

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS



**Degradación bacteriana del exoesqueleto de langostino
(*Litopenaeus vannamei*) para la obtención de quitina**

Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Forestal y del Medio
Ambiente

Autor:

Br. Sinthya Del Pilar Arcaya Rodríguez

Tumbes, 2022

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS



**Degradación bacteriana del exoesqueleto de langostino
(*Litopenaeus vannamei*) para la obtención de quitina.**

Tesis aprobada en forma y estilo por:

Dr. Gerardo J.F. Cruz Cerro (Presidente)

Dr. Javier Querevalu Ortiz (Secretario)

Mg. Victor Guzman Tripul (Vocal)

Tumbes, 2022

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS



**Degradación bacteriana del exoesqueleto de langostino
(*Litopenaeus vannamei*) para la obtención de quitina.**

Los suscritos declaramos que la tesis es original en su contenido y
forma:

Br. Sinthya Del Pilar Arcaya Rodríguez (Autor)

Mg. Rosa Liliana Solis Castro (Asesor)

Ing. Andy Luis García Peña (Co-Asesor)

Tumbes, 2022

Copia del Acta de Sustentación



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
EX FUNDO FISCAL LA CRUZ-CAMPUS UNIVERSITARIO
SECRETARIA ACADÉMICA



“AÑO DEL FORTALECIMIENTO DE LA SOBERANÍA NACIONAL”

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En Tumbes, a los uno día (s) del mes de setiembre del dos mil veintidós, siendo las once horas, y en la modalidad virtual, a través de la plataforma zoom cuyo link de acceso es <https://us02web.zoom.us/j/83977805168>, se reunieron el Jurado Calificador de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Tumbes, designado por **Resolución N° 048-2021/UNTUMBES-VRACAD-FCA-D**, el Dr. GERARDO JUAN FRANCISCO CRUZ CERRO (Presidente), Dr. JAVIER QUEREVALU ORTIZ (Secretario) y Mg. VICTOR SANTOS GUZMAN TRIPUL (Vocal), reconociendo en la misma resolución además, a la M Sc. ROSA LILIANA SOLIS CASTRO como asesor y como co-asesor al Ing. ANDY LUIS GARCIA PEÑA, se procedió a evaluar, calificar y deliberar la sustentación de la tesis, titulada: “**Degradación bacteriana del exoesqueleto de langostino (*Litopenaeus vannamei*) para la obtención de quitina**”, para optar el Título Profesional de Ingeniero Forestal y Medio Ambiente, presentado por el (la): **Br. ARCAYA RODRIGUEZ SINTHYA DEL PILAR**. Concluida la sustentación y absueltas las preguntas, por parte del (la) sustentante y después de la deliberación, el jurado según el artículo N° 65 del Reglamento de Tesis para Pregrado y Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes, declara APROBAR al (a la): **Br. ARCAYA RODRIGUEZ SINTHYA DEL PILAR** con calificativo BUENO.

Se hace conocer al (a la) sustentante, que deberá levantar las observaciones finales hechas al informe final de tesis, que el jurado le indica.

En consecuencia, queda APTA para continuar con los trámites correspondientes a la obtención del título profesional de Ingeniero Forestal y Medio Ambiente, de conformidad con lo estipulado en la Ley Universitaria N° 30220, el Estatuto, Reglamento General, Reglamento General de Grados y Títulos y Reglamento de Tesis para Pregrado y Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes.

Siendo las once horas y cincuentiséis minutos del mismo día, se dio por concluida la ceremonia académica, en forma virtual, procediendo a firmar el acta en presencia del público asistente.

Tumbes, 01 de setiembre del 2022

Dr. GERARDO J. F. CRUZ CERRO
DNI N° 80661595
Presidente

Dr. JAVIER QUEREVALU ORTIZ
DNI N° 03584037
Secretario

Mg. VICTOR SANTOS GUZMAN TRIPUL
DNI N° 18090530
Vocal

Dedicatoria

Dedicar en primer lugar a Dios por guiarme, cuidarme y ayudarme a cumplir una de tantas metas, en esta ocasión de obtener mi título profesional, ir avanzando poco a poco hasta ser un profesional competente, capaz de realizar cualquier actividad encargada.

A mis padres, por brindarme apoyo moral como económico para lograr ser una gran persona y un gran profesional. A mi abuela por motivarme y darme aliento para seguir avanzando. Y dedico a mi hermana por ser mi motivo de seguir esforzándome para lograr lo que deseo.

Agradecimiento

A Mg. Rosa Liliana Solís Castro y al Ing. Andy Luis García Peña por todo el apoyo, conocimiento y asesoramiento brindado en el transcurso de la actual investigación, logrando culminarlo con éxito.

Al Proyecto Canon "Producción y caracterización molecular de metabolitos obtenidos a partir de la degradación biológica de desechos de langostino (*Litopenaeus vannamei*) y pluma de pota (*Dosidicus gigas*) para fines biotecnológicos", con Resolución N°0904-2018/UNTUMBES-CU, con el cual se ha financiado esta tesis.

A la Universidad Nacional de Tumbes, a la Facultad de Ciencias Agrarias por ser allí donde lleve mi formación profesional, agradecer a los distintos profesores por brindarnos el conocimiento para seguir avanzando, el apoyo y paciencia a mi persona como a otros compañeros de clase.

Agradecer a los Miembros del Jurado por sus aportes y observaciones brindadas para una mejora de la presente investigación.

Índice de contenido

I. INTRODUCCIÓN	10
II. ESTADO DEL ARTE.....	13
2.1. Glosario de términos	16
III. MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1. Tipo de investigación.....	20
3.2. Población y muestra.....	20
3.3. Recolección de Muestra.....	20
3.4. Degradación biológica del residuo de langostino	20
3.4.1. Preparación del inóculo	20
3.4.2. Preparación de medio y la degradación por fermentación discontinua	21
3.4.3. Proceso para medición de quitooligómeros	21
3.4.4. Medición del pH	22
3.4.5. Caracterización del producto.....	22
3.5. Plan de procesamiento y análisis de datos.....	23
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1. Análisis superficial – rendimiento.....	24
4.2. Resultados de Quitooligómeros	25
4.3. Resultado de medición de PH.....	29
4.4. Resultados de análisis de grupos funcionales.....	31
4.5. Resultados de difracción rayos X.....	32
V. CONCLUSIONES	36
VI. RECOMENDACIONES.....	37
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	38
VIII. ANEXOS	46
8.1. Panel fotografico	46

Índice de tablas

Tabla 1. Investigaciones realizadas con método químico y biológico.	14
Tabla 2. Datos para la preparación de la curva de calibración.	22
Tabla 3. Diferencia de pesos y rendimientos de los tratamientos.	25
Tabla 4. Resultados de prueba de calibración de quitoooligómeros.	25
Tabla 5. Promedio de medición de quitoooligómeros.	27
Tabla 6. Mediciones del PH cada 24 horas.	29

Índice de figuras

Figura 1. Procesos del método químico y biológico para la extracción de quitina adaptado de Sirvas-Cornejo & Perochena-Escalante (2020).....	15
Figura 2. Residuos de exoesqueleto de langostino. (a) Antes del tratamiento, (b) después del tratamiento, (c) después del tratamiento secado, molido y tamizado.	24
Figura 3. Muestras del sobrenadante durante el tratamiento.	25
Figura 4. Curva de calibración quitoooligómeros.....	26
Figura 5. Resultado de medición de quitoooligómeros.....	28
Figura 6. Actividad enzimática de quitoooligómeros.	28
Figura 7. Comportamiento del pH durante la degradación biológica del residuo de exoesqueleto de langostino.	30
Figura 8. Resultado del análisis de grupos funcionales mediante FTIR de las muestras RDQ, 3DQ y Quitina de langostino (Q-Lang).....	31
Figura 9. Análisis de difracción de rayos X de las muestras RDQ, 3DQ.....	32

Resumen

En la actualidad los residuos de crustáceos principalmente en langostino son los responsables de un problema ambiental no resuelto en su totalidad. Por ello, se buscan alternativas para mitigar estos impactos ambientales que se están dando y cada día es más preocupante. Se ha demostrado que por el método químico se puede obtener quitina, teniendo como materia prima los desechos de langostino, sin embargo, genera desechos tóxicos perjudiciales para el ambiente y la salud de la población. Es por ello, en la presente investigación se propuso ver la factibilidad de obtener quitina, utilizando bacterias proteolíticas, lipolíticas y amilolíticas *Pseudomona geniculata* (3DQ) y *Stenotrophomonas maltophilia* (RDQ) las cuales realizaran degradación por fermentación discontinua del residuo de langostino ya que es considerado no agresivo para el medio ambiente.

Se realizó la degradación discontinua del residuo usando medio basal, con 10% de residuos seco de langostino, y 5% de inóculo, que contendrá un microorganismo distinto. Se incubó a 32°C sobre un rotador orbital a 150 rpm por 14 días. Durante la etapa de fermentación del residuo se realizó mediciones de quitoooligómeros de manera alternada y medición de pH diarias. El residuo obtenido fue analizado mediante Espectrometría infrarroja (FT-IR) y Difracción de rayos X.

Se observó un incremento en el pH y el contenido de quitoooligómeros, evidenciado así el crecimiento bacteriano y la degradación del residuo. En el análisis de grupos funcionales se observó picos en la en las bandas 1654 cm⁻¹ y 1069 cm⁻¹ se muestran bandas que son relacionadas a las vibraciones de las amidas I, II y III, además en el análisis de difracción de rayos x, se observaron picos cristalinos aproximadamente a $2\theta = 9^\circ$, 19° y 20° que son propios de los biopolímeros quitina.

Se concluye que se observan datos favorables para la obtención de quitina, sin embargo, no se ha llegado a consolidar del todo, por ello se recomienda realizar el tratamiento por un periodo de tiempo mayor.

Palabras Claves: quitina, desechos de langostino, espectrometría infrarroja, quitoooligómeros, fermentación discontinua.

Abstract

Nowadays, crustacean residues, mainly shrimp, are responsible for an environmental problem that has not been fully resolved. For this reason, alternatives are sought to mitigate these environmental impacts that are occurring and are becoming more worrying every day. It has been shown that chitin can be obtained by the chemical method, having shrimp waste as raw material, however, it generates toxic waste that is harmful to the environment and the health of the population. That is why, in the present investigation it was proposed to see the feasibility of obtaining chitin, using proteolytic, lipolytic and amilolytic bacteria *Pseudomonas geniculata* (3DQ) and *Stenotrophomonas maltophilia* (RDQ) which will carry out degradation by batch fermentation of the shrimp residue since it is considered non-aggressive for the environment.

Discontinuous degradation of the residue was carried out using basal medium, with 10% dried shrimp residue and 5% inoculum, which will contain a different microorganism. It was incubated at 32°C on an orbital rotator at 150 rpm for 14 days. During the fermentation stage of the residue, inter-daily measurements of chito-oligomers and daily pH measurements were made. The residue obtained was analyzed by infrared spectrometry (FT-IR) and X-ray diffraction.

An increase in the pH and the content of chito-oligomers was observed, thus evidencing the bacterial growth and the degradation of the residue. In the analysis of functional groups, peaks were observed in the bands 1654 cm⁻¹ and 1069 cm⁻¹, bands that are related to the vibrations of amides I, II and III are shown, in addition to the x-ray diffraction analysis, crystalline peaks were observed approximately at $2\theta = 9^\circ$, 19° and 20° , which are characteristic of chitin biopolymers.

It is concluded that favorable data are observed for obtaining chitin, however, it has not been fully consolidated, therefore it is recommended to carry out the treatment for a longer period of time.

Keywords: chitin, shrimp waste, infrared spectrometry, chito-oligomers, batch fermentation.

I. INTRODUCCIÓN

En el Perú, la industria del langostino blanco (*Litopenaeus vannamei*), hace años se dedica a la línea comercial de su carne a nivel nacional e internacional, llegando a producir en promedio 32118,4 TM de langostino, transportándose 29,9 mil toneladas al extranjero (PROMPERÚ, 2020). En la zona norte del País: Tumbes y Piura, seguirá incrementando la producción de langostino ya que esta actividad es considerada muy rentable. Al exportar langostino se genera una gran cantidad de residuo, tanto del exoesqueleto y cabezas constituyendo un total del 60% del peso producido; Se desecha además otros residuos de distintos crustáceos comercializados (PNIPA, 2020). Estos residuos son el principal problema de contaminación no resuelto en su totalidad, poniendo en riesgo la salud de los pobladores, y la conservación de vida en el ecosistema (Moran, 2017).

Los desechos del exoesqueleto de langostino contienen un polisacárido considerado como el segundo más abundante existente en el planeta tierra, seguido de la glucosa (Ahmad et al., 2020) denominado quitina, un polímero de alto valor, biodegradable, semipermeable, no es tóxica, contiene propiedades fimogénicas y es muy demandante a nivel mundial, esto la convierte en una excelente materia prima y con gran potencial para la elaboración de diversos subproductos. Lamentablemente se desaprovecha esta posibilidad (García Zavala, 2017).

Al compuesto quitina, se le ha encontrado un gran número de aplicaciones: crecimiento de plantas, filtración y depuración de aguas, industria de alimentos y bebidas, producción de cosméticos, entre otros. Lo cual hace que su investigación y producción sea de gran importancia. Además, su obtención es de bajo costo debido a que la materia prima utilizada generalmente es desperdicio de las empresas langostineras (Zulay Mármol et al., 2011).

Actualmente se utilizan dos métodos para obtener quitina: Método biológico y el método químico, en la presente investigación se empleará con el método biológico con la finalidad de no generar residuos que afecten al ambiente.

Entre los estudios de microorganismos utilizados en la degradación del exoesqueleto de langostino se encuentra el de (Ghorbel-Bellaaj et al., 2011) donde se aisló *Pseudomona aeruginosa*, bacteria productora de una proteasa para obtener quitina a partir de los desechos de camarón, identificándose que la enzima cruda de *P. aeruginosa* A2 es eficaz en el proceso de desproteización de desechos de camarón. Para los resultados se hizo un análisis espectral *Cross Polarization/Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance* (C-CP/MAS-NMR) de la quitina previamente preparada por el tratamiento con la proteasa bruta y se llegó a la conclusión que era similar al de la x-quitina comercial. Por ello, los resultados sugieren que la desproteización de enzimas de los desechos de camarón por la *P. aeruginosa* A2 es aplicable en el proceso para obtención de quitina y su derivado quitosano. Cabe resaltar que los productos de la degradación biológica (biopolímeros) poseen diversas aplicaciones en el campo ambiental, medico, agricultura, comercial, entre otros más (Durán Olvera et al., 2017).

En el Perú es incipiente la aplicación de estas metodologías para la obtención de dichos derivados, por lo que, la obtención de subproductos resultado de la degradación bacteriana por fermentación discontinua de los desechos del exoesqueleto de langostino estaría mitigando el impacto ambiental que estos producen. Adicionalmente, se lograría reducir los contaminantes como los residuos del exoesqueleto del langostino presentes en los ecosistemas adyacentes a las langostineras.

La quitina al ser un producto nuevo y muy rentable, ayudarían a generar aportes considerables en las regiones de Tumbes y Piura si ahora o a un futuro no muy lejano se logra llegar a un acuerdo con las empresas productoras de langostino, ayudaría también en la parte económica ya que se les pagaría por los desechos.

Esta investigación busca incentivar, motivar a más estudiantes de todas las universidades del Perú a seguir y aportar algo mejor en cada trabajo que desarrollen, ya que cada persona tiene la capacidad de aportar algo a la sociedad y lograr un cambio para bien. Además, esta investigación sentará las bases en la búsqueda y aplicación de bacterias degradadoras de residuos, lo cual servirá para trabajos futuros, en la estandarización del método, por ejemplo, o de contribuir a incrementar el acervo microbiológico para este fin.

Por último, en el tema socioeconómico ya que al ser una nueva tecnología innovadora habrá una mejora para la calidad de vida y calidad ambiental. Además, el presente estudio lograra impulsar a la realización de nuevos estudios para un adecuado manejo de la producción de langostinos y en la valorización de los residuos para satisfacer económicamente a la población y a la vez conservando el ambiente, logrando una economía circular.

En tal sentido nace la presente investigación con objetivo de aplicar la degradación bacteriana de exoesqueleto de langostino (*Litopenaeus vannamei*) para la obtención de quitina.

II. ESTADO DEL ARTE

Perú es reconocido a nivel mundial como un país altamente potencial en la producción y extracción de mariscos, la especie más exportada actualmente es camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (PNIPA, 2020).

Según el ministerio de producción, la producción de langostino proviene principalmente de las regiones de Tumbes y Piura (PRODUCE, 2019) las exportaciones generan un total de 230,7 millones de dólares (PNIPA, 2021). En el año 2019 la industria pesquera ha llegado a producir en promedio 32 118,4 TM de langostino, donde 29,9 mil TM son exportados al extranjero (PROMPERÚ, 2020). Los desechos de los langostinos constituyen un 60% del peso total, del cual no tienen un proceso para reusarlo o desecharlo (Taboada Silva, 2019).

El exoesqueleto de langostino contiene cerca del 30% de quitina, polisacárido abundante en el planeta tierra que gracias a su alto valor y demanda ha despertado interés de muchas empresas (Ahmad et al., 2020). La quitina y su derivado quitosano está presente en arácnidos, insectos, hongos y crustáceos, es muy beneficioso puesto que posee muchas propiedades y está presente en diversos productos de uso humano, apto para uso de agricultura (fungicidas) entre otros más (Tsurkan et al., 2021).

Debido a que la quitina es un producto abundante en los residuos de las industrias procesadoras de especies del mar, se han realizado investigaciones para obtener quitina mediante la utilización de microorganismos. En la Tabla 1, se puede observar un resumen de los microorganismos, la fuente de degradación, así como la caracterización de los productos obtenidos.

Tabla 1. Investigaciones realizadas con método químico y biológico.

microorganismo	fuelle	Producto	Caracterización	referencia
<i>Exiguobacterium profundum</i>	Desechos de camarón	Quitina	Espectrometría infrarroja, difracción de rayos x, microscopia electrónica de barrido	(Xin et al., 2020)
<i>Brevibacillus parabrevis</i>	Desechos de camarón	Quitina	Espectros infrarrojos, difracción de rayos x	(Doan et al., 2019)
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	Desechos de camarón	Quitina	FTIR	(Subramanian et al., 2020)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Conchas de camarón	Quitinasa	Análisis de actividad quitinasa	(Sasi et al., 2020)
<i>Bacterias proteolíticas y quinolíticas</i>	Caparazón de cangrejo	Quitina y su derivado quitosano	Espectrometría infrarroja, difracción de rayos x	(Dliyaiddin et al., 2019)
<i>Paenibacillus sp.</i>	Desechos de camarón	Quitina	SEM, FTIR	(Kumar et al., 2018)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Desechos de camarón	Quitina	FTIR	(Sedaghat et al., 2017)
<i>Pseudolateromonas porphyrae, Halomonas aguamarina, reinekea aestuarii, colwellia, asteriadis y Vibrio crassostreae</i>	Desechos de camarón	Quitina	Microscopia electrónica de barrido	(Xaxiri et al., 2018)
<i>Pseudomonas aeruginosa A2</i>	Desecho de camarón	Quitina	MAS-RMN espectral	(Ghorbel-Bellaaj et al., 2011)

En la actualidad se están empleando dos métodos para la obtención de quitina: método químico y método biológico, el método químico es efectivo para obtener quitina y su derivado quitosano con la desventaja de que este utiliza ácidos que son considerados muy tóxicos para el ambiente y al generar los procesos de desmineralización y desproteización (Figura 1), genera efluentes contaminantes

que son desechados a los cuerpos de agua sin un previo tratamiento afectando la salud de la población y al ambiente en general (Subramanian et al., 2020). Al contrario del método biológico, que utilizan los microorganismos para realizar los procesos mencionados logrando eliminar el uso de ácidos contribuyendo al cuidado del ambiente y la salud de la población (Pacheco et al., 2011). Además este método puede disminuir la despolimerización de la materia prima, al eliminar el uso de los diversos compuestos químicos sería posible producir biopolímeros con características distintas y además de conservar su peso molecular (Pacheco Lopez, 2013).

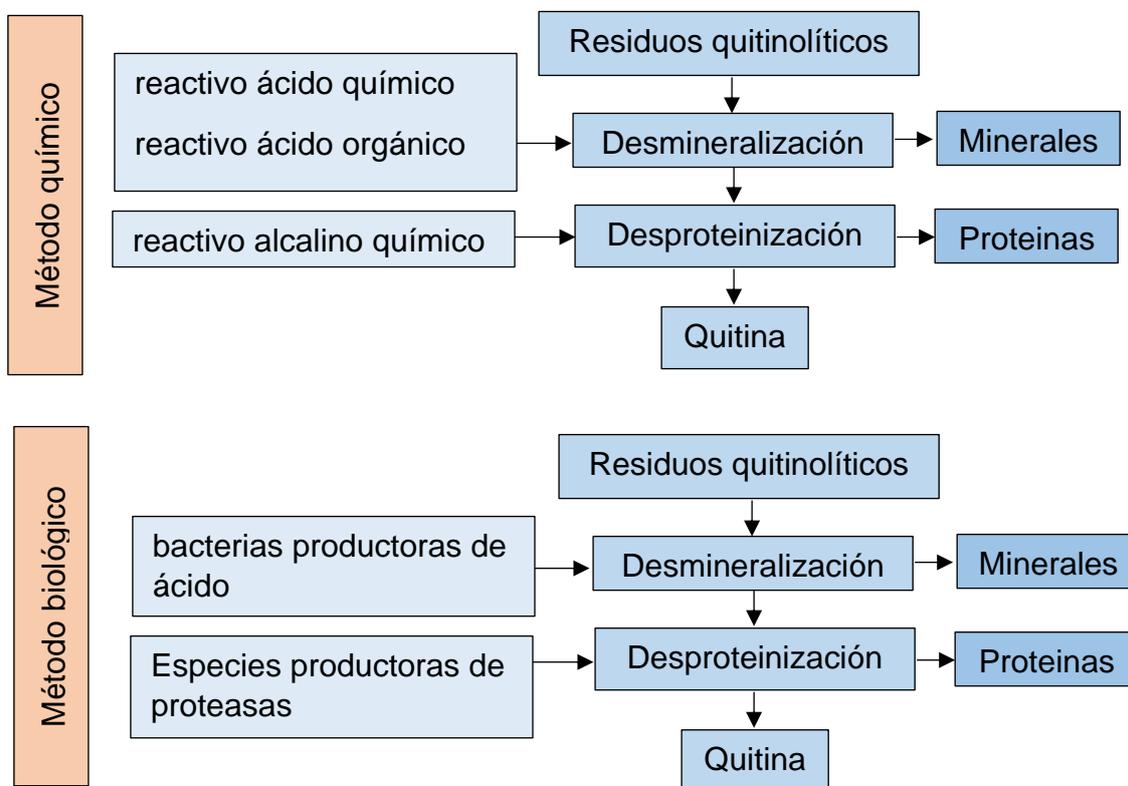


Figura 1. Procesos del método químico y biológico para la extracción de quitina adaptado de Sirvas-Cornejo & Perochena-Escalante (2020).

Los desechos de langostino antes de utilizarlos para el trabajo de investigación es lavada y almacenada para preservar sus características (Colina et al., 2014). Luego se realiza un proceso de despigmentación con el objetivo de remover los pigmentos, proteínas, minerales y sales presentes en los desechos. En el proceso de desproteínización y decoloración se degradan los pigmentos y las proteínas, desmineralización: en los caparazones de los crustáceos el principal componente inorgánico es el carbonato de calcio y otras sales presentes en el exoesqueleto,

estas se suelen eliminar con soluciones diluidas en HCL (Briceño & de Montiel, 2008).

El grado de acetilación es un proceso que se lleva a cabo por hidrólisis de los grupos acetamida en un medio alcalino a una alta temperatura. (Rivas–González et al., 2009). Para conocer el grado de acetilación y el peso molecular, la quitina se caracteriza por tres técnicas analíticas: Espectroscopia infrarroja (FT-IR) actualmente la más usada, esencial para hallar el grado de acetilación identificado como el método empírico, además de identificar estructuralmente la quitina, implica la presencia de varios átomos enlazados para poder detectar con la interacción de la luz las rotaciones de esas moléculas y las vibraciones de los enlaces; La resonancia nuclear (RMN) determina el tipo de distribución de unidades respectivas en la cadena polimétrica y el grado de acetilación; La difracción de Rayos X es una técnica encargada de demostrar la presencia de quitina en los resultados, y dependiendo de la fuente de origen la estructura cristalina de la quitina nos muestra que podemos encontrar los tres polímeros distintos: α -, β -, y γ - quitina (Berghoff,2011).

Perú es considerado un país potencial en la producción y exportación de mariscos, principalmente en Tumbes y Piura, las empresas encargadas de la producción generan residuos a cuerpos de agua sin previo tratamiento perjudicando el ambiente y a la salud. Al realizar esta investigación se busca usar un método de fermentación discontinua para la obtención de quitina de los residuos de langostino usando bacterias llamadas *stentrophomonas maltophilia* y *pseudomona geniculata*, con el fin de no dañar al ambiente, si no buscar soluciones para restaurar daños ocasionados al ambiente y a la salud de todos los ciudadanos. Este es un tema muy preocupante porque las empresas langostineras cada año buscan mejorar la producción y seguir creciendo, siendo muy probable a un futuro que los exoesqueletos de langostinos no sean aprovechados.

2.1. Glosario de términos

- a. Fermentación láctica: es un proceso celular dado anaeróbicamente donde la fuente principal para obtener energía es la glucosa y el producto de desecho es el ácido láctico, este proceso lo pueden realizar tanto hongo, bacterias y algunos protozoos.

Un ejemplo de glucosa tenemos a la lactosa que al fermentarse produce energía, esta energía es aprovechada como fuente principal de algunas bacterias (*Lactobacillus*), dejando como residuo ácido láctico. La leche cuajada es el resultado de la precipitación de la caseína y algunas proteínas, esto ocasiona un descenso del pH debido a la presencia del ácido láctico, evitando el crecimiento de microorganismo no deseados y por consiguiente, la putrefacción del exoesqueleto de langostino (Narváez, 2019).

- b. Bacterias ácido-lácticas: lo conforman un grupo de microorganismos donde su característica principal es la de producir ácido láctico, que se genera a partir de la fermentación de la glucosa como leche, vegetales, carne. Estos microorganismos se vienen utilizando año tras año para la producción de alimentos como embutidos, yogurt, quesos, vinos y cerveza (Sánchez Suárez et al., 2017).
- c. Exoesqueleto: es la parte externa de los artrópodos que tiene como función de proteger, soportar y recubrir toda la superficie de todos los animales artrópodos y también otros grupos de animales relacionados. El exoesqueleto está conformado por cutícula y quitina previniendo pérdida de agua y actúa como contrafuerza al contraer los músculos, el exoesqueleto no crece a medida que crece el animal, este debe mudar para poder reemplazarlo con uno nuevo sucesivamente durante toda su estadía en la naturaleza (Graciano León et al., 2021).

Porcentaje de composición química del residuo (exoesqueleto):

Contiene:	•	Quitina	→	17%– 32%
	•	Proteína	→	17% – 42%
	•	Pigmentos	→	1% – 14%
	•	cenizas	→	41% - 46%

- d. Residuo: es todo aquel elemento que es considerado un desecho, donde depende del tipo de residuo se debe realizar un tratamiento previo antes de desecharlo, reciclarlo o bien reutilizarlo (Nizama Lazo, 2014).

- e. Quitina: es un polisacárido con una estructura lineal, solubles en medio ácido e insoluble en agua, disolvente en ácidos concentrados, con baja reactividad y de alto peso molecular constituida por N-acetil-D-glucosamina que son unidas por los enlaces B-D (1,4). La quitina después de la celulosa es la más abundante en la naturaleza, un carbohidrato que está presente en el caparazón (exoesqueleto) de los crustáceos brindándole protección y resistencia, presente también en las alas de algunos insectos, en los arácnidos, en órganos de otros animales y en las paredes celulares de los hongos brindándoles rigidez y evitar la deshidratación. La quitina es una molécula muy versátil que puede formar por si sola una estructura sólida e incluso combinarse con otros componentes y formar estructuras mucho más sólidas como los son las conchas (Zulay Mármol et al., 2011).
- f. Método biológico: En este método se utiliza bacterias ácido-lácticas para la fermentación de los desechos del langostino, es una alternativa considerada una opción ecológica verde debido a que usa microorganismos o enzimas para obtener quitina de la materia prima que son los desechos de los animales artrópodos. Además, en este proceso se hace una manipulación simple para contribuir al cuidado del medio ambiente. En muchas ocasiones se ha planteado como una solución a los diversos tratamientos marinos, pero hasta el día de hoy se encuentra muy poco explorado (Guevara, 2007).
- g. Método químico: este método es comúnmente más usado a nivel industrial, para obtener la quitina el residuo pasa por distintos procesos como: remoción del material inorgánico y la hidrólisis de proteína. Para la desproteinización se usa soluciones de NaOH a 65 y 100 °C durante 1 a 24 horas, esto depende del material a utilizar. En la desmineralización se busca remover el carbonato de calcio y del fosfato, para llevar a cabo este proceso se usa ácido acompañado con soluciones diluidas de HCL a una temperatura ambiente. Para la decoloración se usan solventes de etanol, acetona, cloroformo, agentes blanqueadores y también hipoclorito de sodio. En este método se necesitan grandes cantidades de energía y agua a comparación del método biológico, además de generar desperdicios corrosivos para la salud y el ambiente (Romero–Serrano, 2020).

- h. Tamizado: básicamente es la separación de partículas de distintos tamaños, método por el cual retiene las partículas de tamaño mayor y deja pasar las de menor tamaño, un tamiz posee mallas u orificios que son progresivamente decrecientes.
- i. Desproteínización: con el método biológico, este proceso consiste en la fermentación con bacterias ácido lácticas con el fin de separar la proteína del material biológico, usar microorganismos tiene como ventaja proteger las condiciones del medio ambiente y disminuir la degradación química, sin embargo, este proceso deja 1-8% de residuo de la proteína (Palma, 2017).
- j. Desmineralización: etapa complementaria donde utilizan bacterias con o sin ácido láctico con el fin de eliminar contenido mineral presentes en los residuos de los langostinos y crustáceos en general. El carbonato de calcio oscila entre 30% - 55%, fosfato de calcio 10% y también presenta carbonato de magnesio. Al finalizar el proceso de desmineralización es muy importante confirmar que la quitina haya sido lavada hasta el punto de neutralidad, para evitar la concentración y/o pérdida de ácido (Romero–Serrano, 2020).
- k. Despigmentación: los exoesqueletos de langostino presentan pigmentos de alto valor comercial, químicamente algunos de los pigmentos que contienen son la cantaxantina, luteína, astaxantina B-caroteno y la astacina. En el método químico los pigmentos son separados mediante extracciones del residuo con el uso de acetona, cloroformo, etanol, entre otros. Para los resultados, todo dependerá del objetivo que se persiga, por ello es muy importante la selección y adecuación de las condiciones experimentales para el proceso (Palma, 2017).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Tipo de investigación

El estudio fue experimental de tipo aplicado, donde se emplearon especies bacterianas para la degradación biológica de los desechos de langostino, y se consideraron y controlaron los parámetros de cantidad de inóculo, temperatura (que fue constante) y pH, en todo el proceso.

3.2. Población y muestra

La población estuvo constituida por la producción de desechos de langostino generados en las empresas acuícolas del distrito la Cruz- Tumbes. La muestra estuvo constituida de 1 kg de desecho de langostino recolectado.

3.3. Recolección de Muestra

Las muestras fueron tomadas de las empresas acuícolas del distrito La Cruz, fueron colocadas en bolsas con cierre hermético y transportadas a una temperatura de 4-10 °C, hacia el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Tumbes.

En la presente tesis se utilizaron las bacterias que corresponden al cepario del Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Tumbes. Las bacterias fueron aisladas de residuo de langostino, y fueron caracterizadas fenotípicamente como proteolíticas, lipolíticas y amilolíticas. Asimismo, las bacterias fueron identificadas molecularmente mediante secuenciamiento del gen 16S RNA.

3.4. Degradación biológica del residuo de langostino

3.4.1. Preparación del inóculo

Las bacterias 3DQ (*Pseudomona geniculata*) Y RDQ (*Stenotrophomonas maltophilia*) se reactivaron en caldo, y se sembraron en placas Petri con agar tripticasa soya, incubándose durante 48 horas. Ambas bacterias se sembraron en 40 ml de caldo LB, y se incubaron por 18 a 24 horas a 32°C con rotación orbital. De las

células obtenidas se procedió a lavarlas con solución salina fisiológica (SSF) estéril, y se centrifugaron a una velocidad de 10000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y se agregó SSF estéril, se homogenizó y nuevamente se centrifugó. Finalmente fueron resuspendidas en SSF estéril. La concentración de la suspensión bacteriana se ajustó a 600 nm para obtener un D.O 1,5-2,0 en espectrofotómetro.

3.4.2. Preparación de medio y la degradación por fermentación discontinua

En matraces de 100 ml se colocaron 50 ml del medio basal, con 10% de residuos seco de langostino, y se le agregó 2,5 ml de inóculo, que contenía un microorganismo distinto.

Se incubó a 32°C sobre un rotador orbital a 150 rpm por 14 días, los matraces fueron removidos cada 24 horas para medir el pH y tomar una muestra de 1 ml de sobrenadante para medir la cantidad de quitoooligómeros.

3.4.3. Proceso para medición de quitoooligómeros

Se utilizó el sobrenadante obtenido cada 24 horas (1 ml), así como el reactivo DNS (ácido 3,5, dentro salicílico). Se usó el espectrofotómetro UV-VIS a 540 nm, para determinar la cantidad de quitoooligómeros. Se usó como control la N-acetil glucosamina para diseñar la curva de calibración.

Preparación DNS (ácido dinitrosalicílico): Se pesó 4 gr de hidróxido de sodio y se disolvió en 100 ml de agua destilada. Una vez que se obtuvo una mezcla homogénea se añadió 75 gr de tartrato de sodio y potasio ACS y se completó con 200 ml de agua hasta obtener una muestra homogénea, luego se agregó 2.5 g de DNS y se enrasa a 250 ml en la fiola. Se colocó en un agitador por 24 horas cubriendo con papel aluminio. Pasada las 24 horas la muestra se filtró y se almacenó en un envase protegiéndose de la luz.

Curva de calibración: Para la preparación de la solución madre se pesó 4 mg de solución madre (0,004 g) de N acetil-glucosamina y se disolvió en 2 ml de agua destilada. Se colocaron las diferentes concentraciones

de la solución madre en tubos de ensayo (Tabla 2), y se mezcló con reactivo DNS. Las muestras se colocaron en baño maría a 96 °C por 5 minutos. Luego, los tubos se retiraron y se colocaron en hielo por 10 minutos, y se completó con agua. Con ayuda del equipo Espectrofotómetros UV/VIS y se hicieron las respectivas mediciones.

Medición de quitoooligómeros: En un microtubo se extrajo 1 ml de cada una de las muestras, y se centrifugo a 10000 durante 10 minutos. En tubos de ensayo se añadió 350 ul del sobrenadante, y 350 ul de DNS. Se llevaron a baño maría a 96 °C por 5 minutos, pasado ese tiempo se agregó 5 ml de agua destilada. Se consideró un blanco para la medición de la absorbancia en el UV-VIS. Esto se realizó cada 48 horas hasta completar los 14 días.

Tabla 2. Datos para la preparación de la curva de calibración.

código	mg/ml	sol. Madre	H2O	DNS	Total
Blanco	0	0	1000	1000	2000
C1	0,02	3,5	346,5	350	700
C2	0,2	35	315	350	700
C3	0,38	66,5	283,5	350	700
C4	0,56	98	252	350	700
C5	0,74	129,5	220,5	350	700
C6	0,92	161	189	350	700
C7	1,1	192,5	157,5	350	700
C8	1,28	224	126	350	700
C9	1,46	255,5	94,5	350	700
C10	1,64	287	63	350	700
C11	1,82	318,5	31,5	350	700

3.4.4. Medición del pH

Se usó el equipo potenciómetro (Metler-Toledo) para medir el pH de las muestras, diariamente por un período de 14 días.

3.4.5. Caracterización del producto

Transcurridos los 14 días de fermentación, se procedió a colectar el sobrenadante y el precipitado de cada matraz. El precipitado fue colectado con ayuda de un tamiz de 25 micras, se lavó varias veces

con agua destilada para eliminar las bacterias. Se llevó a 60 °C para su secado, hasta que tuvo un peso constante. Luego se analizó por los siguientes métodos:

Espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier (FT-IR): que permitió identificar especies químicas a través de la determinación de la frecuencia (número de ondas) a la que los distintos grupos funcionales presentan bandas de absorción en el espectro.

Difracción de rayos X: permite determinar la cristalinidad de la quitina obtenido de la degradación bacteriana.

3.5. Plan de procesamiento y análisis de datos

Se procedió a organizar los datos en una tabla de frecuencias con el programa estadístico Microsoft Excel 2020, lo cual permitirá acceder y tramitar de una manera fácil la base de datos, con el fin de analizarlos, obtener porcentajes determinantes y representarlos gráficamente para los resultados de la presente investigación.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis superficial – rendimiento

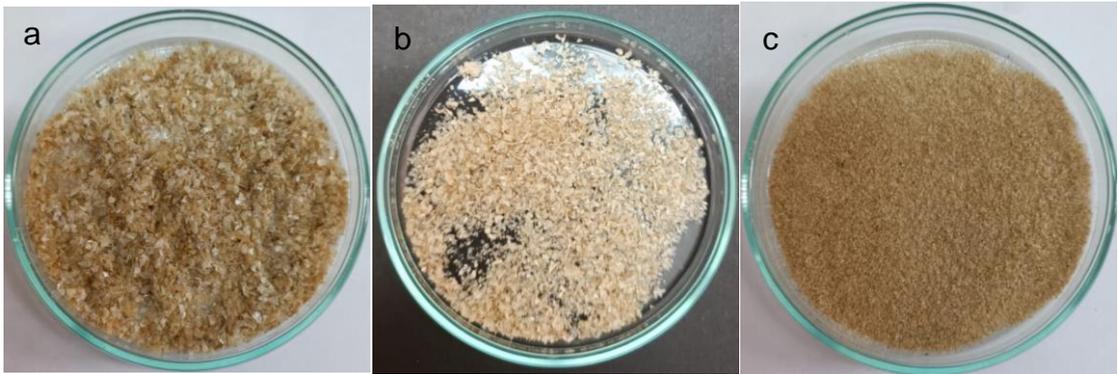


Figura 2. Residuos de exoesqueleto de langostino. (a) Antes del tratamiento, (b) después del tratamiento, (c) después del tratamiento secado, molido y tamizado.

Las muestras del residuo de langostino fueron pesadas al inicio y final de la ejecución del proyecto. En Figura 2 se logra apreciar cómo cambio su textura y color, antes del tratamiento (a) todas las muestras tenían partículas más gruesas y por tanto un peso mucho mayor. Al finalizar con el tratamiento (b) el peso disminuyó al igual que el tamaño de las partículas. Para caracterizar las muestras, el residuo luego de ser secado en estufa fue molido, y se pasó por tamiz de tamaño de poro de 0,5 mm (c), donde obtenemos como resultado partículas más pequeñas que al inicio.

A continuación, en la Tabla 3 se muestra la diferencia de pesos del residuo al inicio y final del tratamiento, así como sus respectivos rendimientos. Se observa que las muestras tratadas con la cepa 3DQ, son las que ostentan los rendimientos más altos con rendimientos de 53 y 56% para la primera y segunda repetición respectivamente, sin embargo, no se evidencia mucha diferencia entre los rendimientos dados por la cepa RDQ, siendo estos del 51% para ambas repeticiones.

Tabla 3. Diferencia de pesos y rendimientos de la degradación por fermentación discontinuas de las bacterias.

Muestra	Peso inicial (gr)	Peso final (gr)	Rendimiento (%)
3DQ-1	5,00	2,63	53%
3DQ- 2	5,00	2,80	56%
RDQ-1	5,00	2,57	51%
RDQ-2	5,00	2,57	51%

En la Figura 3 se puede apreciar la diferencia de las muestras del día 01 hasta el día 14, a medida que avanzaban los días la muestra cambiaba de un color claro a uno oscuro, también hay diferencia en el olor, ya que era un poco más intenso a medida que el color era más oscuro.

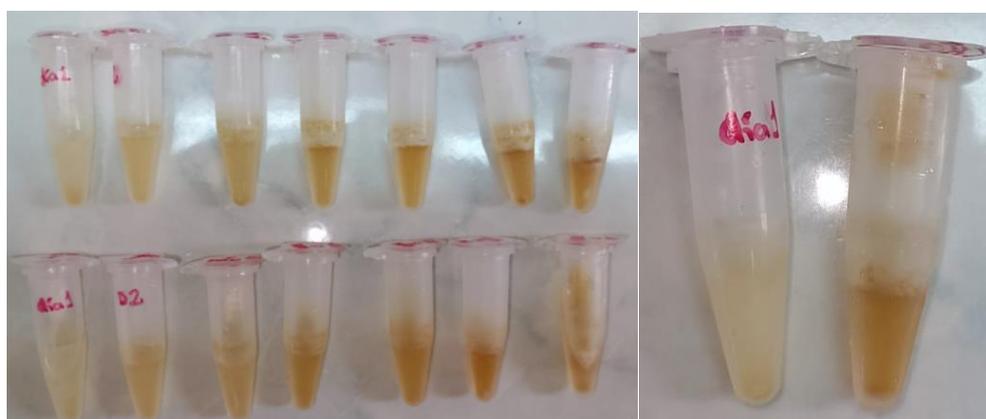


Figura 3. Muestras del sobrenadante durante el tratamiento.

4.2. Resultados de Quitooligómeros

Tabla 4. Resultados de prueba de calibración de quitooligómeros.

Código	R1	R2	R3	Ads.	mg/ml
C1	0,0026	0,0019	0,0019	0,0021	0,02
C2	0,0680	0,0684	0,0680	0,0681	0,20
C3	0,1424	0,1423	0,1426	0,1424	0,38
C4	0,2108	0,2111	0,2116	0,2112	0,56
C5	0,2924	0,2922	0,2922	0,2923	0,74
C6	0,3536	0,3546	0,3549	0,3544	0,96
C7	0,4747	0,4750	0,4756	0,4751	1,10
C8	0,5567	0,5554	0,5570	0,5564	1,28
C9	0,6181	0,6184	0,6189	0,6185	1,46
C10	0,7337	0,7341	0,7337	0,7338	1,64
C11	0,8497	0,8506	0,8511	0,8505	1,82

Las mediciones de las concentraciones preparadas con el estándar (Tabla 4) sirvieron como base para graficar la curva de calibración, y a través de ésta evaluar el contenido de quitooligómeros en los sobrenadantes de cada una de las muestras de fermentación. Como estándar se utilizó la N-acetil glucosamina debido a que la quitina está compuesta por monómeros de N-acetil glucosamina (Subramanian et al., 2020).

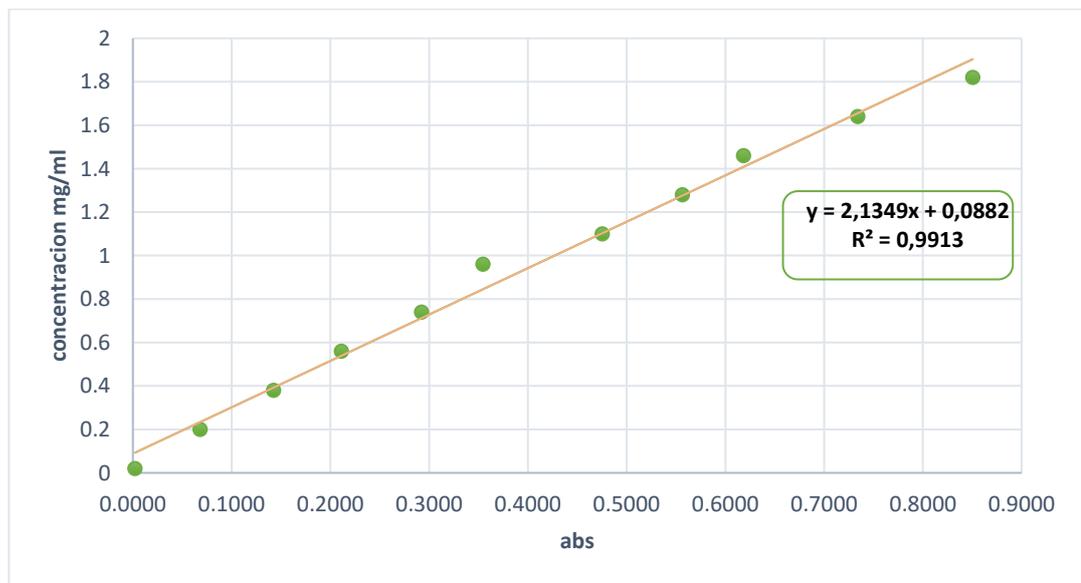


Figura 4. Curva de calibración quitooligómeros.

En Figura 4, se muestran los resultados en la gráfica indican que las preparaciones de las muestras son correctas, dando como resultado un coeficiente de determinación $R^2 = 0,9913$ con estos datos se pueden medir las muestras de langostino.

Medición de quitooligómeros de langostino

Por el transcurso de 14 días, de forma interdiaria, se realizaron las mediciones de quitooligómeros de langostino, del cual obtuvimos los siguientes resultados:

En la Tabla 5 podemos observar que la muestra 3DQ-1 en el día 01 tuvo un valor de 0,30 mg/ml, y al día 02 este valor aumentó, sin embargo, en el día 05 el valor disminuyó para que en el día 07 incremente nuevamente y sea el valor más alto de los obtenidos durante los ocho de la fermentación. En los siguientes días este valor disminuyó y aumentó como al inicio del

experimento, teniendo un comportamiento oscilante. De forma similar, en su réplica 3DQ-2, el valor más alto de quitoooligómeros se obtuvo en el día 07, mientras que en el resto de los días este valor decrece y asciende.

Tabla 5. Promedio de medición de quitoooligómeros.

Días	3DQ-1	3DQ-2	RDQ-1	RDQ-2
Día 01	0,303709719	0,359948644	0,341486945	0,33639367
Día 03	0,341241583	0,379330213	0,326121060	0,33600422
Día 05	0,296368095	0,418044323	0,291373386	0,30785455
Día 07	0,557407557	0,637375405	0,545608291	0,5456827
Día 09	0,499183844	0,507014086	0,519429988	0,50701409
Día 11	0,556790001	0,494512242	0,523914007	0,59719454
Día 13	0,480467782	0,548347765	0,520453898	0,48767795
Día 14	0,548074129	0,522793784	0,561859695	0,51528517

Por otro lado, en el caso de la muestra RDQ-1 en el día 01 se obtuvo una concentración de quitoooligómeros de 0,34 mg/ml, este valor decreció durante los 5 días para incrementarse en el 07 e ir disminuyendo y aumentando como la muestra 3DQ. En el día 14 este obtuvo su valor más alto con 0,56 mg/ml. En el caso de la muestra RDQ-2 a diferencia de RDQ-1, presentó una concentración de quitoooligómeros más alta en el día 11 con 0,59 mg/ml, los siguientes días decrece y aumenta al igual que las otras muestras.

Los quitoooligómeros también llamados oligómeros, son definidos como co-oligómeros lineales que se obtienen por medio de la degradación química, enzimática, física de la quitina y su derivado el quitosano (Castañeda Ramírez et al., 2011).

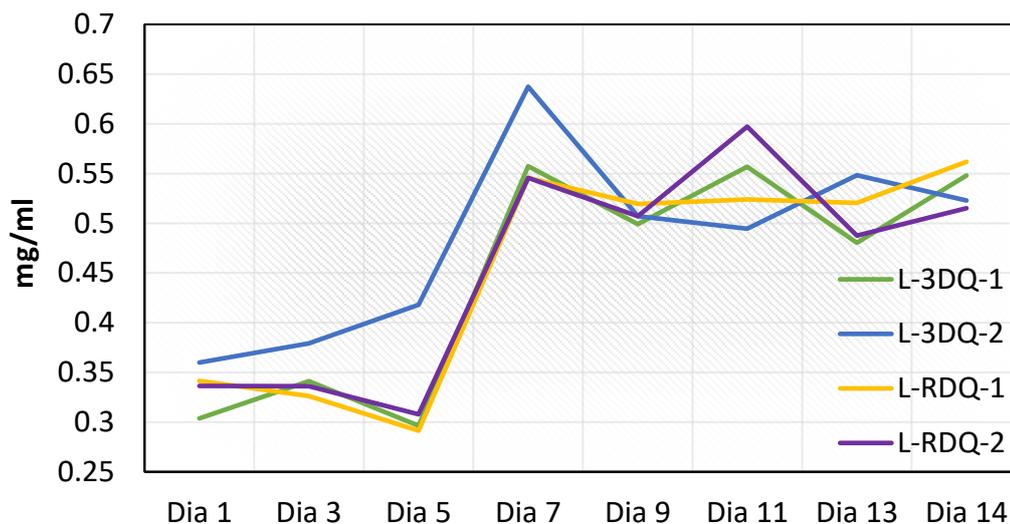


Figura 5. Resultado de medición de quitooligómeros.

La Figura 5 nos indica la variación de producción de quitooligómeros en el transcurso de los días, resaltando que hubo una disminución en el día 5, presentando un aumento máximo en el día 7, para luego mantenerse constante en un rango de 0,6 a 0,5 mg/ml de producción de quitooligómeros.

Al comparar datos, observamos que las muestras de medición de quitooligómeros en el día 01 tenemos en promedio 0,30 mg/ml y en el día 14 con 0,56 mg/ml, además, observamos que los datos se encuentran en el rango C5 y C8 de la curva de calibración.

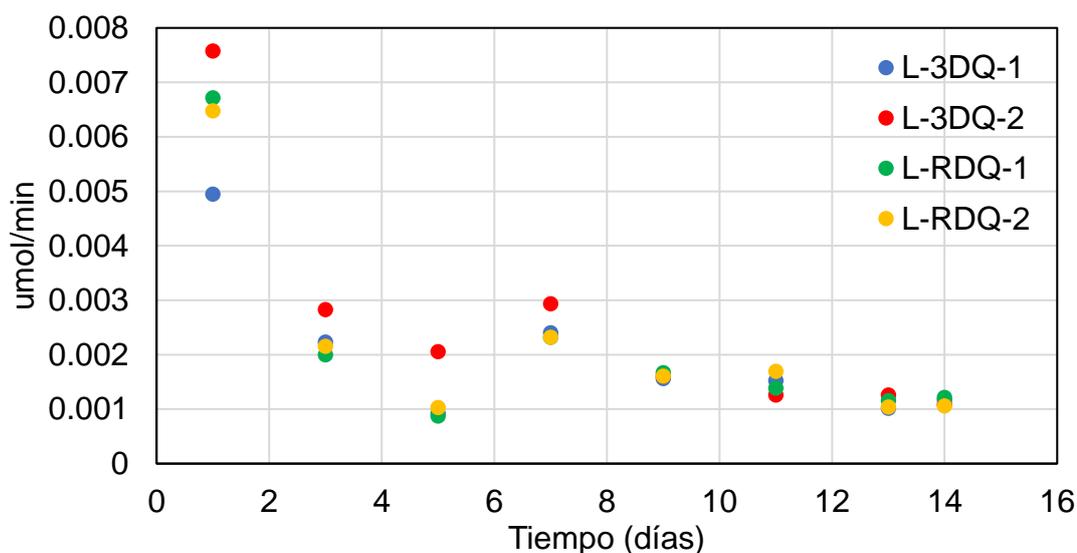


Figura 6. Actividad enzimática de quitooligómeros.

La Figura 6 nos indica la actividad enzimática máxima durante la fermentación del residuo de langostino. La obtención de quitoooligómeros, demuestra de forma indirecta que las quitinasas están actuando sobre el residuo, por lo tanto, son las responsables de su producción. A mayor cantidad de quitinasas mayor será la degradación y producción de quitoooligómeros.

La muestra 3DQ-2 presentó un mejor resultado, durante los 14 días se mantuvo una actividad enzimática por encima de las demás con una disminución en el día 11. Las muestras 3DQ-1, RDQ-1 y RDQ-2 no presentan mucha diferencia en sus resultados.

Es complicado comparar resultados de actividad enzimática y rendimiento de la producción de quitoooligómeros debido a la escasez de trabajos y de información con referencia a este tema.

4.3. Resultado de medición de pH

Tabla 6. Medición del pH cada 24 horas.

Días	3DQ-1	3DQ2	RDQ-1	RDQ-2
Día 1	8,20	8,20	8,21	8,24
Día 2	8,43	8,50	8,52	8,54
Día 3	8,62	8,64	8,65	8,66
Día 4	8,68	8,74	8,74	8,73
Día 5	8,75	8,95	8,89	8,78
Día 6	9,03	9,14	8,96	8,98
Día 7	9,16	9,20	9,22	9,22
Día 8	9,19	9,21	9,26	9,25
Día 9	9,23	9,21	9,30	9,28
Día 10	8,96	9,18	8,90	9,26
Día 11	8,92	8,79	9,00	8,88
Día 12	9,04	8,905	9,25	8,995
Día 13	9,16	9,02	9,25	9,11
Día 14	9,21	9,19	9,32	9,24

En la Tabla 6, se observan las mediciones de pH de los tratamientos durante 14 días. El día 0 el valor inicial del pH fue de 7 (neutro), en el transcurso de los días el valor iba aumentando progresivamente hasta el día 10 donde se observa una disminución del pH, en el día 12 volvió a aumentar nuevamente para mantenerse en aumento progresivo.

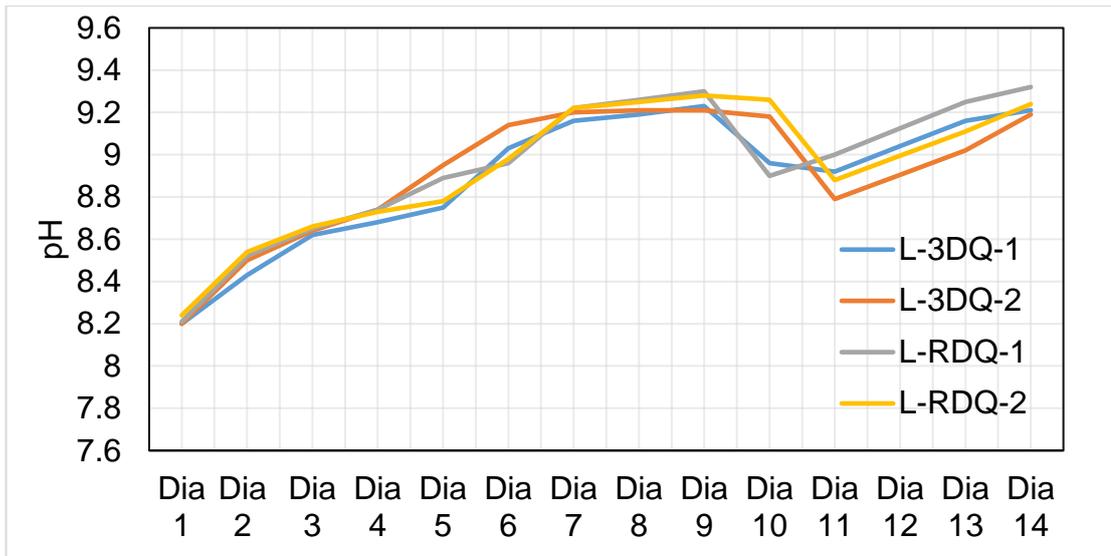


Figura 7. Comportamiento del pH durante la degradación biológica del residuo de exoesqueleto de langostino.

Durante los 14 días los valores de pH oscilaron entre 8,21 y 9,32 siendo un pH básico, esto podría indicar un crecimiento bacteriano, debido a que, durante la degradación del residuo para formación de la quitina, los microorganismos liberan acetato y NH_3 , de esta manera aumentan los niveles de pH llegando a ser básico (Keyhani & Roseman, 1999).

4.4. Resultados de análisis de grupos funcionales

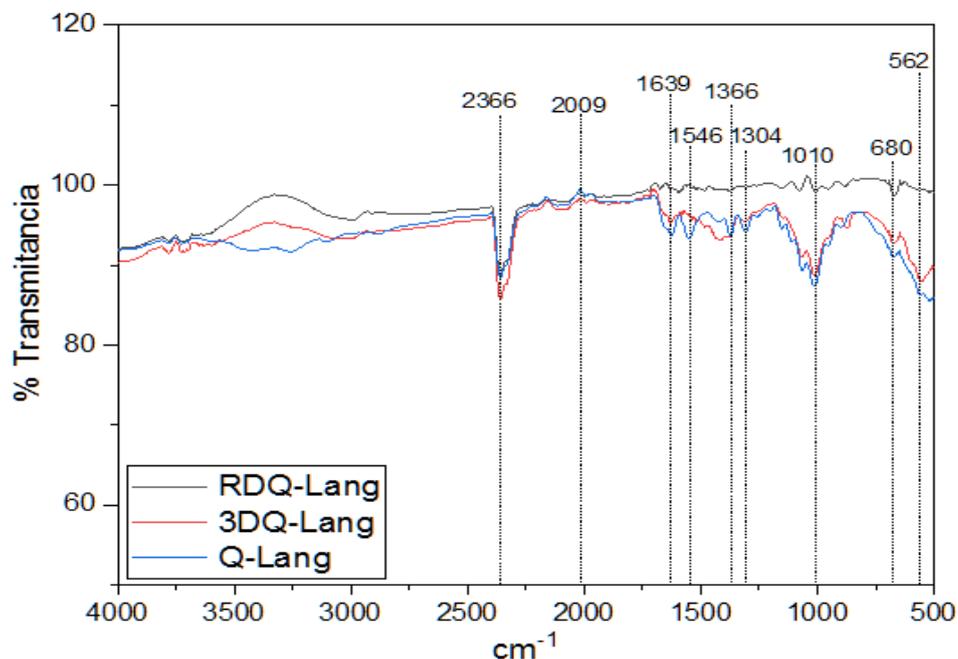


Figura 8. Resultado del análisis de grupos funcionales mediante FTIR de las muestras RDQ, 3DQ y Quitina de langostino (Q-Lang).

El método FTIR nos permite identificar los grupos funcionales en moléculas orgánicas, confirmar la identidad de un compuesto, y estudiar la formación de enlaces de hidrogeno, entre otras. En la Figura 8, el pico 2366 cm^{-1} pertenece a un estiramiento C-H refiriéndose al grupo $-\text{CH}_3$, para un estiramiento del grupo carbonilo (C=O) se le atribuye la banda 1639 cm^{-1} . Finalmente, para la banda 1010 cm^{-1} es atribuida a un estiramiento C-O-C.

Para comparar los resultados obtenidos de las muestras por FTIR, se ha tomado como referencia a Barros et al. (2015), debido a que, en los resultados de sus muestras, poseen bandas con picos de 3258 cm^{-1} que pertenecen a una combinación de estiramiento de OH de la quitina. En las bandas 1654 cm^{-1} y 1069 cm^{-1} se muestran bandas que son relacionadas a las vibraciones de las amidas I, II y III. Finalmente se observaron bandas agudas de una intensidad mediana de 951 cm^{-1} y 894 cm^{-1} , estas son pertenecientes al enlace 1 y 4 y confirmando con la banda de 3259 cm^{-1} se destacó al grupo OH del polisacárido quitina.

La región de 2366 cm^{-1} a 2874 cm^{-1} pertenece a las vibraciones del enlace C-H, este enlace es propio de los grupos funcionales de quitina $-\text{CH}_2$. Por

último, en la región 1647 cm^{-1} se muestra una absorción de una moderada intensidad perteneciente al estiramiento del enlace $\text{C}=\text{O}$ que es propio del grupo funcional amida primaria (Valderrama et al., 2010).

4.5. Resultados de difracción rayos X

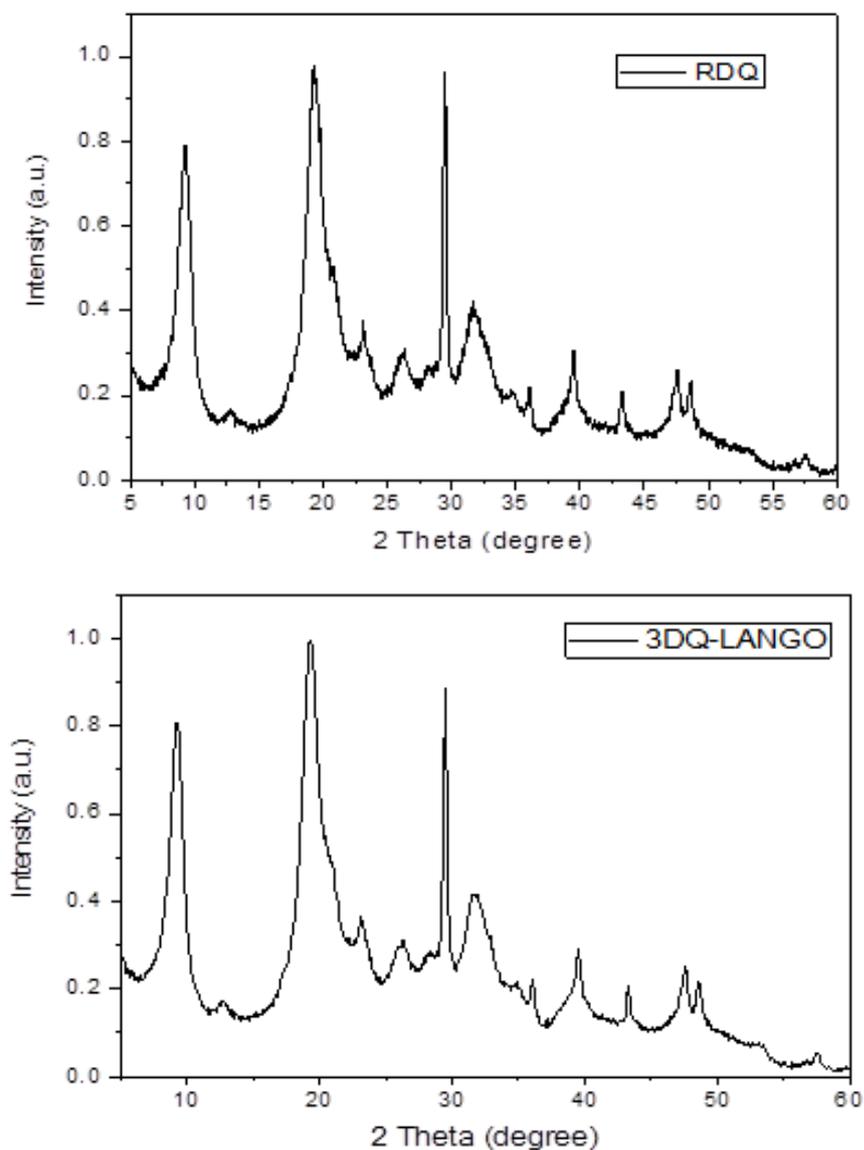


Figura 9. Análisis de difracción de rayos X de las muestras RDQ, 3DQ.

Las muestras 3DQ y RDQ mostraron resultados similares. Estas exhibieron un pico cristalino aproximadamente a $2\theta = 9^\circ$ que son propios de los biopolímeros quitina (Sáenz et al., 2019), y se observa un segundo pico mucho más intenso que los otros de $2\theta = 19-20^\circ$ y un tercer pico de $2\theta = 29^\circ$.

Además, se aprecian otros picos menos agudos (14° , 24° , 26° , 32° , 39°). La difracción de rayos x permiten la caracterización de distintos materiales cristalinos para obtener información sobre su estructura. Los enlaces por puentes de hidrógeno entre las cadenas de quitina ponen en evidencia la existencia en la naturaleza de tres formas cristalinas: α , β y γ (Escobar et al., 2011). La α quitina es la más abundante, por ello continuamente es estudiada por difracción de rayos x (Rodríguez et al., 2010).

En las tres formas cristalinas, los picos de $2\theta = 9^\circ$ y 19° - 20° son los más pronunciados, el segundo es de mayor intensidad para la quitina. Los picos de cristalinidad de $2\theta = 9^\circ$ y 19° - 20° según (Quiroga et al., 2020) pueden indexarse como 110 y 010 donde evidencian la estructura típica de quitina.

En las muestras 3DQ y RDQ, los patrones de difracción corresponderían a una quitina tipo α , propio de la quitina extraídas del exoesqueleto de langostino (Neith, 2010). Los tipos de cristalinidad de cada especie son distintos, posiblemente se debe a el método empleado en el proceso de separación de los compuestos que interactúan con la quitina. Estos resultados nos indica la reflectancia característica de cristalinidad de cada biopolímero, para los picos de menor y mayor intensidad vistos en los gráficos.

Las bacterias *P. geniculata* (3DQ) y *S. maltophilia* (RDQ) son productoras de quitinasas (Gopalakrishnan et al., 2015; Shaikh et al., 2018), las cuales son enzimas hidrolíticas que descomponen la quitina en monómeros de N-acetil glucosamina y oligómeros (Stoykov et al., 2015). Estas bacterias se usaron en la degradación del exoesqueleto de langostino para la obtención de quitina mostraron resultados favorables y similares entre ambas cepas, sin embargo, el residuo al finalizar la fermentación discontinua no se llegó a consolidar como quitina debido a que los picos presentados no llegan a ser similares al control de quitina empleado. En el caso de *P. geniculata* (3DQ) no se ha encontrado referencias respecto a su uso para la obtención de quitina, no obstante, el género *Pseudomonas* reporta diversas investigaciones en la bioconversión de residuos quitinosos, específicamente con *P. aeruginosa* (Ghorbel-Bellaaj et al., 2011; Sedaghat et al., 2017) y *P. fluorescens* (C.-L. Wang et al., 2004; S. L. Wang et al., 2005).

Por otro lado, se reporta la eficiencia de *S. maltophilia* (RDQ) para la obtención de quitina (Subramanian et al., 2022). Subramanian et al. mencionan que esta bacteria posee potencial productor de quitinasa, obteniendo una actividad específica de 5,01 $\mu\text{mol/ml}$ durante 5 días en un pH y temperatura óptima de 6,5 y 30-50°C, respectivamente. Estos datos difieren con lo encontrado en esta investigación donde se reportó una actividad de quitinasa de 0,0067 $\mu\text{mol/ml}$ a las 24h, disminuyendo hasta 0,0010 $\mu\text{mol/ml}$ al día 14 de la degradación por fermentación discontinua, esto podría deberse a los valores de pH presentados al final del proceso. La actividad de la quitinasa ha sido estudiada por Jabeen et al. (2018) observando que la actividad máxima de las quitinasas se produce a pH 5 y disminuye al aumentar el pH, llegando a ser nulo en pH 11. De igual manera, Thimoteo et al. (2017) declararon que el intervalo de pH de 5 a 7.5 es óptimo para la actividad de la quitinasa y que la temperatura también afecta esta actividad enzimática. En esta investigación el pH que se obtuvo fue alcalino, contradictoriamente a las investigaciones anteriormente citadas, lo cual podría también explicar que el pH de nuestros batch son valores altos para una eficiente actividad de las quitinasas.

Por otro lado, algunas investigaciones realizan una fermentación sucesiva en dos partes como en el caso de Xie et al. (2021) usando inicialmente una cepa productora de ácido láctico (*Lactobacillus acidophilus*) seguido de una cepa productora de proteasa (*Exiguobacterium profundum*) para extraer la quitina de los caparazones de los camarones. En el caso de la fermentación con *L. acidophilus* suele iniciarse con un pH 8 debido a que muchos de los péptidos y aminoácidos generan una capacidad amortiguadora en el proceso de la hidrólisis de proteasa del residuo, el pH disminuye drásticamente debido al ácido láctico, producido por *L. acidophilus* alimentado por las fuentes de carbohidratos disponibles disolviendo CaCO_3 y obteniendo lactato de calcio soluble en agua. En el caso de la fermentación con *E. profundum* tuvo una alta actividad proteolítica a las 96 h de fermentación indicando que la proteasa podría hidrolizar las proteínas del residuo y obtener fuentes de carbono y nitrógeno hidrolizado, convirtiéndose en un proceso clave para la extracción de quitina. Obteniendo que la fermentación sucesiva en dos pasos recupera 47,8% de quitina y tiene un rendimiento del 16,3%. El uso de la fermentación

en dos pasos podría usarse para la extracción de quitina, para acelerar el proceso; sin embargo, en este experimento se buscó emplear 1 o 2 bacterias que realicen el trabajo en 1 solo paso, y las bacterias utilizadas crecen en un pH neutro o básico.

V. CONCLUSIONES

1. Las bacterias usadas en la fermentación discontinua redujeron el residuo en un 50% en peso siendo muy similares entre sí, además, se observó cambios en textura y color.
2. En los quitoooligómeros, se observó un comportamiento oscilante en días no consecutivos, sin embargo, se obtuvieron datos favorables debido a que los oligómeros se obtienen a partir de la degradación enzimática y física del residuo de langostino.
3. El pH aumentó durante todo el tratamiento con disminución en días no consecutivos, lo cual evidenció un adecuado crecimiento bacteriano.
4. La caracterización mediante FTIR presentó estiramiento en algunas bandas características de la quitina, de igual manera, en la difracción de rayos x presento picos cristalinos propios de los biopolímeros de quitina, sin embargo, no se llega a consolidar la quitina como tal.
5. Las bacterias *P. geniculata* (3DQ) y *S. maltophilia* (RDQ) obtuvieron resultados favorables para la degradación de la quitina mediante fermentación discontinua, sin embargo, no se llegó a consolidar la quitina como tal, haciendo suponer que los valores de pH podrían haber estado muy elevados reduciendo la actividad enzimática.

VI. RECOMENDACIONES

En esta investigación se llegan a las siguientes recomendaciones:

1. Realizar las pruebas de degradación durante un periodo más extenso de tiempo, con un periodo de tiempo más largo sería posible la obtención de quitina.
2. Mejorar la efectividad y acelerar el proceso de fermentación para la obtención de quitina.
3. Realizar ensayos para cuantificar la quitina mediante espectroscopia de masas con plasma acoplado.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Ahmad, S. I., Ahmad, R., Khan, M. S., Kant, R., Shahid, S., Gautam, L., Hasan, G. M., & Hassan, M. I. (2020). Chitin and its derivatives: Structural properties and biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 526–539. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.098>.
- Barros, Israel, Guzmán, Luis y Tarón, Arnulfo. (2015). extracción y comparación de la quitina obtenida a partir del caparazon de *Callinectes sapidus* Y *Penaeus vannameis*. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica* , 18 (1), 227-234. Recuperado el 10 de junio de 2022, de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262015000100026&lng=en&tlng=es.
- Briceño, J., & de Montiel, N. (2008). Recuperación de quitina a partir de los residuos sólidos generados del procesamiento industrial de crustáceos. *Revista Cubana de Química*, 20(3), 17–26.

<https://www.redalyc.org/pdf/4435/443543715003.pdf>.
- Berghoff, C. F. (2011). Desarrollo y caracterización de matrices compuestas Quitosano/Polímero sintético para regeneración de tejido óseo (Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata).
- Castañeda Ramírez, C., De la Fuente Salcido, N. M., Pacheco Cano, R. D., Ortiz-Rodríguez, T., & Barboza Corona, J. E. (2011). Potencial de los quitooligosacáridos generados de quitina y quitosana. *Acta Universitaria*, 21(3), 14–23. <https://doi.org/10.15174/au.2011.16>.
- Colina, M., Ayala, A., Rincón, D., Molina, J., Medina, J., Ynciarte, R., ... & Montilla, B. (2014). Evaluación de los procesos para la obtención química de quitina y quitosano a partir de desechos de cangrejos. Escala piloto e industrial. *Revista Iberoamericana de polímeros*, 15(1), 21-43. <https://reviberpol.files.wordpress.com/2019/07/2014-colina.pdf>.

- Cusihuamán Noa, S., Talavera Núñez, M. E., Arenas Chávez, C., Pacheco Salazar, D. G., & Vera Gonzales, C. (2018). Caracterización por técnicas espectroscópicas del O-Carboximetilquitosano obtenido por derivatización del quitosano. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 84(2), 204-216.
- Dliyauddin, M., Ardyati, T., & Suharjono. (2019). Evaluation of enzymatic activity and identification of potent proteolytic and chitinolytic bacteria isolated from crab shell waste. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21(1). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210127>.
- Doan, C. T., Tran, T. N., Nguyen, V. B., Vo, T. P. K., Nguyen, A. D., & Wang, S.-L. (2019). Chitin extraction from shrimp waste by liquid fermentation using an alkaline protease-producing strain, *Brevibacillus parabrevis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 131, 706–715. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.117>.
- Durán Olvera, J. M., Magaña Pérez, G., Ayala Tirado, R. C., García Gómez, R. S., Amábilis Sosa, L. E., Durán Domínguez de Bazúa, M. D. C., & Solís Fuentes, J. A. (2017). Uso de quitina y quitosana procedentes de residuos de camarón en la purificación de jugos de caña (*saccharum officinarum*). *Química Central*, 5(1), 27–40. <https://doi.org/10.29166/quimica.v5i1.1221>.
- Escobar Sierra, Diana Marcela, Urrea Llano, Carlos Alberto, Gutiérrez Guerra, Mariana, & Zapata Ocampo, Paola Andrea. (2011). Producción de matrices de quitosano extraído de crustáceos. *Revista Ingeniería Biomédica*, 5(9), 20-25.
- García Zavala, C. A. (2017). Obtención de quitosano a partir de exoesqueleto de langostino blanco (*litopenaeus vannamei*), para el tratamiento de efluentes industriales. (Tesis de Pregrado, Universidad Señor de Sipán).
- Ghorbel-Bellaaj, O., Jellouli, K., Younes, I., Manni, L., Ouled Salem, M., & Nasri, M. (2011). A Solvent-Stable Metalloprotease Produced by *Pseudomonas aeruginosa* A2 Grown on Shrimp Shell Waste and Its Application in Chitin Extraction. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164(4), 410–425. <https://doi.org/10.1007/s12010-010-9144-4>.
- Gopalakrishnan, S., Srinivas, V., Prakash, B., Sathya, A., & Vijayabharathi, R.

- (2015). Plant growth-promoting traits of *Pseudomonas geniculata* isolated from chickpea nodules. *3 Biotech*, 5(5), 653–661. <https://doi.org/10.1007/S13205-014-0263-4/FIGURES/1>
- Graciano León, F., Vásquez Mori, J., & Reyes Avalos, W. E. (2021). La dureza total del agua afecta la muda, calcificación, crecimiento y supervivencia de *Cryphiops caementarius* (Palaemonidae). *Acta Biológica Colombiana*, 27(1). <https://doi.org/10.15446/abc.v27n1.89933>.
- Guevara, L. soro. (2007). *generalidades de quitina y quitosano*. [https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/13332/3/Tesis capitulo 1.pdf](https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/13332/3/Tesis%20capitulo%201.pdf)
- Innovacion, programa nacional de pesca y acuicultura (PNIPA). (2021). *cadena de valor de langostino*. <https://pnipa.gob.pe/wp-content/uploads/2021/04/cadena-de-valor-del-langostino-PNIPA-2021.pdf>.
- Jabeen, F., Hussain, A., Manzoor, M., Younis, T., Rasul, A., & Qazi, J. I. (2018). Potential of bacterial chitinolytic, *Stenotrophomonas maltophilia*, in biological control of termites. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 28(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S41938-018-0092-6/FIGURES/10>
- Kumar, A., Kumar, D., George, N., Sharma, P., & Gupta, N. (2018). A process for complete biodegradation of shrimp waste by a novel marine isolate *Paenibacillus* sp. AD with simultaneous production of chitinase and chitin oligosaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.024>.
- Morán, B. (2017). Evaluación de impactos ambientales en la Bahía Puerto Pizarro de la región Tumbes año 2014 (Doctoral dissertation, Tesis Doctoral de Ciencias Ambientales. Universidad Nacional de Tumbes. Perú).
- Rosero Narváez, C. J. (2019). Bioconversión de desechos de crustáceos mediante fermentación láctica y maloláctica para la obtención de quitosano (Tesis pregrado, Quito: UCE).
- Neith Aracely Pacheco Lopez. Extracción biotecnológica de quitina para la producción de quitosanos : caracterización y aplicación. *Food and Nutrition*.

Université Claude Bernard - Lyon I; Université autonome métropolitaine (Universidad Autónoma Metropolitana).

Nizama Lazo, D. R. (2014). Valoración de residuos crustáceos para concretos de baja resistencia (Tesis pregrado, Universidad de Piura). <https://hdl.handle.net/11042/2194>.

Pacheco Lopez, N. A. (2013). *extracción biotecnologica de quitina para la producción de quitosanos: caracterización y aplicación*. (Tesis doctoral, Universidad Autonoma Metropolitana) <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00807945/document>.

Pacheco, N., Garnica-Gonzalez, M., Gimeno, M., Bárzana, E., Trombotto, S., David, L., & Shirai, K. (2011). Structural Characterization of Chitin and Chitosan Obtained by Biological and Chemical Methods. *Biomacromolecules*, 12(9), 3285–3290. <https://doi.org/10.1021/bm200750t>.

Palma, E. T. (2017). *Evaluación del quitosano obtenido a partir de escamas de la trucha arco iris (oncorhynchus mykiss) por metodos quimicos y biológico*. (Tesis doctoral, Universida Nacional San Agustin).

PNIPA. (2020). residuos del langostino y conchas de abanico pueden mejorar calidad de agua para uso acuicola. *Programa Nacional de Innovación de Pesca y Acuicultura*. <https://pnipa.gob.pe/residuos-del-langostino-y-conchas-de-abanico-mejoran-calidad-del-agua/>

PRODUCE. (2019). *anuario estadístico pesquero y acuícola*. file:///C:/Users/usuario/Downloads/Anuario_Estadistico_Pesca_y_Acuicultura_2019.pdf

PROMPERÚ. (2020). *Desenvolvimiento del comercio exterior pesquero y acuicola en el Perú*. <https://www.siicex.gob.pe/siicex/resources/sectoresproductivos/desenvolvimiento-comerico-exterior-pesquero-acuicola-en-peru-informe-anual-2019-v2.pdf>

Quiroga Ariza, L., Vega Prieto, J., & Gil Padilla, L. (2020). Evaluación metodológica del proceso químico extractivo de quitina y quitosano en latinoamérica. *Ingenio Magno*, 10(1), 180-194.

- Rivas–González, M., Zamudio–Flores, P. B., & Bello–Pérez, L. A. (2009). Effect of the acetylation degree on the morphological and physicochemical characteristics of banana starch. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 8(3), 291–297.
- Rodríguez Hamamura, Nadia, Valderrama Negrón, Ana, Alarcón Cavero, Hugo, & López Milla, Alcides. (2010). Preparación de partículas de quitosano reticuladas con tripolifosfato y modificadas con polietilenglicol. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 76(4), 336-354.
- Romero–Serrano, A., & Pereira, J. (2020). Estado del arte: Quitosano, un biomaterial versátil. Estado del Arte desde su obtención a sus múltiples aplicaciones. *Revista INGENIERÍA UC*, 27(2), 118-135.
- Sáenz-Mendoza, Alma & Zamudio-Flores, Paul & G.A, Palomino-Artalejo & Tirado-Gallegos, Juan & V.G, García-Cano & Ornelas-Paz, José & Rios, Claudio & Vargas-Torres, Apolonio & Salgado-Delgado, R. & Aparicio-Saguilán, Alejandro. (2019). Physicochemical, morphological and structural characterization of the chitin and chitosan of *Tenebrio molitor* and *Galleria mellonella* insects. *Revista mexicana de ingeniería química*. 18. 39-56.
- Sánchez Suárez, H., Domínguez, F. F., Ochoa Mogollón, G., & Alfaro Aguilera, R. (2017). Aislamiento de Bacterias Ácido Lácticas a partir del Tracto Digestivo del Lechón. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 28(3), 730. <https://doi.org/10.15381/rivep.v28i3.13372>
- Sasi, A., Duraipandiyar, N., Marikani, K., Dhanasekaran, S., Al-Dayyan, N., & Venugopal, D. (2020). Identification and Characterization of a Newly Isolated Chitinase-Producing Strain *Bacillus licheniformis* SSCL-10 for Chitin Degradation. *Archaea*, 2020, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2020/8844811>
- Sedaghat, F., Yousefzadi, M., Toiserkani, H., & Najafipour, S. (2017). Bioconversion of shrimp waste *Penaeus merguensis* using lactic acid fermentation: An alternative procedure for chemical extraction of chitin and chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 883–888. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.099>

- Shaikh, S. S., Wani, S. J., Sayyed, R. Z., Thakur, R., & Gulati, & A. (2018). Production, purification and kinetics of chitinase of *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from rhizospheric soil. In *Indian Journal of Experimental Biology* (Vol. 56). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Sirvas-Cornejo, Susana, & Perochena-Escalante, Eduardo. (2020). Biotechnological recovery of chitin from crustacean waste. *Revista Peruana de Biología*, 27(1), 95-102. <https://dx.doi.org/10.15381/rpb.v27i1.17586>
- Solano Romero, J.F. (2017) Obtención de quitosano a partir del exoesqueleto del camarón (infraorden caridea) (trabajo de titulación). UTMACH, Unidad Académica de Ciencias Químicas Y De La Salud, Machala, Ecuador. 54 p. <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/11382>
- Stoykov, Y. M., Pavlov, A. I., & Krastanov, A. I. (2015). Chitinase biotechnology: Production, purification, and application. *Engineering in Life Sciences*, 15(1), 30–38. <https://doi.org/10.1002/ELSC.201400173>
- Subramanian, K., Balaraman, D., Panangal, M., Nageswara Rao, T., Perumal, E., Amutha, R., Kumarappan, A., Sampath Renuga, P., Arumugam, S., Thirunavukkarasu, R., Aruni, W., & Yousef AlOmar, S. (2022). Bioconversion of chitin waste through *Stenotrophomonas maltophilia* for production of chitin derivatives as a Seabass enrichment diet. *Scientific Reports* 2022 12:1, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08371-1>
- Subramanian, K., Sadaippan, B., Aruni, W., Kumarappan, A., Thirunavukkarasu, R., Srinivasan, G. P., Bharathi, S., Nainangu, P., Renuga, P. S., Elamaran, A., Balaraman, D., & Subramanian, M. (2020). Bioconversion of chitin and concomitant production of chitinase and N-acetylglucosamine by novel *Achromobacter xylosoxidans* isolated from shrimp waste disposal area. *Scientific Reports*, 10(1), 11898. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68772-y>
- Taboada Silva, J. C. (2019). *Incidencias de tallas por cosecha en Litopenaeus vannamei "(Bonne 1931) "langostino Blanco" procesado en la empresa marinasol-Tumbes*. (Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Piura)
- Thimoteo, S. S., Glogauer, A., Faoro, H., de Souza, E. M., Huergo, L. F.,

- Moerschbacher, B. M., & Pedrosa, F. O. (2017). A broad pH range and processive chitinase from a metagenome library. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 50(1). <https://doi.org/10.1590/1414-431X20165658>
- Tsurkan, M. V., Voronkina, A., Khrunyk, Y., Wysokowski, M., Petrenko, I., & Ehrlich, H. (2021). Progress in chitin analytics. *Carbohydrate Polymers*, 252, 117204. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117204>
- Valderrama Negrón, Ana, & Rodríguez Hamamura, Nadia, & López Milla, Alcides, & Alarcón Cavero, Hugo (2010). Preparación de partículas de quitosano reticuladas con tripolifosfato y modificadas con polietilenglicol. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 76 (4),336-354.
- Wang, C.-L., Tzeng, G.-C., Yen, Y.-H., & Wang, S.-L. (2004). Bioconversion of Shellfish Chitin Wastes for Antifungal Materials Production. 510–510. <https://doi.org/10.11491/APCCHE.2004.0.510.0>
- Wang, S. L., Yen, Y. H., Tzeng, G. C., & Hsieh, C. (2005). Production of antifungal materials by bioconversion of shellfish chitin wastes fermented by *Pseudomonas fluorescens* K-188. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(1), 49–56. <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2004.03.024>
- Xaxiri, N.-A., Nikouli, E., Berillis, P., & Ar. Kormas, K. (2018). Bacterial biofilm development during experimental degradation of *Melicertus kerathurus* exoskeleton in seawater. *AIMS Microbiology*, 4(3), 397–412. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.397>
- Xie, J., Xie, W., Yu, J., Xin, R., Shi, Z., Song, L., & Yang, X. (2021). Extraction of Chitin From Shrimp Shell by Successive Two-Step Fermentation of *Exiguobacterium profundum* and *Lactobacillus acidophilus*. *Frontiers in Microbiology*, 12.
- Xin, R., Xie, W., Xu, Z., Che, H., Zheng, Z., & Yang, X. (2020). Efficient extraction of chitin from shrimp waste by mutagenized strain fermentation using atmospheric and room-temperature plasma. *International Journal of Biological Macromolecules*, 155, 1561–1568. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.133>

Zulay Mármol, G. P., Rincón, M., Araujo, K., Aiello, C., Chandler, C., & Gutiérrez, y E. (2011). *Quitina y Quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones*. Revista Tecnocientífica URU, 1, 53-58.

VIII. ANEXOS

8.1. Panel fotografico



Imagen 03: reactivación de bacterias



Imagen 04: medición de pH y quitooligómeros

Degradación biológica del exoesqueleto de langostino (Litopenaeus vannamei) para la obtención de quitina

INFORME DE ORIGINALIDAD

5 %	5 %	0 %	%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.untumbes.edu.pe Fuente de Internet	1 %
2	www.dspace.uce.edu.ec Fuente de Internet	1 %
3	hdl.handle.net Fuente de Internet	1 %
4	repositorio.unsa.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
5	dspace.unitru.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
6	repositorio.uss.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
7	es.scribd.com Fuente de Internet	<1 %
8	www.icms.us-csic.es Fuente de Internet	<1 %
9	www.abpnrevista.org.br Fuente de Internet	<1 %
		<1 %

10	repositorio.ucundinamarca.edu.co Fuente de Internet	<1 %
11	repositorio.uta.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
12	repositorio.unu.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
13	www.researchgate.net Fuente de Internet	<1 %
14	bibliotecadigital.exactas.uba.ar Fuente de Internet	<1 %
15	Hilmi Amanah Aditya Cahyaningtyas, Wasana Suyotha, Benjamas Cheirsilp, Asep Awaludin Prihanto, Shigekazu Yano, Mamoru Wakayama. "Optimization of protease production by Bacillus cereus HMRSC30 for simultaneous extraction of chitin from shrimp shell with value-added recovered products", Environmental Science and Pollution Research, 2021 Publicación	<1 %
16	tel.archives-ouvertes.fr Fuente de Internet	<1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 15 words

Excluir bibliografía

Activo


MSc. Rosa Liliana Solis Castro
 Asesora del Proyecto
 Orcid 0000-0002-1813-8644