

Mon
547.782
M319
2013

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
INGENIERÍA QUÍMICA**



**Estudio de la Fermentación Láctica para la Recuperación de
Quitina a partir de Desechos de Camarón y Langostino**

TRABAJO DE DIPLOMA PRESENTADO POR:

**Ezra Martín Marcia Palma
Julia Mercedes Malespín Rocha**

PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO QUÍMICO

TUTOR

Lic Eng. Martha Benavente Silva

ASESOR TÉCNICO

Lic. Alejandro Hernández

Managua, Nicaragua, Abril 2013

DEDICATORIA

A Dios, Familia y Amigos

AGRADECIMIENTO

A Dios que fue nuestra guía y fuerza para sobrellevar limitantes, encontrar soluciones y aclarar nuestra joven visión investigativa. A nuestros padres y familiares por sus consejos y soporte incondicional durante nuestra vida.

A nuestro gran apoyo e iniciadora de este labor LicEng. Martha Benavente por su paciente tutoría que permitió el desarrollo de este proyecto. Al Programa de Proyectos de Investigación y Desarrollo de la Vice Rectoría de Investigación y Desarrollo, y al Programa UNI-ASDI/SAREC-FIQ por proveernos de los recursos necesarios para llevar a cabo tan arduo reto.

A la Msc.Ing. Maritza Sánchez e Ing. Denis Escorcía por su gran apoyo y mano amiga. A nuestro asesor técnico Lic. Alejandro Hernández por su incomparable y valiosa colaboración.

A todos ellos mil gracias por ser parte de esta labor que ha logrado ser concluida y coronar finalmente nuestra carrera.

OPINIÓN DEL CATEDRÁTICO GUÍA

El trabajo de Diploma titulado "*Estudio de la Fermentación Láctica para la recuperación de quitina a partir de desechos de crustáceos*", realizado por los bachilleres Ezra Martín Marcia Palma y Julia Mercedes Malespín Rocha, es un valioso aporte al campo de la biorecuperación de materiales valiosos a partir de desechos industriales.

El incremento anual de los productos desechados por la industria camaronera, los cuales pueden conducir al detrimento ambiental y la calidad de vida, permiten hoy en día recuperar una materia valiosa y aprovechable tal como la quitina para producir materiales con valor comercial, como por ejemplo quitosano, glucosamina y films de origen biológico, los cuales tienen grandes aplicaciones en diferentes áreas tales como la farmacéutica, cosmética, ambiental, textil, y alimenticia.

En el desarrollo de este estudio, los Bres. Marcia Palma y Malespín Rocha demostraron una gran capacidad de trabajo y de equipo, independencia, buena organización, responsabilidad y destreza en la resolución de problemas de carácter práctico, logrando con ello obtener excelentes resultados.

Como catedrático guía considero que este trabajo cumple con la calidad técnica y científica requerida, por lo que solicito a los honorables miembros del tribunal examinador evaluar el gran esfuerzo desarrollado y otorgar a los bachilleres Ezra Martín Marcia Palma y Julia Mercedes Malespín Rocha el título de Ingeniero Químico.

LicEng. Martha Benavente
Tutora del estudio,
Profesora Titular, UNI- FIQ

RESUMEN

Este estudio involucró el uso de bacterias del ácido láctico (*Lactobacilo* o *Lactobacillus*) para la desproteinización y desmineralización de desechos de crustáceos (camarón y langostino) para la obtención de quitina, usando suero de leche como sustrato. El proceso de extracción de quitina también involucró el uso de tratamiento químico con hidróxido de sodio e hipoclorito de sodio para garantizar la pureza del producto final.

El proceso de fermentación se llevo a cabo en un reactor vertical de vidrio Pyrex de 4L por un período de 2 y 3 semanas a temperatura ambiente, con inóculo y sin inóculo, para cada tipo de material. La realización de las corridas con ayuda de inoculación de *lactobacillus spp* correspondió a un nivel del 10% v/v de corridas previas, así como concentraciones de azúcar de caña al 10% p/p como fuente de carbono en conjunto con la lactosa presente en el suero lácteo. Las variables de medición tales como pH, el porcentaje de acidez total titulable (%ATT) y la concentración de calcio fueron utilizadas para valorar el comportamiento de las bacterias ácido-lácticas ante el consumo de proteínas y minerales que posee el desecho del crustáceo.

Para ambos materiales, los resultados mostraron que aunque hubo una buena desproteinización y desmineralización en un tiempo de fermentación de tres semanas con inoculación, todavía el producto presentaba restos de proteínas y pigmentos. El tratamiento químico con hidróxido de sodio e hipoclorito de sodio permitió la remoción de las proteínas y los pigmentos de la estructura del producto final (quitina).

La comparación de los espectros IR de la quitina producida utilizando el método combinado, con una muestra de quitina obtenida vía química y una quitina comercial reveló que la quitina producida a partir de desechos de camarón tiene un alto grado de pureza ya que se logró un porcentaje de correlación del 98.64% con respecto a la quitina obtenida vía química y del 92.20% con respecto a la quitina comercial. Así también, el grado de pureza de la quitina producida a partir de desechos de langostino fue alto ya que se obtuvo un porcentaje de correlación del 99.35% con respecto a la quitina obtenida vía química y del 94.11% con respecto a la quitina comercial.

Este trabajo demostró que la interacción de las bacterias ácido-lácticas con el medio y el material (desechos de crustáceos) generó la remoción de los subproductos (proteínas y calcio) además de permitir una reducción del uso de reactivos (NaOH y NaClO) para la purificación del producto, teniendo en cuenta la eliminación completa del uso de ácido (HCl) para la solubilización de los iones minerales. Con ello se logra un proceso más amigable al medio ambiente.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA.....	1
AGRADECIMIENTO.....	2
OPINIÓN DEL CATEDRÁTICO GUÍA.....	3
RESUMEN.....	4
LISTA DE TABLAS.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
I. INTRODUCCIÓN.....	10
II. OBJETIVOS.....	12
2.1 Objetivo General.....	12
2.2 Objetivos Específicos.....	12
III. MARCO TEÓRICO.....	13
3.1 Composición de los Desechos de crustáceos.....	13
3.2 Quitina.....	14
3.2.1 Usos.....	15
3.2.1.1 Aplicaciones Biomédicas.....	15
3.2.1.2 Cosmetología.....	15
3.2.1.3 Agricultura.....	15
3.2.1.4 Biotecnología.....	15
3.2.1.5 Tratamiento de aguas residuales.....	16
3.3 Suero Lácteo.....	16
3.3.1 Composición y Propiedades.....	16
3.3.2 Usos.....	17
3.4 Sacarosa.....	17
3.4.1 Propiedades.....	18
3.4.2 Metabolismo de Azúcares.....	18
3.4.3 Usos.....	19
3.5 Ácido Láctico.....	19
3.5.1 Producción Industrial.....	19
3.5.2 Recuperación y Purificación.....	21
3.5.3 Usos.....	22
3.6 Fermentación Láctica.....	23
3.6.1 Bacterias Ácido Lácticas.....	23
3.6.2 Clasificación de Bacterias Ácido Lácticas.....	24
3.6.2.1 Clasificación Histórica.....	24
3.6.2.2 Clasificación a nivel de Género.....	24
3.6.2.3 Clasificación a nivel de Especies.....	26
3.6.3 Metabolismo de las Bacterias Ácido Lácticas.....	27
3.6.4 Componentes Antimicrobianos de las Bacterias del Ácido Láctico.....	30
3.6.4.1 Ácidos Orgánicos.....	30
3.6.4.2 Peróxido de Hidrógeno.....	31
3.6.4.3 Dióxido de Carbono.....	32
3.6.4.4 Diacetil.....	32
3.6.4.5 Bacteriocinas.....	33

3.6.5	Condiciones para la Fermentación Ácido Láctica.....	33
3.6.6	Curva del Crecimiento Bacteriano	34
IV.	METODOLOGÍA.....	37
4.1	Materia Prima	37
4.1.1	Desechos de Crustáceos.....	37
4.1.2	Suero de Leche	37
4.1.3	Sacarosa	37
4.2	Reactivos, materiales y Equipos de Laboratorio.....	38
4.2.1	Reactivos	38
4.2.2	Cristalería y materiales	38
4.2.3	Equipos	38
4.3	Parte Experimental.....	39
4.3.1	Preparación del Inóculo	39
4.3.2	Proceso de Obtención de Quitina por Fermentación Láctica	39
4.3.3	Análisis Espectral del Producto.....	41
4.3.4	Diseño Experimental	41
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
5.1	Desarrollo del Inóculo	43
5.2	Fermentación Láctica utilizando Caparazón de Camarón	44
5.2.1	Tiempo de Fermentación de dos semanas	44
5.2.1.1	Variación del pH y de %ATT durante la fermentación en dos semanas.....	44
5.2.1.2	Variación de calcio durante la fermentación en dos semanas	46
5.2.2	Tiempo de Fermentación de tres semanas.....	47
5.2.2.1	Variación de pH y %ATT durante la fermentación en tres semanas.....	47
5.2.2.2	Variación de calcio durante la fermentación en 3 semanas.....	48
5.2.3	Desproteínización: Combinación con tratamiento químico	49
5.3	Fermentación Láctica utilizando Caparazón de Langostino.....	51
5.3.1	Tiempo de Fermentación de dos Semanas	51
5.3.1.1	Variación del pH y de %ATT durante la fermentación en dos semanas.....	51
5.3.1.1	Variación de Ca durante la fermentación en dos semanas	52
5.3.2	Tiempo de Fermentación de tres Semanas	53
5.3.2.1	Variación del pH y de %ATT durante la fermentación en tres semanas.....	53
5.3.2.2	Variación de calcio durante la fermentación en tres semanas	54
VI.	CONCLUSIONES	63
VII.	RECOMENDACIONES.....	65
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	66
APÉNDICE	71

LISTA DE TABLAS

No.	Descripción	Página
3.1	Composición en base seca de desperdicios de Caparazón de Crustáceos.	13
3.2	Propiedades del ácido láctico.	20
3.3	Características diferenciales de las bacterias lácticas.	25
3.4	Disposición de los Géneros <i>Lactobacillus</i> .	27
4.1	Descripción de los Reactivos.	39
4.2	Equipos que serán utilizados durante el estudio.	39
5.1	Factores en el Diseño Experimental.	44
5.2	Variables dependientes o respuestas y sus unidades.	44

LISTA DE FIGURAS

No.	Descripción	Página
3.1	Diagrama de un crustáceo. El cefalotórax incluye el cefalón y el tórax.	12
3.2	Molécula de Quitina	13
3.3	Síntesis de la sacarosa	17
3.4	Principales vías de fermentación de la glucosa: (A) de fermentación homoláctica (glicólisis, Ruta de Embden-Meyerhof-Parnas), (B) la fermentación heteroláctica (Ruta de 6-fosfogluconato/fosfoelotasa phoketolase).	29
3.5	Curva de Crecimiento Microbiano	36
4.1	Imágenes de (a) caparazón de camarón y (b) caparazón de langostino	38
4.2	(a) Balanza de precisión y (b) Procesador de Alimentos <i>Oster</i> , equipos utilizados en el pesado y triturado de las muestras.	41
4.3	Equipo de fermentación y sus componentes para llevar a cabo la extracción de quitina.	39
5.1	Recuento en (a) placas de licor y (b) suero lácteo.	42
5.2	Comportamiento del Porcentaje de Acidez total titulable (%ATT) y del pH durante la fermentación ácido-láctica de caparazón de camarón en un tiempo de fermentación de 2 semanas sin inóculo y con inóculo.	43
5.3	Ruta metabólica de la fermentación ácido láctica para la producción de ácido láctico (Biolcchn, 2012).	44
5.4	Comportamiento de la concentración de calcio durante la fermentación ácido-láctica de caparazón de camarón en un tiempo de fermentación de 2 semanas sin inóculo y con inóculo.	46
5.5	Variación del porcentaje de Acidez total titulable (%ATT) y pH durante la fermentación ácido láctica de caparazones de camarón en un tiempo de fermentación de 3 semanas sin y con inoculación.	48
5.6	Comportamiento del calcio durante la fermentación ácido-láctica de caparazón de camarón en un tiempo de fermentación de 3 semanas sin inóculo y con inóculo.	49
5.7	Quitina producida (a) después del período de fermentación y (b) posterior al tratamiento con NaOH al 5 % y NaClO al 0.38 %.	50
5.8	Comportamiento del % Acidez total titulable (%ATT) y pH en función del tiempo de fermentación de 2 semanas para langostino sin inoculación.	51

5.9	Variación de calcio durante la fermentación ácido láctica de caparazón de langostino en un tiempo de 2 semanas sin inóculo y con inóculo.	52
5.10	Comportamiento del % Acidez total titulable (%ATT) y pH en función del tiempo de fermentación de 2 semanas para langostino sin inóculo y con inóculo.	54
5.11	Concentraciones de calcio durante fermentación de 3 semanas para langostino sin inóculo y con inóculo.	55
5.12	Quitina producida (a) después del período de fermentación de caparazón de langostino y (b) posterior al tratamiento con NaOH al 10% y NaClO al 0.76 %.	55
5.13	Correlación de Espectros IR de quitina de camarón con un tiempo de fermentación de dos semanas sin inóculo (Sample) vs quitina vía química (Ref No. 1) y quitina comercial (Ref No. 2).	56
5.14	Correlación de Espectros IR de quitina de camarón con un tiempo de fermentación de tres semanas sin inóculo (Sample) vs quitina vía química (Ref No. 1) y quitina comercial (Ref No. 2).	57
5.15	Correlación de Espectros IR de quitina de camarón con un tiempo de fermentación de dos semanas con inóculo (Sample) vs quitina vía química (Ref No. 1) y quitina comercial (Ref No. 2).	58
5.16	Correlación de Espectros IR de quitina de camarón con un tiempo de fermentación de tres semanas con inóculo (Sample) vs quitina vía química (Ref No. 1) y quitina comercial (Ref No. 2).	59
5.17	Correlación de Espectros IR de quitina de langostino en dos semanas sin inóculo (Sample) vs quitina vía química (Ref No. 1) y quitina comercial (Ref No. 2).	60
5.18	Correlación de Espectros IR de quitina de langostino en tres semanas sin inóculo (Sample) vs quitina vía química (Ref No. 1) y quitina comercial (Ref No. 2).	60
5.19	Correlación de Espectros IR de quitina de langostino en un período de fermentación de dos semanas con inóculo (Sample) vs quitina vía química (Ref No. 1) y quitina comercial (Ref No. 2).	61
5.20	Correlación de Espectros IR de quitina a partir de langostino en un período de fermentación de tres semanas con inóculo vs quitina vía química (Sample) vs quitina vía química (Ref No. 1) y quitina comercial (Ref No. 2).	62

I. INTRODUCCIÓN

Aunque las plantas nicaragüenses procesadoras de crustáceos han incrementado su producción en los últimos años, no se aplica un manejo efectivo de los desechos sólidos que genera esta industria, que es de aproximadamente el 50% de la producción (Xu *et al.*, 2008). La descarga de estos desechos a las zonas aledañas, principalmente a las granjas de cultivo, representa un serio problema medioambiental por su alto potencial contaminante. En contraste, estos desechos son la principal materia prima para la obtención de quitina y subproductos lo que ha despertado en estas industrias la búsqueda de un aprovechamiento integral de este material.

El proceso convencional utilizado en la industria para la extracción de quitina a partir de desechos de crustáceos, consiste en hidrolizar la proteína con álcali, remover las sales minerales con ácidos minerales, y en algunos casos se incluye la despigmentación como un paso para mejorar el color de la quitina extraída usando solventes orgánicos (Pastor de Abram, 2004). En Nicaragua, estas investigaciones se han restringido a valoraciones del proceso químico de obtención de quitina estableciendo los parámetros óptimos para mejorar el rendimiento, el estudio mostró que las condiciones óptimas dependen fuertemente de las características del material. Permitió estimar el uso de 3L/Kg de NaOH al 10% (desproteínización), 2L/Kg de HCl 1.8N (desmineralización) y 8L de NaClO al 0.38%/kg (blanqueo). Así también, las condiciones para material de langostino correspondiendo a valores 4 L/Kg de NaOH al 10% para desproteínización, 4L de HCl 3.6N usados en desmineralización y 12L de NaClO al 0.76% por kg de material para el blanqueo final del material.

(Escorcia *et al.*, 2009).

Sin embargo, estos métodos emplean grandes cantidades de agua y energía, y a menudo producen desechos corrosivos. Además, hacen que la recuperación de otros productos como la proteína y pigmentos sea relativamente más complicada (Beaney *et al.*, 2005). Otra desventaja de la purificación química de la quitina es la parcial desacetilación de la quitina y la hidrólisis del polímero, resultando en un producto final con menor peso molecular y variabilidad o inconsistencia en las propiedades fisicoquímicas (Xu *et al.*, 2008).

Durante las últimas dos décadas en el ámbito global, se ha evaluado al proceso biológico usando microorganismos como una alternativa al proceso químico. Esta alternativa produce efectos similares a las acciones químicas y se ha convertido en una idea viable para la obtención de quitina. Como punto de partida se ha estudiado las fermentaciones producidas por bacterias ácido lácticas sobre desechos de crustáceos y la acción de carbohidratos como energía natural de los organismos (Hall y Silva, 1992), cepas como *Lactobacillus plantarum* usando melaza de caña para la fermentación de cabezas de gamba (Fagbenro, 1996), al igual que el uso de cepas *Lactobacillus paracasei* A3 para la fermentación de desechos de langostinos (Zakaria *et al.*, 1998) generaron hallazgos que fortalecen la viabilidad de este proceso.

El objeto primordial de los estudios anteriormente mencionados, fue la desproteínización de este material en crudo. Como contraparte a estas trabajos se encuentran el uso de proteasas producidas de bacterias como *Pseudomonas maltophilia* LC-102 (Shimahara *et al.*, 1984), *Pseudomonas aeruginosa* K-187 (Wang y Chio, 1998) y *Bacillus subtilis* (Yang

et al., 2000). Además, durante el metabolismo bacteriano también tiene lugar la desmineralización del caparazón de crustáceo, en donde la eficiencia se ve influenciada directamente por la cantidad suministrada de inóculo, iniciador y glucosa o carbohidrato (Meraz *et al.*, 1992; Rao *et al.*, 2002; Shirai *et al.*, 2001).

Otras investigaciones de obtención de quitina en los siguientes años continúan validando este proceso biológico, en donde el *Lactobacillus plantarum* demuestra nuevamente su acción dual sobre los desechos de crustáceos (Jung *et al.*, 2007; Khanafari *et al.*, 2007). Así también, se han continuado reportando mayores ventajas con respecto al tratamiento químico: no produce desechos tóxicos, mayor calidad del producto obtenido y disminución de los costos de producción; además, permite la recuperación de subproductos de alto valor agregado presentes en los desechos tales como proteínas, pigmentos y lípidos (Carvalho *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2008).

Por su parte, diferentes estudios han demostrado que se puede extraer quitina de desechos de crustáceos haciendo uso de la fermentación ácido láctica con suero de leche enriquecido con sacarosa de caña de azúcar como sustrato (Carvalho *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2008; Zakaria *et al.*, 1998). Se ha propuesto el uso de suero de leche debido a que este material es un contaminante biológico de aguas superficiales y contiene idealmente la carga bacteriana necesaria para llevar a cabo la fermentación (Trujillo *et al.*, 1998). Además, este proceso permitirá reducir considerablemente los efluentes líquidos con alta carga química contaminante, ya que se reducirá la utilización de reactivos; así también, se dará un uso integral a los subproductos, ya que el licor obtenido durante la fermentación es rico en proteínas, minerales y podrá ser usado como alimento animal.

En el presente trabajo se estudió la fermentación ácido láctica en conjunto con el tratamiento químico como una alternativa al método convencional para la extracción de quitina de los desechos de crustáceos. La fermentación láctica se llevó a cabo en un pequeño reactor con desechos de camarón y langostino como fuentes de quitina y suero de leche enriquecido con sacarosa como sustrato. El tratamiento químico se empleó como apoyo del proceso de despigmentación de la quitina y para la remoción de las proteínas remanentes en el producto que no se haya podido solubilizar durante la fermentación. Con esto se pretendió lograr un proceso más amigable con el medio ambiente aprovechando los residuos de crustáceos y el suero de leche que es un excedente de la fabricación de queso, así como aminorar los efluentes con alta carga química contaminante.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Estudiar la fermentación láctica para la extracción de quitina a partir de desechos de camarón y cabeza de langostino.

2.2 Objetivos Específicos

- Evaluar el uso de azúcar de caña y suero de leche como posibles fuentes de carbono en la fermentación láctica.
- Determinar el tiempo de fermentación óptimo para la extracción de quitina a partir de desecho de camarón y langostino, con inóculo y sin inóculo.
- Determinar el pH, la acidez total titulable y la concentración de calcio como variables de medición, durante la fermentación láctica de caparzones de camarón y langostino.
- Evaluar la purificación de la quitina cruda obtenida de la fermentación a través de un tratamiento químico.
- Comparar cualitativamente a través del análisis espectral IR de la quitina obtenida en el proceso de fermentación láctica con la quitina producida con el tratamiento químico y la quitina comercial.

III. MARCO TEÓRICO

3.1 Composición de los Desechos de crustáceos

Los Crustáceos son artrópodos mandibulados, con dos pares de antenas, cinco pares de patas, un par de mandíbulas, respiración branquial y el cuerpo generalmente dividido en dos partes denominadas cefalotórax y abdomen (unos pocos presentan tres partes denominadas cabeza, tórax y abdomen como los insectos) (Botanical-online, 2012). En muchos la quitina está impregnada de sales (carbonato cálcico) para ser más resistente. En estos, la parte del esqueleto que corresponde al cefalotórax se denomina *caparazón* (ver Figura 3.1). Del camarón sólo el 50% es comestible ya que el resto comprende el cefalotórax que es la parte que se desecha. Esto puede dar una idea de los grandes volúmenes de desechos que se producen por año y por tanto, muestra la magnitud del problema que esto suscita.

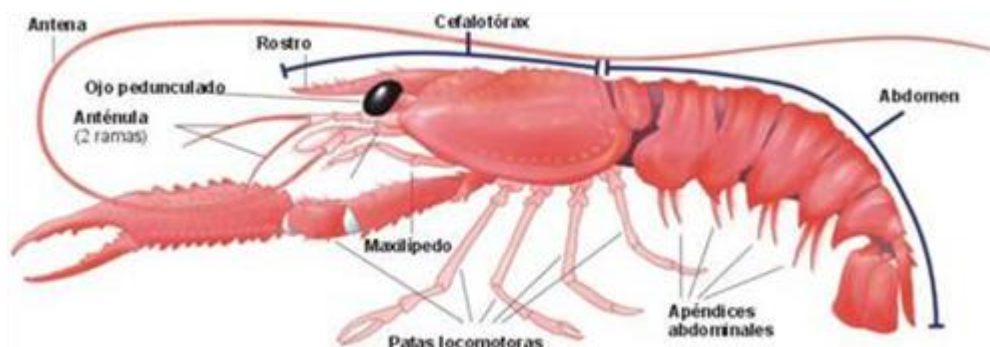


Figura 3.1 Diagrama de un crustáceo. El cefalotórax incluye el cefalón y el tórax.

La composición de los desechos en base seca está compuesta por proteínas (13-58%), carbonatos –y fosfatos- de calcio (20-72%), lípidos (0.8-12%) y quitina (14-35%). El contenido de humedad varía, en un rango de 50% a 80% en función del origen biológico y del manejo de los desechos (Pastor de Abram, 2004).

El contenido de quitina, proteína, minerales y carotenoides en el desecho varía ampliamente dependiendo de la especie, de la parte del organismo, del estado de nutrición y de la etapa de ciclo reproductivo, así como de las condiciones de separación del exoesqueleto durante el proceso (Synowiecki y Al-Khateeb, 2003).

La composición de quitina en el desecho de camarón y langostino, en base seca está en un rango de 14-35% (Pastor de Abram, 2004). El contenido de humedad varía, en función del origen biológico y del manejo de los desechos. Escorcía *et al.* (2009) reportaron valores de humedad del 72.11% para el desecho de langostino y 76.7% para el desecho de camarón.

Tabla 3.1 Composición en base seca de desperdicios de Caparazón de Crustáceos¹

Fuente de quitina		Proteína (%)	Quitina (%)	Ceniza (%)	Lípidos (%)
Cangrejo:	<i>Collinectes sapidus</i>	25.1	13.5	58.6	2.1
	<i>Chionoecetes opilio</i>	29.2	26.6	40.6	1.3
Camarón:	<i>Pandalus borealis</i>	41.9	17.0	34.2	5.2
	<i>Crangon crangon</i>	40.6	17.8	27.5	9.9
	<i>Panaeus monodon</i>	47.4	40.4	23.0	1.3
Cangrejo de río:	<i>Procamborus clarkii</i>	29.8	13.2	46.6	5.6
Kril:	<i>Euphausia superba</i>	41.0	24.0	23.0	11.6
Gamba		61.6	33.0	29.4	1.4

¹ Elaborado de acuerdo a: Muzzarelli (1997), Naczki *et al.* (1981), Shahidi y Synowiecki (1991), Synowiecki y Al.-Khateeb (2000).

3.2 Quitina

La quitina es un sólido de color blanco translúcido, prácticamente insoluble en agua, ácidos diluidos, álcalis y solventes orgánicos; los ácidos inorgánicos concentrados la degradan.

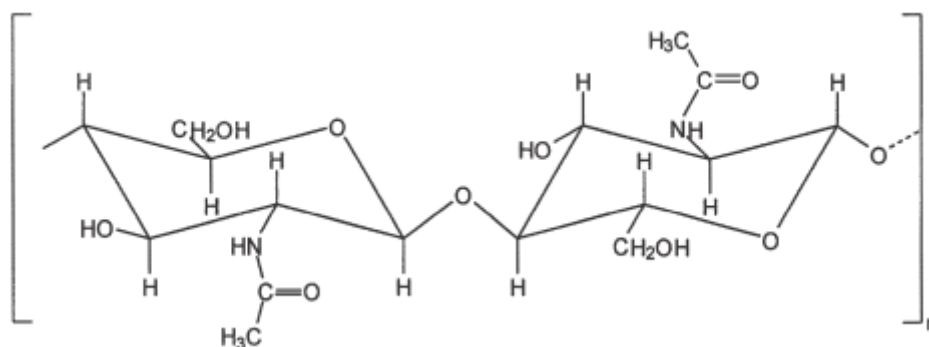


Figura 3.2 Molécula de Quitina

La quitina fue aislada por primera vez por el profesor Henri Braconnot en 1811, a partir de hongos superiores, y por su origen la denominó "fungina". El nombre quitina se debe a Odier, que en 1823 la aisló a partir de escarabajos en soluciones alcalinas (Pastor de Abram, 2004)

La quitina, poli[β-(1-4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glucopiranosas], se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, tanto en el reino animal como en el vegetal, formando parte del caparazón de crustáceos, moluscos, insectos y otros seres vivos, defendiéndolos del contacto con el medio externo. Se presenta en tres formas polimórficas: alfa (α), beta (β) y gama (γ), que difieren en el arreglo de las cadenas moleculares. La α-quitina presenta

cadena no paralelas y es la más compacta y cristalina, se obtiene de artrópodos y crustáceos. La β presenta cadenas paralelas y es la más vulnerable, es sintetizada de diatomeas marinas. La existencia del tercer alomorfismo, en el cual dos de las tres cadenas son paralelas y la tercera antiparalela, ha quedado en controversia (Synowiecki y Al-Khateeb, 2003).

3.2.1 Usos

Dada la insolubilidad de la quitina en la mayoría de los solventes, se busca, básicamente, aplicaciones en las que ella actúe en el estado sólido.

3.2.1.1 Aplicaciones Biomédicas

La quitina es un polisacárido no tóxico y biodegradable y su baja solubilidad es una limitación para su empleo; sin embargo, se ha reportado la aplicación de ella y sus derivados como material para hacer fibras de suturas absorbentes y vendajes. Tales suturas resisten el ataque de bilis, ácido úrico y jugo pancreático (Sandford y Hutchings, 1989). Así también se han evidenciado sus potencialidades como excipiente y sustancia biológicamente activa (Peniche, 2006). Por lo segundo mencionado permite su uso en ungüentos, cremas y polvos, ya que su potente efecto acelerador de la cicatrización y reconstructor tisular (García y Roca Ortega, 2008).

3.2.1.2 Cosmetología

En esta industria, la quitina, el quitosano y sus derivados se utilizan para la elaboración de cosméticos dérmicos, capilares y pastas dentales, gracias a su bio-compatibilidad y ausencia de toxicidad. El quitosano despolimerizado es utilizado como ingrediente en champús, enjuagues y tónicos capilares; su uso es debido a que su solución acuosa es viscosa, forma películas, retiene la humedad y da suavidad al cabello (Hirano, 1989; Sandford y Hutchings, 1989).

3.2.1.3 Agricultura

El quitosano tiene la aprobación de la EPA para ser usado como recubrimiento de semillas. Esta técnica permite mejorar la producción en el campo ya que incrementa su viabilidad. También ha sido aprobado como una agente floculante para recuperar residuos proteínicos en plantas elaboradas de alimentos. Actualmente se trata de aplicar quitosano en la elaboración de productos que permitan la liberación controlada de plaguicidas y herbicidas. El quitosano puede adicionarse a los cultivos para estimular el crecimiento de cierto tipo de microorganismos benéficos para la agricultura (Sandford y Hutchings, 1989). Además tiene efectos antimicrobianos que pueden ser empleados en el empaque de vegetales y frutas altamente perecederos para alargar su vida de anaquel (Hirano, 1989).

3.2.1.4 Biotecnología

Debido a su naturaleza no tóxica, biocompatibilidad, versatilidad y propiedades únicas, el quitosano se utiliza comercialmente para inmovilizar enzimas y células (Sandford y Hutchings, 1989). Otros usos en este campo se dan en la aplicación de estos polímeros en la remoción de sustancias indeseables (células, enzimas, iones) presentes en los desechos

industriales, inmovilización de células y encapsulamientos. El quitosano se usa ampliamente para recuperar biomasa y nutrimentos en la industria alimentaria que incluyen vegetales, cárnicos, camarón y leche (Knorr, 1984).

3.2.1.5 Tratamiento de aguas residuales

Esta es una de sus principales aplicaciones. El quitosano es un floculante natural que reacciona con polímeros aniónicos para formar complejos polielectrolitos que precipitan y pueden ser prensados, semi-hidratados y destruidos o aprovechados dependiendo del producto (Sandford y Hutchings, 1989).

3.3 Suero Lácteo

Se entiende por suero aquella fracción de la leche que no precipita por la acción del cuajo o por acidez. También puede describirse como los componentes de la fracción no caseínica y desgrasada de la leche, que se desprende espontáneamente de la cuajada o se separa de ella por presión. Es un líquido opalescente, amarillo verdoso debido a su elevado contenido en vitamina B2, que presenta en disolución proteínas, vitaminas, sales minerales y otra serie de sustancias más o menos conocidas. Representa cerca del 90 % del volumen de la leche, contiene la mayor parte de los compuestos hidrosolubles de ésta, el 95 % de lactosa (azúcar de leche), el 25 % de las proteínas y el 8 % de la materia grasa de la leche.

A pesar de los grandes esfuerzos por aprovechar el suero, la mayoría de los volúmenes producidos son vertidos directamente en los cursos de agua naturales provocando un impacto ambiental negativo elevado debido a su carga orgánica, que alcanza una DBO₅ de 30,000 a 50,000 mg/L.

3.3.1 Composición y Propiedades

El suero usado para esta investigación, ya contiene una cierta cantidad de calcio, fósforo, lactosa y un cierto contenido del 6 al 7 % de proteínas, tomando en cuenta que este es suero dulce obtenido de la coagulación enzimática por uso de la enzima coagulante Renina es el más empleado en la industria y con una composición más estable que la del suero ácido. Por tanto, su composición varía dependiendo del origen de la leche y el tipo de queso elaborado, pero en general el contenido aproximado es de 93.1 % de agua, 4.9 % de lactosa, 0.9 % de proteína cruda, 0.6 % de cenizas (minerales), 0.3 % de grasa, 0.2 % de ácido láctico y vitaminas hidrosolubles.

De acuerdo a su acidez el suero se divide en dulce (pH mayor a 8), medio ácido (pH 5-5.8) y ácido (pH menor a 5).

Teniendo en cuenta que podría ser un sustitutivo de la leche en la industria alimenticia se deben tener en cuenta ciertas desventajas de sus propiedades como son las proteínas del suero que no poseen propiedades funcionales como las de la caseína en cuanto a su capacidad de gelificación, además de que genera coloraciones más intensas (reacción de Maillard) debido a la alta cantidad de azúcares presentes. En contra parte, el sabor que se adquiere con este es más agradable y delicado.

Los análisis fisicoquímicos del suero muestran valores promedios de (Serna Cock, L., A. Rodríguez. 2005.):

Índice de Refracción	1.438 a 20 °C
Densidad	1.022 g/mL a 20 °C
Sólidos Totales	7 %
pH	6.45
Acidez Titulable(como ácido láctico)	0.37 g/L
Proteína (Kjeldhal)	0.86 %
Cenizas	0.587 %
Punto de Congelación	-0.582 °C
Grasa	0.55 %
Lactosa	4.74 %

3.3.2 Usos

Sus componentes con alta carga orgánica le brindan un valioso uso como medio de cultivo en fermentaciones industriales (Garcia *et al.*, 1993; Moulin y Galzy, 1984), ya que puede suministrar las fuentes de carbono y energía necesarias para diferentes microorganismos y en la producción de metabolitos de alto valor. El número de microorganismos que pueden asimilar la lactosa son limitados, pero al hidrolizar este disacárido y obtener glucosa-galactosa mediante procesos enzimáticos empleados β -galactosidasa (lactasa), se amplían significativamente las perspectivas de utilización del suero en procesos fermentativos (Garcia *et al.*, 1993). También se ha estudiado la posibilidad de ser usado como medio de cultivo alternativo en la producción de microorganismos recombinantes (Domingues *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2001).

A través de distintas investigaciones se ha evidenciado su uso para la producción de inóculos en las queserías y la obtención de lactasa, poligalacturonasa, proteína unicelular, etanol y ácidos orgánicos entre otros. Sobre todo la producción de ácidos orgánicos genera gran interés por la gran utilidad de estos en las industrias alimenticias, ya que estos metabolitos obtenidos a partir del suero pueden ser usados como aditivos de origen natural en la misma industria láctea. Por lo tanto, el espectro de ácidos obtenidos durante distintas pruebas son: ácido láctico, acético propiónico, glucónico, succínico y cítrico.

3.4 Sacarosa

La sacarosa ó azúcar común es un disacárido formado por la unión de dos monosacáridos, la glucosa y la fructosa con pérdida o liberación de H₂O (ver Figura 3.3). Su nombre químico es α -D-Glucopiranosil - (1→2) - β -D-Fructofuranósido, y su fórmula química es C₁₂H₂₂O₁₁ (Wikipedia, 2010a).

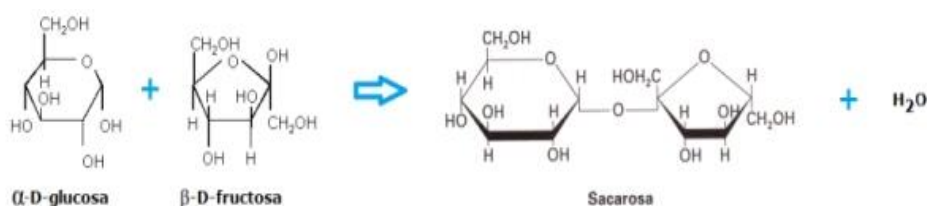


Figura 3.3 Síntesis de la sacarosa

Actúa como la principal fuente de energía para los vegetales y animales, por ser un nutriente fácilmente asimilable que provee una fuente rápida de energía, provocando un incremento rápido de la glucosa sanguínea tras la ingestión. Su consumo en grandes cantidades está relacionado con enfermedades, como la caries dental, debido a que las bacterias de la boca convierten los azúcares en ácidos que atacan el esmalte dental. Los organismos heterótrofos son los productores naturales de este sacárido.

Generalmente se extrae de la caña de azúcar, de la remolacha o del maíz y entonces es purificada y cristalizada. Otras fuentes comerciales (menores) son el sorgo dulce y el jarabe de arce (Wikipedia, 2010a).

3.4.1 Propiedades

Entre sus propiedades físicas presenta sabor dulce, puede cristalizar, soluble en agua y puede atravesar las membranas celulares por difusión facilitada, teniendo en cuenta que tiene que ser reducida en glucosa y fructosa primeramente. La sacarosa no tiene poder reductor, por no contener ningún átomo de carbono anomérico libre, puesto que los carbonos anoméricos de sus dos unidades monosacáridos constituyentes se hallan unidos entre sí, covalentemente mediante un enlace O-glucosídico. Por esta razón, la sacarosa no es un azúcar reductor y tampoco posee un extremo reductor. Por otro lado cambio los dos monosacáridos que la forman, sí tienen capacidad reductora, es decir, pueden llevar a cabo reacciones de óxido-reducción.

Si se calienta pasa a estado líquido, pero es muy peligrosa, ya que se encuentra a alta temperatura y puede quemar la piel. Debido a su bajo punto de fusión, pasa a estado líquido muy rápidamente, y se adhiere al recipiente que lo contiene con mucha facilidad.

La hidrólisis de la sacarosa en glucosa y fructosa puede ser realizada por dos enzimas: la *beta-fructosidasa*, que actúa sobre el extremo fructosa de la molécula de sacarosa, y la *alfa-glucosidasa*, que la ataca por el extremo de la glucosa.

3.4.2 Metabolismo de Azúcares

En la primera etapa se degrada el polímero por la acción de enzimas e hidrólisis, para dar glucosa y fructuosa. En la segunda etapa, la glucosa se degrada para dar piruvato, y éste se convierte en acetil coenzima A. Finalmente, ésta se degrada para dar CO₂ y H₂O. Es necesario señalar que, de las tres etapas, sólo en las dos últimas se obtiene energía aprovechable por la célula, en forma de ATP. La degradación de la glucosa a piruvato u otros compuestos cercanos es probablemente el camino metabólico más antiguo que existe, y todavía algunos organismos lo utilizan para obtener ATP.

Con objeto de obtener energía y otras sustancias, tan sólo para partir a la molécula de glucosa en dos fragmentos iguales de piruvato o lactato, se requiere de un gran número de pasos, catalizados cada uno por una enzima diferente. La degradación de la glucosa, o glucólisis, se puede llevar a cabo tanto en ausencia como en presencia de oxígeno. Sin embargo, lo más importante del proceso es que parte de la energía contenida en los enlaces de la glucosa puede transformarse, con bajo rendimiento, en la de los enlaces del ATP, directamente aprovechable por la célula. Pero aunque una molécula de glucosa que se

degrada para dar ácido láctico sólo produce dos moléculas de ATP, esta vía puede funcionar a gran velocidad en algunas células, las musculares, por ejemplo.

La fructosa para poder ser metabolizada debe ser fosforilada, la cual se puede realizar por medio de una reacción catalizada gracias a la enzima fructoquinasa la cual produce fructosa 1 fosfato, esta catalización se realiza en una reacción catalizada por la Hexoquinasa. De esta manera se produce el gliceraldehído fosfatado que interviene en el ciclo de Krebs para la producción de piruvato y lactato.

3.4.3 Usos

La sacarosa es el edulcorante más utilizado en el mundo industrializado, aunque ha sido en parte reemplazada en la preparación industrial de alimentos por otros endulzantes tales como jarabes de glucosa, o por combinaciones de ingredientes funcionales y endulzantes de alta intensidad (Wikipedia, 2010a).

La extensa utilización de la sacarosa se debe a su poder endulzante y sus propiedades funcionales como consistencia; por tal motivo es importante para la estructura de muchos alimentos incluyendo panecillos y galletas, nieve y sorbetes, además es auxiliar en la conservación de alimentos; así que es común en mucha de la llamada comida basura.

3.5 Ácido Láctico

El ácido láctico fue descubierto en 1780 por el químico sueco Carl Wilhelm Scheele, quien lo aisló de leche agria. Fue reconocido como producto de fermentación por Blonodeaur en 1847 y tan solo en 1881, Littlelon inicia la fermentación a escala industrial. Es un compuesto muy versátil utilizado en la industria química, farmacéutica, de alimentos y de plásticos (Serna Cock y Rodríguez, 2005).

El ácido láctico, o su forma ionizada, el lactato (del lat. *lac*, *lactis*, leche), también conocido por su nomenclatura oficial ácido 2-hidroxi-propanoico o ácido α -hidroxi-propanoico, es un compuesto químico que juega importantes roles en diversos procesos bioquímicos, como la fermentación láctica. Es un ácido carboxílico, con un grupo hidroxilo en el carbono adyacente al grupo carboxilo, lo que lo convierte en un ácido α -hidroxílico (AHA) de fórmula $\text{H}_3\text{C}-\text{CH}(\text{OH})-\text{COOH}$ ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$). En solución puede perder el hidronio y convertirse en el anión lactato (Wikipedia, 2010b).

El ácido láctico es un dímero, por lo que posee dos isómeros ópticos. Uno es el dextrógiro ácido D (-)-láctico o d-ácido láctico, y el otro es el levógiro ácido L (+)-láctico o l-ácido láctico. La mezcla racémica está constituida por fracciones equimolares de las formas D (-) y L (+) y se llama d, l-ácido láctico (Wikipedia, 2010b). A diferencia del isómero D (-), la configuración L (+) es metabolizada por el organismo humano. Ambas formas isoméricas del ácido láctico pueden ser polimerizadas y se pueden producir polímeros con diferentes propiedades dependiendo de la composición (Serna Cock y Rodríguez, 2005).

3.5.1 Producción Industrial

El ácido láctico puede ser obtenido por vía química o biotecnológica. La producción química, está basada en la reacción de acetaldehído con ácido cianhídrico (HCN) para dar lactonitrilo, el cual puede ser hidrolizado a ácido láctico. Otro tipo de reacción se basa en la reacción a alta presión de acetaldehído con monóxido de carbono y agua en presencia de

ácido sulfúrico como catalizador. La síntesis química tiene la desventaja que el ácido láctico producido es una mezcla de D y L ácido láctico óptimamente inactivo, por lo cual el 90% del ácido láctico producido en el mundo es elaborado por vía biotecnológica (Serna Cock y Rodríguez, 2005).

La producción biotecnológica está basada en la fermentación de sustratos ricos en carbohidratos por bacterias u hongos y tiene la ventaja de formar enantiómeros D (-) o L (+), óptimamente activos. La producción biotecnológica depende del tipo de microorganismo utilizado, la inmovilización o recirculación del microorganismo, el pH, la temperatura, la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno, el modo de fermentación empleado y la formación de subproductos.

De las LAB, *Lactobacillus delbrueckii* es el microorganismo más utilizado en la producción a gran escala de ácido láctico, ya que tiene la ventaja de producir únicamente isómeros L (+), consumir eficientemente glucosa y ser un microorganismo termófilo con temperatura óptima de crecimiento 41.5°C, lo que reduce costes de enfriamiento y esterilización, así como riesgos de contaminación microbológica en el fermentador. Este microorganismo crece bien a un pH entre 5,5 y 6,5 por lo que el ácido producido debe ser continuamente neutralizado.

Tabla 3.2 Propiedades del ácido láctico

Descripción	Propiedades
Nombre IUPAC ¹	Ácido 2-hidroxi-propanoico
Fórmula semidesarrollada ¹	H ₃ C – CH(OH) – COOH
Fórmula molecular ¹	C ₃ H ₆ O ₃
Peso molecular ¹	90.08 g/mol
Índice de refracción ²	1,4414
Punto de fusión ²	L(+) y D(-) 52,8 a 54 °C
Punto de ebullición ²	125 – 140 °C
Gravedad específica ²	1206
Calor de combustión ²	3616 cal/g
Viscosidad ²	40,33 mNsm ⁻²
Densidad ²	1,249
Constante dieléctrica ²	22ε
Acidez (pKa) ¹	3.5

¹ Wikipedia, 2010b;

² Serna-Cock y Rodríguez, 2005

Los hongos utilizados en la producción de ácido láctico son mohos y levaduras que pertenecen a los géneros *Rhizopus*, *Zymomonas*, *Saccharomyces*. Desde finales de los años 80, se ha venido estudiando ampliamente *Rhizopus oryzae* para la producción biotecnológica de ácido láctico ya que presenta la ventaja de que no requiere fuente de nitrógeno orgánico para su crecimiento, tiene la habilidad de producir directamente grandes cantidades de L (+) ácido láctico de almidón y es fácilmente separado del medio de fermentación en el proceso de recuperación y purificación. Sin embargo la dificultad

que presenta la producción de ácido láctico con moho es su forma física ya que el gran tamaño de los micelios o sus agregados puede provocar un aumento en la viscosidad del medio de fermentación lo que causa un alto incremento en la demanda de oxígeno y resistencia a la transferencia de masa en el proceso fermentativo, lo que a su vez aumenta los tiempos de fermentación, aumenta los subproductos formados especialmente etanol, y disminuye los rendimientos en conversión.

En la producción biotecnológica de ácido láctico con bacterias o con hongos, se utilizan como sustratos, sacarosa proveniente de la caña de azúcar y de la remolacha azucarera, pero debido a que el azúcar puro es de alto coste se han investigado otros sustratos (desechos agrícolas) para disminuir los costes de producción. Sin embargo, la producción de ácido láctico de estas fuentes renovables requiere de los siguientes pasos:

- 1) Hidrólisis del sustrato hasta azúcares fermentables.
- 2) Fermentación de azúcares a ácido láctico.
- 3) Separación de biomasa y partículas sólidas del medio de fermentación.
- 4) Purificación del ácido láctico obtenido.

En la obtención comercial con bacterias lácticas, al sustrato puro se le adiciona una fuente de vitaminas y de cofactores, se utiliza una mezcla de de 10 a 15 % de glucosa, cantidades menores de fosfato de amonio, extracto de levadura y 10 % neutralizante. El medio se inocula y se agita sin aireación para optimizar la neutralización del ácido formado. La fermentación dura entre 2 a 4 días y se termina cuando todo el azúcar es consumido, con el fin de facilitar la purificación. Al final de la fermentación el medio es ajustado a pH 10 y si se utiliza carbonato de calcio, el medio es calentado para solubilizar el lactato de calcio y coagular proteínas presentes. Posteriormente el medio se filtra para eliminar sustancias insolubles, así como biomasa. El ácido libre se obtiene por adición de ácido sulfúrico seguido de filtración para eliminar el sulfato de calcio formado. El ácido láctico es entonces concentrado por evaporación.

Debido a que el tipo de fermentación descrito (en discontinuo) está limitado por el daño que sufren las células por la acumulación en el medio de fermentación de la forma no disociada del ácido, se han investigado otros modos de fermentación como son la fermentación en discontinuo con alimentación intermitente y la fermentación en continuo y se han desarrollado una serie de procesos basados en la eliminación del producto por filtración y concentración de las células usando una unidad de retención. La fermentación en discontinuo con alimentación intermitente es un proceso en el cual el biorreactor es alimentado continuamente con sustrato, sin la eliminación del medio de fermentación. Mientras que la fermentación en continuo la corriente de producto posee la misma composición que el líquido presente en el reactor. La fermentación en continuo da en la mayoría de los casos mayores concentraciones y mayores rendimientos, comparado con la fermentación en discontinuo (Serna Cock y Rodríguez, 2005).

3.5.2 Recuperación y Purificación

La separación, purificación y pre-concentración del ácido láctico obtenido de los medios de fermentación es difícil debido a la alta afinidad del ácido por el agua y a su baja volatilidad. En la mayoría de los procesos, el ácido láctico es recuperado bajo la forma de lactato de calcio, y los tratamientos posteriores van a depender de la pureza deseada e incluyen: tratamiento con carbón activo, purificación con resinas de intercambio iónico, extracción con solventes o esterificación con metanol seguido por destilación e hidrólisis.

Sin embargo, con el fin de limpiar los residuos generados en el proceso, se han desarrollado otros métodos de recuperación y purificación que incluyen clarificación de medios de fermentación por microfiltración con flujo cruzado, tratamientos con resinas, entre otras (Serna Cock y Rodríguez, 2005).

Comparado con técnicas de adsorción, precipitación o filtración por membranas, el método de extracción por solventes con componentes organofosforados, aminas terciarias o amonios cuaternarios, es más selectivo y favorece la eficacia del proceso y la pureza del producto obtenido. Sin embargo los solventes orgánicos plantean dos problemas: son tóxicos para los microorganismos y el pH óptimo de la extracción y de la fermentación no coinciden, por lo que se ha propuesto el uso de membranas poliméricas de Triacetato de celulosa con sales de amonio cuaternario como fase móvil y o-nitrofeniloctil éter como plastificante, para la separación in situ de ácido láctico.

En cuanto a la electrodiálisis, es un proceso que ha sido diseñado para separar, purificar y concentrar sales de ácidos de medios de fermentación. El método permite separar el ácido a medida que se produce, eliminando la necesidad de agregar agentes neutralizantes. La concentración de ácido en el medio de cultivo por este sistema permanece en niveles muy bajos, por lo cual se ha evaluado una modificación al mismo que emplea la electrodiálisis periódica acoplada a un sistema de control de pH, lo que hace que se aumente la concentración de lactato en el medio y se disminuyan los tiempos de fermentación. Con este método de fermentación se aumenta la productividad 1,5 veces respecto a la electrodiálisis convencional. La electrodiálisis puede además utilizarse después de la fermentación tipo batch y más recientemente se han propuestos sistemas en continuo que tienen la ventaja de mantener constante el volumen del medio de fermentación y de disminuir las pérdidas de glucosa en la solución recuperada, por este método se logra obtener 19,5 veces más ácido láctico que con la electrodiálisis convencional y 9,7 veces más ácido láctico comparado con la electrodiálisis intermitente. A pesar de todos estos avances la mayoría de industrias productoras de ácido láctico emplean aún los procesos de precipitación para la purificación de ácido láctico, lo cual genera una tonelada de yeso por cada tonelada de ácido láctico producido que se desecha al ambiente como residuo (Serna Cock y Rodríguez, 2005).

3.5.3 Usos

El ácido láctico es de amplio uso en la industria; debido a sus características benéficas, se utiliza en la industria alimentaria (en bebidas y como conservante), en farmacia, medicina, textilera, en la industria del cuero y para la producción de plásticos biodegradables (Lederberg, 1992).

En la industria alimenticia es usado como regulador de acidez y conservante. Aunque puede obtenerse de la lactosa (azúcar de la leche), la mayor parte del ácido láctico empleado comercialmente deriva del uso de bacterias como la *Bacillus acidilacti*, *Lactobacillus delbrueckii* o *Lactobacillus bulgaricus* para fermentar fuentes de carbohidratos como la maicena y las patatas. Así, lo que comúnmente se denomina "leche ácida" en alimentos vegetarianos o veganos tienen ácido láctico como ingrediente (Wikipedia, 2010b).

Las industrias químicas lo utilizan como solubilizador y como agente controlador de pH. En la producción de pinturas y resinas, puede ser utilizado como solvente biodegradable.

En la industria de plásticos es utilizado como precursor del ácido poliláctico (PLA), un polímero biodegradable con interesantes usos en la industria y la medicina; se considera ésta la principal aplicación del ácido y la causa por la cual ha aumentado considerablemente su demanda (Serna Cock y Rodríguez, 2005).

En cosmética se utiliza como la alternativa más amplia al uso de la glicerina como suavizante. Es usado principalmente como químico anti-edad para suavizar contornos; reducir el daño producido por la luz solar; para mejorar la textura y el tono de la piel, y el aspecto en general. Sin embargo deben tomarse serias precauciones al utilizar cosméticos con ácido láctico, porque aumentan la sensibilidad a los rayos ultravioleta del sol (Wikipedia, 2010b).

Otras aplicaciones: alimento para niños, purgante (en la forma de lactato de calcio o lactato de magnesio), aditivo en alimentos o fragancias, en la forma de lactato de etilo, para remover sales de calcio, como mordiente, curtimiento de pieles, materia prima para síntesis orgánica, debido a su acción acaricida es utilizado en el control del varroasis, ácaro que ataca la abeja melífera *Apis mellifera* (Wikipedia, 2010b)

3.6 Fermentación Láctica

3.6.1 Bacterias Ácido Lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) constituyen un grupo de bacterias gram-positivas unidas por una constelación de características morfológicas, metabólicas y fisiológicas. La descripción general de las bacterias incluidas en el grupo o la bacteria típica de ácido láctico, es gram-positivos, no formadora de esporas, cocos o bastones, catalasa-negativos, carente de los citocromos, de hábitats anaeróbicos, pero aerotolerantes, exigentes, ácido-tolerante, y fermentativa estrictamente, con ácido láctico como el principal producto final durante fermentación de hidratos de carbono. Las BAL están generalmente asociadas con los hábitats ricos en nutrientes, tales como diversos productos alimenticios (leche, carne, bebidas, verduras), por lo que participan en los alimentos y fermentación de los mismos. Algunos también son miembros de la flora normal de la boca, el intestino, mucosa (saludable) y la vagina de los mamíferos. Los límites del grupo está sujeto a cierta controversia, pero históricamente los géneros *Lactobacillus*, *Leuco-Nostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* forman el núcleo del grupo. Revisiones taxonómicas de estos géneros y la descripción de nuevos géneros significa que las BAL podrían, en su amplia definición fisiológica, comprender alrededor de 20 géneros. (Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects Third Edition, Revised and Expanded)

La clasificación de las bacterias del ácido láctico en los diferentes géneros se basa principalmente en la morfología, el modo de fermentación de la glucosa, crecimiento a temperaturas diferentes, la configuración del ácido láctico producido, la capacidad para crecer a altas concentraciones de sal y ácido o alcalino tolerancia.

Marcadores quimiotaxonómicos tales como ácidos grasos en su composición y constituyentes de la pared celular también son utilizados para sus clasificaciones. Además, la presente taxonomía se basa en parte en verdaderos parentescos filogenéticos, el cual ha sido revelado a través de trabajos extensivos de determinaciones de Ácido Ribonucleico (ARN).

Para el presente trabajo se espera usar bacterias del genero *Lactobacillus* que está comprendido por bacterias en forma bacilar de $0.5\text{--}1.2 \times 1.0\text{--}10.0$ mm, comúnmente se asocian en cadenas cortas, son anaerobias facultativas o microaerófilas, catalasa y citocromo negativos (Foo *et al.*, 1993). Excepcionalmente pueden poseer motilidad, se mueven ayudados por flagelos peritricos. Los lactobacilos son auxótrofos quimioorganotróficos, necesitan medios complejos para su crecimiento, degradan la sacarosa para producir lactato. La temperatura óptima de crecimiento de los lactobacilos está entre $30\text{--}40$ °C (Foo *et al.*, 1993; Morishita *et al.*, 1981). Su hábitat natural es bastante semejante a sus hermanos pudiéndolos encontrar en el aparato gastrointestinal de mamíferos y aves, incluyen alimentos de origen vegetal y animal (Callon *et al.*, 2004; Holt *et al.*, 1998).

3.6.2 Clasificación de Bacterias Ácido Lácticas

3.6.2.1 Clasificación Histórica

Desde los primeros estudios realizado en 1986 por Bergey, se inició el reconocimiento de géneros de estas bacterias, un primer grupo de especies que no permitían una definición inequívoca de las bacterias de ácido láctico. Inevitablemente, la mayoría de características que se utilizan en estos conjuntos están sujetas a más o menos calificaciones, lo que significa que son precisos sólo en "condiciones normal" o "estándar" y pueden encontrarse excepciones que en la definición de los grupos no tienen lugar. En realidad, sólo la característica de bacterias gram-positivo no puede ser impugnada. Por ejemplo, la catalasa y citocromos puede estar formado por algunas BAL sobre ciertos medios (véase más adelante), algunos estreptococos (por ejemplo, *Streptococcus bovis*) pueden tener requerimientos nutricionales limitados, la fermentación del azúcar puede resultar en muy poco ácido láctico bajo ciertas condiciones, etc. Además, no hay argumentos científicos sólidos para la exclusión de bacterias formadoras de esporas, que de otro modo se asemejan a las BAL (es decir, *Sporolactobacillus*), ya que algunos de los géneros que consideramos "auténtico" BAL no están claramente separadas de estas filogenéticamente, pero históricamente este aspecto fue excluido para esta clasificación. (Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects Third Edition, Revised and Expanded)

Sin embargo, de un punto de vista práctico de la tecnología de los alimentos durante estos años, los siguientes géneros se consideran las BAL principales: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*.

Por otra parte el género *Bifidobacterium*, a menudo se considera en el mismo contexto que las BAL genuina y compartiendo algunas de sus características típicas, es filogenéticamente relacionado y tiene un modo único de fermentación del azúcar para el género, que claramente los separa del grupo de las BAL. (Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects Third Edition, Revised and Expanded)

3.6.2.2 Clasificación a nivel de Género

Como se ha mencionado, las bases generales para la clasificación de las BAL en diferentes géneros se mantuvieron prácticamente sin cambios desde el trabajo de Orla-Jensen. Sin

embargo, con la descripción de nuevos géneros y especies se está convirtiendo cada vez más difícil utilizar estas pruebas clásicas para la identificación fiable de género. Sin embargo, estas características fenotípicas son útiles como un punto de partida para pruebas más sofisticadas. Aunque la morfología es considerada como una clave de las características en la taxonomía bacteriana, sigue siendo importante en las descripciones actuales de los géneros de BAL. Así, las BAL se puede dividir en varillas (*Lactobacillus* y *Carnobacterium*) y cocos (todos los otros géneros). Una excepción es la relativamente recientemente describe género *Weissella*, que es el primer género en el grupo de LAB que, por definición, puede incluir tanto cocos y varillas. Por otra parte, la división celular en dos direcciones perpendiculares en un solo plano (anteriormente en forma incorrecta se describía como "la división en dos planos"), conduce a la formación tétrada, se utiliza como una característica clave en la diferenciación de los cocos. Los géneros formadores de tétradas son *Aerococcus*, *Pediococcus* y *Tetragenococcus*. Un resumen de las características aparece en la Tabla 3.3. (Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects Third Edition, Revised and Expanded)

Tabla 3.3 Características diferenciales de las bacterias lácticas (Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects Third Edition, Revised and Expanded)

Característica	Bastones		Cocos							
	Carnob.	Lactob.	Aeroc.	Enteroc.	Lactoc. Vagoc.	Leucon. Oenoc.	Pedioc.	Streptoc.	Tetrag.	Weiss. ^a
Formaciones Tetras	2	2	2	2	2	2	þ	2	þ	2
CO ₂ de glucosa ^b	2c	+	2	2	2	þ	2	2	2	þ
Crecim. a 108C	þ	+	þ	þ	þ	þ	+	2	þ	þ
Crecim. a 458C	2	+	þ	þ	2	2	+	+	2	2
Crecim. en 6.5% NaCl	NDd	+	þ	þ	2	+	+	2	þ	+
Crecim. en 18% NaCl	2	2	2	2	2	2	2	2	þ	2
Crecim. en 8% NaCl	ND	+	þ	þ	+	+	þ	2	2	+
Crecim. a pH 4.4	2	2	þ	þ	2	2	2	2	þ	2
Crecim. a pH 9.6	L	fD, L	fD, L	L	L	D	fL, DL	fL, DL	L	fD, DL
Ácido Láctico ^e			L					L		

þ, positivo; 2, negativo; +, la respuesta varía según las especies; ND, no determinado.

a Cepas *Weissella* también puede ser en forma de bastones.

b Prueba para homo o heterofermentación de la glucosa; denota negativos y positivos homofermentativas y heterofermentativos, respectivamente.

c Pequeñas cantidades de CO₂ pueden ser producidos, en función de los medios.

d No se ha reportado crecimiento en 8% de NaCl.

e Configuraciones de ácido láctico producido a partir de glucosa.

f Production de D -, L -, o DL de ácido láctico varía entre las especies.

Una característica importante que se utiliza en la diferenciación de los géneros es el modo de fermentación de la glucosa bajo condiciones estándar, es decir, concentraciones no limitativas de glucosa y factores de crecimiento (aminoácidos, vitaminas y precursores de ácidos nucleicos) y limitada disponibilidad de oxígeno. Bajo estas condiciones LAB se pueden dividir en dos grupos: homofermentativo, la conversión de glucosa casi cuantitativamente a ácido láctico y el heterofermentativos, la fermentación de la glucosa a ácido láctico, etanol/ácido acético y el CO₂. En la práctica, una prueba de glucosa para la producción de gas puede permitir la distinción entre los grupos. *Leuconostocs*, *oenococci*, *weissellas*, y un subgrupo de los lactobacilos son heterofermentativa, todas las demás LAB son homofermentativo. (Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects Third Edition, Revised and Expanded)

5.6.2.3 Clasificación a nivel de Especies

Es imposible dentro del alcance de esta revisión bibliográfica describir la clasificación de todas las especies de LAB. El género *Lactobacillus* por si solo incluye unas 80 especies reconocidas. Por lo tanto, lo siguiente sólo será un resumen, concentrándose en los medios por los cuales se puede hacer una clasificación dentro del género de interés en este estudio y la mención de algunas de las especies más interesantes desde un punto de vista tecnología de los alimentos. (*Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects Third Edition, Revised and Expanded*)

Como se ha indicado anteriormente, la clasificación adecuada de LAB se inició confiando en métodos biológicos. Es quizás más verdadera con respecto a la clasificación de las especies que a nivel de género. En algunos casos, sólo un análisis en nivel de ácido nucleico va a resolver los problemas de clasificación. Aun así, la clásica caracterización fenotípica / bioquímica es importante para una clasificación preliminar, así como aprender sobre las propiedades de las cepas.

Otras características utilizadas en la caracterización fenotípica / bioquímica de cepas son rango de carbohidratos fermentados, la hidrólisis de arginina, la formación de acetoina (Voges-Proskauer test), tolerancia a la bilis, el tipo de hemólisis, la producción de polisacáridos extracelulares, los requisitos del factor de crecimiento, la presencia de ciertas enzimas (por ejemplo, β -galactosidasa y β -glucuronidasa), características de crecimiento en la leche, e inmunológicas. Además la caracterización incluye métodos moleculares/quimiotaxonómicos, incluyendo el tipo de ácido diamino en el peptidoglicano, presencia y tipo de ácido teicoico, menaquinonas, guanina citosina β (G β C) relación entre el ADN, composición de ácidos grasos, y la movilidad electroforética de la lactato deshidrogenasa (LDH).

Las especies se han agrupan dependiendo de características similares, así como por estudios de sus parentescos genéticos reflejado en su ARN respectivo.

1. *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, and *Vagococcus*
2. *Aerococcus*, *Pediococcus*, and *Tetragenococcus*
3. *Leuconostoc*, *Oenococcus*, and *Weissella*
4. *Lactobacillus* and *Carnobacterium*

El género *Lactobacillus* es por mucho el más grande de los géneros incluidos en LAB. También es una especie muy heterogénea, abarcando una gran variedad de bioquímica fenotípica, y propiedades fisiológicas. La heterogeneidad se refleja en la gama de % moles guanine β cytosine (G β C) del ADN de especies incluidas en el género. Este intervalo es de 32 a 55 %, dos veces la medida generalmente aceptada para un solo género.

La heterogeneidad y el gran número de especies son debido a la definición del género, que es esencialmente bacterias de ácido láctico en forma de varilla. Esta definición es comparable a un acuerdo para que todo el LAB cocoides fueron incluido en un género. Sin embargo, entre los cocos, los rasgos fenotípicos fueron reconocidos desde sus principios, que hizo que la diferenciación en varios géneros fuese posible. Incluso si la situación era más difícil para el LAB en forma de varilla, Orla-Jensen (1919) esencialmente trató de dividir este grupo de una manera similar a aquella con los cocos. Así, los subgéneros de *Lactobacillus* fueron creados: *Thermobacterium*, *Streptobacterium* y *Betabacterium*. Cabe destacar que, esta división sigue siendo válida en un grado considerable, aunque las

designaciones han sido reducidas y algunas modificaciones se han realizado en las definiciones de los subgrupos.

La Tabla 3.4 muestra un resumen de las características utilizadas para distinguir entre los tres grupos y algunas de las especies más conocidas incluidas en cada grupo. La base fisiológica para la división es (generalmente) la presencia o ausencia de la clave de enzimas para el metabolismo homo- y heterofermentativo de azúcar, fructosa-1,6-difosfatoaldolasa y fosfoctolasa, respectivamente.

Tabla 3.4 Disposición de los Géneros *Lactobacillus* (Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects Third Edition, Revised and Expanded)

Característica	Grupo I, Obligatoriamente Homofermentativo	Grupo II, Facultativamente Heterofermentativos	Grupo III, Obligatoriamente Heterofermentativos
Fermentación de pentosas	2	þ	2
CO ₂ de la glucosa	2	2	þ
CO ₂ de gluconato	2	þ _a	þ _a
FDP aldolasa presente	þ	þ	2
Fosfoctolasa presente	2	þ _b	þ
	Lb. acidophilus	Lb. casei	Lb. brevis
	Lb. delbrückii	Lb. curvatus	Lb. buchneri
	Lb. helveticus	Lb. plantarum	Lb. fermentum
	Lb. salivarius	Lb. sakei	Lb. reuteri

a Cuando ha sido fermentado

b inducible por pentosas

3.6.3 Metabolismo de las Bacterias Ácido Lácticas

Las bacterias del ácido láctico (LAB) tienen requerimientos nutricionales complejos debido a su limitada habilidad para sintetizar aminoácidos y vitamina B. La mayoría de LAB producen únicamente una forma isomérica de ácido láctico. Las especies de los géneros *Aerococcus*, *Carnobacterium*, producen únicamente isómeros L, mientras las especies del género *Leuconostoc* producen únicamente isómeros D. Sin embargo, algunas LAB producen formas racémicas donde el isómero predominante depende de cambios en la aireación, cantidad de NaCl, tipo de fermentación, incrementos en el pH y concentración de sustrato (Serna Cock y Rodríguez, 2005).

La característica esencial del metabolismo de LAB es la fermentación de carbohidratos eficiente acoplado a la fosforilación a nivel de sustrato. El ATP generado se utiliza posteriormente para la biosíntesis propósitos. LAB como grupo presentan una enorme capacidad para degradar los hidratos de carbono y diferentes compuestos relacionados. Generalmente, el producto final predominante es, por supuesto, el ácido láctico (0.50% del carbono del azúcar). Es evidente, sin embargo, que LAB adaptarse a diversas condiciones y cambiar su metabolismo en consecuencia. Esto puede conducir al producto final significativamente diferente patrones.

Hay dos vías principales para hexosa (por ejemplo, glucosa) fermentación dentro de LAB (ver Figura 3.4). El transporte y-fosforilación de glucosa puede producirse como se

describe, es decir, el transporte de azúcar libre y la fosforilación por una glucoquinasa dependiente de ATP. Algunas especies utilizan la fosfoenolpiruvato: azúcar de sistema fosfotransferasa (STP), en la que es la fosfoenolpiruvato fosforilo de los donantes. En cualquier caso, un enlace de fosfato de alta energía es requerido para la activación del azúcar.

La glucólisis (Embden-Meyerhof-Parnas vía), utilizado por todos, excepto LAB leuconos-COT, grupo III lactobacilos, oenococci, y weissellas, se caracteriza por la formación de fructosa-1,6-difosfato (FDP), la cual está dividida por una aldolasa FDP en dihidroxiacetona-fosfato (DHAP) y gliceraldehído-3-fosfato (GAP).

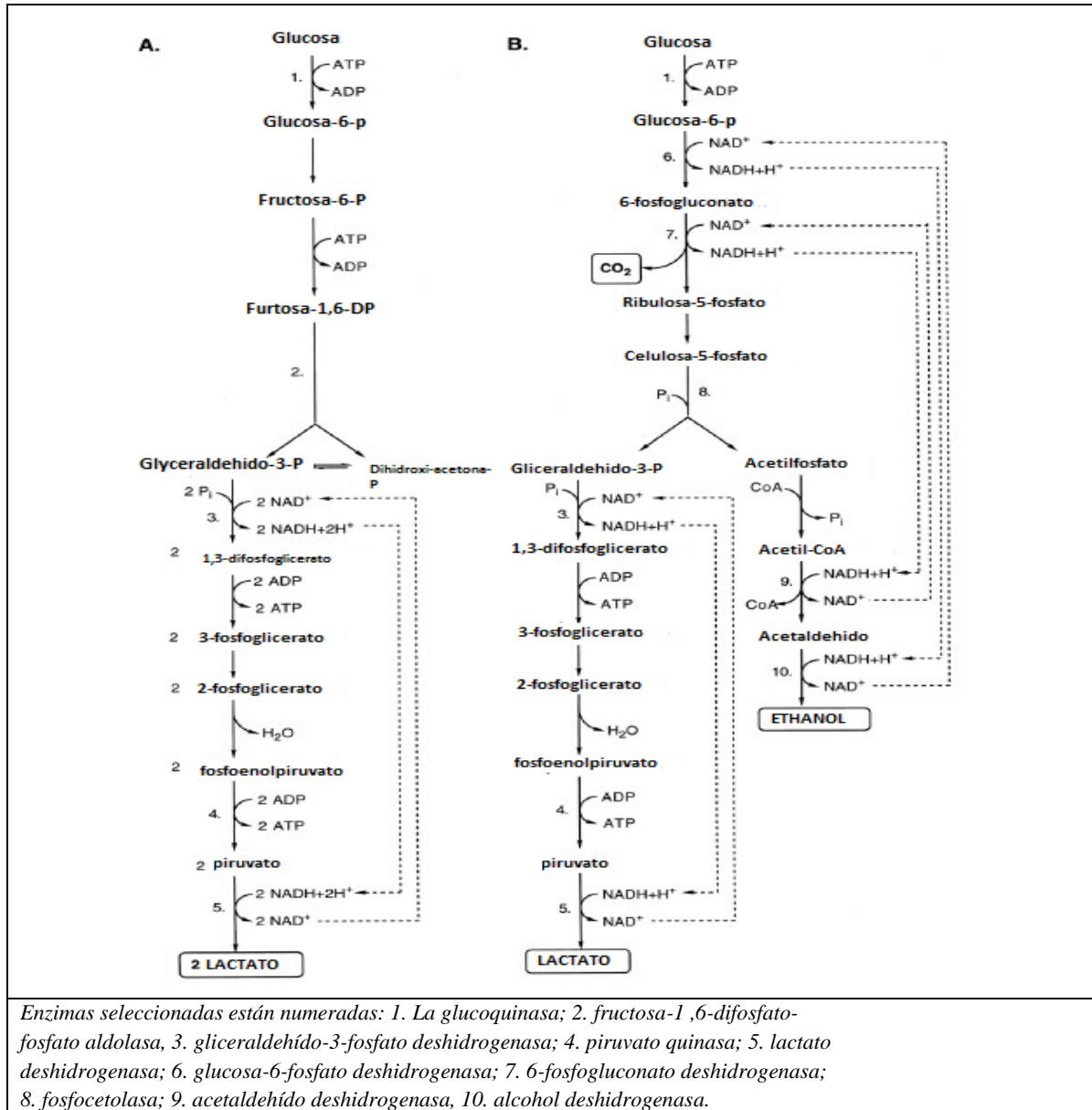


Figura 3.4 Principales vías de fermentación de la glucosa: (A) de fermentación homoláctica (glucólisis, Ruta de Embden-Meyerhof-Parnas), (B) la fermentación heteroláctica (Ruta de 6-fosfogluconato/fosfocelotasa phoketolase). (Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects Third Edition, Revised and Expanded)

GAP (y DHAP por vía de GAP) luego se convierte en piruvato en una secuencia metabólica incluyendo sustratos- nivel de fosforilación en dos sitios. En condiciones normales, es decir, el exceso de azúcar y el acceso limitado a oxígeno, el piruvato se reduce a ácido láctico por un lactato deshidrogenasa NAD β -lactato deshidrogenasa dependiente (NLDH), con lo que la reoxidación del NADH se da lugar durante las etapas anteriores glicolíticas. Se obtiene así un equilibrio redox, el ácido láctico es prácticamente el único producto final, y el metabolismo se refiere como una fermentación homoláctica.

La otra vía de fermentación principal ha tenido designaciones, tales como el pentosa fosfato vía, la vía de las pentosas fosfocetolasa, la derivación de hexosas monofosfato y la vía 6-fosfatogluconato (utilizados por Kandler y Weiss en el Manual de Bergey (Holt *et al.*, 1998)). Nos referiremos a ella como la vía 6 fosfogluconato/fosfocetolasa (6-PG/PK), reconociendo así un paso clave en la secuencia metabólica (la dividida fosfocetolasa) y al mismo tiempo que la distingue de la vía bifidum, que también implica fosfocetolasa pero no tiene 6-fosfogluconato como un intermedio. Se caracteriza por los pasos iniciales de deshidrogenación con la formación de 6-fosfogluconato, seguido por descarboxilación. El restante pentosa-5-fosfato se divide por fosfocetolasa en GAP y acetyl fosfato. BPA se metaboliza de la misma manera que para la ruta glicolítica, resultando en la formación de ácido láctico. Cuando no hay aceptores de electrones disponibles, acetyl fosfato se reduce a etanol vía acetyl-CoA y el acetaldehído. Este metabolismo conduce a significativa cantidades de otros productos finales (CO₂, etanol), además de ácido láctico. Es referida como una fermentación heteroláctica. (Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects Third Edition, Revised and Expanded)

La terminología en relación con estas vías y las bacterias que los utilizan es bastante confusa, y tal vez sea oportuno añadir una nota de cautela. En general, el término "LAB homofermentativo" se refiere a aquellos en el grupo que utilizan la ruta glicolítica para la fermentación de la glucosa, mientras que "LAB heterofermentativos" son aquellos que utilizan la 6-PG/PK vía. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la glicólisis puede conducir a una fermentación heteroláctica (es decir, cantidades significativas de otros productos finales que el ácido láctico) bajo ciertas condiciones y que algunas LAB considera uso de la vía 6-PG/PK homofermentativo al metabolizar determinados sustratos.

En teoría, la fermentación homoláctica de glucosa da por resultado 2 moles de ácido láctico y una ganancia neta de 2 ATP por mol de glucosa consumida. La fermentación de la glucosa a través de la vía 6-PG/PK heteroláctica produce 1 mol de cada uno de ácido láctico, etanol y CO₂ y 1 mol de ATP / mol de glucosa. En la práctica, estos valores teóricos rara vez se obtiene. A factor de conversión 0.9 a partir de azúcar a producto de carbono final es común y probablemente refleja una incorporación de carbono de azúcar en la biomasa, aunque la mayoría de los factores de crecimiento (por ejemplo, aminoácidos, nucleótidos, y vitaminas) se suministran en exceso en los medios ricos frecuentemente utilizados. Estos medios complejos también pueden contribuir a otros balances de fermentación y para la formación de otros productos finales, en particular, ácido acético, ya que los compuestos como ácidos orgánicos, aminoácidos, y los residuos de azúcar puede alterar la fermentación. La presencia de oxígeno también puede tener un efecto significativo sobre el metabolismo. (Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects Third Edition, Revised and Expanded)

La estequiometría clásica de la fermentación homoláctica es la siguiente: (Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects Third Edition, Revised and Expanded)



En la fermentación heteroláctica hay formación de xilulosa-5 fosfato por el sistema de glucosa-6 fosfato deshidrogenada. La estequiometría heteroláctica a partir de glucosa es la siguiente:



Hexosas distintas de la glucosa, tales como manosa, galactosa, fructosa, pueden ser fermentadas por muchos LAB. Los azúcares se metabolizan por las vías principales a nivel de glucosa-6-fosfato o fructosa-6-fosfato después de isomerización y/o fosforilación. Una excepción importante es el metabolismo de la galactosa en LAB, que utiliza un STP para la absorción de este azúcar.

Como se ha mencionado anteriormente disacáridos como la sacarosa son descompuestos por hidrolasas específicas a monosacáridos y monosacáridos fosfatados para ser metabolizados por las vías que se han descrito en esta sección.

3.6.4 Componentes Antimicrobianos de las Bacterias del Ácido Láctico

La fermentación reduce la cantidad de hidratos de carbono disponibles y los resultados en una gama de pequeñas moléculas de masas moleculares orgánicas que exhiben actividad antimicrobiana, el más común siendo los ácidos láctico, acético y propiónico. Además de la producción de estos inhibidores metabólicos primarios, muchos otros componentes antimicrobianos pueden estar formados por diferentes bacterias de ácido láctico. Hay que tener en cuenta que son sustancias antimicrobianas producidas no por conveniencia humana. El significado biológico se cree que es de amensalismo, un medio de ventaja ganando una bacteria en otra competición microbiana. Esto puede lograrse mediante el cambio del medio ambiente, por ejemplo, la acidificación, o la producción de toxinas contra los competidores. (Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects Third Edition, Revised and Expanded)

3.6.4.1 Ácidos Orgánicos

Durante mucho tiempo se ha observado que los ácidos débiles tienen una actividad antimicrobiana más potente a un pH bajo que a pH neutro. De los dos ácidos producidos en las fermentaciones, el ácido acético es el más fuerte inhibidor y tiene una amplia gama de actividad inhibitoria, levaduras inhibidoras, moldes, y bacterias, mientras que el ácido propiónico se ha observado que ejerce un efecto antimicrobiano fuerte, en particular a levaduras y mohos. Esta actividad antimicrobiana más fuerte de ácido acético y propiónico se puede explicar en parte por su pKa más elevado de en comparación con ácido láctico (4.87, 4.75, y 3.08, respectivamente). Cuando una mezcla de ácidos está presente, es probable que el ácido láctico contribuya principalmente a la reducción en el pH, mientras que el ácido propiónico y acético, que se convierten en no disociado, son el real anti-

agentes microbianos. En efecto, las mezclas de ácido láctico y acético se han observado que reduce la tasa de crecimiento de *Salmonella enterica* ser. var. *Typhimurium* más que el ácido solo, sugiriendo una actividad sinérgica. Sin embargo, además de reducir el pH, se ha observado también que el ácido láctico permeabiliza las membranas, lo que incrementa la actividad de otras sustancias antimicrobianas. (Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects Third Edition, Revised and Expanded)

A menudo se asume que la molécula no disociada es la forma tóxica de un ácido débil, aunque se ha observado que los ácidos disociados también inhiben el crecimiento microbiano. Se asume que la forma del ácido orgánico no disociado (neutro) se difunde a través de la membrana celular, ya que son solubles en lípidos. Sin embargo, algunos investigadores han sugerido una energía ligada a absorción de ciertos ácidos. Después de entrar en la célula, el ácido se disocia ya que el pH citoplasmático es generalmente alrededor de neutral. Muchos investigadores han sugerido que la liberación de protones en el citoplasma conduce a la acidificación y la disipación del gradiente de pH a lo largo de la membrana causando la inhibición del crecimiento de observar.

Sin embargo, otros investigadores sugieren que esta hipótesis debe ser revisada. Han sugerido que no la translocación de protones, pero la acumulación del anión es la principal causa de la inhibición del crecimiento observado. Se propone que el anión reduce la tasa de síntesis de macromoléculas y afecta el transporte a la membrana celular.

En particular, las bacterias del ácido láctico, así como otras bacterias, contrarrestan los efectos de la acumulación de aniones, reduciendo su pH citoplasmático.

3.6.4.2 Peróxido de Hidrógeno

En presencia de oxígeno, las bacterias de ácido láctico son capaces de generar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a través de la acción de que contienen flavoproteína-oxidasas, oxidasas NADH y superóxido de dismutasa. En ausencia de una fuente de hemo, las bacterias de ácido láctico no producirán catalasa para la eliminación de peróxido de hidrógeno. Otros sistemas que eliminan peróxido de hidrógeno son menos activos que los que lo producen. Esto permite la acumulación de peróxido de hidrógeno. Sin embargo, Fontaine y colaboradores sostienen que el peróxido de hidrógeno no se acumula a cantidades significativas *in vivo*, ya que se descompone por peroxidasas, flavoproteínas y pseudocatalasa. El efecto bactericida de hidrógeno peróxido se ha atribuido a su efecto oxidante fuerte en la célula bacteriana; grupos sulfhidrilos de proteínas celulares y los lípidos de membrana pueden ser oxidados. Además, algunas reacciones productoras de peróxido de hidrógeno recogen oxígeno, creando así un ambiente anaerobio desfavorable para ciertos organismos. Se ha sugerido que la producción de peróxido de hidrógeno es particularmente importante para la colonización del tracto urogenital por lactobacilos. Se ha encontrado que la colonización por lactobacilos puede disminuir la adquisición del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), la gonorrea y las infecciones del tracto urinario. Sin embargo, algunos cuestionan si el peróxido de hidrógeno *in vivo* por sí tiene una actividad bactericida significativa. (Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects Third Edition, Revised and Expanded)

En condiciones naturales, los efectos antimicrobianos de peróxido de hidrógeno puede ser mejorado debido a la presencia de lactoperoxidasa y tiocianato (SCN_2). La proteína

glicolactoperoxidasa se encuentra en la saliva, las lágrimas y la leche. Esta cataliza la oxidación del tiocianato por el peróxido de hidrógeno produciendo hipotianato (OSCN_2) y, en presencia de un exceso de peróxido de hidrógeno, también se puede producir O_2SCN_2 y O_3SCN_2 .

Se han reportado daños estructurales y cambios en las membranas bacterianas, debido a la exposición a OSCN_2 . Sin embargo, el efecto antimicrobiano principal es aportado al bloqueo de la glucólisis. Se propone que inhibe el transporte de glucosa, la actividad hexoquinasa, y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, debido a la oxidación de los grupos sulfhidrilos en estas enzimas metabólicas. La última enzima, la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa, parece ser el objetivo principal. La actividad hacia bacterias gram-positivas, incluyendo bacterias de ácido láctico, es generalmente bacteriostático, mientras que muchas bacterias gram-negativas mueren rápidamente.

3.6.4.3 Dióxido de Carbono

El dióxido de carbono (CO_2) es producido principalmente durante la fermentación ácido láctico heterofermentativos de hexosas, pero también muchas otras vías metabólicas generan dióxido de carbono durante fermentación. El dióxido de carbono tiene un efecto antimicrobiano doble. Su formación crea un ambiente anaeróbico y el dióxido de carbono en sí mismo tiene una actividad antimicrobiana. El mecanismo de esta actividad es desconocida, pero se ha sugerido que se inhiben la decarboxilación enzimática y que la acumulación de dióxido de carbono en la bicapa lipídica causa la disfunción en la permeabilidad de la membrana. A bajas concentraciones de dióxido de carbono puede estimular el crecimiento de algunos microorganismos, mientras que a concentraciones más altas se puede prevenir el crecimiento. (Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects Third Edition, Revised and Expanded)

Debido a su actividad antimicrobiana, dióxido de carbono se utiliza hoy en día como el componente principal de los paquetes de atmósfera modificada. Se ha reportado que bacterias Gram-negativas suelen ser más sensibles al dióxido de carbono en la atmósfera modificada que bacterias gram-positivas.

3.6.4.4 Diacetil

Diacetilo (2,3-butanodiona) fue identificada por van Niel y colaboradores como el aroma y el sabor componente de la mantequilla. En 1927 Lemoigne se refirió a su actividad antimicrobiana contra *Bacillus* sp. Es producida por especies y cepas de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, y *Streptococcus*, así como otros organismos. Cuando hexosas se metabolizan, la formación de diacetilo será reprimido. Sin embargo, diacetilo puede ser producido en exceso, si el citrato se metaboliza. El citrato se convierte a través de piruvato en diacetil. (Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects Third Edition, Revised and Expanded)

Jay observó que diacetilo era progresivamente más eficaz a pH de 7. También observó que la actividad antimicrobiana se antagoniza por la presencia de glucosa, acetato y Tween 80. El diacetilo se encontró que era más activo contra bacterias gram-negativas, levaduras y mohos que contra bacterias gram-positivas, bacterias del ácido láctico son las menos sensibles. El diacetilo se cree que reaccionan con la proteína de unión de arginina bacterias gram-negativos y lo que interfiere con la utilización de este aminoácido.

3.6.4.5 Bacteriocinas

Las bacteriocinas son compuestos sintetizados por ribosomas producidos por las bacterias con el fin de inhibir el crecimiento de otras bacterias. Estos compuestos se encuentran en casi cada bacteria de las especies examinadas hasta la fecha, pero sólo algunos de ellos han sido ampliamente estudiados. Las bacteriocinas pueden ser considerados como los antibióticos, pero se diferencian de los antibióticos en varios aspectos críticos: (a) bacteriocinas son ribosomas sintetizados, (b) las células huésped son inmunes a ellos, (c) su modo de acción es diferente de los antibióticos, y (d) tienen una estrecha espectro de matanza y por lo tanto en general son capaces de matar las bacterias sólo estrechamente relacionados con la cepa que la produce. Hasta ahora no hay pruebas suficientes de que las bacteriocinas producidas por bacterias gram-positivas tienen ningún efecto sobre bacterias gram-negativas, sin adición de algún compuesto de membrana activa. Esto ha limitado el uso de bacteriocinas en aplicaciones en los alimentos, pero esta propiedad también se puede considerar una ventaja. Las bacteriocinas se pueden utilizar como "fármacos de objetivo" hacia determinados agentes patógenos sin alterar la microbiota beneficiosa. Las bacteriocinas entonces podría limitar el uso de antibióticos en alguna medida y, por tanto retrasar la evolución de la resistencia a los antibióticos. (Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects Third Edition, Revised and Expanded)

Además de su preocupación por la resistencia a antibióticos, lo que aumenta sensibilización de los consumidores de los riesgos potenciales para la salud asociados con conservantes químicos tiene un mayor interés en las bacteriocinas. Las bacteriocinas son producidas naturalmente por lo que son más fácilmente aceptado por los consumidores. Las bacteriocinas producidas por bacterias de ácido láctico se pueden dividir en tres clases principales: I, lantibióticos; II, pequeños péptidos estables al calor, y III, proteínas de gran lábil al calor. También se ha sugerido una cuarta clase de bacteriocinas con una estructura compleja, pero no es generalmente aceptado. Clases I y II son las principales clases de bacteriocinas, debido a su abundancia y su uso potencial en aplicaciones comerciales. Aunque el conocimiento de bacteriocinas ha aumentado considerablemente, todavía hay muchas preguntas abiertas respecto a la inmunidad (auto-protección) y la base molecular de la especificidad del blanco a atacar en las células.

3.6.5 Condiciones para la Fermentación Ácido Láctica (Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects Third Edition, Revised and Expanded)

- **Temperatura:** Es una de las condiciones óptimas para el desarrollo de microorganismos responsables. Ejerce una influencia fundamental en la calidad de la fermentación, y de ella depende además criterios como el tiempo de fermentación, selectividad de la cepa en desarrollo debido a la naturaleza de microorganismos afines a ciertas temperaturas. La temperatura para el desarrollo de Lactobacilos es de 30 °C, esta temperatura garantiza generalmente una rápida propagación de la acidez y con esto una reducción del tiempo de fermentación.

La temperatura afecta directamente al crecimiento de microorganismos debido a que si se trabaja a una temperatura inferior a la óptima el crecimiento es retardado y disminuye en gran medida la productividad celular, en el sentido contrario altas temperaturas no letales pueden producir estrés de choques térmicos y afectar la producción de

metabolitos no deseados de los microorganismos en cuestión. Por tanto, para procurar los mejores rendimientos las fermentaciones deben manejarse en rangos estrechos de temperatura casi constantes teniendo en cuenta su temperatura de trabajo óptimo.

- **Exclusión de Aire:** Este es uno de los factores críticos para una fermentación, las bacterias lácticas pertenecen a los microorganismos anaerobios facultativos, es decir, que pueden desarrollarse tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. Sin embargo, la mayoría de fermentaciones no tiene lugar en presencia de aire, por lo que se toman las correspondientes medidas para desalojarlo procurando que durante la fermentación no penetre aire de nuevo. Se debe tener en cuenta también el control de los niveles de CO₂ producidos durante las fermentaciones que generalmente brinda un aporte a estos ambientes. Condiciones aerobias permiten el crecimiento de cantidades mayores de levaduras y de hongos, que por su intenso metabolismo aerobio destruyen en breve tiempo cantidades relativamente grandes de hidratos de carbono que serán necesario para la formación de ácido láctico, y además ciertas levaduras y hongos consumen el ácido láctico, resultando la elevación del pH y la aparición de bacterias proteolíticas u otros organismos que pueden causar alteraciones.

Por lo tanto es necesaria la hermeticidad del fermentador, los microorganismos aerobios, al consumir los restos de oxígenos existentes proporcionan de esta forma condiciones favorables para el desarrollo de las bacterias anaeróbicas productoras de ácido láctico.

- **pH:** Durante el crecimiento microbiano en un fermentador, los metabolitos celulares son liberados al medio, lo que origina cambios de pH, que requieren de un control debido a que cada microorganismo tiene un rango de trabajo en el que pueden vivir adecuadamente, fuera de este pueden obtenerse un deceso repentino, por lo que de ser necesario se añade una base o un ácido cuando se necesite mantener una constante, procurando una mezcla homogénea para que el pH sea el mismo en todo el fermentador. Los descensos de pH también son evidencia de producción de ácidos que permiten eliminar la competitividad de otros microorganismos en el medio.

3.6.6 Curva del Crecimiento Bacteriano

La curva del crecimiento bacteriano (ver Figura 3.5) resulta de la representación gráfica de la determinación periódica del número de células viables por mililitro que existen en un líquido inoculado con células microbianas provenientes de un cultivo que ha crecido previamente hasta la saturación.

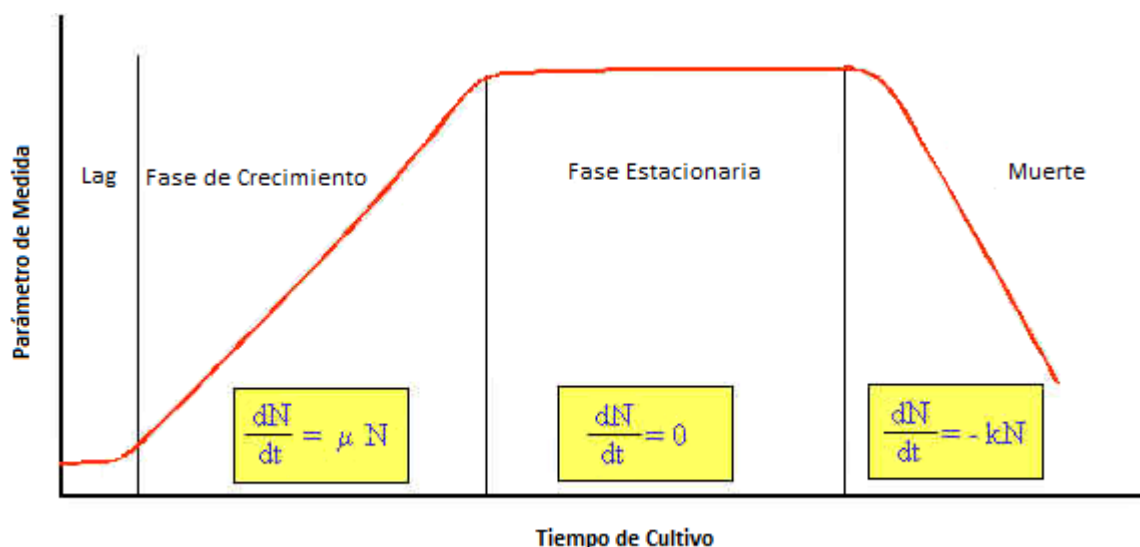


Figura 3.5 Curva de Crecimiento Microbiano (Monografías, 2010)

- **Fase de latencia:** Este periodo consiste en la adaptación de las células microbianas a su nuevo ambiente. En esta fase, las células microbianas se encuentran empobrecidas en cuanto a metabolitos y enzimas, esto debido a las condiciones desfavorables que representaba el cultivo previo.

Por lo anterior, en este lapso de tiempo se forman las enzimas y los metabolitos intermedios hasta alcanzar las concentraciones necesarias para reiniciar el crecimiento.

Este periodo se puede prolongar en el caso de que el medio de cultivo previo y las condiciones actuales resulten tan diferentes que las células sean genéticamente incapaces de sobrevivir, por lo que sólo unas cuantas mutantes podrán subsistir, y obviamente se requerirá más tiempo para que éstas se multipliquen lo suficiente y sea notorio el aumento de células.

- **Fase de Crecimiento Exponencial o Logarítmico:** Como el nombre lo indica, en esta fase las células se encuentran en un estado de crecimiento sostenido.

Se sintetiza nuevo material celular a una tasa constante, pero éste material es en sí catalítico y la masa aumenta de manera exponencial. Lo anterior continua hasta que uno o más nutrientes se agoten, o hasta que se acumule tal cantidad de metabolitos tóxicos que se inhiba el crecimiento. El nutriente limitante para los organismos aerobios suele ser el oxígeno: cuando la concentración bacteriana es de aproximadamente 1×10^7 / ml es necesario incrementar el ingreso de oxígeno mediante agitación o burbujeo; pero cuando la concentración alcanza 4 ó 5×10^9 bacterias por ml, la tasa de difusión de oxígeno no puede satisfacer las demandas aun en un medio aireado, por lo que el crecimiento disminuye progresivamente.

Durante el crecimiento exponencial, la tasa de crecimiento de las células (medida en gramos de biomasa producida por hora), cuando el crecimiento no es limitado por los nutrientes, se puede obtener multiplicando la constante de la tasa de crecimiento por

la concentración de biomasa. La constante de la tasa de crecimiento es la tasa a la cual las células producen más células, y el valor que esta toma se interpreta como los gramos de biomasa producidos por cada gramo de biomasa preexistente creados en una hora.

El crecimiento se denomina exponencial porque la biomasa se incrementa exponencialmente con respecto al tiempo. De lo anterior se deriva que, si graficamos el logaritmo de la concentración de la biomasa (o celular) en función del tiempo, como ocurre en la curva del crecimiento, obtendremos una línea recta como representación de esta fase.

Esta fase puede prolongarse indefinidamente si las células se transfieren repetidamente a un medio nuevo (fresco) de composición idéntica al anterior, lo cual se logra de manera automática mediante dos aparatos: el quimiostato y el turbidostato.

- **Fase Estacionaria:** Como se explicó en la descripción de la fase anterior, ante el agotamiento de nutrientes en el medio o la acumulación de metabolitos tóxicos el crecimiento cesa por completo después de un periodo de decrecimiento en la tasa de crecimiento, lo cual corresponde a la fase D o de retraso.

No obstante, por lo general en esta fase se puede observar recambio celular, lo cual se debe a que, aunque existe una pérdida lenta de células por muerte, dicha pérdida se compensa exactamente por la formación de nuevas células a través de crecimiento y división. Así, la cifra de células viables se mantiene constante, aunque en realidad en el conteo aumenta poco a poco el número de células, si se cuentan también las muertas.

Para comprender lo anterior debemos considerar que, para una célula microbiana, muerte significa la pérdida irreversible de la capacidad para reproducirse (crecer y dividirse), lo cual se comprueba cuando una célula es incapaz de producir una colonia en cualquier medio. De lo anterior se deriva que designar a una célula microbiana como muerta no implica su destrucción física. La duración de esta fase depende de la naturaleza del microorganismo y de las condiciones del medio.

- **Fase de Declive o Muerte:** Esta fase, también conocida como fase de muerte, representa el decremento de células debido al aumento progresivo de la tasa de mortalidad, misma que tarde o temprano alcanza un valor sostenido. Por lo general, una vez que la mayoría de las células ha muerto, la tasa de mortalidad disminuye bruscamente, por lo que un número pequeño de sobrevivientes pueden persistir en cultivo por meses o años. Dicha persistencia puede deberse a que las células consiguen crecer gracias a los nutrientes liberados por las células que mueren y se lisan, observándose recambio celular.

IV. METODOLOGÍA

4.1 Materia Prima

4.1.1 Desechos de Crustáceos

Para efectuar esta investigación se utilizaron aproximadamente 500 g de desecho de camarón o langostino en base húmeda. Este material fue proporcionado por las Empresas CAMANICA y Acuario Internacional. En la Figura 4.1 se presentan imágenes de las especies de crustáceos utilizadas en esta investigación.

La especie de camarón roja (*Farfantepenaeus Brevirostris*) es una de las más comunes que se distribuye en la costa del pacífico de Nicaragua; los desechos comprenden patas, cabezas y caparazón. Por otro lado, la especie de langostino es la mangle rojo (*Rhizophora spp*) también presentes en las costas del pacífico, sus desechos comprenden simplemente la cabeza del crustáceo (ver Figura 4.1.b).



(a)



(b)

Figura 4.1 Imágenes de (a) caparazón de camarón y (b) caparazón de langostino.

4.1.2 Suero de Leche

Para la obtención del suero lácteo se procedió de la siguiente manera: se calentaron 5 L de leche hasta una temperatura de 45°C, manteniéndola constante por 10 min. Posteriormente, se midió el pH hasta llegar a un valor de 6.24. Una vez alcanzado este valor se le añade 0.1 g de pastilla de cuajo y se deja reposar por media hora hasta que la caseína insoluble precipita formando el cuajo. Una vez que el cuajo está formado, se separa del suero por medio de la decantación con ayuda de un colador y de gasas estériles con el fin de remover las partículas más finas. De esta manera el suero ya está listo para usarse en la etapa de fermentación.

4.1.3 Sacarosa

En este trabajo se utilizó sacarosa como fuente de carbono, debido a su bajo costo en comparación con la glucosa. Las bacterias ácido lácticas se encargaron de fermentar los

dos monosacáridos resultantes de la hidrólisis de la sacarosa (glucosa y fructosa) para obtener energía y generar el ácido láctico necesario para la recuperación de la quitina.

4.2 Reactivos, materiales y Equipos de Laboratorio

4.2.1 Reactivos

En la Tabla 4.1 se enlistan los reactivos utilizados en la determinación de las variables de medición.

Tabla 4.1 Descripción de los Reactivos.

No.	Descripción	Análisis
1	Ácido Nítrico concentrado	Determinación de Ca
2	Estándar de Ca de 1000 mg/L	Determinación de Ca
3	Hidróxido de sodio 0.1M	Acidez Titulable
4	Fenolftaleína	Acidez Titulable
5	Bromuro de Potasio	Análisis de Infrarojo

4.2.2 Cristalería y materiales

Los materiales de laboratorio para llevar a cabo este estudio incluyen: pipetas, beakers, matraz volumétricos y probetas de diferente graduación, bureta de 25 ml, envases de plástico de 100 ml para almacenar muestras, matraz Erlenmeyer de 150 ml, soporte universal, gotero, agitador magnético, entre otros.

4.2.3 Equipos

En la Tabla 4.2 se enlistan los equipos utilizados en la realización del estudio y en la determinación de las variables de medición.

Tabla 4.2 Equipos que serán utilizados durante el estudio.

No.	Descripción	Marca y Modelo	Observación
1	Procesador de alimentos	Oster-3200	Trituración de la materia prima
2	Equipo de Fermentación	Pirex England	Para la fermentación láctica
3	Balanza de precisión	Adventurer Ohaus	Pesaje de materia
4	Horno	Precision 120V	Secado de la quitina
6	pH-metro	WTW-330i	Análisis de pH
7	Absorción Atómica	GBC-932 Plus	Determinación de Calcio
8	Espectrómetro IR	FT-IR ALPHA T Bruker	Pureza de la muestra
9	Microscopio	LW Scientific	Identificación de bacterias

4.3 Parte Experimental

4.3.1 Preparación del Inóculo

Parte vital del estudio fue el inóculo que se utilizó en las pruebas para comparar el efecto de una población bacteriana conocida contra una corrida con sustrato fresco. Se estableció que el inóculo utilizado para la segunda etapa del estudio correspondiera al 10 % de volumen. Este se extrajo de una corrida estándar después de un tiempo de fermentación de dos semanas, por lo que el volumen de medio preparado para estas corridas fue de 90 % del volumen que se utilizó en el experimento.

Para conocer la población de inoculación se realizaron recuentos en placas para determinar la población bacteriana luego de finalizado el experimento de dos semanas.

4.3.2 Proceso de Obtención de Quitina por Fermentación Láctica

El diagrama de bloques del proceso se presenta en la Figura A.1 del Apéndice. El procedimiento para la obtención de quitina por fermentación láctica a partir de desechos de crustáceos se describe a continuación:

- **Lavado:** La muestra de caparazón fue lavada para eliminar suciedades, desechos de carne y descongelar perfectamente todo el desecho para proceder a pesar.
- **Pesado:** 500 g de caparazón de crustáceo fueron pesados utilizando una balanza de precisión Adventurer Ohaus (Figura 4.2a)
- **Triturado:** La trituration fue llevada a cabo en un procesador marca *Oster* (Figura 4.2b). El propósito de la trituration es conseguir un tamaño de material adecuado para promover la interacción entre las bacterias y el caparazón. Así también de esta manera, se debilita la estructura del caparazón y se facilita la separación de la quitina, proteínas y calcio.



(a)



(b)

Figura 4.2 (a) Balanza de precisión y (b) Procesador de Alimentos *Oster*, equipos utilizados en el pesado y triturado de las muestras.

- **Fermentación Láctica:** El sistema de fermentación o bioreactor (ver Figura 4.3) utilizado consiste en un reactor vertical de vidrio pyrex de 55 cm de largo por 16 cm de diámetro para un volumen de cuatro litros. Este reactor contiene una canastilla cilíndrica de acero inoxidable concéntrica de 30.5 cm de largo por 10.5 cm de diámetro. El sistema utiliza un mezclador de 500 rpm para llevar a cabo el mezclado cada 24 horas por lapsos de 10 a 30 minutos.

Los desechos previamente triturados fueron depositados dentro de la canastilla y el suero lácteo fue vertido dentro del reactor ocupando ambos alrededor del 75% del reactor. El volumen total del suero fue de 2250 mL enriquecido con sacarosa al 10% p/v. La sacarosa provee la fuente de carbono necesaria para que las bacterias ácido lácticas produzcan el ácido orgánico que actuará sobre los desechos de crustáceo permitiendo, de esta manera, su descalcificación y desproteinización parcial con el fin de obtener la quitina cruda.

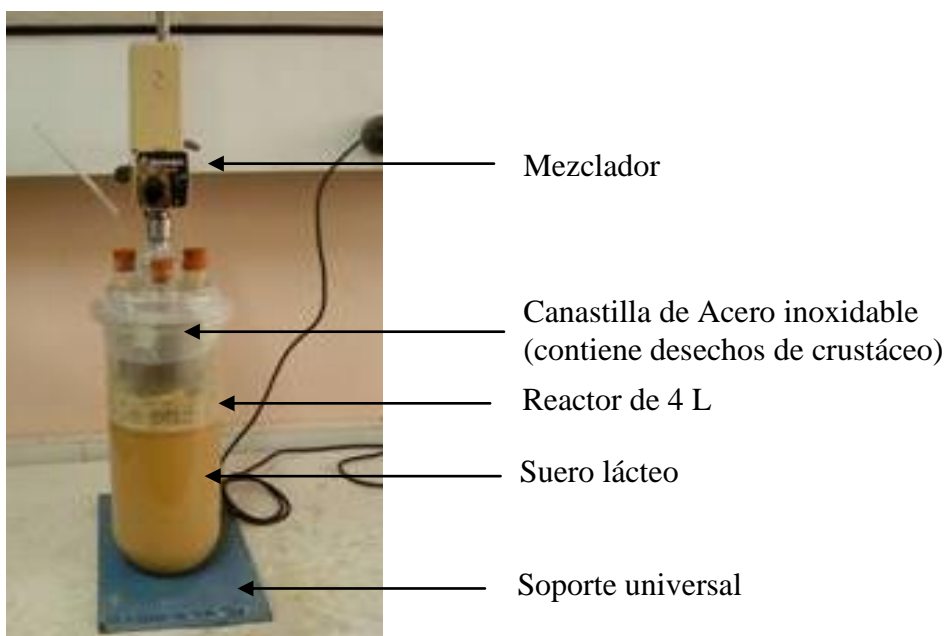


Figura 4.3 Bioreactor ó equipo de fermentación y sus componentes para llevar a cabo la extracción de quitina.

Las pruebas fueron realizadas con una cepa SPP de *Lactobacillus* para valorar su rendimiento, esto implica permitir un desarrollo bacteriano natural de microorganismos en el sustrato de suero. La fermentación batch se llevó a cabo en 2 a 3 semanas, a temperatura ambiente.

Para valorar el comportamiento de las bacterias ante el consumo de proteínas y minerales que posee el cascajo del crustáceo, se tomaron alícuotas de 50 mL en intervalos de 24 h de iniciado el experimento, lo que implicó una toma de muestra de licor por día. En total se recabaron 13 muestras para una corrida de 2 semanas y 19 muestras para una corrida de 3 semanas (275 muestras en total). Los análisis realizados al licor producido fueron: pH, Acidez total titulable, y contenido de calcio.

En el apéndice de este documento se encuentran descritos los procedimientos para cada análisis.

Al final del proceso de fermentación, la canastilla fue retirada del fermentador y el material es separado y lavado con abundante agua.

- **Desproteínezación:** Al material producto de la fermentación se le agregó NaOH al 5% (para camarón) y 10% (para langostino) en una relación de 200 L/50 kg de material, para asegurar la separación de toda la proteína residual. La mezcla se agitó por 1 hora a temperatura ambiente (25°C) con un agitador mecánico para favorecer la correcta agitación y posteriormente, el líquido fue separado con ayuda de un colador y el sólido fue lavado con agua destilada para eliminar todo el NaOH residual.
- **Blanqueo:** El sólido obtenido en el paso anterior se trató con una solución de hipoclorito de sodio al 0.38% en una relación de 8 L/kg para el camarón y 0.76% con una relación de 12 L/kg para el langostino para asegurar el blanqueo total de la quitina. Nuevamente se le proporcionó agitación con el mezclador mecánico en un lapso de 15 a 30 min. Luego la quitina fue separada de la solución utilizando un colador y se lavó adecuadamente con agua destilada para la siguiente etapa.
- **Secado:** Para eliminar toda la humedad de la quitina producida, el material fue introducido en un horno a una temperatura entre 45–50 °C. El tiempo de secado de esta dependió del nivel de humedad que contenía la quitina, concluido esto se procedió al enfriamiento, empaque y almacenamiento del producto final.

En el equipo fermentador se llevaron a cabo un total de 16 corridas (8 de camarón y 8 de langostino), además de 3 corridas preliminares para conocer el proceso, el comportamiento del material y algunas variables de medición (pH, acidez total) durante la fermentación láctica.

4.3.3 Análisis Espectral del Producto

Finalizadas todas las operaciones del proceso, se procedió a evaluar la pureza de la quitina producida. Para ello, se obtuvieron los espectros IR de la quitina producida utilizando el Equipo FT-IR con accesorio ALPHA T. Estos espectros fueron comparados con una muestra patrón de Quitina proporcionada por Jining Green Group Co. Ltd, Shandong, China.

4.3.4 Diseño Experimental

Para el diseño experimental se usó el programa Statgraphics Centurion XVI versión 16.1.02 para Windows de 32 bits. El diseño experimental es un diseño factorial estándar que estima los efectos de 3 factores categóricos. Este diseño consiste en todas las combinaciones de los niveles de los factores. El diseño base considera:

- Número de Factores Experimentales: 3
- Número de Respuestas: 3
- Número de Réplicas: 2
- Número de Corridas: 16
- Grados de Libertad para el error: 9

La Tabla 4.3 muestra los factores independientes a evaluar para el estudio de la Fermentación Láctica para la Recuperación de Quitina; mientras que la Tabla 4.4 muestra las variables dependientes (respuestas).

Tabla 4.3 Factores en el Diseño Experimental

Factores	Niveles	Observación
Inóculo	2	Con y sin inóculo
Material	2	Desechos de camarón y desechos de langostino
Tiempo de fermentación	2	2 semanas y 3 semanas

Tabla 4.4 Variables dependientes o respuestas y sus unidades

Respuestas	Unidades
pH	-
Acidez total titulable	%
Calcio	mg/L

En este diseño se obtuvieron un total de 16 corridas, ocho para cada tipo de material. Estas se muestran en la Tabla A.2.1 del Apéndice A.2.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los desechos de crustáceos, la quitina está asociada con minerales de calcio (principalmente en forma de carbonatos), proteínas y pigmentos (en su mayoría astaxantina) (Gerente *et al.*, 2007); por lo tanto, para su recuperación es necesario remover estos materiales. Aunque el método químico usa NaOH para la remoción de proteínas (desproteización) y HCl para remover los minerales de calcio (desmineralización) (Escorcía *et al.*, 2009), en este estudio se utilizó el proceso de fermentación ácido láctica con inóculo y sin inóculo, para la remoción de proteínas y los minerales de calcio. A continuación se presentan y se discuten los principales resultados.

5.1 Desarrollo del Inóculo

El inóculo se preparó con una cantidad poblacional de microorganismo (BAL) que se habían desarrollado en una corrida anterior en el bioreactor. En ese proceso, el 10% de volumen de fermentación fue transferido asegurando la estabilización de los residuos y la prevención de la colonización de organismos de descomposición a como lo sugiere Zakaria (1998).

Los análisis de recuento bacteriano en placas (ver Figura 5.1) se realizaron por duplicado con el fin de valorar el crecimiento en el suero lácteo y el licor producido después de llevada a cabo la fermentación láctica, el dato promedio generado para la muestra del licor es de 66.5×10^7 ufc con lo cual se realizó la inoculación tomando el 10% del volumen total del licor generado, y para el suero lácteo es de 114.5×10^5 ufc que es el índice de carga bacteriana con el que se cuenta al inicio de cada corrida sin inoculación. La población bacteriana del licor es comparable a los valores de inoculación de otros estudios (Jung *et al.*, 2005; Zakaria *et al.*, 1998).



Figura 5.1 Recuento en (a) placas de licor y (b) suero lácteo.

En muchas ocasiones el desarrollo de estos microorganismos puede ser frenado por altas concentraciones de azúcares que aletargan el metabolismo de estas bacterias.

5.2 Fermentación Láctica utilizando Caparazón de Camarón

5.2.1 Tiempo de Fermentación de dos semanas

En este estudio, el proceso de fermentación ácido-láctica se llevó a cabo considerando un tiempo de fermentación de 2 semanas, sin inóculo y con inóculo. Para evaluar el comportamiento de las bacterias ácido-lácticas en el fermentador, se consideraron las variables de pH, el porcentaje de Acidez total titulable (%ATT) y el contenido de calcio (g/L) en el licor. Los datos experimentales del estudio sin inóculo se muestran en las Tablas A3.1 y A3.2 (réplica); mientras que los resultados experimentales con inóculo se presentan en las Tablas A3.3 y A3.4 (réplica) del Apéndice.

5.2.1.1 Variación del pH y de %ATT durante la fermentación en dos semanas

En el método biológico la función de desmineralización y desproteínización está a cargo de las bacterias *Lactobacillus* a través de la fermentación ácido-láctico, la cual causa una reducción gradual del pH y un aumento continuo de la acidez total titulable.

En la Figura 5.2 se presenta la media de los resultados del comportamiento del pH, con una desviación estándar promedio de 0.059 (sin inóculo) y 0.136 (con inóculo) y un intervalo de confianza promedio respectivamente de 0.082 y 0.189 con un nivel del confianza del 95%. Así también se presenta el porcentaje promedio de acidez total titulable (%ATT), con una desviación estándar promedio de 0.073 (sin inóculo y con inóculo) y un intervalo de confianza promedio respectivamente de 0.102 en ambos casos. Esta acidez puede ser expresada como un porcentaje de ácido láctico, en función del tiempo de la fermentación ácido láctica.

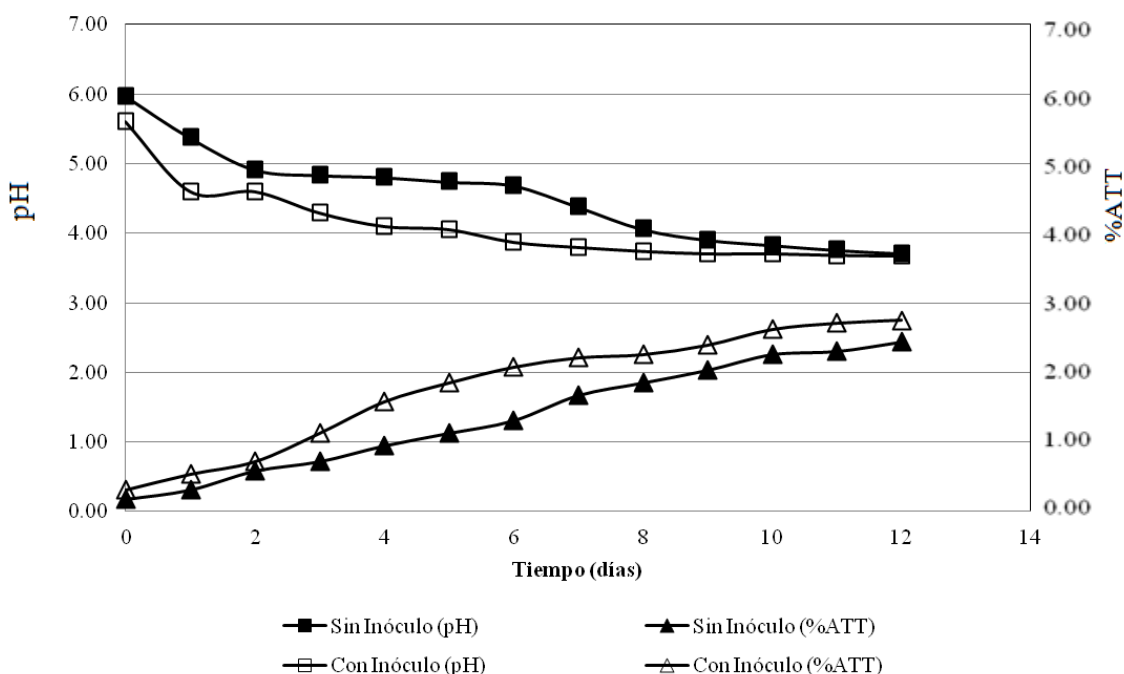


Figura 5.2 Comportamiento del Porcentaje de Acidez total titulable (%ATT) y del pH durante la fermentación ácido-láctica de caparazón de camarón en un tiempo de fermentación de 2 semanas sin inóculo y con inóculo.

Los resultados muestran que el pH inicial del suero fue decreciendo de 5.97 (sin inóculo) y 5.61 (con inóculo) hasta aproximadamente 3.7 para ambos casos. Así también, se puede observar como incrementa el porcentaje de Acidez total titulable con el tiempo, hasta alcanzar un valor de 2.43% (sin inóculo) y 2.75% (con inóculo).

Además, se puede observar en la Figura 5.2 que hubo un menor incremento en el pH del licor de fermentación cuando se trabaja con inóculo; sin embargo, después del día noveno hay una similitud en los resultados. Por otra parte, comparando los gráficos del %ATT se observa que la acidez es mayor cuando se trabaja el proceso de fermentación con inóculo. Esto significa que la presencia inicial de los microorganismos influye en la producción de ácido láctico, y además evita el crecimiento de microorganismos no deseados que también pueden aprovechar los azúcares presentes en el medio y afectar el metabolismo de las BAL. Este mismo fenómeno también fue observado por otros autores (Shirai *et al.*, 2001), señalando un claro beneficio al gobernar la población bacteriana en los procesos de fermentación con este procedimiento. Otra de las ventajas de la inoculación es la posible aceleración del proceso y el aumento del control de desarrollo de microorganismos con lo que se le brinda un carácter de activación metabólica a la técnica a diferencia de una cruda competencia de crecimiento bacteriano de especies en el medio.

Según Beaney *et al.* (2005), el aumento de la acidez resulta de la producción metabólica de ácido láctico a partir de la fuente de carbono, en este caso la sacarosa y la lactosa, lo cual indica la presencia de bacterias ácido láctica y su adecuado crecimiento. Durante el proceso metabólico ocurre primero la separación de la molécula de sacarosa en glucosa y fructosa, y de la molécula de lactosa en glucosa y galactosa. En la glucólisis la célula transforma y oxida la glucosa para producir ácido pirúvico y posteriormente, el ácido láctico (ver Figura 5.3), creando una condición de bajo pH que suprime el crecimiento de microorganismos no deseados *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter* y *Micrococcus* (Rao *et al.*, 2000; Shirai *et al.*, 2001). De estos, las *Pseudomonas* son particularmente importantes por su alta actividad proteolítica ya que promueven la rápida putrefacción de los desechos de camarón (Shirai *et al.*, 2001).

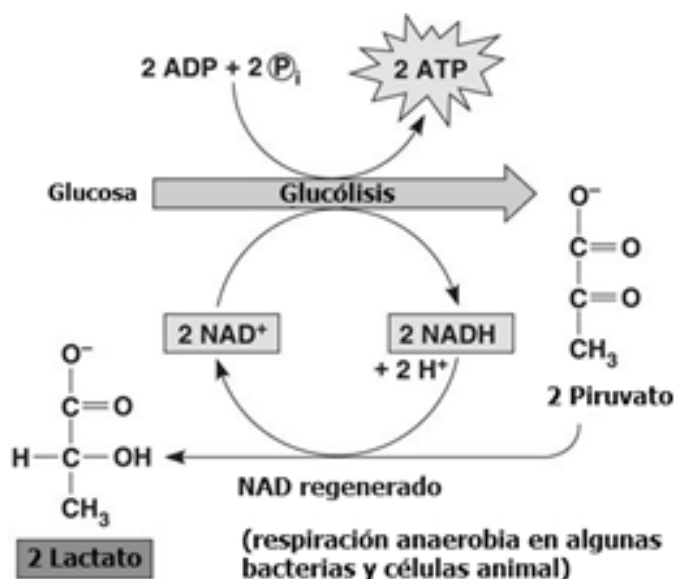


Figura 5.3 Ruta metabólica de la fermentación ácido láctica para la producción de ácido láctico (Biolcchn, 2012).

5.2.1.2 Variación de calcio durante la fermentación en dos semanas

En la Figura 5.4 se muestra la media de los resultados de la variación del calcio con una desviación estándar promedio de 0.073 (sin inóculo y con inóculo) y un intervalo de confianza promedio respectivamente de 0.102 con un nivel de confianza del 95% para ambos casos, durante la fermentación láctica. Estos resultados indican que se produjo una significativa desmineralización del material.

Los datos experimentales mostraron que hubo un aumento en la concentración de iones Ca^{2+} en la solución, de 1.40 g/L en el suero (día 0) a 9.69 g/L de Ca (sin inóculo) y a 12.12 g/L (con inóculo) en el licor de fermentación al finalizar el proceso (día 12 del período de fermentación). Observándose que la inoculación permite un mayor incremento en la concentración final de iones Ca^{2+} debido a la mayor estabilidad del crecimiento bacteriano que se encargan de metabolizar el ácido necesario para solubilizar los minerales presentes en los desechos de camarón.

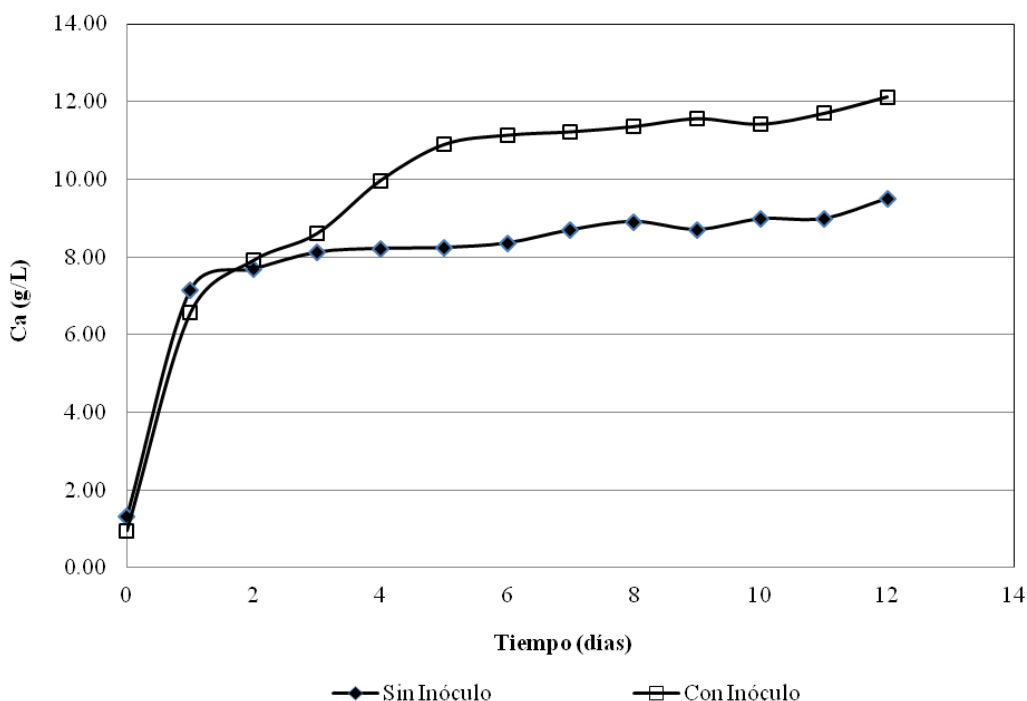
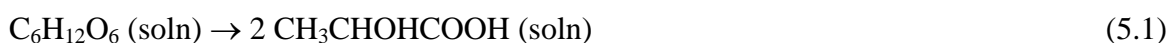


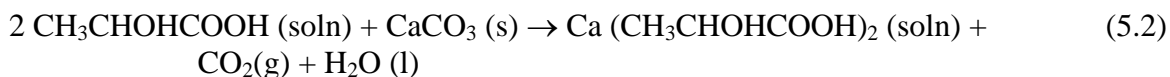
Figura 5.4 Comportamiento del calcio durante la fermentación ácido-láctica de caparazón de camarón en un tiempo de fermentación de 2 semanas sin inóculo y con inóculo.

El ácido láctico producido durante la fermentación láctica homofermentativa, reacciona con los minerales de calcio, los cuales se encuentran unidos a la quitina en el caparazón, produciendo lactato de calcio y alcanzando, de esta manera, una remoción de aproximadamente el 80 %.

En la fermentación homoláctica una molécula de glucosa es convertida a dos moléculas de ácido láctico (Xu *et al.*, 2008):



Y en la desmineralización, 2 moléculas de ácido láctico reaccionan con una molécula de carbonato de calcio:



El lactato de calcio puede ser subsiguientemente recuperado del sistema, para su posterior utilización en la industria de alimentos, ya que se utiliza en polvos para hornear, como suplemento en dietas de aves y animales y como fuente de calcio en fármacos y bebidas claras (García *et al.*, 1993).

La eficiencia en la remoción de calcio del material depende grandemente de la cantidad de fuente de carbono añadido (sacarosa y lactosa). De acuerdo a Shirai *et al.* (2001) un aumento en la concentración de glucosa causa un decrecimiento del pH debido al incremento en la producción de ácido láctico. Sin embargo, una concentración de glucosa mayor que un 10 % puede provocar una fase de latencia prolongado debido a una disminución de la actividad del agua promovida por la alta concentración de azúcar en el sistema. Esto pueda causar una posible putrefacción debido a la competencia de los organismos de descomposición (*Moraxella*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Micrococcus*) con las bacterias ácido láctico por el azúcar metabolizable.

5.2.2 Tiempo de Fermentación de tres semanas

En esta sección, el proceso de fermentación ácido-láctica se llevó a cabo en un tiempo de fermentación de 3 semanas, sin inóculo y con inóculo. Los datos experimentales del estudio sin inóculo se muestran en las Tablas A3.5 y A3.6 (réplica); mientras que los resultados experimentales con inóculo se presentan en las Tablas A3.7 y A3.8 (réplica) del Apéndice.

5.2.2.1 Variación de pH y %ATT durante la fermentación en tres semanas

La Figura 5.5 presenta en forma gráfica la media de los resultados del comportamiento del pH, con una desviación estándar promedio de 0.095 (sin inóculo) y 0.003 (con inóculo) y un intervalo de confianza promedio respectivamente de 0.132 y 0.005 con un nivel de confianza del 95%. Así también se presenta el porcentaje promedio de los resultados de acidez total titulable (%ATT), con una desviación estándar promedio de 0.069 (sin inóculo) y 0.147 (con inóculo) y un intervalo de confianza promedio respectivamente de 0.095 y 0.204, en función del tiempo de fermentación en un período de 3 semanas.

Los resultados muestran que para ambos casos (sin inóculo y con inóculo) hubo una disminución del pH y un incremento del %ATT. Sin embargo, es evidente que el pH tuvo un mayor decrecimiento cuando se trabajó con el inóculo; así también se observa, que el %ATT, en la fermentación con inóculo, fue ligeramente mayor que en la fermentación sin inóculo. Estos resultados confirman que la presencia inicial de microorganismos influye grandemente en la producción de ácido láctico, provocando un menor pH y un mayor porcentaje de ATT en el licor al finalizar el período de fermentación.

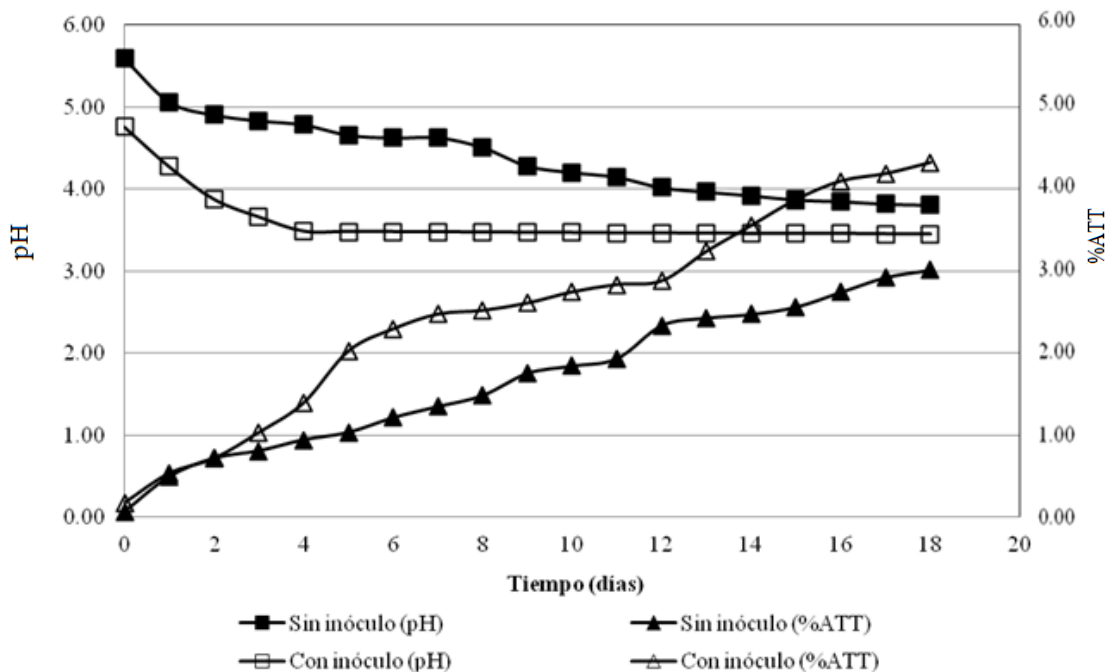


Figura 5.5 Variación del porcentaje de Acidez total titulable (%ATT) y pH durante la fermentación ácido láctica de caparazones de camarón en un tiempo de fermentación de 3 semanas sin y con inoculación.

Por otro lado, al comparar estos resultados con los resultados experimentales de la fermentación de 2 semanas, se observa que el pH del licor en el proceso de fermentación con inóculo en un tiempo de 3 semanas fue ligeramente menor. Mientras que el incremento del %ATT en el licor, en el período de 3 semanas, es más alto con relación al período de 2 semanas, aproximadamente del 24% (sin inóculo) y 57% (con inóculo). Esta variación en la duración de la fermentación permite que las bacterias ácido lácticas produzcan mayores niveles de acidez que se acumula en el sistema.

5.2.2.2 Variación de calcio durante la fermentación en 3 semanas

La Figura 5.6 refleja de manera gráfica, los datos experimentales del contenido de calcio en función del tiempo de fermentación de 3 semanas. En la figura se puede observar un alto incremento de calcio en el licor, de 1.56 g/L (valor promedio) en la fermentación sin inóculo, hasta 11.51 g/L; y de 1.13 g/L (valor promedio) en la fermentación con inóculo, hasta 13.8 g/L. Los resultados muestran que se obtuvo un mayor solubilización de iones calcio durante la fermentación de 3 semanas, posiblemente debido que al incrementar el tiempo de fermentación, incrementa la acidez en el sistema lo que permite una mayor remoción de minerales de calcio del caparazón de camarón.

Comparando estos resultados con los datos obtenidos en la fermentación ácido láctica en un período de 2 semanas, se observa un mayor incremento en la concentración de calcio en el licor: de aproximadamente 21.2% (sin inóculo) y 14.2% (con inóculo). La variación en la duración de la fermentación permite mayores niveles de acidez lo que provoca una mayor solubilización de calcio en el sistema.

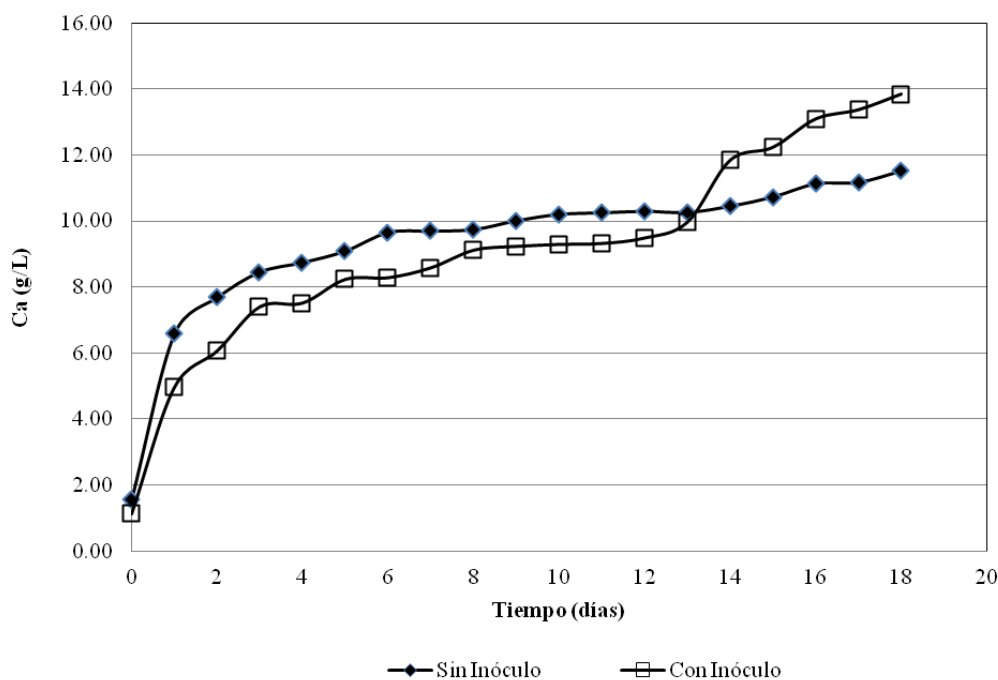


Figura 5.6 Comportamiento del calcio durante la fermentación ácido-láctica de caparazón de camarón en un tiempo de fermentación de 3 semanas sin inóculo y con inóculo.

5.2.3 Desproteínización: Combinación con tratamiento químico

La desproteínización es llevada a cabo por las enzimas peptidasas (antes conocidas como proteasas) las cuales se encuentran presentes de forma natural en el crustáceo. Estas enzimas son activadas a bajo pH y actúan rompiendo los enlaces peptídicos de las proteínas, provocando la hidrólisis y dando lugar a la producción de licor (Shirai *et al.*, 1997). Al finalizar la etapa de fermentación (12 días) se pudo apreciar que el producto aun contenía restos de pigmentos y restos proteicos indicando que el proceso de desproteínización no fue completo (ver Figura 5.7a).

Los resultados durante la fermentación ácido-láctica de 3 semanas también mostraron que, a pesar de haber extendido el tiempo de fermentación, siempre persisten restos de proteínas y pigmentos. Para asegurar la completa remoción de las proteínas se adicionó NaOH al 5 %, en una proporción de 4 L/kg de material, para conseguir el rompimiento del complejo quitina-proteína del caparazón. Así también, para remover los restos de pigmentos del producto se adicionó NaClO al 0.38 %, en una proporción de 8 L/kg de material. Al finalizar el procedimiento químico, la quitina obtenida tenía una apariencia suave al tacto, sin olor y sin restos de pigmentación (Fig. 5.7b), obteniéndose una recuperación de quitina de aproximadamente el 85 %.

Estos resultados concuerdan con aquellos obtenidos por Xu *et al.* (2008). Estos autores trabajaron en la purificación de la quitina de desechos de camarón usando *Lactobacillus casei* como inóculo y a diferentes concentraciones de glucosa, con cantidades de 2.7 y 5.4 g en base seca de cultivo microbiano y 6.5 a 10% de glucosa. Los resultados mostraron que al incrementar la cantidad de glucosa disminuye el pH, al igual que la adición de mayor cantidad de inóculo, obteniendo pH finales después de concluida la etapa de fermentación de 3.9 (con 2.7 g de cultivo bacteriano) y 3.5 (con 5.4 g de cultivo bacteriano)

correspondiendo a una remoción de calcio de 80 % y 72 %, respectivamente. Así también, notaron que la desproteínización no fue totalmente efectiva, alcanzado una eficiencia entre 40 y 85 %.



Figura 5.7 Quitina producida (a) después del período de fermentación y (b) posterior al tratamiento con NaOH al 5 % y NaClO al 0.38 %.

Similares resultados también fueron obtenidos, en similares condiciones de trabajo, por Setyahadi (2007) que lograron una producción de ácido láctico de 1.09 % (v/v) y un pH de 4.15 después de 6 días de incubación a 37 °C usando MRS Agar (de Man, Rogosa y Sharpe) como medio de cultivo y melaza como fuente de carbono. Esto indica que el uso de sacarosa (azúcar blanca comercial) en vez de glucosa o melaza, puede ser efectiva como fuente de carbono para el crecimiento de las bacterias ácidas lácticas y la producción del ácido láctico.

Por otro lado, en un trabajo realizado por Rao *et al.* (2000) encontraron que uno de los factores críticos en la producción de quitina en cuanto a la eficiencia en la desproteínización y desmineralización del material es el pH inicial del licor de fermentación. De acuerdo a sus resultados, la adición de 1 % de ácido acético (p/v) disminuye el pH del licor (de 8.0 a 6.0) lo cual evita la formación de microorganismos no deseados, incrementa la eficiencia de la desmineralización (de 44.1 a 67.5 %), pero disminuye ligeramente la eficiencia de la desproteínización (de 89.2 a 88.4 %). Esta tendencia es más evidente a medida que se incrementa la adición del porcentaje de ácido acético en el sistema. El uso de suero lácteo en este trabajo permitió tener las condiciones de pH necesarios (entre 5.4-6) en la fermentación láctica, además del aporte de altos contenidos de lactosa como sustrato (Trujillo *et al.*, 1998), alcanzar una buena eficiencia en la desmineralización y desproteínización del material de desecho. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, mediante la sola utilización de la fermentación láctica no es posible recuperar la quitina con un buen grado de pureza. Por ello, Cira *et al.* (2002) trataron la quitina obtenida del proceso de fermentación con ácido (HCL 1-1.5 N) y álcali (NaOH 1.75 N) para la eliminación de minerales y proteínas.

5.3 Fermentación Láctica utilizando Caparazón de Langostino

5.3.1 Tiempo de Fermentación de dos Semanas

De igual manera que en el caso anterior, el proceso de fermentación ácido-láctica para la obtención de quitina a partir de caparazón de langostino se llevó a cabo considerando un tiempo de fermentación de 2 semanas, sin inóculo y con inóculo. Los datos experimentales del estudio sin inóculo se muestran en las Tablas A4.1 y A4.2 (réplica); mientras que en las Tablas A4.3 y A4.4 (réplica) del Apéndice se presentan los resultados experimentales con inóculo.

5.3.1.1 Variación del pH y de %ATT durante la fermentación en dos semanas

La Figura 5.8 muestra de manera gráfica los datos experimentales promedios del pH, con una desviación estándar promedio de 0.036 (sin inóculo) y 0.122 (con inóculo) con un intervalo de confianza promedio respectivamente de 0.050 y 0.169, y los datos promedio del %ATT, con una desviación estándar promedio de 0.083 (sin inóculo) y 0.073 (con inóculo) con un intervalo de confianza promedio respectivamente de 0.115 y 0.095, en función del tiempo de fermentación.

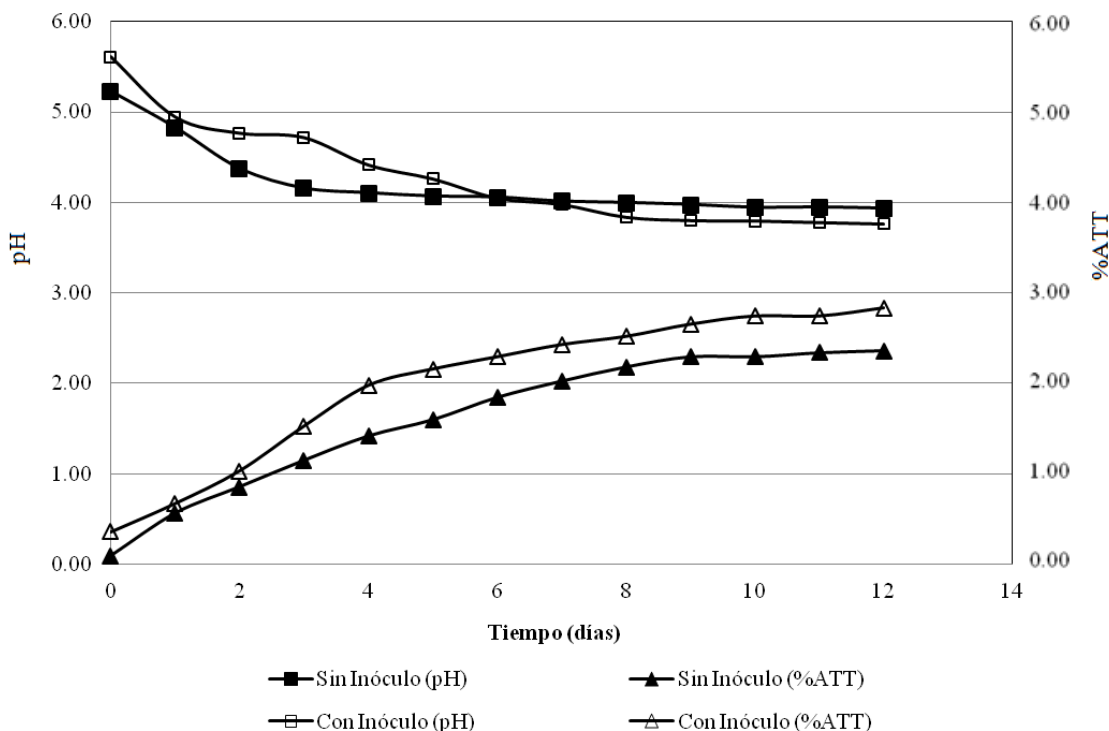


Figura 5.8 Comportamiento del % Acidez total titulable (%ATT) y pH en función del tiempo de fermentación de 2 semanas para langostino sin inóculo y con inóculo.

Los resultados muestran que el pH inicial del suero fue decreciendo de 5.37 (sin inóculo) y 5.98 (con inóculo) hasta aproximadamente 3.7 y 3.9, respectivamente. Lo que indica que la presencia de microorganismos en el inóculo no afecta grandemente la variación de pH durante el período de fermentación. Por otro lado, también se puede observar como

incrementa el porcentaje de Acidez total titulable con el tiempo, hasta alcanzar un valor de 2.36% (sin inóculo) y 2.84% (con inóculo). En este caso, si se puede notar que la presencia inicial de los microorganismos influye en la producción de ácido láctico, obteniéndose mejores resultados.

Comparando estos resultados con los obtenidos con el caparazón de camarón, se observa que en general los comportamientos de las variables pH y %ATT, así como los resultados finales de la fermentación ácido láctica de ambos tipos de material son bastantes similares, en iguales condiciones de trabajo.

5.3.1.1 Variación de Ca durante la fermentación en dos semanas

Para este caso, el mayor reto era demostrar la viabilidad del uso del método biológico para la remoción del calcio considerando que el langostino posee una estructura de mayor dureza debido a las altas concentraciones de calcio (45-58 %). En la Figura 5.9 se muestra de manera gráfica los datos experimentales promedios de calcio, con una desviación estándar promedio de 0.98 (sin inóculo) y 2.01 (con inóculo) con un intervalo de confianza promedio respectivamente de 1.31 y 2.79, en función del tiempo de fermentación.

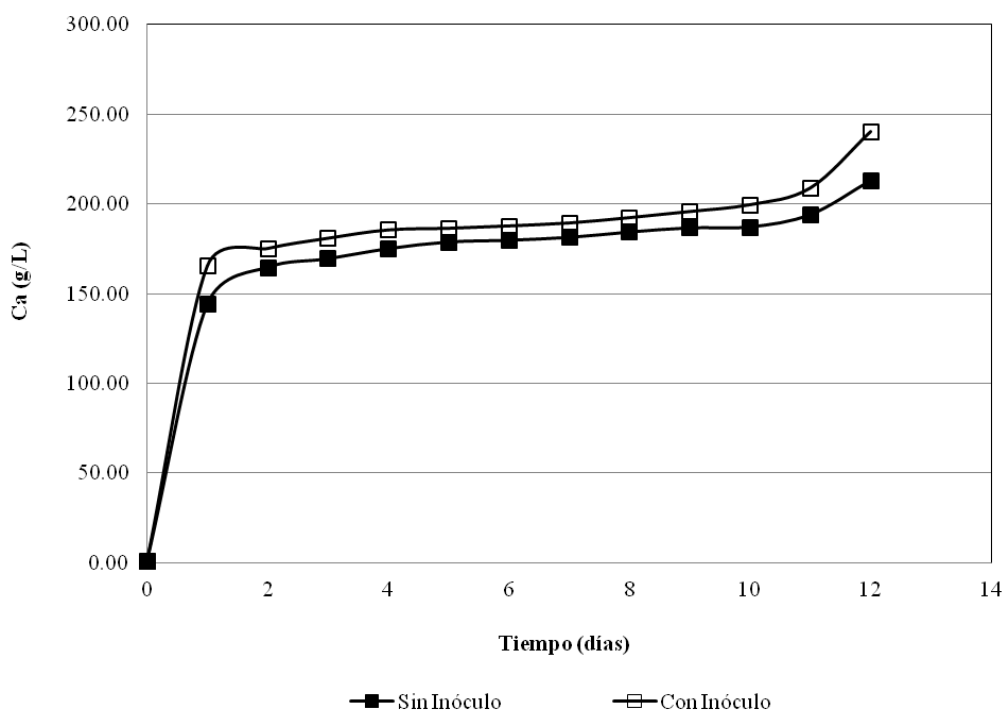


Figura 5.9 Variación de calcio durante la fermentación ácido láctica de caparazón de langostino en un tiempo de 2 semanas sin inóculo y con inóculo.

Las concentraciones reflejadas en la figura corresponden a las lecturas del mineral y su acumulación periódica en el licor producido por la fermentación, el valor final fue de 213.2 g/L de iones Ca (sin inóculo) y 240.4 (con inóculo). La inoculación afecta de manera positiva la producción de ácido láctico por parte de las BAL, con lo que se aumenta la solubilización del calcio en el medio. La estabilidad de crecimiento microbiano afecta claramente las corridas, por lo que esta población bacteriana usada como inóculo

(66.5×10^7) aminora las batallas con los organismos de descomposición no deseados a las que se mantienen expuestas corridas estándar sin el 10% de volumen de una corrida previa. Comparando estos resultados con el del otro material, se observa que las cargas presentes en el licor producto de la fermentación ácido-láctica del caparazón de langostino sobrepasan grandemente los resultados que reportaron los datos experimentales con caparazón de camarón. Cabe destacar que el incremento de la concentración implica la reacción química del ácido láctico producido en la fermentación con el carbonato de calcio, logrando solubilizar este componente. Por tanto, podemos señalar que la fermentación láctica homofermentativa realiza una desmineralización significativa del caparazón de langostino que finalmente afecta de manera positiva la pureza de la quitina obtenida.

5.3.2 Tiempo de Fermentación de tres Semanas

Los datos experimentales del proceso de fermentación ácido-láctica para la obtención de quitina a partir de caparazón de langostino sin inóculo y con inóculo se muestran en las Tablas A4.5 y A4.6 (réplica); mientras que en las Tablas A4.7 y A4.8 (réplica) del Apéndice se presentan los resultados experimentales con inóculo.

5.3.2.1 Variación del pH y de %ATT durante la fermentación en tres semanas

La influencia del tiempo de fermentación también fue observada para el material de langostino, en la que idealmente se espero favoreciera la recuperación de quitina y beneficiara los procesos de desmineralización, desproteinización y despigmentación que se acumularían en el licor producido por la fermentación. Un aumento del tiempo de fermentación permitió una mejor interacción del material con el ácido láctico producido por el metabolismo de las bacterias y de igual manera garantizar la posibilidad de mayor crecimiento bacteriano teniendo en cuenta la competitividad entre bacterias, que pudiesen ralentizar el desarrollo y eficiencia del proceso a causa del consumo de las fuentes de carbonos por organismos no deseados.

En la Figura 5.10 se reflejan gráficamente los datos para pH que brindan valores finales promedios de 3.74 (sin inóculo y con inóculo) con una desviación estándar promedio de 0.03 (sin inóculo) y 0.02 (con inóculo) con un intervalo de confianza promedio respectivamente de 0.04 y 0.03, y los datos de %ATT con valores finales de 2.88 (sin inóculo) y 3.60 (con inóculo) con una desviación estándar promedio de 0.07 (sin inóculo) y 0.08 (con inóculo) con un intervalo de confianza promedio respectivamente de 0.10 y 0.11, en función del tiempo de fermentación. Los resultados revelan que en el caso del pH no hubo diferencias significativas en comparación con los resultados de la fermentación con un tiempo de fermentación de 2 semanas de langostino; Mientras que para el caso del %ATT hubo un mayor incremento de la acidez en el licor de fermentación (22% sin inóculo y 27% con inóculo), lo cual indica que el tiempo de fermentación favorece la producción de ácido láctico en el sistema.

Por otra parte, comparando estos resultados con aquellos obtenidos con caparazón de camarón, en iguales condiciones de trabajo, se observa que cuando se trabaja sin inóculo las variables de medición, pH y %ATT, son similares para ambos materiales; sin embargo, cuando se trabaja con inóculo hay diferencias significativas en las variables de medición: pH de 3.4 (camarón) y de 3.7 (langostino); %ATT de 4.32 (camarón) y de 3.60 (langostino), debido posiblemente a las diferencias de interacción con cada material y el aporte de estos al medio de cultivo preparado que puede ralentizar la producción de

metabolitos. De cualquier forma, aunque en ambos casos los resultados obtenidos en las experimentaciones brindaron buenas respuestas a la recuperación de quitina a partir de los desechos de crustáceos, la inoculación y el tiempo de fermentación favorecen la producción de ácido láctico cuando se trabaja con caparazón de camarón.

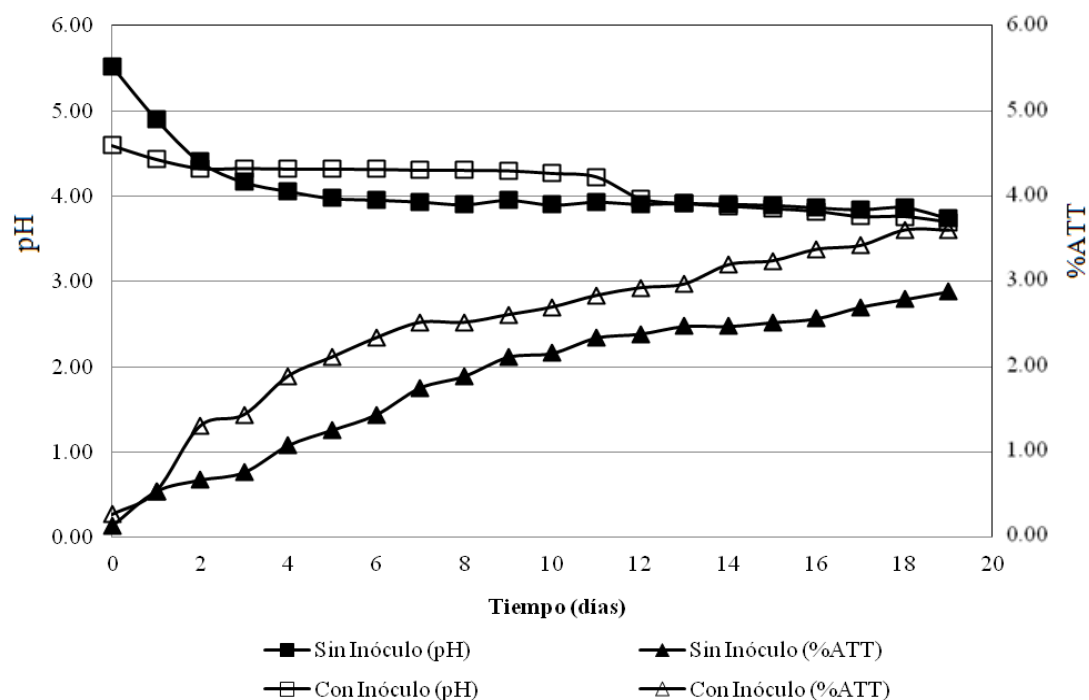


Figura 5.10 Comportamiento del % Acidez total titulable (%ATT) y pH en función del tiempo de fermentación de 3 semanas para langostino sin inóculo y con inóculo.

5.3.2.2 Variación de calcio durante la fermentación en tres semanas

La variable del %ATT indica que la desmineralización se ve afectada con estas condiciones de experimentación debido al aumento en la producción de ácido láctico, lo cual provoca el incremento de la concentración de los iones calcio en el sistema (ver Figura 5.11). Los resultados experimentales muestran que se alcanzó una concentración promedio de iones calcio de 361.08 g/L (sin inóculo) con una desviación estándar promedio de 1.64 con un intervalo de confianza promedio de 2.28, y de 384.00 (con inóculo) con una desviación estándar promedio de 14.726 con un intervalo de confianza promedio de 20.41. El aumento en el tiempo de fermentación nuevamente beneficia la eficiencia del proceso incrementando la producción de ácido láctico y por ende, la solubilización del carbonato de calcio presente en los desechos de crustáceos.

Los resultados generados en las tres semanas de fermentación superan las cantidades finales de iones calcio obtenidas en las corridas de 2 semanas con el mismo material, en aproximadamente un 69.5% sin inóculo y 60% con inóculo. Así también, se percibe que tales resultados también son mayores que aquellos obtenidos por la fermentación ácido-láctica de desechos de camarón. Lo que es de esperarse debido a las diferencias de composición en las estructuras de ambos tipos de material.

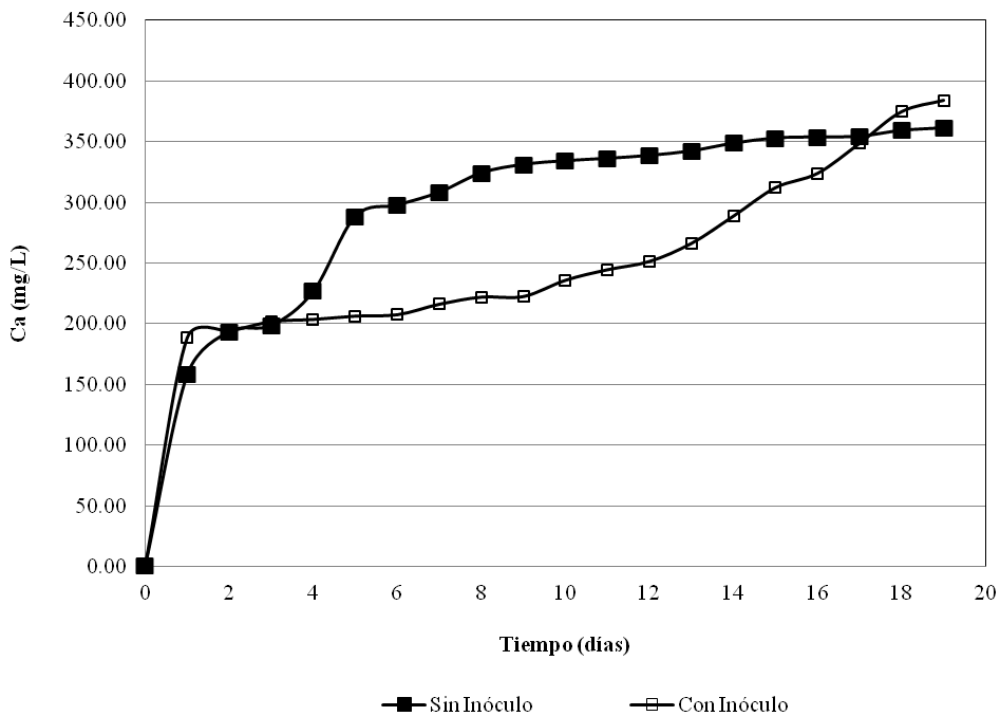


Figura 5.11 Concentraciones de calcio durante fermentación de 3 semanas para langostino sin inóculo y con inóculo.

5.3.3 Desproteínización: Combinación con tratamiento químico

Al igual que en el caso del caparazón de camarón, se tuvo la necesidad del uso de tratamiento químico para la eliminación de remanentes de pigmentación y proteínas presente en el caparazón de langostino (ver Figura 5.12a). Sin embargo, esto no fue suficiente ya que todavía persistía un color rosado en el material y además, éste no tenía la suavidad característica de la quitina.



(a)



(b)

Figura 5.12 Quitina producida (a) después del período de fermentación de caparazón de langostino y (b) posterior al tratamiento con NaOH al 10% y NaClO al 0.76 %.

5.4 Comparación por Análisis Espectral IR

Para evaluar cualitativamente la calidad del material producido, éste se comparó, vía análisis espectral, con una muestra de quitina obtenida por el método químico (Escorcía *et al.*, 2009) y con una muestra proporcionada por Jining Green Group Co. Ltd, Shandong, China.

5.4.1 Espectros IR de Análisis para Caparazón de Camarón

El espectro FTIR de la quitina (ver Figura 5.13) exhibe una banda intensa y ancha a 3500 cm^{-1} asociada al grupo OH y presenta una absorción en la región de 1730 cm^{-1} relacionada a la vibración de tensión del enlace C=O. Además se observan fuertes bandas de absorción a 2900 y 1450 cm^{-1} que corresponden a las vibraciones de tensión y deformación del enlace C-H y una banda a 1650 cm^{-1} asociada con la amida. Esta banda muestra dos picos: uno que se atribuye al enlace de hidrógeno intermoleculares $\text{CO}\cdots\text{HN}$ a 1660 cm^{-1} y otro debido al enlace de hidrógeno intramolecular $\text{CO}\cdots\text{HOCH}_2$ a 1625 cm^{-1} . Esta banda característica es usada para distinguir entre α -quitina y la β -quitina, ya que en el caso de la β -quitina una sola banda puede ser observada a 1656 cm^{-1} .

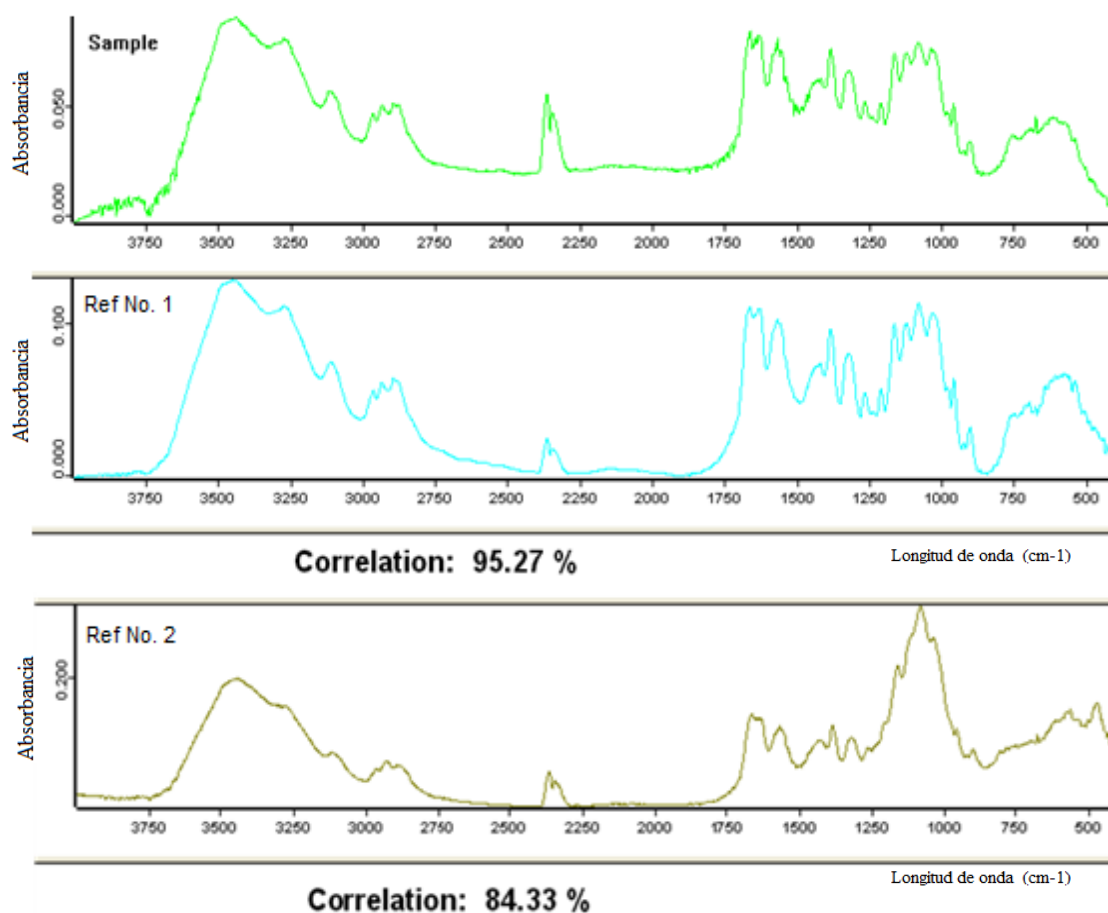


Figura 5.13 Correlación de Espectros IR de quitina de camarón con un tiempo de fermentación de dos semanas sin inóculo (Sample) vs quitina vía química (Ref No. 1) y quitina comercial (Ref No. 2).

5.4.1.1 Experimentaciones sin Inóculo

La comparación del espectro infrarrojo de la quitina obtenida en un período de fermentación ácido-láctica de dos semanas sin inóculo con los dos tipos de quitina usadas como referencia, reflejan un porcentaje de coeficiente de correlación del 95.27 % con la quitina obtenida vía química y del 84.33 % con respecto a la quitina comercial (Figura 5.13). La figura muestra que los espectros FTIR de los materiales son muy parecidos en lo que respecta a la posición de las bandas de los principales grupos de la quitina; sin embargo, la quitina producida por el procedimiento microbiológico-químico combinado presenta una baja correlación con respecto a la quitina comercial.

Por su parte, la quitina producida en período de fermentación ácido-láctica de tres semanas presenta un porcentaje de coeficiente de correlación del 95.92 % con la quitina obtenida vía química y del 89.80 % con respecto a la quitina comercial (Figura 5.14), el cual es un porcentaje mayor que el obtenido con la quitina producida en un tiempo de dos semanas. Esto indica que el tiempo de fermentación puede influir en la calidad de la quitina producida al utilizar el procedimiento microbiológico-químico combinado.

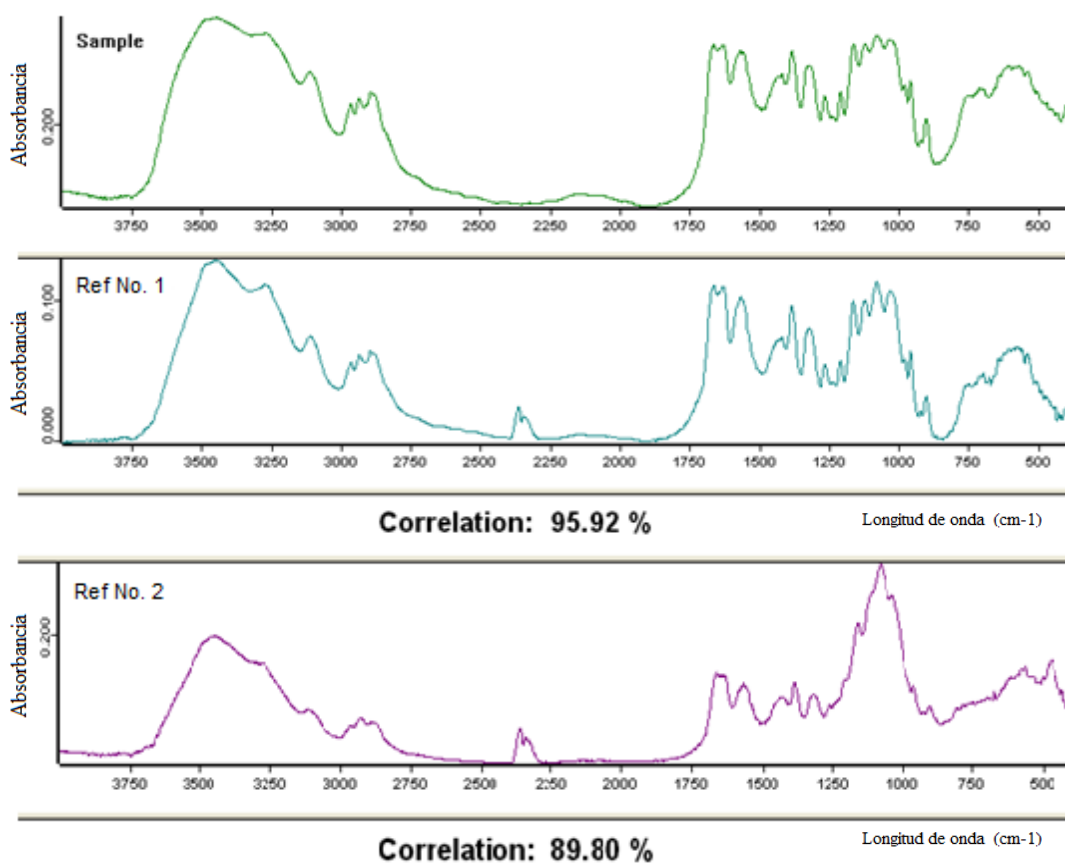


Figura 5.14 Correlación de Espectros IR de quitina de camarón con un tiempo de fermentación de tres semanas sin inóculo (Sample) vs quitina vía química (Ref No. 1) y quitina comercial (Ref No. 2).

5.4.1.2 Experimentaciones con Inóculo

La Figura 5.15 muestra que la comparación del espectro infrarrojo de la quitina obtenida en un período de fermentación ácido-láctica de dos semanas con inóculo reflejan un porcentaje de coeficiente de correlación del 95.24 % con la quitina obtenida vía química y del 90.84 % con respecto a la quitina comercial. Esto indica que el uso del inóculo mejora grandemente la calidad de la quitina ya que permite un mayor incremento de la acidez y por lo tanto, una mayor remoción de calcio del material.

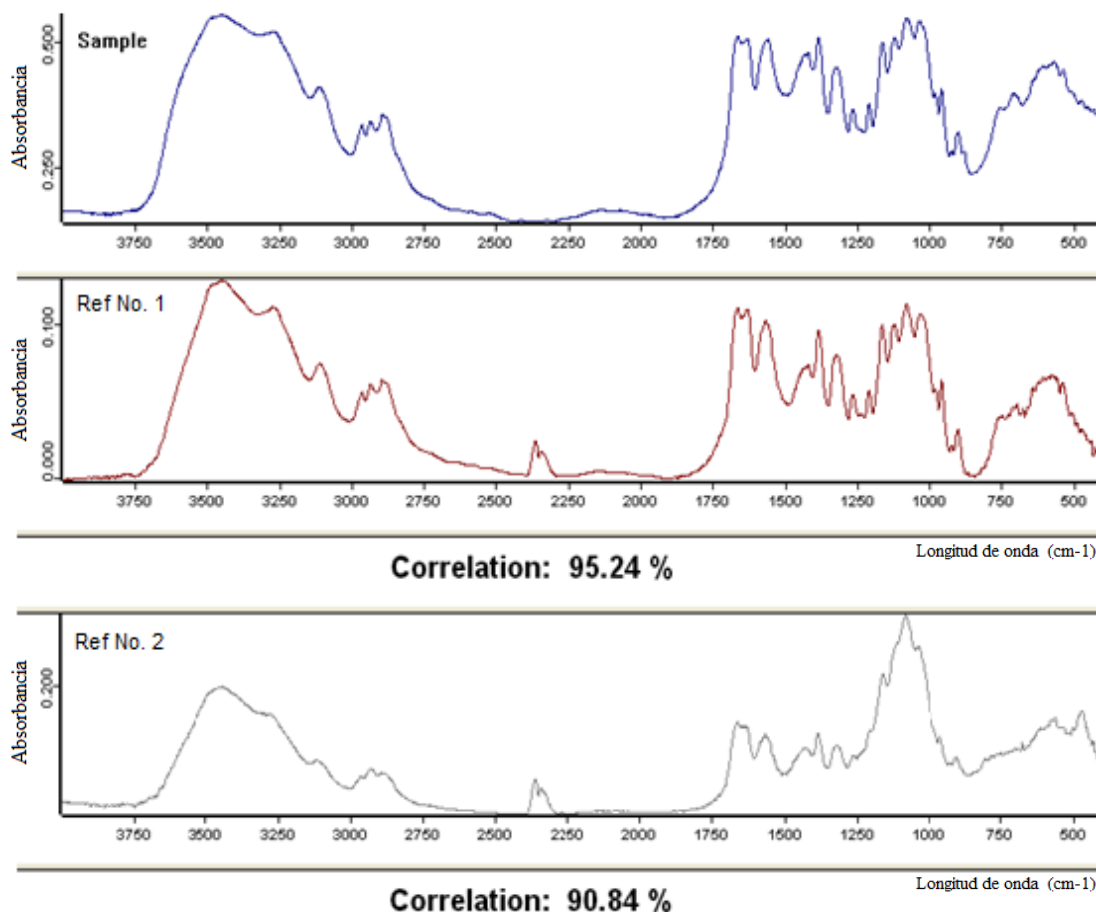


Figura 5.15 Correlación de Espectros IR de quitina de camarón con un tiempo de fermentación de dos semanas con inóculo (Sample) vs quitina vía química (Ref No. 1) y quitina comercial (Ref No. 2).

Por su parte, al comparar la quitina producida en un período de fermentación ácido-láctica de tres semanas con inóculo muestra que el porcentaje de coeficiente de correlación con la quitina obtenida vía química incremento hasta el 98.64 % y con respecto a la quitina comercial incremento hasta el 92.2 % (ver Figura 5.16), indicando nuevamente que el tiempo de fermentación influye en la calidad de la quitina producida ya que permite una mayor solubilización de las sales calcio contenidas en los desechos de camarón.

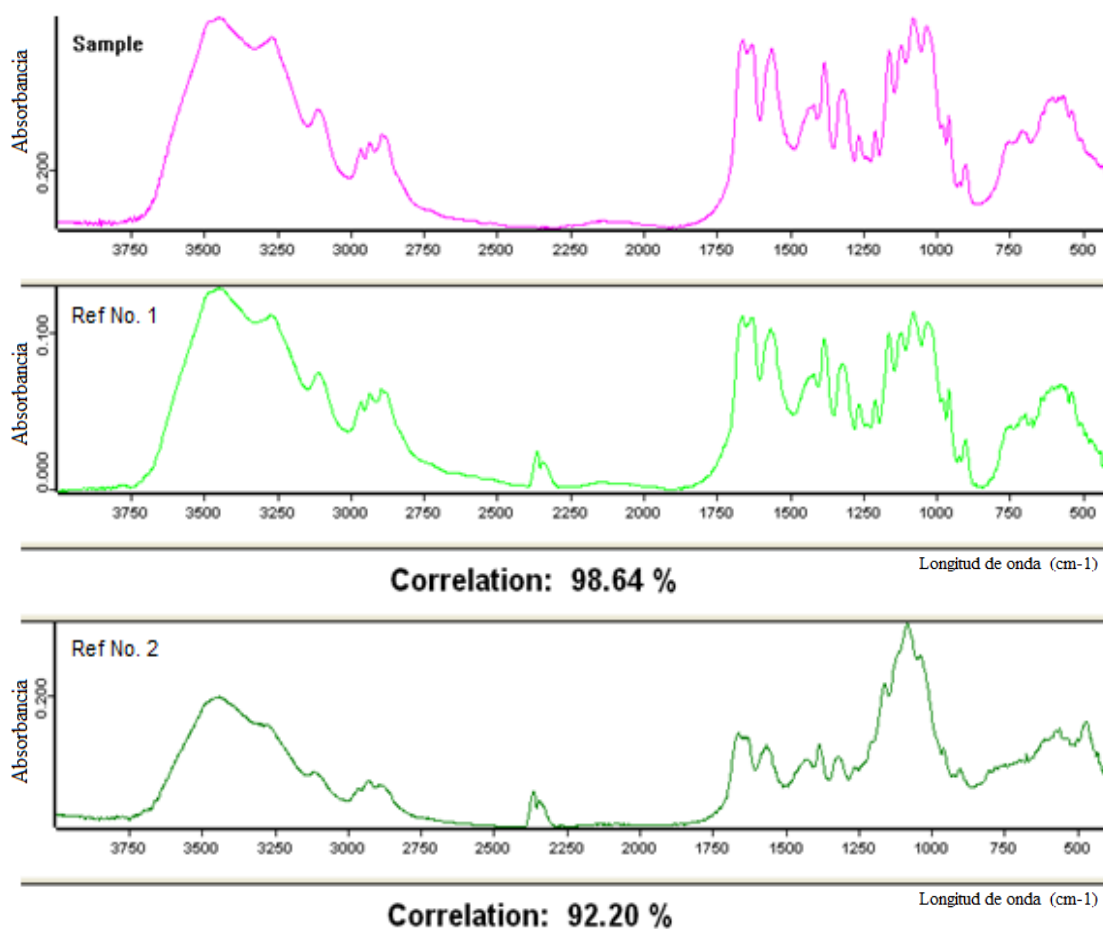


Figura 5.16 Correlación de Espectros IR de quitina de camarón con un tiempo de fermentación de tres semanas con inóculo (Sample) vs quitina vía química (Ref No. 1) y quitina comercial (Ref No. 2).

5.4.2 Espectros de Análisis para Caparazón de Langostino

5.4.2.1 Experimentaciones sin Inóculo

La Figura 5.17 muestra la comparación del espectro infrarrojo de la quitina obtenida de caparazón de langostino en un período de fermentación de dos semanas sin inóculo, reflejando un porcentaje de coeficiente de correlación del 99.23 % con la quitina obtenida vía química y del 95.30 % con respecto a la quitina comercial. Esto indica una buena correlación del material producido posiblemente debido a la buena remoción de calcio del producto.

Por su parte, en la Figura 5.18 se puede observar que la comparación del espectro infrarrojo de la quitina obtenida de caparazón de langostino en un período de fermentación de tres semanas sin inóculo es ligeramente menor con la quitina obtenida vía química (98.32%) y ligeramente mayor con la quitina comercial (96.35%), indicando que el tiempo de fermentación no influye significativamente en la mejora de la calidad de la quitina producida usando el procedimiento microbiológico-químico combinado.

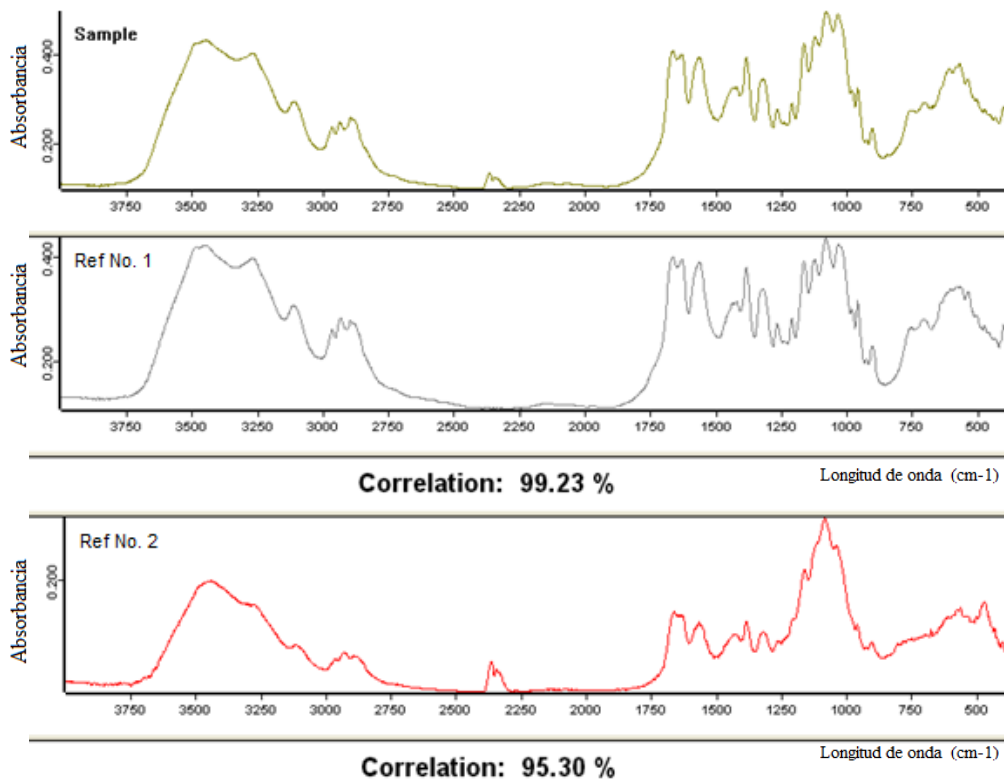


Figura 5.17 Correlación de Espectros IR de quitina de langostino en dos semanas sin inóculo (Sample) vs quitina vía química (Ref No. 1) y quitina comercial (Ref No. 2).

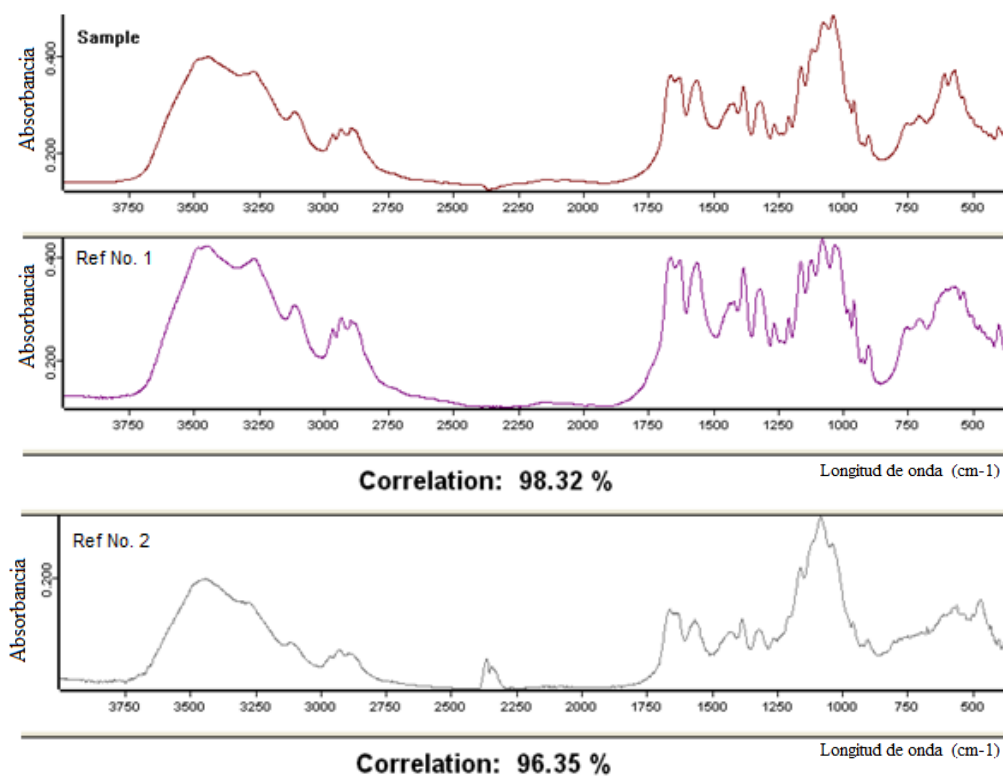


Figura 5.18 Correlación de Espectros quitina de langostino en tres semanas sin inóculo (Sample) vs quitina vía química (Ref No. 1) y quitina comercial (Ref No. 2).

5.4.2.2 Experimentaciones con Inóculo

La comparación del espectro infrarrojo de la quitina obtenida a partir de langostino en un período de fermentación de dos semanas con inóculo, reflejan un porcentaje de coeficiente de correlación del 99.23 % con la quitina obtenida vía química y del 93.31 % con respecto a la quitina comercial (Figura 5.19). Comparando estos resultados con la muestra sin inóculo, se observa que no hay diferencia significativa entre los resultados, lo cual indica que la presencia del inóculo no influye en la calidad de la quitina producida.

Por su parte, la quitina producida en período de fermentación ácido-láctica de tres semanas presenta un porcentaje de coeficiente de correlación del 99.35 % con la quitina obtenida vía química y del 94.11 % con respecto a la quitina comercial (Figura 5.14), indicando que el tiempo de fermentación influye muy poco en la calidad de la quitina producida. Al comparar estos resultados con la muestra sin inóculo, se observa que el porcentaje de coeficiente de correlación con la quitina obtenida vía química incremento hasta el 99.35 %, pero disminuyó con respecto a la quitina comercial ya que fue de 94.11 % (ver Figura 5.20), indicando nuevamente que la presencia del inóculo no influye en la calidad de la quitina producida, cuando se trabaja con desechos de langostino.

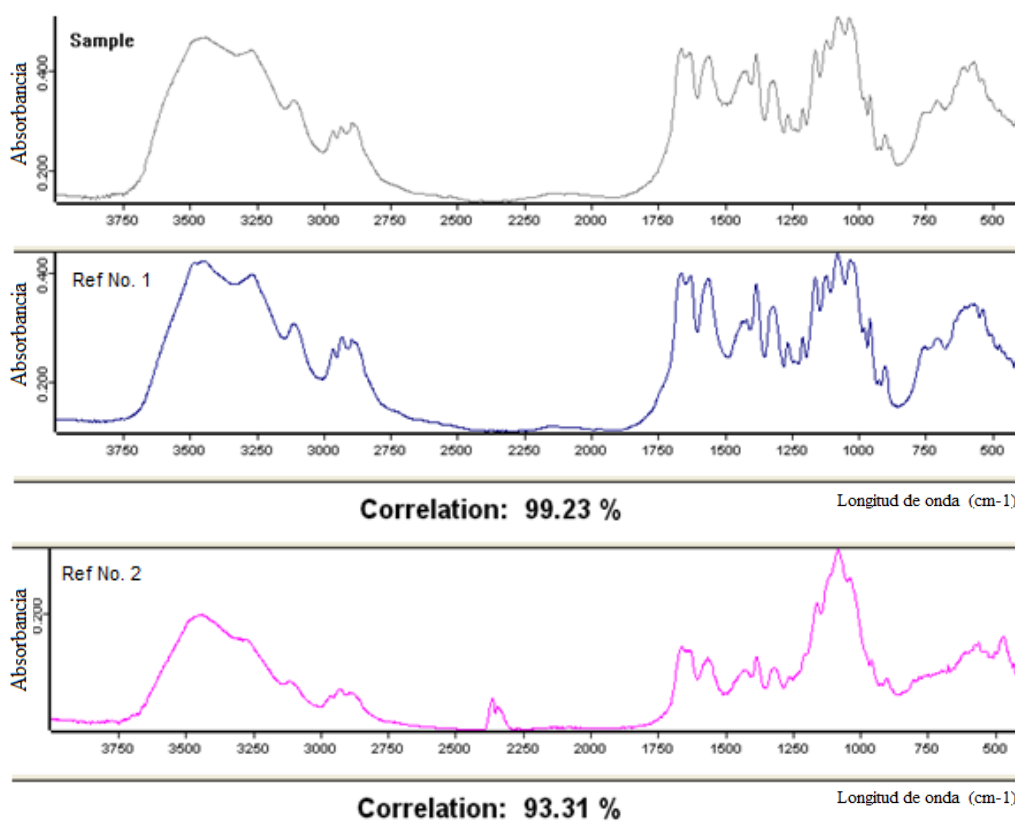


Figura 5.19 Correlación de Espectros IR de quitina de langostino en un período de fermentación de dos semanas con inóculo (Sample) vs quitina vía química (Ref No. 1) y quitina comercial (Ref No. 2).

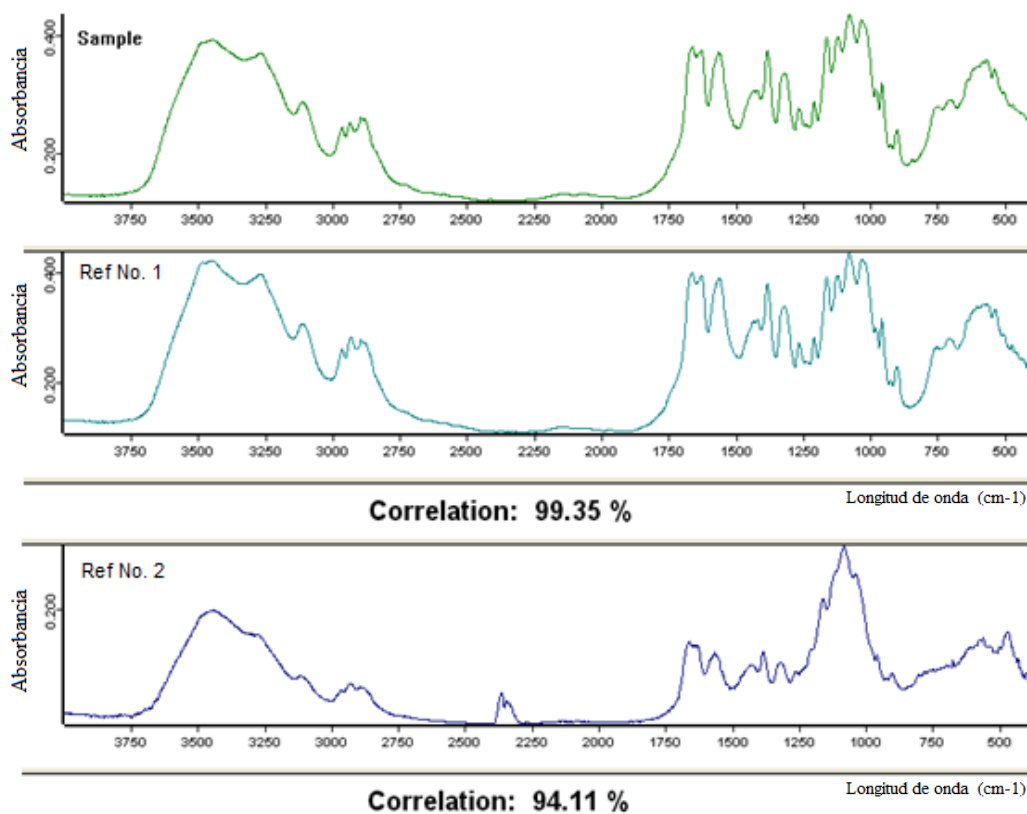


Figura 5.20 Correlación de Espectros IR de quitina a partir de langostino en un período de fermentación de tres semanas con inóculo vs quitina vía química (Sample) vs quitina vía química (Ref No. 1) y quitina comercial (Ref No. 2).

VI. CONCLUSIONES

El suero lácteo, rico en bacterias lácticas, resultó ser un buen sustrato para la fermentación con la adición de azúcar de caña a un 10%, permitió la recuperación de subproductos y la conservación de desechos, así como el desarrollo bacteriano idóneo alcanzando niveles poblacionales de 114.5×10^5 ufc (corridas sin inoculación previa) a 66.5×10^7 ufc, cuya interacción con el medio y el material generó hallazgos significativos. Así también se logró reducir el uso de reactivos para la purificación del producto, logrando así un proceso más amigable al medio ambiente.

El tiempo de fermentación establecido en 3 semanas logró en general mejores resultados al permitir mayores incrementos de acidez y por tanto mayor remoción de calcio que logra solubilizarse en el sustrato, comparativos de correlación con la muestra comercial apoyaron esto al brindar aproximaciones de 90%. Particularmente las corridas de material de langostino no son influenciadas grandemente por los tiempos de fermentación e inoculación al mantener constante la calidad de la quitina obtenida. Por otra parte la opción de inóculo permite obtener resultados similares en dos semanas en especial para el material de langostino, por lo que esto la convierte en la primera opción experimental con las pruebas futuras en material de las diferentes especies de crustáceos.

Los cambios en las variables de medición establecieron un patrón de comportamiento para las fermentaciones por lo que la determinación de pH, acidez total titulable y concentración de iones calcio reflejaron la interacción de las bacterias ácido lácticas con el medio de cultivo preparado (suero lácteo y sacarosa) y el material de desecho de crustáceo. Los valores más bajos de pH logrados son aproximados a 3.4 con inoculación sobre material de camarón y 3.7 para material de langostino, así también la acidez sufre cambios considerables en dependencia a la interacción que tuvieron las bacterias con el medio por lo que los tiempos de fermentación de 3 semanas permitieron una mayor productividad de acidez con el apoyo de inoculación con cantidades aproximadas a los 3.6 % en langostino y 4.32 % en camarón. La solubilidad de los iones calcio también es influenciada por la cantidad de metabolito (ácido láctico) producido por las bacterias, además de la previa inoculación que brindaron la concentraciones más altas aproximándose a los 13.8 g/l para caparazón de camarón y 384 g/l para material de langostino el cual se destaca por su dureza. Por tanto, estos datos representan los valores óptimos de trabajo para obtener los mejores resultados en el proceso biológico.

A pesar de extenderse tiempos de fermentación, persiste restos de proteínas y pigmentos en ambos materiales por lo que es necesario el apoyo con tratamiento químico que permiten obtener las características particulares de la quitina, removiendo pigmentos con concentraciones de NaClO entre 0.38% a 0.76% y apoyar la desproteínización con la adición de NaOH con concentraciones de 5% a 10%.

Los análisis espectrales revelaron la calidad de quitina producida, los materiales en general mantienen semejanzas cualitativas en las bandas de los grupos característicos de la quitina apoyado por el espectro que presentan los más bajos valores de correlación por encima del 84%. Particularmente la producción de quitina con desechos de camarón recibió gran influencia del inóculo y el tiempo extendido de fermentación para lograr valores

correlación por encima de los 95% vía química de camarón y un 90% con la muestra comercial. Por otra parte la calidad de producción con desecho de langostino tiene poca influencia de ambos factores, los porcentajes de correlación se mantienen por encima de 98% para la vía química de desecho de langostino y 94% con la muestra comercial. Este decente desempeño establece la potencialidad que tiene el proceso en especial para el langostino, que posee los mayores retos en el tratamiento químico.

VII. RECOMENDACIONES

Para futuros trabajos se deben tomar ciertas consideraciones:

- La modificación de otras variables pueden beneficiar el proceso, además de favorecer el mejor control de desarrollo de las experimentaciones como es el caso con temperatura, control de oxígeno, volumen del medio extractivo (suero lácteo), sentido del reactor usando una posición horizontal en vez de vertical, agitación continua.
- Realizar nuevas pruebas con las cantidades de reactivos requeridos para el tratamiento químico que apoya la purificación, así como cambios en las concentraciones usadas, ya que el método biológico por si mismo logra liberar casi en su totalidad los compuestos presentes en el desecho.
- Estos datos pueden servir de guía productiva para escalar un diseño y establecer el verdadero aporte medio ambiental que tendría, por tanto deberán analizarse las ventajas y desventajas que implica una puesta en marcha de una planta enfocada en el proceso productivo y sistemas de tratamiento de desechos.
- Se debe tener en cuenta que aun existen otros compuestos presentes en el suero que pueden ser medibles como son los pigmentos caratenoides y proteínas, los cuales pueden establecerse como medición en un nuevo diseño experimental y establecer pautas para una valoración técnica de su recuperación para posibles usos.
- Realizar nuevas pruebas con inóculos de mayor especificidad y pureza para comparar resultados y posibles mejoras al proceso.
- Brindar un enfoque sobre pruebas de 2 semanas con inoculación que tienen la posibilidad de realizar hallazgos semejantes a los tiempos de fermentación de 3 semanas con el fin de acortar la duración batch del proceso.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Beaney, P., J. Lizardi-Mendoza, M. Healy. 2005. Comparison of chitins produced by chemical and bioprocessing methods. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 80. pp. 145-50
- Callon, C., L. Millet, M.C. Montel. 2004. Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. *Journal of Dairy Research*, 71. pp. 231-44
- Carvalho, T., V. Nogueira, G. Melo, P. Pinheiro, A. Craveiro, V.M. Melo. 2009. Bioprocessing of crustacean shell waste to recovery chitin, proteins and pigments. 9th. International Conference of the European Chitin Society, Venice, Italy, *Advances in Chitin Science*.
- Cira, L.A., S. Huerta, G.M. Hall, K. Shirai. 2002. Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemistry*, 37. pp. 1359-66
- Domingues, L., N. Lima, J.A. Teixeira. 2001. Alcohol production from cheese whey permeate using genetic modified flocculating yeasts cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 72. pp. 507-14
- Escorcía, D., D. Hernández, M. Sánchez, M. Benavente. 2009. Diseño y montaje de una planta piloto para la extracción de quitina y proteínas. *Nexo*, 22. pp. 45-55
- Fagbenro, O.A. 1996. Preparation, properties and preservation of lactic acid fermented shrimp heads. *Food Research International*, 29. pp. 595-99
- Foo, E.L., H.G. Griffin, R. Mollby, C.G. Hedén. 1993. *The Lactic Acid Bacteria*. Horizon Scientific Press, United Kingdom. pp. 89-91
- García, M., R. Quintero, A. López-Munguía. 1993. *Biotecnología Alimentaria*. Editorial Limusa. ISBN 968-18-4522-6. pp. 196-204, 568
- García, T., J. Roca Ortega. 2008. Industrialización de los crustáceos para la obtención de Quitosano en ungüento con efecto cicatrizante. *Revista de la Facultad de Ingeniería Industrial*, 11. pp. 24-32
- Gerente, C., V.K.C. Lee, P.L. Cloirec, G. McKay. 2007. Application of Chitosan for the Removal of Metals From Wastewaters by Adsorption—Mechanisms and Models Review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 37. pp. 41-127
- Hall, G.M., S. Silva, Eds. (1992). Lactica acid fermentation of shrimp (*Penaeus monodon*) waste for chitin recovery. In: Brine CJ, Sandford PA, Zikakis JP (eds) *Advance in chitin and chitosan*. Elsevier Applied Science, London. Vol: 633-68.

- Hirano, S. 1989. Production and applications of chitin and chitosan in Japan. 4th Conference on chitin and chitosan, Trondheim, Noruega, Anthosen, T. y Standford, eds.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, S.T. Williams (1998). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*: 528-66.
- Jung, W.-J., G.-H. Jo, J.-H. Kuk, K.-Y. Kim, R.-D. Park. 2005. Demineralization of crab shells by chemical and biological treatments. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 10. pp. 67-72
- Jung, W., G. Jo, J. Kuk, K. Kim, R. Park. 2007. Production of chitin from red crab shell waste by successive fermentation with *Lactobacillus paracasei* KCTC-3074 and *Serratia marcescens* FS-3. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71. pp. 234-37
- Khanafari, A., A. Saberi, M. Azar, G. Vosooghi, S. Jamili, B. Sabbaghzadh. 2007. Extraction of astaxanthin esters from shrimp waste by chemical and microbial methods. *Iran Journal Environment Health Science Engineering*, 4. pp. 93-98
- Knorr, D. 1984. Use of chitinous polymers in foods. *Food Technology*, 38. pp. 85-97
- Lederberg, J., Ed. (1992). *Encyklopedia of Microbiology*. The Rockefeller University, New York, 2nd edition, Vol: 3, 1-17.
- Meraz, M., K. Shirai, P. Larralde, S. Revah. 1992. Studies of the bacterial acidification process of Cassava (*Manihot esculenta*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60. pp. 457-63
- Morishita, T., Y. Deguchi, M. Yahima, T. Sakuri, T. Yura. 1981. Multiple nutritional requirements of lactobacilli: genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways. *Journal of Bacteriology*, 148. pp. 64-71
- Moulin, G., P. Galzy. 1984. Whay, a potential substrate for biotechnology. *Biochotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 1. pp. 347-73
- Pastor de Abram, A., Ed. (2004). *Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones*. Aplicaciones en Alimentación y Control Ambiental. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima, Perú, Primera Edición, Vol: 26, 120.
- Peniche, C. 2006. Estudios sobre quitina y quitosana. Tesis Doctoral, Universidad de la Habana, La Habana.

- Rao, M.S., J.P. Guyot, J. Pintado, W.F. Stevens, Eds. (2002). Improved conditions for lactobacillus fermentation of shrimp waste into chitin. In: Scchiva K, Chandrkrachang S, Methacanon P, Peter MG (eds) Advance in chitin science, vol V. Bangkok, Thailand. Vol: 40-44.
- Rao, M.S., J. Muñoz, W.F. Stevens. 2000. Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste. Applied Microbiology and Biotechnology, 54. pp. 808-13
- Sandford, P.A., G.P. Hutchings. 1989. Chitosan -A natural, cationic biopolymer- Commercial applications. . Journal of Aquatic Food Product Technology, 4. pp.
- Serna Cock, L., A. Rodríguez. 2005. Producción biotecnológica de ácido láctico: Estado del arte. Ciencia y Tecnología Alimentaria, 5. pp. 54-65
- Setyahadi, S. 2007. Screening of lactic acid bacteria for the purpose of chitin recovery processing. Microbiology Indonesia, 1. pp. 48-50
- Shimahara, K., T. Yasuyuki, O. Kazuhiro, K. Kazunori, O. Osamu, Eds. (1984). Chemical composition and some properties of crustacean chitin prepared by use of proteolytic activity of *Pseudomonas maltophilia* LC102. In: Zikakis JP (ed) Chitin, chitosan and related enzymes. Academic, Orlando, FL. Vol: 239-55.
- Shirai, K., I. Guerrero, S. Huerta, G. Saucedo, A. Castillo, R. Obdulia Gonzalez, G.M. Hall. 2001. Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation. Enzyme and Microbial Technology, 28. pp. 446-52
- Souza, C.G., W.M. Ledingham, M.A. Morais. 2001. Utilization of cheese whey as an alternative growth medium for recombinant strains of *Kluyveromyces marxianus*. Biochtechnol. Lett, 23. pp. 1413-16
- Synowiecki, J., N.A. Al-Khateeb. 2003. Production, Properties, and Some New Applications of Chitin and Its Derivatives. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 43. pp. 145-71
- Trujillo, M., F. Suárez, D. Gallego. 1998. "Fermentación Láctica en continuo a partir de Suero Dulce de Leche Desproteinizado." Revista Colombiana de Biotecnología 1 (1), 45-50, (ed.).
- Wang, S.L., S.H. Chio. 1998. Deproteinization of shrimp and crab shell with the protease of *Pseudomonas aeruginosa* K-187. Enzyme and Microbial Technology, 22. pp. 629-33

Xu, Y., C. Gallert, J. Winter. 2008. Chitin Purification from Shrimp Wastes by Microbial Deproteination and Decalcification. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 79. pp. 687-97

Yang, J.K., I.L. Shih, Y.M. Tzeng, S.L. Wang. 2000. Production and purification of protease from *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, 26. pp. 406-13

Zakaria, Z., G.M. Hall, G. Shama. 1998. Lactic acid fermentation of scampi waste in a rotating horizontal bioreactor for chitin recovery. *Process Biochemistry*, 33. pp. 1-6

Salminen, A. Wright, A. Ouwehand. 2004. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, Third Edition; Revised and Expanded.

Páginas WEB

Biolcchn 2012: Fermentaciones. En línea, En: <http://biolcchn.wikispaces.com/Fermentaciones> [Consultado: Noviembre 2012]

Botanical-online 2010: Los Crustáceos. En línea, En: http://www.botanical-online.com/animales/crustaceos_caracteristicas.htm [Consultado: Junio 2010]

Monografias: Crecimiento bacteriano. En línea, En: <http://www.monografias.com/trabajos27/crecimiento-bacteriano/crecimiento-bacteriano.shtml> [Consultado: Junio 2010]

Wikipedia 2010a: Sacarosa. En línea, En: <http://es.wikipedia.org/wiki/Sacarosa> [Consultado: Junio 2010]

Wikipedia 2010b: Ácido láctico. En línea, En: http://es.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido_1%C3%A1ctico [Consultado: Junio 2010]

Wikipedia 2010c: Calcium lactate. En línea, En: http://en.wikipedia.org/wiki/Calcium_lactate [Consultado: Junio 2010]

APÉNDICE

A.1. Diagrama de bloques del proceso de obtención de quitina por fermentación láctica

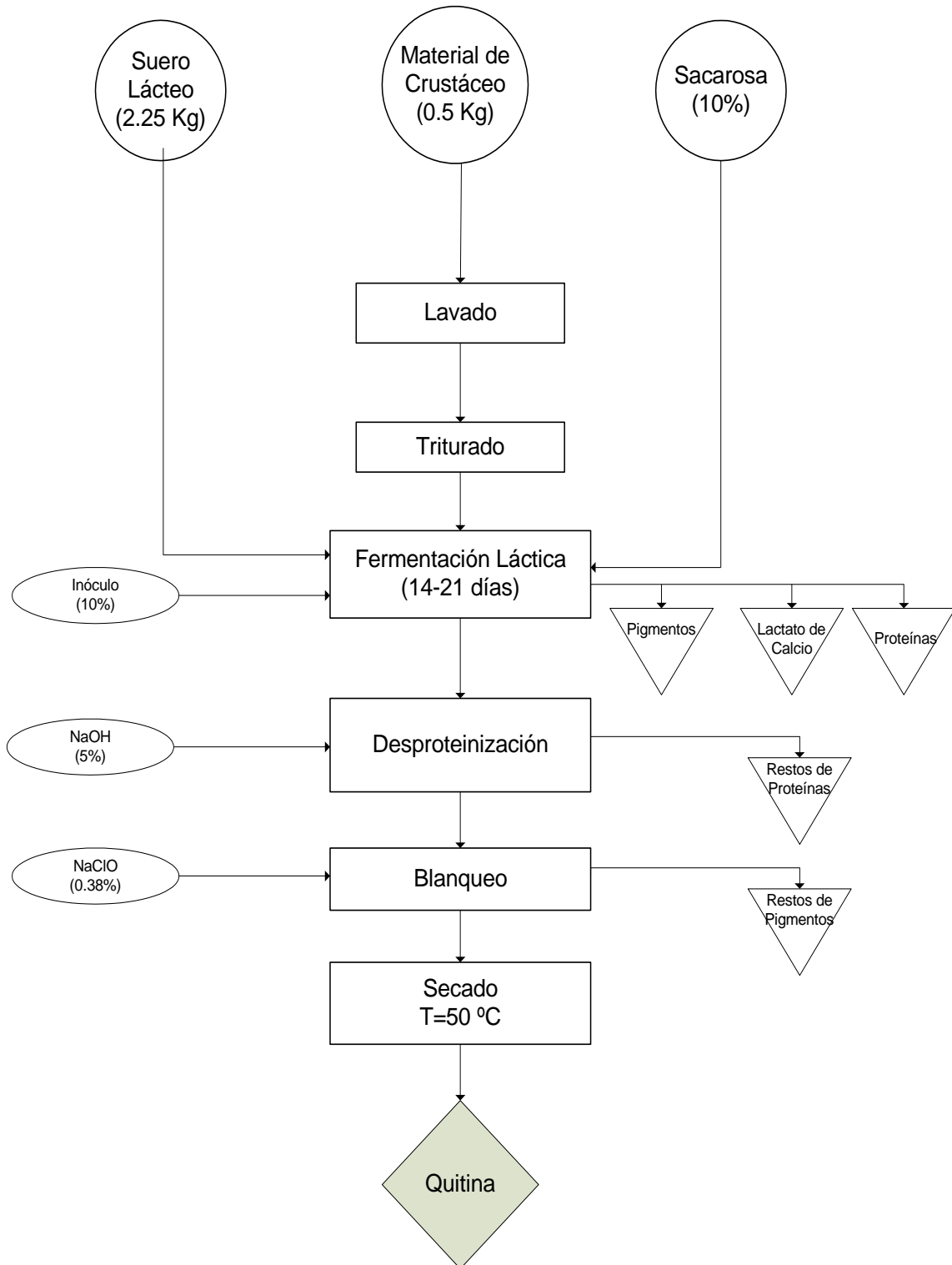


Figura A.1. Diagrama de bloque del proceso de obtención de quitina por fermentación láctica

A.2 Tabla de Variables del Diseño Experimental del Proceso de Fermentación Láctica**Tabla A.2.1** Variables Independientes del Diseño Experimental

No.	Material	Inóculo	Tiempo (semanas)
1	Langostino	Con_Inóculo	2
2	Langostino	Sin_Inóculo	2
3	Langostino	Con_Inóculo	3
4	Camarón	Sin_Inóculo	2
5	Langostino	Sin_Inóculo	2
6	Camarón	Con_Inóculo	3
7	Camarón	Con_Inóculo	2
8	Camarón	Con_Inóculo	2
9	Langostino	Con_Inóculo	2
10	Langostino	Con_Inóculo	3
11	Camarón	Con_Inóculo	3
12	Langostino	Sin_Inóculo	3
13	Langostino	Sin_Inóculo	3
14	Camarón	Sin_Inóculo	3
15	Camarón	Sin_Inóculo	2
16	Camarón	Sin_Inóculo	3

A.3 Resultados del Proceso de Fermentación Láctica con Desechos de Caparazón de camarón

Tabla A3.1 Proceso de Fermentación láctica con desechos de camarón en un tiempo de dos semanas, sin inóculo

No. Muestra	pH	Vol. NaOH (mL)	ATT (%)	Ca (g/L)
0	6.016	0.200	0.180	1.40
1	5.171	0.400	0.360	7.52
2	4.855	0.600	0.540	7.82
3	4.806	0.800	0.720	8.52
4	4.778	0.900	0.810	8.57
5	4.750	1.200	1.080	8.61
6	4.713	1.400	1.260	8.65
7	4.373	1.900	1.710	9.05
8	4.005	2.200	1.980	9.45
9	3.878	2.400	2.160	9.03
10	3.834	2.500	2.250	9.56
11	3.739	2.600	2.340	9.53
12	3.679	2.700	2.430	9.69

Tabla A3.2 Replica de los resultados del Proceso de Fermentación láctica con desechos de camarón en un tiempo de dos semanas, sin inóculo

No. Muestra	pH	Vol. NaOH (mL)	ATT (%)	Ca (g/L)
0	5.927	0.200	0.180	1.27
1	5.576	0.300	0.270	6.78
2	4.973	0.700	0.630	7.55
3	4.862	0.800	0.720	7.72
4	4.831	1.200	1.080	7.86
5	4.725	1.300	1.170	7.87
6	4.658	1.500	1.350	8.06
7	4.386	1.800	1.620	8.34
8	4.111	1.900	1.710	8.37
9	3.932	2.100	1.890	8.38
10	3.824	2.500	2.250	8.39
11	3.779	2.500	2.250	8.45
12	3.741	2.700	2.430	9.31

Tabla A3.3 Proceso de Fermentación láctica con desechos de camarón en un tiempo de dos semanas, con inóculo.

No. Muestra	pH	Vol. NaOH (mL)	ATT (%)	Ca (g/L)
0	5.230	0.30	0.270	0.95
1	4.760	0.50	0.450	5.69
2	4.653	0.70	0.630	7.50
3	4.225	1.30	1.170	7.95
4	4.174	1.70	1.530	9.89
5	4.130	2.20	1.980	10.78
6	3.934	2.30	2.070	11.26
7	3.829	2.40	2.160	11.08
8	3.825	2.50	2.250	11.03
9	3.772	2.70	2.430	11.28
10	3.742	3.00	2.700	10.94
11	3.729	3.00	2.700	11.32
12	3.731	3.10	2.790	11.43

Tabla A3.4 Replica de los resultados del Proceso de Fermentación láctica con desechos de camarón en un tiempo de dos semanas, con inóculo

No. Muestra	pH	Vol. NaOH (mL)	ATT (%)	Ca (g/L)
0	5.983	0.40	0.360	0.97
1	4.436	0.70	0.630	7.42
2	4.537	0.90	0.810	8.33
3	4.349	1.20	1.080	9.25
4	4.013	1.80	1.620	10.04
5	3.966	1.90	1.710	11.00
6	3.795	2.30	2.070	11.01
7	3.754	2.50	2.250	11.36
8	3.643	2.50	2.250	11.68
9	3.624	2.60	2.340	11.83
10	3.657	2.80	2.520	11.89
11	3.623	3.00	2.700	12.07
12	3.602	3.00	2.700	12.81

Tabla A3.5 Proceso de Fermentación láctica con desechos de camarón en un tiempo de tres semanas, sin inóculo

No. Muestra	pH	Vol. NaOH (mL)	ATT (%)	Ca (g/L)
0	5.430	0.050	0.045	1.16
1	5.144	0.400	0.360	6.04
2	5.051	0.700	0.630	6.94
3	4.965	0.800	0.720	7.94
4	4.940	0.900	0.810	8.29
5	4.753	1.000	0.900	8.92
6	4.698	1.300	1.170	8.98
7	4.605	1.400	1.260	9.00
8	4.426	1.600	1.440	9.03
9	4.308	2.000	1.800	9.17
10	4.261	2.100	1.890	9.40
11	4.213	2.200	1.980	9.37
12	4.139	2.600	2.340	9.33
13	4.072	2.700	2.430	9.17
14	3.998	2.800	2.520	9.42
15	3.933	2.900	2.610	9.77
16	3.910	3.200	2.880	10.12
17	3.880	3.300	2.970	10.06
18	3.881	3.300	2.970	10.21
19	3.878	3.300	2.970	10.28

Tabla A3.6 Replica de los resultados del Proceso de Fermentación láctica con desechos de camarón en un tiempo de tres semanas, sin inóculo

No. Muestra	pH	Vol. NaOH (mL)	ATT (%)	Ca (g/L)
0	5.750	0.100	0.090	1.96
1	4.983	0.700	0.630	7.12
2	4.759	0.900	0.810	8.43
3	4.703	1.000	0.900	8.97
4	4.630	1.200	1.080	9.20
5	4.567	1.300	1.170	9.27
6	4.554	1.400	1.260	10.33
7	4.653	1.600	1.440	10.39
8	4.592	1.700	1.530	10.45
9	4.258	1.900	1.710	10.85
10	4.150	2.000	1.800	11.01
11	4.082	2.100	1.890	11.13
12	3.901	2.600	2.340	11.26
13	3.862	2.700	2.430	11.36
14	3.849	2.700	2.430	11.48
15	3.808	2.800	2.520	11.69
16	3.794	2.900	2.610	12.13
17	3.762	3.200	2.880	12.28
18	3.735	3.400	3.060	12.82

Tabla A3.7 Proceso de Fermentación láctica con desechos de camarón en un tiempo de tres semanas, con inóculo.

No. Muestra	pH	Vol. NaOH (mL)	ATT (%)	Ca (g/L)
0	5.060	0.20	0.180	1.08
1	4.273	0.60	0.540	5.05
2	3.876	0.90	0.810	6.20
3	3.658	1.30	1.170	7.58
4	3.485	1.80	1.620	7.64
5	3.483	2.00	1.800	8.25
6	3.482	2.50	2.250	8.28
7	3.479	2.60	2.340	8.40
8	3.478	2.70	2.430	9.08
9	3.476	2.80	2.520	9.25
10	3.471	3.00	2.700	9.31
11	3.467	3.10	2.790	9.34
12	3.464	3.10	2.790	9.52
13	3.463	3.50	3.150	9.87
14	3.461	3.70	3.330	11.91
15	3.460	4.10	3.690	12.23
16	3.460	4.30	3.870	12.95
17	3.451	4.50	4.050	13.35
18	3.447	4.80	4.320	13.99
19	3.442	4.80	4.320	14.00

Tabla A3.8 Replica de los resultados del Proceso de Fermentación láctica con desechos de camarón en un tiempo de tres semanas, con inóculo.

No. Muestra	pH	Vol. NaOH (mL)	ATT (%)	Ca (g/L)
0	4.462	0.20	0.180	1.18
1	4.275	0.60	0.540	4.88
2	3.873	0.70	0.630	5.93
3	3.658	1.00	0.900	7.22
4	3.483	1.30	1.170	7.39
5	3.479	2.50	2.250	8.22
6	3.476	2.60	2.340	8.28
7	3.475	2.90	2.610	8.77
8	3.469	2.90	2.610	9.15
9	3.467	3.00	2.700	9.21
10	3.467	3.10	2.790	9.27
11	3.462	3.20	2.880	9.30
12	3.461	3.30	2.970	9.45
13	3.457	3.70	3.330	10.06
14	3.455	4.20	3.780	11.77
15	3.455	4.50	4.050	12.23
16	3.454	4.80	4.320	13.23
17	3.453	4.80	4.320	13.38
18	3.449	4.80	4.320	13.69
19	3.442	4.80	4.320	13.73

A.4 Resultados del Proceso de Fermentación Láctica con Desechos de Caparazón de Langostino

Tabla A.4.1 Proceso de Fermentación láctica con desechos de langostino en un tiempo de dos semanas, sin inóculo

No. Muestra	pH	Vol. NaOH (mL)	ATT (%)	Ca (g/L)
0	5.093	0.1	0.090	0.75
1	4.803	0.6	0.540	141.41
2	4.359	1.0	0.900	165.41
3	4.140	1.4	1.260	169.02
4	4.116	1.7	1.530	175.41
5	4.099	1.9	1.710	180.34
6	4.088	2.2	1.980	181.03
7	4.036	2.3	2.070	181.41
8	4.005	2.5	2.250	183.85
9	3.972	2.6	2.340	186.68
10	3.965	2.6	2.340	186.80
11	3.948	2.6	2.340	193.82
12	3.943	2.6	2.340	213.52

Tabla A.4.2 Proceso de Fermentación láctica con desechos de langostino en un tiempo de dos semanas, sin inóculo (Réplica)

No. Muestra	pH	Vol. NaOH (mL)	ATT (%)	Ca (g/L)
0	5.367	0.1	0.090	0.95
1	4.858	0.7	0.585	146.90
2	4.393	0.9	0.810	164.03
3	4.176	1.2	1.035	169.96
4	4.095	1.5	1.305	174.82
5	4.039	1.7	1.485	177.34
6	4.028	1.9	1.710	178.56
7	3.989	2.2	1.980	181.41
8	3.990	2.4	2.115	184.90
9	3.980	2.5	2.250	186.80
10	3.923	2.5	2.250	187.66
11	3.948	2.6	2.340	194.47
12	3.926	2.7	2.385	212.83

Tabla A.4.3 Proceso de Fermentación láctica con desechos de langostino en un tiempo de dos semanas, con inóculo.

No. Muestra	pH	Vol. NaOH (mL)	ATT (%)	Ca (g/L)
0	5.237	0.40	0.360	1.02
1	4.760	0.70	0.630	166.48
2	4.770	1.00	0.900	173.35
3	4.855	1.60	1.440	179.09
4	4.567	2.20	1.980	186.59
5	4.343	2.40	2.160	187.65
6	4.084	2.50	2.250	188.68
7	4.028	2.60	2.340	188.89
8	3.826	2.70	2.430	193.80
9	3.787	2.90	2.610	195.77
10	3.781	3.00	2.700	199.24
11	3.748	3.00	2.700	211.39
12	3.735	3.10	2.790	234.59

Tabla A.4.4 Proceso de Fermentación láctica con desechos de langostino en un tiempo de dos semanas, con inóculo (Réplica).

No. Muestra	pH	Vol. NaOH (mL)	ATT (%)	Ca (g/L)
0	5.983	0.40	0.360	0.95
1	5.132	0.80	0.720	164.60
2	4.765	1.30	1.170	177.17
3	4.582	1.80	1.620	182.86
4	4.265	2.20	1.980	184.63
5	4.181	2.40	2.160	185.30
6	4.014	2.60	2.340	186.97
7	3.931	2.80	2.520	190.08
8	3.852	2.90	2.610	191.07
9	3.819	3.00	2.700	195.97
10	3.815	3.10	2.790	200.11
11	3.813	3.10	2.790	206.66
12	3.793	3.20	2.880	246.30

Tabla A.4.5 Proceso de Fermentación láctica con desechos de langostino en un tiempo de tres semanas, sin inóculo.

No. Muestra	pH	Vol. NaOH (mL)	ATT (%)	Ca (g/L)
0	5.399	0.2	0.180	0.74
1	4.893	0.5	0.450	153.57
2	4.380	0.7	0.630	192.57
3	4.118	0.8	0.720	198.69
4	4.043	1.2	1.080	208.18
5	3.978	1.4	1.260	282.54
6	3.967	1.6	1.440	297.13
7	3.929	1.8	1.620	303.71
8	3.880	2.0	1.800	319.80
9	3.988	2.3	2.070	330.55
10	3.880	2.4	2.160	333.72
11	3.954	2.6	2.340	336.17
12	3.910	2.6	2.340	337.10
13	3.937	2.7	2.430	341.43
14	3.925	2.7	2.430	349.30
15	3.904	2.8	2.520	352.80
16	3.860	2.8	2.520	354.00
17	3.825	2.9	2.610	354.08
18	3.928	3.0	2.700	358.70
19	3.738	3.2	2.880	359.45

Tabla A.4.6 Proceso de Fermentación láctica con desechos de langostino en un tiempo de tres semanas, sin inóculo (Réplica).

No. Muestra	pH	Vol. NaOH (mL)	ATT (%)	Ca (g/L)
0	5.641	0.1	0.090	0.81
1	4.913	0.7	0.630	162.10
2	4.427	0.8	0.720	194.10
3	4.211	0.9	0.810	198.14
4	4.073	1.2	1.080	245.01
5	3.975	1.4	1.260	293.97
6	3.948	1.6	1.440	298.16
7	3.942	2.1	1.890	312.65
8	3.926	2.2	1.980	328.38
9	3.922	2.4	2.160	331.48
10	3.918	2.4	2.160	334.43
11	3.912	2.6	2.340	335.86
12	3.908	2.7	2.430	339.81
13	3.901	2.8	2.520	342.90
14	3.892	2.8	2.520	347.72
15	3.887	2.8	2.520	352.80
16	3.876	2.9	2.610	353.21
17	3.865	3.1	2.790	354.32
18	3.812	3.2	2.880	359.40
19	3.743	3.2	2.880	362.70

Tabla A.4.7 Proceso de Fermentación láctica con desechos de langostino en un tiempo de tres semanas, con inóculo.

No. Muestra	pH	Vol. NaOH (mL)	ATT (%)	Ca (g/L)
0	4.725	0.20	0.180	0.95
1	4.464	0.60	0.540	180.40
2	4.328	1.20	1.080	189.92
3	4.327	1.70	1.530	195.47
4	4.318	2.10	1.890	196.56
5	4.317	2.40	2.160	201.06
6	4.317	2.80	2.520	202.69
7	4.300	2.90	2.610	208.81
8	4.300	2.90	2.610	213.16
9	4.290	3.00	2.700	213.50
10	4.267	3.10	2.790	217.90
11	4.262	3.30	2.970	223.40
12	3.983	3.30	2.970	235.14
13	3.946	3.40	3.060	252.54
14	3.880	3.60	3.240	271.01
15	3.847	3.60	3.240	303.51
16	3.847	3.80	3.420	315.36
17	3.748	3.80	3.420	349.68
18	3.781	4.00	3.600	375.98
19	3.700	4.00	3.600	387.99

Tabla A.4.8 Proceso de Fermentación láctica con desechos de langostino en un tiempo de tres semanas, con inóculo (Réplica).

No. Muestra	pH	Vol. NaOH (mL)	ATT (%)	Ca (g/L)
0	4.460	0.40	0.360	1.08
1	4.400	0.60	0.540	196.88
2	4.321	1.70	1.530	198.07
3	4.320	1.50	1.350	208.02
4	4.317	2.10	1.890	210.63
5	4.315	2.30	2.070	211.68
6	4.312	2.40	2.160	212.30
7	4.305	2.70	2.430	223.52
8	4.305	2.70	2.430	230.79
9	4.303	2.80	2.520	231.41
10	4.265	2.90	2.610	253.83
11	4.188	3.00	2.700	265.70
12	3.957	3.20	2.880	267.56
13	3.879	3.20	2.880	279.97
14	3.884	3.50	3.150	306.44
15	3.858	3.60	3.240	320.68
16	3.796	3.70	3.330	332.49
17	3.772	3.80	3.420	347.58
18	3.738	4.00	3.600	373.36
19	3.691	4.00	3.600	380.02

A.2. Metodología de Análisis

A.2.1. Medición del pH

Base Teórica

El pH-metro es un dispositivo que mide el potencial de una solución. Este potencial depende de la actividad de los protones, por lo cual, conociendo el potencial, es posible conocer el pH de la solución a medir. El método más adecuado para la medición del pH consiste en medir el potencial que se desarrolla a través de una delgada membrana de vidrio que separa dos soluciones con distinta concentración de protones (H^+).

Procedimiento a seguir para la utilización del pH-metro:

1. Encender el equipo y dejarlo estabilizarse (el tiempo requerido para esto depende de cada equipo).
2. Lavar el electrodo combinado con cuidado para evitar roturas y déjelo sumergido en agua destilada.
3. Secar suavemente el electrodo con papel absorbente.
4. Sumergir hasta leer el pH correspondiente de la muestra. Esperar unos segundos hasta ver una lectura constante.
5. Lavar y secar el electrodo.
6. Dejarlo sumergido en la solución de KCl. No dejar el electrodo seco durante períodos prolongados.

Nota: Es recomendable verificar que la lectura para los patrones no se ha modificado. De ser así, calibrar el equipo; ya que esto puede ocurrir por falta de estabilización del equipo.

A.2.2. Acidez Total Titulable

Base teórica

Una titulación o valoración es un procedimiento analítico, en el cual se mide cuantitativamente la capacidad de una determinada sustancia de combinarse con un reactivo. Normalmente, este procedimiento se lleva a cabo mediante la adición controlada del reactivo de concentración conocida a la solución problema, hasta que por algún medio se juzga que la reacción es completa. Al reactivo de concentración conocida usado en la titulación, se le conoce como solución patrón.

El objetivo final de cualquier valoración es la adición del reactivo patrón en una cantidad tal que sea químicamente equivalente a la sustancia problema con la cual reacciona es decir, añadir un número de equivalentes de reactivo patrón igual al número de equivalentes de la sustancia problema.

Reactivos

Indicador de Fenolftaleína 1%: Pesar 1.0 g de fenolftaleína y transfiera a un matraz volumétrico de 100 ml, llene hasta la mitad con alcohol al 95% y disuelva. Complete el volumen con el alcohol y mezcle.

Solución de NaOH 0.1 N: Pesar 0.999992 g de hidróxido de sodio de grado analítico y transfiera a un matraz volumétrico de 250 ml, llene hasta la mitad con agua destilada y disuelva. Complete el volumen con agua destilada y mezcle.

Determinación del porcentaje en peso/volumen (%p/v) del licor muestra

El tratamiento consiste en la toma de una alícuota de 1 ml de licor muestra en la que estará contenida una concentración desconocida de ácido láctico, esta será valorada con una solución de base fuerte con ayuda del indicador hasta llegar a un pH de 8.3. Por lo tanto se procederá de la siguiente manera:

Mida 1 ml del licor muestra con una pipeta aforada y colóquelo en un matraz Erlenmayer de 25 ml. Agregue 10 ml de agua destilada y 3 gotas de la solución indicadora de fenolftaleína. Titule con una solución valorada de hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 M que estará contenida en una bureta de 25 ml con agitación constante proporcionado por el agitador magnético hasta el viraje del indicador. Finalmente se utiliza el Phmetro para comprobar el pH final establecido para esta prueba.

Tomando en cuenta el gasto final de NaOH determinaremos la concentración del ácido en las muestras de licor:

$$N_m V_m = N_{NaOH} V_{NaOH} \quad (A.1)$$

$$N_m = \frac{N_{NaOH} V_{NaOH}}{V_m} \quad (A.2)$$

Si en vez de calcular la normalidad del ácido, se prefiere expresar su porcentaje (relación peso/volumen) y tomando en cuenta el número de iones hidróneos (H^+) del ácido que aporta que en este caso es 1 para el cálculo de meq del ácido se operará del siguiente modo:

$$\frac{g \text{ de Ac}}{ml \text{ de licor muestra}} \times 100 = \frac{N_{NaOH} \times V_{NaOH} \times meq.ácido}{ml \text{ de licor muestra}} \times 100 \quad (A.3)$$

Finalmente se obtiene la ecuación siguiente:

$$\% p/v = \frac{V_{NaOH} \times N_{NaOH} \times meq.ácido \times fd}{V_m} \times 100 \quad (A.4)$$

Donde,

V_{NaOH} : Volumen gastado de base

N_{NaOH} : Concentración de la base

$meq.ácido$: Miliequivalente del ácido presente en la muestra

fd : Factor de dilución

V_m : Volumen del analito

A.2.3. Análisis de Calcio por Espectrofotometría de Absorción Atómica

Base Teórica

La Espectroscopía de llama es una técnica analítica usada para la determinación cualitativa y cuantitativa de un elemento en una muestra. En este método la muestra, en forma de líquido homogéneo, es introducida en una llama en donde reacciones químicas y térmicas producen átomos "libres" capaces de absorber, emitir o fluorecer a longitudes de ondas características.

Para realizar el análisis es necesario el equipo de espectrofotometría de absorción atómica, GBC AAS 932 plus que se presenta en la Figura A.2. Este equipo cuenta con un software específico, por lo que es necesaria una computadora que se encargue de la administración y procesamiento de los datos obtenidos de su puesta en marcha.



Figura A.2. Espectrofotómetro de absorción atómica GBC AAS 932

Preparación de Reactivos

Solución ácida: Esta se prepara midiendo 83 ml de ácido clorhídrico concentrado y en un matraz volumétrico de 1000 ml disolverlo y aforar con agua desionizada. Con ella se realizan las diluciones consecutivas para los demás estándares.

Estándares de Calcio: La realización correcta de este análisis de espectrofotometría depende mayormente de la correcta formulación de los estándares de referencia, por lo que se debe procurar tener suma precisión en la preparación de estos. A partir de un estándar primario se deben de preparar estándares en un rango de concentración de 500 a 1.0 ppm. Cada uno de los estándares se preparó midiendo el volumen requerido del estándar y aforando a la marca con la solución de ácido clorhídrico de concentración de 1 N.

Para el estándar primario se debe pesar en la balanza analítica 2.497 g de carbonato de calcio y en un matraz Erlenmayer de 50 ml disolverlo en 25 ml de ácido clorhídrico de 1 N, todo esto con ayuda del mezclador magnético para lograr que se disuelva de forma completa el reactivo, posteriormente se debe diluir la mezcla en un matraz volumétrico de 1000 ml y aforar hasta la marca. En la Tabla A.1 se presentan los volúmenes requeridos para la correcta preparación de los estándares:

Tabla A.1. Volúmenes para la preparación de estándares

Concentración final(ppm)	Volumen requerido de estándar (ml)	Volumen final (ml)
500	250 de Estándar de 1000 ppm	500
100	50 de Estándar de 500 ppm	250
50	50 de Estándar de 100 ppm	100
25	50 de Estándar de 50 ppm	100
10	40 de Estándar de 25 ppm	100
5	50 de Estándar de 10 ppm	100
1	20 de Estándar de 5 ppm	100

Determinación de calcio por espectrofotometría de absorción

Con ayuda del software se establecen las condiciones de trabajo del equipo (Tabla A.2), parámetros fundamentales para su correcto funcionamiento y que alteran la precisión del análisis.

Posterior a la inserción de las condiciones apropiadas se permite la puesta en marcha del equipo o ignición de la flama y se mide la absorbancia de los estándares de concentración conocida, el programa se encarga de realizar graficas de los resultados de absorbancia en función de la concentración, estableciendo una curva de calibración que será necesaria para valorar los datos respuesta de las muestras.

Tabla A.2. Parámetros del Equipo

Condiciones Estándar para Calcio	
Tipo de Lámpara	Cátodo Hueco
Corriente (mA)	15
Longitud de onda (nm)	422.7
Slit (nm)	0.7
Ruido Relativo	1.0
Sensitividad (mg/L)	0.092
Chequeo de Sensitividad (mg/L)	4.0
Límite de Detección (mg/L)	0.001
Gases	N/Ac
N/Ac: Óxido nitroso - Acetileno	

Después que se establece la curva de calibración, se mide la concentración directa de las soluciones. Para favorecer la precisión del análisis es necesario trabajar en niveles de absorbancia menores a 0.7, por lo que en la mayoría de los casos es necesario realizar diluciones a las muestras con el fin de disminuir el valor respuesta de absorbancia medido. Por lo tanto las muestras deben ser preparadas previamente con sumo cuidado diluyéndolas con la solución de HCl.

Cálculo de los resultados

$$\text{Metal (mg / lt)} = C \times F \quad (\text{A.5})$$

Donde:

C = concentración de la muestra dada por el equipo

F = Factor de dilución de la muestra

A.2.4 Preparación de medio de cultivo para microorganismos *Lactobacillus* en medio sólido

Base teórica

El caldo o medio de cultivo MRS, en contraste con otros medios, se utiliza para el enriquecimiento, cultivo y aislamiento de todas las especies de *Lactobacillus*, según de Man, Rogosa y Sharpe (1960).

Estos Medios contienen polisorbato, acetato, magnesio y manganeso, sustancias que se conocen como factores especiales de crecimiento para lactobacilos, así como una base nutritiva, abundante y rica. Dado que sólo posee muy escasa selectividad, también pueden crecer especies de *Pediococcus* y de *Leuconostoc*, y otros gérmenes acompañantes. En la Tabla A.3 se presenta la composición del MRS que le confiere la efectividad de crecimiento de todas las especies.

Tabla A.3. Composición de Medio MRS

Componente	Concentración (g/l)
Peptona universal	10.00
Extracto de carne	5.00
Extracto de levadura	5.00
D(+)-Glucosa	20.00
di-Potasio hidrogenofosfato	2.00
Polioxietilensorbitan monooleato	1.00
di-Amonio hidrogenocitrato	2.00
Sodio acetato	5.00
Magnesio sulfato	0.05
Agar-agar(ausente en el Caldo MRS)	12.00

El material objeto de investigación (eventualmente, tras homogenización) se incorpora al Caldo MRS para su enriquecimiento, o para determinación del número de gérmenes según los métodos respectivos.

Materiales

Tabla A.4. Descripción de los reactivos y Materiales usados para el Inóculo

Reactivos	Equipos
Agua destilada	Autoclave
Medio <i>Lactobacillus</i> MRS Both	Balanza analítica con sensibilidad de 0.0001 g
Agar	Erlenmayer de 500 ml
	Plancha de calentamiento con agitación magnética
	Tubos de ensayo microbiológico

Procedimiento de preparación

Con ayuda de la balanza analítica se pesa 15.5 g del medio de cultivo y disolverlo en un volumen de 250 ml de agua destilada en un Erlenmayer de 500 ml. Se procede a disolverlo completamente con ayuda del equipo del mezclado.

Posteriormente se pesa la cantidad requerida de agar para producir la solidificación del medio, para este caso se usan 3g. Para disolver completamente el agar es necesario someter la mezcla a calentamiento hasta ebullición, ya que a temperatura ambiente es insoluble en el medio. La desaparición total de sólidos marca la completa mezcla del medio con el agar.

Es necesaria la esterilización de este medio para evitar la intervención de cualquier agente bactericida o invasor en el medio, por lo que esto se realiza aislando este de aire usando ajustados tapones algodón para luego introducirlo en autoclave a una presión de 20 psi con una temperatura de 121 °C por un período de 15 a 20 minutos. De esta manera se permite mantener un medio inocuo y selectivo a las bacterias en estudio.

A.2.5 Tinción Diferencial: Tinción de Gram

Base teórica

La tinción de Gram es uno de los métodos de tinción más importantes en el diagnóstico bacteriológico. Es un método diferencial, separando bacterias en dos grandes categorías, *Gram positivas* y *Gram negativas*.

La diferenciación de estas se basa en el color que adquieren las bacterias cuando se tratan con dos distintos colorantes consecutivamente, luego de haber permitido una decoloración con alcohol entre cada uno. Las bacterias resistentes a la decoloración conservarán la primera tonalidad y no toman el color contraste, por lo que estos organismos serán clasificados como Gram positivos. Los organismos Gram negativos serán los que luego de la decoloración adquieren el color contraste. La base de esta diferenciación es la velocidad de decoloración que una característica absoluta de las bacterias, por lo que el procedimiento se debe realizar con sumo cuidado. Existe una tendencia para algunos Gram positivos de mostrar una respuesta negativa al Gram a medida que el cultivo envejece. Por lo tanto es importante que los cultivos sean jóvenes, de preferencia no mayor de 48 horas.

Materiales y reactivos

Tabla A.5. Materiales y reactivos para tinción de Gram

Reactivo	Material
Agua destilada	Asa de cultivo
Cristal violeta	Cubeta de tinciones
Safranina	Lamina de vidrio de 25x75 mm
Lugol	Mechero Bunsen
Alcohol	Microscopio de magnificación de 4x-100x

Procedimiento de tinción de Gram

La primera parte consiste en preparar frotis delgados e individuales de la muestra, para esto requerimos del haza que será previamente calentada en el mechero hasta el rojo vivo con lo cual tomaremos la cantidad necesaria de muestra, esta será frotada con firmeza en la lámina de cristal previamente humedecida con agua destilada en su centro, a esto se le conoce como fresco. Posterior a esto deben ser secados al aire y fijados con calor proporcionado por el mechero Bunsen.

Lo segundo en este procedimiento es colorar para poder diferenciar los microorganismos en el microscopio. La tinción primaria será efectuada con una solución de cristal violeta 1% se goteará sobre el frotis la cantidad necesaria para cubrirlo durante 1 minuto. Se debe enjuagar con agua destilada por 5 segundos y se adiciona el lugol (solución diluida de yodo) sobre el frotis por 1 minuto, nuevamente es necesario enjuagar para provocar la decoloración con alcohol etílico 95%, este se aplica lentamente y se sigue agregando hasta que la tintura ya no fluya del frotis este dura de 10 a 15 segundos. Concluido lo anterior será necesario enjuagar inmediatamente para ser cubierto el frotis con la solución de

safranina 0.5% durante 30 segundos. Por última vez se enjuaga y se deja secar al aire. Finalmente lo que resta es observar el frotis con ayuda del microscopio en una magnificación máxima de 40x para reconocer si la especie es Gram positiva o Gram negativa.

Como se mencionó anteriormente las Gram positivas se tiñen de azules, esto a causa de que el colorante se une a los grupos cargados negativamente de la pared celular, membrana, citoplasma. El uso de la solución yoduro permite fijar el cristal violeta a los grupos cargados negativamente y el alcohol decolora el cristal violeta y iodo de las células, el color de los microorganismos Gram positivos se difunde más lentamente que con los negativos, por la composición química y grosor de la pared celular de Gram positivos.

Las Gram negativas se decoloran y son difíciles de ver por lo que se usa este segundo colorante (safranina), este también se liga a los grupos cargados negativamente en ambos tipos de células. Unos cuantos grupos negativos están libres del cristal violeta en Gram positivo, mientras que la mayoría de los grupos negativos están libres en bacterias Gram negativos, por tanto son teñidas a rosa o rojo.

A.2.6 Técnicas de conteo celular

Nociones Generales

En numerosas actividades de la microbiología es importante conocer el número o la masa de microorganismos presentes en una muestra. Este conocimiento puede ser utilizado en: estudios de curvas de crecimiento, análisis de alimentos, preparación de inóculos para fermentaciones, control de fermentaciones a escala laboratorio e industrial, comparación del crecimiento celular en varias condiciones, etc.

La selección de un método para el recuento de microorganismos depende de diferentes factores tales como la concentración de microorganismos presentes, el medio de cultivo, los productos formados durante el crecimiento y la precisión requerida.

Se puede determinar:

- Número de células (bacterias, levaduras, esporas fúngicas). Es necesario considerar si el dato requerido es el número de microorganismos totales presentes o viables (número de microorganismos capaces de multiplicarse)
- Masa molecular
- Componentes celulares (ADN, ARN, proteínas, ATP, etc.)
- Formación de productos
- Consumo de nutrientes

Una suspensión celular se caracteriza por presentar un número de partículas microscópicas dispersas de un fluido. Habitualmente será necesario determinar tanto la densidad de las células en la suspensión como el porcentaje de éstas que son viables.

Para determinar la densidad de las células se emplean diferentes técnicas, desde la relativamente simple cámara de conteo celular de la que existen numerosas variantes, hasta equipos automáticos de conteo celular.

Materiales y reactivos

Tabla A.6. Materiales y reactivos para el conteo celular

Reactivo	Material
Caldo-Agar MRS	Pipetas estériles de 1 ml
Solución de Ringer 1/4	Asa de cultivo
Agua destilada	Estufa de cultivo
	Tubos de ensayo 16 x 160 mm
	Gradillas
	Placas de Petri de 90 mm
	Matraces Erlenmeyer
	Mechero Bunsen

Procedimiento

Como primer paso es necesario preparar la solución de Ringer que será el diluyente para el seriado de diluciones, esta contiene elementos que brindará un ambiente no hostil a las bacterias. Las cantidades requeridas serán:

- 9 g de Cloruro de sodio
- 0.42 g de cloruro cálcico anhidro
- 0.20 g de Hidrogeno carbonato sódico
- 1000 ml de Agua destilada

Con ello la solución madre estará listo para ser diluido y adecuarlo a $\frac{1}{4}$ de su volumen para ser diluido nuevamente con $\frac{3}{4}$ partes de agua destilada. Teniendo esto podemos utilizar los 5 tubos de ensayo descritos anteriormente, en cada uno de ellos serán contenidos 9 ml de solución Ringer $\frac{1}{4}$ y serán sellados con tapones para ser esterilizados en autoclave.

Posteriormente, se toma 1 ml de la muestra, en este caso será licor de fermento, con una pipeta previamente esterilizada para preparar la primera dilución de la serie (1:10) y que constituye la suspensión madre. Esta será vertida en el primer tubo de ensayo que contiene agua Ringer y será mezclada 30 segundos con agitación excéntrica. La pipeta usada debe ser desechada.

Luego de su mezcla total se toma nuevamente 1 ml con una nueva pipeta estéril de la suspensión madre para ser vertido y mezclado en otro de los tubos con 9 ml de disolvente para obtener la siguiente dilución del seriado 1:100, la pipeta debe ser desechada nuevamente. La operación se repite nuevamente hasta lograr las diluciones deseadas de esta forma se obtiene la "serie de diluciones decimales" ($10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}$, etc.), que servirá para iniciar las determinaciones en las que sea necesario obtener recuentos.

Los tubos de la serie se mantendrán en frigorífico hasta el comienzo del análisis, el cual, aun en condiciones de refrigeración no deberá demorarse más de dos horas a partir del momento en que se haya preparado la "serie de diluciones decimales" (Ver Figura A.3.a).

Concluida esta etapa se preparan las placas Pietri en las cuales será vertido el medio sólido MRS que ha sido previamente preparado y cuyo procedimiento es descrito en el Apéndice A.2.4. Se preparará 5 placas en las cuales será vertido 1 ml de cada dilución del seriado (Ver Figura A.3.b), además de 15 ml de medio sólido MRS que se precalentara a 45 °C para ser vertido y mezclado circularmente en contra y a favor de las manecillas del reloj para lograr la homogenización de la mezcla. El recuento se realizó por duplicado.

La cantidad de diluciones planeadas para este análisis serán hasta 1×10^{-5} considerando que la bacteria en estudio es *Lactobacilos*. Finalizado el procedimiento se incubó por 5 días a una temperatura de 30 °C y 5% de CO₂ en cámara húmeda, estas son las condiciones establecidas para el crecimiento de bacterias de esta especie.

Transcurrida la incubación, se hace el recuento de las colonias en las placas donde estén perfectamente aisladas que generalmente serán en las últimas dos diluciones.

La media del número total de colonias contadas del duplicado multiplicado por el factor de dilución de la placa elegida, da como resultado el número de colonias viables por ml de la muestra analizada.

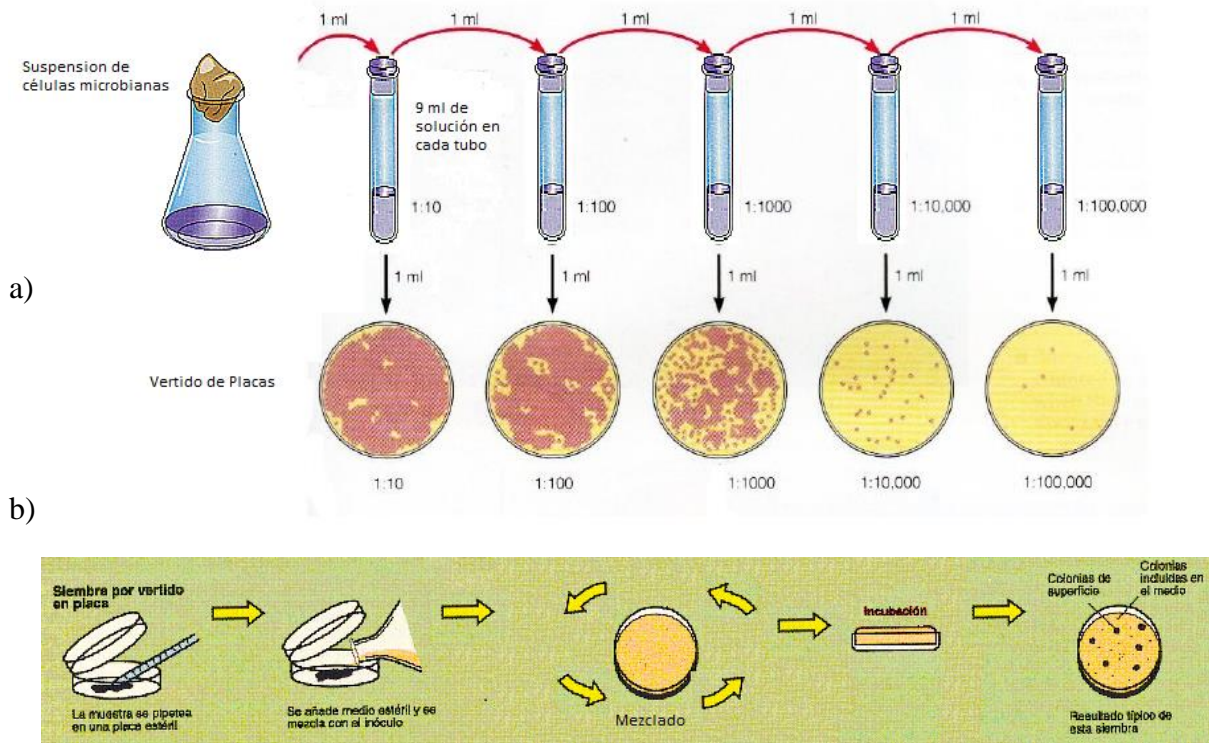


Figura A.3 (a) Seriado de diluciones decimales y (b) siembra vertido en placas

A.2.7. Análisis de Pureza por Espectroscopia Infrarroja

Base Teórica

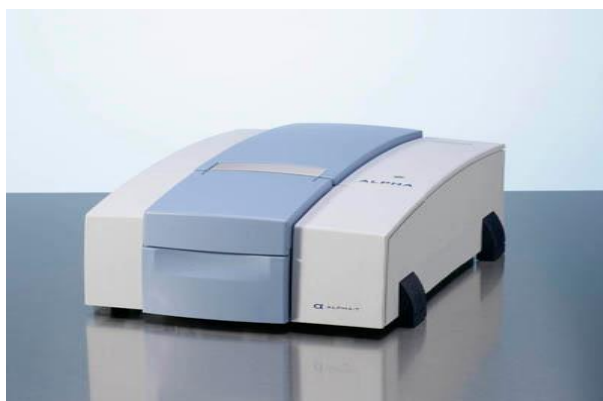
Esta se fundamenta en la absorción de la radiación IR por las moléculas en vibración. Una molécula absorberá la energía de un haz de luz infrarroja cuando dicha energía incidente sea igual a la necesaria para que se dé una transición vibracional de la molécula. Es decir, la molécula comienza a vibrar de una determinada manera gracias a la energía que se le suministra mediante luz infrarroja.

Pueden distinguirse dos categorías básicas de vibraciones: de tensión y de flexión. Las vibraciones de tensión son cambios en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos. Las vibraciones de flexión están originadas por cambios en el ángulo que forman dos enlaces.

La espectroscopia infrarroja tiene su aplicación más inmediata en el análisis cualitativo, debido a la correlación que existe entre los espectros y la estructura molecular.

Procedimiento de Determinación de Pureza

El análisis será realizado por un equipo de espectrofotometría FT-IR ALPHA T Bruker (ver figura A.4.a) con ayuda de su software respectivo OPUS/DB 20080204/6.5.4 que establecerá las condiciones adecuadas para realizar la corrida. Uno de estos parámetros es el nivel de humedad que debe ser menor al 30% para no afectar la fiabilidad del análisis, el rango de trabajo general del equipo se mantiene en $500 - 4000 \text{ cm}^{-1}$, por otra parte la resolución media del equipo se encuentra en $1.65 \text{ cm}^{-1} - 2.00 \text{ cm}^{-1}$.



(a)



(b)

Figura A.4. Equipo FT-IR con accesorio ALPHA T para lectura de muestras solidas

A continuación se prepara la muestra que implica triturar una cantidad de la mezcla con una sal especialmente purificada (usualmente bromuro de potasio) finamente (para remover efectos dispersores de los cristales grandes). Esta mezcla en polvo se comprime en una prensa de troquel mecánica para formar una pastilla translúcida a través de la cual puede pasar el rayo de luz del espectrómetro.

Es importante destacar que los espectros obtenidos a partir de preparaciones distintas de la muestra se verán ligeramente distintos entre sí debido a los diferentes estados físicos en los que se encuentra la muestra, ya que en algunos casos los agentes aglomerantes también absorben en IR mostrando bandas características.

Se debe tener en cuenta que la cantidad de muestra usada en el análisis debe ser del 1-5% del KBR y este a su vez en dependencia de la traslucidez y constitución de la pastilla.

Finalmente la pastilla muestra es introducida en el instrumento como se observa en la figura A.4.b para comparar su espectro con una muestra patrón purificada previamente analizada y valorar la correlación entre ambas.