



EFFECTO DE LA PURIFICACIÓN QUÍMICA, BIOLÓGICA Y FÍSICA EN LA RECUPERACIÓN DE QUITINA DE EXOESQUELETOS DE CAMARÓN (*Penaeus sp*) Y CHAPULÍN (*Sphenarium purpurascens*)
EFFECT OF CHEMICAL BIOLOGICAL AND PHYSICAL PURIFICATION ON CHITIN RECOVERY FROM EXOSKELETONS OF SHRIMP (*Penaeus sp*) AND GRASSHOPPER (*Sphenarium purpurascens*)

A. Amador-Mendoza¹, S. Huerta-Ochoa², E. Herman-Lara³, I. Membrillo-Venegas⁴, A. Aguirre-Cruz⁵, M.A. Vivar-Vera³, L. Ramírez-Coutiño^{5*}

¹Instituto Tecnológico Superior de Juan Rodríguez Clara. Calle José Ma. Morelos Pavón No.507, Col. Mata Bejuco. Juan Rodríguez Clara, Ver. México. C.P. 95670.

²Universidad Autónoma Metropolitana. Depto. de Biotecnología. Av. San Rafael Atlixco No. 186, Iztapalapa, México, D. F. C.P. 09340.

³Instituto Tecnológico de Tuxtepec. Avenida Dr. Víctor Bravo Ahuja S/N, 5 de Mayo Tuxtepec, Oax., México C.P. 68350.

⁴Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec. División de Ingeniería Química y Bioquímica. Av. Tecnológico S/N Col. Valle de Anáhuac, Ecatepec de Morelos, Estado de México. C.P. 55210.

⁵Instituto de Biotecnología, Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec. Circuito Central # 200, Colonia Parque Industrial, Tuxtepec, Oax., México C.P. 6830.

Recibido 16 de marzo de 2016; Aceptado 29 de junio de 2016

Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de tres métodos: químico (Hidrólisis alcalina-ácida), Biológico o fermentación en medio sólido (FMS) y físico (ultrasonicación) en exoesqueletos de chapulín y camarón para la recuperación de quitina. En los productos de cada método se evaluó el porcentaje de desmineralización, desproteínización y cambio de color. Los resultados demostraron que la FMS con *L. plantarum* BG-112 a las 120 h produjo 32.43% y 32.63% de desproteínización y 40.31% y 15.40% de desmineralización, la hidrólisis alcalina-ácida presentó 98.19% y 96.75% de desproteínización y 98.91% y 92.66% de desmineralización. Por último, en la ultrasonicación empleando 40% de amplitud, la desproteínización fue de 64.58% y 61.12%; y una desmineralización de 13.71% y 12.29% con esos sustratos. El tratamiento químico generó una mayor remoción de proteínas y minerales en comparación con los demás tratamientos con un tiempo de proceso de 5 h, y los rendimientos alcanzados de quitina fueron de 51.94% y 47.68% para chapulín y camarón respectivamente. Sin embargo, la aplicación de ondas ultrasónicas permitió obtener una extracción tanto de proteínas y minerales en un tiempo menor (2 h), extrayendo quitina con rendimientos en base húmeda de 75.3% y 74.02%. **Palabras clave:** fermentación en medio sólido, ultrasonicación, desproteínización, desmineralización, despigmentación.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of three methods: Chemical (hydrolysis by alkaline-acid reactants), solid-state fermentation (SSF) and physical (ultrasonication) treatments in grasshopper and shrimp exoskeletons for chitin recovery. In products derived from each method were evaluated the percentages of demineralization, deproteinization and color changes. The results showed that at 120 h of SSF with strain *L. plantarum* BG-112 were obtained 32.43% and 32.63% of deproteinization and 40.31% and 15.40% of demineralization with grasshopper and shrimp respectively. The alkaline-acid treatment produced 98.19% and 96.75% of deproteinization and 98.91% and 92.66% of demineralization with these substrates. Finally, using ultrasonication (40% of amplitude), the deproteinization achieved was 64.58% and 61.12% and presented a demineralization of 13.71% and 12.29% in grasshopper and shrimp exoskeletons. Chemical treatment showed a greater protein and mineral removal compared to other treatments with a process time of 5 h, and chitin yields achieved were 51.94% (grasshopper) and 47.68% (shrimp). However, the application of ultrasonic waves allowed the extraction of protein and minerals in a shorter time (2 h), and on wet basis chitin yields were estimated as 75.3% and 74.02% from grasshopper and shrimp exoskeletons.

Keywords: solid-state fermentation, ultrasonication, deproteinization, demineralization and depigmentation.

* Autora para la correspondencia. E-mail: rac.lape@yahoo.com.mx
Tel. 01 287 87 5 92 40, Ext.220. Fax 01 287 87 5 92 40

1 Introducción

Los productos marinos han constituido uno de los rubros económicos de mayor importancia para países como México que cuenta con amplios litorales, entre estos productos se encuentra el camarón, según cifras del Anuario Estadístico 2013 de la Comisión Nacional de Pesca y Acuicultura (CONAPESCA), la tasa media de crecimiento anual de la producción en los últimos 10 años es de 0.15% y se capturaron alrededor de 127,517 toneladas camarón. Aproximadamente del 43 al 45% del peso del animal corresponde a la cabeza, este residuo se utiliza en una baja proporción para la elaboración de harinas empleadas como ingredientes de alimentos para animales y casi en su totalidad es desechado ocasionando serios problemas ecológicos, convirtiéndose en una gran preocupación para las plantas procesadoras en el país. Tan sólo los desechos sólidos generados a partir del procesamiento del camarón representan una carga orgánica diez veces mayor que la que aportan los desperdicios domésticos, ocasionando el desperdicio de proteínas de alta calidad y un aumento de la contaminación ambiental según Barreto y col. (2001). Por esta razón y como alternativa para resolver esta problemática algunos desechos de crustáceos (camarones, cangrejos, langostas) son procesados a nivel industrial como principal materia prima para la obtención de quitina. Por otra parte, el chapulín proveniente del estado de Oaxaca, es considerado como una plaga en los cultivos de maíz, frijol, soya y alfalfa, dedicándose la población en diferentes municipios o localidades a la recolección de este insecto para su venta permitiendo a cada familia de la localidad obtener alrededor de 50-70 kg de saltamontes semanalmente. Se estima que al menos se extraen 75-100 toneladas (peso fresco) por año en esta región. Por tal motivo y debido a la similitud en el contenido de quitina de los exoesqueletos de crustáceos en comparación con los de chapulín. El objetivo de este trabajo consistió en evaluar el efecto de tres métodos: tratamiento químico (hidrólisis alcalina-ácida), tratamiento biológico por fermentación láctica en medio sólido (FMS) y tratamiento físico (ultrasonicación) en exoesqueletos de chapulín y camarón para la recuperación de quitina.

2 Materiales y métodos

2.1 Materiales

Se utilizaron dos fuentes quitinosas, chapulines provenientes de la ciudad de Ocotlán, Oaxaca, y desechos de camarón obtenidos en el embarcadero del puerto de Alvarado, Veracruz. Estas muestras se secaron a 55 °C por 12 h (Horno Scorpion scientific® A62060 USA), molieron (Molino ProctorSilex® 72500RY, Japón) y tamizaron (Tamiz No. 50 Test Sieve® 090233332 Alemania) a un tamaño de partícula de 300µm.

2.2 Métodos

2.2.1. Tratamiento químico

Se realizó una desproteínización de los exoesqueletos de camarón y chapulín mediante una hidrólisis alcalina con NaOH (0.4 M) a una relación 1/15 (p/v) en base seca durante 1 h a 150 rpm y temperatura de 25 °C. Posteriormente, se desmineralizaron las muestras mediante hidrólisis ácida con una solución de HCl 0.6 N en una relación 1/15 (p/v) en base húmeda una temperatura de 28 °C durante 3 h. Las muestras procedentes de la desproteínización y desmineralización fueron filtradas al vacío con filtros de rayón-poliéster 50-50%, puestos a peso constante previamente, para eliminar el solvente correspondiente y pesadas para el siguiente paso. Inmediatamente, se realizó un doble blanqueado con NaClO al 38% a una temperatura de 28 °C durante 30 min., una vez concluido todo el proceso se lavó con agua corriente hasta la neutralidad, se filtró de la manera antes descrita y se secó (Horno Felisa® FE-132AD México) a 40 °C durante 24 h para cuantificar el porcentaje de proteína por el método de Kjeldahl (AOAC 43, 689, 2005) y cenizas retenidos (AOAC 7,132, 2005). Los porcentajes de desmineralización (% DM) y desproteínización (% DP) fueron calculados por la Ec. (1).

$$Y(\%) = \left[\frac{(x_0 \cdot s_0) - (x_f \cdot s_f)}{(x_0 \cdot s_0)} \right] \times 100 \quad (1)$$

Donde, “Y” es el porcentaje de desmineralización o desproteínización, “ x_0 ” y “ x_f ” son el porcentaje inicial y final del contenido de proteínas o cenizas, “ s_0 ” y “ s_f ” el peso inicial y final de las muestras fermentadas (g) respectivamente. Por último, en las muestras secas provenientes del tren de purificación completo, se realizó el análisis de color en forma instrumental con un espectrofotómetro (ColorFlex EZ HunterLab® DIFUSE USA) leyendo con un iluminante tipo C, obteniendo los factores °H, S* y L* del Modelo de color HSL (Hue, Saturación y Luminosidad), a partir

de estos datos se usó un programa de conversiones llamado “Easy RGB-PC” (<http://www.easyrgb.com>) con el objetivo de realizar las cartillas de colores (López-Vidal y col., 2014; Rodríguez-Miranda y col., 2014; Porras-Barrientos y col., 2015).

2.2.2. Tratamiento biológico

Consistió en la implementación de un tratamiento en fermentación en medio sólido (FMS) donde se utilizó como fuente de carbono de fácil asimilación melaza de caña de azúcar, que se adicionó en una proporción de 18% (p/p) a las muestras de camarón y chapulín. Se emplearon recipientes de 30 mL llenándose siguiendo el criterio geométrico establecido por Ramírez-Ramírez y col. (2009) e incubando a 38 ± 1 °C (Incubadora Felisa® FE-132AD México). Las cepas ácido lácticas se reactivaron en medio MRS a 38 °C por 2.5 h para *L. plantarum* BG-112, 2.7 h para *L. rhamnosus* SP-1 y 3.0 h para *L. acidophilus* LA-3, considerando el valor de μ_{max} de estos microorganismos. Las fermentaciones fueron realizadas por triplicado en microfermentadores tipo frasco con las dimensiones mostradas en la tabla 1, empleando intervalos de tiempo de 0, 24, 48, 72, 96 y 120 h donde se utilizaron dos microfermentadores para los análisis fisicoquímicos y uno para los análisis microbiológicos correspondientes.

2.2.2.1. Caracterización de los fermentados

Para el análisis fisicoquímico se tomaron muestras homogéneas por triplicado de la fracción sólida determinándose cada 24 h desde el tiempo cero: el porcentaje de humedad (AOAC 33, 749, 2005), cenizas (AOAC 7,132, 2005), pH, acidez total titulable (AOAC, 37,924, 2005), proteína retenida por el método de Kjeldahl (AOAC 43, 689, 2005) y actividad de agua (A_w) a las 120 h empleando los métodos estándar (AOAC, 2005). Por otra parte las muestras se lavaron con agua y se centrifugaron a 5500 rpm, 4 °C por 15 min para separar la fracción sólida de

la líquida, evaluando en esta última el contenido de proteína soluble por el Método de Bradford (2005) acorde a la metodología de Ramírez y col., (2009). El conteo microbiano en placa de los microensilados a las 120 h, se realizó cuantificando mesófilos totales, coliformes totales, bacterias ácido lácticas (BAL) y cuenta total de hongos y levaduras, respectivamente (Shirai, 1999). Por último, se realizó un análisis de color mediante la técnica planteada anteriormente.

2.2.2.2. Modelación

Se utilizó el modelo de Langmuir modificado Ec. (2) para determinar el porcentaje de producción máxima de acidez total titulable. Por otra parte, se utilizó el modelo de Page Ec. (3) para calcular mediante la pendiente de las tangentes la velocidad de secado constante “ R_c ” (g de agua/hm²). Por último, el porcentaje de cenizas y perfil de pH se ajustaron a modelos de regresión no lineales ecs. (4)-(5) para determinar a través de la primera derivada el tiempo (t') de mayor porcentaje de cenizas y de menor pH. Todos los parámetros de los modelos (% ATT_{MAX} , t_L , X , X_e , X_0 , k , n , a , b , c , t , x , y , y z) fueron obtenidos con el programa estadístico MINITAB® 17.0 (2015).

$$\%ATT = \frac{\%ATT_{MAX}t}{t_L + t} \quad (2)$$

$$\frac{X - X_e}{X_0 - X_e} = \exp(-kt^n) \quad (3)$$

$$\%Cenizas = a - bt + ct^2 \quad (4)$$

$$pH = x - yt + zt^2 \quad (5)$$

Donde: “% ATT_{MAX} ” es el porcentaje de producción máxima de ATT, “ t_L ” es la constante de tiempo (h) en donde se observa linealidad para el porcentaje ATT, “ X ” es la humedad media (gH₂O/gss); “ X_e ” es la humedad de equilibrio (gH₂O/gss); “ X_0 ” humedad inicial (gH₂O/gss); “ k ” parámetro en función de la temperatura del aire de secado ($T = 38$ °C) y el contenido de humedad inicial, “ n ” es un parámetro

Tabla 1. Dimensiones y cantidad de carga de los fermentados de camarón y chapulín.

Muestra	Dimensiones del frasco (cm)	Altura de llenado (cm)	Cantidad de mezcla total (g)	Volumen ocupado (cm ³)	Densidad aparente (g/cm ³)
Camarón	5.5 de Alto y 3.0 de diámetro	3.9	3.5	27.56	1.27
Chapulín	5.5 de Alto y 3.0 de diámetro	3.9	4.0	27.0	1.15

que depende del tipo de producto a deshidratar y la velocidad del aire (m/s), “t” tiempo (h), “a”, “b”, “c”, “x”, “y”, y “z” son constantes del modelo.

2.2.3. Tratamiento físico

Se aplicaron ondas ultrasónicas a una frecuencia de 20 kHz a 750 W (Ultrasonic Processor® CPX750 USA) durante diferentes intervalos de tiempo (1, 2, 4, 8, 16, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 min) y diferentes niveles de amplitud (30, 35 y 40%) a una temperatura de 30 °C. Los medios de procesamiento usaron agua como disolvente y el material quitinoso se ajustó a una relación (5:100) (p/v). Posterior a cada tiempo de procesamiento se centrifugó a 5500 rpm, 4 °C por 15 min para separar la fracción sólida de la líquida, evaluando en esta última el contenido de proteína soluble. La fracción sólida se liofilizó (Liofilizadora Freezone plus 2.5 L Labconco® 7751021 USA) para cuantificar los porcentajes de proteína y cenizas retenidos. Por último, se realizó un análisis de color mediante la técnica planteada anteriormente.

2.2.4. Análisis estadístico

Se llevó a cabo un diseño al azar en los experimentos variando la fuente y tipo de tratamiento. El porcentaje de humedad, cenizas, acidez, pH, proteínas y color, fueron considerados como las variables de respuesta utilizándose el programa MINITAB® versión 17.0 (2015). Así mismo, se realizó una comparación de medias agrupadas con un análisis de varianza (ANDEVA) y una comparación con la prueba de Tukey para verificar si las diferencias fueron estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

3 Resultados y discusión

3.1 Tratamiento químico

En la tabla 2 se muestran los contenidos obtenidos del porcentaje de proteínas (2.56% y 5.73%) y porcentaje de cenizas (2.86% y 1.57%) del camarón y chapulín, después de aplicar el método químico. Los porcentajes de desproteínización fueron de 94.85% y 89.17% y para la desmineralización de 93.39% y 91.82% respectivamente. Por último, en los exoesqueletos de camarón se presentó una despigmentación con valores medios de °H, S* L*, es decir, de “Naranja Suave” (#E 3A86B) a “Muy pálido sobre todo blanco” (#FFF7F7), se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para ambos sustratos. Por otra

parte, en los exoesqueletos de chapulín se obtuvieron valores de °H, S* L*, es decir, de “Naranja desaturado muy oscuro” (#553D2A) a “Pálido grisáceo Luz” (#E ADEDE) presentando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para ambos sustratos. Cabe mencionar que este trabajo es pionero en la evaluación del grado de despigmentación mediante el método Hunter Lab sobre muestras quitinosas purificadas por diversos tratamientos. Esta despigmentación se asoció al fuerte efecto oxidante del hipoclorito de sodio. Como desventaja del método, se tiene el empleo de aproximadamente 31L de agua por cada 50g de material quitinoso procesado. Aspecto a considerar para validar el empleo de otros métodos de procesamiento (Gimeno y col., 2007; Hernández y col., 2008; Khanafari y col., 2008; Pacheco y col., 2009).

3.2 Tratamiento biológico

Las fermentaciones lácticas requieren de la adición de carbohidratos altamente fermentables para facilitar la acción de las bacterias lácticas (Jay y col., 2000; Hall y col. 2002). La melaza de caña de azúcar ha sido la más utilizada para este propósito en concentraciones desde 5 hasta 40% (Fagbenro y col., 1998; Zahar y col., 2002). El porcentaje de humedad de la melaza empleada fue de $23.118 \pm 0.01\%$, cenizas de $9.51 \pm 0.02\%$, proteínas de $4.25 \pm 0.02\%$, pH 5.43 ± 0.01 y actividad de agua 0.67 ± 0.01 . De acuerdo a estos resultados se utilizó una concentración de melaza de 18% (p/p) sobre la mezcla total como lo estableció Ramírez-Ramírez y col. (2009). En la Fig. 1, se observa la pérdida del porcentaje de humedad en los microfermentados de camarón (A) y chapulín (B), ambos presentaron una mayor pérdida de humedad con la cepa *L. plantarum* BG-112 (43.02% y 15.40 %) y una velocidad de secado en el periodo constante (R_c) de 7.99×10^{-3} y 6.60×10^{-3} g de agua/hm² respectivamente, presentando diferencias estadísticamente significativas para ambos sustratos ($P \leq 0.05$). Este efecto resultó en parte de la porosidad y el contenido lipídico de las partículas quitinosas utilizadas, pero también del contenido de humedad de la melaza evitando la pérdida drástica de humedad. El agua se observó más fuertemente ligada en las partículas de chapulín en comparación con el camarón. Por tal motivo, estos resultados se relacionan con la mayor actividad metabólica de la cepa (Desmineralización y Desproteínización), debido a que todas las reacciones químicas en la célula requieren de un medio acuoso.

Los valores calculados durante las curvas de pérdida de humedad se ajustaron al modelo de Page ($R^2 > 0.98$). En la Tabla 3 se encuentran los parámetros k y n los cuales fueron determinados acorde a Vega y col. (2006), se incluyen los coeficientes de determinación (R^2) para dicho modelo.

Por otra parte, en la Fig. 2 se observa la pérdida del porcentaje de cenizas en los microfermentados de camarón (C) y chapulín (D), ambos presentaron una mayor pérdida en el porcentaje de desmineralización

(40.31% y 13.56%); y un menor tiempo de desmineralización (122.06 y 161.76 h) con la cepa *L. plantarum* BG-112 respectivamente, presentando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para ambos sustratos. Estos resultados están por debajo de los valores reportados por Ramírez y col. (2009) quienes obtuvieron valores de porcentaje de cenizas de alrededor de 18% y 19% a las 96 h empleando desechos de pescado, en donde los minerales fueron de más fácil extracción.

Tabla 2.- Porcentajes de proteínas, cenizas y descripción del color obtenidos mediante el método químico en los fermentados de camarón y chapulín.¹

TIPO DE MUESTRA	%P	%DP	% M	% DM	#COLOR	COLORIMETRÍA			CARTILLA DE COLOR
						°H	S*	L*	
Camarón Sin Tratamientos	49.73 ±0.01 ^a	0.00 ^d	43.29 ±0.03 ^a	0.00 ^d	#E3A86B	30.5 ±0.01 ^a	68.2 ±0.02 ^d	65.5 ±0.02 ^d	
Hidrólisis Alcalina Camarón	2.56 ±0.04 ^c	94.85 ±0.01 ^b	42.97 ±0.01 ^b	0.72 ±0.01 ^c	#FACBA0	28.7 ±0.01 ^b	90 ±0.01 ^c	80.4 ±0.02 ^c	
Hidrólisis Ácida Camarón	48.96 ±0.02 ^b	1.54 ±0.02 ^c	2.86 ±0.02 ^c	93.39 ±0.05 ^b	#FED2AD	27.4 ±0.01 ^c	97.6 ±0.02 ^b	83.7 ±0.01 ^b	
Despigmentación Camarón	0.54 ±0.01 ^d	98.91 ±0.01 ^a	0.79 ±0.01 ^d	98.19 ±0.01 ^a	#FFF7F7	0 ^d	100 ±0.01 ^a	98.4 ±0.02 ^a	
Chapulín Sin Tratamientos	52.97 ±0.02 ^e	0.00 ^h	19.21 ±0.02 ^a	0.00 ^h	#553D2A	26.5 ±0.01 ^g	33.9 ±0.02 ^g	24.9 ±0.01 ^h	
Hidrólisis Alcalina Chapulín	5.73 ±0.02 ^g	89.17 ±0.04 ^f	4.66 ±0.02 ^f	75.72 ±0.03 ^g	#865E3B	28 ±0.01 ^f	38.9 ±0.04 ^f	37.8 ±0.02 ^g	
Hidrólisis Ácida Chapulín	51.27 ±0.01 ^f	3.20 ±0.02 ^g	1.57 ±0.04 ^g	91.82 ±0.02 ^f	#98642C	31.1 ±0.01 ^e	55.1 ±0.03 ^e	38.4 ±0.01 ^f	
Despigmentación Chapulín	3.89 ±0.02 ^h	92.66 ±0.01 ^e	0.62 ±0.02 ^h	96.75 ±0.06 ^e	#EADEDE	0 ^h	22.2 ±0.02 ^h	89.4 ±0.02 ^e	

¹ Promedio de tres repeticiones ± error estándar. Valores promedio que no comparten una letra son significativamente diferentes ($P > 0.05$).

Tabla 3. Parámetros del modelo de Page y coeficientes de determinación.

	CAMARÓN			CHAPULÍN		
	SP-1	LA-3	BG-112	SP-1	LA-3	BG-112
R^2	0.996	0.996	0.990	0.995	0.985	0.997
k	4.0984	4.0845	4.0130	3.9501	3.9221	3.8650
n	-0.015905	-0.01587	-0.001992	-0.01158	-0.01083	-0.008343
R_c	5.330×10^{-3}	6.364×10^{-3}	7.987×10^{-3}	6.460×10^{-3}	6.553×10^{-3}	6.604×10^{-3}

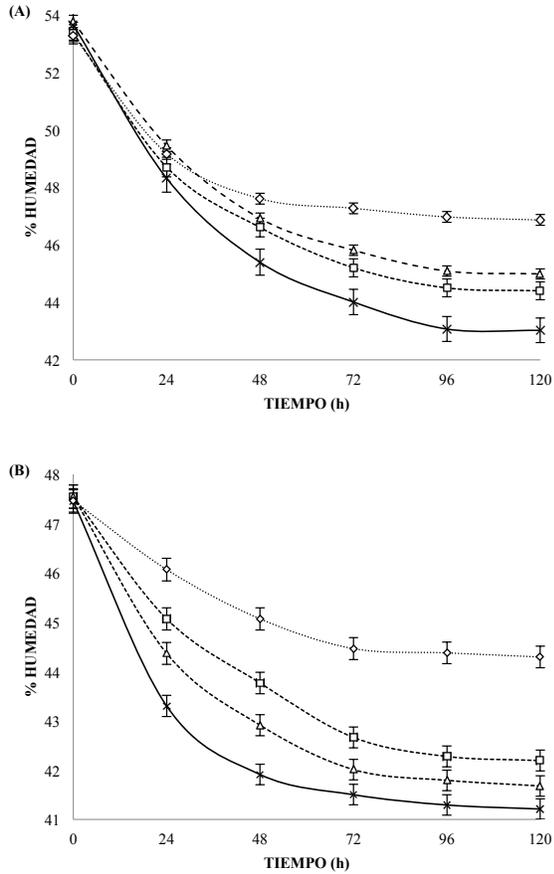


Fig. 1. Cambios del porcentaje de humedad durante la fermentación ácido láctica de exoesqueletos de camarón (A) y chapulín (B) utilizando (□) *L. rhamnosus* SP-1, (Δ) *L. acidophilus* LA-3 y (×) *L. plantarum* BG-112 y (◇) Blanco.

Los valores calculados durante la desmineralización se ajustaron al modelo de regresión no lineal ($R^2 > 0.98$). En la Tabla 4 se encuentran los parámetros (a, b, c y t') y los coeficientes de determinación (R^2).

Durante los 5 días de fermentación (Fig. 3), ambas fuentes presentaron un aumento en el porcentaje de ATT (3.085% y 2.95%), un mayor porcentaje

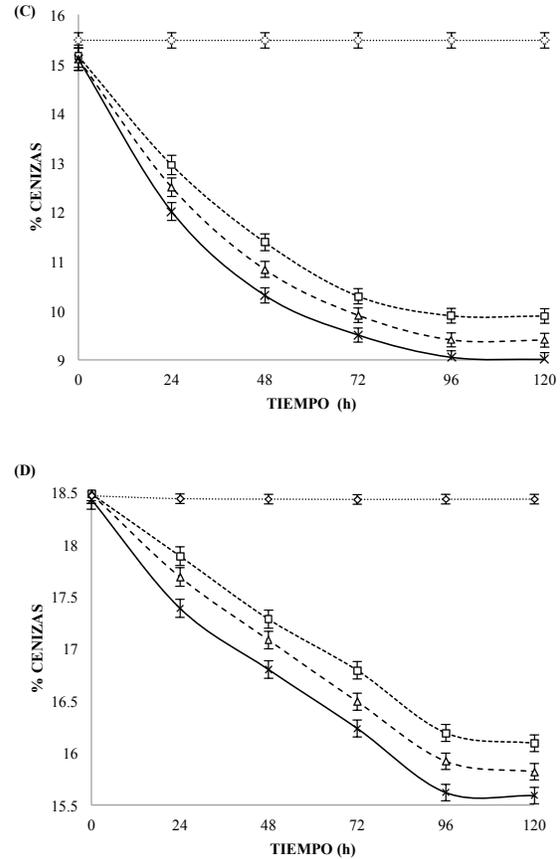


Fig. 2. Disminución del porcentaje de cenizas durante la fermentación ácido láctica de exoesqueletos de camarón (C) y chapulín (D) utilizando (□) *L. rhamnosus* SP-1, (Δ) *L. acidophilus* LA-3 y (×) *L. plantarum* BG-112 y (◇) Blanco.

de producción máxima de ATT (3.19% y 3.07%) y un mayor valor para t_L (54.34 y 64.41h) con la cepa *L. plantarum* BG-112, presentando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respectivamente.

Estas curvas son similares a las de una cinética de adsorción, en términos de los modelos ajustados al

porcentaje ATT, por lo que se adecuó este parámetro al modelo de Langmuir ($R^2 > 0.99$). En la Tabla 5 se presentan los parámetros porcentaje ATT_{MAX} , t_L y los coeficientes de determinación (R^2). En la Fig. 4 se observa la disminución de los valores de pH en los microfermentados de camarón (G) y chapulín (H),

ambos presentaron una pérdida mayor de pH (49.48 y 36.39%) en el menor tiempo (122.05 h y 161.76 h) con la cepa *L. plantarum* BG-112 presentando diferencias estadísticamente significativas respectivamente, ($p < 0.05$).

Tabla 4. Parámetros del modelo de regresión no lineal y coeficiente de determinación.

	CAMARÓN			CHAPULÍN		
	SP-1	LA-3	BG-112	SP-1	LA-3	BG-112
R^2	0.998	0.990	0.987	0.989	0.984	0.995
a	16.606	17.81	18.209	19.352	19.737	19.508
b	-1.307	-2.744	-3.673	-0.807	-0.962	-1.193
c	0.0916	0.2605	0.3611	0.0412	0.0467	0.0885
t'	235.04	247.19	122.06	235.04	247.19	161.76

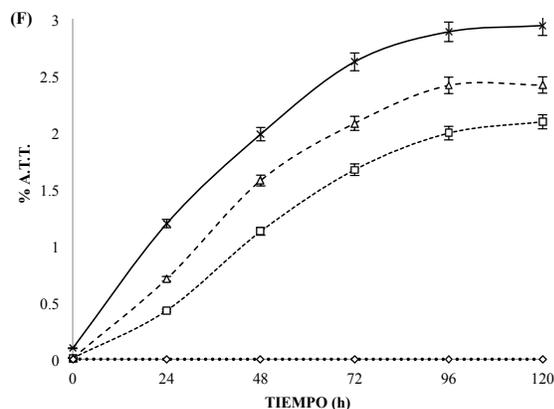
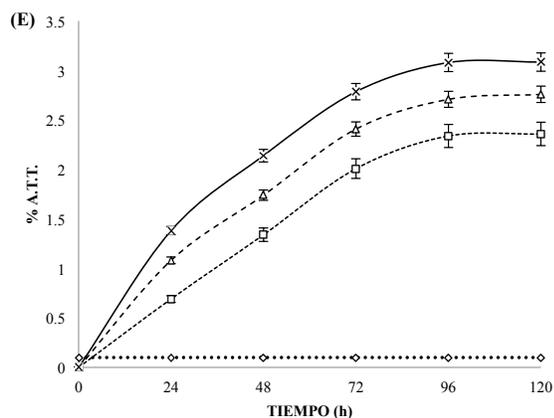


Fig. 3. Cuantificación del %ATT durante la fermentación de exoesqueletos de camarón (E) y chapulín (F) con (—□—) *L. rhamnosus* SP-1, (—△—) *L. acidophilus* LA-3 y (—×—) *L. plantarum* BG-112 y (—○—) Blanco.

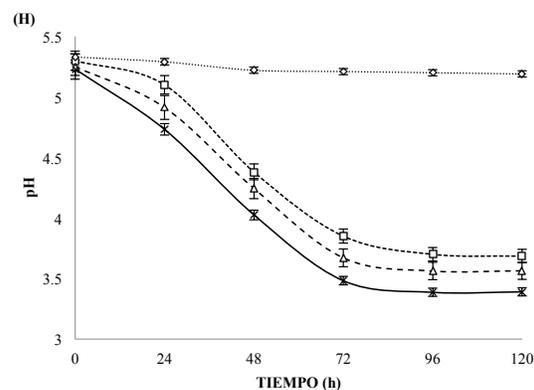
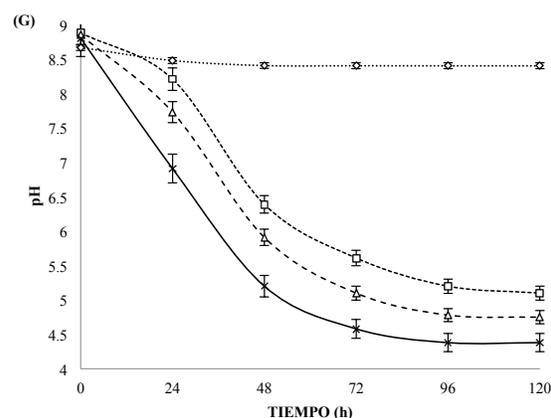


Fig. 4. Evolución del pH durante la fermentación de exoesqueletos de camarón (G) y chapulín (H) adicionados con (—□—) *L. rhamnosus* SP-1, (—△—) *L. acidophilus* LA-3 y (—×—) *L. plantarum* BG-112 y (—○—) Blanco.

Tabla 5. Parámetros del modelo de Langmuir y coeficientes de determinación.

	CAMARÓN			CHAPULÍN		
	SP-1	LA-3	BG-112	SP-1	LA-3	BG-112
R^2	0.992	0.996	0.997	0.991	0.991	0.996
%ATT _{MAX}	5.25579	4.70566	4.67375	6.21665	4.77795	7.72219
t_L	131.784	76.4552	54.3431	216.801	102.542	64.4085

Tabla 6. Parámetros del modelo de regresión no lineal y coeficiente de determinación.

	CAMARÓN			CHAPULÍN		
	SP-1	LA-3	BG-112	SP-1	LA-3	BG-112
R^2	0.992	0.987	0.985	0.976	0.982	0.987
x	10.851	11.111	11.321	6.151	6.162	6.244
y	-1.882	-2.293	-2.802	-0.766	-0.865	-1.013
z	0.3032	0.2045	0.2766	0.0572	0.0703	0.0884
t'	148.96	134.55	121.56	160.70	147.65	137.511

Los valores calculados durante las curvas de pH se ajustaron al modelo de regresión no lineal ($R^2 > 0.98$). En la Tabla 6 se encuentran los parámetros (x , y , z y t') y los coeficientes de determinación (R^2). Cabe mencionar que t' se refiere al tiempo de mayor reducción de pH, el cual fue obtenido a partir de la primera derivada (del modelo no lineal) igualada a cero. Este valor fue mínimo para *L. plantarum* empleando camarón, lo que indica que este sustrato fue más fácilmente asimilable. Este descenso del pH y aumento de acidez nos indica la producción de ácidos orgánicos (láctico principalmente) a partir de la fuente de carbono, los cuales probablemente reaccionaron con el carbonato de calcio que se encuentra unido a la quitina, logrando con esto la desmineralización parcial de los microfermentados (Cira y col., 2002; Rao y col., 2000; Bajaj y col., 2011).

La actividad de agua disminuyó considerablemente durante el proceso de 0.97 al inicio hasta valores de 0.94 y 0.93 a los 5 días para los dos microfermentados con las tres cepas comerciales. Por otra parte, se observó que existió una desproteínización, lo cual se evidenció por el contenido de proteína soluble y remanente en la fracción líquida (Fig. 5) y sólida (Fig. 6) en los microfermentados de camarón y chapulín, siendo mayor con *L. plantarum* BG-112 (27.61 y 32.26 $\mu\text{g/mL}$ de proteína soluble) y (9.04 y 22.27 $\mu\text{g/mL}$ de proteína remanente) presentando diferencias estadísticamente significativas respectivamente, ($p < 0.05$).

Por otra parte, se determinó el porcentaje de proteínas del contenido inicial (53.73 ± 1.46 y

$56.96 \pm 1.37\%$) y final (36.30 ± 0.26 y $38.94 \pm 0.34\%$) por el método Kjeldahl (AOAC 43, 689, 2005), determinándose una desproteínización de 32.43% y 31.63% para camarón y chapulín respectivamente.

Tal desproteínización se atribuye a las enzimas presentes en el desecho de camarón, las cuales actúan sobre las proteínas, provocando la hidrólisis y dando lugar a la producción de un lixiviado (Shirai y col., 1999). Por lo tanto, se puede inferir que con la adición del inóculo de *L. plantarum* BG-112 se presentó una mayor actividad proteolítica en los ensilados de camarón y chapulín, lo cual se vio reflejado en un aumento de la digestibilidad de sus proteínas para ser aprovechadas más eficientemente como pretratamiento para la obtención de quitina. En los ensilados el porcentaje de proteínas presentó un valor superior a la materia prima, atribuyéndose en parte al incremento de la biomasa y por otro lado a la adición de melaza para el proceso de fermentación (Jung y col., 2006; Bashkar y col., 2007; Sini y col., 2007; Xu y col., 2008; Khanafari y col., 2008; Sorokulova y col., 2009).

En la Tabla 7 se presentan los análisis microbiológicos de los microensilados a las 120 h. Se observó que los microfermentados de camarón presentaron valores hasta de 279×10^3 UFC/g de bacterias mesófilas aerobias y 295×10^3 UFC/g de bacterias ácido lácticas; en los microensilados de chapulín de 281×10^3 UFC/g de bacterias mesófilas aerobias y 517×10^3 UFC/g de bacterias ácido lácticas (BAL).

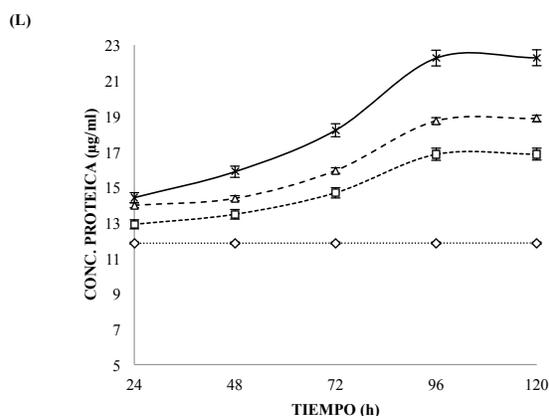
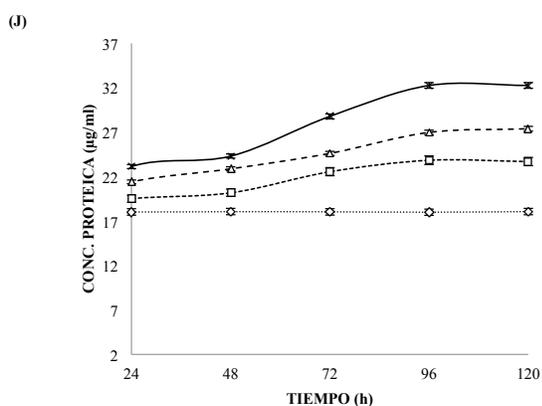
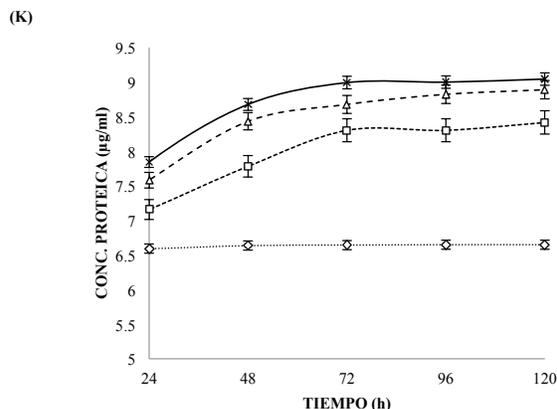
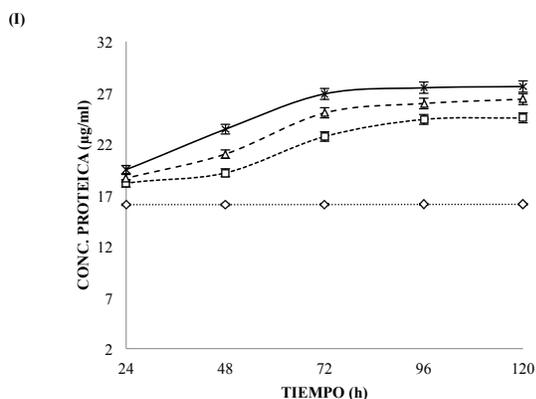


Fig. 5. Determinación de proteína soluble (en el sobrenadante) durante la fermentación de exoesqueletos de camarón (I) y chapulín (J) con (—□—) *L. rhamnosus* SP-1, (—△—) *L. acidophilus* LA-3 y (—×—) *L. plantarum* BG-112 y (—◇—) Blanco.

En los microensilados de ambos residuos no se presentó crecimiento de coliformes totales, hongos ni levaduras; con esto se cumple la NOM-027-SSA1, la cual establece un límite máximo de 400 UFC/g para coliformes. Esto es llevado a cabo por el efecto inhibitorio de la producción de ácido láctico (Wahyuntari y col., 2011) a partir de la fuente de carbono ocasionando con ello la estabilidad del ensilado y conservando el desecho durante más de 120 h. Por último, en la tabla 8 se presenta el análisis colorimétrico en los microensilados de camarón donde se presentó un ligero aumento en la coloración representados con valores medios de °H, S* L*. al inicio de la fermentación que catalogaron a ese color como “Naranja desaturado muy oscuro” (# 421F0F) a “Naranja muy oscuro” (# 5F2C19), lo anterior se atribuye al proceso de fermentación, la

Fig. 6. Determinación de proteína remanente (fracción sólida) durante la fermentación de exoesqueletos de camarón (K) y chapulín (L) con (—□—) *L. rhamnosus* SP-1, (—△—) *L. acidophilus* LA-3 y (—×—) *L. plantarum* BG-112 y (—◇—) Blanco.

interacción de vitaminas y pigmentos con la estructura base de la quitina y a la aportación de la melaza utilizada. Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Por otra parte, en los fermentados de chapulín se obtuvieron valores de °H, S* L, es decir, de “Naranja muy oscuro (Tono café)” (# 553D2A) a “Naranja oscuro” (# EADEDE) respectivamente, estos valores presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para ambos sustratos. En este caso, el oscurecimiento se atribuye al efecto de la fermentación, donde la desproteínización de los residuos ocurre en forma paralela a la despigmentación, solubilizando parte de las sales de calcio que forman las vesículas en el exoesqueleto, liberando mayores cantidades de pigmentos (astaceno, astaxantinas, cantaxantinas, luteína y β -caroteno)

debido a la asociación entre proteína-minerales-pigmentos observada en la quitina (Pacheco y col., 2009).

3.3 Tratamiento físico

En la Fig. 7 se muestran los resultados obtenidos utilizando ondas sonoras de alta frecuencia (ultrasonificación) a tres amplitudes para reducir el contenido de cenizas. Se observó un incremento en el porcentaje de desmineralización en los exoesqueletos de camarón y chapulín de 10.13% y 7.83% con una amplitud del 30%, así mismo, se obtuvo 12.16% y 9.72% con 35% de amplitud, por último, 13.71%

y 12.29% con 40% de amplitud respectivamente, ($P \leq 0.05$). Esto es debido a los altos esfuerzos de corte generados durante el crecimiento y colapso de las burbujas de cavitación formadas en la onda del campo acústico (Muthukumaran y col., 2005; Karki y col., 2009). Esta cavitación proporcionó la energía suficiente (234,796 J) para la remoción de minerales como el carbonato de calcio (mineral más abundante en partículas quitinosas), el cual posee a 25 °C una entropía molar estándar de $276.73 \text{ J}^* \text{g}^{-1} \text{CaCO}_3$ (Atkins y Jones, 2006), indicando que este compuesto presenta cierta facilidad de extracción por el tipo de orden, estructura cristalina y grado de asociación con otras moléculas como las proteínas.

Tabla 7.- Resultados de los análisis microbiológicos en los microensilados biológicos de los exoesqueletos de camarón y chapulín.

MUESTRAS		Aerobias Mesófilas (UFC/g)	BAL (UFC/g)	Coliformes Totales (UFC/g)	Mohos y Levaduras (UFC/g)
Microensilados Camarón	<i>SPI</i>	209×10^3	295×10^3	Ausente	Ausente
	<i>LA3</i>	234×10^3	276×10^3	Ausente	Ausente
	<i>BG 112</i>	279×10^3	595×10^3	Ausente	Ausente
	<i>BLANCO</i>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Microensilados Chapulín	<i>SPI</i>	251×10^3	315×10^3	Ausente	Ausente
	<i>LA3</i>	268×10^3	395×10^3	Ausente	Ausente
	<i>BG 112</i>	285×10^3	517×10^3	Ausente	Ausente
	<i>BLANCO</i>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Tabla 8.- Resultados de los análisis colorimétrico en los microensilados biológicos de los exoesqueletos de camarón y chapulín.¹

TIPO DE MUESTRA	TIEMPO (h)	COLORIMETRÍA			#COLOR	CARTILLA DE COLOR
		°H	S*	L*		
FMS Camarón	0	16.3 $\pm 0.01^c$	23.7 $\pm 0.01^c$	48.8 $\pm 0.02^c$	#421F0F	
	120	24.7 $\pm 0.01^b$	31.1 $\pm 0.01^a$	46.1 $\pm 0.01^b$	#5F2C19	
FMS Chapulín	0	15.3 $\pm 0.02^d$	18.6 $\pm 0.01^d$	45.3 $\pm 0.01^c$	#553D2A	
	120	26.3 $\pm 0.01^a$	26.2 $\pm 0.01^b$	42.5 $\pm 0.02^d$	#EAEDEDE	

¹ Promedio de tres repeticiones \pm error estándar. Valores promedio que no comparten una letra son significativamente diferentes ($P > 0.05$).

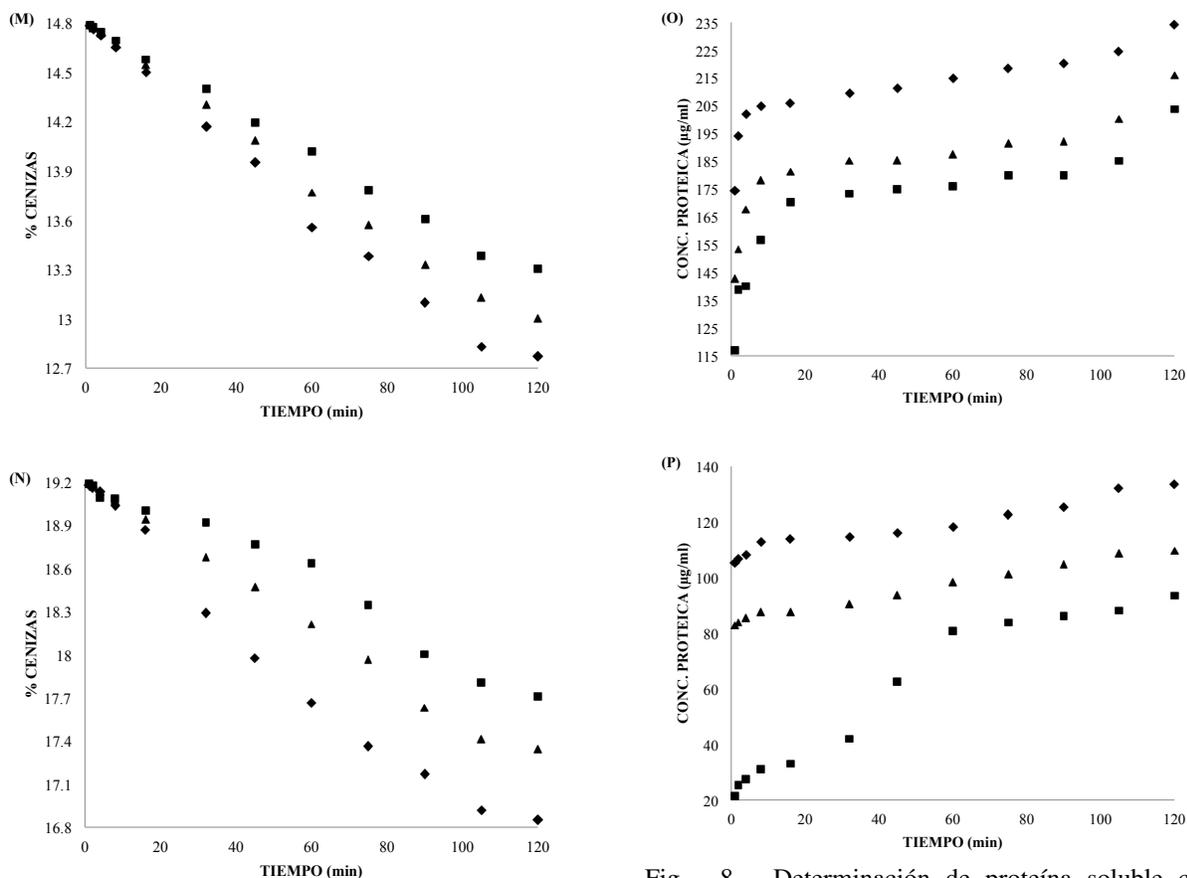


Fig. 7. Desmineralización con respecto al tiempo durante la sonicación a 30(■), 35(▲) y 40(◆) % de Amplitud con Frecuencia de 20 Khz a 750 W en mezclas de exoesqueletos de camarón (M) y chapulín (N) con-agua al 5% (p/v) a 30 °C.

Por otra parte, en la Fig. 8 se observa que el empleo de la ultrasonificación influyó en la desproteización, lo cual se evidenció por el contenido de proteína soluble en la fracción líquida en los exoesqueletos de camarón y chapulín respectivamente, siendo mayor aplicando una amplitud del 40% (233.92 y 133.67 µg/mL de proteína soluble), en comparación con una amplitud del 35% (215.86 y 109.59 µg/mL de proteína soluble) y por último con 30% (203.83 y 93.47 µg/mL de proteína soluble). Por otra parte, se determinó el porcentaje de proteínas del contenido inicial (0 h) y final (120 h) por el método Kjeldahl (AOAC 43, 689, 2005) de (50.27±2.51 y 51.93±1.22%) y (17.80±1.26 y 20.19±1.34%) donde se observaron los porcentajes de desproteización de 64.58% y 61.12% de camarón y chapulín respectivamente. Esto fue debido al aumento de las ondas de alta frecuencia que ocasionaron condiciones severas en la producción de estados

Fig. 8. Determinación de proteína soluble con respecto al tiempo durante la sonicación a 30(■), 35(▲) y 40% (◆) amplitud con frecuencia de 20 Khz a 750 W en mezclas de exoesqueletos de camarón (O) y chapulín (P) con agua al 5% (p/v) a 30 °C.

excitados originando el fenómeno de cavitación y en paralelo el rompimiento de las interacciones proteína-proteína soluble tales como las fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno, originando un aumento en la desproteización y por consecuencia en la extracción de proteína soluble (Kohmei y col., 1993; Knorr y col., 2004; Mason y col., 2007).

En la tabla 9 se observan las coordenadas, descripción y cartilla de color, obtenidos mediante el método de ultrasonificación. En cuanto a color en general, la sonicación provocó una ligera despigmentación en los exoesqueletos de camarón con valores medios de °H, S* L*. Es decir, de “Naranja muy Suave” (# F3C69F) a “Naranja grisáceo iluminado” (# EEC5A1) y para el caso de las muestras de chapulín, se presentaron valores de de °H, S* L*, indicaron de una ligera despigmentación de: “Rojo muy oscuro

Tabla 9.- Descripción del color obtenido mediante el método ultrasonicación en mezclas de sustrato-agua al 5% (p/v) a 30°C en los exoesqueletos de camarón y chapulín.¹

TIPO DE MUESTRA	TIEMPO (min)	COLORIMETRÍA			#COLOR	CARTILLA DE COLOR
		°H	S*	L*		
Camarón	0	30.5 ±0.01 ^b	68.2 ±0.01 ^a	65.5 ±0.02 ^b	#F3C69F	
	120	28.1 ±0.01 ^c	32.4 ±0.02 ^d	93.3 ±0.01 ^a	#EEC5A1	
Chapulín	0	41.6 ±0.01 ^a	67.4 ±0.01 ^b	18.0 ±0.01 ^d	#320900	
	120	26.5 ±0.01 ^d	33.9 ±0.02 ^c	24.9 ±0.01 ^c	#4D3F0F	

¹ Promedio de tres repeticiones ± error estándar. Valores promedio que no comparten una letra son significativamente diferentes ($P > 0.05$).

en su mayoría negro” (# 320900) a “Naranja muy oscuro” (# 4D3F0F), mismos que se evidenciada por la disminución de los valores °H, S* y L*, Estos parámetros (Angulo Hue, saturación y luminosidad) presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$) para ambos sustratos. Este método produjo una mayor despigmentación en los exoesqueletos de camarón, debido a que los pigmentos como el astaceno, astaxantinas, cantaxantinas, luteína y β -caroteno, por sus estructura terpenoide (con largas cadenas e insaturaciones), fueron más susceptibles a separarse del complejo proteína-minerales-pigmentos por la aplicación de ondas sonoras (Liñán y Paniagua, 2004; Zadorozhny y col., 2008). En el caso del chapulín, antes del tratamiento ultrasónico, se piensa que pudo estar presente en esta cutícula un pigmento como la pterina, que es resultado de diversas condiciones fisiológicas y nutrimentales en un insecto, lo anterior se ha observado en *Harmonia axyridis*, dándole la coloración rojo-naranja-amarillo. Debido a que el color detectado inicialmente en la cutícula de chapulín era rojizo tendiendo a marrón, se piensa que la pterina pudo estar asociada a otro tipo de pigmento como la melanina. Este es uno de los principales pigmentos que dan coloración marrón a negro y en éste y otros animales, funciona como un fotoprotector por su estructura química, absorbiendo más energía. Se sintetiza conforme avanza la edad del individuo, pero también bajo condiciones de estrés o como mecanismo de defensa ante depredadores (Liñán y Paniagua, 2004; Riou y Cristidès, 2010; Zadorozhny y col., 2008). Lo anterior pudo hacer más estable a este pigmento o modificarse a una forma de eumelanina (polímero negro marrón), al aplicarse las ondas sonoras, observándose una ligera despigmentación.

Por tal motivo, resulta de importancia realizar el análisis colorimétrico, debido a que está enfocado hacia la posible recuperación de pigmentos y mejorar la calidad del producto final, en este caso la quitina, para aplicaciones posteriores en áreas biotecnológicas (agroalimentaria y farmacéutica).

Conclusiones

La metodología propuesta a base de tratamientos químicos obtuvo una mayor remoción de proteínas, minerales y pigmentos en comparación con los demás tratamientos con un tiempo de proceso de 5h, presentando como desventaja el gasto de agua (0.62L/g quitina) asociado a la purificación del polímero. Entre el método físico y el biológico, la aplicación de ondas sonoras de alta frecuencia permitió con ambos exoesqueletos obtener una extracción más eficiente de proteínas (62.85% vs 32.53%) y una remoción de minerales (13%) comparable al del método biológico (15.40%), pero en un tiempo menor (2h), obteniendo quitina de camarón y chapulín con rendimientos en base húmeda del 75.3% y 74.02%.respectivamente. Los presentes resultados son prometedores, sin embargo, no se obtiene una alta desmineralización y desproteinización en comparación con los demás autores, por lo que es conveniente realizar una combinación de los métodos evaluados, es decir, un pretratamiento biológico (FMS) combinado con el físico (Ultrasonicación) y obtener un producto más rentable y recuperar en el lixiviado ácido láctico, pigmentos y proteínas solubles. Por último, se demostró la factibilidad del uso de nuevas fuentes quitinosas (chapulín)

que pueden ser transformadas mediante tratamientos ambientalmente amigables como la ultrasonificación.

Nomenclatura

μ_{MAX}	velocidad Específica de Crecimiento
t_l	constante de tiempo en donde se observa linealidad para el porcentaje de ATT, (h)
% H	porcentaje de humedad
A_w	actividad de agua
%ATT	porcentaje de acidez total titulable
t'	tiempo de mayor porcentaje de cenizas y pH, (h)
x	humedad media, (gH ₂ O/g s.s.)
x_e	humedad en equilibrio, (g/g)
x_0	humedad inicial, (g/g)
k	parámetro en función de la temperatura del aire de secado
n	parámetro en función de la velocidad del aire y tipo de producto a secar
t	tiempo, (h)
R_c	velocidad de secado en el periodo constante, (gH ₂ O/h m ²)
UFC	unidades formadoras de colonia
SP1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> SP-1
LA3	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-3
BG 112	<i>Lactobacillus plantarum</i> BG-112

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para cursar el doctorado en biotecnología (No. de becario 19428) a través del proyecto CB-2011/169477 dentro del programa de la Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec.

Referencias

- AOAC. Association of Official Analytical Chemist (2005). *Methods of Analysis* (15th ed.). Washington, D.C. AOAC 33, 749, 2005. Moisture in Flour, AOAC 7,132, 2005. Ash of Flour, AOAC, 37,924 Acidity (Titrable) of Fruit Product, AOAC 43, 689, 2005. Microchemical Determination of Nitrogen.
- Atkins, P. W. y Jones, L., (2006). *Principios de Química: los caminos del descubrimiento*. 3^a ed. Ed. Médica Panamericana, España.
- Bajaj, M., Winter, J., Gallert. C. (2011). Effect of deproteination and deacetylation conditions on viscosity of chitin and chitosan extracted from crangon shrimp waste. *Biochemical Engineering Journal* 56, 51- 62.
- Barreto, C., Signini R., Campana, F. (2001). On the sonication of chitin: effects on its structure and morphology and influence on its deacetylation. *Polymer Bulletin* 47, 183-190.
- Bashkar, N., Suresh, P., Sakhare. P., Sachindra. N. (2007). Shrimp biowaste fermentation with *Pediococcus acidolactici* CFR2182: Optimization of fermentation conditions by response surface methodology and effect of optimized conditions o deproteination/demineralization and carotenoid recovery. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 1427-1434.
- Bezzerides, A. L. , McGraw, K J., Parker, R. S. y Husseini, J. (2007). Elytra color as a signal of chemical defense in the Asian ladybird beetle *Harmonia axyridis*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 61, 1401-1408.
- Bradford, M. (2005). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye-binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Cira, L., Huerta, S., Shirai, K. (2002). Fermentación láctica de cabezas de camarón (*Penaeus sp*) en un reactor de fermentación sólida. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 1, 45-48.
- Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. (2013). *Anuario estadístico de Acuicultura y Pesca*. Comisión nacional de acuicultura y pesca. Edición 2013. México. 213 pp.
- Gimeno, M., Ramírez, J., Martínez, C., Pacheco, N., García, R., Barzana, E., Shirai, K. (2007). One-Solvent extraction of astaxanthin from lactic acid fermented shrimp wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 10345-10350.
- Hernández, N., Varo, W., Leyva, N., Ramírez, B., Delgado, F., Andrade, O. (2008). Utilización de residuos de cáscara de camarón para la obtención de quitina blanqueada: propuesta de una metodología a base de tratamientos alcalino-ácidos y ozono, Avances en la investigación científica en el CUCBA.

- Hunter Lab, (2000). *Universal Software Version 4.0 and Above User's Manual*. Hunter Associates Laboratory. Pp.470. Virginia, USA.
- Jung W. J., Jo G. H., Kuk J. H., Kim K. Y., Park R. D. (2006). Extraction of chitin from red crab shell waste by cofermentation with *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* KCTC-3074 and *Serratia marcescens* FS-3. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71, 234-237.
- Karki, B., Lamsal, B.P., Grewell, D., Pometto III, A.L., Van, L.J., Khanal, S.K., y Jung, S. (2009). Functional properties of soy protein isolates produced from ultrasonicated defatted soybean flakes. *Journal of American Oil Chemists Society* 86, 1021-1028.
- Khanafari, A., Marandi, R., Sanatei. S. (2008). Recovery of Chitin and Chitosan from shrimp waste by chemical and microbial methods. *Health Science Engineering* 5, 1, 19.
- Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V., Lee, D.U. (2004). Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends in Food Science and Technology* 15, 261-266.
- Kohmei, K.L. A., Toshiya, N., Keiichi, T., Yutaka, Y., Masahiko, E. (1993) Depolymerization of hyaluronan by sonication. *Glycoconjugate Journal* 10, 435-439.
- Liñán-Cabello M.A., Paniagua-Michel J. (2002). Bioactive roles of carotenoids and retinoids in crustaceans. *Aquaculture Nutrition*, 299-309.
- Liñán-Cabello M.A., Paniagua-Michel J. (2004). Induction factors derived from carotenoids and vitamin A during the ovarian maturation of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture International* 12, 583-592.
- López-Vidal, R., Laines-Canepa, J.R., Hernández-Barajas, J.R., & Aparicio-Trápala, M.A.. (2014). Evaluación de almidones de malanga (*Colocasia esculenta*) como agentes coadyuvantes en la remoción de turbiedad en procesos de potabilización de agua. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 13, 855-863
- Mason, T.J. (2007). Developments in ultrasound-non-medical. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* 93, 166-75.
- Muthukumar, S., Kentish, S., Lalchandani, S., Ashokkumar, M., Mawson, R. (2005). The optimisation of ultrasonic cleaning procedures for dairy fouled ultrafiltration membranes. *Ultrasonics Sonochemistry* 12, 29-35.
- Pacheco, N., Garnica, M., Ramírez, J.Y., Flores, B., Gimeno, M., Bárzana E., Shirai K. (2009). Effect of temperature on chitin and astaxanthin recoveries from shrimp waste using lactic acid bacteria. *Bioresource Technology* 100, 2849-2854.
- Porras-Barrientos, L.D., González-Hurtado, M.I., Ochoa-González, O.A., Sotelo-Díaz, L.I., Camelo-Méndez, G.A., & Quintanilla-Carvajal, M.X.. (2015). Colorimetric image analysis as a factor in assessing the quality of pork ham slices during storage. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 14, 243-252.
- Ramírez-Ramírez, J.C. (2009). Aprovechamiento de fauna de acompañamiento del camarón y subproductos pesqueros mediante la elaboración de ensilado de pescado. Tesis de doctorado en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, México.
- Rao, M.S., Muñoz, J., Stevens, W.F. (2000). Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54, 808-813.
- Riou, M. y Christidès, J.P., (2010). Cryptic color change in a crab spider (*Misumena vatia*): Identification and quantification of precursors and ommochrome pigments by HPLC. *Journal of Chemical Ecology* 36, 412-423.
- Rodríguez-Miranda, J., Ramírez-Wong, B., Vivar-Vera, M. A., Solís-Soto, A., Gómez-Aldapa, C. A., Castro-Rosas, J., Medrano-Roldan, H., & Delgado-Licon, E.. (2014). Efecto de la concentración de harina de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), contenido de humedad y temperatura de extrusión sobre las propiedades funcionales de alimentos acuícolas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 13, 649-663.
- Salazar-Leyva, J.A., Lizardi-Mendoza, J., Ramírez-Suarez, J.C., García-Sánchez, G., Ezquerra-Brauer, J.M., Valenzuela-Soto, E.M., Carvallo-Ruiz, M.G., Lugo-Sánchez, M.E., & Pacheco-Aguilar, R.. (2014). Utilización de materiales a

- base de quitina y quitosano en la inmovilización de proteasas: efectos en su estabilización y aplicaciones. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 13, 129-150.
- Shaofang, L., Jie S., Lina, Y., Chushu, Z., Jie B., Feng, Z., Mingjing, Q., Chen, J. y Qingli, Y. (2012). Extraction and characterization of chitin from the beetle *Holotrichia parallela* Motschulsky. *Molecules* 17, 4604-4611.
- Shirai, K., (1999). Utilización de desperdicios de camarón para recuperación de quitina, proteínas y pigmentos por vía microbiana. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México.
- Sini, T.K., Santhosh, S., Mathew, P.T. (2007). Study on the production of chitin and chitosan from shrimp shell by using *Bacillus subtilis* fermentation. *Carbohydrate Research* 342, 2423-2429.
- Sorokulova, I., Krumnow, A., Globa, L., Vodyanoy, V. (2009). Efficient decomposition of shrimp shell waste using *Bacillus cereus* and *Exiguobacterium acetylicum*. *Journal Industrial Microbiology Biotechnology* 36, 1123-1126.
- Soto-León, S., Zazueta-Patrón, I. E., Piña-Valdez, P., Nieves-Soto, M., Reyes-Moreno, C., & Contreras-Andrade, I. (2014). Extracción de lípidos de *Tetraselmis suecica*: proceso asistido por ultrasonido y solventes. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 13, 723-737.
- Vega-Galves, A., Tello-Ireland, C., Lemus-Mondaca, R. (2007). Simulación matemática del proceso de secado de la gracilaria Chilena (*Gracilaria chilensis*). *Revista Chilena de Ingeniería* 15, 55-64.
- Wahyuntari, B., Junianto, Setyahadi S. (2011). Process design of microbiological chitin extraction. *Microbiology Indonesia* 5, 39-45.
- Xu, Y., Gallert, C., Winter J. (2008). Chitin purification from shrimp wastes by microbial deproteination and decalcification. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79, 687-697.
- Zadorozhny, P. A., Borisovets, E. E., Yakush, E. V., and Davidyuk, T. S. (2008). Change of carotenoid composition in crabs during embryogenesis. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 44, 450-461.