



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
ESCUELA DE POSGRADO

TESIS DE MAGISTER EN CIENCIAS
CON MENCIÓN EN:
BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

**“VALORIZACIÓN BIOTECNOLÓGICA DE DESCARTES
BLANDOS DEL PROCESAMIENTO DE CONCHA DE ABANICO
MEDIANTE EL USO DE *Lactobacillus* NATIVOS
CARACTERIZADOS MOLECULARMENTE”.**

LUIS ALDO LÓPEZ LUNA

TUMBES, PERÚ
(2016)



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
ESCUELA DE POSGRADO

TESIS DE MAGISTER EN CIENCIAS
CON MENCIÓN EN:
BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

**“VALORIZACIÓN BIOTECNOLÓGICA DE DESCARTES
BLANDOS DEL PROCESAMIENTO DE CONCHA DE ABANICO
MEDIANTE EL USO DE *Lactobacillus* NATIVOS
CARACTERIZADOS MOLECULARMENTE”.**

LUIS ALDO LÓPEZ LUNA

TUMBES, PERÚ
(2016)

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Yo **Luis Aldo López Luna** declaro que los resultados reportados en esta tesis, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Asimismo declaro que hasta donde yo sé no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona excepto donde se reconoce como tal a través de citas y con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información presentada sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de esta tesis es producto de mi propio trabajo con la dirección y apoyo de mis asesores de tesis y mi jurado calificador, en cuanto a la concepción y al estilo de la presentación o a la expresión escrita.

Luis Aldo López Luna

ACTA DE REVISIÓN Y DEFENSA DE TESIS

RESPONSABLES

Br. Luis Aldo LOPEZ LUNA

EJECUTOR

Msc. Benoit DIRINGER

ASESOR

JURADO DICTAMINADOR

Dra. Eneida G. VIEYRA PEÑA

PRESIDENTA

Dr. Auberto HIDALGO MOGOLLON

SECRETARIO

Ph.D. Eric MIALHE

VOCAL

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
1. INTRODUCCIÓN.	12
2. MARCO DE REFERENCIA DEL PROBLEMA.	13
2.1. Antecedentes.	13
2.2. Bases teóricas científicas.	15
2.2. Definición de términos básicos.	16
3. MATERIAL Y MÉTODOS	18
3.1. Localidad y periodo de ejecución.	18
3.2. Población y muestreo.	18
3.3. Materiales y métodos.	18
3.3.1. Recolección y tratamiento de la muestra para el aislamiento bacteriano.	18
3.3.2. Aislamiento de bacterias nativas de DBPCA.	18
3.3.3. Caracterización molecular de las cepas bacterianas nativas.	19
3.3.4. Detección molecular de la actividad microbiana de producción de aminas biogénicas.	20
3.3.5. Evaluación de la actividad amilasas proteasas y lipasas de las cepas nativas.	21
3.3.6. Selección de cepas bacterianas nativas y estandarización de las variables en función del pH.	21
3.3.7. Metagenómica del ADN microbiano de los hidrolizados.	22
3.3.8. Análisis proximal de los hidrolizados.	22
3.3.9. Extracción de péptidos y análisis por espectrómetro de masa (MALDI TOF).	22
3.4. Localidad y periodo de ejecución.	23

4. RESULTADOS.	25
4.1. Aislamiento y caracterización molecular de cepas nativas.	25
4.2. Evaluación de genes relacionados a la producción de aminas biogénicas.	26
4.3. Análisis enzimático.	27
4.4. Ensayos para la selección de bacterias y estandarización de variables.	27
4.5. Análisis proximal.	30
4.6. Análisis metagenómico.	31
4.7. Análisis de péptidos.	35
5. DISCUSIÓN.	37
6. CONCLUSIONES.	43
7. RECOMENDACIONES.	45
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	47
9. ANEXOS.	53

RESUMEN

En Perú, los descartes del procesamiento de concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) generan importantes problemas de contaminación sanitaria y ambiental. La posibilidad de valorizar los descartes blandos como una alternativa sostenible a través del hidrolizado microbiológico fue investigada.

Se lograron aislar y caracterizar molecularmente 13 cepas bacterianas nativas de un fermentado natural de descartes blandos. Las cepas *Lactobacillus plantarum* (E3) y *Lactobacillus brevis* (2A1) fueron seleccionadas en base a su poder de acidificación ($\text{pH} < 4.0$), a su actividad proteasa y a la ausencia de genes de producción de aminas biogénicas. Otros parámetros como temperatura y cantidad de melaza fueron optimizados.

El hidrolizado biológico fue evaluado por análisis proximal y espectrometría de masa MALDI TOF, mostrando que la inoculación de las cepas E3 y 2A1 en los hidrolizados incrementa el nitrógeno total y la cantidad de péptidos hidrolizados.

Análisis metagenómicos realizados al tercer y sexto día del proceso mostraron que las cepas E3 y 2A1, inoculadas individualmente son predominantes en los hidrolizados habiendo desplazado completamente a la microbiota no fermentativa.

Estos resultados confirman que el hidrolizado tiene las propiedades para convertirse en alimento alternativo para la cría de animales, en biofertilizante para plantas y en bioacelerador de compostaje.

Palabras clave: Valorización, hidrolizado microbiológico, gen 16SARNr, metagenómica, MALDI TOF.

ABSTRACT

In Peru, the wastes from the processing of the Peruvian scallop (*Argopecten purpuratus*) are generating important health and environmental pollution problems. The possibility of valorizing the scallop soft waste as animal feed or biofertilizer for plants through microbiological hydrolysate was investigated.

It was possible to isolate and characterize molecularly 13 native bacterial strains extracted from naturally fermented soft wastes, from which 2 strains, *Lactobacillus plantarum* (E3) and *Lactobacillus brevis* (2A1), were selected on the basis of their acidification capacity during the process (pH < 4.0), their protease activity and the absence of biogenic amine genes. Others parameters such as temperature and amount of molasses were optimized.

The stability and hydrolysis of the product were evaluated by proximate analysis and MALDI TOF mass spectrometry, showing that the inoculation of bacterial strains E3 and 2A1 increase the total nitrogen content and the quantity of hidrolized peptides.

Metagenomics analysis performed three and six days post inoculation, showed that the E3 and 2A1 strains inoculated individually are predominant in the hydrolysates resulting in the complete displacing of non-fermentative microbiota.

These results confirm that the hidrolizate have the properties to become an alternative food for breeding animals, as a bio-fertilizer for plants and as a composting bioaccelerator.

Keywords: Valorization, microbiological hidrolizate, 16SrRNA gene, metagenomic, MALDI TOF.

1. INTRODUCCIÓN.

El cultivo de concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) es uno de los principales sectores acuícolas del País, siendo Sechura-Piura la principal provincia productora con una participación de más del 70 % del total exportado en el 2014.

El principal problema de este sector es el manejo de los residuos generados por la separación de la parte comestible de la masa visceral y las valvas. En particular los descartes blandos que representan entre el 18-20 % de la cantidad total procesada son actualmente dispuestos en ambientes terrestres o acuáticos marinos. Su putrefacción causa severas contaminaciones y se ha convertido en un reto para la gestión ambiental y las normativas que impuso Produce desde el 2014.

La posibilidad de aprovechar dichos subproductos y convertirlo en un producto económica y ecológicamente sostenible fue realizada a través del proceso de ensilaje e hidrólisis con microorganismos nativos como una alternativa a la descarga de estos residuos planteando como hipótesis “el uso de microorganismos nativos seleccionados molecularmente y biotecnológicamente mejora el proceso de hidrolisis de los descartes blandos del proceso de concha de abanico y permitirá obtener un producto de cálida para la alimentación de animales o biofertilizante para plantas”.

El trabajo fue enfocado en la elaboración de un protocolo optimizado para la hidrolisis de descartes blandos de concha de abanico mediante el uso de *Lactobacillus* nativos caracterizados molecularmente. El cual estuvo financiado por un proyecto Innóvate Perú (PIPEI-5-P-023-13) denominado “Producción de un suplemento alimenticio para langostino (*Litopenaeus vannamei*) a partir de ensilado de los descartes orgánicos de concha de abanico (*Argopecten purpuratus*).

2. MARCO DE REFERENCIA DEL PROBLEMA

2.1. ANTECEDENTES

El cultivo de concha de abanico *Argopecten purpuratus* es el sector de mayor producción acuícola en el Perú. En el 2014 la producción ascendió a 48, 238.5 T de producto bruto, de los cuales el 26 %, correspondiente al músculo (tallo) y a la gónada, fue exportado (12, 542.01 T) con un valor de US\$ 132.9 millones (Prom Perú 2014).

El procesamiento de la concha de abanico para exportación consiste en separar el músculo y la gónada del resto del animal; valvas y masa visceral que representan el 54 % y el 20 % del molusco respectivamente, son descartados a botaderos informales sin tratamiento alguno.

Estos subproductos, constituyen entonces un problema ambiental y sanitario (Berenz 1996), pues no pueden utilizarse directamente para otros fines. La recuperación y transformación de estos descartes en un producto de valor es la mejor opción para solucionar sosteniblemente el problema generado.

La mejor alternativa para aprovechar dichos subproductos (en especial los residuos blandos constituidos por manto, vísceras, partes de músculos y gónadas en malas condiciones), es transformarlos en hidrolizados para la alimentación animal o biofertilizante para plantas a través del proceso de hidrolisis por ensilaje (Encomendero y Uchpa 2002; Gallardo et al. 2012; Davila, Medina y Reyes 2013; Tian *et al.* 2012). De esta manera se está eliminando los problemas de contaminaciones de suelos, aguas, plagas y malos olores generados por la putrefacción de estos descartes.

Los hidrolizados se basan en la acidificación del medio, a modo de favorecer la proteólisis de la materia orgánica para generar un producto pastoso (Berens 1996; Gonzales y Marin 2005). Debido a esto, los hidrolizados son más digeribles, y producen efectos benéficos en los organismos (Giraud,

Champailler y Raimbault 1994; Serna y Naranjo 2005). En particular el hidrolizado biológico con bacterias ácido lácticas (BAL), es una solución más amigable ambientalmente (Encomendreo y Uchpa 2002; Giraud, Champailler y Raimbault 1994; Kandra *et al.* 2010), por no requerir agentes químicos y por su mejor digestibilidad en comparación con los hidrolizados químicos (Asku, Baytok, y Bolat 2004; Pagarkar *et al.* 2006).

Diferentes BAL tales como *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* han sido utilizados para la obtención de hidrolizado biológico de sub-productos marinos (Fagbenro y Juancey 1995; Lassen 1995; Coesetti y Settanni 2007). También fueron empleadas bacterias aisladas de yogurt, principalmente pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Streptococcus* (Encomendreo y Uchpa 2002; Uchida *et al.* 2004; Vazques *et al.* 2008).

Además del ácido, las BAL producen enzimas que permiten la hidrólisis de carbohidratos, lípidos y proteínas generando pequeños péptidos y metabolitos. Algunos *Lactobacillus* también secretan y generan proteínas o metabolitos antimicrobianos que tienen un efecto protector o antagónico de otros microorganismos (bacterias y hongos) mejorando la conservación del hidrolizado (Hernández, Cardell y Zárate 2005; Settachaimongkon *et al.* 2014; Da silva *et al.* 2014; Perin y Nero 2014).

El proceso de hidrólisis simplifica las proteínas complejas en péptidos y amino ácidos libres que son directamente disponibles para los transportadores de aminoácidos intestinales y transportadores de péptidos. Su asimilación podría ser más eficiente y más rápida que las proteínas complejas, como ya se observó en los seres humanos (Koopman *et al.* 2009).

2.2. BASES TEÓRICAS CIENTÍFICAS

La selección de bacterias o cultivos bacterianos con mejores propiedades fermentadoras para su uso como inóculo starter es un proceso complejo que implica muchos pasos; a menudo el procedimiento de selección es bastante difícil y no se puede utilizar a escala industrial o en laboratorios de tamaño medio (Corsetti y Settanni 2007).

Por el contrario Corbo *et al.* 2013, proponen un método simple para seleccionar algunas BAL como cultivos starters promisorios para fermentar masas. El enfoque se basa en tres pasos: (1) el aislamiento de cepa de la masa e identificación molecular; (2) evaluación de los procesos biotecnológicos a nivel laboratorio (crecimiento con diferentes rangos de sal y temperatura así como la acidificación); (3) la selección de cepas y validación a mayor escala para la producción del hidrolizado.

Las propiedades nutricionales y actividades biológicas de los hidrolizados peptídicos están estrechamente relacionadas con la masa molecular de los péptidos y su composición de aminoácidos (Liu *et al.* 2008; Benjakul *et al.* 2009; Rajapakse *et al.* 2005).

El desarrollo de herramientas como la espectrometría de masas para determinar el perfil de la masa peptídica (Graves y Haystead 2002; Steen y Mann 2004; Palagi *et al.* 2006), es esencial para permitir la caracterización de los hidrolizados y para tener una mejor comprensión y predicción de sus propiedades nutricionales y funcionales (Robert *et al.* 2014).

Algunos estudios mostraron que la sustitución de la harina de pescado por niveles bajos de hidrolizados marinos mejoran el crecimiento, la utilización de los alimentos en el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y la respuesta del sistema inmune no específico en corvina amarilla (*Pseudosciaena crocea* R.) (Refstie, Olli y Standal 2004; Tang *et al.* 2008).

2.3. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BASICOS

ADN: El ácido desoxirribonucleico, abreviado como ADN, es un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los organismos vivos conocidos y algunos virus, y es responsable de su transmisión hereditaria. La función principal de la molécula de ADN es el almacenamiento a largo plazo de información.

16S ARNr: Es un componente de la subunidad 30S de los ribosomas procariontes. Tiene una longitud de 1.542 nucleótidos.

Aminas biogénicas: Son compuestos formados por la transformación de los aminoácidos que se encuentran en los alimentos por la acción de enzimas generadas por microorganismos. Entre las aminas biogénicas más significativas estarían: histamina, cadaverina, putrescina, tiramina y triptamina.

Amplicón: Es un pedazo de DNA o RNA, es la fuente o el producto de eventos naturales o artificiales de amplificación o replicación. Puede ser formado usando varios métodos incluyendo reacciones en cadena de polimerasa (PCR), reacciones en cadena de ligasa (LCR), o natural duplicación del gene.

ARNasa: También conocida como ribonucleasa, es una enzima (nucleasa) que cataliza la hidrólisis de ARN en componentes más pequeños.

Densidad óptica (OD): Magnitud física que mide la absorción de un elemento óptico por unidad de distancia, para una longitud de onda dada.

Graphpad Prism: Es un software estadístico y grafico 2D científico comercial, diseñado y publicado por graph Pad software.

Hidrolizado: Es una proteína que ha sido hidrolizada o desglosado en sus aminoácidos componentes. Si bien hay muchos medios para lograr esto, dos de las más comunes son prolongando a ebullición con un ácido fuerte (PVH-ácido) o una base fuerte o utilizando una enzima tal como la proteasa pancreática para simular el proceso hidrolítico de origen natural.

MALDI TOF: Es una técnica de ionización suave utilizada en espectrometría de masas. Se denomina MALDI por sus siglas en inglés Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (desorción/ionización láser asistida por matriz) y

TOF por el detector de iones que se acopla al MALDI y cuyo nombre procede también de sus siglas en inglés Time-Of-Flight.

Metagenómica: Es el estudio del conjunto de genomas de un determinado entorno (metagenoma) directamente a partir de muestras de ese ambiente, sin necesidad de aislar y cultivar esas especies.

MG RAST: Es un servidor de aplicaciones web de código abierto que sugiere el análisis filogenético y funcional automática de metagenomes.

NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica o National Center for Biotechnology Information (NCBI) es parte de la Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos (National Library of Medicine), una rama de los Institutos Nacionales de Salud (National Institutes of Health o NIH).

OTUs: Unidad taxonómica operativa (OTU), es una definición operativa utilizada para clasificar los grupos de individuos estrechamente relacionados. Esta unidad es especialmente útil cuando sólo los datos de secuencia de ADN está disponible. Es la unidad de la diversidad microbiana más comúnmente usado, especialmente cuando analizamos la pequeña subunidad del gen marcador 16S o 18S rRNA en datos de microbios.

PCR: La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (polymerase chain reaction), es una técnica de biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis. Su objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original, o molde.

Iniciadores: Cadena de ácidos nucleicos que sirve como partida para amplificar un fragmento de ADN.

Taq Polimerasa: La polimerasa Taq es un tipo de ADN polimerasa termoestable, nombrada de esta forma debido a que es producida por la bacteria *Thermus aquaticus* (T-*aq*) y a partir de la cual fue aislada en el año 1968 por Thomas D. Brock¹ A menudo suele abreviarse como "Taq Pol" (o simplemente como "Taq"), y es frecuentemente utilizada en las técnicas de PCR, un método que se utiliza para amplificar secuencias cortas de ADN.

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. Localidad y periodo de ejecución.

El presente trabajo se desarrolló en las instalaciones de la empresa FIEST & RIVA SRL y en el centro de investigación INCA´BIOTEC SAC y el laboratorio de biología molecular de la FIPCM/UNT (Tumbes) durante los meses de Marzo 2014 a Febrero 2016.

3.2. Población muestra y muestreo.

Los descartes blandos del procesamiento de concha de abanico fueron recuperados durante dos muestreos en la empresa FIEST & RIVA SRL.

3.3. Materiales y métodos.

3.3.1. Recolección y tratamiento de la muestra para el aislamiento bacteriano.

Los descartes blandos del procesamiento de concha de abanico (DBPCA) fueron recolectados del centro de procesamiento de la empresa FIEST & RIVA SRL (Sechura - Piura) y mantenidos refrigerados hasta su proceso en el centro de investigación Inca´Biotec (Tumbes). Los DBCPA fueron licuados en una licuadora doméstica (Marca Oster) a 5,000 rpm por 3 min y se le adicionó melaza autoclavada al 5 y 10 % (Encomendero y Uchpa 2002). La mezcla fue repartida en tubos falcón de 50 ml los cuales fueron cerrados herméticamente, dejando un cuarto de vuelta para el escape del exceso de gas. Los tubos fueron removidos una vez cada dos días.

3.3.2. Aislamiento de bacterias nativas de DBPCA.

Las cepas fermentadoras “nativas” se aislaron a los 3 y 6 días post-fermentación. Para ello, primero se homogenizó la muestra manualmente por 5 min y se recuperó 3 g en un tubo falcón que contenía 10 ml de solución salina (NaCl al 2 %) estéril, seguidamente se procedió a realizar 2 diluciones seriadas

de 10^{-2} y 10^{-3} . Un alícuota de 50 μ l de la solución madre y de cada dilución se sembró en placas con agar MRS (Man-Rogosa-Sharpe; Oxoid, UK) (Vazquez, Gonzáles, y Marín 2005), a pH 5 suplementado con NaCl al 2 % (Missotten *et al.* 2009; Corbo *et al.* 2010; Bevilacqua *et al.* 2010). Los cultivos fueron incubados a temperatura ambiente (30 °C) por 24 y 48 horas. La separación de colonias se realizó usando el método de estría cruzada (Vazquez, Gonzáles y Murano 2004). La pureza de las cepas fue evaluada mediante la observación de la morfología en tinción de Gram. Las cepas puras fueron conservadas a -20°C con 15 % de glicerol.

3.3.3. Caracterización molecular de las cepas bacterianas nativas.

El ADN fue extraído a partir de bacterias puras cultivadas en 1 ml de caldo MRS suplementado con 2 % de NaCl. El cultivo fue centrifugado durante 2 min a 10000 rpm en una centrífuga Heraeus modelo Biofuge pico, se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con 500 μ l de búfer PBS 1X pH 7.4 (137 mM de NaCl₂; 2.7 de mM KCl; 10 mM de Na₂HPO₄; 1.8 mM deKH₂PO₄). La solución fue centrifugada por 2 min a 10000 rpm, se descartó el sobrenadante y se agregó 200 μ l de TE (1M Tris; 0.1M EDTA; pH 8.0). Luego se llevó a ebullición por 10 min e inmediatamente se colocó sobre hielo por 5 min, se centrifugo por 1 min a 10000 rpm y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. Posteriormente se diluyo este ADN en agua ultra pura (1/10), al cual se le agregó 2 μ l de RNAsa (marca Promega) antes de incubar por 30 min a 37 °C, finalmente se guardó a -20 °C.

Para la PCR (Termociclador marca Biometra modelo One Termoblok) se agregó 2 μ l del ADN extraído al mix de PCR que contenía 34.4 μ l de agua ultra pura, 5 μ l de búfer PCR 10X (Fermentas; Thermo scientific: EE.UU), 5 μ l de MgCl₂ (Fermentas; Thermo scientific: EE.UU), 1 μ l dNTPs 200 mM, 1.2 μ l del iniciador forward 16SrRNA27F a 15 pmol (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1.2 μ l del iniciador reverse 16SrRNA1492R a 15 pmol (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (Lane 1991), 0.2 μ l de Taq polimerasa de

500 U (Invitrogen, Thermo scientific: EE.UU), todo calculado para un volumen final de 50 µl de reacción.

La programación del termociclador fue la siguiente: 1 ciclo a 94 °C por 5 min; 35 ciclos (94 °C por 30 s, 55 °C por 45 s y 72 °C por 90 s); 1 ciclo a 72 °C por 10 min y un paso final de conservación a 4 °C, luego los productos (amplicones) fueron migrados en un gel de agarosa al 1.5 % con BET a 10 mg/ml y observados en un transiluminador UV.

Para la identificación molecular, los amplicones fueron enviados a MacroGen Corp (USA) y secuenciados usando 2 primers internos, el iniciador 16SrRNAF518 (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3') y el iniciador 16SrRNAR800 (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3') (Weisburg *et al.* 1991).

3.3.4. Detección molecular de la actividad microbiana de producción de aminas biogénicas.

La capacidad productora de aminas biogénicas tóxicas por parte de las bacterias aisladas se verificó por Multiplex PCR dirigida a los genes histidina descarboxilasa, tirosina descarboxilasa y Ornithina descarboxilasa utilizando los iniciadores (JV16HC y JV17HC), (P2-for y P1-rev) y (p3 y p16) que son detallados en la Tabla 1 (De la Riva, *et al.* 2005; Landete *et al.* 2007).

Tabla 1: Lista de iniciadores utilizados para la detección de enzimas descarboxilasas por multiplex PCR en bacterias.

Primers	5'→3'sequence	Tamaño de amplicones (pb)
JV16HC	AGATGGTATTGTTTCTTATG	363
JV17HC	AGACCATACACCATAACCTT	
P2-for	GAYATIATIGGIATIGGIYTIGAYCARG	924
P1-rev	CCRTARTCIGGIATIGCRAARTCIGTRTG	
p3	GTNTTYAAYGCNGAYAARACNTAYTTYGT	1446
p16	TACRCARAATACTCCNGGNGGRTANGG	

La programación del termociclador fue, 1 ciclo a 94 °C por 10 min; 30 ciclos (95 °C por 30 s, 55 °C por 30 s y 72 °C por 2 min); 1 ciclo a 72 °C por 10 min y un

paso final de conservación a 4 °C, los productos fueron migrados en un gel de agarosa al 1.5 % con BET a 10 mg/ml y visualizados sobre un transiluminador UV.

3.3.5. Evaluación de la actividad amilasas, proteasas y lipasas de las cepas nativas.

Las actividades proteasa, amilasa y lipasas se evaluaron en placas Petri que contenían 1) agar nutritivo suplementado con leche descremada al 5 %, 2) agar almidón y 3) agar MRS suplementado con glicerol tributirato al 0.5 % respectivamente. Se sembró 10 µl de cada bacteria en discos estériles de papel filtro Whatman N° 1 de 6 mm de diámetro distribuidos en las placas Petri, luego las placas fueron incubadas a 37 °C (Incubadora marca Heating incubator modelo DHP) por 48 y 72 horas. Posteriormente se midió el halo de degradación del medio con ayuda de un vernier (marca Kamasa modelo KM-447). En el caso de las pruebas amilasas se agregó 1 ml de yodo en la placa para poder observar el halo de degradación del almidón.

3.3.6. Selección de cepas bacterianas nativas y estandarización de las variables en función del pH.

Los hidrolizados fueron preparados en diferentes tiempos en falcón de 50 ml por triplicado, los primeros ensayos se realizaron con el total de bacterias aisladas mono-inoculadas a una densidad óptica de 600 nm ($OD_{600} = 1$) las cuales fueron medidas en un biofotómetro (Eppendorf serie 613101640), también se realizaron comparaciones con una cepa fermentadora comercial (BF = *Pediococcus acidophilus*) a una sola concentración de sustrato (5% de melaza), evaluando el pH diariamente (Potenciómetro Hanna modelo HI 98103). Posteriormente, para las cepas seleccionadas en estos primeros ensayos se compararon diferentes concentraciones de melaza (10 y 15 %) y temperaturas de 30 y 37 °C, también midiendo el pH como indicador de acidez.

3.3.7. Metagenómica del ADN microbiano de los hidrolizados.

Para la extracción de este ADN se usó el kit de extracción “Power Soil” (MoBio Laboratorios Inc., Carlsbad, CA, EE.UU). El ADN fue extraído al tercer y sexto día post-fermentación de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Se utilizó 250 mg de los hidrolizados inoculados con *Lactobacillus plantarum* E3 ($OD_{600} = 1.5$; 2.5×10^{10} UFC/ml) y *Lactobacillus brevis* 2A1 ($OD_{600} = 1.5$; 1.3×10^{10} UFC/ml), así como del fermentado natural no inoculado (C), y de los DBPCA sin fermentación (C0 = control). Se evaluó la calidad del ADN extraído y solamente los ADN puros ($OD_{260/230} = 2$) fueron enviados a secuenciar por el método Ion Torren PGM de la empresa MR.DNALAB en EE.UU; <http://mrdnalab.com/dna-sequencing/ion-torrent-pgm.html?lang=es>.

3.3.8. Análisis proximal de los ensilados

Los análisis proximales fueron realizados a los 60 días post-fermentación por CERPER (Certificadora del Perú S.A), donde se determinó el porcentaje de proteínas (método Kjeldahl; AOAC 19 Ed. 2012), porcentaje de grasas (método de extracción de soxhlet; AOAC 19 Ed. 2012), porcentaje de carbohidratos (calculado), porcentaje de cenizas (método de cenizas de plantas; AOAC 19 Ed. 2012), porcentaje de humedad (pérdida de humedad en secado; AOAC 19 Ed. 2012).

3.3.9. Extracción de péptidos y análisis por espectrómetro de masa MALDI TOF.

Primero, los ensilados fueron filtrados en una maya de 37 μm , se recuperó 1 ml del filtrado que fue centrifugado a 5000 G por 20 min, después se recupera 200 μl de sobrenadante. Segundo, se agregó 2.5 volúmenes de acetona, y se mezcló en un agitador (Mrc laboratory equipment modelo Tos) a 150 rpm durante 30 min antes de precipitar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 90 min, luego se centrifuga a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (centrifuga marca centurión Scientific Ltd modelo K3R) por 5 min a 13000 rpm y se descarta la acetona. Se repitió este segundo paso 2 veces. Tercero,

se rehidrató con 50 μ l de buffer (7 M Urea; 2 M triurea; 30 mM DTT; 4 % CHAPS y 1 Mm de TMCF).

Los péptidos extraídos de cada muestra fueron mezclados (V/V) con la matriz CHCA (Sigma Aldrich; EE.UU) la cual estaba a una concentración de 10 mg/ml; luego la mezcla se depositó en los pozos de la placa (placa Opti-TOF 384 pozo MALDI 123x81mm 5PK) para su solidificación, posteriormente la placa se llevó al espectrofotómetro de masas (AB SCIEX TOF/TOF 5800 System), donde se realizaron los análisis de las muestras por triplicado.

3.4. Procesamientos y análisis de datos.

Para obtener las secuencias de cada bacteria las secuencias nucleotídicas fueron alineadas en el programa MEGA-6 que posteriormente fueron analizadas en la base de datos del algoritmo **Blastn** del Centro Nacional para la información Biotecnológica “NCBI” donde se determinó la taxonomía completa de cada bacteria.

El estudio metagenómico de la microbiota presente en las muestras crudas DBPCA y los DBPCA hidrolizados fue caracterizada usando la plataforma de secuenciación de alto rendimiento PGM™, y estuvo basada en la secuenciación parcial del gen 16SARNr (región variable V4) para la identificación de la microbiota total.

Los metadatos de secuenciación en masa dirigido al gen 16S, fueron procesados usando la plataforma de análisis de MRDNA LAB. Las secuencias procesadas fueron entregadas en formatos fasta, qual y mapping como una lista de OTUs en los diferentes niveles taxonómicos. Para su análisis y ordenamiento se utilizaron varios programas libres provistos por el servidor de MRDNA LAB (<http://mrdnafreesoftware.com>), como “Binning Program” el cual permitió individualizar los datos y limpiarlos de duplicados y eliminar secuencias quiméricas.

Luego los datos fueron trabajados en el programa MG_RAST versión 3.2, lo cual permitió organizar los OTUs, por comparación con los bancos de datos del RDP (Ribosomal Data Project) usando un nivel de confianza del 97% y un valor máximo E-value de $1e-30$ utilizando secuencias que presentaban una longitud mínima de 150pb. Los datos fueron ordenados con el programa Excel y esquematizados en gráficos usando el software "Graphpad Prism".

Para la calibración y obtención de datos e imágenes en el espectrómetro de masas se usó el Software analizador TOF TOF™ series explorer™, el método para el análisis de las muestras fue el siguiente: mode MS en modo reflectron (+), rango de masa de 500 a 1000 Da, intensidad de láser 2900 Hz.

Los espectros peptídicos resultantes fueron ordenados en Excel 2010 y esquematizados en el software Graphpad Prism.

4. RESULTADOS.

4.1. Aislamiento y caracterización molecular de cepas nativas.

Se lograron purificar 13 cepas de bacterias nativas a partir del autolisado de descartes de concha de abanico.

La Figura 1 representa el gel de agarosa con los productos de amplificación por PCR del gen 16sARNr de algunas de las cepas aisladas y de la cepa fermentadora comercial, los cuales fueron exitosamente secuenciados.

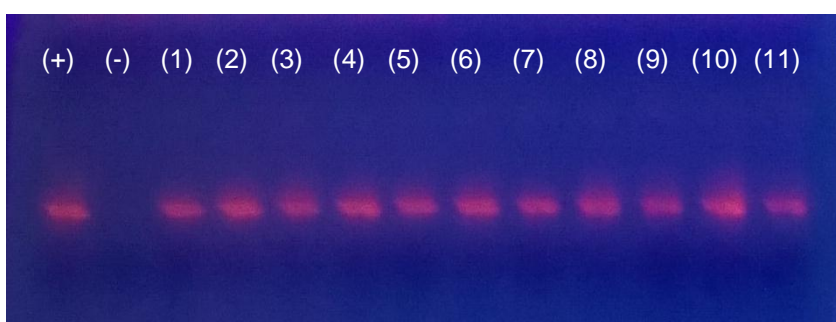


Figura 1: Productos de PCR amplificados en la región 16SARNr bacteriano (1470pb); **(+):** Control positivo; **(-):** Control negativo; **(1):** 5%A1; **(2):** 2A1; **(3):** 5B; **(4):** 5%; **(5):** BBE1; **(6):** BF; **(7):** E3; **(8):** E2; **(9):** E1; **(10):** 2A; **(11):** L

Al comparar las secuencias nucleotídicas obtenidas con la base de datos de NCBI se lograron identificar 6 especies de bacterias que pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Weissella* que son miembros del filum firmicutes (Tabla 2).

Tabla 2: Lista de bacterias nativa aisladas a partir de los autolisados de descartes blandos del procesamiento de concha de abanico.

#	Código	Nombre científico base de datos BLAST/NCBI
1	BBE1	Weissella confusa strain JCM 1093 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
3	2A	Weissella confusa strain JCM 1093 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
4	2X	Enterococcus mundtii QU 25 DNA, complete genome
5	5%2B	Lactobacillus Sp. strain IHB B 6854 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
6	5%A1	Lactobacillus brevis KB290 DNA, complete genome

7	2A1	Lactobacillus brevis KB290 DNA, complete genome
8	5%	Lactobacillus sakei subsp. sakei 23K chromosome, complete genome
9	5B	Enterococcus mundtii QU 25 DNA, complete genome
10	L	Enterococcus mundtii QU 25 DNA, complete genome
11	E1	Lactobacillus plantarum WCFS1, complete genome
12	E2	Lactobacillus plantarum WCFS1, complete genome
13	E3	Lactobacillus plantarum WCFS1, complete genome

A pesar de ser identificadas como especies idénticas, cada bacteria fue evaluada por individual con el fin de seleccionar las mejores cepas.

4.2. Evaluación de genes relacionados a la producción de aminas biogénicas.

El análisis por Multiplex PCR reveló que ninguna de las bacterias aisladas presentaron los genes de producción de aminas biogénicas (Figura 2), por el contrario, las bacterias *Escherichia. coli* y *Vibrio sp* usados como controles positivos, si amplificaron.

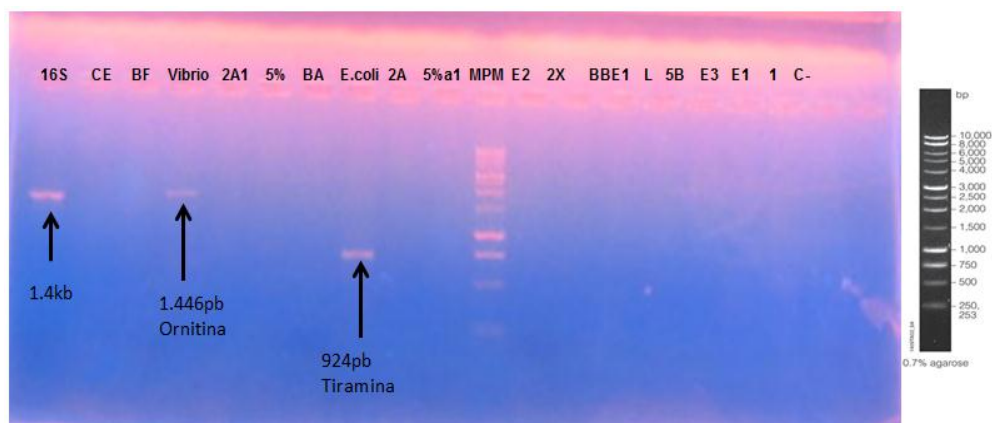


Figura 2: Productos de amplificación por multiplex PCR de 3 genes relacionados a la producción de aminas biogénicas; histamina descarboxilasa (367 pb), ornitina descarboxilasa (1446 pb) y tiramina descarboxilasa (924 pb) en las bacterias aisladas, así como un producto de PCR 16SARNr de 1.47 kb, los controles positivos de *E. coli* y *Vibrio sp*, el control negativo (C-), el marcador de peso molecular (MPM) y el control de extracción (CE).

4.3. Análisis enzimático

En la Figura 3(A) se puede observar la actividad proteasa positivas de 2 de las bacterias aisladas (E3 y 2A1) así como también la actividad proteasa positiva del *Bacillus subtilis* (Figura 3B) utilizado como control positivo. En las figuras 3C y 3D se pueden observar las actividades lipasas negativas de las bacterias antes mencionadas (E3 y 2A1) así como una ligera actividad lipasa por parte del control positivo antes mencionado.

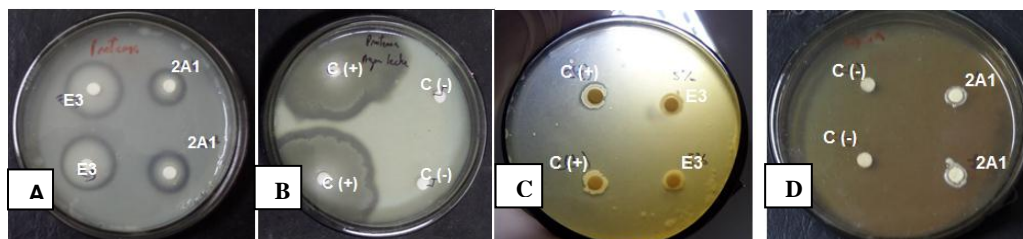


Figura 3: Pruebas de actividad proteasas y lipasas de la bacterias E3 y 2A1 así como de la bacteria *Bacillus subtilis*.

Al finalizar estos ensayos se pudo observar que todas las bacterias aisladas y también la bacteria comercial fueron proteasas positivas, por otra parte, estas bacterias no mostraron actividad lipasa ni amilasa positiva.

4.4. Ensayos para la selección de bacterias y estandarización de variables.

En la Figura 4 se puede observar el poder de acidificación de las bacteria aisladas e inoculadas individualmente ($OD_{600}=1$), así como del control "C" que no fue inoculado pero contenía melaza, y el control positivo inoculado con la cepa comercial (BF). Todos los tratamientos contenían melaza de caña de azúcar al 5 % (v/w) como fuente de carbono, menos el control (CE) que tampoco contenía inóculo. Se puede observar una breve acidificación del control (CE) antes de mostrar un incremento del pH correspondiendo al proceso de putrefacción.

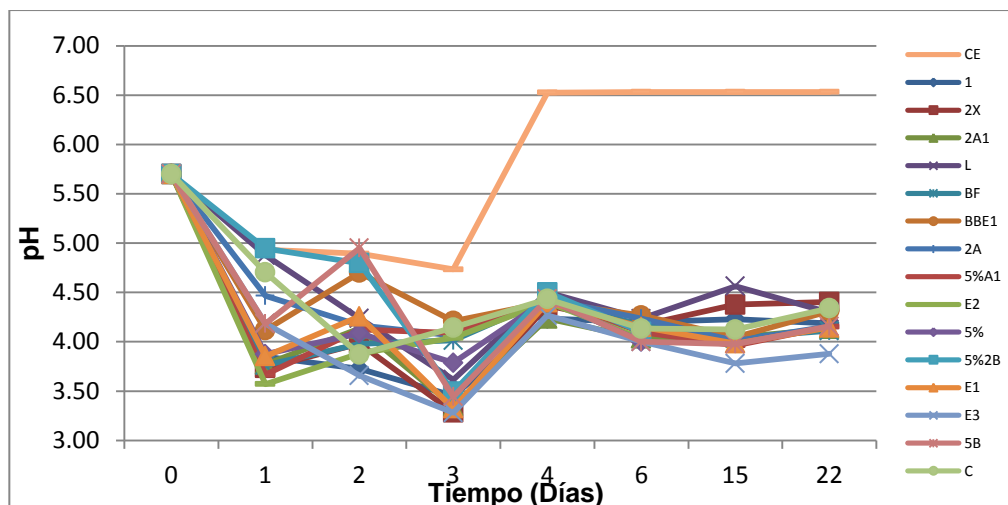


Figura 4: Evolución de los niveles de pH en hidrolizados de DBPCA mono-inoculados con las cepas bacterianas nativas aisladas, una bacteria comercial (BF), hidrolizado nativo (C) y el control DBPCA sin melaza e inculo (CE).

En los resultados de esta (Figura 4) podemos observar que las bacterias que bajaron más el pH al tercer día post-fermentación fueron las cepas **E3, 2A1, 5%A1, BF, y BBE1**, sin embargo ningún tratamiento pudo mantener el pH estable a través del tiempo.

Para confirmar la mejor capacidad acidificante de las cepas antes mencionadas se realizó un segundo ensayo con el 5 % de melaza, donde solo se consideraron las bacterias que tuvieron la mayor capacidad de acidificación de los DBPCA (Figura 5).

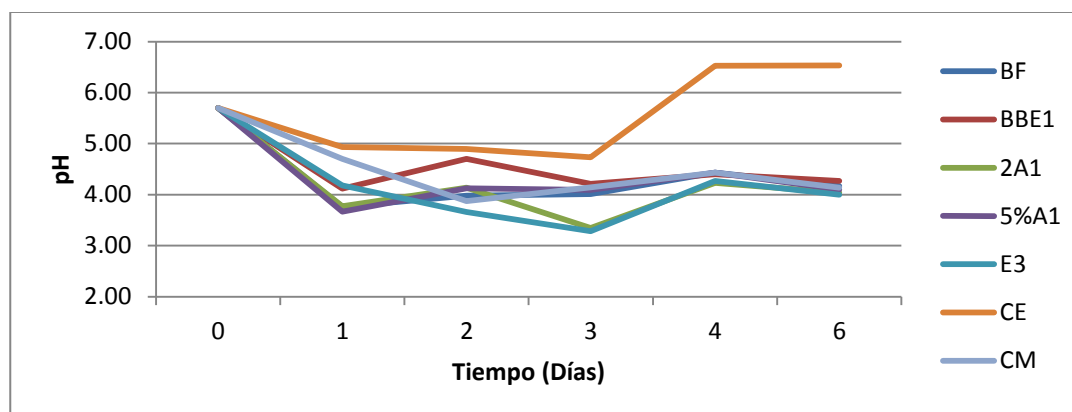


Figura 5: Evolución del pH de hidrolizados a partir DBPCA mono-inoculado con cepas bacterianas nativas, una comercial (BF), un ensilado no inoculado (C) y el control DBPCA sin melaza (CE).

Al observar la figura 5 se sigue visualizando la baja estabilidad del pH entre los tratamientos, a la vez se confirmó que las cepas con la mayor capacidad de acidificación al tercer día post-inoculación fueron las E3 y 2A1.

Para resolver el problema de estabilidad del pH a través del tiempo se decidió aumentar el porcentaje de melaza a 10 y 15 % (v/p), para lo cual se evaluaron solo las cepas E3 y 2A1 (Figura 6).

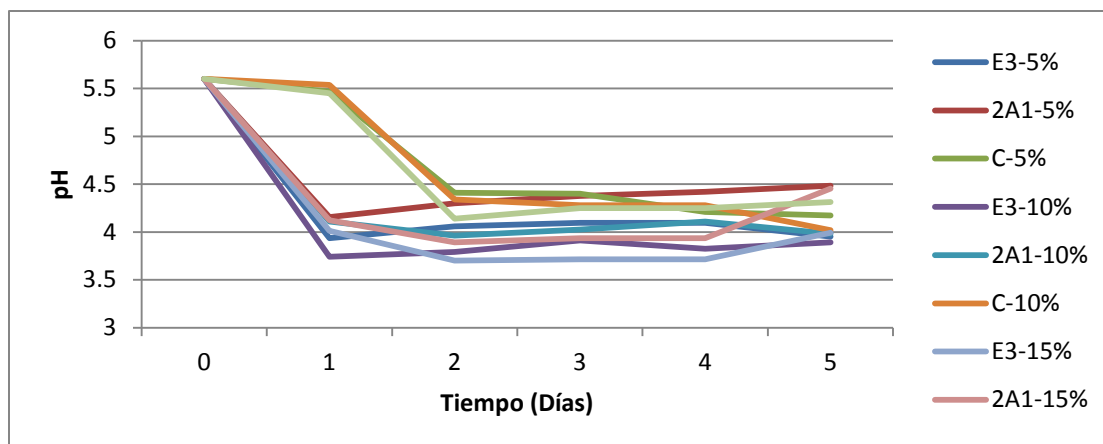


Figura 6: Evolución del pH de los Hidrolizados de DBPCA mono-inoculados (E3 y 2A1) y no inoculados (C) con cepas bacterianas fermentadoras y suplementado con 5%, 10 % y 15 % de melaza.

El incremento de la concentración de melaza mejoró la estabilidad del pH en el tiempo para ambas cepas. Estos tratamientos obtuvieron los mayores niveles de acidificación al primer día post-inoculación frente al control (C) en todos los casos evaluados (5, 10 y 15 % de melaza). El mayor nivel de acidificación fue alcanzado por la cepa E3 al segundo día post-inoculación con 15 % de melaza. Sin embargo, el pH de este tratamiento volvió a subir al tercer día post-inoculación.

También se optimizó la estabilidad del pH en función a la temperatura (Figura 7) a una concentración del 10% de melaza. Podemos observar que la incubación de los hidrolizados a 30 y 37 °C no impactó significativamente la acidificación de los fermentos inoculados.

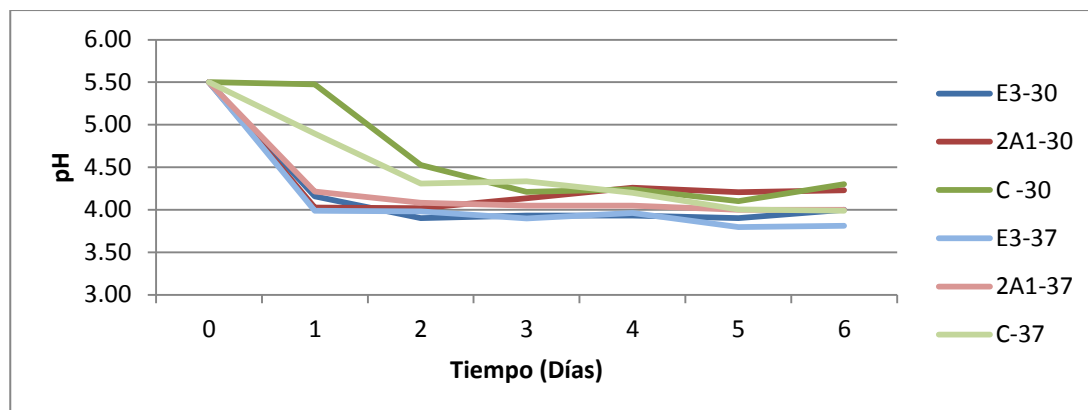


Figura 7: Evolución del pH de los hidrolizados de DBPCA mono-inoculados (E3 y 2A1) y no inoculados (C), enriquecidos con 10 % de melaza y almacenados a 30 °C y 37 °C.

4.5. Análisis proximal.

Se evaluó a los 60 días post fermentación el impacto sobre la composición proximal del producto de la inoculación de las cepas E3 y 2A1 frente a un hidrolizado no inoculado con melaza al 10% (C) y a descartes blandos frescos no hidrolizados pero con adición de melaza al 10% (C0) (Tabla 3).

Tabla 3: Análisis proximal a los 60 días post fermentación con melaza de caña de azúcar al 10 % de hidrolizados biológicos de CA mono-inoculados (E3 y 2A1), no inoculados con fermentación (C) y el control no fermentado DBPCA mas melaza (C0).

Hidrolizado	Proteína (%)	Humedad (%)	Grasas (%)	Cenizas (%)	Carbohidratos (%)	pH (H+)
E3	10.39	77.3	0.84	4.27	7.2	4.0
2A1	10.92	78.7	1.01	4.06	5.31	4.1
C	10.57	73.7	1.41	4.87	9.45	4.2
C0	9.41	76.9	0.79	4.41	8.49	5.6

Se puede observar que los hidrolizados con o sin bacterias incrementaron su concentración de nitrógeno proteico de 10.4 % (E3), 16 % (2A1) y 12.3 % (C) con respecto al control crudo (C0). Importantes variaciones fueron encontradas a nivel del porcentaje de grasas con un incremento de 6.3 % (E3), 27.8 %

(2A1), y 78.5 % (C). Las tasas de carbohidratos fueron más variables, con una disminución del 15 % (E3), 37.5 % (2A1) y un aumento del 11.3 % para el control hidrolizado (C).

4.6. Análisis metagenómico.

El Análisis de secuencias para todas las muestras produjo 131,563 lecturas crudas (raw) con un estimado de tamaño promedio de 257 pb. Después de la eliminación de 7.3 % de secuencias ilegibles, un total de 121,805 lecturas validas con una longitud ≥ 150 pb fueron usadas para los análisis posteriores.

El conjunto de OTUs fue identificado usando la plataforma de MG RAST y la base de datos RDPII (Cole *et al.* 2009), con una tasa de confiabilidad umbral de identidad de secuencias ≥ 80 %, y ≥ 97 % a nivel de filo y género respectivamente (Tabla 4).

Tabla 4: Número de OTUs observados por muestra, basados en la clasificación de secuencias por MG RAST y evaluación de los índices de diversidad específica.

# de Accession MG-RAST	Muestra	# Lecturas	# Lecturas utilizadas	# OTU	Diversidad α
4638980	C0	3829	3533 (92.3%)*	129	21.2
4638979	C6	49937	45764 (91.6%)*	83	8.2
4638,982	E3-6	37530	35230 (93.9%)*	77	1.2
4638977	2A1-6	40267	37278 (92.6%)*	58	4.4

*Número (porcentaje en paréntesis) de secuencias asignadas a un filo dado usando RDPII (Cole *et al.*, 2009)

El análisis filogenético de las secuencias por MG RAST utilizando la base de RDP permitió identificar 17 filios disgregados en 31 clases y 258 géneros entre todas las muestras, también los gráficos de curvas de rarefacción (Figura 8) permiten estimar si todas las especies presentes en una muestra han sido encontradas en función de la pendiente de las curvas. Este análisis permite una comparación del número de OTUs entre muestras aun cuando los tamaños de las mismas (cantidad de secuencias obtenidas en la muestra) son desiguales,

calculando el número de OTUs relativo de cada muestra frente a un tamaño estándar.

La muestra de DBPCA (C0) presentó un mayor número de OTUs (129) pero el menor número de lecturas (3829). La muestra C6 corresponde al hidrolizado sin inóculo (microbiota “espontanea”) presentó el mayor número de secuencias leídas (49937) y es el segundo a nivel de especie (83) al sexto día de hidrólisis. Para los hidrolizados inoculados, el análisis revela que la comunidad microbiana fermentadora inoculada con E3 contiene relativamente más especies que el hidrolizado inoculado con 2A1 a pesar de contar con menos lecturas.

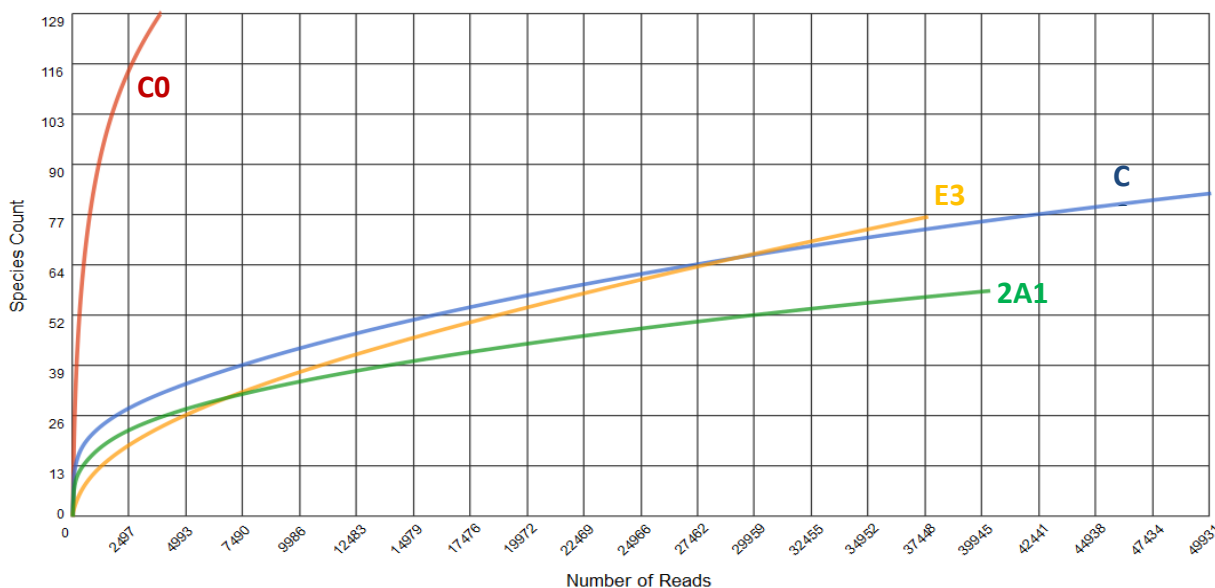


Figura 08: Curvas de rarefacción al 95 % de confianza que representa el contenido de especies bacterianas identificadas en muestras de DBPCA crudos e hidrolizados; no inoculado sin fermentación (C0), no inoculado con fermentación a los 6 días post fermentación (C), inoculados con *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis* a los 6 días post fermentación (E3) y (2A1).

En la Figura 9, los análisis de secuencias de la muestra C0 (DBPCA), permitieron observar que la microbiota nativa de los DBPCA es dominada por *Proteobacterias* (53.4 %), *Bacteroidetes* (20.9 %), *Tenericutes* (10.5 %), y *Firmicutes* (7.9 %) seguido de 13 filos que representan menos del 2 %. En el caso de las muestras hidrolizadas con y sin inóculo, todas presentaron una

dominancia de *Firmicutes* (de 99 a 99.9 %) que corresponde al tipo de bacterias inoculadas o mayormente presentes en los procesos de fermentación.

El estudio comparativo de la diversidad microbiana, revela diferencias a nivel de género en los tratamientos que fueron sometidos a procesos fermentativos, con o sin inóculo. En el hidrolizado no inoculado se observa la presencia de 4 géneros principales; *Lactobacillus* (45.2 %), *Enterococcus* (43 %), *Weissella* (7.4 %) y *Lactococcus* (3.4 %) a los 3 días post-fermentación. A los 6 días post-fermentación el orden de los géneros dominantes cambio con *Enterococcus* (47.5 %), *Lactobacillus* (30.3 %), *Weissella* (19.9 %) y *Lactococcus* (1.1 %). En cambio, en las muestras inoculadas con E3 y 2A1 a los 3 y 6 días post-fermentación estos *Lactobacillus* permanecieron dominantes y estables, con un 96.4 % y 96.3 % (inoculado con E3) y un 99.1 % y 95.8 % (inoculado con 2A1). Un segundo género fue identificado en ambos tratamientos a los 6 días post fermentación, *Pediococcus* para E3 (1.4 %) y *Enterococcus* para 2A1 (2.6 %).

A nivel de especies, la muestra C0 presentaba 329 especies, principalmente dominadas por especies de los generos *Mycoplasma* (10.5 %), *Bizionia* (7.3 %), *Pseudomonas* (6.5 %), *Acinetobacter* (4.6%), *Arcobacter* (4.6 %), y *Vibrio* (3.5%). A nivel de hidrolizado espontáneo, se observa un fraccionamiento de las comunidades donde tenemos 10 principales especies: *Enterococcus durans* (13.9 %), *Lactobacillus plantarum* (12.6 %), *Lactobacillus mindensis* (12.3 %), *Enterococcus faecalis* (12.3 %), *Enterococcus faecium* (7.6%), *Weissella cibaria* (6.7 %), *Weissella hellenica* (6.5 %), *Enterococcus termitis* (3.9 %), *Weissella spp* (3.5 %), *Enterococcus sp.* (3.4 %), siendo estas comunidades no completamente estables entre el día 3 a 6.

Las comunidades microbianas presentes en el hidrolizado inoculado con *Lactobacillus plantarum* E3 fueron estables y fuertemente dominadas por *L. plantarum* y *L. paraplantarum* tanto a los 3 días (87 % y 7 %) como a los 6 días de fermentación (86 % y 7.7 %). Un perfil un poco diferente pero con prevalencia del *lactobacillus* inoculado fue observado en las muestras

inoculadas con *L. brevis* (2A1), al tercer y sexto día *L. brevis* fue dominante (44.2 % y 39.7 %), seguido por comunidades relativamente estables de *L. mindensis* (18.4 % y 13.7 %) *L. farciminis* (15 % y 13.3 %) *L. sp.* (11.5 % y 11.7 %) y *L. plantarum* (4.3 % y 11.7 %).

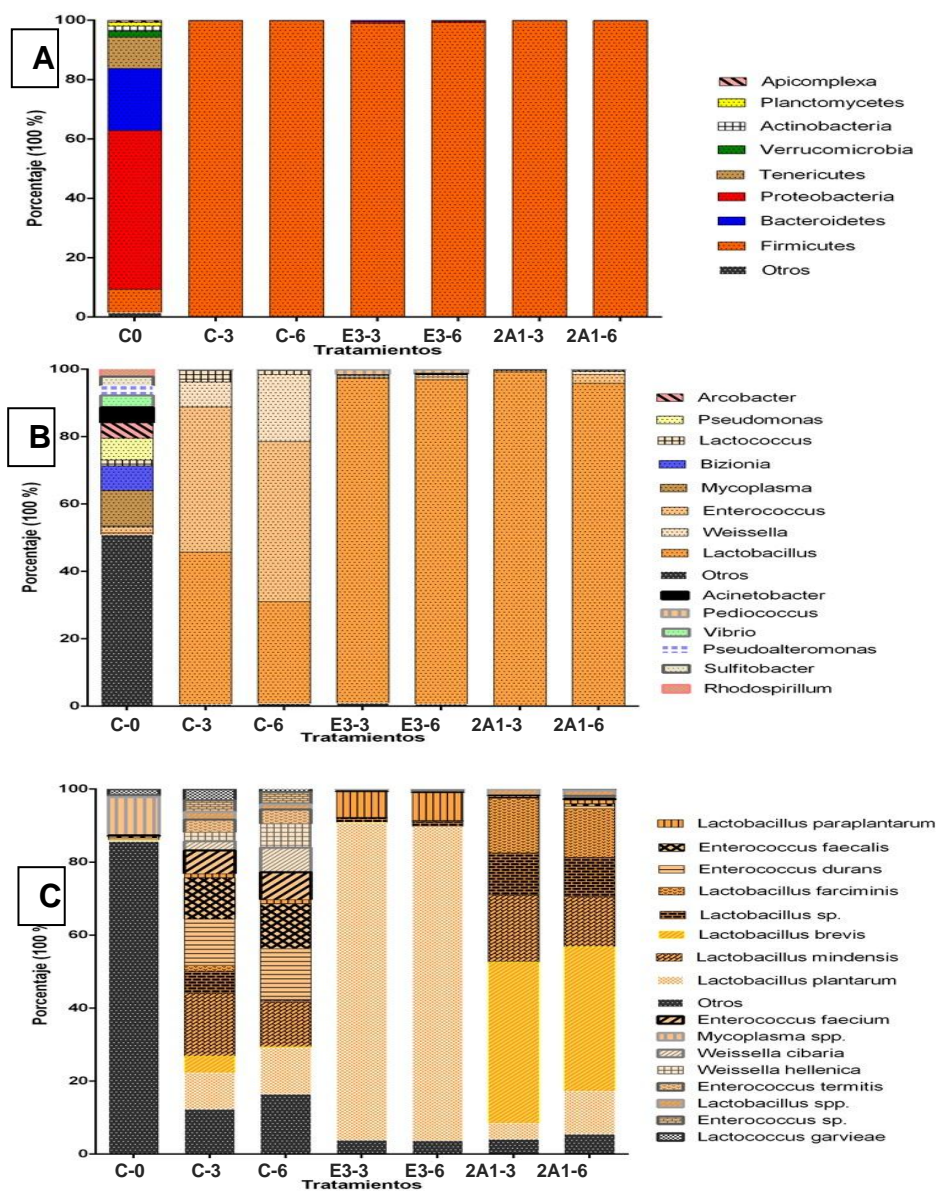


Figura 9: Análisis metagenómico a nivel de filo (A), género (B) y especie (C) de las comunidades bacterianas presentes en DBPCA (C-0); hidrolizados no inoculados a los 3 y 6 días post-fermentación (C-3 y C-6), hidrolizados inoculados con *Lactobacillus plantarum* (E3) y *Lactobacillus brevis* (2A1) a los 3 y 6 días post fermentación (E3-3 y E3-6) y (2A1-3 y 2A1-6) respectivamente.

3.6. Análisis de péptidos.

En la Figura 10 se puede observar la cantidad de péptidos de bajos pesos moleculares encontrados en los tratamientos inoculados y no inoculados a los 3 y 6 días post-fermentación. El rango seleccionado (500 a 1000 Da) corresponde al tamaño de potenciales péptidos bioactivos de 4 a 12 aminoácidos. Los tratamientos inoculados con la cepa E3 y 2A1 al sexto día de fermentación (E3-6 y 2A1-6) mostraron un mayor número de péptidos (50 y 51) y con menores pesos indicando una mejor eficiencia de hidrólisis del 19.6 y 20 % respectivamente en relación al control (C-6) que solo obtuvo 41 péptidos.

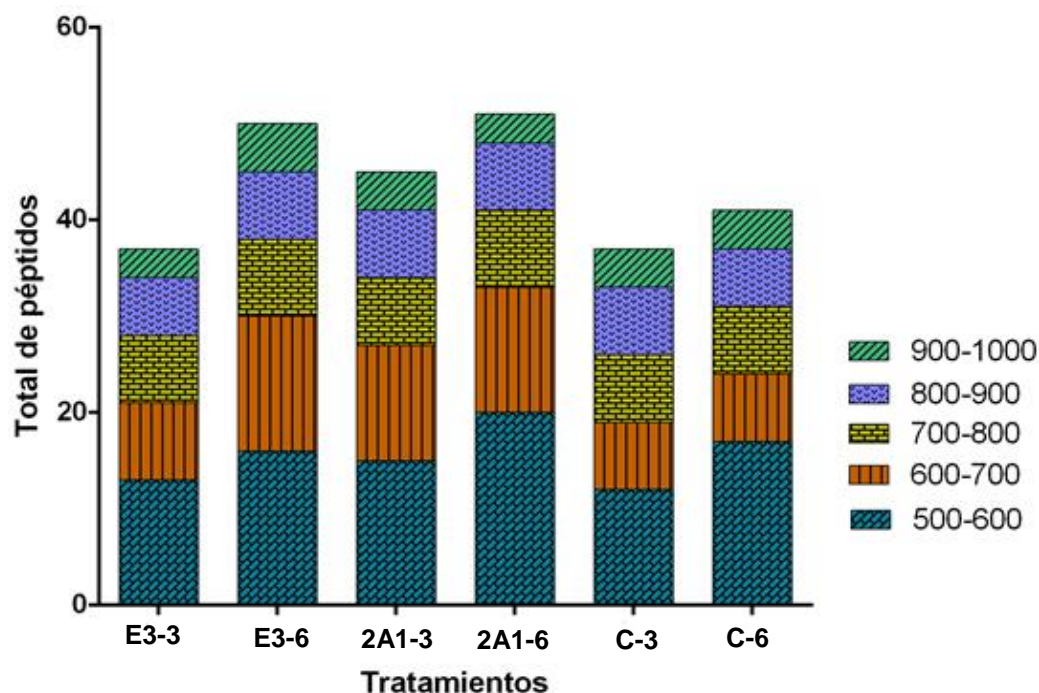


Figura 10: Péptidos en el rango de 500 a 1000 Da de tratamientos inoculados (E3 y 2A1) y no inoculado (C), analizados por MALDI TOF a los 3 y 6 días post-fermentación.

En la figura 11 podemos observar los espectros de los picos peptídicos encontrados en los tratamientos E3 (A) y 2A1 (B) a los 6 días post fermentación.

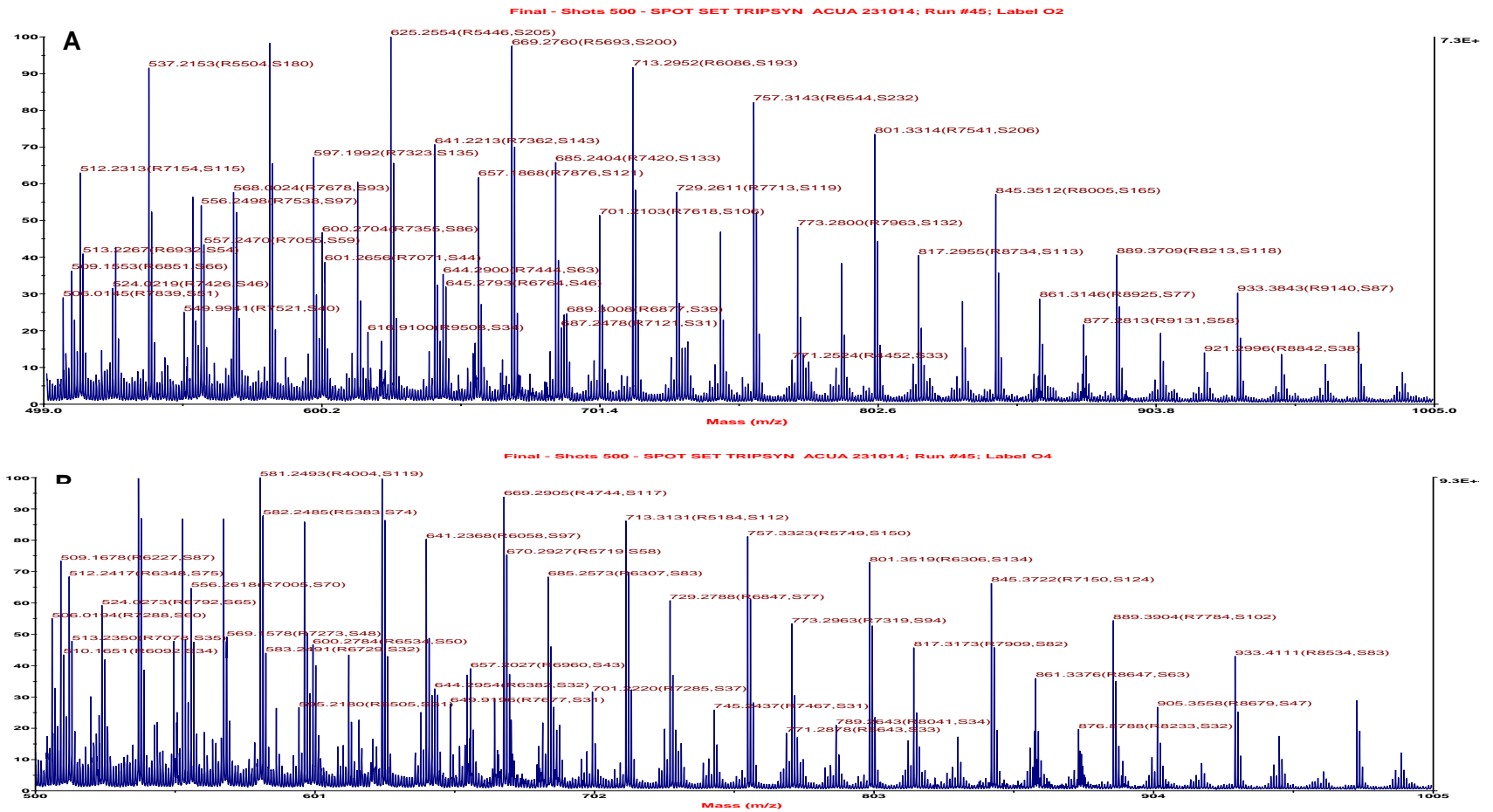


Figura 11: Análisis de espectros peptídicos por MALDI TOF TOF de los tratamientos inoculados con la cepas E3 (A) y 2A1 (B) a los 6 días de post fermentación.

5. DISCUSIÓN.

La metodología del hidrolizado por ensilaje microbiológico de descartes blandos del procesamiento de concha de abanico (DBPCA) con cepas fermentadoras fue realizada anteriormente (Encomendero, y Uchpa 2002); esto implicaba el cocinado de los DBPCA a 100 °C y el uso de bacterias de yogurt que también fueron utilizadas en otros trabajos (Uchida et al. 2004; Vazques et al. 2008). Sin embargo, esa metodología es contraproducente a múltiples niveles: 1) porque varios aminoácidos son lábiles a temperaturas superiores a 70 °C lo que conlleva a una disminución de los péptidos bioactivos y disminución de la calidad del producto. 2) El cocido produce agua de drenaje que contiene proteínas, y diversos elementos que resulta ser un subproducto adicional a tratar (Benjakul et al. 2009; Gallardo et al. 2012; Davila, Medina, y Reyes 2013). 3) Llevar a 100 °C grandes cantidades de licuado representa un sobre costo muy importante, lo que es contraproducente si se trata de valorizar un producto que no tendría un gran valor comercial. 4) El uso de bacterias no nativas (exógenas) en particular aisladas de yogurt es criticable porque los descartes de moluscos presentan condiciones muy particulares (presencia de sales, pH, composición) lo que podría alterar la buena adaptación del inóculo y la reproductibilidad del proceso. En el presente trabajo, el protocolo desarrollado elimina la etapa de cocción y de adición de químicos, e integra la adición de bacterias nativas.

Dentro de los hidrolizados existen los procesos de hidrólisis química donde se adicionan reactivos como ácidos minerales u orgánicos, antimicrobianos, antifúngicos, que permiten disminuir el pH, o el hidrolizado enzimático que requiere condiciones de pH iniciales específicas (generalmente con el uso de ácidos) y temperaturas muy controladas para el correcto desarrollo del proceso de hidrólisis (Liu *et al.* 2008; Davila, Medina, y Reyes 2013; Gonzales, y Marin 2005; Giraud, Champailier, y Raimbault 1994; Serna, y Naranjo 2005; Kandra *et al.* 2010; Asku, Baytok, y Bolat 2004; Pagarkar *et al.* 2006). Ambos hidrolizados son interesantes pero presentan muchas desventajas como: 1) No

son orgánicos, 2) Requieren de insumos (ácidos y enzimas) muy caros o con uso extremadamente regulado a nivel nacional, 3) los ácidos químicos desnaturalizan algunos aminoácidos como la metionina y lisina que son importantes en la nutrición de animales y plantas, 4) alteran la flora microbiana intestinales en especies pecuarias, y 5) su uso y manipulación presentan un riesgo para el medio ambiente y los trabajadores (FAO 2008). La mejor alternativa parece ser entonces la hidrólisis biológica mediante procesos microbianos.

Uno de los principales problemas de intoxicación por mariscos es generado por la producción microbiana de aminas biogénicas, las intoxicaciones por histamina siendo las más importantes (Chong *et al.*, 2011). El control de la formación de aminas biogénicas se centra principalmente en el control del crecimiento de bacterias capaz de producir aminas biogénicas debido a que la histamina es termoestable y muy difícil de destruir (Kurt, y Zorba 2009). La estrategia desarrollada en este trabajo fue de identificar por multiplex PCR que las cepas utilizadas carecían de las descarboxilasas necesarias para la producción de histamina, ornitina y tiramina (De la Riva *et al.* 2005; Landette *et al.* 2007).

Aquello es particularmente importante porque diferentes miembros de las familias *Enterobacteriaceae*, *Clostridium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* y *Lactobacillus* producen aminas biogénicas (Shalaby, 1996). Las cepas aisladas en el presente trabajo no presentaban estas características. A futuro la caracterización de descarboxilasas podría realizarse más rápidamente por MALDI TOF ya que el equipo de Fernández-No *et al.* (2010) ha identificado picos específicos relacionados a la producción de aminas biogénicas en diferentes cepas bacterianas.

Los microorganismos conocidos en las comunidades de hidrolizados microbiano que intervienen en la fermentación del ácido láctico pertenecen al filo *Firmicutes* y en particular a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Weissella* y *Leuconostoc* (Woolford y Pahlow, 1998) que comprende especies

como *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Weissella cibaria* (Pang *et al.* 2011; Carbo *et al.* 2013). Las cepas aisladas en este trabajo pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Weissella* y *Enterococcus*, siendo las cepas E3 y 2A1 del género *Lactobacillus* las que mostraron el mayor poder de acidificación y finalmente fueron seleccionadas. Los análisis de metagenómica confirman la presencia de los otros géneros en los ensilados espontáneos, tal como lo describen Pang *et al.* 2011.

La ventaja de realizar un inóculo de cepas caracterizadas reside también en limitar la producción de aminas biogénicas por cepas nativas fermentativas presentes en el DBPCA (Komprda *et al.* 2009). Interesantemente varios estudios demostraron que cepas de *Lactobacillus plantarum* tenían actividades degradadoras de aminas biogénicas como histamina oxidasa cuando son aplicadas solas o en consorcio (Fadda *et al.* 2001; Coloretti *et al.* 2008, Gücükoğlu *et al.* 2010; Hu *et al.* 2007).

La utilización del inóculo de *L. plantarum* (E3) y *L. brevis* (2A1) benefició claramente a la acidificación y estabilidad del hidrolizado. Los análisis metagenómicos proporcionan una clara evidencia de la competitividad de la *L. plantarum* (E3) durante la fermentación del hidrolizado ya que esta cepa colonizó completamente (85% de las secuencias de ADN reclutas) el hidrolizado y fue capaz de desplazar a los otros miembros de la comunidad fermentadoras. Es posible que estas prevalencias sean aún más altas debido a que la especie que sigue en prevalencia es *L. paraplantarum*, una especie muy cercana genéticamente y fenotípicamente idéntica a *L. plantarum* (Curk, Hubert, y Bringel 1996). Es probable que el cambio de unos cuantos nucleótidos entre las secuencias sea suficiente para alterar la identificación debido al reducido tamaño del fragmento secuenciado (únicamente la región V4). En el caso de *L. brevis* (2A1), esta cepa fue también predominante pero con solamente el 44.2-39.6% de las secuencias registradas a los 3 y 6 días. Es posible que este segundo *Lactobacillus* tenga una acción más preponderante

en las primeras etapas del hidrolizado donde prepara un medio favorable para otros microorganismos fermentativos que finalmente lo suplantán. Una dinámica similar de disminución progresiva fue reportada con *Lactococci lactis* en el ensilaje de alfalfa (Stevenson *et al.* 2006) y de césped (Eikmeyer *et al.* 2013) respectivamente. La dinámica de colonización de E3 y 2A1 podría ser averiguado realizando análisis adicionales a mayores tiempos de inoculación.

Una observación notable es que la utilización de “starters” como las cepas E3 y 2A1 favoreció el reclutamiento casi exclusivo del género *Lactobacillus* en los hidrolizados inoculados mientras que el hidrolizado no inoculado presentó 3 géneros dominantes *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Weissella*. Es importante adicionar que la prevalencia de los *Lactobacillus* presentes en los hidrolizados inoculados fueron muy estables en el tiempo (con mínimo 95,8% y máximo 99.2%) mientras que en el hidrolizado no inoculado la prevalencia varió fuertemente entre el día 3 y 6 revelando que el hidrolizado no está completamente estabilizado. Es de resaltar que 3 de las 5 especies más importantes de la comunidad fermentativa “espontánea” son del género *Enterococcus* (*E. faecalis*, *E. faecium* y *E. durans*) de las cuales las 2 primeras especies son organismos comensales comunes del tracto intestinal humano (*E. faecalis* (90-95%) y *E. faecium* (5-10%)) (Gilmore *et al.* 2002). En EE.UU y Europa la detección de los *Enterococcus* es desde el 2004, el nuevo estándar de evaluación de calidad en playas públicas de agua salada en el lugar de los coliformes fecales (Jin *et al.* 2004). Además, los *Enterococcus* son patógenos oportunistas que causan septicemia, infecciones del tracto urinario, dolor abdominal, meningitis y son la causa de más de 10% de las infecciones nosocomiales (Fisher, y Phillips, 2009).

Por lo tanto, estos resultados confirman que valores bajos de pH por sí solos no reducen necesariamente el crecimiento de bacterias no deseadas y refuerzan la importancia de utilizar “starters” de bacterias nativas caracterizadas para asegurar la inocuidad del hidrolizado (Eikmeyer *et al.* 2013).

El análisis de curvas de rarefacción (figura 8) permitió resaltar que el DBPCA (C0) contiene la mayor cantidad de OTUs (al menos 2 veces más) con la menor cantidad de secuencias leídas (al menos 10 veces) comparativamente con las muestras de hidrolizados. Ello se explica porque la microbiota inicial de DBPCA corresponde a la flora nativa de un animal filtrador vivo y fresco, mientras los hidrolizados son caldos bacterianos mantenidos en condiciones de fermentación para favorecer la multiplicación de una microbiota específica.

Es importante resaltar que en metagenómica es el número de OTUs y no necesariamente el número de especies que refleja la diversidad microbiana. El índice de análisis para la evaluación de la diversidad ecológica el más empleado es el de Diversidad α , es decir la riqueza de especies de una comunidad determinada y que se considera homogénea. Se observó claramente que la diversidad α que consiste en la evaluación de la diversidad total y local de una comunidad fue más elevada en el DBPCA que en los hidrolizados indicando *a priori* un mayor número de especies. Los resultados pueden ser correlacionados con las curvas de rarefacción. Estas curvas permiten estimar si la totalidad de los OTUs presentes en las muestras han sido recuperados considerando un nivel de identidad de secuencia de 97%. El análisis permitió apreciar que ninguna de las muestras alcanzó una saturación o fase meseta sugiriendo que varios OTUs quedaron inadvertidos. Sin embargo, los OTUs menos importantes encontrados en las muestras representan importancias relativas muy inferiores al 0.1% sugiriendo que los OTUs inadvertidos no son realmente relevantes.

El uso del hidrolizado biológico con cepas bacterianas (Uchida *et al.* 2004; Vazques *et al.* 2008) permite obtener un alimento más ecológico y barato así como aumentar la hidrólisis proteica y la cantidad de péptidos como se muestra en la figura 11. Estos péptidos con potencial de ser bioactivos tiene un importante valor agregado en comparación con péptidos largos y tendrán aplicaciones económicamente interesantes para la nutrición animal y la

fertilización de plantas (Refstie, Olli, y Standal 2004; Tang et al 2008; Tian *et al.* 2012).

El proceso de hidrolizado biológico desarrollado también evita el uso de químicos para el control de bacterias y hongos putrefacientes que pueden: 1) alterar las características organolépticas del producto, 2) degradar proteínas y grasas y 3) producir compuestos tóxicos (Encomendero, y Uchpa 2002; Pagarkar *et al.* 2006). En el caso de este hidrolizado biológico no se agregó químico alguno para la conservación y no se evidenció alteraciones en el contenido de proteínas y grasas hasta los 60 días de conservación. Además el uso de bacterias incrementó el contenido de proteína en los tratamientos inoculados y fermentados en comparación al control no fermentado (C0) como se muestra en la Tabla 3. Esto se debe probablemente al incremento de la biomasa bacteriana (Hernández, Cardell, y Zárate 2005; Settachaimongkon *et al.* 2014; Da Silva *et al.* 2014; Perin, y Nero 2014).

El uso de las pruebas bioquímicas nos permitió visualizar y tener una referencia de la actividad proteasa de todas las bacterias aisladas. La utilización de la espectrometría de masas además de reafirmar la actividad proteasa de dichas bacterias al incrementar el número de péptidos entre el rango de 500 a 1000 Da (E3-6 y 2A1-6 en figura 11), mejoro la comprensión, identificación y análisis de los péptidos como lo describen otros trabajos (Robert *et al.* 2014; Graves, y Haystead 2002; Steen, y Mann 2004; Palagi *et al.* 2006).

6. CONCLUSIONES.

- Se logró aislar y caracterizar 13 cepas de bacterias ácido lácticas nativas extraídas de descartes blandos del proceso de concha de abanico, a partir de estas se seleccionaron dos cepas *Lactobacillus plantarum* (E3) y *Lactobacillus brevis* (2A1) en base a su poder de acidificación durante el proceso de hidrólisis, su actividad proteasa y por no producir aminos biogénicas.
- El pH dentro el proceso de hidrolisis era muy variable, por ende se optimizó experimentalmente la concentración de melaza de caña de azúcar a adicionar (10 %), la temperatura de incubación (30 °C) y la cantidad de starter bacteriano (5 %; $DO_{600} = 1.5$) a inocular dentro del licuado para la obtención de un hidrolizado con un pH idóneo y estable.
- Los resultados de análisis metagenómicos demostraron que los hidrolizados espontáneos albergaban diferentes comunidades bacterianas fermentadoras, con fuertes prevalencias de especies indicadoras de materias fecal y posiblemente patógenas, mientras tanto los hidrolizados inoculados eran masivamente colonizados con poblaciones estables de *Lactobacillus* de las especies inoculadas, por lo tanto aseguran la inocuidad del producto.
- A nivel de especies la cepa E3 domino fuertemente la comunidad microbiana fermentadora indicando una interesante capacidad de inhibición de otros tipos bacterianos. La cepa 2A1 también predominaba pero parece permitir el crecimiento de otras especies de *Lactobacillus*, en consecuencia estas cepas inoculadas aseguran la calidad e inocuidad del hidrolizado
- La actividad de hidrólisis fue evaluada por espectrometría de masa MALDI TOF, indicando que los hidrolizados inoculados presentan alrededor de 20 % más péptidos que los hidrolizados espontáneos y principalmente péptidos en el rango de 500 a 1000 Da que corresponden a péptidos bioactivos,

quedando demostrado que las bacterias inoculadas también participan en la hidrólisis proteica dentro del proceso de ensilaje.

- En su conjunto, el presente trabajo desarrolló y validó un protocolo de valorización de descartes blandos del proceso de concha de abanico. Este protocolo fue evaluado y aprobado por el Ministerio de Producción de Piura (PRODUCE) y está actualmente aplicado en Fiest & Riva SRL, entonces este proceso se presenta como la mejor alternativa para el uso y valorización de los DBPCA frente a los ensilados antes desarrollados.
- El producto obtenido tiene un bajo costo de producción comparativamente a harinas o hidrolizados químicos/enzimáticos/microbianos con flora no nativa, es estable, orgánico, inocuo y contiene más péptidos bioactivos que otras alternativas, por lo tanto, teniendo en cuenta que las empresas procesadoras de Sechura desde el 2015 tienen la obligación de presentar un plan de manejo de residuos y a la fecha, solo 2 proposiciones existen; la valorización de estos descartes como hidrolizado desarrollado por el presente proyecto y la transformación directa en harina presentada por Prisco 2015, nuestra propuesta parece ser la más viable ya que esta última parece ser no viable debido al importante contenido de agua de los descartes lo cual genera un elevado costo de producción.
- Los excelentes resultados en pruebas piloto a nivel de laboratorio utilizando el hidrolizado como biofertilizante, acelerador de compostaje, medio de cultivo para microorganismos, así como alimento para pollos y cerdos nos ha permitido ganar otro proyecto innovate para escalación industria (PVE-1-P-151-15) denominado “Validación de formulaciones de hidrolizado microbiológico controlado de descartes blandos del proceso de concha de abanico, como componentes de biofertilizantes, biocompostajes, bioremediadores o como aditivos de alimentos para especies pecuarias”, también actualmente este hidrolizado está en fase de negociación comercial bajo la denominación HIBIOCA (Hidrolizado biológico de Concha de abanico).

7. RECOMENDACIONES.

- Frente a los excelentes resultados obtenidos, se recomendaría realizar análisis adicionales de metagenómica y cuantificación de biopéptidos, en particular con tiempos de hidrólisis más largos (30, 60 y 90 días) y en hidrolizados mixtos (E3 mas 2A1). Este trabajo debería evaluar la cinética de inoculación (primero 2A1 y luego E3).
- Las cepas E3 y 2A1 deberían ser completamente secuenciadas. Esto permitirá determinar qué tipo de enzimas o moléculas producen los *Lactobacillus* aislados con el fin de optimizar su rendimiento y eventualmente encontrar nuevas aplicaciones biotecnológicas.
- De evaluar post secuenciación la posibilidad de introducir mediante ingeniería genética a genes de interés como descarboxilasas de aminas biogenicas, proteasas adicionales, que en su conjunto podría mejorar el rendimiento de las cepas. Importantemente, la secuenciación del genoma post manipulación genética permitiría una protección comercial de las cepas a través de patentes.
- Caracterizaciones molecular adicionales de las cepas podrían ser interesante, tanto al nivel genético (genes de tipo rpoB, platarumicina, descarboxilasas de aminas biogenica) a nivel proteico por MALDI TOF TOF (proteoma, secretoma). En particular la estandarización de la detección por MALDI TOF OF sería una alternativa interesante por su velocidad de repuesta y la posibilidad de descubrir nuevas moléculas mientras que análisis por real time PCR aparece como una alternativa interesantes para cuantificaciones.
- El análisis de los perfiles peptídicos a nivel de simple MS (MALDI TOF) nos puede dar una clara referencia de la digestión proteica, sin embargo si se quiere reconocer alguna funcionalidad específica de estos péptidos se recomienda analizarlos a nivel de MS MS (MALDI TOF TOF) para conocer

su secuencia de aminoácidos y predecir su función. A la vez, la realización de un aminoácidoograma de los hidrolizados serían un argumento comercial importante para poder asegurar la composición y cantidades en aminoácidos del producto.

- Los primeros resultados de utilización del producto para actividades agropecuarias deben ser consolidados a mayor escala, de preferencia con socios industriales.
- Finalmente, se recomendaría realizar el mismo tipo de estudio para la hidrólisis de descartes de pescados y otros descartes hidrobiológicos para poder ofrecer alternativas de valorización de estos descartes generados en los puertos pesqueros y sectores acuícolas del Perú.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Aksu T., E. Baytok, y D. Bolat. 2004. Effects of a bacterial silage inoculant on corn silage fermentation and nutrient digestibility. *Small Ruminant Research* 55: (1–3), 249–252.
- Benjakul, S., W. Binsan, W. Visessanguan, K. Osako, and M.Tanaka. 2009. Effects of flavourzyme on yield and some biological activities of Mungoong, an extract paste from the cephalothorax of white shrimp. *J. Food Sci.* 74: S73–S80.
- Berenz Z. 1996. Ensilado de Residuos de Pescado. *XI Curso Internacional de Procesamiento de Productos Pesqueros*. Instituto Tecnológico Pesquero del Perú. Callao, Perú.
- Bevilacqua, A., C. Altieri, M.R. Corbo, M. Sinigaglia, and L.I.I. Ouoba. 2010. Characterization of lactic acid bacteria isolated from Italian bella di Cerignola table olives: Selection of potential multifunctional starter cultures. *Journal of Food Science* 75(8): M536–M544 (2010).
- Chong, C. Y., Fatimah, A. B., Russly, A. R., Jamilah, B. and Mahyudin, N. A. MiniReview The effects of food processing on biogenic amines formation *International Food Research Journal* 18(3): 867-876 (2011)
- Cole, J., Q. Wang, E. Cardenas, J. Fish, and B. Chai. 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 37:141–145.
- Coloretti, F., C. Chiavari, E. Armaforte, Carri, S. and G.B. Castagnetti. 2008. Combined use of starter cultures and preservatives to control production of biogenic amines and improve sensorial profile in low-acid salami. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(23): 11238-11244.
- Corbo, M.R., A. Bevilacqua, D. Campaniello, B. Speranza, and M. Sinigaglia. 2014. Selection of promising lactic acid bacteria as starter cultures for sourdough: Using a step-by-step approach through quantitative analyses and statistics. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94(9): 1772-1780.
- Corsetti A., and L. Settanni. 2007. Lactobacilli in sourdough fermentation. *Food Research International*, 40(5): 539–558.
- Curk M.C., J.C. Hubert, and F. Bringel. 1996. *Lactobacillus paraplantarum* sp. nov., a new species related to *Lactobacillus plantarum*. *Int J Syst Bacteriol.* 46: 595–598.

- Da Silva-Sabo, S., M. Vitolo, J.M. Domínguez-González, and R.P. de Souza-Oliveira. 2014. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocins producer among lactic acid bacteria. *Food Research International* 64: 527–536.
- Dávila, E., J. Medina, and W. Reyes. 2013. Crecimiento y supervivencia de postlarvas de *Macrobrachium inca Holthuis*, 1950 (Crustacea, Palaemonidae) alimentadas con ensilado biológico. *Revista Intrópica* 8: 79 – 86
- de Las Rivas, B., A. Marcobal, and R. Muñoz. 2005. Improved multiplex-PCR method for the simultaneous detection of food bacteria producing biogenic amines. *FEMS Microbiol Lett.* 244(2): 367-72.
- Encomendero, E., y F. Uchpa. 2002. Producción de ensilado biológico de subproductos de concha de abanico (*Argopecten purpuratus*). pp 292-298. En: Memorias I Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura 2002. Zaragoza, España.
- Fadda, S., G. Vignolo, and G. Oliver. 2001. Tyramine degradation and tyramine/histamine production by lactic acid bacteria and *Kocuria* strains. *Biotechnology Letters* 23(24): 2015-2019.
- Fagbenro, O., and K. Jauncey. 1995. Growth and protein utilization by juvenile catfish (*Clarias gariepinus*) fed dry diets containing co-dried lactic acid fermented fish silage and protein feed stuffs. *Bioresource Technology* 51: 29–35.
- Fernández-No I.C., K. Böhme, J.M. Gallardo, J. Barros-Velázquez, B. Cañas, and P Calo-Mata . 2010. Differential characterization of biogenic amine-producing bacteria involved in food poisoning using MALDI-TOF mass fingerprinting. *Electroforesis* 31(6):1116-27.
- Fisher K., and C. Phillips. 2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* 155(6): 1749–57.
- Gallardo P., G. Gaxiola, S. Soberano, J.G. Taboada, M. Pérez, C. Rosas, G. Cuzon, L.G. Espinosa, and A. Sotelo. 2012. Nutritive value of diets containing fish silage for juvenile *Litopenaeus vannamei* (Bonne, 1931). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92(11): 2320–2325.
- Gilmore, MS et al. 2002. The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance. Washington, D.C: ASM Press. ISBN 978-1-55581-234-8.

- Giraud, E., A. Champaviller, and M. Raimbault. 1994. Degradation of raw starch by a wild amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Applied Environmental Microbiology* 60: 4319-4323.
- González, D., y M. Marín, 2005. Obtención de ensilados biológicos a partir de los descartes del procesamiento de sardinas. *Revista Científica* 15: 560-567.
- Graves, P.R., and T.A. Haystead. 2002. Molecular Biologist's Guide to Proteomics. *Microbiology and molecular biology reviews* 66(1): 39-63.
- Gücükoğlu, A. and Ö. Küplülü. 2010. The effect of different starter cultures and ripening temperatures on formation of biogenic amine in Turkish fermented sausages. *European Food Research and Technology* 230(6): 875-884.
- Hernández D., E. Cardell, and V. Zárate. 2005. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *Journal of Applied Microbiology* 99(1): 77-84
- Hu, Y., W. Xia, and X. Liu. 2007. Changes in biogenic amines in fermented silver carp sausages inoculated with mixed starter cultures. *Food Chemistry* 104(1): 188-195.
- Je, J.Y., P.J. Park, and S.K. Kim. 2005. Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *Food Res.Int.* 38: 45-50.
- Jin G., H.W. Jeng, H. Bradford, and A.J. Englande. 2004. Comparison of *E. coli*, *enterococci*, and fecal coliform as indicators for brackish water quality assessment. *Journal Water Environ. Res.* 76(3): 245-55.
- Kandra P., Ch. Murali-Mohan, P.V. Smitha, and K.P.J. Hemalatha. 2010. Bioremediation of shrimp biowaste by using natural probiotic for chitin and carotenoid production an alternative method to hazardous chemical method. *IJABPT* 1(3): 903-910
- Komprda, T., P. Sládková, and V. Dohnal. 2009. Biogenic amine content in dry fermented sausages as influenced by a producer, spice mix, starter culture, sausage diameter and time of ripening. *Meat Science* 83(3): 534-542.
- Koopman, R., N. Crombach, A.P. Gijsen, S. Walrand, J. Fauquant, A.K. Kies, and L.J. van Loon. 2009. Ingestion of a protein hydrolysate is accompanied by an

accelerated in vivo digestion and absorption rate when compared with its intact protein. *Am. J. Clin. Nutr.* 90(1): 106–115.

- Kurt, S. and O. Zorba. 2009. The effects of ripening period, nitrite level and heat treatment on biogenic amine formation of "sucuk" - A Turkish dry fermented sausage. *Meat Science* 82(2): 179-184.
- Landete, J.M., B. De Las Rivas, A. Marcobal, and R. Muñoz. 2007. PCR methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on food. *International Journal of Food Microbiology* 117(1): 258–269.
- Lane, D. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow. Chichester: Wiley. pp. 115–175.
- Lassen, T.M., 1995. Lactic acid fermentation of fish offal and chicken by-product with different starter cultures. *Agriculture Science of Finland* 4: 19–26.
- Liu, Z., S. Dong, J. Xu, M. Zeng, H. Song, and Y. Zhao. 2008. Production of cysteine-rich antimicrobial peptide by digestion of oyster (*Cras-sostrea gigas*) with alcalase and bromelin. *Food Control* 19(3): 231–235.
- Missotten, J.A.M., J. Goris, J. Michiels, E. Van Coillie, L. Herman, S. De Smet, N.A. Dierick, and M. Heyndrickx. 2009. Screening of isolated lactic acid bacteria as potential beneficial strains for fermented liquid pig feed production. *Animal Feed Science and Technology* 150(1-2): 122-138.
- Pagarkar, A.U., S. Basu, A. Mitra, and N.P. Sahu. 2006. Preparation of bio-fermented and acid silage from fish waste and its biochemical characteristic. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences* 8(2): 381–387.
- Palagi, P.M; P. Hernandez, D. Walther, and R.D. Appel. 2006. Proteome informatics I: Bioinformatics tools for processing experimental data. *Proteomics* 6(20): 5435-5444.
- Perin, L.M., y L.A. Nero. 2014. Antagonistic lactic acid bacteria isolated from goat milk and identification of a novel nisin variant *Lactococcus lactis*. *BMC microbiology* 14: 1 – 36.
- Prom Perú. 2014. Desenvolvimiento de comercio exterior pesquero. *Informe anual*, Perú (2014).

- Rajapakse, N., E. Mendis, W.K Jung, J.Y. Je, and S.K. Kim. 2005. Purification of a radicals scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Res. Int.* 38: 175–182.
- Refstie, S., J.J. Olli, and H. Standal, 2004. Feed intake, growth, and protein utilisation by post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) in response to graded levels of fish protein hydrolysate in the diet. *Aquaculture* 239(1–4): 331–349. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.06.015>.
- Robert, M., C. Zatylny-Gaudin, V. Fournier, E. Corre, G. Le Corguillé, B. Bernay, and J. Henry. 2014. Transcriptomic and peptidomic analysis of protein hydrolysates from the white shrimp (*L. vannamei*). *Journal of Biotechnology* 186: 30-37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.06.020>
- Ruthu, P.S. Murthy, A.K. Rai and N. Bhaskar. 2012. Fermentative recovery of lipids and proteins from freshwater fish head waste with reference to antimicrobial and antioxidant properties of protein hydrolysate. *J Food Sci Technol.* 51(9): 1884-1892.
- Serna, L., y E. Naranjo. 2005. Producción de ácido láctico por una mezcla de *Lactococcus lactis* y *Streptococcus salivarius* en fermentaciones en discontinuo. *Revista Colombiana de Biotecnología* 7: 32-38.
- Settachaimongkon, S., M.J. Nout, E.C. Antunes-Fernandes, K.A. Hettinga, J.M. Vervoort, van T.C. Hooijdonk, M.H. Zwietering, E.J. Smid, and H.J. van Valenberg. 2014. Influence of different proteolytic strains of *Streptococcus thermophilus* in co-culture with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus on the metabolite profile of set-yoghurt. *International Journal of Food Microbiology* 177: 29–36.
- Shalaby, A.R. 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International* 29(7): 675–690.
- Steen, H., and M. Mann. 2004. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. Nature reviews. *Molecular cell biology* 5(9): 699-711.
- Tang, H., T. Wu, Z. Zhao, and X. Pan. 2008. Effects of fish protein hydrolysate on growth performance and humoral immune response in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea* R.). *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 9(9): 684–690.
- Tian, S., Lingli Lu; Ruohan Xie; Minzhe Zhang; Judith A. Jernstedt; Dandi Hou; Cliff Ramsier; and Patrick H. Brown 2012. Supplemental macronutrients and microbial fermentation products improve the uptake and transport of foliar applied

zinc in sunflower (*Helianthus annuus*) plants. Studies utilizing micro X-ray fluorescence, *Front Plant Sci*.

- Uchida, M., H. Amakasu, Y. Satoh, and M. Murata. 2004. Combinations of lactic acid bacteria and yeast suitable for preparation of marine silage. *Fisheries Science* 40: 507–517.
- Vázquez, J.A., M.P. González, and M.A. Murado, 2004. A new marine medium. Use of the different fish peptones and comparative study of the growth of selected species of marine bacteria. *Enzyme and Microbial Technology* 35: 385–392.
- Weisburg, W., S. Barns, D. Pelletier., D. Lane 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study". *J Bacteriol* 173 (2): 697–703.
- Wilke, A., E.M. Glass, J. Bischof, D. Braithwaite, W. Gerlach, T. Harrison, K. Keegan, T. Paczian, W.L. Trimble, and F. Meyer. 2015. MG-RAST Manual for version 3.6, revision 3: October 2nd, 2015. <http://metagenomics.anl.gov/>

9. ANEXOS.

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a dios por haberme permitido culminar con éxito esta etapa de mi vida, por haberme dado las fuerzas y el empuje para poder culminar esta maestría.

A mi familia por el apoyo incondicional en todo lo que fue esta etapa de mi vida ya que sin ellos no hubiese sido posible todo esto.

A los docentes y amigos de esta maestría por impartirme los conocimientos necesarios para mi preparación profesional, en especial al Mcs. Benoit Diringer Ph.D. Erick Mialhe y Ph.D Emmerik Motte por su apoyo en la realización de esta tesis y el asesoramiento en este informe.

A los amigos y docentes de la Universidad Nacional de Tumbes, en especial al Dr. Auberto Hidalgo Mogollón y Dra. Enedia G. Vieyra Peña por su apoyo incondicional en todo el desarrollo de esta maestría.

Al consejo nacional de ciencia, tecnología e innovación (CONCYTEC) por el financiamiento y brindarme todas las facilidades para realizar esta tesis y la maestría a través del otorgamiento de una beca.

A todo el personal que labora en el área de investigación del centro de investigación Inca Biotec S.A.C, Universidad Nacional de Tumbes y la empresa Fiest & Riva S.R.L S por su buen trato y apoyo en el desarrollo de este trabajo y a la hora de mostrarme el manejo en laboratorio y campo.

DEDICATORIA

A Dios, por haberme dado salud, sabiduría y mucha paciencia para culminar con éxito esta maestría.

A mis padres: Efraín López y Santos Luna, por todo su amor, confianza y por el apoyo que me brindaron y brindan, así como dejarme la herencia más rica.

A mi amor Nayda Zamira Munaya Sáenz, por sus palabras de estímulo y darme la fortaleza necesaria para realizar esta tesis.

A mis hermanos y Sobrinos: Andubar, Junior, Rubi, Aldair, Zair y Piero por sus palabras de aliento, estímulo y confianza que me brindaron y brindan.