriano 3 (CB03).

Ensayos	Número de replicas	Media de las tasas de DP	Desviación estándar	Intervalos de Confianza (99% IC)
C1-	2	0.05605	0.00000	(0.04455; 0.06756)
C1+	2	0.1149	0.0000	(0.1033; 0.1264)
C2-	2	0.04513	0.00000	(0.03363; 0.05664)
C2+	2	0.1197	0.0000	(0.1082; 0.1312)
CB3-1	2	0.2204	0.0151	(0.2089; 0.2319)
CB3-2	2	0.18627	0.00331	(0.17476; 0.19778)
CB3-3	2	0.56110	0.00802	(0.54960; 0.57261)
CB3-4	2	0.171192	0.000247	(0.159684; 0.182700)
CB3-5	2	0.28953	0.00248	(0.27802; 0.30104)
CB3-6	2	0.37623	0.00265	(0.36472; 0.38774)
CB3-7	2	0.63648	0.00460	(0.62498; 0.64799)
CB3-8	2	0.46596	0.00143	(0.45445; 0.47747)

Tabla 19. ANOVA (one way ANOVA) sobre la tasa de desproteínización (% DP/hora), con el consorcio bacteriano 3 (CB03).

Fuentes de variación	GL	SC	MC	Valor-F	Valor-p	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> aj
Bioensayos CB03	11	0.86268	0.07843	2762.59	0.000		
Error	12	0.00034	0.00003				
Total	23	0.86302				99.96	99.92

Los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia fueron aceptados, dando así validez a los resultados del análisis ANOVA (Tabla 19); las tasas de DP seguían una distribución normal, siendo el valor de Anderson-Darling 0.879 y el valor de probabilidad mayor al valor de significancia escogido de 0.01; la evaluación de homocedasticidad mostró que las tasas de DP no seguían un patrón determinado entre sí; asimismo la prueba de Bartlett dio un valor de probabilidad de 0.209 mayor al valor de significancia escogido de 0.01; finalmente la prueba de independencia, mostró que los residuos no seguían un patrón definido, por lo cual se aceptó el supuesto de independencia en los residuos.

El análisis de Tukey Kramer sobre las tasas de DP del CB03, permitió determinar que todos los bioensayos fueron significativamente diferentes de los controles positivos y negativos (Tabla 20 y figura 17), evidenciando que la hidrólisis de proteínas en los bioensayos fue el resultado de la aplicación del CB03. El contenido de proteína disminuyó 11.529% a 1.345 y a 2.551 % en los bioensayos CB03-7 y CB03-3 respectivamente, es decir, se redujo el contenido de proteína de los residuos en 99.694 y 99.450% en cada bioensayo. Esos bioensayos, mostraron ser significativamente diferentes entre sí, probablemente debido a la diferencia en el volumen de inóculo entre los bioensayos. Además, CB03-7 y CB03-3 presentaron la mayor tasa de desproteínización de este grupo, siendo 0.636 y 0.561 %DP/hora respectivamente (Tabla 30, Figuras 17 y 20). Asimismo, se observó en los mismos bioensayos (CB03-7 y CB03-3) un grado de hidrólisis de 14.909 y 12.808 gGLY/g ET (%GH) correspondientes a los productos proteicos solubles obtenidos a partir de los residuos de langostinos. Los bioensayos CB3-2 y CB3-4 tuvieron la menor tasa de desproteínización del CB3 y no fueron significativamente diferentes entre sí (figura 19).

Tabla 20. Análisis secuencial de Tukey Kramer sobre las tasas de desproteínización de residuos de langostinos con el consorcio bacteriano 03 (CB03).

Ensayos	Número de Replicas	Medias de las Diferencias Observadas (99.82%)	Grupos formados
<b>CB3-7</b>	2	0.63648	A
<b>CB3-3</b>	2	0.56110	B
<b>CB3-8</b>	2	0.46596	C
<b>CB3-6</b>	2	0.37623	D
<b>CB3-5</b>	2	0.28953	E
<b>CB3-1</b>	2	0.2204	F
<b>CB3-2</b>	2	0.18627	G
<b>CB3-4</b>	2	0.171192	G
<b>C2+</b>	2	0.1197	H
<b>C1+</b>	2	0.1149	H
<b>C1-</b>	2	0.05605	I
<b>C2-</b>	2	0.04513	I

\*Aquellos ensayos que no comparten una letra son significativamente diferentes, con respecto de los demás.

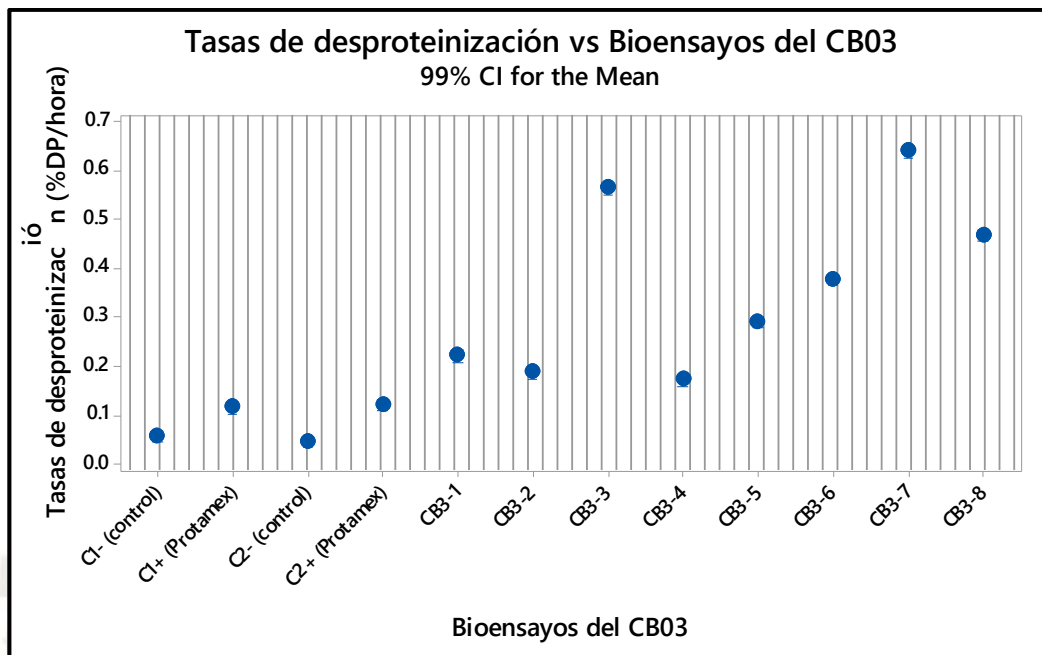


Figura 17. Tasas de reducción de proteínas (%DP/hora) de los bioensayos del CB03.

#### 4.4.3.2. Análisis del efecto individual y de interacción que las variables ejercen sobre el bioproceso de desproteínización con CB03

El efecto de las variables sobre el bioproceso con el consorcio bacteriano CB03, en el diseño factorial, fue analizado mediante un análisis de varianza (ANOVA). El efecto de todas las variables fue significativo para explicar el bioproceso en estudio (Tabla 21), donde los valores de probabilidad (valores-p) del efecto individual de cada variable como los de interacción, fueron menores que el valor de significancia escogido de 0.01, por lo cual se rechaza las hipótesis nulas ( $H_0$ ) (Tabla 21). Asimismo, los efectos más importantes del modelo fueron los de temperatura y volumen de inóculo, seguidos del efecto de la interacción doble tiempo y temperatura, en concordancia con lo reportado por Montgomery (2009) y Gutiérrez y De la Vara (2008) (52,56).

Tabla 21. Análisis de varianza (ANOVA) de los efectos sobre la tasa de desproteinización (%DP/hora), en el diseño factorial del consorcio bacteriano 03 (CB03).

Fuentes de variación	GL	SC	Valor-F	Valor-p	Efecto	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> aj
<b>Factores principales</b>	3	0.30874	2416.82	0.000			
Tiempo (horas)	1	0.06449	1514.38	0.000	-0.1270		
Temperatura (°C)	1	0.14528	3411.63	0.000	0.1906		
Volumen de Inóculo(10 <sup>7</sup> UFC/mL)	1	0.09898	2324.44	0.000	0.1573		
<b>Interacciones dobles</b>	3	0.12596	986.04	0.000			
Volumen de Inóculo*Tiempo	1	0.02894	679.56	0.000	0.0851		
Volumen de Inóculo*Temperatura	1	0.00308	72.43	0.000	0.0278		
Temperatura * Tiempo	1	0.09394	2206.13	0.000	-0.1533		
<b>Interacciones triples</b>	1	0.00243	57.02	0.000			
Volumen de Inóculo*Tiempo*Temperatura	1	0.00243	57.02	0.000	0.0246		
<b>Error</b>	8	0.00034					
<b>Total</b>	15	0.43747				99.92	99.85

La evaluación de los supuestos de normalidad, homocedasticidad, independencia y multicolinealidad del modelo, permitió validar al modelo y la ecuación de predicción del análisis de regresión lineal múltiple. La evaluación de normalidad con los resultados del CB03, mostró que los residuos seguían una distribución normal, siendo el factor de Anderson-Darling 0.333 y el valor de probabilidad mayor al valor de significancia escogido de 0.01. La evaluación de la homocedasticidad (igualdad de las varianzas), mostró que los residuos no seguían un patrón definido, siendo el valor de probabilidad según la prueba de Bartlett 0.209, mayor al valor de significancia (0.01), por lo cual se acepta el supuesto de que los datos obtenidos tenían varianzas iguales. La evaluación de independencia sobre los residuos del CB03, mostró que los residuos no seguían un patrón definido, por lo cual se aceptó el supuesto de independencia en los residuos. Finalmente, los factores de inflación de varianza (FIV) fueron iguales a 1, mostrándose que no existe colinealidad entre los factores.

Los análisis de varianza y de regresión lineal múltiple mostraron un coeficiente de determinación ajustado (R<sup>2</sup>adj) 99.85 (Tabla 21), el cual indica que el modelo explica el 99.85% de la tasa de desproteinización (%DP/hora) con el CB03 en los residuos. Se

obtuvo la siguiente ecuación de predicción, mediante análisis de regresión lineal múltiple:

$$\text{Tasa (\%DP/hora)} = -2.494 - 0.11476 A + 0.11477 B + 0.0761C - 0.005063A*B \\ - 0.00392 A*C - 0.004771B *C + 0.000308 A*B*C$$

Donde: A es la variable Tiempo (horas), B es Temperatura (°C) y C es Volumen de Inóculo ( $10^7$ UFC/mL).

A partir de la ecuación de predicción del CB03 se obtuvo las mejores condiciones de operación (16 horas, 35°C, 6 mL inóculo de  $10^7$ UFC).

#### **4.4.4 Análisis del modelo experimental para el consorcio bacteriano 4 (CB4)**

##### **4.4.4.1 Comparación de los bioprocesos de desproteínización con CB04.**

Las tasas de desproteínización de residuos de langostino obtenidas con el consorcio bacteriano 4 (CB04) fueron analizadas, observándose mediante la desviación estándar (Tabla 22), que los datos se ajustaban a los valores esperados por el modelo. Asimismo, fueron analizadas mediante un análisis de varianza (ANOVA), el cual mostró que existía diferencia significativa entre los bioensayos y los controles en estudio (Tabla 23), donde el valor de probabilidad (valor-p) es menor que el valor de significancia escogido de 0.01.

Los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia fueron aceptados, dando así validez a los resultados del análisis ANOVA (Tabla 23); las tasas de DP seguían una distribución normal, siendo el valor de Anderson-Darling 0.972 y el valor de probabilidad mayor al valor de significancia escogido de 0.01; la evaluación de homocedasticidad mostró que las tasas de DP no seguían un patrón determinado entre sí; asimismo la prueba de Bartlett dio un valor de probabilidad de 0.863 mayor al valor de significancia escogido de 0.01; finalmente la prueba de independencia, mostró que los residuos no seguían un patrón definido, por lo cual se aceptó el supuesto de independencia en los residuos.

Tabla 22. Media de las tasas de desproteínización y desviación estándar de los bioensayos, con el consorcio bacteriano 4 (CB04).

Ensayos	Número de replicas	Media de las tasas de DP	Desviación estándar	Intervalos de Confianza (99% IC)
C1-	2	0.04503	0.00000	(0.03798; 0.05208)
C1+	2	0.3773	0.0000	(0.3702; 0.3843)
C2-	2	0.04928	0.00000	(0.04223; 0.05633)
C2+	2	0.3399	0.0000	(0.3329; 0.3470)
CB4-1	2	1.50751	0.00553	(1.50046; 1.51456)
CB4-2	2	0.85811	0.00353	(0.85106; 0.86516)
CB4-3	2	1.39968	0.00595	(1.39263; 1.40673)
CB4-4	2	1.19410	0.00051	(1.18705; 1.20115)
CB4-5	2	1.79320	0.00340	(1.78615; 1.80025)
CB4-6	2	1.22665	0.00241	(1.21960; 1.23370)
CB4-7	2	1.79588	0.00471	(1.78883; 1.80293)
CB4-8	2	1.23783	0.00310	(1.23078; 1.24488)

Tabla 23. ANOVA (one way ANOVA) sobre la tasa de desproteínización (% DP/hora), con el consorcio bacteriano 04 (CB04).

Fuentes de variación	GL	SC	MC	Valor-F	Valor-p	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> aj
Bioensayos CB04	11	8.96481	0.81498	76490.6	0.000		
Error	12	0.00013	0.00001				
Total	23	8.96493				100.0	100.0

El análisis de Tukey Kramer sobre las tasas de DP del CB04, permitió determinar que todos los bioensayos fueron significativamente diferentes de los controles positivos y negativos (Tabla 24 y Figura 18), evidenciando que la hidrólisis de proteínas en los bioensayos fue el resultado de la aplicación del CB04. El contenido de proteína disminuyó de 30.7% a 1.960 y a 2.003 % en los bioensayos CB04-7 y CB04-5 respectivamente, es decir, se redujo el contenido de proteína de los residuos en 93.613 y 93.473 %DP en cada bioensayo. Esos bioensayos, mostraron ser no significativamente diferentes entre sí, revelando que la temperatura pareciera no afectar el proceso en este caso.

Además, CB04-7 y CB04-5 presentaron la mayor tasa de desproteínización de este grupo, siendo 1.796 y 1.793 %DP/hora (Tabla 30, Figuras 18 y 20). Asimismo, se observó en los mismos bioensayos (CB04-7 y CB04-5) un grado de hidrólisis de 6.847

y 5.588 gGLY/g ET (%GH) correspondientes a los productos proteicos solubles obtenidos a partir de los residuos de langostinos. Los bioensayos CB4-8 y CB4-6 mostraron no ser significativamente diferentes entre sí; asimismo, los controles negativos. Los controles positivos sí fueron diferentes entre sí, lo cual podría deberse a que la temperatura óptima de funcionamiento de la enzima Protamex™, es 50°C y no 25°C (17,57).

Tabla 24. Análisis secuencial de Tukey Kramer sobre las tasas de desproteínización con el consorcio bacteriano 04 (CB04).

Ensayos	Número de Replicas	Medias de las Diferencias Observadas (99.82%)	Grupos formados
<b>CB4-7</b>	2	1.79588	A
<b>CB4-5</b>	2	1.79320	A
<b>CB4-1</b>	2	1.50751	B
<b>CB4-3</b>	2	1.39968	C
<b>CB4-8</b>	2	1.23783	D
<b>CB4-6</b>	2	1.22665	D
<b>CB4-4</b>	2	1.19410	E
<b>CB4-2</b>	2	0.85811	F
<b>C1+</b>	2	0.3773	G
<b>C2+</b>	2	0.3399	H
<b>C2-</b>	2	0.04928	I
<b>C1-</b>	2	0.04503	I

\*Aquellos ensayos que no comparten una letra son significativamente diferentes, con respecto de los demás.

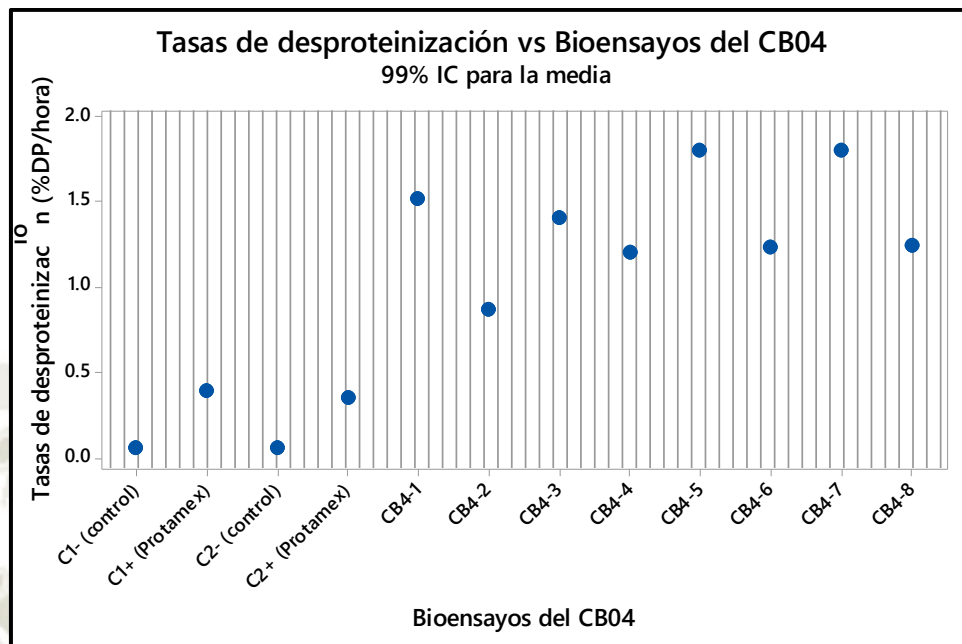


Figura 18. Tasas de reducción de proteínas (%DP/hora) de los bioensayos del CB04.

#### 4.4.4.2. Análisis del efecto individual y de interacción que las variables ejercen sobre el bioproceso de desproteinización con CB04

El efecto de las variables sobre el bioproceso con el consorcio bacteriano CB04, en el diseño factorial, fue analizado mediante un análisis de varianza (ANOVA). El efecto de todas las variables fue significativo para explicar el bioproceso en estudio (Tabla 25), donde los valores de probabilidad (valores-p) del efecto individual de cada variable como los de interacción, fueron menores que el valor de significancia escogido de 0.01, por lo cual se rechaza las hipótesis nulas ( $H_0$ ) (Tabla 25). Asimismo, los efectos más importantes del modelo fueron los de tiempo y volumen de inóculo, seguidos del efecto de la interacción doble tiempo y temperatura, en concordancia con lo reportado por Montgomery (2009) y Gutiérrez y De la Vara (2008) (52,56).

Tabla 24. Análisis de varianza (ANOVA) de los efectos sobre la tasa de desproteínización (%DP/hora), en el diseño factorial del consorcio bacteriano 04 (CB04).

Fuentes de variación	GL	SC	Valor-F	Valor-p	Efecto	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> aj
<b>Factores principales</b>	3	1.29363	26980.0	0.000			
Tiempo (horas)	1	0.97970	61299.9	0.000	-0.4949		
Temperatura (°C)	1	0.01464	916.21	0.000	0.0605		
Volumen de Inóculo(10 <sup>7</sup> UFC/mL)	1	0.29923	18726.9	0.000	0.2735		
<b>Interacciones dobles</b>	3	0.08080	1685.3	0.000			
Volumen de Inóculo*Tiempo	1	0.01817	1137.21	0.000	-0.0674		
Volumen de Inóculo*Temperatura	1	0.01148	718.32	0.000	-0.0536		
Temperatura * Tiempo	1	0.05115	3200.3	0.000	0.1131		
<b>Interacciones triples</b>	1	0.04738	2964.4	0.000			
Volumen de Inóculo*Tiempo*Temperatura	1	0.04738	2964.4	0.000	-0.1088		
<b>Error</b>	8	0.00013					
<b>Total</b>	15	1.42194				99.99	99.98

La evaluación de los supuestos de normalidad, homocedasticidad, independencia y multicolinealidad del modelo, permitió validar al modelo y la ecuación de predicción del análisis de regresión lineal múltiple. La evaluación de normalidad con los resultados del CB04, mostró que los residuos seguían una distribución normal, siendo el factor de Anderson-Darling 0.501 y el valor de probabilidad mayor al valor de significancia escogido de 0.01. La evaluación de la homocedasticidad (igualdad de las varianzas), mostró que los residuos no seguían un patrón definido, siendo el valor de probabilidad según la prueba de Bartlett 0.863, mayor al valor de significancia (0.01), por lo cual se acepta el supuesto de que los datos obtenidos tenían varianzas iguales. La evaluación de independencia sobre los residuos del CB04, mostró que los residuos no seguían un patrón definido, por lo cual se aceptó el supuesto de independencia en los residuos. Finalmente, los factores de inflación de varianza (FIV) fueron iguales a 1, mostrándose que no existe colinealidad entre los factores.

Los análisis de varianza y de regresión lineal múltiple mostraron un coeficiente de determinación ajustado (R<sup>2</sup>adj) de 99.98 (Tabla 25), el cual indica que el modelo explica el 99.98% de la tasa de desproteínización (%DP/hora) con el CB04 en los residuos. Se obtuvo la siguiente ecuación de predicción, mediante análisis de regresión lineal múltiple:

$$\text{Tasa (\%DP/hora)} = 6.4614 - 0.29307 A - 0.14861 B - 0.5832 C + 0.008268 A*B + 0.036598 A*C + 0.02459 B*C - 0.001360 A*B*C$$

Donde: A es la variable Tiempo (horas), B es Temperatura (°C) y C es Volumen de Inóculo ( $10^7$ UFC/mL)

A partir de la ecuación de predicción del CB04 se obtuvo las mejores condiciones de operación (16 horas, 35°C, 6 mL inóculo de  $10^7$ UFC).

#### 4.4.5 Análisis del modelo experimental para el consorcio bacteriano 5 (CB5)

##### 4.4.5.1 Comparación de los bioprocesos de desproteínización con CB05.

Las tasas de desproteínización de residuos de langostino obtenidas con el consorcio bacteriano 5 (CB05) fueron analizadas, observándose mediante la desviación estándar (Tabla 26), que los datos se ajustaban a los valores esperados por el modelo. Asimismo, fueron analizadas mediante un análisis de varianza (ANOVA), el cual mostró que existía diferencia significativa entre los bioensayos y los controles en estudio (Tabla 27), donde el valor de probabilidad (valor-p) es menor que el valor de significancia escogido de 0.01.

Tabla 26. Media de las tasas de desproteínización y desviación estándar de los bioensayos, con el consorcio bacteriano 5 (CB05).

Ensayos	Número de replicas	Media de las tasas de DP	Desviación estándar	Intervalos de Confianza (99% IC)
C1-	2	0.04103	0.00000	(0.03314; 0.04892)
C1+	2	0.1253	0.0000	(0.1174; 0.1332)
C2-	2	0.04709	0.00000	(0.03920; 0.05498)
C2+	2	0.1526	0.0000	(0.1447; 0.1605)
CB5-1	2	0.59753	0.00988	(0.58964; 0.60542)
CB5-2	2	0.39477	0.00202	(0.38688; 0.40266)
CB5-3	2	0.57127	0.00731	(0.56338; 0.57916)
CB5-4	2	0.37405	0.00187	(0.36616; 0.38194)
CB5-5	2	0.802058	0.001019	(0.794168; 0.809948)
CB5-6	2	0.542560	0.000014	(0.534670; 0.550450)
CB5-7	2	0.810523	0.000474	(0.802633; 0.818413)
CB5-8	2	0.512634	0.000456	(0.504744; 0.520524)

Tabla 27. ANOVA (one way ANOVA) sobre la tasa de desproteínización (% DP/hora), con el consorcio bacteriano 5 (CB05).

Fuentes de variación	GL	SC	MC	Valor-F	Valor-p	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> aj
<b>Bioensayos CB05</b>	11	1.63970	0.14906	11170.6	0.000		
<b>Error</b>	12	0.00016	0.00001				
<b>Total</b>	23	1.63986				99.99	99.98

Los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia fueron aceptados, dando así validez a los resultados del análisis ANOVA (Tabla 27); las tasas de DP seguían una distribución normal, siendo el valor de Anderson-Darling 0.753 y el valor de probabilidad mayor al valor de significancia escogido de 0.01; la evaluación de homocedasticidad mostró que las tasas de DP no seguían un patrón determinado entre sí; asimismo la prueba de Bartlett dio un valor de probabilidad de 0.014 mayor al valor de significancia escogido de 0.01; finalmente la prueba de independencia, mostró que los residuos no seguían un patrón definido, por lo cual se aceptó el supuesto de independencia en los residuos.

El análisis de Tukey Kramer sobre las tasas de DP del CB05, permitió determinar que todos los bioensayos fueron significativamente diferentes de los controles positivos y negativos (Tabla 28 y figura 19), evidenciando que la hidrólisis de proteínas en los bioensayos fue el resultado de la aplicación del CB05. El contenido de proteína disminuyó de 13.025% a 0.062 y 0.180 en los bioensayos CB05-7 y CB05-3 respectivamente, es decir, se redujo el contenido de proteína de los residuos en 99.566 y 98.526 %DP en cada bioensayo. Esos bioensayos, mostraron ser no significativamente diferentes entre sí, revelando que la temperatura pareciera no afectar el proceso en este caso.

Además, CB05-7 y CB05-3 presentaron la mayor tasa de desproteínización de este grupo, siendo 0.811 y 0.802 %DP/hora (Tabla 30, Figura 19 y 20). Asimismo, se observó en los mismos bioensayos (CB05-7 y CB05-3) un grado de hidrólisis de 29.034 y 16.801 gGLY/g ET (%GH) correspondientes a los productos proteicos solubles obtenidos a partir de los residuos de langostinos. Los controles positivos fueron diferentes entre sí, lo cual podría deberse a que la temperatura óptima de funcionamiento de la enzima Protamex™, es 50°C y no 25°C (17,57).

Tabla 28. Análisis secuencial de Tukey Kramer sobre las tasas de desproteínización de residuos de langostino, con el consorcio bacteriano 5 (CB05).

Ensayos	Número de Replicas	Medias de las Diferencias Observadas (99.82%)	Grupos formados
CB5-7	2	0.810523	A
CB5-5	2	0.802058	A
CB5-1	2	0.59753	B
CB5-3	2	0.57127	C
CB5-6	2	0.542560	D
CB5-8	2	0.512634	E
CB5-2	2	0.39477	F
CB5-4	2	0.37405	G
C2+	2	0.1526	H
C1+	2	0.1253	I
C2-	2	0.04709	J
C1-	2	0.04103	J

\*Aquellos ensayos que no comparten una letra son significativamente diferentes, con respecto de los demás.

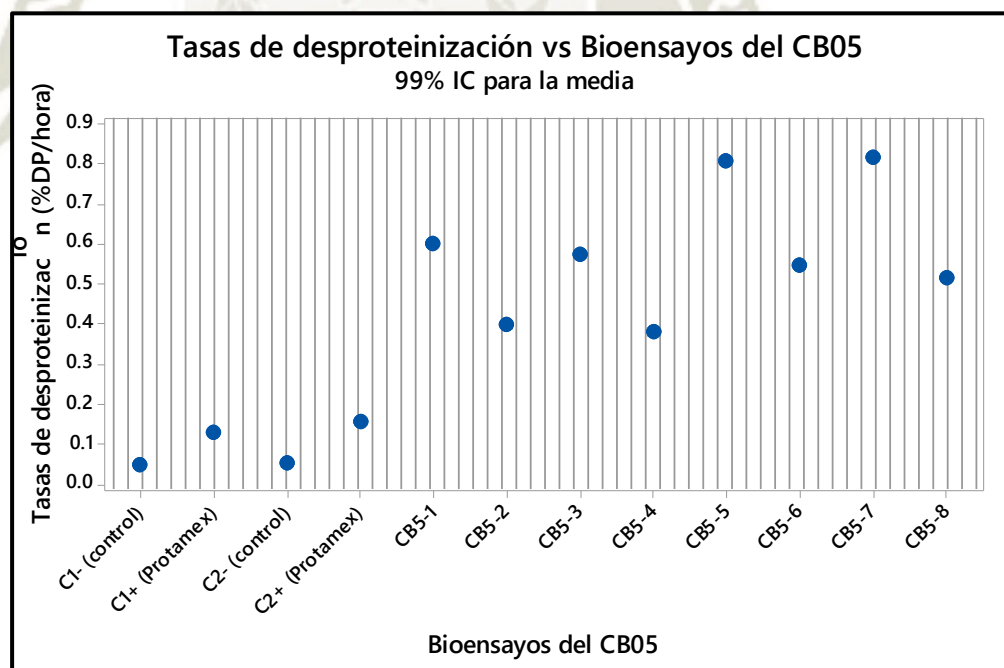


Figura 19. Tasas de reducción de proteínas (%DP/hora) de los bioensayos del CB05.

#### 4.4.5.2. Análisis del efecto individual y de interacción que las variables ejercen sobre el bioproceso de desproteínización con CB05

El efecto de las variables sobre el bioproceso con el consorcio bacteriano CB05, en el diseño factorial, fue analizado mediante un análisis de varianza (ANOVA). Sólo el efecto de la interacción temperatura y volumen de inóculo no fue significativo para explicar el bioproceso en estudio (Tabla 29), dado que el valor de probabilidad fue mayor que el valor de significancia escogido de 0.01, por lo cual se aceptan las hipótesis nulas ( $H_0$ ) para el efecto de esa interacción. Asimismo, los efectos individuales más importantes del modelo fueron los de tiempo y temperatura, seguidos del efecto de la interacción doble de los mismos (tiempo y temperatura), en concordancia con lo reportado por Montgomery (2009) y Gutiérrez y De la Vara (2008) (52,56).

Tabla 29. Análisis de varianza (ANOVA) de los efectos sobre la tasa de desproteínización (%DP/hora), en el diseño factorial del consorcio bacteriano 05 (CB05).

Fuentes de variación	GL	SC	Valor-F	Valor-p	Efecto	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> aj
<b>Factores principales</b>	3	0.36359	6054.86	0.000			
Tiempo (horas)	1	0.22914	11447.5	0.000	-0.2393		
Temperatura (°C)	1	0.13328	6658.60	0.000	0.1825		
Volumen de Inóculo(10 <sup>7</sup> UFC/mL)	1	0.00117	58.51	0.000	-0.0171		
<b>Interacciones dobles</b>	3	0.00663	110.36	0.000			
Volumen de Inóculo*Tiempo	1	0.00027	13.49	0.006	-0.0082		
Volumen de Inóculo*Temperatura	1	0.00016	8.14	0.021	0.0064		
Temperatura * Tiempo	1	0.00619	309.46	0.000	-0.0394		
<b>Interacciones triples</b>	1	0.00048	24.09	0.001			
Volumen de Inóculo*Tiempo*Temperatura	1	0.00048	24.09	0.001	-0.0110		
<b>Error</b>	8	0.0002	0.00002				
<b>Total</b>	15	0.3709				99.96	99.92

La evaluación de los supuestos de normalidad, homocedasticidad, independencia y multicolinealidad del modelo, permitió validar al modelo y la ecuación de predicción del análisis de regresión lineal múltiple. La evaluación de normalidad con los resultados del CB05, mostró que los residuos seguían una distribución normal, siendo el factor de Anderson-Darling 0.869 y el valor de probabilidad mayor al valor de significancia escogido de 0.01. La evaluación de la homocedasticidad (igualdad de las varianzas), mostró que los residuos no seguían un patrón definido, siendo el valor de

probabilidad según la prueba de Bartlett 0.014, mayor al valor de significancia (0.01), por lo cual se acepta el supuesto de que los datos obtenidos tenían varianzas iguales. La evaluación de independencia sobre los residuos del CB05, mostró que los residuos no seguían un patrón definido, por lo cual se aceptó el supuesto de independencia en los residuos. Finalmente, los factores de inflación de varianza (FIV) fueron iguales a 1, mostrándose que no existe colinealidad entre los factores.

Los análisis de varianza y de regresión lineal múltiple mostraron un coeficiente de determinación ajustado ( $R^2_{adj}$ ) de 99.92 (Tabla 29), el cual indica que el modelo explica el 99.92% de la tasa de desproteínización (%DP/hora) con el CB05 en los residuos. Se obtuvo la siguiente ecuación de predicción, mediante análisis de regresión lineal múltiple:

$$\text{Tasa (\%DP/hora)} = 0.3799 - 0.01482 A + 0.02567 B - 0.0859 C - 0.000435 A*B + 0.003604 A*C + 0.003064 B*C - 0.000137 A*B*C$$

Donde: A es la variable Tiempo (horas), B es Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) y C es Volumen de Inóculo ( $10^7\text{UFC/mL}$ )

A partir de la ecuación de predicción del CB05 se obtuvo las mejores condiciones de operación (16 horas,  $35^{\circ}\text{C}$ , 6 mL inóculo de  $10^7\text{UFC}$ ).

#### **4.4.6 Discusión de resultados de los bioprocesos y del efecto de las variables sobre las tasas de desproteínización de residuos de langostino.**

Todos los consorcios bacterianos estudiados (CB01, CB02, CB03, CB04 y CB05) hidrolizaron las proteínas reduciendo su contenido en los residuos de langostino. La tabla 30 y la figura 20 consolidan los 10 bioensayos que mostraron mejores resultados, 2 bioensayos de cada uno de los 5 consorcios bacterianos estudiados. Los resultados de todos los bioensayos se presentan en el anexo 3.

Los resultados obtenidos en el análisis estadístico de los CB consolidados en la tabla 30 y graficados en la figura 20 indican que el consorcio bacteriano CB2 mostró la tasa de reducción de proteínas más alta, en los bioensayos CB02-5 y CB02-7 (1.913 y 1.908% de proteína reducida/hora) con un porcentaje de desproteínización de 99.694 y 99.450% respectivamente. En segundo lugar, el consorcio bacteriano CB05, en los bioensayos CB05-7 y CB05-3 con porcentajes de desproteínización de 99.57 y

98.53%, pero con tasas de reducción de proteína de 0.811 y 0.802% de proteína reducida/hora, respectivamente.

Tabla 30. Reducción del contenido de proteína en residuos de langostino en los 10 bioensayos que mostraron mejores resultados con los 5 consorcios bacterianos (CB) estudiados.

Bioensayos	Tasa de reducción de proteína (% proteína reducida/ h)	Proteína remanente, dato experimental (%P)	Proteína reducida, (%DP)	%GH (gGly/gMuestra)	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Volumen de inóculo (10 <sup>7</sup> UFC/mL)
CB01-7	1.347	9.193	70.105	18.886	35	16	6
CB01-5	1.335	9.396	69.443	15.742	25	16	6
CB02-5	1.913	0.094	99.694	25.159	25	16	6
CB02-7	1.908	0.169	99.450	19.487	35	16	6
CB03-7	0.636	1.345	88.333	14.909	35	16	6
CB03-3	0.561	2.551	77.871	12.808	35	16	2
CB04-7	1.796	1.960	93.613	6.847	35	16	6
CB04-5	1.793	2.003	93.473	5.588	25	16	6
CB05-7	0.811	0.057	99.566	29.034	35	16	6
CB05-3	0.802	0.192	98.526	16.801	35	16	2

El consorcio bacteriano CB4 si bien tuvo la segunda mejor tasa de reducción de proteínas (1.799 y 1.791% de proteína reducida /hora), mostró valores de desproteínización de 93.786 y 93.348% (bioensayos CB04-7 y CB04-5), más bajos que aquellos de los consorcios bacterianos CB05 y CB02.

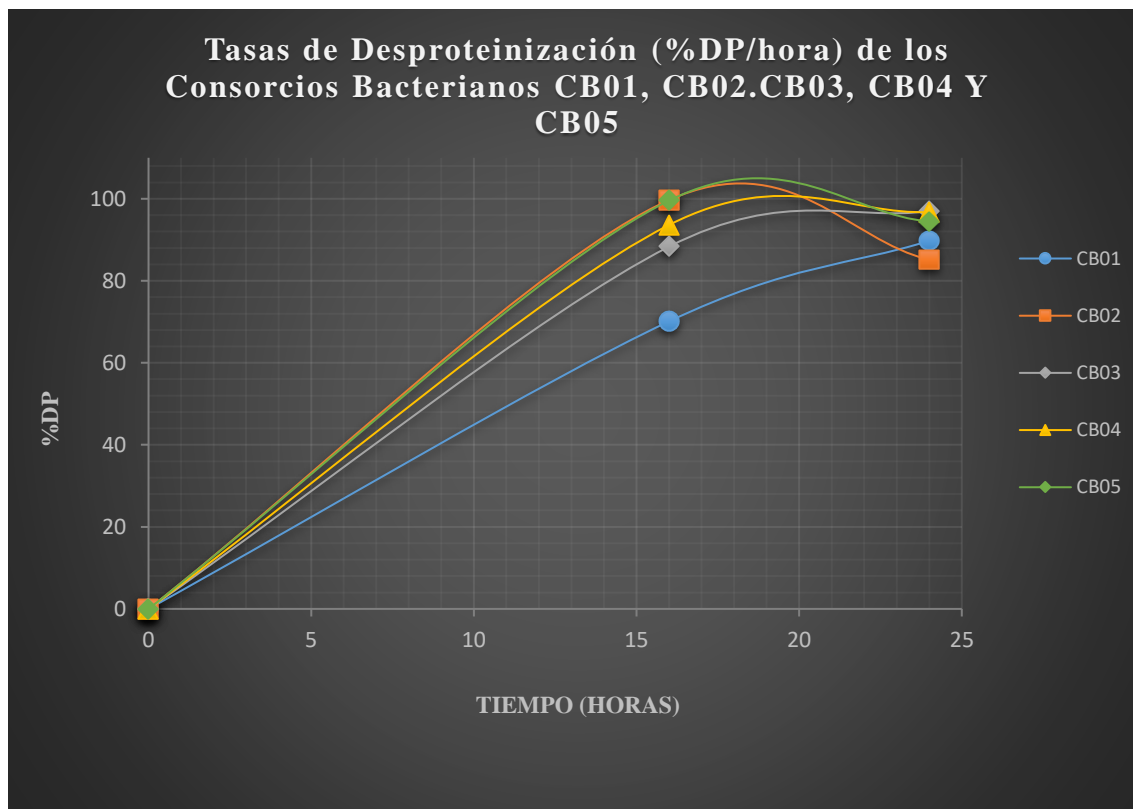


Figura 20. Tasas de reducción de proteínas (%DP/hora) con los consorcios bacterianos en estudio.

Aunque el consorcio bacteriano CB02 obtuvo la tasa de reducción de proteínas y porcentaje de desproteínización más altos (Tabla 30 y Figura 20), este fue descartado para los bioprocesos del presente estudio debido a que estaba conformado por cepas patógenas, en concordancia con las recomendaciones descritas por Okafor (2007) acerca de la no inclusión de microorganismos patógenos en el escalamiento de procesos biotecnológicos hasta nivel piloto e industrial, lo cual ha sido considerado como continuación del presente trabajo. A pesar de ello, el CB2 fue conformado e incluido en el presente estudio, con la finalidad de investigar su potencialidad para hidrolizar las proteínas de los residuos de langostino y posteriormente evaluar los genes codificantes de sus capacidades enzimáticas.

Por lo tanto, el consorcio bacteriano CB5 fue seleccionado para bioprocesar residuos de langostino en el presente trabajo, cuyos resultados podrían ser utilizados como base para un futuro escalamiento con las mismas cepas que lo conforman.

Los bioprocesos de desproteínización (DP) para la obtención de productos con valor agregado a partir de residuos de langostinos, son una alternativa ecológica a los procesos químicos tradicionales (10,17), no obstante el gran inconveniente de los mismos son los grandes periodos de tiempo implicados. Sedaghat y colaboradores (2016) reportaron una DP de 74.76% con *Pseudomonas aeruginosa*, luego de 6 días de fermentación a 37°C(70). Igualmente Zhang y colaboradores (2017), reportaron una DP de 93.52% con *Serratia marcescens* B742, luego de 4 días de cultivo (87). Por lo tanto, podría considerarse que los bioprocesos de DP por lo general ocupan periodos de tiempo extensos superiores a 2 días, lo cual hace que el proceso no sea atractivo desde el punto de vista industrial. Los bioprocesos realizados en el presente trabajo fueron llevados a cabo durante periodos de tiempo de 16 a 24 horas (Anexo 2 y Figura 20), donde los bioensayos CB01-7, CB02-5, CB03-7, CB04-7 y CB05-7, mostraron porcentajes de DP de 70.11, 99.69, 88.34, 93.61 y 99.57 % respectivamente (Tabla 30 y Anexo 3), indicando que los consorcios bacterianos CB02, CB03, CB04 y CB05 permitirían reducir el tiempo de proceso a 16 horas, manteniendo porcentajes de desproteínización competitivos con los reportados por otros autores (18,25,30,37,72,88). Asimismo, los consorcios más eficientes fueron CB02 y CB05 con % DP de 99.69 y 99.57 respectivamente.

Cabe resaltar que este tipo de bioprocesos por lo general es llevado a cabo con una sola cepa, siendo las más usadas aquellas del género *Bacillus*, dado que poseen una alta capacidad proteolítica (72,81,82,89). Ghorbel-Bellaaj y colaboradores (2013), reportan una DP de 94% con *Bacillus pumilus* A1, durante 6 días de bioproceso a 35°C (18). Liu y colaboradores (2014) reportaron una DP de 87% con *Bacillus licheniformis*, durante 4 días de bioproceso a 30°C (37). Bashandy y colaboradores (2016) reportaron una DP del 96% con *Bacillus subtilis*, durante 6 días de fermentación a 35°C (72).

Otro género de bacterias altamente empleado es *Lactobacillus*, el cual además de actividad proteolítica tiene la capacidad de producir ácido láctico, el cual inhibe el crecimiento de bacterias competitivas y la microflora indeseada (15,29,90,91). Juárez en año 2010, reportó que con *Lactobacillus sp.* consiguió una DP de 78.2% luego de 5 días de fermentación a 30°C (17). Arbia y

colaboradores reportaron (2013) una DP del 78% con *Lactobacillus helveticus*, luego de 15 días de bioproceso a 32°C (29). Pacheco (2010), reportó una DP de 90% con *Lactobacillus plantarum* luego de 6 días de fermentación a 30°C (12).

Si bien el empleo de los géneros *Bacillus* y *Lactobacillus* en los bioprocesos de DP resulta una práctica usual y se consiguen valores de DP favorables, se mantienen los inconvenientes de los extensos periodos de tiempo para desproteínizar los tejidos. En el presente trabajo, no fueron incluidas especies del género *Bacillus* ni *Lactobacillus*.

Asimismo, en la búsqueda de mejorar el proceso, otros autores han estudiado alternativas como el uso de hongos y mezclas de bacterias (consorcios) (41,92–94). Los estudios de Aranday-García y colaboradores en el año 2017, mostraron que el hongo *Rhizopus oligosporus*, conseguía 96% DP luego de 120 horas de fermentación a 30°C (92). Por otra parte, Islas (2010) reportó una DP del 80.9% con una mezcla de especies bacterianas de tipo ácido lácticas, luego de 5 días de bioproceso a 30°C (40); de igual manera Francisco y colaboradores (2015), reportaron una DP de 84.4% con una mezcla de bacterias ácido lácticas luego de 3 días de bioproceso (95). Beaney y colaboradores (2005) utilizaron un cultivo mixto de microorganismos logrando un 97.2% de DP luego de 7 días de fermentación(96).

Aunque el uso de consorcios bacterianos reportados por otros autores no mostró reducir los tiempos de biorreacción, sí redujo el contenido de proteínas en los tejidos estudiados, según lo reportado por Islas, Francisco y colaboradores, y Beaney y colaboradores (2010, 2015, 2005). En el presente estudio los 5 consorcios bacterianos que fueron evaluados (Anexo 2), consiguieron reducir el contenido de proteína en residuos de langostino en 16 horas, es decir en menor tiempo de operación que lo reportado por los autores anteriormente mencionados. Los más eficientes consorcios fueron CB02 y CB05, los cuales consiguieron un %DP de 99.70 y 99.57 respectivamente luego de 16 horas de operación.

El consorcio bacteriano CB5 fue seleccionado en este estudio como el consorcio más adecuado, dada su velocidad para reducir el contenido de proteínas en residuos de langostino; y además debido a que no incluía microorganismos patógenos. Las mejores condiciones de operación obtenidas para el CB05 mediante el diseño factorial, fueron 35°C, 16 horas y 6 mL de inóculo a una concentración de  $10^7$  UFC/mL.

## CONCLUSIONES

1. Se seleccionaron 5 consorcios bacterianos (CB01, CB02, CB03, CB04 y CB05) con actividad proteolítica, los cuales fueron probados en bioprocesos de hidrólisis enzimática, reduciendo el contenido de proteína en residuos de langostinos.
2. Los 5 consorcios bacterianos conformados en el presente trabajo (CB01, CB02, CB03, CB04 y CB05), redujeron el contenido de proteínas en residuos de langostinos a diferentes condiciones de operación por encima de 50% (%DP) mediante bioprocesos de hidrólisis enzimática.
3. Las mejores condiciones de operación para cada consorcio bacteriano, que permitieron reducir el contenido de proteínas en los residuos de langostinos mediante el análisis de un diseño factorial de tipo  $2^3$ , fueron:
  - 35°C, 16 horas y  $6 \times 10^7$  UFC/mL para el consorcio bacteriano CB01.
  - 25°C, 16 horas y  $6 \times 10^7$  UFC/mL para el consorcio bacteriano CB02.
  - 35°C, 16 horas y  $6 \times 10^7$  UFC/mL para el consorcio bacteriano CB03.
  - 35°C, 16 horas y  $6 \times 10^7$  UFC/mL para el consorcio bacteriano CB04.
  - 35°C, 16 horas y  $6 \times 10^7$  UFC/mL para el consorcio bacteriano CB05.
4. El consorcio bacteriano más eficiente en hidrolizar las proteínas en residuos de langostinos y que podría ser considerado para escalamiento futuro con las mismas cepas que lo conforman, fue el consorcio bacteriano CB05, el cual redujo el contenido de proteínas en 99.525% (%DP) con una tasa de desproteínización de 0.810 % DP/hora.
5. El consorcio bacteriano más veloz en hidrolizar las proteínas de residuos de langostinos fue el consorcio bacteriano CB02, el cual redujo el contenido de proteínas en 99.699% (%DP) con una tasa de desproteínización de 1.913 %DP/hora; sin embargo, este no sería el más adecuado para futuro escalamiento por contener bacterias patógenas.

## RECOMENDACIONES

1. Se recomienda la optimización del bioproceso de desproteínización de residuos de langostinos utilizando el consorcio bacteriano CB05, para obtener las mejores condiciones de operación que permitan la máxima tasa de desproteínización de estos residuos, siendo este un paso previo al escalamiento y el posible uso de este consorcio en pruebas semi-piloto y piloto.
2. Se recomienda para trabajos posteriores evaluar la posibilidad de usar cepas recombinantes que contengan los genes del consorcio bacteriano CB02, de manera que permita aprovechar las características enzimáticas de dicho consorcio.
3. Con respecto a los consorcios bacterianos CB01, CB03 y CB04, se recomienda realizar evaluaciones ampliando el número de factores de manera que permita mejorar la comprensión del mecanismo de hidrólisis de los consorcios bacterianos sobre los residuos de langostinos y sobre la tasa de consumo de proteínas para afinar el modelo de bioproceso.
4. Se sugiere estudiar el aprovechamiento de restos musculares y vísceras que se generan durante la etapa de preparación de muestra de exoesqueleto total (ET).
5. Realizar estudios que permitan el aprovechamiento de otros compuestos a partir de los mismos residuos de langostinos, como productos proteicos en solución generados por el bioproceso de desproteínización (DP), los cuales podrían tener una aplicación y un valor en el mercado.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. PRODUCE. Anuario Estadístico Pesquero Y Acuícola 2015. 2015.
2. PRODUCE. Anuario Estadístico Pesquero Y Acuícola 2016. 2016.
3. Banco Central de Reserva de Perú (BCRP). Resumen Informativo Semanal N° 1 [Internet]. 34. 2018. Available from: <http://www.bcrp.gob.pe/docs/Publicaciones/Nota-Semanal/2017/resumen-informativo-34-2017.pdf>
4. Saldarriaga M, Regalado F. Potencial acuícola en el Perú. Moneda. 2017;34–9.
5. Biao X, Kaijin Y. Shrimp farming in China: Operating characteristics, environmental impact and perspectives. Ocean Coast Manag. 2007;50(7):538–50.
6. Se-Kwon Kim. Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives: Biological Activities and Applications. 2011. 3–37 p.
7. Beaney P, Lizardi-Mendoza J, Healy M. Comparison of chitins produced by chemical and bioprocessing methods. J Chem Technol Biotechnol. 2005;80(2):145–50.
8. Buschmann AH, López DA, Medina A. A review of the environmental effects and alternative production strategies of marine aquaculture in Chile. Aquac Eng. 2002;15(6):397–421.
9. Soto Cardenas GI. Visión general del sector acuícola nacional - Perú. National Aquaculture Sector Overview Fact Sheets. National Aquaculture Sector Overview. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma; 2005.
10. Arbia W, Arbia L, Adour L, Amrane A. Chitin Extraction from Crustacean Shells Using Biological Methods – A Review. 2013;9862(1):12–25.
11. Caprile M. Obtención y utilización de quitina y quitosano a partir de desechos de crustáceos. Int Solid Waste Assoc [Internet]. 2005;1–7. Available from: <http://www.ceiso.com.ar/documentos/caprilequitina.pdf>
12. Pacheco N. Extracción biotecnológica de quitina para la producción de quitosanos : caracterización y aplicación. Universidad Autónoma Metropolitana,

- Mexico; Université Claude Bernard Lyon , Francia; 2010.
13. Phuong PTD, Minh NC, Cuong HN, Van Minh N, Han NT, Van Hoa N, et al. Recovery of protein hydrolysate and chitosan from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) heads: approaching a zero waste process. *J Food Sci Technol* [Internet]. 2017 Jun 11;54(7):1850–6. Available from: m
  14. Cahú TB, Santos SD, Mendes A, Córdula CR, Chavante SF, Carvalho LB, et al. Recovery of protein, chitin, carotenoids and glycosaminoglycans from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste. *Process Biochem* [Internet]. 2012;47(4):570–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2011.12.012>
  15. Chakravarty J, Yang C, Palmer J, Brigham CJ, Brigham CJ. Chitin Extraction from Lobster Shell Waste using Microbial Culture-based Methods. *Appl Food Biotechnol*. 2018;5(3):141–54.
  16. Abdel-Rahman RM, Hrdina R, Abdel-Mohsen AM, Fouda MMG, Soliman AY, Mohamed FK, et al. Chitin and chitosan from Brazilian Atlantic Coast: Isolation, characterization and antibacterial activity. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2015;80:107–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.06.027>
  17. Juárez C. Estudio del uso de enzimas comerciales en la preparación de quitina a partir de desperdicios de camaron. Universidad Autónoma Metropolitana; 2010.
  18. Ghorbel-bellaaj O, Hajji S, Younes I, Chaabouni M. International Journal of Biological Macromolecules Optimization of chitin extraction from shrimp waste with *Bacillus pumilus* A1 using response surface methodology. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2013;61:243–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.07.001>
  19. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. *Penaeus vannamei* (Boone, 1931). Programa de información de especies acuáticas. Roma; 2006.
  20. Buleje V. “ Obtención de cepas bacterianas productoras de enzimas de interés industrial a partir de residuos de langostino (*Litopenaeus vannamei*, Boone,

- 1931).” UNIVERSIDAD NACIONAL FEDERICO VILLARREAL; 2017.
21. Holthuis LB. Shrimps and prawns of the world. Shrimps and Prawns of the World. An annotated catalogue of species of interest to fisheries. Vol. 1, Fao Fisheries Synopsis. Italia: FAO; 1980. 284 p.
  22. De Grave S, Fransen CHJM. WoRMS - World Register of Marine Species - *Penaeus vannamei* Boone, 1931 [Internet]. 2015 [cited 2018 Mar 30]. Available from: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=377748>
  23. Armenta R. Obtención de astaxantina a partir de residuos de camarón fermentados. Universidad Autónoma Metropolitana; 2002.
  24. Kumari S, Rath P, Sri Hari Kumar A, Tiwari TN. Extraction and characterization of chitin and chitosan from fishery waste by chemical method. Environ Technol Innov [Internet]. 2015;3:77–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eti.2015.01.002>
  25. Nouri M, Khodaiyan F, Razavi SH, Mousavi M. Improvement of chitosan production from Persian Gulf shrimp waste by response surface methodology. Food Hydrocoll [Internet]. 2016;59:50–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.08.027>
  26. Cadeza M. Estudio de factibilidad para la implementación de una red de valor de quitosano extraído de *Penaeus vannamei*; opción de desarrollo económico sustentable. [Internet]. 2014. Available from: [http://www.biblio.colpos.mx:8080/jspui/bitstream/handle/10521/256/Sanchez\\_Borja\\_M\\_DC\\_Fitosanidad\\_2010.pdf?sequence=1](http://www.biblio.colpos.mx:8080/jspui/bitstream/handle/10521/256/Sanchez_Borja_M_DC_Fitosanidad_2010.pdf?sequence=1)
  27. Barbosa Cahú T. Novo Método Para Obtenção De Proteínas, Cálcio, Quitina, Carotenóides E Glicosaminoglicanos De Cabeças De Camarão. UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO; 2010.
  28. Leung P, Engle C. Shrimp Culture [Internet]. Leung P, Engle C, editors. Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing; 2006. 1–335 p. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470277850>
  29. Arbia W, Adour L, Amrane A, Lounici H. Optimization of medium composition

- for enhanced chitin extraction from *Parapenaeus longirostris* by *Lactobacillus helveticus* using response surface methodology. *Food Hydrocoll* [Internet]. 2013;31(2):392–403. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.10.025>
30. Neves AC, Zanette C, Grade ST, Schaffer JV, Alves HJ, Arantes MK. <b>Optimization of lactic fermentation for extraction of chitin from freshwater shrimp waste. *Acta Sci Technol* [Internet]. 2017 May 15;39(2):125. Available from: <http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciTechnol/article/view/29370>
31. Pareek N, Singh RP, Ghosh S. Optimization of medium composition for enhanced chitin deacetylase production by mutant *Penicillium oxalicum* SAEM-51 using response surface methodology under submerged fermentation. *Process Biochem* [Internet]. 2011;46(8):1693–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2011.05.002>
32. Pareek N, Vivekanand V, Agarwal P, Saroj S, Singh RP. Bioconversion to chitosan: A two stage process employing chitin deacetylase from *Penicillium oxalicum* SAEM-51. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2013;96(2):417–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.005>
33. Sedaghat F, Yousefzadi M, Toiserkani H, Najafipour S. Bioconversion of shrimp waste *Penaeus merguensis* using lactic acid fermentation: An alternative procedure for chemical extraction of chitin and chitosan. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2017;104:883–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.099>
34. Wang Y, Chang Y, Yu L, Zhang C, Xu X, Xue Y, et al. Crystalline structure and thermal property characterization of chitin from Antarctic krill (*Euphausia superba*). *Carbohydr Polym* [Internet]. 2013;92(1):90–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.09.084>
35. Ma J, Xin C, Tan C. Preparation, physicochemical and pharmaceutical characterization of chitosan from *Catharsius molossus* residue. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2015;80:547–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.07.027>

36. Srinivasan H, Kanayairam V, Ravichandran R. Chitin and chitosan preparation from shrimp shells *Penaeus monodon* and its human ovarian cancer cell line, PA-1. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2018;107(PartA):662–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.035>
37. Liu P, Liu S, Guo N, Mao X, Lin H, Xue C, et al. Cofermentation of *Bacillus licheniformis* and *Gluconobacter oxydans* for chitin extraction from shrimp waste. *Biochem Eng J* [Internet]. 2014;91:10–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2014.07.004>
38. Zhang H, Jin Y, Deng Y, Wang D, Zhao Y. Production of chitin from shrimp shell powders using *Serratia marcescens* B742 and *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 successive two-step fermentation. *Carbohydr Res* [Internet]. 2012;362:13–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2012.09.011>
39. Zhang H, Fang J, Deng Y, Zhao Y. Optimized production of *Serratia marcescens* B742 mutants for preparing chitin from shrimp shells powders. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2014;69:319–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.05.058>
40. Islas R. Tratamiento microbiano de residuos de camarón para obtención de quitina y astaxantina. Universidad Autónoma Metropolitana; 2010.
41. Younes I, Hajji S, Rinaudo M, Chaabouni M, Jellouli K, Nasri M. Optimization of proteins and minerals removal from shrimp shells to produce highly acetylated chitin. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2016;84:246–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.034>
42. Illanes A. *Enzyme biocatalysis: Principles and applications*. Sprynger. 2008. 1–391 p.
43. Morales Velasquez A, Muñoz Vera MC. Establecimiento de la actividad lipolítica y de las condiciones de crecimiento del microorganismo presente en el fruto de palma maduro para al produccion de acidos grasos. UNIVERSIDAD DE LA SABANA; 2006.
44. CAR/PL. *Aplicaciones de la Biotecnología en la industria*. París; 2003.

45. Ray RC, Rosell CM. Microbial Enzyme Technology in Food Applications. Ray RC, Rosell CM, editors. CRC Press; 2017.
46. Nasri M. Protein Hydrolysates and Biopeptides: Production, Biological Activities, and Applications in Foods and Health Benefits. A Review. Adv Food Nutr Res [Internet]. 1st ed. 2017;81:109–59. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.10.003>
47. OECD. The application of biotechnology to industrial sustainability – a primer. OECD Publi. OECD Publishing; Paris; 2001. 1–140 p.
48. Skołućka-Szary K, Ramięga A, Piaskowska W, Janicki B, Grala M, Rieske P, et al. Chitin dipentanoate as the new technologically usable biomaterial. Mater Sci Eng C. 2015;55:50–60.
49. Guadix A, Guadix EM, Páez-Dueñas MP, Gonzáles-Tello P, Camacho F. Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. Ars Pharm. 2000;41(1):79–89.
50. Benítez R, Ibarz A, Pagan J. Hidrolizados de proteína : procesos y aplicaciones Resumen. Acta Bioquímica Clínica Latinoam. 2008;42(2):227–37.
51. De Holanda HD, Netto FM. Recovery of components from shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri*) processing waste by enzymatic hydrolysis. J Food Sci. 2006;71(5):298–303.
52. Montgomery D. Introduction to statistical quality control [Internet]. John Wiley & Sons Inc. 2009. 754 p. Available from: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Introduction+to+Statistical+Quality+Control#0>
53. Gutiérrez Pulido H, de la Vara Salazar R. Análisis y diseño de experimentos. 2012. 489 p.
54. Dean A, Voss D, Draguljić D. Design and Analysis of Experiments. 2nd ed. Vol. 3, Design and Analysis of Experiments. Springer International Publishing; 2017. 1–833 p.

55. Maxwell SE, Delaney HD, Kelley K. Designing experiments and Analyzing Data. Taylor & Francis Group; 2018. 5–1081 p.
56. Gutiérrez H, De la Vara R. Análisis y diseño de experimentos. 2 da. Cano A, Osorio M, editors. México, D.F: McGRAW-HILL; INTERAMERICANA EDITORES; 2008. 1–537 p.
57. Aranda D. Extracción y Caracterización del Aceite Crudo obtenido de un Hidrolizado enzimático de Residuos frescos de Anchoqueta (*Engraulis ringens*). Universidad Nacional Agraria La Molina; 2012.
58. FAO. Manual of food quality control. 1st ed. Swedish international development authority, editor. Rome: FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; 1986. 1–237 p.
59. Gútiérrez-Jiménez J, Luna-Cazás L, Mendoza-Orozco M, Díaz-Marina G de J, Burguete-Gutiérrez J, Feliciano-Guzmán J. Organización, mantenimiento y preservación de la Colección de Cultivos Bacterianos del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH), México. *Rev la Soc Venez Microbiol.* 2015;35:95–102.
60. Whiteley M, Brown E, McLean RJC. An inexpensive chemostat apparatus for the study of microbial biofilms. *J Microbiol Methods.* 1997;30(2):125–32.
61. Harmand J, Lobry C, Rapaport A, Sari T. The Chemostat. *The Chemostat.* 2017.
62. AOAC OM of A. Procedimiento para determinar materia grasa. Método Hidrólisis Ácida-Soxhlet. *J Chem Inf Model.* 1990;53(9):1689–99.
63. Díaz-Rojas EI, Argüelles-Monal WM, Higuera-Ciajara I, Hernández J, Lizardi-Mendoza J, Goycoolea FM. Determination of chitin and protein contents during the isolation of chitin from shrimp waste. *Macromol Biosci.* 2006;6(5):340–7.
64. Sanger F. The terminal peptides of insulin. *Biochem J.* 1949;45(5):563–74.
65. Dumay J, Barthomeuf C, Bergé J-P. How enzymes may be helpful for upgrading fish by-products: enhancement of fat extraction. *J Aquat Food Prodcut Technol.* 2004;13(2):69–84.

66. Czechowska-biskup R, Jarosińska D, Rokita B, Ulański P, Rosiak JM. Determination of Degree of Deacetylation of Chitosan - Comparison of Methods. *Prog Chem Appl chitin its Deriv.* 2012;17:5–20.
67. Hidalgo C, Suárez Y, Fernández Cervera M. Validación de una técnica potenciométrica para determinar el grado de desacetilación de la quitosana. *Ars Pharm.* 2008;49(3):245–57.
68. Hernández H, Águila E, Flores O, Viveros EL, Ramos E. Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Superf y Vacío* [Internet]. 2009;22(3):57–60. Available from: [http://smcsyv.fis.cinvestav.mx/supyvac/22\\_3/SV2235709.pdf](http://smcsyv.fis.cinvestav.mx/supyvac/22_3/SV2235709.pdf)
69. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock. *Biología de los Microorganismos* [Internet]. 10th ed. Brock *Biología de los Microorganismos*. Roma: PEARSON; 2004. 1096 p. Available from: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1139-67092004000100013&script=sci\\_arttext&tng=e](http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1139-67092004000100013&script=sci_arttext&tng=e)
70. Sedaghat F, Yousefzadi M, Toiserkani H, Najafipour S. Chitin from *Penaeus merguensis* via microbial fermentation processing and antioxidant activity. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2015;82:279–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.070>
71. Younes I, Ghorbel-Bellaaj O, Nasri R, Chaabouni M, Rinaudo M, Nasri M. Chitin and chitosan preparation from shrimp shells using optimized enzymatic deproteinization. *Process Biochem* [Internet]. 2012;47(12):2032–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2012.07.017>
72. Gamal RF, El-Tayeb TS, Raffat EI, Ibrahim HMM, Bashandy AS. Optimization of chitin yield from shrimp shell waste by *Bacillus subtilis* and impact of gamma irradiation on production of low molecular weight chitosan. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2016;91:598–608. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.008>
73. CHAN S-M, RANKIN SM, KEELEY LL. Characterization of the Molt Stages in *Penaeus vannamei*: Setogenesis and Hemolymph Levels of Total Protein, Ecdysteroids, and Glucose. *Biol Bull* [Internet]. 1988 Oct;175(2):185–92.

Available from: <https://www.journals.uchicago.edu/doi/10.2307/1541558>

74. Díaz AC, Petriella AM, Fenucci JL. Ciclo de muda y reproducción de la población del langostino *Pleoticus muelleri* ( Crustacea , Penaeoidea ) de Mar del Plata  
Molting cycle and reproduction in the population of the shrimp *Pleoticus muelleri* ( Crustacea , Penaeoidea ) from Mar del Plata. *Ciencias Mar.* 2003;29:343–55.
75. de Oliveira Cesar JR, Zhao B, Malecha S, Ako H, Yang J. Morphological and biochemical changes in the muscle of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* during the molt cycle. *Aquaculture.* 2006;261(2):688–94.
76. Goma G. White Biotechnology [Internet]. Ulber R, Sell D, editors. *Biochimie.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2007. XIX–XX. (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology; vol. 105). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-45696-4>
77. Turton R, Shaeiwitz JA, Bhattacharyya D, Whiting WB. *Analysis, Synthesis, and Design of Chemical Processes.* 2018. 1–16 p.
78. Hau HH, Gralnick JA. Ecology and Biotechnology of the Genus *Shewanella* . *Annu Rev Microbiol.* 2007;61(1):237–58.
79. Chen WC, Tseng WN, Hsieh JL, Wang YS, Wang SL. Biodegradation and microbial community changes upon shrimp shell wastes amended in mangrove river sediment. *J Environ Sci Heal - Part B Pestic Food Contam Agric Wastes.* 2010;45(5):473–7.
80. Thompson FL, Austin B, Swings JG. *The Biology of Vibrios.* 1st ed. Washington, D.C: ASM Press; 2006. 1–423 p.
81. Vázquez JA, Docasal SF, Mirón J, González MP, Murado MA. Proteases production by two *Vibrio* species on residuals marine media. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2006;33(8):661–8.
82. Venugopal M, Saramma A V. Characterization of alkaline protease from *Vibrio fluvialis* strain VM10 isolated from a mangrove sediment sample and its application as a laundry detergent additive. *Process Biochem.* 2006;41(6):1239–43.

83. O'Sullivan LA, Mahenthiralingam E. Under the microscope: Biotechnological potential within the genus Burkholderia. *Lett Appl Microbiol.* 2005;41(1):8–11.
84. Coenye T, Vandamme P. Diversity and significance of Burkholderia species occupying diverse ecological niches. *Environ Microbiol.* 2003;5(9):719–29.
85. Sombatjinda S, Boonapatcharoen N, Ruengjitchatchawalya M, Wantawin C, Withyachumnarnkul B, Techkarnjanaruk S. Dynamics of Microbial Communities in an Earthen Shrimp Pond during the Shrimp Growing Period. *Environ Nat Resour Res.* 2011;1(1).
86. Okafor N. *Modern Industrial Microbiology and Biotechnology* [Internet]. Vol. 3, Industrial. South Carolina: Science Publisher; 2007. 954–955 p. Available from: [http://www.socgenmicrobiol.org.uk/pubs/micro\\_today/book\\_reviews/MTNOV07/MTN07\\_12.cfm](http://www.socgenmicrobiol.org.uk/pubs/micro_today/book_reviews/MTNOV07/MTN07_12.cfm)
87. Zhang H, Yun S, Song L, Zhang Y, Zhao Y. The preparation and characterization of chitin and chitosan under large-scale submerged fermentation level using shrimp by-products as substrate. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2016;96:334–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.017>
88. Lin L, Guo D, Huang J, Zhang X, Zhang L, Wei C. Molecular structure and enzymatic hydrolysis properties of starches from high-amylose maize inbred lines and their hybrids. *Food Hydrocoll* [Internet]. 2016;58:246–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.03.001>
89. Mhamdi S, Bkhairia I, Nasri R, Mechichi T, Nasri M, Kamoun AS. Evaluation of the biotechnological potential of a novel purified protease BS1 from *Bacillus safensis* S406 on the chitin extraction and detergent formulation. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2017;104:739–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.062>
90. Castro R, Guerrero-Legarreta I, Bórquez R. Chitin extraction from *Allopetrolisthes punctatus* crab using lactic fermentation. *Biotechnol Reports* [Internet]. 2018;20:e00287. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00287>

91. Duan S, Li L, Zhuang Z, Wu W, Hong S, Zhou J. Improved production of chitin from shrimp waste by fermentation with epiphytic lactic acid bacteria. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2012;89(4):1283–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.04.051>
92. Aranday-García R, Román Guerrero A, Ifuku S, Shirai K. Successive inoculation of *Lactobacillus brevis* and *Rhizopus oligosporus* on shrimp wastes for recovery of chitin and added-value products. *Process Biochem* [Internet]. 2017;58(April):17–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2017.04.036>
93. Hamdi M, Hammami A, Hajji S, Jridi M, Nasri M, Nasri R. Chitin extraction from blue crab (*Portunus segnis*) and shrimp (*Penaeus kerathurus*) shells using digestive alkaline proteases from *P. segnis* viscera. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2017;101:455–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.103>
94. Younes I, Hajji S, Frachet V, Rinaudo M, Jellouli K, Nasri M. Chitin extraction from shrimp shell using enzymatic treatment. Antitumor, antioxidant and antimicrobial activities of chitosan. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2014;69:489–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.06.013>
95. Francisco FC, Simora RMC, Nuñal SN. Deproteination and demineralization of shrimp waste using lactic acid bacteria for the production of crude chitin and chitosan. *Int J Bioflux Soc*. 2015;8(1):107–15.
96. Gortari MC, Hours RA. Biotechnological processes for chitin recovery out of crustacean waste: A mini-review. *Electron J Biotechnol*. 2013;16(3).

## ANEXOS

### Anexo 1

#### Preparación de Medios de Cultivo

A continuación, se detallan los ingredientes empleados en todos los medios de cultivo.

Ingredientes para la preparación de TSA

<b>Agar Trypticasa de Soya (TSA)</b>	
<b>Insumos</b>	<b>Cantidades 1000 mL</b>
<i>Trypticasa</i>	15 g
<i>Peptona de soya</i>	5 g
<i>Cloruro de sodio</i>	5 g
<i>Agar</i>	15 g
<i>pH</i>	7.3 ±0.2
<i>Autoclavar a 121°C / 15 min</i>	

Ingredientes para la preparación de TSB

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

## Anexo 2

### Ensayos de desproteínización (condiciones de operación)

ENSAYOS DE DESPROTEINIZACIÓN DEL CBI				
N° ENSAYOS	CODIGO DE MUESTRA	FECHA	RESIDUO (ET): Exoesqueleto total triturado, lavado, pulverizado y secado a sesenta grados Celsius.	
			CONDICIONES	
			Diferentes	Similares
1	CB01-1	22/05/2018	Inóculo: 2ml/ Tiempo: 16 horas/Temperatura: 25°C/pH final:8	
1	CB01-2		Inóculo: 2ml/ Tiempo: 24 horas/Temperatura: 25°C/ pH final: 7.3	
1	CB01-3		Inóculo: 2ml/ Tiempo: 16 horas/Temperatura: 35°C/ pH final: 7.5	
1	CB01-4		Inóculo: 2ml/ Tiempo: 24 horas/Temperatura: 35°C/ pH final: 7.3	
1	CB01-5		Inóculo: 6ml/ Tiempo: 16 horas/Temperatura: 25°C/ pH final: 7.8	
1	CB01-6		Inóculo: 6ml/ Tiempo: 24 horas/Temperatura: 25°C/ pH final: 7	
1	CB01-7		Inóculo: 6ml/ Tiempo: 16 horas/Temperatura: 35°C/ pH final: 7	
1	CB01-8		Inóculo: 6ml/ Tiempo: 24 horas/Temperatura: 35°C/ pH final: 7	
1	C1+		Protamex: 3.75mg/Tiempo: 16 horas/Temperatura:25°C/pH final: 7	
1	C2+		Protamex: 3.75mg/Tiempo: 24 horas/Temperatura:35°C/pH final: 7	
1	C1-		Tiempo: 16 horas/Temperatura:25°C/pH final: 7	
1	C2-		Tiempo: 24 horas/Temperatura:35°C/pH final: 7	
12	<p><b>CB01-1:</b> Consorcio bacteriano 1 (biorreacción 1). <b>CB01-2:</b> Consorcio bacteriano 1 (biorreacción 2).  <b>CB01-3:</b> Consorcio bacteriano 1 (biorreacción 3). <b>CB01-4:</b> Consorcio bacteriano 1 (biorreacción 4).  <b>CB01-5:</b> Consorcio bacteriano 1 (biorreacción 5). <b>CB01-6:</b> Consorcio bacteriano 1 (biorreacción 6).  <b>CB01-7:</b> Consorcio bacteriano 1 (biorreacción 7). <b>CB01-8:</b> Consorcio bacteriano 1 (biorreacción 8).  <b>C+:</b> Control Positivo (Protamex)      <b>C-:</b> Control Negativo</p>			

ENSAYOS DE DESPROTEINIZACIÓN DEL CB2				
N° ENSAYOS	CODIGO DE MUESTRA	FECHA	RESIDUO (ET): Exoesqueleto total triturado, lavado, pulverizado y secado a sesenta grados Celsius.	
			CONDICIONES	
			Diferentes	Similares
1	CB02-1	02/06/2018	Inóculo: 2ml/ Tiempo: 16 horas/Temperatura: 25°C/pH final:6.5	
1	CB02-2		Inóculo: 2ml/ Tiempo: 24 horas/Temperatura: 25°C/ pH final:6.5	
1	CB02-3		Inóculo: 2ml/ Tiempo: 16 horas/Temperatura: 35°C/ pH final: 6.8	
1	CB02-4		Inóculo: 2ml/ Tiempo: 24 horas/Temperatura: 35°C/ pH final: 6.5	
1	CB02-5		Inóculo: 6ml/ Tiempo: 16 horas/Temperatura: 25°C/ pH final: 6.7	
1	CB02-6		Inóculo: 6ml/ Tiempo: 24 horas/Temperatura: 25°C/ pH final: 6.6	
1	CB02-7		Inóculo: 6ml/ Tiempo: 16 horas/Temperatura: 35°C/ pH final: 6.7	
1	CB02-8		Inóculo: 6ml/ Tiempo: 24 horas/Temperatura: 35°C/ pH final: 6.5	
1	C1+		Protamex: 3.75mg/Tiempo: 16 horas/Temperatura:25°C/pH final: 7	
1	C2+		Protamex: 3.75mg/Tiempo: 24 horas/Temperatura:35°C/pH final: 7	
1	C1-		Tiempo: 16 horas/Temperatura:25°C/pH final: 7	
1	C2-		Tiempo: 24 horas/Temperatura:35°C/pH final: 7	
12	<b>CB02-1:</b> Consorcio bacteriano 2 (biorreacción 1). <b>CB02-2:</b> Consorcio bacteriano 2 (biorreacción 2). <b>CB02-3:</b> Consorcio bacteriano 2 (biorreacción 3). <b>CB02-4:</b> Consorcio bacteriano 2 (biorreacción 4). <b>CB02-5:</b> Consorcio bacteriano 2 (biorreacción 5). <b>CB02-6:</b> Consorcio bacteriano 2 (biorreacción 6). <b>CB02-7:</b> Consorcio bacteriano 2 (biorreacción 7). <b>CB02-8:</b> Consorcio bacteriano 2 (biorreacción 8). <b>C+:</b> Control Positivo (Protamex) <b>C-:</b> Control Negativo			

ENSAYOS DE DESPROTEINIZACIÓN DEL CB3				
N° ENSAYOS	CODIGO DE MUESTRA	FECHA	RESIDUO (ET): Exoesqueleto total triturado, lavado, pulverizado y secado a sesenta grados Celsius.	
			CONDICIONES	
			Diferentes	Similares
1	CB03-1	14/07/2018	Inóculo: 2ml/ Tiempo: 16 horas/Temperatura: 25°C/pH final:7	
1	CB03-2		Inóculo: 2ml/ Tiempo: 24 horas/Temperatura: 25°C/ pH final:7	
1	CB03-3		Inóculo: 2ml/ Tiempo: 16 horas/Temperatura: 35°C/ pH final: 7	
1	CB03-4		Inóculo: 2ml/ Tiempo: 24 horas/Temperatura: 35°C/ pH final: 7	
1	CB03-5		Inóculo: 6ml/ Tiempo: 16 horas/Temperatura: 25°C/ pH final: 7	
1	CB03-6		Inóculo: 6ml/ Tiempo: 24 horas/Temperatura: 25°C/ pH final: 6.5	
1	CB03-7		Inóculo: 6ml/ Tiempo: 16 horas/Temperatura: 35°C/ pH final: 7	
1	CB03-8		Inóculo: 6ml/ Tiempo: 24 horas/Temperatura: 35°C/ pH final: 7	
1	C1+		Protamex: 3.75mg/Tiempo: 16 horas/Temperatura:25°C/pH final: 7	
1	C2+		Protamex: 3.75mg/Tiempo: 24 horas/Temperatura:35°C/pH final: 7	
1	C1-		Tiempo: 16 horas/Temperatura:25°C/pH final: 7	
1	C2-		Tiempo: 24 horas/Temperatura:35°C/pH final: 7	
12	<b>CB03-1:</b> Consorcio bacteriano 2 (biorreacción 1). <b>CB03-2:</b> Consorcio bacteriano 2 (biorreacción 2). <b>CB03-3:</b> Consorcio bacteriano 2 (biorreacción 3). <b>CB03-4:</b> Consorcio bacteriano 2 (biorreacción 4). <b>CB03-5:</b> Consorcio bacteriano 2 (biorreacción 5). <b>CB03-6:</b> Consorcio bacteriano 2 (biorreacción 6). <b>CB03-7:</b> Consorcio bacteriano 2 (biorreacción 7). <b>CB03-8:</b> Consorcio bacteriano 2 (biorreacción 8). <b>C+:</b> Control Positivo (Protamex) <b>C-:</b> Control Negativo			

ENSAYOS DE DESPROTEINIZACIÓN DEL CB4				
N° ENSAYOS	CODIGO DE MUESTRA	FECHA	RESIDUO (ET): Exoesqueleto total triturado, lavado, pulverizado y secado a sesenta grados Celsius.	
			CONDICIONES	
			Diferentes	Similares
1	CB04-1	15/08/2018	Inóculo: 2ml/ Tiempo: 16 horas/Temperatura: 25°C/pH final:7	
1	CB04-2		Inóculo: 2ml/ Tiempo: 24 horas/Temperatura: 25°C/ pH final:7	
1	CB04-3		Inóculo: 2ml/ Tiempo: 16 horas/Temperatura: 35°C/ pH final: 7	
1	CB04-4		Inóculo: 2ml/ Tiempo: 24 horas/Temperatura: 35°C/ pH final: 7	
1	CB04-5		Inóculo: 6ml/ Tiempo: 16 horas/Temperatura: 25°C/ pH final: 7	
1	CB04-6		Inóculo: 6ml/ Tiempo: 24 horas/Temperatura: 25°C/ pH final: 6.5	
1	CB04-7		Inóculo: 6ml/ Tiempo: 16 horas/Temperatura: 35°C/ pH final: 7	
1	CB04-8		Inóculo: 6ml/ Tiempo: 24 horas/Temperatura: 35°C/ pH final: 7	
1	C1+		Protamex: 3.75mg/Tiempo: 16 horas/Temperatura:25°C/pH final: 7	
1	C2+		Protamex: 3.75mg/Tiempo: 24 horas/Temperatura:35°C/pH final: 7	
1	C1-		Tiempo: 16 horas/Temperatura:25°C/pH final: 7	
1	C2-		Tiempo: 24 horas/Temperatura:35°C/pH final: 7	
12	<b>CB04-1:</b> Consorcio bacteriano 2 (biorreacción 1). <b>CB04-2:</b> Consorcio bacteriano 2 (biorreacción 2). <b>CB04-3:</b> Consorcio bacteriano 2 (biorreacción 3). <b>CB04-4:</b> Consorcio bacteriano 2 (biorreacción 4). <b>CB04-5:</b> Consorcio bacteriano 2 (biorreacción 5). <b>CB04-6:</b> Consorcio bacteriano 2 (biorreacción 6). <b>CB04-7:</b> Consorcio bacteriano 2 (biorreacción 7). <b>CB04-8:</b> Consorcio bacteriano 2 (biorreacción 8). <b>C+:</b> Control Positivo (Protamex) <b>C-:</b> Control Negativo			

ENSAYOS DE DESPROTEINIZACIÓN DEL CBS				
N° ENSAYOS	CODIGO DE MUESTRA	FECHA	RESIDUO (ET): Exoesqueleto total triturado, lavado, pulverizado y secado a sesenta grados Celsius.	
			CONDICIONES	
			Diferentes	Similares
1	CB05-1	05/09/2018	Inóculo: 2ml/ Tiempo: 16 horas/Temperatura: 25°C/pH final:7	
1	CB05-2		Inóculo: 2ml/ Tiempo: 24 horas/Temperatura: 25°C/ pH final:7	
1	CB05-3		Inóculo: 2ml/ Tiempo: 16 horas/Temperatura: 35°C/ pH final: 7	
1	CB05-4		Inóculo: 2ml/ Tiempo: 24 horas/Temperatura: 35°C/ pH final: 7	
1	CB05-5		Inóculo: 6ml/ Tiempo: 16 horas/Temperatura: 25°C/ pH final: 7	
1	CB05-6		Inóculo: 6ml/ Tiempo: 24 horas/Temperatura: 25°C/ pH final: 6.5	
1	CB05-7		Inóculo: 6ml/ Tiempo: 16 horas/Temperatura: 35°C/ pH final: 7	
1	CB05-8		Inóculo: 6ml/ Tiempo: 24 horas/Temperatura: 35°C/ pH final: 7	
1	C1+		Protamex: 3.75mg/Tiempo: 16 horas/Temperatura:25°C/pH final: 7	
1	C2+		Protamex: 3.75mg/Tiempo: 24 horas/Temperatura:35°C/pH final: 7	
1	C1-		Tiempo: 16 horas/Temperatura:25°C/pH final: 7	
1	C2-		Tiempo: 24 horas/Temperatura:35°C/pH final: 7	
12	<b>CB05-1:</b> Consorcio bacteriano 2 (biorreacción 1). <b>CB05-2:</b> Consorcio bacteriano 2 (biorreacción 2). <b>CB05-3:</b> Consorcio bacteriano 2 (biorreacción 3). <b>CB05-4:</b> Consorcio bacteriano 2 (biorreacción 4). <b>CB05-5:</b> Consorcio bacteriano 2 (biorreacción 5). <b>CB05-6:</b> Consorcio bacteriano 2 (biorreacción 6). <b>CB05-7:</b> Consorcio bacteriano 2 (biorreacción 7). <b>CB05-8:</b> Consorcio bacteriano 2 (biorreacción 8). <b>C+:</b> Control Positivo (Protamex) <b>C-:</b> Control Negativo			

### Anexo 3

## Ensayos de caracterización de las fracciones obtenidas de los bioprocesos de hidrólisis

### - Composición química proximal

ENSAYOS DE DESPROTEINIZACIÓN DEL CB1										
CODIGO DE MUESTRA	FECHA	COMPOSICIÓN QUÍMICA PROXIMAL BASE HUMEDA					COMPOSICIÓN QUÍMICA PROXIMAL BASE SECA			
		Humedad (%H)	Ceniza (%C)	Grasa Cruda (%G)	Proteína (%P)	Quitina (%Q)	Ceniza (%C)	Grasa Cruda (%G)	Proteína (%P)	Quitina (%Q)
ET	22/07/2016	7.426	29.549	1.545	28.466	33.013	31.919	1.669	30.750	35.662
CB01-1		7.613	32.969	0.786	12.156	46.477	35.685	0.850	13.189	50.275
		7.613	32.811	0.868	12.404	46.304	35.514	0.940	13.426	50.120
CB01-2		7.799	32.624	0.344	15.937	43.296	35.383	0.373	17.285	46.958
		7.799	32.602	0.330	15.854	43.415	35.360	0.358	17.195	47.088
CB01-3		7.799	32.382	0.344	14.101	45.374	35.121	0.373	15.293	49.212
		7.799	32.287	0.368	13.932	45.614	35.018	0.399	15.111	49.473
CB01-4		7.762	32.985	0.264	11.389	47.601	35.760	0.286	12.347	51.607
		7.762	32.795	0.267	11.581	47.595	35.555	0.289	12.555	51.600
CB01-5**		7.426	32.201	0.264	8.722	51.387	34.784	0.285	9.422	55.509
		7.426	32.092	0.233	8.675	51.573	34.667	0.252	9.371	55.711
CB01-6		7.613	31.494	0.347	15.454	45.092	34.090	0.375	16.728	48.807
		7.613	31.227	0.342	15.245	45.573	33.800	0.371	16.501	49.328
CB01-7*		7.804	32.143	0.347	8.526	51.180	34.864	0.376	9.247	55.513
		7.804	32.149	0.326	8.425	51.296	34.870	0.354	9.138	55.638
CB01-8		7.847	32.130	0.543	2.956	56.524	34.866	0.589	3.208	61.337
		7.847	31.683	0.551	2.858	57.060	34.381	0.598	3.102	61.919
C1+		8.468	31.487	0.347	23.798	35.900	34.400	0.379	26.000	39.221
C2+		8.582	30.719	0.342	22.228	38.129	33.603	0.374	24.314	41.709
C1-		8.430	30.047	0.344	26.729	34.450	32.813	0.376	29.189	37.621
C2-	8.674	31.410	0.351	26.704	32.861	34.393	0.384	29.240	35.983	

\* Se obtuvo la mejor desproteínización de todos los sistemas.  
\*\* Se obtuvo la segunda mejor desproteínización.

ENSAYOS DE DESPROTEINIZACIÓN DEL CB2										
CODIGO DE MUESTRA	FECHA	COMPOSICIÓN QUÍMICA PROXIMAL BASE HUMEDA					COMPOSICIÓN QUÍMICA PROXIMAL BASE SECA			
		Humedad (%H)	Ceniza (%C)	Grasa Cruda (%G)	Proteína (%P)	Quitina (%Q)	Ceniza (%C)	Grasa Cruda (%G)	Proteína (%P)	Quitina (%Q)
ET	03/07/2016	7.426	29.549	1.367	28.420	33.239	31.919	1.476	30.700	35.905
CB02-1		7.426	32.184	0.347	5.774	54.269	34.766	0.375	6.237	58.622
		7.426	32.184	0.347	5.774	54.269	34.750	0.366	6.372	58.513
CB02-2		7.804	34.641	0.264	7.636	49.655	37.573	0.286	8.283	53.858
		7.720	34.934	0.298	7.523	49.525	37.856	0.323	8.153	53.668
CB02-3		7.762	39.295	0.347	7.190	45.407	42.601	0.376	7.795	49.228
		7.013	39.338	0.333	7.351	45.965	42.305	0.358	7.906	49.431
CB02-4		7.799	34.976	0.802	16.182	40.241	37.935	0.870	17.551	43.645
		7.619	35.064	0.783	16.096	40.438	37.956	0.848	17.423	43.773
CB02-5*		7.847	38.655	0.347	0.085	53.066	41.946	0.376	0.092	57.585
		7.796	38.102	0.348	0.088	53.666	41.324	0.377	0.096	58.203
CB02-6		7.613	33.322	0.679	4.306	54.079	36.068	0.735	4.661	58.535
		7.653	33.598	0.667	4.111	53.971	36.382	0.722	4.452	58.444
CB02-7**		7.613	34.169	0.302	0.144	57.772	36.985	0.327	0.156	62.532
		7.641	34.308	0.254	0.168	57.629	37.146	0.275	0.182	62.397
CB02-8		7.799	33.379	0.264	7.596	50.963	36.202	0.286	8.238	55.274
		7.825	33.364	0.271	7.469	51.072	36.196	0.294	8.103	55.407
C1+		7.613	33.038	0.264	24.815	34.271	35.760	0.285	26.859	37.095
C2+		7.762	32.160	0.344	22.809	36.925	34.866	0.373	24.729	40.033
C1-		7.799	32.144	0.347	26.874	32.836	34.864	0.376	29.147	35.613
C2-	7.874	31.571	0.264	26.525	33.767	34.269	0.286	28.792	36.653	

\* Se obtuvo la mejor desproteínización de todos los sistemas.

\*\* Se obtuvo la segunda mejor desproteínización.

ENSAYOS DE DESPROTEINIZACIÓN DEL CB3										
CODIGO DE MUESTRA	FECHA	COMPOSICIÓN QUÍMICA PROXIMAL BASE HUMEDA					COMPOSICIÓN QUÍMICA PROXIMAL BASE SECA			
		Humedad (%H)	Ceniza (%C)	Grasa Cruda (%G)	Proteína (%P)	Quitina (%Q)	Ceniza (%C)	Grasa Cruda (%G)	Proteína (%P)	Quitina (%Q)
ET	07/05/2016	9.014	27.688	1.545	10.490	51.263	30.431	1.698	11.529	56.342
CB03-1		7.956	35.345	0.786	7.208	48.705	38.400	0.854	7.831	52.915
		8.028	35.742	0.744	7.517	47.969	38.862	0.809	8.173	52.156
CB03-2		9.067	32.372	0.344	6.367	51.850	35.600	0.378	7.002	57.020
		9.014	32.175	0.388	6.473	51.950	35.362	0.427	7.114	57.097
CB03-3**		8.114	35.192	0.264	2.261	54.169	38.300	0.287	2.460	58.953
		8.539	35.544	0.204	2.416	53.297	38.862	0.223	2.642	58.273
CB03-4		9.259	32.667	0.347	6.737	50.990	36.000	0.382	7.424	56.193
		9.480	32.824	0.325	6.713	50.659	36.261	0.359	7.416	55.964
CB03-5		9.528	38.270	0.344	6.214	45.645	42.300	0.380	6.868	50.452
		9.874	38.049	0.388	6.241	45.448	42.218	0.431	6.924	50.427
CB03-6		9.015	39.943	0.264	2.233	48.546	43.900	0.290	2.454	53.356
		8.585	38.717	0.253	2.326	50.118	42.354	0.277	2.544	54.825
CB03-7*		9.276	38.376	0.347	1.173	50.828	42.300	0.382	1.293	56.025
		9.462	38.523	0.386	1.265	50.364	42.549	0.426	1.397	55.627
CB03-8		9.337	38.350	0.543	0.336	51.434	42.300	0.599	0.370	56.731
		9.010	38.716	0.539	0.293	51.443	42.549	0.592	0.323	56.537
C1+		9.014	31.226	0.347	8.818	50.595	34.320	0.381	9.691	55.608
C2+		9.014	30.007	0.344	9.674	50.961	32.980	0.378	10.632	56.010
C1-		9.226	37.127	0.342	7.857	45.449	40.900	0.377	8.655	50.068
C2-	9.256	36.207	0.340	9.479	44.718	39.900	0.375	10.446	49.279	

\* Se obtuvo la mejor desproteínización de todos los sistemas.

\*\* Se obtuvo la segunda mejor desproteínización.

ENSAYOS DE DESPROTEINIZACIÓN DEL CB4										
CODIGO DE MUESTRA	FECHA	COMPOSICIÓN QUÍMICA PROXIMAL BASE HUMEDA					COMPOSICIÓN QUÍMICA PROXIMAL BASE SECA			
		Humedad (%H)	Ceniza (%C)	Grasa Cruda (%G)	Proteína (%P)	Quitina (%Q)	Ceniza (%C)	Grasa Cruda (%G)	Proteína (%P)	Quitina (%Q)
ET	22/07/2016	9.014	29.042	1.545	27.928	32.471	31.919	1.698	30.695	35.688
CB04-1		9.259	31.743	0.786	6.022	52.190	34.982	0.866	6.637	57.515
		9.017	31.732	0.744	5.925	52.582	34.877	0.818	6.512	57.794
CB04-2		9.533	33.939	0.344	9.083	47.101	37.515	0.380	10.040	52.065
		9.285	34.355	0.388	9.217	46.755	37.871	0.428	10.160	51.541
CB04-3		7.956	33.565	0.264	7.578	50.638	36.466	0.286	8.232	55.015
		7.556	33.562	0.204	7.735	50.943	36.306	0.221	8.367	55.106
CB04-4		9.067	35.907	0.347	1.844	52.836	39.487	0.381	2.028	58.104
		8.516	36.476	0.325	1.871	52.812	39.872	0.355	2.045	57.728
CB04-5**		8.496	37.937	0.344	1.868	51.354	41.460	0.376	2.042	56.123
		8.308	38.405	0.388	1.802	51.098	41.884	0.423	1.965	55.728
CB04-6		9.067	38.825	0.264	1.104	50.740	42.696	0.290	1.214	55.799
		9.080	38.307	0.253	1.178	51.181	42.133	0.279	1.296	56.292
CB04-7*		9.067	36.682	0.347	1.734	52.170	40.339	0.381	1.907	57.372
		9.062	36.469	0.386	1.831	52.252	40.103	0.424	2.014	57.459
CB04-8		8.333	41.651	0.543	0.953	48.520	45.437	0.592	1.039	52.931
		8.307	41.857	0.539	0.857	48.440	45.650	0.587	0.934	52.828
C1+		8.498	31.477	0.347	22.562	37.116	34.400	0.379	24.658	40.563
C2+		8.409	30.777	0.342	20.642	39.830	33.603	0.373	22.537	43.487
C1-		8.450	30.041	0.344	27.441	33.724	32.813	0.376	29.974	36.837
C2-	8.374	31.513	0.340	27.040	32.732	34.393	0.372	29.512	35.724	

\* Se obtuvo la mejor desproteínización de todos los sistemas.

\*\* Se obtuvo la segunda mejor desproteínización.

ENSAYOS DE DESPROTEINIZACIÓN DEL CB5										
CODIGO DE MUESTRA	FECHA	COMPOSICIÓN QUÍMICA PROXIMAL BASE HUMEDA					COMPOSICIÓN QUÍMICA PROXIMAL BASE SECA			
		Humedad (%H)	Ceniza (%C)	Grasa Cruda (%G)	Proteína (%P)	Quitina (%Q)	Ceniza (%C)	Grasa Cruda (%G)	Proteína (%P)	Quitina (%Q)
ET	26/05/2016	9.014	27.688	1.545	11.851	49.901	30.431	1.698	13.025	54.845
CB05-1		7.956	30.457	0.786	3.086	57.715	33.090	0.854	3.353	62.704
		7.976	30.487	0.744	3.291	57.503	33.129	0.808	3.576	62.486
CB05-2		9.067	28.326	0.344	3.260	59.004	31.150	0.378	3.585	64.887
		9.063	28.538	0.388	3.197	58.814	31.382	0.427	3.516	64.675
CB05-3**		7.850	27.866	0.344	0.166	63.774	33.230	0.287	0.180	69.205
		7.865	27.669	0.388	0.188	63.890	33.337	0.222	0.204	69.344
CB05-4		9.067	26.498	0.264	0.003	64.167	29.140	0.290	0.004	70.566
		9.303	26.885	0.253	0.003	63.556	29.642	0.279	0.003	70.075
CB05-5		8.114	30.534	0.264	3.493	57.595	30.240	0.287	3.802	62.681
		8.218	30.597	0.204	3.641	57.340	30.031	0.222	3.967	62.474
CB05-6		9.014	29.033	0.347	3.712	57.893	31.908	0.381	4.080	63.629
		9.188	28.907	0.325	3.647	57.933	31.832	0.358	4.016	63.795
CB05-7*		9.067	30.908	0.347	0.056	59.622	33.990	0.381	0.062	65.567
		9.063	30.845	0.386	0.047	59.659	33.919	0.424	0.051	65.604
CB05-8		8.114	32.197	0.543	0.670	58.476	35.040	0.591	0.729	63.640
		8.333	32.202	0.539	0.654	58.271	35.130	0.588	0.714	63.569
C1+		9.014	28.788	0.347	10.027	51.824	31.640	0.381	11.020	56.959
C2+		9.259	31.215	0.342	8.495	50.689	34.400	0.377	9.362	55.862
C1-		9.014	29.625	0.344	11.253	49.763	32.560	0.378	12.368	54.693
C2-	9.528	30.290	0.340	10.762	49.080	33.480	0.376	11.895	54.249	

\* Se obtuvo la mejor desproteínización de todos los sistemas.

\*\* Se obtuvo la segunda mejor desproteínización.

- **Caracterización de hidrolizado (fracción soluble) y fracción insoluble obtenidos.**

Caracterización de Hidrolizado del CBI							
CODIGO DE MUESTRA	FECHA	ENSAYOS					
		Proteína remanente (%Pr)	g GLY/g Muestra	%GH (g Gly/g Muestra)	%DD	%DP	Tasa de DP (%DP/hora)
ET	22/07/2016	30.750	0.005	2.181	0.000	0.000	0.000
CB01-1a		13.189	0.029	12.828	22.440	57.108	1.098
CB01-1b		13.426	0.028	12.702	25.126	56.338	1.083
CB01-2a		17.285	0.020	8.789	21.250	43.788	0.561
CB01-2b		17.195	0.020	8.762	14.459	44.080	0.565
CB01-3a		15.293	0.023	10.354	25.360	50.265	0.966
CB01-3b		15.111	0.023	10.507	20.226	50.859	0.977
CB01-4a		12.347	0.030	13.187	20.175	59.847	0.767
CB01-4b		12.555	0.029	12.989	20.402	59.169	0.758
CB01-5a**		9.422	0.035	15.724	22.192	69.360	1.333
CB01-5b**		9.371	0.035	15.760	21.366	69.526	1.336
CB01-6a		16.728	0.026	11.451	20.325	45.601	0.584
CB01-6b		16.501	0.026	11.496	20.005	46.339	0.594
CB01-7a*		9.247	0.042	18.917	22.380	69.927	1.344
CB01-7b*		9.138	0.042	18.854	15.174	70.282	1.351
CB01-8a		3.208	0.043	19.123	32.160	89.567	1.148
CB01-8b		3.102	0.043	19.159	30.150	89.913	1.152
C1+		26.000	0.020	8.816	16.125	15.448	0.297
C2+		24.314	0.021	9.652	13.004	20.929	0.268
C1-		29.189	0.008	2.092	10.025	5.075	0.098
C2-	29.240	0.004	1.626	12.365	4.909	0.063	

\* Se obtuvo la mejor desproteínización de todos los sistemas.

\*\* Se obtuvo la segunda mejor desproteínización.

Caracterización de Hidrolizado del CB2							
CODIGO DE MUESTRA	FECHA	ENSAYOS					
		Proteína remanente (%Pr)	g GLY/g Muestra	%GH (g Gly/g Muestra)	%DD	%DP	Tasa de DP (%DP/hora)
ET	22/07/2016	30.700	0.002	1.172	0.000	0.000	0.000
CB02-1a		6.237	0.035	20.903	32.344	79.683	1.529
CB02-1b		6.372	0.033	20.360	40.025	79.245	1.521
CB02-2a		8.283	0.037	21.579	28.350	73.020	0.934
CB02-2b		8.153	0.029	21.422	25.106	73.444	0.939
CB02-3a		7.795	0.035	20.903	29.176	74.608	1.432
CB02-3b		7.906	0.026	20.823	35.122	74.249	1.425
CB02-4a		17.551	0.033	19.730	20.130	42.830	0.548
CB02-4b		17.423	0.020	19.711	20.055	43.246	0.553
CB02-5a*		0.092	0.043	25.166	46.117	99.699	1.913
CB02-5b*		0.096	0.041	25.152	49.142	99.688	1.913
CB02-6a		4.661	0.031	18.189	38.265	84.816	1.085
CB02-6b		4.452	0.030	18.175	43.266	85.499	1.094
CB02-7a**		0.156	0.033	19.519	40.012	99.492	1.909
CB02-7b**		0.182	0.018	19.454	31.285	99.408	1.907
CB02-8a		8.238	0.028	16.353	28.420	73.166	0.936
CB02-8b		8.103	0.022	16.289	30.366	73.606	0.942
C1+		26.859	0.003	2.292	8.101	12.509	0.240
C2+		24.728	0.006	4.365	10.125	19.450	0.249
C1-		29.147	0.002	1.172	11.466	5.057	0.097
C2-	28.792	0.005	3.250	12.055	6.215	0.079	

\* Se obtuvo la mejor desproteinización de todos los sistemas.

\*\* Se obtuvo la segunda mejor desproteinización.

Caracterización de Hidrolizado del CB3							
CODIGO DE MUESTRA	FECHA	ENSAYOS					
		Proteína remanente (%Pr)	g GLY/g Muestra	%GH (g Gly/g Muestra)	%DD	%DP	Tasa de DP (%DP/hora)
ET	22/07/2016	11.529	0.004	2.449	0.000	0.000	0.000
CB03-1		7.831	0.006	3.659	32.035	32.074	0.231
CB03-1		8.173	0.006	3.677	30.255	29.104	0.210
CB03-2		7.002	0.002	1.332	30.196	39.264	0.189
CB03-2		7.114	0.002	1.345	30.201	38.290	0.184
CB03-3**		2.460	0.020	12.781	39.006	78.658	0.567
CB03-3**		2.642	0.021	12.835	40.015	77.084	0.555
CB03-4		7.424	0.013	8.391	31.066	35.601	0.171
CB03-4		7.416	0.014	8.817	25.786	35.674	0.171
CB03-5		6.868	0.002	1.283	30.142	40.425	0.291
CB03-5		6.924	0.002	1.256	35.001	39.938	0.288
CB03-6		2.454	0.005	3.014	43.105	78.711	0.378
CB03-6		2.544	0.005	2.987	47.005	77.930	0.374
CB03-7*		1.293	0.024	14.947	48.112	88.784	0.640
CB03-7*		1.397	0.022	14.870	45.106	87.881	0.633
CB03-8		0.370	0.028	17.365	56.063	96.790	0.465
CB03-8		0.323	0.028	17.490	56.100	97.201	0.467
C1+		9.691	0.007	2.449	23.185	15.940	0.115
C2+		10.632	0.006	4.009	31.020	24.925	0.120
C1-		8.655	0.002	1.166	11.051	7.779	0.056
C2-	10.446	0.002	1.390	8.162	9.396	0.045	

\* Se obtuvo la mejor desproteínización de todos los sistemas.

\*\* Se obtuvo la segunda mejor desproteínización.

Caracterización de Hidrolizado del CB4							
CODIGO DE MUESTRA	FECHA	ENSAYOS					
		Proteína remanente (%Pr)	g GLY/g Muestra	%GH (g Gly/g Muestra)	%DD	%DP	Tasa de DP (%DP/hora)
ET	22/07/2016	30.695	0.005	2.076	0.000	0.000	0.000
CB04-1		6.637	0.002	0.836	30.162	78.378	1.504
CB04-1		6.512	0.002	0.839	32.155	78.785	1.511
CB04-2		10.040	0.013	5.729	28.425	67.291	0.861
CB04-2		10.160	0.012	5.427	30.022	66.900	0.856
CB04-3		8.232	0.018	7.910	31.320	73.180	1.404
CB04-3		8.367	0.017	7.822	35.126	72.741	1.395
CB04-4		2.028	0.010	4.263	37.185	93.394	1.194
CB04-4		2.045	0.009	4.234	32.004	93.338	1.194
CB04-5**		2.042	0.012	5.583	38.142	93.348	1.791
CB04-5**		1.965	0.012	5.592	35.426	93.598	1.796
CB04-6		1.214	0.010	4.630	40.112	96.044	1.228
CB04-6		1.296	0.010	4.777	44.022	95.778	1.225
CB04-7*		1.907	0.015	6.856	40.205	93.786	1.799
CB04-7*		2.014	0.015	6.838	40.400	93.439	1.793
CB04-8		1.039	0.037	16.605	44.063	96.614	1.236
CB04-8		0.934	0.036	16.767	40.491	96.956	1.240
C1+		24.658	0.002	0.971	16.111	19.667	0.377
C2+		22.537	0.003	1.542	11.284	26.578	0.340
C1-		29.974	0.0004	0.209	10.066	2.347	0.045
C2-	29.512	0.001	0.662	13.501	3.853	0.049	

\* Se obtuvo la mejor desproteínización de todos los sistemas.

\*\* Se obtuvo la segunda mejor desproteínización.

Caracterización de Hidrolizado del CB5							
CODIGO DE MUESTRA	FECHA	ENSAYOS					
		Proteína remanente (%Pr)	g GLY/g Muestra	%GH (g Gly/g Muestra)	%DD	%DP	Tasa de DP (%DP/hora)
ET	26/05/2016	13.025	0.004	2.335	0.000	0.000	0.000
CB05-1		3.353	0.028	16.915	58.069	74.260	0.605
CB05-1		3.576	0.028	16.900	60.109	72.543	0.591
CB05-2		3.585	0.028	16.915	55.122	72.479	0.393
CB05-2		3.516	0.028	16.879	47.450	73.005	0.396
CB05-3**		0.180	0.028	16.804	59.105	98.614	0.803
CB05-3**		0.204	0.028	16.798	60.125	98.437	0.801
CB05-4		0.004	0.053	31.546	58.144	99.971	0.543
CB05-4		0.003	0.052	31.386	60.110	99.975	0.543
CB05-5		3.802	0.027	16.320	60.120	70.810	0.576
CB05-5		3.967	0.027	16.369	59.226	69.541	0.566
CB05-6		4.080	0.027	15.826	71.405	68.678	0.373
CB05-6		4.016	0.026	15.818	65.002	69.167	0.375
CB05-7*		0.062	0.049	29.027	68.004	99.525	0.810
CB05-7*		0.051	0.036	29.040	67.105	99.607	0.811
CB05-8		0.729	0.035	20.794	55.326	94.400	0.512
CB05-8		0.714	0.034	20.674	54.226	94.518	0.513
C1+		11.020	0.008	5.024	11.036	15.392	0.125
C2+		9.362	0.014	8.229	10.466	28.125	0.153
C1-		12.369	0.006	3.940	12.330	5.040	0.041
C2-	11.895	0.008	4.882	22.049	8.676	0.047	

\* Se obtuvo la mejor desproteínización de todos los sistemas.

\*\* Se obtuvo la segunda mejor desproteínización.

## Anexo 4

### Resultados análisis microbiológicos

CARACTERIZACIÓN HIDROLIZADOS									
CÓDIGO DE MUESTRA	CONCEN-TRACIÓN (UFC)	CÓDIGO DE MUESTRA	CONCEN-TRACIÓN (UFC)	CÓDIGO DE MUESTRA	CONCEN-TRACIÓN (UFC)	CÓDIGO DE MUESTRA	CONCEN-TRACIÓN (UFC)	CÓDIGO DE MUESTRA	CONCEN-TRACIÓN (UFC)
CB1-1	15x10 <sup>8</sup>	CB2-1	32x10 <sup>6</sup>	CB3-1	17x10 <sup>6</sup>	CB4-1	22x10 <sup>6</sup>	CB5-1	21x10 <sup>6</sup>
CB1-2	11x10 <sup>8</sup>	CB2-2	13x10 <sup>6</sup>	CB3-2	15x10 <sup>6</sup>	CB4-2	9x10 <sup>6</sup>	CB5-2	35x10 <sup>6</sup>
CB1-3	26x10 <sup>9</sup>	CB2-3	23x10 <sup>7</sup>	CB3-3	41x10 <sup>6</sup>	CB4-3	5x10 <sup>7</sup>	CB5-3	3x10 <sup>8</sup>
CB1-4	22x10 <sup>8</sup>	CB2-4	7x10 <sup>6</sup>	CB3-4	13x10 <sup>7</sup>	CB4-4	15x10 <sup>7</sup>	CB5-4	27x10 <sup>8</sup>
CB1-5	45x10 <sup>6</sup>	CB2-5	4x10 <sup>9</sup>	CB3-5	24x10 <sup>6</sup>	CB4-5	7x10 <sup>6</sup>	CB5-5	29x10 <sup>6</sup>
CB1-6	9x10 <sup>6</sup>	CB2-6	24x10 <sup>8</sup>	CB3-6	32x10 <sup>6</sup>	CB4-6	11x10 <sup>7</sup>	CB5-6	3x10 <sup>7</sup>
CB1-7	40x10 <sup>9</sup>	CB2-7	9x10 <sup>9</sup>	CB3-7	21x10 <sup>8</sup>	CB4-7	13x10 <sup>7</sup>	CB5-7	19x10 <sup>8</sup>
CB1-8	14x10 <sup>9</sup>	CB2-8	10x10 <sup>8</sup>	CB3-8	12x10 <sup>8</sup>	CB4-8	24x10 <sup>8</sup>	CB5-8	11x10 <sup>8</sup>
Control -	0	Control -	0	Control -	0	Control -	0	Control -	0

