



Universidad del Papaloapan

Campus Tuxtepec

“Purificación química, física y biológica de quitina en exoesqueletos de crustáceos e insectos, pre-tratados por fermentación sólida”

Tesis para obtener el grado de
DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta:

M. EN C. ADOLFO AMADOR MENDOZA

Directora de tesis:
Dra. Laura Patricia Ramírez Coutiño

DEDICATORIAS

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan-Campus Tuxtepec, bajo la dirección de la Dra. Laura Patricia Ramírez Coutiño. El trabajo experimental se llevó a cabo con financiamiento del fondo sectorial de investigación para la educación SEP-CONACYT (CB-2011/169477). Se agradece, al Instituto Tecnológico Superior de Juan Rodríguez Clara por la comisión de estudios de postgrado otorgado al M.C. Adolfo Amador Mendoza para la realización de esta investigación.

Quiero agradecer especialmente a la **Dra. Laura Patricia Ramírez Coutiño**, por el gran apoyo recibido en la dirección del presente trabajo. ¡Muchas gracias!, por haber creído en mí, por su amistad, su ayuda y todas las enseñanzas que me ha brindado.

A la **Dra. María de los Ángeles Vivar Vera** y el **Dr. Erasmo Herman y Lara** del Instituto Tecnológico de Tuxtepec por sus atenciones y comentarios que siempre me han motivado y la asesoría tan valiosa recibida para realizar el presente trabajo.

Al **Dr. Sergio Huerta Ochoa** del Departamento de Biotecnología, UAM-Iztapalapa por su gran gentileza, paciencia y calidad profesional brindada durante la asesoría del presente trabajo.

A la **Dra. Isabel. Membrillo Venegas** del Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec por sus valiosas observaciones y sugerencias al presente trabajo.

A la **Dra. Jacqueline Capataz Tafur**, **Dra. María De Jesús García Gómez**, **Dra. Alama Xochil Ávila Alejandre**, **Dra. Ana Karin Navarro Martínez** y el **Dr. Andrés Aguirre Cruz** del Instituto de Biotecnología, UNPA Campus Tuxtepec por las sugerencias y comentarios en la revisión de este trabajo.

A la **Universidad del Papaloapan-Campus Tuxtepec**, institución en la que he aprendido mucho, por haberme dado la oportunidad de realizar este proyecto.

Gracias al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por el apoyo económico para realizar la parte experimental de esta investigación.

Al **Instituto Tecnológico Superior de Juan Rodríguez Clara**, institución que me ha permitido realizar mis actividades laborales, agradezco por darme la oportunidad de seguirme preparando.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Bioprocesos, ¡Muchas gracias! por su ayuda incondicional y los gratos momentos compartidos. Siempre los recordaré con afecto.

RESUMEN

Debido a las cantidades crecientes de desechos de camarón que generan un aumento en la contaminación ambiental, los daños ocasionados en los cultivos por la plaga de chapulín y el interés comercial de la purificación de la quitina y sus derivados por la necesidad de tener sustratos baratos y disponibles, este trabajo de investigación consistió en evaluar la purificación química, física y biológica de quitina de exoesqueletos de camarón y chapulín, pre-tratados por fermentación sólida. Para ello, primero, se evaluó en cada tratamiento (químico, físico y biológico) el contenido de desproteínización y desmineralización. Así mismo, los resultados para ambos sustratos demostraron que la fermentación en medio sólido (FMS) con *Lactobacillus plantarum* BG-112 a las 120 h produjo una desproteínización de 32.43 y 32.63%, y una desmineralización de 40.31 y 13.56%. Por otra parte, en la hidrólisis alcalina-ácida presentó una desproteínización de 98.19 y 96.75%; y una desmineralización de 98.91 y 92.66%. Por último, en la ultrasonificación empleando 40% de amplitud, la desproteínización fue de 64.58 y 61.12%; y una desmineralización de 13.71 y 12.29% respectivamente. Con las condiciones de fermentación previamente seleccionadas, el proceso se escaló utilizando un reactor con una capacidad de 1.5 kg. En el tratamiento combinado de FMS-ultrasonificación los resultados para ambos sustratos mostraron un contenido de desproteínización de 84.82 y 76.38%; y una desmineralización 82.12 y 79.39% respectivamente; sin embargo, en el escalamiento del tratamiento combinado de FMS-Hidrólisis química alcanzó un mayor contenido desproteínización de 94.67 y 92.04%; y una desmineralización 95.58 y 96.37% respectivamente y por último en el escalamiento del tratamiento combinado de FMS-Hidrólisis Enzimática se alcanzó un mayor contenido de desproteínización de 80.45 y 78.71% una desmineralización de 52.00 y 51.79% respectivamente. En general 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 camarón y chapulín 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%. Se concluyó que a partir de la FMS como pre-tratamiento es una herramienta eficiente que permitió desproteinizar y desmineralizar los exoesqueletos chapulín y camarón para la obtención de quitina, siendo este último el más eficiente en el sentido del medio ambiente.

ABSTRACT

Due to the increasing amounts of shrimp waste that generate an increase in environmental pollution, the damages caused in the crops by the plague of grasshopper and the commercial interest of the purification of the chitina and its derivatives by the necessity to have cheap and available substrates, this research work consisted in evaluating the chemical, physical and biological purification of chitin from exoskeletons of shrimp and grasshopper, pre-treated by solid fermentation. For that, the percentage of demineralization and deproteinization was evaluated in each treatment (Chemical, physical and biological). The results showed that fermentation in solid medium (FSM) with *Lactobacillus plantarum* BG-112 at 120 h was 32.43 and 32.63% of deproteinization and 40.31 and 13.56% of demineralization, the alkaline-acid hydrolysis presented 98.19 and 96.75% Deproteinization and 98.91 and 92.66% demineralization. Finally, in the ultrasound using 40% amplitude, the deproteinization was 64.58 and 61.12%; and a demineralization of 13.71 and 12.29% with these substrates. The conditions previously selected fermentation, the process was scaled using a reactor with a capacity of 1.5 kg. The results demonstrated in combined treatment of FMS-ultrasonication a percentage of deproteinization and demineralization with exoskeletons substrate shrimp 84.82 and 82.12% compared with 76.38 of grasshopper of 79.39% and respectively, the scaling of the combined treatment of FMS-Chemical Hydrolysis reached a higher percentage deproteinization and demineralization with the substrate of exoskeletons of shrimp 94.67 and 95.58% compared to that of grasshopper of 92.04 and 96.37% respectively and finally in the scaling of the combined treatment of FMS-Enzymatic Hydrolysis a greater percentage deproteinization and demineralization was achieved with the substrate of exoskeletons of shrimp 80.45 and 52.00% compared to that of grasshopper of 78.71 and 51.79% respectively. In general, the chemical treatment resulted in a greater removal of proteins and minerals compared to the other treatments with a processing time of 5 h, and the yields of chitin were 51.94 and 47.68% for grasshopper and shrimp respectively. However, the application of ultrasonic waves allowed to obtain an extraction of both proteins and minerals in a shorter time (2 h),

extracting chitin with yields in wet basis of 75.3 and 74.02%. It was concluded that from the FMS as a pre-treatment is an efficient tool that allowed deproteinizar and demineralize the exoskeletons grasshopper and shrimp to obtain chitin, the latter being the most efficient in the sense of the environment.

ÍNDICE GENERAL

	Pag.
PORTADA	0
DEDICATORIAS	I
AGRADECIMIENTOS	II
RESUMEN	IV
ABSTRACT	VI
ÍNDICE GENERAL	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XIV
ÍNDICE DE TABLAS	XXII
NOMENCLATURA	24
I. INTRODUCCIÓN	26
II REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	28
2.1. QUITINA	28
2.1.2. ESTRUCTURA DE LA QUITINA	28
2.1.2. APLICACIONES DE QUITINA Y DERIVADOS.	30
2.1.3. COMPONENTES DE EXOESQUELETOS DE CRUSTACEOS E INSECTOS	31

2.2. MÉTODOS QUÍMICOS	31
2.3. MÉTODOS BIOLÓGICOS	33
2.3.1. FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO	33
2.3.2. FERMENTACIÓN ACIDO LÁCTICA (FAL)	33
2.3.3. BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS (BAL)	35
2.3.3.1. Condiciones de Crecimiento de las BAL	37
2.3.4. DESPROTEINIZACIÓN ENZIMÁTICA	38
2.4. METODO FÍSICO	39
2.4.1. ULTRASONICACIÓN	39
2.4.2. MECANISMO DE LA ULTRASONICACIÓN	40
2.4.3. EFECTOS DEL ULTRASONIDO	42
2.4.4. CAMPOS DE APLICACIÓN DEL ULTRASONIDO	43
2.4.5. EXTRACCIÓN	44
III. ANTECEDENTES	50
IV. JUSTIFICACIÓN	53
V. HIPOTESIS	55
VI. OBJETIVOS	55

6.1. OBJETIVOS GENERAL	55
6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
VII. ESTRATEGIA GENERAL DE TRABAJO	56
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	58
8.1 FERMENTACIÓN EN MEDIO SOLIDO	58
8.1.1. MUESTRAS	58
8.1.2. FUENTE DE CARBONO	58
8.1.3. MICROORGANISMOS	58
8.1.4. CONDICIONES DE FERMENTACIÓN ÁCIDO LÁCTICA	58
8.1.5. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS	59
8.1.5.1. Determinación de pH y Acidez Total Titulable (ATT)	59
8.1.5.2. Determinación de Humedad, Minerales y Proteínas	59
8.1.5.3. Determinación de la Actividad del Agua (Aw)	60
8.1.5.4. Determinación del Contenido de Humedad	60
8.1.5.5. Análisis Microbiológico	60
8.1.5.6. Análisis de Color	61
8.1.5.7. Modelación	61
8.2. PURIFICACIÓN DE QUITINA	62

8.2.1. TRATAMIENTO QUÍMICO	62
8.2.1.1. Desproteínización química (Hidrólisis alcalina)	62
8.2.1.2. Desmineralización química (Hidrólisis Ácida)	62
8.2.1.3. Despigméntación química	62
8.2.1.4. Análisis de las Muestras	62
8.2.2. TRATAMIENTO FÍSICO	63
8.2.2.1. Análisis de las muestras	63
8.2.3. TRATAMIENTO ENZIMÁTICO	64
8.2.3.1. Desproteínización enzimática	64
8.2.3.2. Determinación de actividad proteolítica	64
8.3. ESCALAMIENTO DE LA FERMENTACIÓN	64
8.4. TRATAMIENTOS DE PURIFICACIÓN	65
8.4.1. TRATAMIENTO FÍSICO (ULTRASONICACIÓN)	65
8.4.2. TRATAMIENTO QUÍMICO	65
8.4.3. TRATAMIENTO BIOLÓGICO (DESPROTEINIZACIÓN ENZIMÁTICA)	65
8.4.4. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS	65

8.5. CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS QUITINOSAS RESULTANTES DE LOS TRATAMIENTOS DE PURIFICACIÓN.	66
8.5.1. DETERMINACIÓN DE SOLUBLES	66
8.5.2. DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR	66
8.5.3. OBTENCIÓN DE ESPECTROS INFRARROJO (FTIR)	66
8.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	66
IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	68
9.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA PROXIMAL DE LOS SUSTRATOS	68
9.2. CARACTERIZACIÓN CUALITATIVA DE LOS ENSILADOS	68
9.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA PROXIMAL DE LOS MICROENSILADOS	69
9.4. PURIFICACIÓN QUÍMICA	78
9.5. PURIFICACIÓN FÍSICA (ULTRASONICACIÓN)	80
9.6. PURIFICACIÓN ENZIMÁTICA	83
9.6.1. ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA	83
9.6.2. DESPROTEINIZACIÓN ENZIMÁTICA	84
9.7. ESCALAMIENTO DEL PROCESO FERMENTATIVO	85
9.7.1. PRETRATAMIENTO FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO	85
9.7.2. TRATAMIENTO COMBINADO DE FMS-ULTRASONICACIÓN	86

9.7.3. TRATAMIENTO COMBINADO DE FMS-HIDRÓLISIS QUÍMICA	87
9.7.4. TRATAMIENTO COMBINADO DE FMS-HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA	88
9.7.5. CARACTERIZACIÓN DE MUESTRAS QUITINOSAS	89
X. CONCLUSIONES	92
XI. BIBLIOGRAFÍA	94
XII. ANEXOS	109
XIII. ARTICULOS Y PRESENTACIONES EN CONGRESOS DERIVADOS DE ESTA TESIS	138

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1 Estructura de la quitina.	28
Figura 2 Esquema generalizado de la fermentación de la glucosa en bacterias ácido lácticas.	37
Figura 3 Mecanismo de la ruptura de la pared celular (a) ruptura de la pared celular debido a la cavitación (b) difusión de disolvente en la estructura de la célula.	41
Figura 4 Diagrama de bloques del proceso de purificación de quitina cruda por tratamiento químico, físico y biológico.	56
Figura 5 Diagrama de bloques del proceso de purificación de quitina cruda por tratamiento químico, físico y biológico.	56
Figura 6 Diagrama de bloques del proceso de purificación química, física y biológica de quitina pre-tratados por fermentación sólida.	57
Figura 7 Cambios del contenido de humedad durante la fermentación ácido láctica de exoesqueletos de camarón (A) y chapulín (B) utilizando (---) <i>L. rhamnosus</i> SP-1, (---) <i>L. acidophilus</i> LA-3 y (---) <i>L. plantarum</i> BG-112 y (---) control.	70
Figura 8 Comparación de la curva simulada y los datos experimentales para la fermentación ácido láctica de exoesqueletos de Camarón (A) y Chapulín (B).	71

- Figura 9 Desmineralización durante la fermentación ácido láctica de exoesqueletos de camarón (A) y chapulín (B) utilizando (---□---) *L. rhamnosus* SP-1, (---▲---) *L. acidophilus* LA-3 y (---✕---) *L. plantarum* BG-112 y (---◇---) control. 72
- Figura 10 Cuantificación de ácido láctico durante la fermentación de exoesqueletos de Camarón (A) y Chapulín (B) utilizando (---□---) *L. rhamnosus* SP-1, (---▲---) *L. acidophilus* LA-3 y (---✕---) *L. plantarum* BG-112 y (---◇---) control. 73
- Figura 11 Evolución del pH durante la fermentación de exoesqueletos de Camarón (A) y Chapulín (B) utilizando (---□---) *L. rhamnosus* SP-1, (---▲---) *L. acidophilus* LA-3 y (---✕---) *L. plantarum* BG-112 y (---◇---) control. 75
- Figura 12 Determinación de proteína soluble (en el sobrenadante) durante la fermentación de exoesqueletos de Camarón (A) y Chapulín (B) utilizando (---□---) *L. rhamnosus* SP-1, (---▲---) *L. acidophilus* LA-3 y (---✕---) *L. plantarum* BG-112 y (---◇---) control. 75
- Figura 13 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 (---◇---) control. 76
- Figura 14 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 (A) y chapulín (B) con agua al 5% (p/v) a 30 °C. 80

- Figura 15 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 (A) y chapulín (B) con agua al 5% (p/v) a 30 °C. 81
- Figura 16 Determinación de la relación Enzima:Sustrato con respecto al tiempo durante la hidrólisis proteica utilizando Alcalasa-exoesqueleto de camarón y chapulín 1:1 (◆), 1:2(■), 1:5 (▲), 1:10(●) a 70 °C 84
- Figura 17 Determinación de proteína soluble con respecto al tiempo durante la hidrólisis proteica utilizando Alcalasa-exoesqueletos de camarón (◆) y chapulín (■). 85
- Figura 18 Desproteínización (A) y Desmineralización (B) durante la fermentación en medio sólido de exoesqueleto de camarón (▨) y Chapulín (▩). 86
- Figura 19 Desproteínización (A) y desmineralización (B) utilizando la FMS (▨), Sonicación (▩) y FMS + Sonicación (▧) en exoesqueletos de camarón y chapulín. 87
- Figura 20 Desproteínización (A) y desmineralización (B) utilizando FMS (▨), T. Químico (▩) y FMS + T. Químico (▧) en exoesqueletos de camarón y chapulín. 88
- Figura 21 Desproteínización (A) y desmineralización (B) utilizando FMS (▨), T. Enzimático (▩) y FMS + T. Enzimático (▧) en exoesqueletos de camarón y chapulín. 89

- Figura 22 Espectros FTIR de las quitinas obtenidas por fermentación en medio sólido combinado con el tratamiento químico (—), físico (—), enzimático (—) y quitina (Sigma) (—) a partir de exoesqueletos de camarón. 90
- Figura 23 Espectros FTIR de las quitinas obtenidas por fermentación en medio sólido combinado con los tratamientos químico (—), físico (—), enzimático (—) y quitina (Sigma) (—) a partir de exoesqueletos de chapulín. 91
- Figura 24 Gráficas de residuos de medias del %Humedad por la prueba de Tukey durante la fermentación en medio sólido de exoesqueletos de camarón y chapulín. 110
- Figura 25 Gráficas de residuos de medias del %Cenizas por la prueba de Tukey durante la fermentación en medio sólido de exoesqueletos de camarón y chapulín. 111
- Figura 26 Gráficas de residuos de medias del %ATT por la prueba de Tukey durante la fermentación en medio sólido de exoesqueletos de camarón y chapulín. 112
- Figura 27 Gráficas de residuos de medias del pH por la prueba de Tukey durante la fermentación en medio sólido de exoesqueletos de camarón y chapulín. 113
- Figura 28 Gráficas de residuos de medias del contenido de proteína soluble por la prueba de Tukey durante la fermentación en medio sólido de exoesqueletos de camarón y chapulín. 114

- Figura 29 Gráficas de residuos de medias de H° por la prueba de Tukey durante la fermentación en medio sólido de exoesqueletos de camarón y chapulín. 115
- Figura 30 Gráficas de residuos de medias de *S por la prueba de Tukey durante la fermentación en medio sólido de exoesqueletos de camarón y chapulín. 116
- Figura 31 Gráficas de residuos de medias de *L por la prueba de Tukey durante la fermentación en medio sólido de exoesqueletos de camarón y chapulín. 117
- Figura 32 Gráficas de residuos de medias del %Proteína por la prueba de Tukey durante el tratamiento Químico de exoesqueletos de camarón y chapulín 118
- Figura 33 Gráficas de residuos de medias del %Desproteínización por la prueba de Tukey durante el tratamiento Químico de exoesqueletos de camarón y chapulín 119
- Figura 34 Gráficas de residuos de medias del %Cenizas por la prueba de Tukey durante el tratamiento Químico de exoesqueletos de camarón y chapulín 120
- Figura 35 Gráficas de residuos de medias del %Desmineralización por la prueba de Tukey durante el tratamiento Químico de exoesqueletos de camarón y chapulín 121

- Figura 36 Gráficas de residuos de medias del %Desmineralización por la prueba de Tukey durante el tratamiento Químico de exoesqueletos de camarón y chapulín 122
- Figura 37 Gráficas de residuos de medias de *S por la prueba de Tukey durante el tratamiento Químico de exoesqueletos de camarón y chapulín 123
- Figura 38 Gráficas de residuos de medias de *L por la prueba de Tukey durante el tratamiento Químico de exoesqueletos de camarón y chapulín 124
- Figura 39 Gráficas de residuos de medias del %Cenizas por la prueba de Tukey durante el pretratamiento de ultrasonificación de exoesqueletos de camarón y chapulín. 125
- Figura 40 Gráficas de residuos de medias del contenido de proteína soluble por la prueba de Tukey durante el pretratamiento de ultrasonificación de exoesqueletos de camarón y chapulín. 126
- Figura 41 Gráficas de residuos de medias de H° por la prueba de Tukey durante el pretratamiento de ultrasonificación de exoesqueletos de camarón y chapulín. 127
- Figura 42 Gráficas de residuos de medias de *S por la prueba de Tukey durante el pretratamiento de ultrasonificación de exoesqueletos de camarón y chapulín. 128

- Figura 43 Gráficas de residuos de medias de *L por la prueba de Tukey durante el pretratamiento de ultrasonicación de exoesqueletos de camarón y chapulín. 129
- Figura 44 Gráficas de residuos de medias del %DP (A) y DM (B) por la prueba de Tukey durante el pretratamiento de fermentación en medio sólido de exoesqueletos de camarón y chapulín. 130
- Figura 45 Gráficas de residuos de medias del %DP (A) y DM (B) por la prueba de Tukey durante Tratamiento combinado de FMS-Ultrasonicación de exoesqueletos de camarón y chapulín. 131
- Figura 46 Gráficas de residuos de medias del %DP (A) y DM (B) por la prueba de Tukey durante Tratamiento combinado de FMS-Hidrólisis química de exoesqueletos de camarón y chapulín. 132
- Figura 47 Gráficas de residuos de medias del %DP (A) y DM (B) por la prueba de Tukey durante Tratamiento combinado de FMS-Hidrólisis Enzimática de exoesqueletos de camarón y chapulín. 133
- Figura 48 Modelaciones del % Humedad para la fermentación ácido láctica de exoesqueletos de Camarón (A) y Chapulín (B) utilizando *L. rhamnosus* SP-1(1), *L. acidophilus* LA-3 (2) y *L. plantarum* BG-112 (3) 134
- Figura 49 Modelaciones del % Cenizas para la fermentación ácido láctica de exoesqueletos de Camarón (A) y Chapulín (B) utilizando *L. rhamnosus* SP-1(1), *L. acidophilus* LA-3 (2) y *L. plantarum* BG-112 (3) 135

Figura 50 Modelaciones del % ATT para la fermentación ácido láctica de exoesqueletos de Camarón (A) y Chapulín (B) utilizando *L. rhamnosus* SP-1(1), *L. acidophilus* LA-3 (2) y *L. plantarum* BG-112 (3). 136

Figura 51 Modelaciones del pH para la fermentación ácido láctica de exoesqueletos de Camarón (A) y Chapulín (B) utilizando *L. rhamnosus* SP-1(1), *L. acidophilus* LA-3 (2) y *L. plantarum* BG-112 (3). 137

ÍNDICE DE TABLAS

		Pag.
Tabla 1	Contenido de quitina en diferentes organismos	29
Tabla 2	Área de aplicación y usos de la quitina, quitosano, N-acetil-D-Glucosamina y Glucosamina.	30
Tabla 3	Descripción general de los procesos de tratamiento de los residuos biológicos de camarón	36
Tabla 4	Análisis del efecto de la extracción asistida por ultrasonificación en colorantes y antioxidantes.	45
Tabla 5	Análisis del efecto de la extracción asistida por ultrasonificación en grasas y proteínas.	48
Tabla 6	Dimensiones y cantidad de carga de los microensilados de camarón y chapulín.	59
Tabla 7	Dimensiones y cantidad de carga de los ensilados de camarón y chapulín.	65
Tabla 8	Resumen de las variables de respuesta analizadas y los análisis estadísticos.	67
Tabla 9	Características físicas de los microensilados elaborados con desechos de camarón y chapulín.	69

Tabla 10	Parámetros del modelo de PAGE y coeficiente de determinación (R^2), calculados por regresión de los datos experimentales.	71
Tabla 11	Parámetros del modelo de regresión no lineal y coeficiente de determinación.	73
Tabla 12	Parámetros del modelo de Langmuir y coeficientes de determinación	74
Tabla 13	Parámetros del modelo de regresión no lineal y coeficiente de determinación	74
Tabla 14	Análisis microbiológicos en los microensilados de los exoesqueletos de camarón y chapulín	77
Tabla 15	Análisis colorimétrico en los microensilados biológicos de los exoesqueletos de camarón y chapulín.	78
Tabla 16	Contenidos de proteínas, cenizas y descripción del color obtenidos mediante el método químico en los exoesqueletos de camarón y chapulín.	79
Tabla 17	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.	82

NOMENCLATURA

ATT	Acidez total titulable, (%)
ATT_{MAX}	Acidez total titulable máxima, (%)
A_w	Actividad de agua.
BG 112	<i>Lactobacillus plantarum</i> BG-112
F_d	Factor de dilución
H	Humedad, (%)
H°	Grados Heu
k	Parámetro en función de la temperatura del aire de secado.
L^*	Luminosidad.
LA3	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-3
n	Parámetro en función de la velocidad del aire y tipo de producto a secar
R^2	Coefficiente de determinación
R_c	Velocidad de secado en el periodo constante, (gH ₂ O/h m ²).
R_c	Velocidad de secado, (g/s)
S^*	Saturación.
s_0	Peso inicial de las muestras fermentadas.
s_f	Peso final de las muestras fermentadas.
SP1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> SP-1
t	Tiempo, (h).
t'	Tiempo de mayor contenido de cenizas y pH, (h).

t_i	Constante de tiempo en donde se observa linealidad para el contenido de ATT
U_{cas}	Unidad de actividad caseinolítica
UFC	Unidades formadoras de colonia.
x	Humedad media, (gH ₂ O/g s.s.).
x_0	Contenido inicial de proteínas, (%)
x_0	Humedad inicial, (g/g).
x_e	Humedad en equilibrio, (g/g).
x_f	Contenido final de proteínas, (%)
Y	Desmineralización y desproteínización, (%)
μ_{MAX}	Contenido de producción máxima de Acidez Total Titulable
$[\eta]$	Viscosidad intrínseca, (g/ml)

I. 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, cuya 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 de acuerdo a cifras del Anuario Estadístico 2013 de la Comisión Nacional de Pesca y Acuicultura (CONAPESCA). Estos residuos tienen un contenido de quitina de 13.1-23.2%, siendo este la principal fuente comercial de quitina a pesar de su amplia distribución en la naturaleza (cangrejo, langostino, jaiba, pluma de calamar, hongos e insectos). Por tal motivo, el interés comercial de la purificación de la quitina y sus derivados por la necesidad de tener sustratos económicos. Por referencia se sabe que la quitina se encuentra en elevada concentración en insectos, siendo ésta una nueva fuente de explotación. Debido a la similitud en el contenido de quitina en exoesqueletos de crustáceos en comparación con los insectos sobre todo con los considerados plaga (chapulín 5-12%, cucarachas 2-18% y escarabajos de 27-35%) (CYTED, 2012), se decidió realizar un estudio sobre la implementación de fermentaciones ácido lácticas, hidrólisis químicas y ondas sonoras de alta frecuencia en una fuente quitinosa poco reportada como el “Chapulín”. Esta fuente en particular en el estado de Oaxaca es considerada como una plaga, sus infestaciones pueden llegar a ser de 30 chapulines/m² o mas (Rios *et al.*, 2004) en los cultivos de maíz, frijol, soya y alfalfa. Permitiendo a cada familia de la localidad obtener alrededor de 50-70 kg de saltamontes semanal. Se estima que al menos se extraen 75-100 toneladas (peso fresco) por año en este valle. Por tal motivo, esta investigación consta de tres partes importantes: la primera consiste en establecer nuevas fuentes de quitina, la segunda consiste en la implementación de un método físico para la obtención y purificación de quitina, como el ultrasonido, que sea amigable con el ambiente en el sentido de que permita emplear menos ácidos y se reduzca la cantidad de agua de lavado entre cada paso de purificación, lo anterior en virtud de los beneficios aportados por dicho método para lograr la reducción de tamaño, desproteínización, posible despigmentación y desmineralización inherentes, debido a la asociación entre proteína-minerales-pigmentos observada en la quitina. Por último, como alternativa, se estudió el proceso biológico para la extracción de quitina por fermentación en medio sólido para la desproteínización y desmineralización del material obteniéndose quitina

como producto final. Este es un proceso amigable con el medio ambiente comparado con los métodos de preservación que involucran ácidos o bases, que son ecológicamente agresivos y económicamente inviables. Para este propósito se evaluaron mediante los perfiles hidrolíticos, las diferencias en los modos de acción de un mismo tipo de enzimas sobre substratos similares en cuanto a solubilidad, grado de desacetilación y peso molecular. Este proyecto propone un proceso limpio, para la obtención de quitina a partir de residuos marinos e insectos; utilizando la ultrasonificación y tratamientos biológicos como la depolimerización.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. QUITINA

La quitina fue aislada por primera vez por Braconnot en 1811, a partir de hongos superiores, y por su origen se denominó fungina. El nombre quitina del griego *xitwuy*, que significa cubierta se debe a Odier, que en 1923 la aisló a partir de escarabajos en soluciones alcalinas. Compuesto insoluble en la mayoría de los solventes comunes la quitina y su derivado principal, el quitosano, son biopolímeros con una gran diversidad de aplicaciones en los diversos campos de la actividad humana. La quitina se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, tanto en el reino animal como en el vegetal (tabla 1), siendo el segundo biopolímero más abundante después de la celulosa, por lo que constituye un importante recurso renovable. La quitina se encuentra presente en artrópodos, insectos, arácnidos, moluscos, hongos y algas entre otros organismos. En los animales aparece asociada a otros constituyentes, tales como lípidos, pigmentos, carbonato de calcio y proteínas (Peniche, 2006)

2.1.1. ESTRUCTURA DE LA QUITINA

La quitina es un homopolímero que está compuesto por residuos de *N-acetil-D-glucosamina* unidos por enlaces β -(1, 4) (figura 1) (Chuan, 2006). Es un polisacárido cristalino que cuenta con tres diferentes formas cristalográficas: α -, β - y γ -. La α -quitina es la isoforma más abundante, se encuentra compactada dando una estructura cristalina donde sus cadenas se encuentran antiparalelas, favoreciendo los enlaces de hidrógeno. La β -quitina tiene un arreglo paralelo con una fuerza intermolecular más débil, dando una molécula menos estable y la γ -quitina es una mezcla de las dos anteriores (Ramírez *et al.*, 2006).

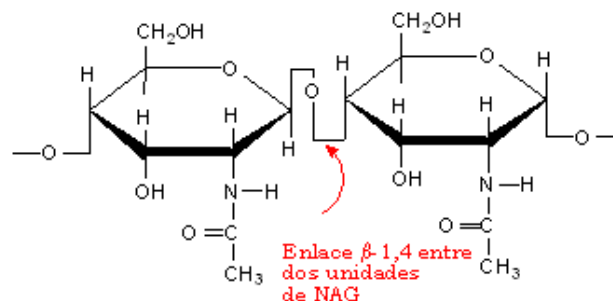


Fig. 1. Estructura de la quitina (Chuan, 2006)

Tabla 1. Contenido de quitina en diferentes organismos

FUENTE	QUITINA (%)	REFERENCIA
CRUSTÁCEOS		
Cangrejo (<i>Cancer</i>)	72.1	Tharanathan <i>et al.</i> , 2003 Synowiecki y Al-Khateeb, 2003 Arbia <i>et al.</i> , 2013
Cangrejo (<i>Carcinus</i>)	64.2	
Cangreso rey (<i>Paralithodes</i>)	35	
Cangreso azul (<i>Callinectes</i>)	14	
Camarón (<i>Crangon</i>)	69.1	
Camarón de Alaska	28	
Camarón (<i>Penaeus</i>)	13.1-23.2	Cira <i>et al.</i> , 2002
Langosta (<i>Nephrops</i>)	69.8	Tharanathan <i>et al.</i> , 2003
Langosta (<i>Homarus</i>)	60-75	
Langosta (<i>Panilirusornatus</i>)	15.71	Beaney <i>et al.</i> , 2005
Gamba (<i>Penaeusmonodon</i>)	67.9-97	Chandumpai <i>et al.</i> , 2004
Gamba (<i>Penaeusindicus</i>)	28	Oudor-Odote <i>et al.</i> , 2005
MOLUSCOS		
Concha deproteinizada de krill	40.2	Tharanathan <i>et al.</i> , 2003 Synowiecki y Al-Khateeb, 2003 Crini <i>et al.</i> , 2009 Arbia <i>et al.</i> , 2013
Concha de ostra (<i>Ostreaedulis</i>)	3.6	
Concha de almeja	6.1	
Pluma de calamar	41	
Pluma de calamar (<i>L. lessoniana</i>)	36.06	Chandumpai <i>et al.</i> , 2004
Pluma de calamar (<i>L. formosana</i>)	36.55	Chandumpai <i>et al.</i> , 2004
HONGOS		
<i>Aspergillus niger</i>	42	Tharanathan <i>et al.</i> , 2003 Synowiecki y Al-Khateeb, 2003 Arbia <i>et al.</i> , 2013
<i>Penicillium notatum</i>	24.01	
<i>Penicillium chrysogenum</i>	20.1	
<i>Agaricus bisporus</i> (<i>Champiñon blanco</i>)	27	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.9	
<i>Mucor rouxii</i>	44.5	
<i>Lactarius vellerus</i> (<i>Champiñon</i>)	19	
INSECTOS		
Cucaracha (<i>Periplaneta americana</i>)	2	Oudor-Odote <i>et al.</i> , 2005 Tharanathan <i>et al.</i> , 2003 Kaur y Dhillon, 2013
Cucaracha (<i>Blatella</i>)	18.4	
Escarabajo (<i>Coleoptera</i>)	27-35	
Mosca (<i>Diptera</i>)	54.8	
Mariposa sulfurada comun (<i>Colias philodice</i>)	64	
Mosca azul larva (<i>Calliphora erythrocephala</i>)	12	
Gusano de cera (<i>Galleria melonella</i>)	33.7	

Comparando la abundancia natural de las formas polifórmicas, encontramos que la α -quitina es la más abundante y estable, mientras que las otras dos se presentan en pequeñas

proporciones y tienden a ser transformadas en α -quitina (Hirano, 1999). Debido a que la quitina cuenta con un alto grado de cristalinidad, es insoluble en soluciones acuosas y solventes orgánicos (Tsigos *et al.*, 2002).

2.1.2. APLICACIONES DE QUITINA Y DERIVADOS.

Los derivados de la quitina presentan un conjunto de propiedades que resultan ventajosas para su aplicación en diversos campos. La quitina tiene poca aplicación, sin embargo, modificada como la carboximetilquitina o bien combinada con otros materiales, proporciona las aplicaciones mostradas en la tabla 2.

Tabla 2. Área de aplicación y usos de la quitina, quitosano, N-acetil-D-Glucosamina y Glucosamina.

SUSTANCIA	ÁREA	POSIBLES USOS
Quitina	Medicina	Polvo cicatrizante, gasa, algodón, esponjas, vendas e hilos para cirugía. Anticoagulante, y para fabricación de membranas. Tratamiento de pelo y piel.
	Cromatografía	Como soporte y para la inmovilización de enzimas
	Farmacia	Excipiente y transportador de drogas
	Inmunología	Adyuvante
	Industrias varias	Fabricación de nuevas telas, nuevos adhesivos, sucedáneos del vidrio, nuevos tipos de papel, etc.
SUSTANCIA	ÁREA	POSIBLES USOS
Quitosano	Medicina	Disminución de colesterol en sangre. Acelera la cicatrización de heridas y estimula el sistema inmune. Despierta la actividad antitumoral e inhibe el crecimiento bacteriano
	Cromatografía	Soporte de intercambio catiónico y soporte para inmovilizar enzimas
	Farmacia	Excipiente
	Alimentos	Clarificación de vinos y jugos, Cubiertas protectoras de frutas
	Tratamiento de efluentes	Quelantes de iones de metales pesados Clarificante y precipitante
	Agricultura	Recubrimiento de semillas, aditivo para insecticidas
	Acuicultura y Biotecnología	Para flocular cultivos
	Química	Purificación de biológicos
N-acetil-D-Glucosamina y/o sus derivados	Medicina	En el tratamiento de enteritis y colitis. Antiviral y antitumoral
	Alimentación	Para modificar la flora intestinal y lograr metabolizar la lactosa. Como edulcorantes.
Glucosamina y/o sus derivados	Medicina	Antitumoral (citotóxica), antimetástasis, antimicrobiano. Para combatir osteoartritis, hipertrofia cardíaca y disfunciones musculares

En el caso del quitosano, su capacidad de secuestrar iones metálicos de transición y post-transición es de utilidad en la descontaminación de desechos industriales, debido a su naturaleza policatiónica la cual le confiere una acción floculante. Puede ser utilizado en numerosas aplicaciones industriales (Guibal, 2004), como soporte para inmovilización de enzimas, formación de películas biodegradables, como agente antimicrobiano y como aditivo alimentario (Agulló *et al.*, 2003), la capacidad antifúngica está ampliamente documentada y ha tenido aplicaciones dentro del área de la agricultura para el control de hongos fitopatógenos (Mulawarman *et al.*, 2003), es excelente generador de fibras, películas y membranas, que se pueden preparar en forma de microesferas y microcápsulas, lo que unido a su biocompatibilidad y su biodegradabilidad promueven su empleo en diversas áreas principalmente en las industrias biomédica y farmacéutica (Chen *et al.*, 2003 y Qin *et al.*, 2002).

2.1.3. COMPONENTES DE EXOESQUELETOS DE CRUSTACEOS E INSECTOS

Los tres componentes principales de los exoesqueletos de crustáceos incluyendo a la quitina son los minerales (principalmente carbonato de calcio) y proteínas. Estos tres componentes se encuentran estrechamente asociados y representan alrededor del 90% del peso seco total del caparazón (Rødde *et al.*, 2008). Sin embargo, en los exoesqueletos de insectos también están asociados con microfibrillas y láminas de quitina; como también, las capas de ceras formando lipoproteínas, como la artropodina (proteína hidrosoluble maleada) y melanina (Andersen *et al.*, 2010)

2.2. MÉTODOS QUÍMICOS

En el proceso industrial, la quitina es extraída de crustáceos mediante tratamiento ácido para disolver el carbonato de calcio “Desmineralización” (DM) seguido por la extracción alcalina para solubilizar las proteínas “Desproteínización” (DP). Además, un paso de decoloración es usualmente agregado para remover los pigmentos restantes y obtener un producto blanco (Rinaudo, 2006). El procedimiento químico tradicional para la producción de quitina desde residuos de camarón involucra el uso de HCl (0.2 M) para la DM, seguida por un tratamiento con NaOH a temperatura relativamente alta (90 °C) para conseguir la DP. Posteriormente, se realiza un paso de blanqueado con KMnO₄ aunque también se pueden usar peróxidos. A pesar de que el método químico es muy eficiente, tiene el

inconveniente que la purificación de la quitina requiere de energía y causa daño al ambiente por las altas concentraciones de ácido mineral y sosa cáustica (Xu *et al.*, 2008). Por otra parte, Yamaguchi *et al.* (2003), utilizaron hidróxido de sodio (NaOH) al 4% a 100 °C por 4 horas. Igualmente, Tomihata e Ikada en el 2001 utilizaron hidróxido de sodio (NaOH) al 3% a 70 °C por 5 horas. Por otro lado, Vongchan *et al.*, (2005) usaron a ácido acético (CH₃COOH) al 2% a 120 °C por 50 minutos, mientras que Matienzo en el 2002 mezclaron ácido acético (CH₃COOH) al 0,3 M y acetato de sodio (CH₃COONa) al 0.2 M a 25 °C empleando tiempos mayores. Generalmente, la extracción química tiene mayor preferencia debido al procesamiento constante y rápido y el producto final limpio, libre de impurezas que se requiere para aplicaciones sensibles, por ejemplo, en la medicina (Bajaj *et al.*, 2011). Sin embargo, la desventaja de este método es la utilización de químicos peligrosos a altas temperaturas los cuales causan corrosión del equipo y la formación de subproductos indeseables tales como polímeros desacetilados de manera irregular (Hernández *et al.*, 2008; Sorokulova *et al.*, 2009; Wahyuntari *et al.*, 2011). Igualmente, el uso de ácidos químicos fuertes causa la hidrólisis de la quitina y la inconsistencia de algunas de sus propiedades físicas, resultando en la reducción de su peso molecular y grado de acetilación (Flores *et al.*, 2007; Khanafari *et al.*, 2008; Pacheco *et al.*, 2009; Kardas *et al.*, 2012). Adicionalmente, el uso de grandes concentraciones de ácidos minerales y álcalis conduce a la contaminación ambiental (Khanafari *et al.*, 2008; Aytekin y Elibol 2010). Este método causa un incremento de costos de procesamiento debido a problemas ambientales de disposición final de los residuos (Hernández *et al.*, 2008; Wahyuntari *et al.*, 2011; Kardas *et al.*, 2012). El método químico involucra además el uso de gran cantidad de agua y un consumo relativamente alto de energía, así como una gran pérdida de compuestos bioactivos que pueden ser aislados del desecho de camarón tales como proteínas, pigmentos, y ácidos grasos, los cuales pueden ser aplicados para la obtención de nuevos productos (Bashkar *et al.*, 2007; Khanafari *et al.*, 2008; Pacheco *et al.*, 2009; Valdez *et al.*, 2010; Bajaj *et al.*, 2011). Por ejemplo, la astaxantina es degradada bajo tales condiciones operacionales (Pacheco *et al.*, 2009). Con el fin de superar los inconvenientes de los tratamientos químicos, se han estudiado métodos de aprovechamiento alternativos como algunos procesos biológicos, incluyendo el enzimático, microbiológico, así como la combinación de procesos químicos-biológicos (Wahyuntari *et al.*, 2011).

2.3. MÉTODOS BIOLÓGICOS

Se trata de una técnica avanzada y nueva para la extracción de quitina, la cual puede hacerse utilizando microorganismos proteolíticos u hongos o enzimas purificadas. Da como resultado la producción de oligómeros con un grado óptimo de polimerización para diferentes aplicaciones y no desnaturaliza la quitina. (Pal *et al.*, 2014)

2.3.1. FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO

La fermentación en medio o estado sólido (FMS), se define como el crecimiento de microorganismos en medios sólidos, o semi-sólidos, en ausencia de agua libre. Esta técnica ha sido aplicada desde la antigüedad en la preparación de alimentos fermentados (Aidoo *et al.*, 1982). Las fermentaciones con estas características son aquellas en las cuales el sustrato no está ni disuelto ni en suspensión en un gran volumen de agua. El objetivo es el aumento del contenido proteico mejorando las posibilidades de conservación, cambiando las características físicas, químicas y sensoriales de los mismos. La fermentación en medio sólido utiliza generalmente un material natural como fuente de carbono y energía, además de presentar suficiente humedad para permitir procesos bioquímicos de los microorganismos empleados. Los sustratos utilizados deben proporcionar un buen ambiente de crecimiento de la flora microbiana y permitir la síntesis de las diferentes enzimas. Dentro de los aspectos más importantes para la fermentación en sólido se encuentran: la selección del microorganismos y sustrato adecuado, optimización de parámetros del proceso y el aislamiento y purificación del producto. Para la selección del sustrato hay que evaluar si se requiere un sustrato específico o si el objetivo es producir un producto específico de un sustrato adecuado. Los parámetros del proceso y su optimización son importantes, así como parámetros físico-químicos y bioquímicos tales como: el tamaño de las partículas del sustrato, humedad inicial, el pH y pre-tratamiento del mismo, humedad relativa, temperatura de incubación, agitación y aireación, edad y tamaño del inóculo, la suplementación de nutrientes, fuente de carbono e inductores, extracción de producto y depuración (Pandey *et al.*, 2003).

2.3.2. FERMENTACIÓN ÁCIDO LÁCTICA (FAL)

El uso de la fermentación ácido láctica (FAL) produce ácido láctico (AL) que reduce el pH, lo cual resulta en la inhibición del crecimiento de microorganismos no deseados. Estos

materiales son susceptibles a descomposición por microorganismos aeróbicos debido a su alto contenido de humedad y composición química (Martin, 1996). La fermentación en medio sólido (FMS) de residuos de crustáceos y una producción de AL *in situ* por bacterias ácido lácticas (BAL) induce la licuefacción del residuo semisólido y se produce una disminución en el pH, así como la activación de proteasas que desproteinizan los residuos. Un efecto colateral de la FMS es la producción de AL por la fermentación de carbohidratos, que conduce a una desmineralización e los residuos y una precipitación parcial de los iones de calcio como lactato de calcio (Xu *et al.*, 2008; Gimeno *et al.*, 2007). La fermentación del residuo de camarón resulta en un licor rico en proteínas, minerales y carotenoides (especialmente astaxantina) con una fracción sólida (FS) rica en quitina. La fracción líquida (FL) puede ser utilizada como suplemento de proteínas y minerales para consumo humano o alimentación animal (Shirai *et al.*, 2001; Cira *et al.*, 2002; Bhaskar *et al.*, 2007). La utilidad de la obtención por medio de fermentación es debida a su naturaleza amigable ecológicamente comparada con los métodos de preservación que involucran ácido o bases o el secado, que son ecológicamente agresivos y económicamente no viables (Bhaskar *et al.*, 2007). La fermentación del desperdicio para recuperar quitina reemplaza considerablemente el proceso químico (Bhaskar *et al.*, 2007), sin embargo, para producir una quitina de calidad estándar, la proteína y minerales residuales de la quitina cruda deben ser removidos mediante tratamientos suaves con álcalis y ácidos (Cira *et al.*, 2002; Sini *et al.*, 2007). También se ha reportado el uso de proteasas para la desproteización e caparazones de crustáceos, que evitaría el tratamiento alcalino. Además de la aplicación de exoenzimas, bacterias proteolíticas son usadas para la DP de caparazones desmineralizados (Sini *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2008). Jung *et al.*, (2005) realizaron la fermentación láctica para la desmineralización de los residuos de carapacho del cangrejo rojo utilizando *Lactobacillus paracasei* subesp. *tolerans* KCTC-3074, a diversas concentraciones de glucosa se adicionaron como una primera fuente de carbono y varias cantidades del cultivo bacteriano se inocularon como cultivo iniciador. Rao *et al.*, (2000), determinaron los factores que afectan al *Lactobacillus plantarum* durante la fermentación de los desechos de camarón en la producción de quitina y licor de proteína. El objetivo de la fermentación fue posible por la secreción de proteasas y la reducción del pH, ésta se favoreció agregando ácido cítrico, sustituyendo el ácido acético, incrementando hasta un 88% la desproteización y a 90% la desmineralización con un tiempo de bioproceso a las

18 h. La adición de ácido acético al inicio de la fermentación fue esencial, contribuyendo a la reducción del deterioro.

2.3.3. BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS (BAL)

Las bacterias ácido lácticas han sido utilizadas en la fermentación desde 4,000 años atrás, son heterótrofos Gram positivas, ácidos tolerantes, no forman esporas, son inmóviles, se encuentran en forma de cocos o bacilos con bajo contenido de guanina y citosina, se caracterizan por producir ácido láctico a partir de hexosas, lo que las asocia a la conservación de alimentos, pues la acidificación que producen inhibe el crecimiento de agentes descomposición. Algunas BAL son productoras de bacteriocinas tóxicas que proporcionan un obstáculo adicional contra microorganismos patógenos (tabla 3). Las BAL son capaces de adaptarse a diversas condiciones (tiempo, temperatura y sustratos), cambiando su metabolismo y de esta manera generar diferentes productos metabólicos. De acuerdo a los productos finales del metabolismo de la glucosa, se pueden distinguir dos principales rutas metabólicas de las BAL, las que producen ácido láctico como único o mayor producto, se denominan homofermentativos (ruta metabólica de Embden Meyerhof) produciendo dos moles de ácido láctico y una ganancia neta de dos ATP por mol de glucosa consumido. Las BAL que producen además del ácido láctico cantidades iguales de etanol, dióxido de carbono o ácido acético, (ruta metabólica de 6-fosfogluconato/fosfocetolasa) se denominan heterofermentativas, donde se produce un mol de ácido láctico, etanol, CO₂ y un mol de ATP por mol de glucosa consumida (Axelsson, 1993). Generalmente las BAL son mesófilas, pero pueden crecer entre un intervalo de 5-45 °C con temperaturas óptimas que dependen de la especie, son tolerantes a condiciones ácidas y básicas lo que les permite crecer en intervalos de pH de 3.2 a 9.6, siendo el óptimo entre 5 y 7 (Reddy *et al.*, 2008). La fermentación es un proceso catabólico de oxidación incompleta que produce compuestos orgánicos. Cuando la célula se encuentra en condiciones anaerobias, la fermentación responde a la necesidad de generar moléculas de NAD⁺ que han sido reducidas durante la glucólisis para transformar la glucosa en ácido pirúvico y de esta manera continuar la reacción de producción de energía, por lo que es necesario reoxidar el NADH que cede sus electrones al ácido pirúvico y lo reduce a ácido láctico, ácido acético o etanol como se observa en la figura 2. El proceso de fermentación donde el producto final es el ácido láctico

(fermentación láctica) se lleva a cabo por bacterias lácticas, hongos, protozoos y en tejidos animales (Axelson, 1993).

Tabla 3. Descripción general de los procesos de tratamiento de los residuos biológicos de camarón

Fuente de residuos	Microorganismos	Fuente de Carbono	Eficiencia de DP (%)	Eficiencia de DM (%)	Tiempo (días)	Literatura
<i>Nephrops norvegicus</i> Desmineralizado	<i>Stabsila</i> <i>Streptococcus faecium</i> M74, <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i>	Lactosa	40	-----	7	Healy et al. (1994)
<i>Penaeus sp.</i>	<i>Lactobacillus spp.</i> B2	Sacarosa, suero	85	87.6	6	Cira et al. (2002)
Fermentación de una etapa Camarón	<i>Lactobacillus plantarum</i> 541	Glucosa	75	86	N.M.	Rao et al. (2000)
<i>Chionoectes japonicus</i>	<i>Lactobacillus paracasei ssp. tolerans</i> KCTC-3074	Glucosa	52.6	97.2	7	Jung et al. (2006)
<i>Penaeus monodon</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>		>99	98.8b	2	Waldeck et al. (2006)
<i>Metapenaeopsis dobsoni</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	(20% sacarosa)	84	72	15	Sini et al. (2007)
Fermentación de dos etapas <i>Chionoectes japonicus</i>	<i>Lactobacillus paracasei ssp. tolerans</i> KCTC-3074 <i>Serratia marcescens</i> FS-3	Glucosa	68.9	94.3	12	Jung et al. (2007)
<i>Penaeus monodon</i>	Cultivo enriquecido GM, <i>L. casei</i> MRS1	Glucosa	97.4	99.6	4.8	Xu et al. (2007)
Crangon Crangon Pretratado	Cultivo enriquecido GM, <i>L. casei</i> MRS1	Glucosa	90.8	99.7	4	Xu et al. (2007)

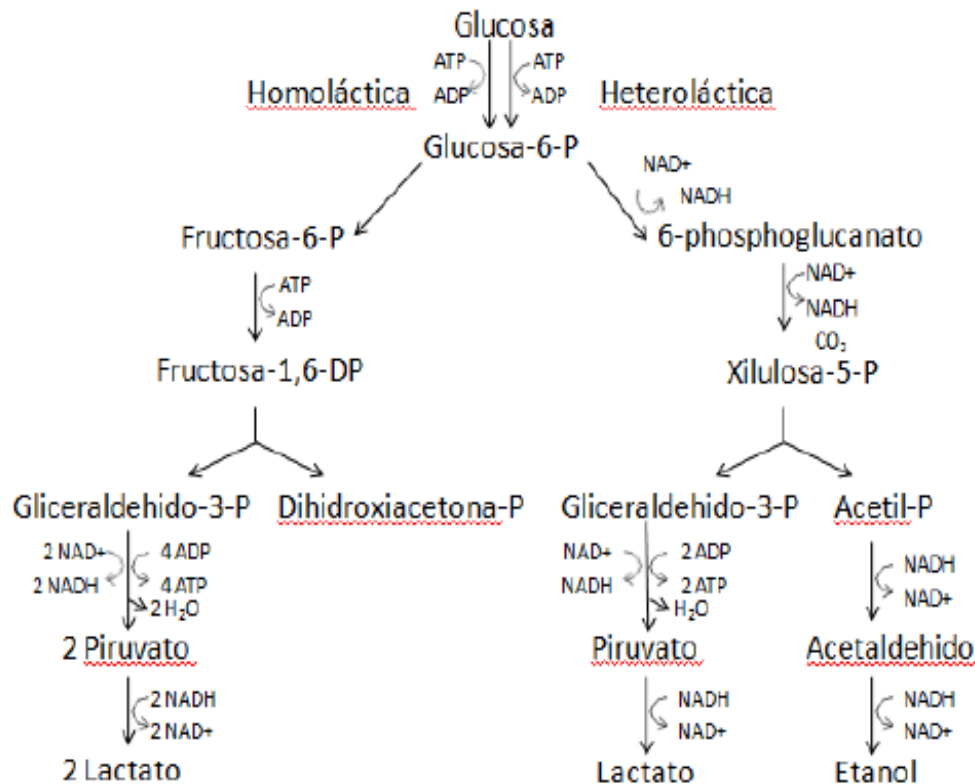


Fig. 2. Esquema generalizado de la fermentación de la glucosa en bacterias ácido lácticas

2.3.3.1. Condiciones de Crecimiento de las BAL

Las bacterias se asocian a hábitats ricos en nutrientes, como son diversos productos alimenticios tales como la leche, carne, bebidas, granos y vegetales, aunque también a la superficie de las mucosas de animales (Barakat *et al.*, 2000). Siendo muy exigentes en cuanto a la nutrición, todas fermentan glucosa, aunque algunas pueden multiplicarse en ausencia de azúcares como es el caso de *Leuc. Citrovorum* el cual puede desarrollarse en presencia de citrato como única fuente de carbono. Mientras unas no fermentan la sacarosa, otras no atacan la lactosa, las pentosas o las dextrinas. Requieren aminoácidos como fuente de nitrógeno siendo las sales amoniacales las que estimulan su desarrollo y una diversidad de factores de crecimiento. Estas demandas de determinados nutrientes permiten diferenciar algunas especies (Leveau *et al.*, 2000). El carbono es el nutriente más importante para el crecimiento de las BAL seguido del nitrógeno el cual es requerido para la síntesis de aminoácidos como la purina y pirimidina, también son indispensables el fósforo, magnesio y elementos traza. La velocidad del proceso metabólico en las BAL varía en respuesta a las

condiciones ambientales como el pH y la temperatura. La fermentación láctica es bastante sensible a la inhibición por producto (Pacheco *et al.*, 2006), las enzimas reguladoras tienen una estabilidad limitada a pH y temperatura, esto se debe a que son proteínas globulares, con enlaces no covalentes débiles y a medida que aumenta la temperatura o a pH extremos pierden actividad, convirtiendo a estos dos parámetros importantes en el proceso. Generalmente las BAL son mesófilas pero pueden crecer entre un intervalo de 5 - 45 °C con temperaturas óptimas que dependen de la especie, son tolerantes a condiciones ácidas y básicas lo que les permite crecer en intervalos de 3.2 - 9.6, siendo el óptimo entre 5 y 7 (Reddy *et al.*, 2008). A pesar de la utilidad que tienen las BAL para la industria de alimentos, es reconocida la dificultad que representa el cultivarlas por la necesidad de una gran cantidad de requerimientos nutricionales. Las vitaminas son los factores de crecimiento que se necesitan con mayor frecuencia, ya que funcionan formando partes de las coenzimas. Algunos géneros como *Streptococcus* y *Lactobacillus*, destacan por sus requerimientos vitamínicos complejos, mucho más amplios que los humanos. Las principales vitaminas requeridas por los microorganismos son tiamina (vitamina B₁), biotina, piridoxina (vitamina B₆) y cobalamina (vitamina B₁₂), de aquí su uso en las pruebas microbiológicas para detectar estos compuestos (Madigan *et al.*, 2004). Las exigencias nutricionales de las BAL a minerales son pocos conocidos. La necesidad de los iones en el metabolismo se explica en primer lugar por su función de cofactor para numerosas enzimas, ahí la importancia de los minerales metálicos en el metabolismo de las bacterias.

2.3.4. DESPROTEINIZACIÓN ENZIMÁTICA

En las últimas décadas se han utilizado gran variedad de enzimas para acelerar diversos procesos como es en la industria agrícola, alimentaria, farmacéutica, biomédica, textil, papelera, entre otros (Gildberg, 1993). Ibrahim en 1999, estableció que las enzimas son particularmente adecuadas para las industrias de alimento por varias razones, ellas dan de manera natural un material biológico los cuales son catalogados como no tóxicos y actúan de manera específica. Por otra parte, los controles de las reacciones enzimáticas se logran con bastante facilidad con ajustes de la temperatura y pH, algunos investigadores han tratado de desproteínizar residuos de crustáceos para la producción de quitina por digestión de enzimas. Siendo este un procedimiento alternativo para la desproteínización de la quitina cruda obtenida al término de la fermentación ácido láctica, esta puede realizarse utilizando

enzimas proteolíticas hidrolizando los enlaces peptídicos. Gagné *et al.* (1993), utilizó proteasas bacterianas como, quimotripsina tipo II (CE 3.4.21.1) y papaína (CE 3.4.22.2) Broussignac, (1968) recomendó el uso de la papaína, pepsina y tripsina para la desproteínización de crustáceos durante la extracción de quitina. Shimahara (1989) describe un procedimiento para desproteínizar exoesqueleto de camarón por medio de bacterias proteolíticas (*Pseudomonas maltophilia* LC 102) sobre la materia prima, reportando que después de 24 horas la proteína residual, en la concha era de 1%, y encontró este método preferible para evitar la desacetilación. Gagne (1994) utilizó diversas enzimas proteolíticas (quimotripsina, papaína bacteriana y proteasa) para desproteínizar crustáceos. De las tres proteasas probadas, quimotripsina resultó ser la más eficaz. Las condiciones óptimas utilizando quimotripsina fueron a pH 8 durante 72 horas a 40 °C y una proporción enzima a sustrato de 7:10 (p/v). Wang y Chio (1999) encontraron que *P. aeruginosa* K-187 produjo además de quitinasa y lisozima, una proteasa útil para la desproteínización de desechos de camarón y cangrejo. La proteasa de *P. aeruginosa* K-187, fue producida bajo las óptimas condiciones de cultivo (40 °C y pH 6–8) y puede ser inmovilizada sobre un soporte polimérico reversiblemente soluble (hidroxipropil metilcelulosa, acetato, ac. succínico). La enzima inmovilizada fue soluble arriba de un pH 5.5 pero insoluble debajo de un pH 4.5. La utilización de la enzima inmovilizada para la desproteínización de camarón y concha de cangrejo en polvo, resultó en una remoción de proteína del 67% en contraste, la remoción de proteína usando la enzima no inmovilizada fue de 72%. Valdez-Peña en el 2010, investigó la recuperación de quitina cruda a partir de residuos de camarón, *Litopenaues vannamei*, usando proteasas comerciales y aplicando la tecnología de microondas observando que la alcalasa presentó el mejor desempeño de desproteínización de residuos de camarón. Así mismo, cabe mencionar que actualmente no existe un estudio reciente sobre la implementación de nuevos métodos para la obtención industrial de quitina de insectos en chapulín (*Sphenarium purpurascens*).

2.4. MÉTODO FÍSICO

2.4.1. ULTRASONICACIÓN

La ultrasonificación es una técnica que se basa en la aplicación de ondas electromagnéticas completas del tipo de microondas, las cuales producen una serie de cavitaciones entre el medio de cultivo y el gas disuelto; formando así un poro temporal en las membranas de

las células. A frecuencias de 20 KHz se producen vibraciones que provocan el fenómeno de cavitación generando zonas de baja presión en el líquido, el líquido se transforma en gas formándose pequeñas burbujas, que colapsan debido a los cambios de presión y los fuertes esfuerzos de corte en el líquido que rompen las células. Por otra parte, la homogeneización ultrasónica es un proceso mecánico para disminuir partículas pequeñas en un líquido para que sean uniformemente pequeñas y distribuidas con suavidad. El ultrasonido de potencia representa una tecnología novedosa, la cual ha creado bastante interés debido a sus efectos promisorios en las áreas de procesamiento y conservación de alimentos; sin embargo, y aunque actualmente es considerada una tecnología emergente, el uso de la tecnología de ultrasonido no se ha promovido para su aplicación en productos comerciales. Solo se ha reconocido como una tecnología que asiste o ayuda en la modificación de procesos o mejora de los existentes (Knorr *et al.*, 2004). Hoover (2000) define ultrasonido como una forma de energía que viaja en ondas de sonido iguales o mayores a 20000 vibraciones por segundo, otra definición la realizó Mason (1990), en la cual lo establece como cualquier sonido con frecuencia más allá de lo que el oído humano puede percibir (16 KHz). Las aplicaciones de las ondas ultrasónicas se dividen por lo general en dos grupos: baja y elevada intensidad. Las aplicaciones de baja intensidad son aquellas cuyo objetivo es obtener información acerca del medio de propagación sin producir ninguna modificación en su estado. Por el contrario, las aplicaciones de elevada intensidad son aquellas en la que la energía ultrasónica se utiliza para producir cambios permanentes en el medio tratado. Por ello, los ultrasonidos de potencia (USP) se asignan a las aplicaciones de elevada intensidad. El límite entre baja y alta intensidad es difícil de fijar, pero puede establecerse de forma aproximada para aquellos valores de la intensidad para los que, dependiendo del medio, varían entre 0.1 W/cm^2 y 1 W/cm^2 . Sin embargo, Mason (1998) establece que como en el caso de otras áreas de procesamiento tecnológico, el rango de sonido empleado es muy amplio y se puede dividir en los de alta frecuencia baja energía en el rango de MHz, aplicado como ultrasonido de diagnóstico y de baja frecuencia alta energía, USP en el rango de los KHz.

2.4.2. MECANISMO DE LA ULTRASONICACIÓN

La intensificación de la eficacia de extracción usando ultrasonido se ha atribuido a la propagación de las ondas sónicas a través de los fenómenos de cavitación y disolventes resultante. El mecanismo de control de extracción asistida por ultrasonido se atribuye

generalmente a la cavitación mecánica, y los efectos térmicos que pueden resultar en ruptura de las paredes celulares, la reducción de tamaño de partícula, y la transferencia de masa mejorada a través de las membranas celulares. La implosión de las burbujas de cavitación genera micro-turbulencias y de alta velocidad entre las partículas y la perturbación en micro-partículas porosas de la biomasa que acelera la difusión y difusión interna. Debido al "espacio" limitado para que las burbujas se expandan, la mayor parte de la caída de burbujas asimétricamente en los vasos, resulta importantes corrientes de circulación de líquidos asociadas con una intensa turbulencia. También la cavitación en la superficie del material provoca pinzamiento por el micro-chorro resultante en la superficie de desprendimiento, la erosión y la descomposición de partículas. Los efectos principales de ultrasonido son muy evidentes por microscopía electrónica de barrido. La aplicación del ultrasonido permite que los compuestos se disuelvan en el disolvente, lo que aumenta el rendimiento con un tiempo más corto mediante la ruptura de la pared celular. Debido a la cavitación, las grietas se desarrollan en la pared celular que aumenta la permeabilidad de los tejidos vegetales que facilitan la entrada de disolvente en la parte interior del material, así como el lavado de los extractos como se aprecia en la figura 3. Sin embargo, más allá de un cierto límite hay desperdicio de energía ultrasónica debido a las limitaciones. La consideración de estos hechos es muy importante para hacer el proceso de extracción total económicamente más viable.

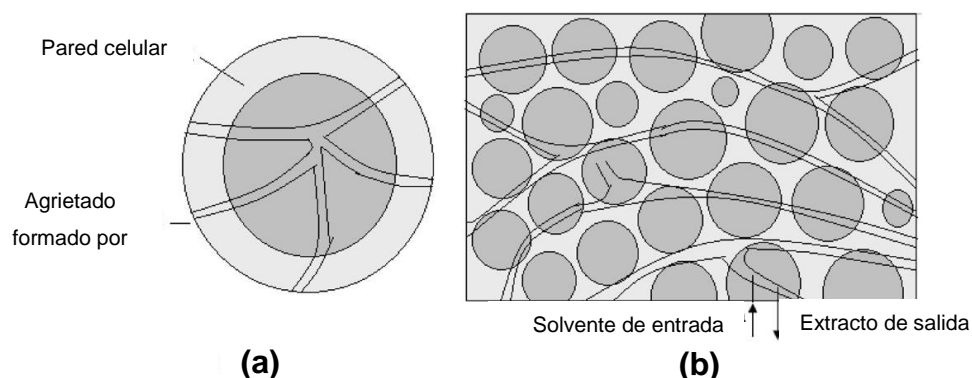


Figura. 3. Mecanismo de la ruptura de la pared celular (a) ruptura de la pared celular debido a la cavitación. (b) difusión de disolvente en la estructura de la célula.

Shirsath *et al.* (2013), estudiaron la extracción de productos naturales usando ondas ultrasónicas, ya que la extracción de compuestos químicos activos de los productos naturales es una de las áreas de investigación más importantes para la industria química,

biotecnológica y farmacéutica. Las técnicas tradicionales utilizadas para la extracción de productos naturales están asociadas con los tiempos de extracción y de rendimientos más largos, el uso de la gran cantidad de disolventes orgánicos y de la baja eficiencia de extracción. El ultrasonido puede ser utilizado para mejorar la velocidad de extracción mediante el aumento de las tasas de transferencia de masa y la posible ruptura de la pared celular debido a la formación de microcavidades que conducen a mayores rendimientos de producto de procesamiento y el consumo de disolvente. El mecanismo de la extracción asistida por ultrasonido ha sido discutido y las condiciones óptimas de operación se han reportado para maximizar el rendimiento. En general, parece que las irradiaciones ultrasónicas pueden utilizarse eficazmente para la intensificación de la extracción de constituyentes importantes de productos naturales (Hielscher, 2005). Existen equipos ultrasónicos para la homogeneización de cualquier volumen de muestras, tanto en recipiente como para procesos continuos. Los equipos ultrasónicos para laboratorios pueden ser utilizados para volúmenes desde 1.5 mL hasta aproximadamente 2 L. Los equipos ultrasónicos industriales se utilizan para el proceso de desarrollo y producciones en recipiente desde 0.5 hasta 2,000 L o para caudales desde 0.1 L hasta 20 m³/h (Sivakumar *et al.*, 2007).

2.4.3 EFECTOS DEL ULTRASONIDO

El efecto conservador del ultrasonido está asociado a los fenómenos complejos de cavitación gaseosa, que explican la generación y evolución de microburbujas en un medio líquido. La cavitación se produce en aquellas regiones de un líquido que se encuentran sometidas a presiones de alta amplitud que alternan rápidamente. Durante la mitad negativa del ciclo de Presión, el líquido se encuentra sometido a un esfuerzo tensional y durante la mitad positiva del ciclo experimenta una compresión. El resultado es la formación ininterrumpida de microburbujas cuyo tamaño aumenta miles de veces en la alternancia de los ciclos de presión. Las microburbujas que alcanzan un tamaño crítico implosionan o colapsan violentamente para volver al tamaño original. La implosión supone la liberación de toda la energía acumulada, ocasionando incrementos de temperatura instantáneos y focales, que se disipan sin que supongan una elevación sustancial de la temperatura del líquido tratado. Sin embargo, la energía liberada, así como el choque mecánico asociadas al fenómeno de implosión, afectan la estructura de las células situadas en el microentorno.

Se considera que, dependiendo de la frecuencia empleada y la longitud de las ondas de sonido, se pueden generar diferentes cambios físicos, químicos y bioquímicos que pueden emplearse en un sin número de aplicaciones en los diferentes campos Industriales (Herrero *et al.*, 2006).

2.4.4. CAMPOS DE APLICACIÓN DEL ULTRASONIDO

El ultrasonido hace uso de fenómenos físicos y químicos que son fundamentalmente diferentes a los que se aplican convencionalmente en las técnicas de extracción, procesamiento y conservación. Ofrece ventajas en términos de productividad, rendimiento y selectividad, ya que se obtienen mejores tiempos de proceso, mejora la calidad, reduce riesgos químicos y físicos y se considera ambientalmente amigable. Actualmente es considerada una técnica de procesamiento sustentable, debido a que típicamente emplea menos tiempo, agua y energía (Chemat *et al.*, 2011). El uso de ondas ultrasónicas de elevada intensidad en procesos industriales se basa generalmente en una explotación adecuada de una serie de mecanismos activados por la energía ultrasónica tales como transferencia de calor, agitación, difusión, inestabilidad en las interfases, fricción, rotura mecánica, efectos químicos, etc. Estos mecanismos son empleados para producir o mejorar una amplia gama de procesos tales como soldadura de plásticos y metales, mecanizado, formación de metales, atomización, emulsificación y dispersión, desgasificación, extracción desespumado, aglomeración de partículas, secado y extracción de líquidos en suspensiones, reacciones sonoquímicas, etc. (Joice, *et al.*, 2008). Una característica de las ondas ultrasónicas de elevada intensidad es su capacidad para trabajar de manera que actúan en sinergia con otras formas de energía estimulando, acelerando, o mejorando muchos procesos. Esta es la razón por la que varias aplicaciones prácticas de los ultrasonidos no son exclusivamente procesos ultrasónicos sino procesos asistidos ultrasónicamente. Tal situación es particularmente importante en aquellos procesos relacionados con la industria alimentaria donde la aplicación de las ondas ultrasónicas impone la utilización de una energía limpia, no contaminante (Knorr *et al.*, 2004, Chemat *et al.*, 2011; Mason *et al.*, 1996). Se considera como efectos ventajosos de esta tecnología lo siguiente: efectiva contra células vegetativas, esporas y enzimas, reducción de los tiempos y temperaturas de proceso, pocos requerimientos de adaptación en plantas ya establecidas, incrementos de los fenómenos de transferencia de calor, posible modificación de la

estructura y textura en alimentos, puede emplearse en procesos continuos o intermitentes y efecto sobre la actividad enzimática.

2.4.5. EXTRACCIÓN

Actualmente en la búsqueda de tecnologías no contaminantes y consideradas “verdes”, se ha encontrado que la extracción asistida con ultrasonificación llena estos requisitos ya que emplea menos solventes y energía. Esta metodología es considerada actualmente emergente (Chemat *et al.*, 2011; Joyce *et al.*, 2008) y se fundamenta en la aceleración de la transferencia de masa y calor, de manera que interaccionan con el material alterando sus propiedades físicas y químicas y el efecto de cavitación favorece la liberación de los compuestos a extraer y mejora el transporte de masa debido al rompimiento de la pared celular. Sin embargo, el uso de la sonicación como tecnología asistente se ha reportado como más ventajosa que el emplear procesos como extracción con fluidos supercríticos, microondas y extracción acelerada con solventes. Las aplicaciones incluyen extracciones en hierbas, aceites, proteínas y componentes bioactivos de plantas. Investigaciones de Riera *et al.*, (2004) empleando Ultrasonificación a 20 KHz y 50W como asistente en la extracción supercrítica con CO₂ de aceite de almendra, obtuvieron un rendimiento mayor al 20% al emplear Ultrasonificación, en comparación con la extracción supercrítica sola, este mismo comportamiento se observó en extracciones de aceite a partir de semillas de té (Rajaei *et al.*, 2005). Anteriormente Moulton y Wang (1982), realizaron la extracción de proteínas a partir de soya, empleando un sonicador planta piloto con el cual obtuvieron rendimientos mayores al 54 y 23% para extracciones acuosas y con álcali respectivamente. En este mismo proceso se obtuvo 70% menos gasto energético. Los componentes bioactivos se consideran de interés particular en muchos campos de investigación actuales, la extracción de compuestos fenólicos a partir de desechos de uva se ha considerado como prioritario en áreas como la nutrición y farmacéutica. La extracción de fenoles empleando extracción con fluidos supercríticos y asistida por ultrasonido es considerada como el mejor método según Palma y Taylor (1999). En el caso de compuestos aromáticos en vinos, Vila *et al.*, (1999) reportaron incremento del 16 a 23% comparado con la extracción convencional. En la tabla 4 se presenta un análisis del efecto de la extracción asistida por ultrasonificación en diferentes investigaciones.

Tabla 4. Análisis del efecto de la extracción asistida por ultrasonificación en colorantes y antioxidantes.

MUESTRA	APLICACIÓN DE LA ULTRASONIFICACIÓN	EQUIPO	CONDICIONES	RENDIMIENTO	REFERENCIA
Nueces de myrobalan	Extracción de Taninos	Sonda ultrasónica (VCX 400, Sonics and Materials, EE.UU., 20 kHz y 0-400 W)	La extracción se realizó usando agua como disolvente en una relación (1:6) (p/v). Para los experimentos, 20 g de nueces mirobálano en 120 ml de agua destilada fueron transferidos en dos diferentes vasos de 250 ml limpio. La Influencia de la potencia ultrasónica 40-100 W a (30 °C). El efecto de la temperatura 70 °C se estudió también por ultrasonido, a 80 W, así como el proceso de control para la comparación.	La eficiencia de extracción se encontró que 90% de los ultrasonidos, 100 W sin calentamiento externo, en comparación con 77% para el proceso de control a 70 °C durante 4 h.	Sivakumar et al. (2007)
Bayas Aronia melanocarpa	Extracción de polifenoles antioxidantes	La extracción de los polifenoles se estudió en un contactor de vidrio agitado de 1 L, equipado de un generador de ultrasonidos (SinapTec, Francia).	Los experimentos se llevaron a cabo en cuatro niveles de temperatura (20, 40, 60, 80 °C) y tres niveles de sólido-disolvente (1:10, 1:20, 1:40). La extracción de las bayas aronia se estudió sin o con ayuda de ultrasonidos. En el caso de la asistencia de ultrasonido, la sonicación se aplicó en el modo continuo a la frecuencia de 30.8 kHz y la potencia de 100 W.	Hasta 85% de aumento de la producción de polifenoles extraídos	D'Alessandro et al. (2013)
Flores de caléndula, Corteza de acacia, Cáscaras de Granada y 4 flores de reloj Pollas peine.	Extracción efectiva colorante natural	Sonda ultrasónica (VCX 400, Sonics and Materials, EE.UU., 20 kHz y 400 W)	1 g de las muestras de plantas fue tomada y se añadió a 50 ml de agua tomada en el vaso de precipitados. El vaso de precipitados se cubrió con papel de aluminio para evitar la pérdida de disolvente por evaporación. La sonda ultrasónica se coloca en el vaso de precipitados y la potencia de ultrasonidos ajustado a 80 W. Puesto que la temperatura del baño ultrasónico elevar desde la temperatura ambiente 30n °C a 50 °C en 3 h tiempo, la temperatura se mantuvo a alrededor de 45 °C mediante el uso de un baño de agua sin ningún calentamiento externo.	Los resultados indican que hay una mejora significativa 13-100% en la eficiencia de la extracción del colorante obtenido a partir de materiales vegetales diferentes, debido a la utilización de ultrasonidos	Vivakumar et al. (2011)

Opuntia ficus-indica	Teñido de tejidos acrílicos modificados con indicaxantina	los experimentos se llevaron a cabo en un vaso de precipitados de vidrio con fondo plano equipado con un refrigerante	El limpiador ultrasónico generó una potencia máxima de 500 W ultrasónico y una frecuencia de 40 kHz. El valor óptimo de la energía sónica se obtuvo después de estudiar el efecto de la energía sónica en la capacidad de teñido de acrílico modificado. Así, en un baño de tinte que contiene 20 mg/L de indicaxantina colorante con una relación de licor de 50:1 y pH 3, modificada por la tela de acrílico se tiñó a 80 °C durante 30 min utilizando diferentes niveles de potencia de sonido (100-500 W).	Se concluye que el método de ultrasonidos mejora las propiedades de teñido de la tela de acrílico modificado teñido con colorante indicaxantina. El efecto de mejora en la absorción de colorante era de 49.62% más que el calentamiento convencional.	Guesmia <i>et al.</i> (2013)
Remolacha	La extracción de tinte natural de remolacha usando ultrasonido	Exsonda ultrasónica (VCX 400, Sonics and Materials, EE.UU., 20 kHz y W 0-400)	Basándose en los experimentos, se ha encontrado que una mezcla de 1:1 de etanol-agua con una potencia de 80 W ultrasonidos durante 3 h tiempo de contacto proporciona un mejor rendimiento y eficacia de la extracción	Considerable mejora de 8% de rendimiento de colorante se ha logrado con ultrasonido, 80 W en comparación con MS proceso tanto usando 1:1 de agua-etanol.	Venkatasubramanian <i>et al.</i> (2009)

En el caso de extracción de isoflavonoides a partir de soya Rostagno *et al.*, (2003), reportaron mejoras de extracción arriba del 15% y con cierta dependencia del solvente orgánico empleado. El mejoramiento en la extracción de compuestos debido al uso de Ultrasonificación se atribuye a la presión de las ondas propagadas que resultan en el fenómeno de cavitación. La elevada fuerza de cizalla incrementa la transferencia de masa de los extractantes debido a la implosión de las burbujas generadas que provocan macro turbulencia y la colisión de interpartículas a alta velocidad y a la perturbación en los micro poros de las partículas de la biomasa que acelera difusión por remolino y la interna (Jian-Bing *et al.*, 2006) Actualmente se considera que la extracción con ultrasonificación a nivel laboratorio tiene grandes beneficios; sin embargo, el escalamiento a nivel industrial es el mayor reto (Vilkhu *et al.*, 2008). La extracción de compuestos orgánicos de plantas o semillas puede mejorarse significativamente por el uso de ultrasonidos de alta potencia, como la energía generada colapsa burbujas proporciona una mayor penetración del disolvente en el material celular y mejora la transferencia de masa a y desde las interfaces (Knorr *et al.*, 2003). A mayores intensidades de ultrasonidos, los procesos de extracción aumentan la ruptura de las paredes celulares y la liberación de materiales celulares. Por otra parte, Balachandran *et al.* (2006) estudiaron el efecto de los ultrasonidos en la extracción supercrítica de jengibre. Por tal motivo, el ultrasonido ha traído el interés en la aplicación a la ciencia y tecnología de los procesos de extracción, por ejemplo, en los procesos de modificación de las propiedades, aportando beneficios en el tratamiento. Al ser una tecnología emergente, puede aplicarse para desarrollar procesos modernos como el estudio de efectos combinados, como es el empleo del ultrasonido junto con presión y temperatura. Este tipo de tratamiento fue empleado por Lopez *et al.* (1994), para estudiar el efecto de enzimas relevantes en la industria de alimentos como la lipoxigenasa, polifenoloxidasas y peroxidasas. Sin embargo, los efectos que producen los ultrasonidos de potencia sobre los medios en que se aplican influyen en los procesos de transferencia de materia en sistema sólido/líquido, esta influencia puede darse tanto en la parte del fluido (resistencia externa) como en la parte del sólido (resistencia interna). Por otra parte, la frecuencia más aplicada en la industria de los alimentos, está en el rango de 18 y 100 kHz de potencia, siendo 24 kHz la más efectiva para la inactivación enzimática y celular. Por tal motivo en la tabla 5 se presenta un análisis del efecto de la extracción asistida por ultrasonificación en grasas y proteínas por mencionar algunas.

Tabla 5. Análisis del efecto de la extracción asistida por ultrasonificación en grasas y proteínas.

MUESTRA	APLICACIÓN DE LA ULTRASONIFICACIÓN	EQUIPO	CONDICIONES	RENDIMIENTO	REFERENCIA
MICROALGA <i>Nannochloropsis oculata</i>	Extracción de aceite	Sistema de ultrasonido "Desmembrator 300 SONIC" y rotavapor Buchi 461.	Muestras de microalgas de 2.0 g liofilizadas (refrigerada con 15% de humedad y 0.408 mm de tamaño de poro) fueron pesadas para agregárseles 15 mL de metanol o ciclohexano, 5ml de cloroformo o isopropanol y una solución de cloruro de sodio NaCl (1% p/p). Seguidamente fueron agitadas en un vortex por 30 segundos para posteriormente ser llevadas a un equipo de ultrasonido que trabaja con una amplitud del 70% y lograr extraer el aceite a diferentes tiempos y midiendo la temperatura de extracción.	El mayor rendimiento fue alcanzado al usar la mezcla cloroformo metanol (35.55% \pm 2.05), pero se considera que tiene un efecto negativo en el medio ambiente y a la salud, por ello la mezcla ciclohexano-isopropanol mostró un rendimiento aceptable (31.49% \pm 0.11) siendo menos contaminante para el ambiente.	Campos <i>et al.</i> (2003)
MICROALGA <i>C. minutissima</i> , <i>T. fluviatilis</i> y <i>T. pseudonana</i> ,	Extracción de aceite	Exsonda ultrasónica (VCX 400, Sonics and Materials, EE.UU., 20 kHz y 0-400 W)	Mezcla de 1:10 de etanol-agua con una potencia de 80W ultrasonidos durante 2 h tiempo de contacto proporciona un mejor rendimiento y eficacia de la extracción	Los resultados mostraron un contenido en lípidos de 15.5% (% peso seco) de <i>C. minutissima</i> , 40.3% para <i>T. fluviatilis</i> y 39.5% para <i>T. pseudonana</i>	Neto <i>et al.</i> (2012)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Extracción de aceite	homogeneizador (U-TRON LAB / P, ESYNDMT, Corea) y ultrasonidos sonda (STH-1000S, Sonictopia, Corea)	Fueron utilizados. Velocidad de rotación del homogeneizador se fijó en 7000 rpm, y su potencia en 750 W. La frecuencia de la sonicador se fijó a 20 kHz. El homogeneizador de ultrasonidos y se conectaron con un enfriador. El volumen máximo de trabajo de cada reactor fue de 1L. Los dos reactores podrían ser utilizados por separado o en tándem. En el proceso de homogeneización / sonicación combinado, solución de muestra circula continuamente entre los dos reactores. Para los experimentos, 1, 20, y las concentraciones de 40 g/l de 500 ml se prepararon microalgas.	El metanol cloroformo, como se utilizó como un disolvente de recuperación de lípidos mejorado significativamente (237.5 mg de lípidos/g de células en 60 min tiempo de reacción) en relación con hexano (152 mg de lípidos/g de células en 60 min tiempo de reacción).	Ji <i>et al.</i> (2014)

<p>Lodos activados</p>	<p>Extracción de lipasas y proteasas</p>	<p>Ultrasonidos en la EDAR de Praga (República Checa): Sonotrodo desintegrador (Ecoson, República Checa). Ultrasonidos en la EDAR de Reus (España): desintegrador ultrasónico UP200S (Hielscher Ultrasonidos GmbH, Alemania).</p>	<p>Todos los experimentos se llevaron a cabo a la intensidad de 8 W/cm² de potencia, frecuencia de trabajo 20 kHz y tres veces diferentes de extracción (1, 5, 10 min) por duplicado. - Los experimentos se llevaron a cabo a la frecuencia de trabajo 24 kHz, la intensidad de potencia entre 3 y 7 y 4 veces W/cm² y diferentes de extracción de entre 1 y 60 min (por duplicado). La intensidad de la energía ultrasónica se calculó como la potencia ultrasónica suministrada al líquido (W) dividido por el área sumergida del sonotrodo en el líquido (cm²) para ambos casos.</p>	<p>Ultrasonidos permite reducir el tiempo de extracción de 10 min para la proteasa (usando 2% v/v Triton X100 obteniéndose 52.9 unidades/g de VSS) y de 20 min para la lipasa (sin ningún aditivo produciendo casi 21.4 unidades/g Solidos suspendidos),</p>	<p>Nabarlatz <i>et al.</i> (2010)</p>
<p>Germen de trigo desgrasada</p>	<p>Efecto sobre la estructura y preparación de péptidos inhibidores</p>	<p>Generador de ultrasonidos (Shangjia Biotecnología Co., Wuxi, China; Modelo GA92-II DB, frecuencia 20 kHz, la potencia máxima de 1800 W)</p>	<p>La sonicación se realizó en 20 kHz y en diferentes potencias (0, 200, 600, 1.000, 1.400 y 1.800 W) durante 10 min. Otro experimento sonicación se realizó mediante el tratamiento del mismo volumen de solución DWGP a 600 W (modo pulsado de sobre-tiempo de 2 s y fuera de tiempo 2 s) y en diferentes momentos (0, 5, 10, 20, 30 y 60 min).</p>	<p>La intensidad de la potencia de 191,1 tiempo W/cm² y Sonicación de 10 min en el reactor de bocina ultrasónica se considera como el estado de funcionamiento óptimo, sobre la base de la actividad inhibidora de la ECA de DWGP hidrolizado.</p>	<p>Zhou <i>et al.</i> (2013)</p>
<p>Aislados proteicos de Frijol negro</p>	<p>Efectos sobre la estructura y propiedades físicas de aislados de proteína de frijol</p>	<p>(VCX 400, Sonics and Materials, EE.UU., 20 kHz y W 0-400</p>	<p>El tratamiento ultrasónico con la sonda de 20 kHz en las salidas de potencia de 150, 300, y 450 W generado intensidades de ultrasonidos de 72-78, 96-104 y 112-120 W cm²</p>	<p>El tratamiento de ultrasonido de potencia media interrumpido en pequeños agregados de proteínas solubles por medio de fuerzas de cavitación que indujeron aumentos en la hidrofobicidad de la superficie y la solubilidad</p>	<p>Jiang <i>et al.</i> (2014)</p>

III. ANTECEDENTES

Rao *et al.* (2002), determinaron los factores que afectan al *Lactobacillus plantarum* durante la fermentación de los desechos de camarón para la producción de quitina y licor de proteína. Se utilizó de 5% de glucosa a los residuos. Se utilizaron ácidos probados para controlar el pH al principio y durante la fermentación, el ácido acético y el ácido cítrico demostraron ser los más eficientes logrando un 75% de desproteínización y un 86% desmineralización. Por otra parte, la sustitución de ácido acético por el ácido cítrico incrementó hasta un 88% la desproteínización y a 90% la desmineralización.

Cira *et al.* (2002), evaluaron el azúcar de caña, lactosa y suero de leche como fuentes de carbono en concentraciones de 10 y 20% (p/p base húmeda) en la fermentación láctica de desechos de camarón, así como niveles de inóculo de 5 y 10% (v/p base húmeda) con *Lactobacillus plantarum* se incubó a 30°C por 96 h. Las condiciones que presentaron un descenso más rápido del pH hasta un valor de 4.4 y una acidez total titulable (ATT) de 3.0% en 48 horas fueron 10% de azúcar de caña (p/p) y 5% de cultivo iniciador (v/p). Con estas condiciones se escaló a 2 kg en un reactor de fermentación sólida, determinándose a un tiempo de 6 días de fermentación, un contenido de desproteínización del 89.4 % y una descalcificación de 82.5%.

Bhaskar *et al.* (2006), realizaron fermentaciones de residuos de camarón con *Pediococcus acidolactici* CFR2182 con 5% (p/p) de inóculo (8.28 log UFC/mL), 15% (p/p) de glucosa y 72 h de incubación a 37 ± 1 °C, se observó una disminución del pH a 4.30 y la producción de quitina fue favorecida por una elevada desproteínización ($97.9 \pm 0.3\%$) y desmineralización ($72.5 \pm 1.5\%$).

Rao *et al.* (2005), fermentaron cabezas de camarones y caparacho (caparazón) con *Lactobacillus plantarum* 541 en reactores de tambor con un volumen interno de 3 dm³. Al fermentar estos sustratos por separado, se obtuvo un rendimiento de quitina cruda de 4.5% en cabezas de camarón y 13% en caparazón, una desmineralización del 88 y 63%, así como una desproteínización del 83 y 66% para tales sustratos. En ambos casos el licor obtenido fue de buena calidad por su elevado contenido de aminoácidos esenciales, por lo que se puede utilizar para la producción de proteína

en polvo. La quitina cruda se refinó y convirtió en quitosano utilizando NaOH 12.5 M.

Castelán *et al.* (2005), evaluaron proteasas comerciales como alcalasa, neutrasa y protamex en la desproteización de desechos de camarón, y en quitina cruda. La enzima protamex arrojó los resultados más altos de desproteización (relación sustrato: enzima (S:E) 0.2, 40 °C, pH 6, 180 rpm), alcanzando un valor de 6.63 mg/g de proteína soluble a las 3 h del tratamiento. Obteniendo contenidos de desproteización (DP) de 87, 89 y 82% con S:E 1, 100 y 1000, respectivamente. Por otra parte, se analizaron los productos obtenidos del escalamiento del proceso de fermentación realizadas a escalas de 500 kg, obteniendo un contenido de desmineralización de 74.85% y de desproteización de 78.2%.

Enríquez *et al.* (2010), evaluaron distintas concentraciones de melaza en la fermentación en medio sólido en cabezas de camarón de la especie *L. vannamei* a 20% (p/p) alcanzando un pH de hasta 4.7 y una ATT de 0.52 mmol/g. Se observó un pH final de 5 y la mayor desproteización de 78 % y 85 % en los reactores de tambor rotatorio (TR) y columna estática (CE) respectivamente. Los resultados indicaron diferencias en la DP ($P < 0.05$) en el TR (79%) y CE (84%), donde este parámetro resultó más alto en el CE. Debido a que el pH no disminuyó a menos de 5 se redujo la cantidad de melaza, usando una mezcla de 5% azúcar de caña (p/p) y 10% melaza (p/p). La quitina fue caracterizada por su espectro de infrarrojo observándose las bandas características en la α -quitina.

Barreto-Cardoso *et al.* (2001), investigaron los efectos del pre-tratamiento de la quitina, se empleó un sonicador en modo intermitente con la duración de pulso ajustado a 0.5 por segundo. La sonicación de la quitina mejoró la homogeneidad global y aumentó la superficie de las partículas y la mejora de la accesibilidad de los reactivos. El pre-sonicado de la quitina comercial no purificada produjo una desacetilación más eficiente (hasta un 95%) que la quitina comercial (88%), probablemente debido a la acción mecánica del ultrasonido desde la agitación de quitina sólida, mientras que en suspensión en agua caliente y fría durante una hora también se mejoró la eficiencia de desacetilación.

Kubo *et al.* (1993), estudiaron la depolimerización de hialuronano de alto peso molecular por Sonicación (M_r 400000) obtenido a partir del cordón umbilical humano, el cual fue depolimerizado por sonicación, durante 10 h, formando moléculas pequeñas de tamaño constante (M_r 11000), cuyo tamaño molecular fue inalterado por procesos de sonicación subsecuentes. El método de sonicación se realizó utilizando cinco mililitros de una solución de ácido hialurónico (HA) en agua destilada [5mg/mL]. La Sonicación se realizó a 20kHz y 7.5 W. Después de la sonicación, la muestra de HA se controló por cromatografía líquida de alta presión (HPLC por sus siglas en inglés). Después de la sonicación, los residuos de azúcar reductores y no reductores, contenían NAG (86%) y ácido glucurónico (98%) respectivamente. Los derivados de hialuronano de peine de gallo ($M_r \times 10^6$) y de *Streptococcus zooepidemicus* ($M_r 1.2 \times 10^6$) se depolimerizaron en moléculas de diferentes tamaños características por sonicación.

IV. JUSTIFICACIÓN

Las cantidades crecientes de desechos provenientes del procesamiento de camarón, se han convertido en una gran preocupación para las plantas procesadoras en el país. Debido al incremento en la explotación de mariscos en la última década se ha aumentado también la cantidad de desechos, estos desperdicios generan gran contaminación en los lugares donde se explota. Tan solo los desechos sólidos generados a partir del procesamiento del camarón representan una carga orgánica diez veces mayor que la que aportan los desperdicios domésticos. 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, cuya tasa media de crecimiento anual de la producción en los últimos 10 años es de 0.15% y se capturaran alrededor de 127,517 toneladas camarón de acuerdo a cifras del Anuario Estadístico 2013 de la Comisión Nacional de Pesca y Acuacultura (CONAPESCA). 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 para alimentación animal, y casi en su totalidad es desechado ocasionando serios problemas ecológicos; convirtiéndose en una gran preocupación para las plantas procesadoras en el país. Estos residuos tienen un contenido de quitina de 13.1-23.2%, siendo este la principal fuente comercial de quitina a pesar de su amplia distribución en la naturaleza (cangrejo, langostino, jaiba, pluma de calamar, hongos e insectos). Por tal motivo, el interés comercial de la purificación de la quitina y sus derivados por la necesidad de tener sustratos económicos. Por referencia se sabe que la quitina se encuentra en elevada concentración en insectos, siendo ésta una nueva fuente de explotación. Debido a la similitud en el contenido de quitina en exoesqueletos de crustáceos en comparación con los insectos sobre todo con los considerados plaga (chapulín 5-12%, cucarachas 2-18% y escarabajos de 27-35%) (CYTED, 2012), se decidió realizar un estudio sobre la implementación de fermentaciones ácido lácticas, hidrolisis químicos y ondas sonoras de alta frecuencia en una fuente quitinosa poco reportada como el “Chapulín”. Esta fuente en particular en el estado de Oaxaca es considerada como una plaga, sus infestaciones pueden llegar a ser

de 30 chapulines/m² o mas (Rios *et al.*, 2004) en los cultivos de maíz, frijol, soya y alfalfa, donde la población en diferentes municipios o localidades todos los días comienzan la cosecha entre 400-500 ha, lo que facilita la captura debido a la disminución del metabolismo de los insectos a temperaturas más frías. Permitiendo a cada familia de la localidad obtener alrededor de 50-70 kg de saltamontes semanal. Se estima que al menos se extraen 75-100 toneladas (peso fresco) por año en este valle. Por otra parte, más de 200 familias del sector rural en la región proveen durante un año casi cinco toneladas de chapulín a la única industria alimentaria de la zona, en donde se le da valor de agregado a este tipo de producción orgánica (SAGARPA, 2011). Sin embargo, la demanda nacional es baja con respecto a la producción, por lo que las ventas son lentas quedando material sin aprovecharse. Por tal motivo, esta investigación consta de tres partes importantes: la primera consiste en establecer nuevas fuentes de quitina, la segunda consiste en la implementación de un método físico para la obtención y purificación de quitina, como el ultrasonido, que sea amigable con el ambiente en el sentido de que permita emplear menos ácidos y se reduzca la cantidad de agua de lavado entre cada paso de purificación, lo anterior en virtud de los beneficios aportados por dicho método para lograr la reducción de tamaño, desproteínización, posible despigmentación y desmineralización inherentes, debido a la asociación entre proteína-minerales-pigmentos observada en la quitina. Por último, como alternativa, se estudió el proceso biológico para la extracción de quitina por fermentación en medio sólido para la desproteínización y desmineralización del material obteniéndose quitina como producto final. Este es un proceso amigable con el medio ambiente comparado con los métodos de preservación que involucran ácidos o bases, que son ecológicamente agresivos y económicamente inviables. Para este propósito se evaluaron mediante los perfiles hidrolíticos, las diferencias en los modos de acción de un mismo tipo de enzimas sobre substratos similares en cuanto a solubilidad, grado de desacetilación y peso molecular. Este proyecto propone un proceso limpio, para la obtención de quitina a partir de residuos marinos e insectos; utilizando la ultrasonificación y tratamientos biológicos como la depolimerización.

V. HIPOTESIS

La purificación química, física y biológica de quitina en exoesqueletos de crustáceos e insectos mejorará con el pre-tratamiento mediante fermentación sólida utilizando bacterias ácido-lácticas.

VI. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVOS GENERAL

Evaluar los métodos de purificación química, física y biológica de quitina de exoesqueletos de crustáceos e insectos, pre-tratados por fermentación sólida.

6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer las condiciones de la fermentación sólida utilizando dos fuentes de quitina (exoesqueletos de chapulín y camarón) y tres cepas de bacterias ácido lácticas comerciales (*L. plantarum*, *L. acidophilus* y *L. rhamnosus*).
2. Determinar las propiedades fisicoquímicas (pH, acidez total titulable, contenido de humedad y cenizas) durante la fermentación en medio sólido.
3. Evaluar el crecimiento de las bacterias ácido lácticas comerciales (*L. plantarum*, *L. acidophilus*, y *L. rhamnosus*) con respecto a la acidificación de los ensilados.
4. Evaluar la desproteínización (exoesqueletos de chapulín y camarón) utilizando una enzima comercial en las muestras pre-tratadas por fermentación en medio sólido.
5. Determinar los parámetros de operación de la ultrasonificación (amplitud, tiempo y temperatura) que permitan incrementar el grado de desproteínización en las muestras pre-tratadas por fermentación en medio sólido.
6. Evaluar dos tipos de solventes en el tratamiento por ultrasonido y determinar la relación polímero/solvente más adecuada, para incrementar el grado de pureza de la quitina (60%) y mejorar sus características estructurales y propiedades fisicoquímicas (solubilidad, peso molecular, grado de acetilación).

VII. ESTRATEGIA GENERAL DE TRABAJO

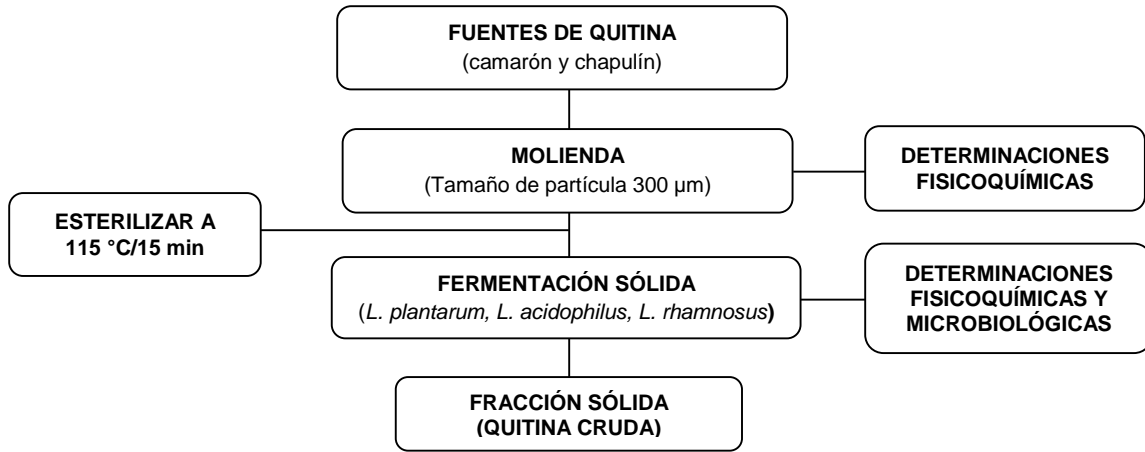


Fig. 4. Diagrama de bloques del proceso de obtención de quitina cruda por fermentación en medio sólido.

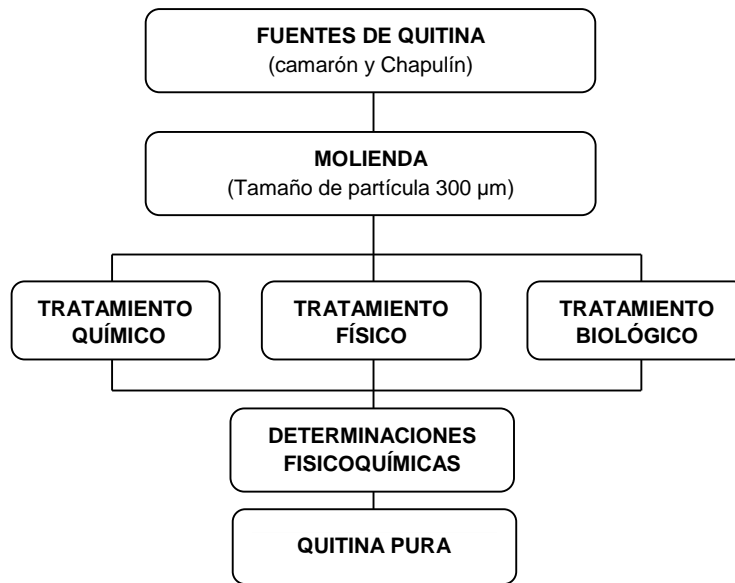


Fig. 5. Diagrama de bloques del proceso de purificación de quitina cruda por tratamiento químico, físico y biológico.



Fig. 6. Diagrama de bloques del proceso de purificación química, física y biológica de quitina pre-tratados por fermentación sólida.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO

8.1.1. MUESTRAS

Para la realización de este proyecto se utilizaron dos muestras, la primera son exoesqueletos de chapulín (*Sphenarium purpurascens*) que fueron adquiridos muertos con un proceso especial de conservación en la comunidad de Ocotlán en la ciudad de Oaxaca y la segunda fueron desechos de camarón, obtenidos en la ciudad y puerto de Alvarado en el estado de Veracruz. Estas muestras se secaron a 55 °C por 12 h en un horno (Scorpion scientific®, A62060, USA), se redujeron de tamaño de partícula en un molino (ProctorSilex®, 72500RY, Japón) y tamizaron en un tamiz No. 50 (Test Sieve®, 090233332, Alemania) a un tamaño de partícula de 300 µm.

8.1.2. FUENTE DE CARBONO

Se utilizó como fuente de carbono melaza de caña de azúcar (compuesta por 23.5% a 26.4% de agua y 48.5% a 53.5% de azúcares totales) obtenida del ingenio Adolfo López Mateos S. A. de C. V. de la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oax., adicionándose en una proporción de 18% (p/p) a los sustratos quitinosos (Ramírez-Ramírez *et al.*, 2009).

8.1.3. MICROORGANISMOS

Los microorganismos utilizados para la fermentación fueron 3 cepas de bacterias ácido lácticas comerciales (*L. plantarum* BG-112, *L. acidophilus* LA-3, y *L. rhamnosus* SP-1). Las cepas ácido lácticas se reactivaron en medio Man Rogosa Sharpe (MRS) incubándolas a 38 °C por 2.5 h en una incubadora (Felisa®, FE-132AD, México) para *L. plantarum*, 2.7 h para *L. rhamnosus* y 3.0 h para *L. acidophilus*, considerando el valor de μ_{max} de cada microorganismo para ser inoculadas posteriormente a cada uno de los desechos.

8.1.4. CONDICIONES DE FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO

Los desechos quitinosos molidos y tamizados se mezclaron con la melaza y esterilizaron, posteriormente, se inocularon al 5% (p/v base húmeda) con cepas

ácido lácticas reactivadas previamente. Se emplearon recipientes cilíndricos de 30 mL de llenado siguiendo el criterio geométrico y condiciones de fermentación establecidas por Ramírez-Ramírez (2009), resumidas en la tabla 6. Por último, se incubaron a 30 °C durante intervalos de tiempo de 24, 48, 74, 96 y 120 h.

Tabla 6. Dimensiones y cantidad de carga de los microensilados de camarón y chapulín.

MUESTRA	DIMENSIONES DEL FRASCO (cm)	ALTURA DE LLENADO (cm)	CANTIDAD DE MEZCLA (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

8.1.5. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

Se tomaron muestras por triplicado (3 a 5 g por determinación) a diferentes tiempos (0, 24, 48, 74, 96 y 120 h) de los microfermentados de exoesqueletos de chapulín y camarón para sus respectivos análisis: % humedad (H), actividad de agua (A_w), % cenizas, % acidez total titulable (ATT), potencial de hidrógeno (pH), % proteínas, análisis microbiológicos y análisis de color.

8.1.5.1. Determinación de pH y Acidez Total Titulable (ATT)

Las fracciones sólidas fueron diluidas en agua destilada en una proporción 1:10 y colocadas en parrilla con agitación magnética (marca: Coorning, modelo: PC-420D, USA) a 600 RPM. Para la medición del pH se utilizó un potenciómetro manual (marca: Hanna Instriments, Modelo: HI 98109, USA) e inmediatamente después se determinó la acidez total titulable (ATT) con NaOH 0.1N (AOAC, 2005).

8.1.5.2. Determinación de Humedad, Minerales y Proteínas

El contenido de humedad y cenizas, fue determinado empleando los métodos estándar (AOAC, 2005). La proteína en la parte sólida fue evaluada por el método microKjeldahl (AOAC, 2005) y para la proteína soluble se preparó una mezcla de los fermentados con agua destilada en una proporción 1:2 (Mackie, 1997). La mezcla obtenida fue homogenizada durante 1 minuto y enseguida se centrifugó a 15 000 rpm durante 15 min y una temperatura de 4 °C empleando una centrifuga

refrigerada (marca: Thermo Scientific, modelo: Allegra X-14, USA). Al sobrenadante obtenido se le determinó la concentración de proteína por el método de Bradford (Bio-Rad protein assay) (Bradford, 2005), para lo cual fueron tomadas las lecturas de absorbancias a una longitud de onda de 595 nm en un lector de microplacas (iMark Bio-Rad). Por último, los porcentajes de desmineralización (% DM) y desproteización (% DP) fueron calculados con 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, “ x_0 ” y “ x_f ” son el contenido inicial y final, “ s_0 ” y “ s_f ” el peso inicial y final de las muestras fermentadas (g) respectivamente.

8.1.5.3. Determinación de la Actividad del Agua (A_w)

La determinación de este parámetro se realizó con 5 g de muestra utilizando un medidor de actividad del agua portátil (marca: Decagon, modelo: PAwKIT, USA), el cual ofreció lecturas con exactitud de ± 0.02 en 5 minutos.

8.1.5.4. Determinación del Contenido de Humedad

Este análisis se realizó con 5 g de muestra utilizando un analizador de humedad de halógenos (marca: Ohaus, modelo: MB-35, USA) el cual tiene un rango de temperatura entre 50 y 160 °C, un ajuste de tiempo de operación y utiliza como fuente calorífica halógeno.

8.1.5.5. Análisis Microbiológico

Se estudió el crecimiento microbiano con respecto al tiempo de los ensilados. Para formar diluciones decimales, las muestras (1 g) fueron homogeneizadas en una solución salina isotónica al 0.09% de NaCl. El crecimiento microbiano fue determinado por conteo en placa de colonias creciendo en medios de agar para métodos estándar, eosina azul de metileno, MRS y agar papa dextrosa (PDA) para determinar mesófilos totales, coliformes totales, bacterias ácido lácticas (BAL) y cuenta total de hongos y levaduras, respectivamente (Shirai, 1999).

8.1.5.6. Análisis de Color

El análisis de color se realizó con un colorímetro ColorFlex EZ (marca: ColorFlex Hunter Lab®, model: DIFUSE, USA) leyendo con un iluminante de tipo C, obteniendo los factores H° , S^* y L^* del Modelo de color HSL (Grados Hue, Saturación and Luminosidad). Una vez calibrado el instrumento (placas de calibración y diagnóstico), las muestras previamente liofilizadas (Liofilizadora de consola Freezone plus 2.5 L, marca: Labconco®, modelo: 7751021, USA) se vertieron en la cámara y se procedió a la lectura para realizar las cartillas de colores tomando los valores medios. Posteriormente se analizaron los datos utilizando el programa estadístico MINITAB® versión 17.0 (2015) se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para verificar si las diferencias en color fueron estadísticamente significativas.

8.1.5.7. 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/h m²). 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 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).

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

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

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

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

Dónde: “ $\%ATT_{MAX}$ ” 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); “X₀” 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 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.

8.2. PURIFICACIÓN DE QUITINA

8.2.1. TRATAMIENTO QUÍMICO

8.2.1.1. Desproteínización química (Hidrólisis alcalina)

Se realizó en vasos de precipitado de 2.0 L con una solución acuosa de hidróxido de sodio (NaOH) 0.4 M, con una relación 1/15 (p/v) y agitación constante de 1000 rpm durante 1 h a una temperatura de 25 °C. Al término, la muestra sólida se lavó con agua corriente hasta la neutralidad (Cira *et al.*, 2002).

8.2.1.2. Desmineralización química (Hidrólisis Ácida)

Esta se efectuó en vasos de precipitado de 2.0 L conteniendo una solución de ácido clorhídrico (HCl) a 0.6 N en una relación (1/15) (p/v) y agitación constante de 1000 rpm durante 3 h. Una vez concluida se lavó con agua corriente hasta la neutralidad conforme a las condiciones determinadas por Cira *et al.* (2002).

8.2.1.3. Despigmentación química

Se realizó empleando un doble blanqueado, el cual consistió en resuspender los residuos desproteínizados y desmineralizados (utilizando matraces de 2.0 L) en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 38%, bajo agitación constante (1000 rpm) a temperatura ambiente durante 20 min. Al término del primer blanqueado, las muestras fueron filtradas y resuspendidas por segunda vez en hipoclorito bajo las condiciones antes descritas. Las muestras resultantes se lavaron hasta llegar a neutralidad y se secaron a 35 °C durante 24 h (Horno, marca: Felisa[®], modelo: FE-132AD, México).

8.2.1.4. Análisis de las Muestras

Se tomaron muestras de 0.15, 3.0 y 5.0 g de los exoesqueletos de camarón y chapulín, provenientes de las diferentes etapas de purificación: desproteínización,

desmineralización y despigmentación, para sus respectivos análisis de proteínas (Kjeldahl), minerales (Cenizas) y determinación de color (Colorímetro ColorFlex EZ, marca: ColorFlex Hunter Lab®, model: DIFUSE, USA).

8.2.2. TRATAMIENTO FÍSICO

Este método consistió de dos partes: primeramente, las muestras de quitina reducidas en tamaño (300 μm), se sonicaron usando agua como disolvente. Como segunda parte se sonicaron las muestras utilizando como disolvente un sistema bifásico formado por polietilenglicol (PEG) y tetraborato de potasio ($\text{K}_2\text{B}_4\text{O}_7$). La concentración de PEG y ($\text{K}_2\text{B}_4\text{O}_7$) para cada una de las fases fue seleccionada con base en particiones reportadas (Bhalchandra *et al.*, 2008). En ambas muestras se utilizó una relación 1:20 (p/v) de quitina:disolvente, en vasos de precipitado de 100 mL con un volumen de reacción de 84.82 cm^3 ; donde se aplicaron ondas ultrasónicas a una frecuencia de 20 kHz y 750 W (Ultrasonicador, Ultrasonic Processor®, modelo: 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.

8.2.2.1. Análisis de las muestras

Las muestras provenientes de cada tiempo de sonicación con cada solvente probado, fueron centrifugadas a 5000 rpm por 15 min y una temperatura de 4 °C empleando una centrifuga refrigerada (marca: Thermo Scientific, modelo: Allegra X-14, USA). Enseguida al sobrenadante (fracción líquida) se le determinó proteína soluble mediante el método de Bradford (Bio-Rad protein assay) descrito anteriormente. El precipitado (fracción sólida) fue liofilizado (Liofilizadora de consola Freezone plus 2.5 L, marca: Labconco®, modelo: 7751021, USA) a una temperatura de -49°C y un vacío de 0.035 mBar durante 12 h. Posteriormente, se le determinó contenido de proteínas (Kjeldahl), minerales (Cenizas) acordes a los métodos estándar (AOAC, 1990) y color (Colorimetría Hunter Lab). Para las muestras disueltas en las mezclas de PEG- $\text{K}_2\text{B}_4\text{O}_7$ exclusivamente se determinó proteína soluble en la fracción líquida.

8.2.3. TRATAMIENTO ENZIMÁTICO

8.2.3.1. Desproteínización enzimática

Se utilizó la enzima comercial Alcalase® 2.4L (Subtilisina A de *Bacillus licheniformis* SIGMA-ALDRICH, USA), probando diferentes relaciones enzima:sustrato (1:1, 1:2, 1:5, 1:10) y suspendidas en buffer de fosfato de potasio 50 mM a pH 7.5. (Novozymes Corp.). La mezcla de reacción se incubó a una temperatura controlada de 70 °C, y una agitación de 150 rpm durante diferentes períodos de tiempo (5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150, 180, 210 240 y 300, 340, 400, min). La enzima se inactivó por calentamiento (≥ 90 °C, 3 min) y se centrifugó (10,000 rpm, 15 min, 4 ° C) (Gildberg y Stenberg, 2001). La fase líquida y sólida se separaron para su posterior análisis de proteína (Bio-Rad protein assay y método Kjeldahl).

8.2.3.2. Determinación de actividad proteolítica

La actividad proteolítica se determinó utilizando como sustrato caseína al 1% disuelta en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.5. La reacción se detuvo con una solución de ácido tricloro acético (ATC) al 5%. La cuantificación se realizó aplicando la ecuación 6.

$$U_{cas} = \left[\frac{(Abs\ muestra - Abs\ testigo)}{tiempo\ (min) * 0.001} \right] * Fd \quad (6)$$

Dónde: U_{cas} = Unidad de actividad caseinolítica, Fd = Factor de dilución. Una unidad de actividad enzimática se definió como “la cantidad de enzima que produce un cambio de 0.001 unidades/minuto a 280 nm en las condiciones descritas anteriormente” (Kunitz, 1946).

8.3. ESCALAMIENTO DE LA FERMENTACIÓN

Con las condiciones de fermentación previamente seleccionadas en los microensilados, el proceso se escaló en reactores con una capacidad de 1.5 kg. En el escalamiento se respetó el criterio geométrico y la escala alcanzada fue 50:1, realizándose el proceso por triplicado. El producto fermentado de cada reactor se destinó (aleatoriamente) a un tratamiento posterior diferente.

Tabla 7. Dimensiones y cantidad de carga de los ensilados de camarón y chapulín.

MUESTRA	DIMENSIONES DEL FRASCO (cm)	ALTURA DE LLENADO (cm)	CANTIDAD DE MEZCLA (g)	VOLUMEN OCUPADO (cm ³)	DENSIDAD APARENTE (g / cm ³)
Camarón	25 de alto y 12 de ancho	20	1,500	2,261.95	0.67
Chapulín	25 de alto y 12 de ancho	20	1,500	2,261.95	0.67

8.4 TRATAMIENTOS DE PURIFICACIÓN

Estos tratamientos fueron posteriores a la FMS, por lo que se mencionan como "métodos combinados".

8.4.1. TRATAMIENTO FÍSICO (ULTRASONICACIÓN)

Se realizó con una relación 1:20 (p/v) de quitina pretratada:disolvente (solución PEG-K₂B₄O₇ al 14%) a 30 °C por 120 min, empleando el mismo equipo de ultrasonido antes descrito y a una amplitud de 40%, en vasos de precipitado de 2000 mL con una capacidad de 0.1 kg de muestra.

8.4.2. TRATAMIENTO QUÍMICO

Se realizó en una relación 1:15 (p/v), en vasos de precipitado de 2000 mL con una capacidad de 0.13 kg de muestra (bajo las mismas condiciones que en la sección 6.2.1.).

8.4.3. TRATAMIENTO BIOLÓGICO (DESPROTEINIZACIÓN ENZIMÁTICA)

El proceso se efectuó en matraces de 2000 mL con una capacidad de 0.5 kg de muestra, empleando las condiciones de E:S (1:2) de la desproteínización enzimática previamente seleccionadas (40 °C, pH 6, 180 rpm y 300 min).

8.4.4. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

Se cuantificaron las proteínas (Método Kjeldahl) y los minerales (cenizas) en las muestras quitinosas resultantes de los diferentes tratamientos de purificación de los exoesqueletos de camarón y chapulín pretratados.

8.5. CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS QUITINOSAS RESULTANTES DE LOS TRATAMIENTOS DE PURIFICACIÓN

8.5.1. DETERMINACIÓN DE SOLUBLES

El contenido de solubles se determinó por diferencia de peso al disolver 0.5% (p/v) de muestra quitinosa en una solución de ácido acético 0.1 M y dejando en agitación a 200 rpm por 24 h, posteriormente fue filtrado y llevado a peso constante (Kasaai *et al.*, 2000).

8.5.2. DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR

El peso molecular se calculó determinando viscosidad intrínseca de soluciones de diferentes concentraciones de las muestras quitinosas, empleando como solvente una solución de ácido acético glacial (2%) y acetato de sodio (0.2 M). Los parámetros se determinaron empleando la ecuación 7 (Mark – Houwink-Sakurada) y las constantes determinadas a y k para el disolvente empleado (Pacheco, 2007; Mao *et al.*, 2007; Shrinivas *et al.*, 2005).

$$[\eta] = kPM^a \quad (7)$$

Dónde: $k = 1.38 \times 10^{-5}$ L/g; $a = 0.85$; PM = Peso Molecular

8.5.3. OBTENCIÓN DE ESPECTROS INFRARROJO (FTIR)

Se obtuvieron espectros infrarrojos de las muestras quitinosas resultantes de los tratamientos combinados utilizando como blanco la quitina comercial Sigma. Estas muestras fueron pulverizadas < 0.5 mm de diámetro y mezcladas con KBr a una relación 1:15, para obtener pastillas (160 mg). Estas fueron analizadas por espectroscopia de infrarrojo en un intervalo de 400-4000 cm^{-1} utilizando un espectrofotómetro e interferómetro con reflectancia total atenuada (Marca: Perkin Elmer, modelo: DYNASCAN spectrum 100, USA), obtenidos con una resolución de 4 cm^{-1} en un rango de 4000-515 cm^{-1} con un total de 16 barridos.

8.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para las muestras derivadas de los microensilados se llevó a cabo un diseño al azar variando en los experimentos el sustrato (camarón y chapulín), tipo de tratamiento

[FMS (microensilados), tratamiento químico, físico y biológico] y las variables de respuesta (porcentaje de humedad, cenizas, acidez, pH, proteínas y color). Por otra parte, el análisis estadístico aplicado en las muestras resultantes de los métodos combinados se llevó a cabo variando el tipo de tratamiento [FMS (escalamiento), FMS + Tratamiento Químico, FMS +Físico y FMS + Biológico] y las variables de respuesta (porcentaje de desproteínización y desmineralización). Se utilizó el programa MINITAB® Versión 17 (Minitab Inc., State College, Pennsylvania, USA, 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 ($P < 0.05$). Numerosos autores coinciden en afirmar que la prueba es apropiada para realizar comparaciones por pares, por lo que tiene una gran aceptación (Atil y Uver, 2001). La tabla 8 resume las variables de respuesta analizadas y los análisis estadísticos aplicados a éstas.

Tabla 8. Resumen de las variables de respuesta analizadas y los análisis estadísticos

FACTOR A (TRATAMIENTOS)	FACTOR B (SUSTRATO)	VARIABLES DE RESPUESTA	MÉTODO ESTADÍSTICO
FMS Microensilados	<ul style="list-style-type: none"> • Camarón • Chapulín 	<ul style="list-style-type: none"> • Humedad • Cenizas • Acidez • pH • Proteínas • Color 	<ul style="list-style-type: none"> • ANDEVA • Prueba de Tukey
Tratamiento Químico			
Tratamiento Físico			
Tratamiento Biológico			
FMS Escalamiento		<ul style="list-style-type: none"> % Desproteínización % Desmineralización 	
FMS + Tratamiento Químico			
FMS + Tratamiento Físico			
FMS + Tratamiento Biológico			

IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA PROXIMAL DE LOS SUSTRATOS

La FMS requiere la adición de carbohidratos altamente fermentables para facilitar la acción de las bacterias ácido lácticas, debido a que en el camarón y chapulín existen escasas cantidades de estos compuestos (Jay, 2000; Hall, 2002). Entre las fuentes de carbono, la melaza de caña de azúcar ha sido la más utilizada para este propósito en concentraciones desde 5 hasta 40% (Fagbenro y Jauncey 1998; Zahar *et al.*, 2002). El contenido de humedad de la melaza, empleada fue de $23.11 \pm 0.01\%$, cenizas de $9.51 \pm 0.02\%$, proteínas de $4.25 \pm 0.02\%$, pH 5.43 ± 0.01 y actividad de agua de 0.67 ± 0.01 . Por otra parte, el contenido de humedad del camarón y chapulín fue de 43.75 ± 0.01 y $21.28 \pm 0.03\%$, cenizas 14.8 ± 0.08 y $19.21 \pm 0.04\%$, proteínas de 49.72 ± 0.09 y 52.96 ± 0.01 , grasas 1.38 ± 0.01 y 8.77 ± 0.08 y a_w de 0.69 ± 0.04 y 8.77 ± 0.03 . Estos contenidos se encuentran por debajo de la media a los reportados por Cira (2000); Peniche (2006) y Kaya *et al.* (2015). Esto se debió a que las proteínas, minerales y contenido de grasas como componentes principales varía dependiendo de la especie, parte del organismo, estado de nutrición y ciclo reproductivo. Por otra parte, los factores que contribuyen significativamente a la rapidez de la fermentación es la gran disponibilidad de componentes mayores (proteínas, agua, grasas y cenizas) y azúcares fermentables (sacarosa, glucosa, fructosa y rafinosa) presentes en la melaza (Owens y Mendoza, 1985, Bozoglu *et al.*, 1996). Por tal motivo, es de gran importancia la composición química de la fuente de carbono, así como también el sustrato para lograr que la fermentación sea exitosa (Shirai *et al.*, 2001; Cira *et al.*, 2002; Vidotti *et al.*, 2002).

9.2. CARACTERIZACIÓN CUALITATIVA DE LOS ENSILADOS

En la tabla 9, se presentan las características físicas de los microensilados (camarón y chapulín) al cabo de cinco días de fermentación, donde se observó que el color de los microensilados de camarón fue más claro (café claro) en comparación con los provenientes del chapulín (café oscuro), debido al color natural de las especies y teniendo en cuenta la adición de la melaza. El olor indicó en los fermentados de camarón y chapulín los aromas “dulce-ácido con suave olor a camarón” y “ácido-ligeramente picante” para el chapulín, lo cual fue debido

principalmente al efecto enmascarante de la melaza residual y a la actividad del inóculo contribuyendo a la producción de compuestos aromáticos (diacetilo, acetaldehídos y monocarboxílicos) vía actividad proteolítica (Bulut *et al.*, 2005). Otro indicador fue la consistencia, la cual fue pastosa en ambos fermentados a pesar de que se observó presencia de líquido exudado y gas, la cantidad del líquido no fue suficiente para darles una consistencia más fluida.

Tabla 9. Características físicas de los microensilados elaborados con desechos de camarón y chapulín.

ENSILADO	OLOR	COLOR	CONSISTENCIA
Camarón	Dulce-Ácido con suave olor a Camarón	Marrón Claro	Pastosa con poco líquido en la base de la pasta
Chapulín	Ácido-Ligeramente Picante	Marrón Oscuro	Pastosa con poco líquido en la base de la pasta

9.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA PROXIMAL DE LOS MICROENSILADOS

A continuación, se presentan los valores de % humedad (H), actividad de agua (A_w), % cenizas, % acidez total titulable (ATT), pH y % proteínas a diferentes tiempos de fermentación (0, 24, 48, 74, 96 y 120 h) en los microfermentados de exoesqueletos de camarón y chapulín adicionados con 18% de melaza (p/p) y 5% (v/p) de *Lactobacillus plantarum* BG-112, *L. acidophilus* LA-3 y *L. rhamnosus* SP1.

En la figura 7, se observó que el contenido de humedad fue menor en los fermentados de camarón y chapulín a las 120 h de fermentación. La mayor disminución del contenido de humedad (con ambos sustratos) se obtuvo con *L. plantarum* BG-112 (43.024 y 13.18%) en comparación con *L. acidophilus* LA-3 (17.23% y 12.19%) y *L. rhamnosus* SP-1 (16.15 y 11.11%) respectivamente, presentando diferencias estadísticamente significativas para ambos sustratos ($P < 0.05$) (Anexo A-1).

Los resultados fueron mayores a los reportados por Fagbenro y Jauncey (1993) quienes obtuvieron valores de humedad de alrededor del 7.0% en fermentados de pescado (10 días) y superior al de Álamo *et al.* (2003), quienes obtuvieron 5.62% de humedad. Este efecto resultó de la porosidad de las partículas utilizadas y el contenido lipídico, evitando la pérdida de humedad, es decir, el agua más fuertemente ligada en las partículas de chapulín en comparación con el camarón. (Honorato *et al.*, 2005). Sin embargo, es importante mencionar que debido al elevado contenido humedad inicial (53.26 y 46.06%) de ambos microensilados y la porosidad del material, la pérdida de humedad es bastante alta al comienzo del proceso, formando canales para la circulación del aire, lo que facilita la pérdida de agua (evaporación). Por otra parte, estos resultados se relacionan también 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.

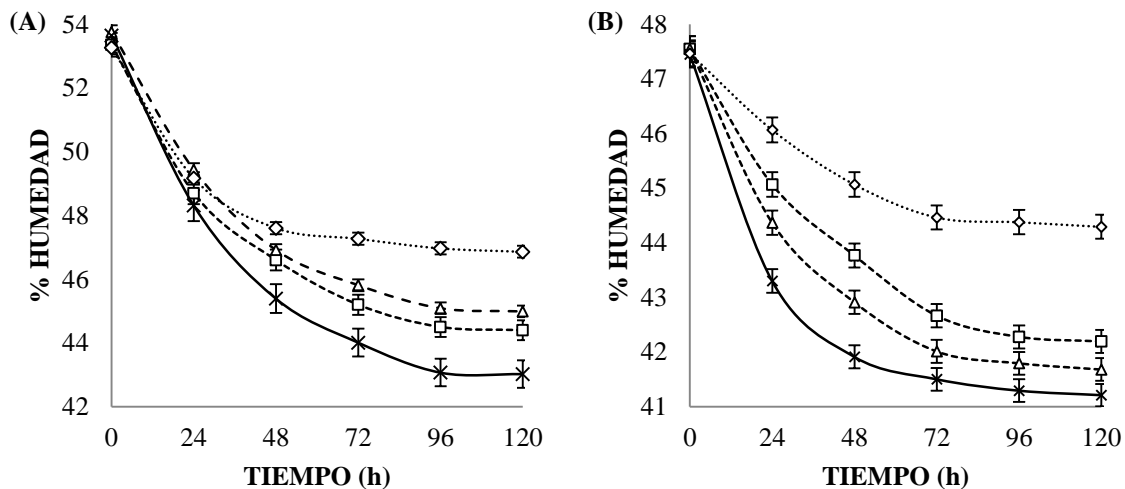


Fig. 7. Cambios del contenido de humedad durante la fermentación ácido láctica de exoesqueletos de camarón (A) y chapulín (B) utilizando (---□---) *L. rhamnosus* SP-1, (---△---) *L. acidophilus* LA-3 y (—*) *L. plantarum* BG-112 y (····◇····) control.

Por otra parte, en la figura 8 se observan las gráficas simuladas y experimentales de la pérdida de humedad empleando el modelo de Page ($R^2 > 0.98$), que fue capaz de predecir la pérdida de humedad ajustándose a los datos experimentales.

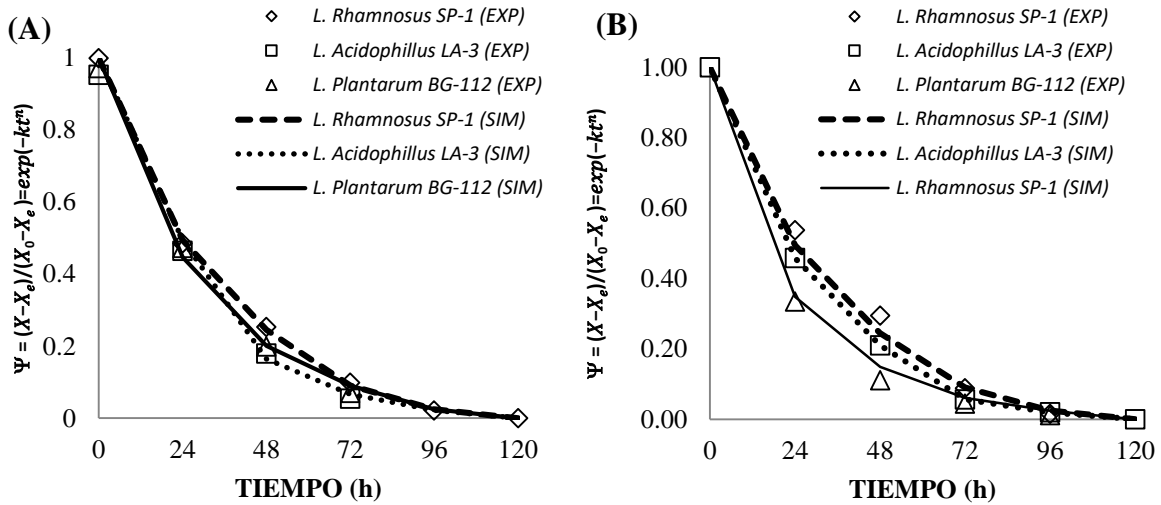


Fig. 8. Comparación de la curva simulada y los datos experimentales para la fermentación ácido láctica de exoesqueletos de camarón (A) y chapulín (B).

En la tabla 10 se encuentran los parámetros utilizados para el modelo de Page (K y n) y los coeficientes de determinación ($R^2 > 0.98$) (Anexo B-1) estos valores de los modelos fueron estimados en función de la temperatura del aire de la incubadora, de la naturaleza del producto y de las condiciones de la pérdida de humedad en el proceso (Misra y Brooker, 1980). También se observa que ambos sustratos presentaron una mayor velocidad de secado (R_c) de 7.99×10^{-3} y 6.60×10^{-3} g de agua/h m^2 utilizando la cepa *L. plantarum* BG-112 respectivamente, presentando diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) con respecto a las otras cepas y ambos sustratos (Anexo A-1).

Tabla 10. Parámetros del modelo de PAGE y coeficiente de determinación (R^2), calculados por regresión de los datos experimentales.

	CAMARÓN			CHAPULÍN		
	SP-1	LA-3	BG-112	SP-1	LA-3	BG-112
R^2	0.996	0.996	0.99	0.986	0.985	0.997
K	0.705	0.706	0.805	1.14	2.806	2.8
n	0.0009	0.0009	0.0009	0.0009	0.0009	0.0009
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}

En la figura 9 se observó la pérdida del contenido de cenizas en los microfermentados de camarón (A) y chapulín (B) a las 120 h de fermentación, ambos presentaron una mayor disminución del contenido de desmineralización (40.31% y 16.09%) con la cepa *L. plantarum* BG-112 en comparación con *L. acidophilus* LA-3 (37.719 y 14.32%) y *L. rhamnosus* SP-1 (34.48 y 13.56%) respectivamente, presentando diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) para ambos sustratos (Anexo A-2). Estos resultados están por encima de los valores reportados por Ramírez-Ramírez *et al.* (2001) quienes obtuvieron valores de contenidos de cenizas de 18.0% a los 96 días en desechos de pescado, en donde los minerales fueron de más fácil extracción.

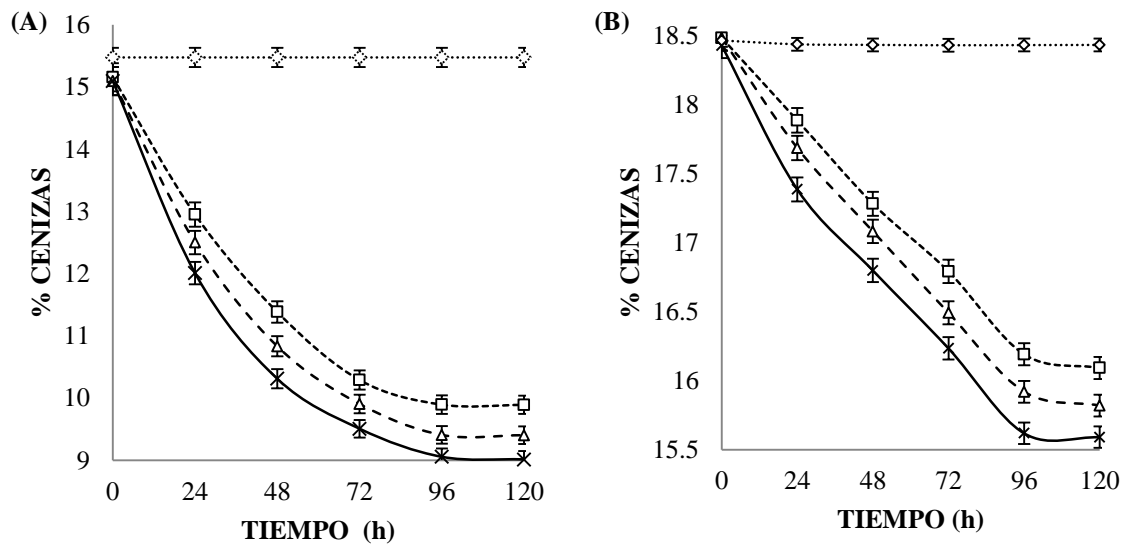


Fig.9. Desmineralización durante la fermentación ácido láctica de exoesqueletos de camarón (A) y chapulín (B) utilizando (--□--) *L. rhamnosus* SP-1, (--△--) *L. acidophilus* LA-3 y (—×—) *L. plantarum* BG-112 y (····) control.

Esto es derivado de la reacción química que ocurre en la fermentación láctica, donde una molécula de glucosa es convertida en dos moléculas de ácido láctico y en la desmineralización, 2 moléculas de ácido láctico reaccionan con una molécula de carbonato de calcio (Xu *et al.*, 2008), es decir, el ácido láctico producido durante la fermentación láctica reaccionó con los minerales de calcio, los cuales se encuentran unidos a la quitina, produciendo lactato de calcio.

Por otra parte, en la tabla 11 se encuentran los parámetros (a, b, c y t') y los coeficientes de determinación (R^2) que se ajustaron al modelo de regresión no lineal ($R^2 > 0.98$) (Anexo B-2).

Tabla 11. 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
R²	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	255.04	257.19	161.76

Una vez transcurridos los 5 días de fermentación, los microfermentados presentaron un aumento en la producción de ácido láctico y por lo tanto una disminución en el pH, lo cual fue observado cuando estos fueron analizados a los diferentes tiempos (figura 10). Las FMS de ambas fuentes quitinosas presentaron un aumento en el contenido de ATT (3.085 y 2.95%) y un mayor valor para t_L (54.34 y 64.41 h) con la cepa *L. plantarum* BG-112, en comparación con *L. acidophilus* LA-3 (2.75 y 2.42%) y (76.4552 y 102.542 h); y *L. rhamnosus* SP-1 (2.358 y 2.1%) y (131.784 y 102.542 h); presentando diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre ambos factores (Anexo A-3). Estas curvas fueron similares a las de una cinética de adsorción, en términos de los modelos ajustados al contenido ATT, por lo que se adecuó este parámetro al modelo de Langmuir ($R^2 > 0.99$).

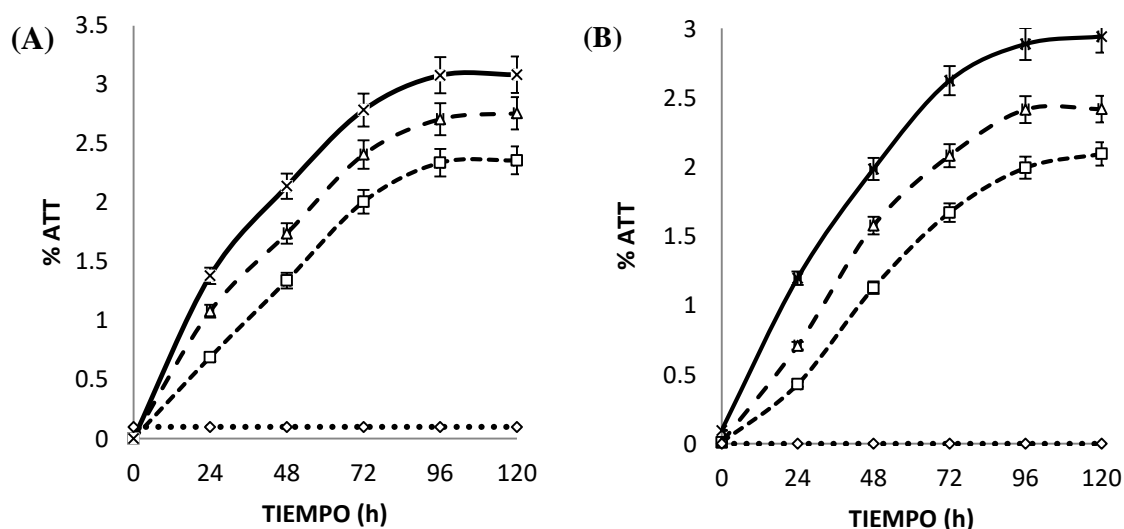


Fig. 10. Cuantificación de ácido láctico durante la fermentación de exoesqueletos de camarón (A) y chapulín (B) utilizando (---□---) *L. rhamnosus* SP-1, (---△---) *L. acidophilus* LA-3 y (—×—) *L. plantarum* BG-112 y (····◇····) control.

En la tabla 12 se presentan los parámetros contenido ATT_{MAX} , t_L y los coeficientes de determinación (R^2) indicando la relación entre el contenido del porcentaje de producción máxima de acidez total titulable y el tiempo (h) en donde se observa linealidad para el porcentaje ATT (Anexo B-3).

Tabla 12. 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

En la figura 11 se observó una mayor disminución en el pH con *Lactobacillus plantarum* BG-112 (49.48 y 36.39%) en comparación con *L. acidophilus* LA-3 (45.21 y 33.2%) y *L. rhamnosus* SP-1 (41.17 y 30.95%) presentando diferencias estadísticamente significativas entre ambos factores respectivamente ($P < 0.05$) (Anexo A-4). Los valores calculados durante las curvas de pH se ajustaron al modelo de regresión no lineal ($R^2 > 0.98$). En la tabla 13 se encuentran los parámetros (x , y , z y t') y los coeficientes de determinación (R^2) (Anexo B-4). 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* BG-112 empleando camarón, lo que indica que este sustrato fue más fácilmente asimilable para esta cepa.

Tabla 13. 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

Este descenso del pH y aumento de la acidez indicó 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 *et al.*, 2002; Rao *et al.*, 2000; Bajaj *et al.*, 2011).

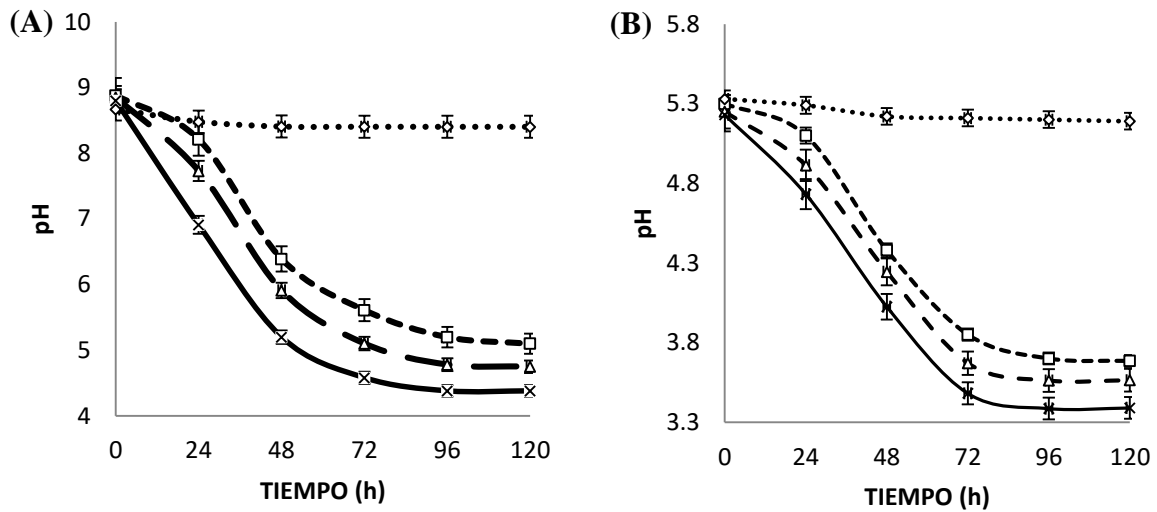


Fig. 11. Evolución del pH durante la fermentación de exoesqueletos de Camarón (A) y Chapulín (B) utilizando (--□--) *L. rhamnosus* SP-1, (--△--) *L. acidophilus* LA-3 y (*--*) *L. plantarum* BG-112 y (···◇···) control.

Por otro lado, 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 evidenciándose por el contenido de proteína soluble y remanente en la fracción líquida (figura 12) y sólida (figura 13) en los microfer-

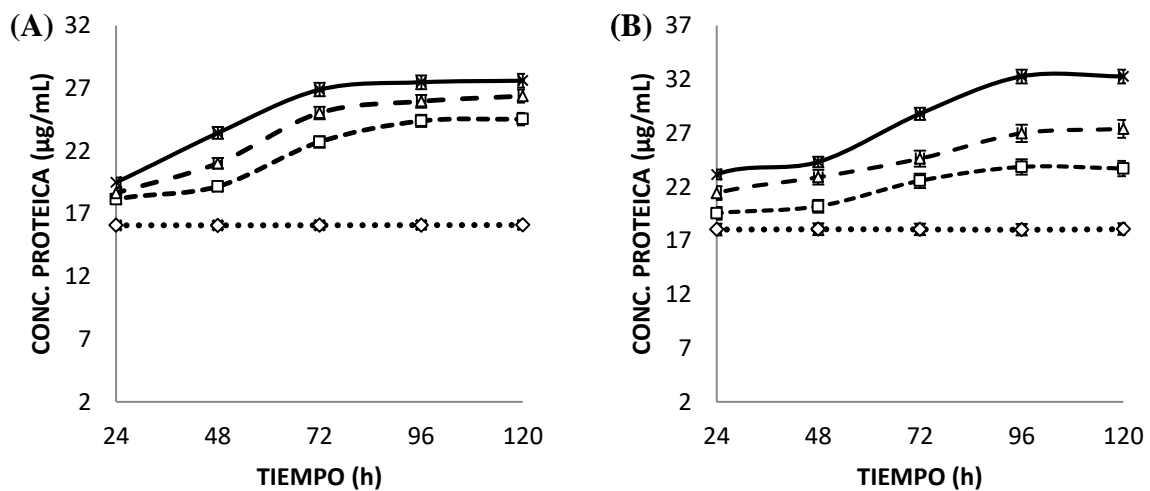


Fig. 12. Determinación de proteína soluble (en el sobrenadante) durante la fermentación de exoesqueletos de camarón (A) y chapulín (B) utilizando (--□--) *L. rhamnosus* SP-1, (--△--) *L. acidophilus* LA-3 y (*--*) *L. plantarum* BG-112 y (···◇···) control.

mentados 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) en comparación con *L. acidophilus* LA-3 (26.37 y 27.39 $\mu\text{g/mL}$ de proteína soluble) y por último el *L. rhamnosus* SP1 con (24.54 y 23.69 $\mu\text{g/mL}$ de proteína soluble) presentando diferencias estadísticamente significativas entre ambos factores respectivamente, ($P < 0.05$) (Anexo A-5).

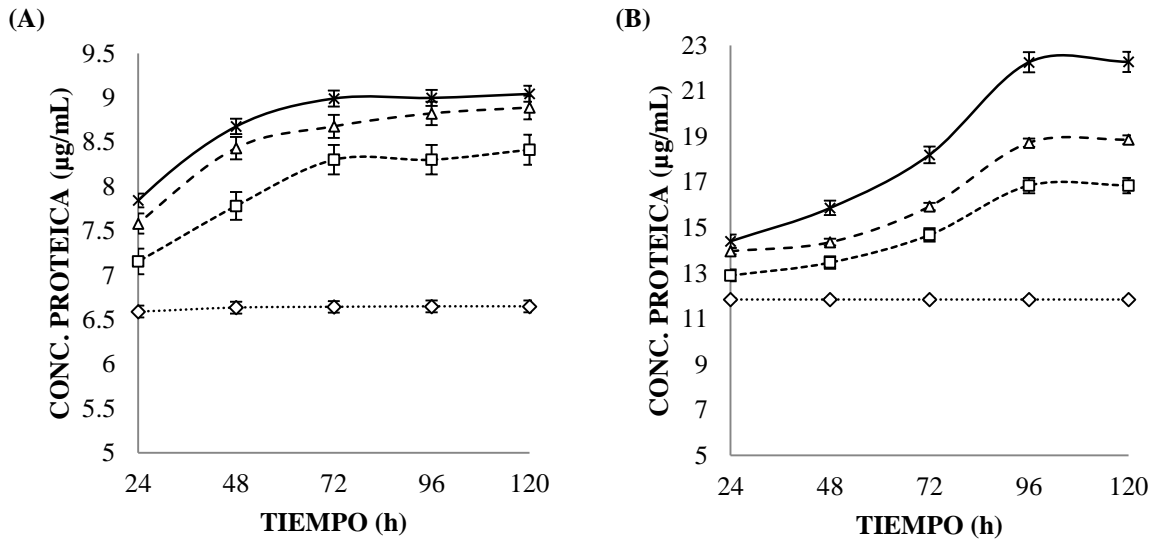


Fig. 13. Determinación de proteína remanente (fracción sólida) durante la fermentación de exoesqueletos de camarón (K) y chapulín (L) con (---□---) *L. rhamnosus* SP-1, (---△---) *L. acidophilus* LA-3 y (—×—) *L. plantarum* BG-112 y (····◇····) control.

Por otra parte, se determinó el contenido de proteínas del contenido inicial (0 h) y final (120 h) de los microfermentados con la cepa *L. plantarum* BG-112, por el método Kjeldahl (53.7321 ± 1.46 y $56.967 \pm 1.37\%$) y (36.3061 ± 0.26 y $38.9453 \pm 0.34\%$) respectivamente. Tal desproteínización se atribuyó a las enzimas presentes en los exoesqueletos de camarón y chapulín, las cuales actúan sobre las proteínas, provocando la hidrólisis y dando lugar a la producción de un lixiviado (Shirai *et al.*, 1999). Por lo tanto, 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 ambos microensilados el contenido 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 *et al.*, 2006; Bashkar *et al.*, 2007; Sini *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2008; Khanafari *et al.*, 2008; Sorokulova *et al.*, 2009).

En la tabla 14 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). 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. Este efecto inhibitorio se llevó a cabo por la producción de ácido láctico (Wahyuntari *et al.*, 2011) a partir de la fuente de carbono ocasionando con ello la estabilidad microbiológica de los microensilados y conservándolos durante más de 120 h.





Tabla 14.- Análisis microbiológicos en los microensilados 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	SP1	209×10^3	295×10^3	Ausente	Ausente
	LA3	234×10^3	276×10^3	Ausente	Ausente
	BG 112	279×10^3	595×10^3	Ausente	Ausente
	BLANCO	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Microensilados Chapulín	SP1	251×10^3	315×10^3	Ausente	Ausente
	LA3	268×10^3	395×10^3	Ausente	Ausente
	BG 112	285×10^3	517×10^3	Ausente	Ausente
	BLANCO	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Por último, en la tabla 15 se presenta el análisis colorimétrico en los microensilados de camarón y chapulín. El primero presentó un ligero aumento en la coloración representados con valores medios de $^{\circ}H$, S^* y L^* al inicio de la fermentación, catalogando el color como “naranja desaturado muy oscuro” (#421F0F) a “Naranja

muy oscuro” (#5F2C19), lo anterior se originó al proceso de fermentación, la 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 entre ambos factores ($P < 0.05$). Por otra parte, en los fermentados de chapulín se obtuvieron valores de H° , S^* y L^* , es decir, de “naranja muy oscuro (Tono café)” (#553D2A) a “naranja oscuro” (#EAEDEDE) respectivamente, estos valores presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) para ambos sustratos (Anexo A-6, A-7 y A-8).

Tabla 15. Análisis colorimétrico en los microensilados biológicos de los exoesqueletos de camarón y chapulín.¹

TIPO DE MUESTRA	TIEMPO (h)	COLORIMETRÍA			#COLOR	CARTILLA DE COLOR
		$^\circ H$	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 ($P < 0.05$)

En ambos casos, el oscurecimiento es atribuido al efecto de la fermentación, donde la desproteización de los residuos ocurrió 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 *et al.*, 2009).

9.4. PURIFICACIÓN QUÍMICA

En la tabla 16 se muestran los resultados obtenidos del contenido de proteínas (2.56 y 5.73%) y contenido de cenizas (2.86 y 1.57%) del camarón y chapulín, después de aplicar el método químico. Los contenidos de desproteización 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” (#E3A86B) a “muy pálido sobre todo blanco” (#FFF7F7), se presentaron diferencias estadísticamente significativas (P<0.05) para ambos sustratos entre los tiempos inicial y final. Por otra parte, en los exoesqueletos de chapulín se obtuvieron valores de H°, S* L*, es, de “naranja desaturado muy oscuro” (#553D2A) a “pálido grisáceo luz” (#EADEDE) presentando diferencias estadísticamente significativas (P<0.05) para ambos sustratos (Anexo A-9 al A-15).

Tabla 16. Contenidos de proteínas, cenizas y descripción del color obtenidos mediante el método químico en los exoesqueletos 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).

Cabe mencionar que no se encontró literatura científica en donde se pudieran constatar la evaluación del grado de despigmentación mediante el método colorimétrico Hunter Lab sobre muestras quitinosas purificadas por diversos

tratamientos. Esta despigmentación se asoció al fuerte efecto oxidante del hipoclorito de sodio. Como desventaja de la purificación química, se tiene el empleo de aproximadamente 31 L de agua por cada 50 g de material quitinoso procesado. Aspecto a considerar para validar el empleo de otros métodos de purificación (Gimeno *et al.*, 2007; Hernández *et al.*, 2008; Khanafari *et al.*, 2008; Pacheco *et al.*, 2009).

9.5. PURIFICACIÓN FÍSICA (ULTRASONICACIÓN)

En la figura 14 se muestran los resultados obtenidos aplicando ondas sonoras de alta frecuencia (ultrasonificación) a tres amplitudes durante 2 h para reducir el contenido de cenizas en exoesqueletos de camarón y chapulín. Después de 120 min se observó un incremento en el contenido de desmineralización 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, ($P < 0.05$) (Anexo A-16).

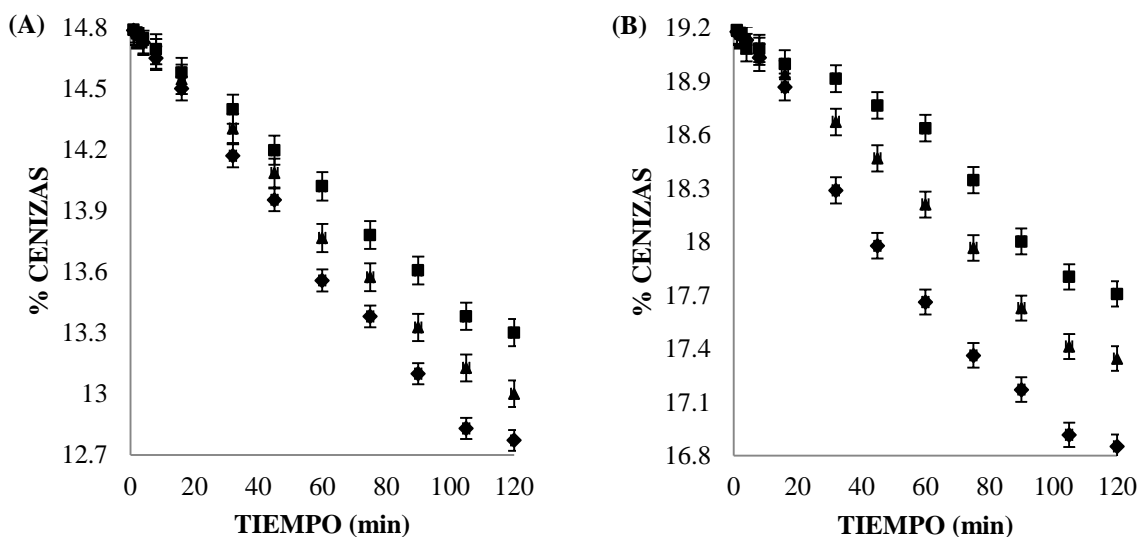


Fig. 14. Desmineralización con respecto al tiempo durante la sonicación a 30(■), 35(▲) y 40(◆) % de amplitud con frecuencia de 20 Khz a 750 W en mezclas de exoesqueletos de camarón (A) y chapulín (B) con agua al 5% (p/v) a 30 °C

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 *et al.*, 2005; Karki *et al.*, 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 J g⁻¹CaCO₃ (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. Por otra parte, en la figura 15 se observó que el empleo de la ultrasonificación influyó en la desproteínización, 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 otro lado, se determinó el porcentaje de proteínas del contenido inicial (0 h) (50.27 ± 2.51 y 51.93 ± 1.22%) y final (120 h) (17.80±1.26 y 20.19±1.34%) de los exoesqueletos de camarón y chapulín por el método Kjeldahl (AOAC, 2005) observándose los contenidos de desproteínización de 64.58 y 61.12% para los exoesqueletos de camarón y chapulín respectivamente.

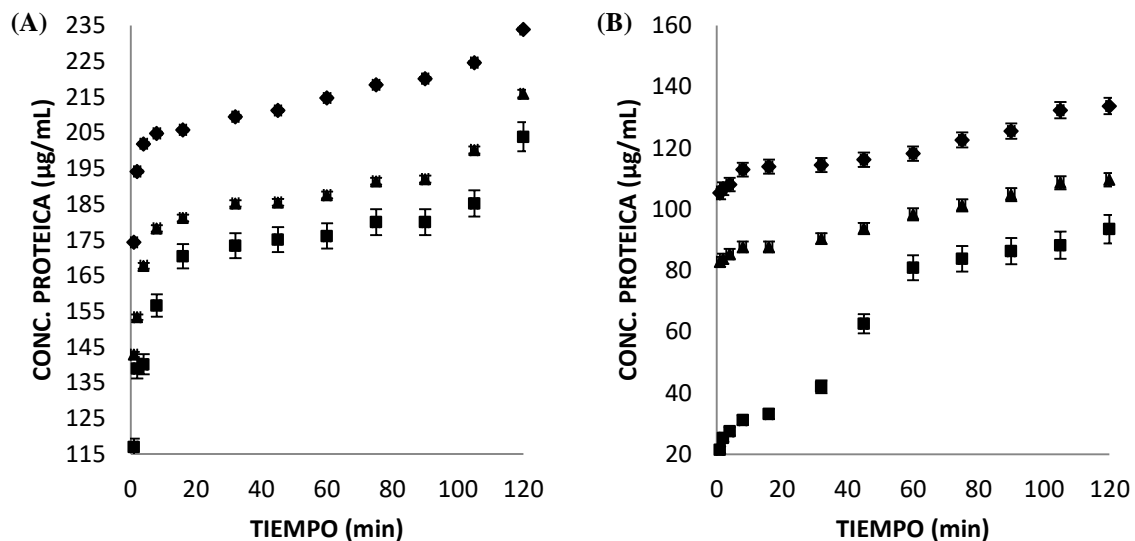






Fig.15. Determinación de proteína soluble con respecto al tiempo durante la sonicación a 30 (■), 35(▲) y 40% (◆) amplitud con frecuencia de 20 Khz a 750 W en mezclas de exoesqueletos de camarón (A) y chapulín (B) con agua al 5% (p/v) a 30 °C.

Esto fue debido al aumento de las ondas de alta frecuencia que ocasionaron condiciones severas en la producción de estados excitados originando el fenómeno de cavitación y en paralelo el rompimiento de las interacciones proteína- proteína

soluble tales como fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno, originando un aumento en la desproteinización y por consecuencia en la extracción de proteína soluble (Kohmei *et al.*, 1993; Knorr *et al.*, 2004; Mason *et al.*, 2007). En la tabla 17 se observa 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* 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 en su mayoría negro” (#320900) a “naranja muy oscuro” (#4D3F0F). Estos parámetros (ángulo Hue, saturación y luminosidad) presentaron diferencias estadísticamente significativas (P<0.05) (Anexo A-18 al A-20) para ambos sustratos.

Tabla 17. Descripción del color obtenido mediante el método ultrasonificación 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).

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 estructuras 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 *et al.*, 2008). En el caso del chapulín, antes del tratamiento ultrasónico, podría 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 especula que la pterina podría 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 *et al.*, 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.

9.6. PURIFICACIÓN ENZIMÁTICA

9.6.1. ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

Existen diferentes métodos para determinar la actividad de las enzimas proteolíticas, que utilizan proteínas y compuestos sintéticos como sustratos. Las proteasas tienen la capacidad de hidrolizar pequeñas moléculas sintéticas. Un método ampliamente utilizado se basa en el cambio en la solubilidad de una proteína en TCA (ácido tricloro acético) cuando se somete a la acción de una enzima proteolítica. Dos proteínas usadas comúnmente como estándares son la: caseína y hemoglobina desnaturalizadas. Cuando una enzima proteolítica actúa sobre la proteína, el promedio de péptidos solubles producidos está en proporción a la cantidad de enzima y el tiempo de acción (Whitaker, 1972). Acorde al modelo de Michaelis-Menten, cuando una enzima en su sitio catalítico se ha saturado con un sustrato, se puede evidenciar como un incremento lineal de la actividad respecto a cada concentración de sustrato probado, además en términos de velocidad de hidrólisis, esto se visualizaría en una gráfica de actividad enzimática vs tiempo,

como líneas rectas cuya pendiente se va incrementando, conforme la enzima se satura de sustrato. Lo anterior se evidenció en la figura 16, en donde la relación E:S

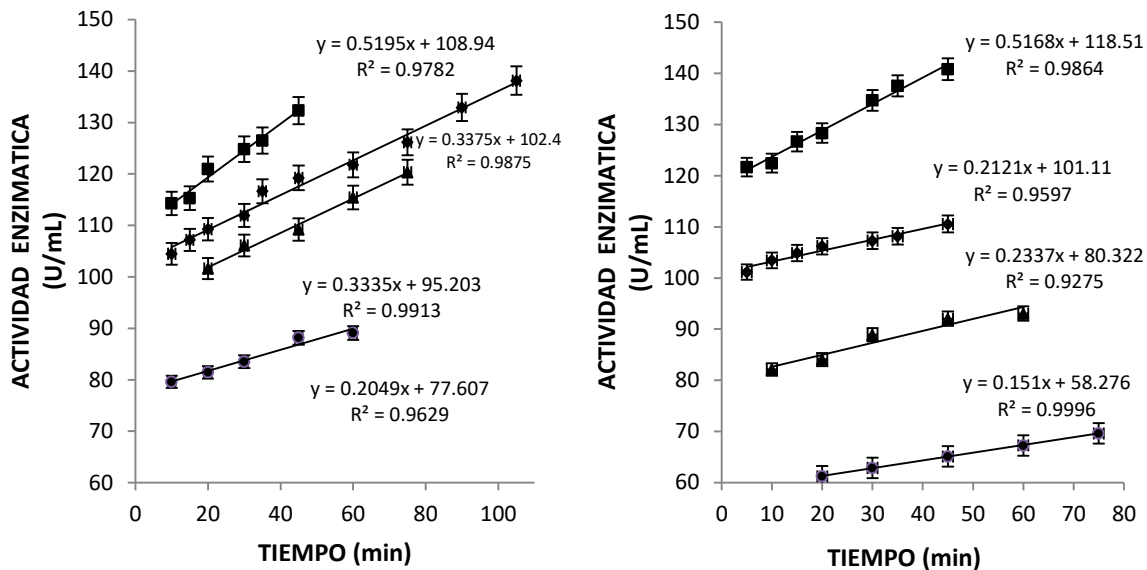


Fig. 16. Determinación de la relación Enzima:Sustrato con respecto al tiempo durante la hidrólisis proteica utilizando Alcalasa-exoesqueleto de camarón y chapulín 1:1 (♦), 1:2(■), 1:5 (▲), 1:10(●) a 70 °C

que produjo una mayor pendiente, es decir una mayor velocidad de hidrólisis, es la relación 1:2, fue válido para ambos sustratos quitinosos. La máxima actividad se presentó con la relación enzima-sustrato 1:2 con valores de pendientes de 0.5195 y 0.5168 mientras que la menor actividad estimada en este ensayo fue con la relación 1:10 con valores de pendientes mínimos de 0.2049 y 0.1511 en muestras de camarón y chapulín respectivamente.

9.6.2. DESPROTEINIZACIÓN ENZIMÁTICA

El efecto de desproteización de la enzima comercial Alcalasa® (endoproteinasa Subtilisina A de *Bacillus licheniformis*, Sigma-Aldrich), se evidenció por el contenido de proteína soluble en los hidrolizados de exoesqueletos de camarón y chapulín respectivamente (figura 17), obteniéndose una máxima actividad proteica con una relación E:S 1:2 (189.01 y 163.08 µg/mL de proteína soluble). Por otra parte, los resultados de este ensayo arrojaron los porcentajes de proteína residual después del hidrólisis. La enzima comercial Alcalase® en una concentración del 1:2 presentó a los 205 min de reacción la mayor actividad proteolítica, conteniendo solamente 10.5 ± 0.28 y $7.10 \pm 0.35\%$ de proteína presente en las muestras, lo que lleva a un

80.45 y 78.71% de desproteínización en exoesqueletos de camarón y chapulín, recordando que el contenido inicial de proteína fue de 53.7321 ± 0.01 y $56.967 \pm 0.03\%$.

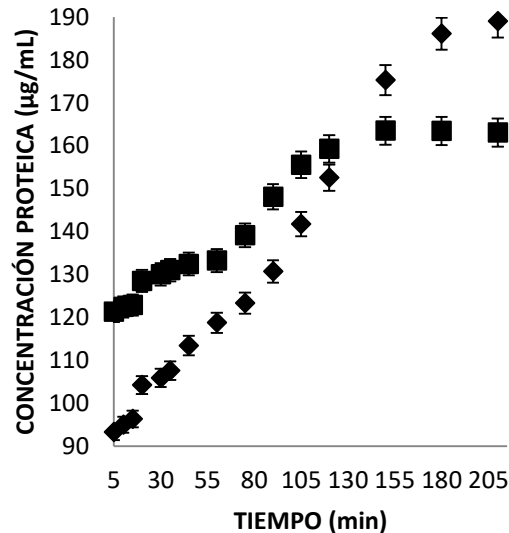


Fig. 17. Determinación de proteína soluble con respecto al tiempo durante la hidrólisis proteica utilizando Alcalasa-exoesqueletos de camarón (♦) y chapulín (■).

9.7. ESCALAMIENTO DEL PROCESO FERMENTATIVO

9.7.1. PRETRATAMIENTO POR FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO

Con el pretratamiento biológico (fermentación en medio sólido en presencia de BAL), se observó una desproteínización (23.204 ± 0.08 y $27.8871 \pm 0.16\%$ de proteína residual) y desmineralización (7.135 ± 0.04 y $7.130 \pm 0.02\%$ de cenizas residual), con los sustratos de exoesqueletos de camarón y chapulín respectivamente. Obteniéndose un mayor contenido de desproteínización y desmineralización con el sustrato de exoesqueletos de camarón de 56.08 y 51.79% en comparación con el de chapulín de 51.05 y 47.77% respectivamente (figura 18). De igual importancia, estos contenidos disminuyeron 13.102 y 1.875% en comparación con los contenidos residuales de proteína y minerales de los microensilados de camarón y chapulín respectivamente. No obstante, estos valores fueron 25% más bajos que los reportados por Cira *et al.* (2002) y Pacheco *et al.* (2009) con respecto al empleo del camarón en estas fermentaciones. Por último, se realizó un análisis estadístico para evaluar si con los resultados del %DP y %DM

eran significativamente diferentes entre los dos sustratos ($P < 0.05$) (Anexo A-21 al A-22), este análisis mostró que, si hubo diferencia significativa, la diferencia puede deberse a que la composición química varía entre las especies y la naturaleza de los complejos quitina-proteína.

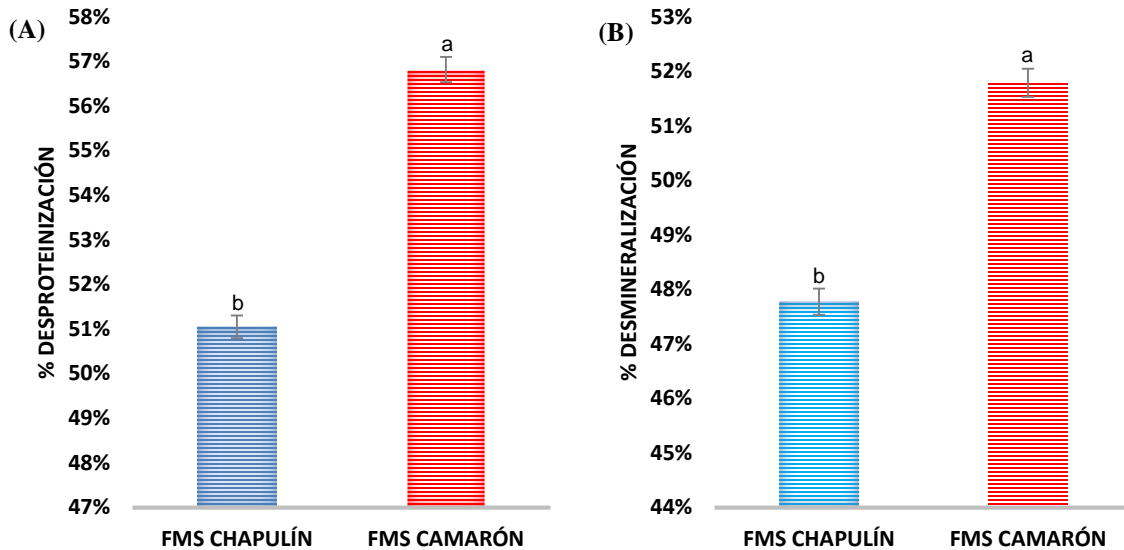


Fig. 18. Desproteinización (A) y desmineralización (B) durante la fermentación en medio sólido de exoesqueletos de camarón (■) y chapulín (■).

^{a,b}Las medias en las columnas que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

9.7.2. TRATAMIENTO COMBINADO DE FMS-ULTRASONICACIÓN

En la combinación de la FMS-Ultrasonificación (figura 19), se obtuvo un contenido de proteína residual de 8.156 ± 0.09 y $10.186 \pm 0.09\%$ y un contenido de cenizas residual de 3.05 ± 0.49 y $4.53 \pm 0.43\%$ con los sustratos de exoesqueletos de camarón y chapulín respectivamente. Existiendo un aumento de 31.07 y 28% de desproteinización; y un 28.61 y 27.6% de desmineralización respectivamente en comparación con los tratamientos de FMS, y existiendo también un aumento de 68.98 y 63.99% de desproteinización; y un 65.66 y 64.2% de desmineralización en comparación con el tratamiento de ultrasonificación. Se alcanzó un mayor contenido de desproteinización y desmineralización con el sustrato de exoesqueletos de camarón de 84.82 y 82.12% en comparación con el de chapulín de 76.38 y 79.39% respectivamente. Se encontró diferencia significativa entre estos dos sustratos y tratamientos ($P < 0.05$) (Anexo A-23 al A-24).

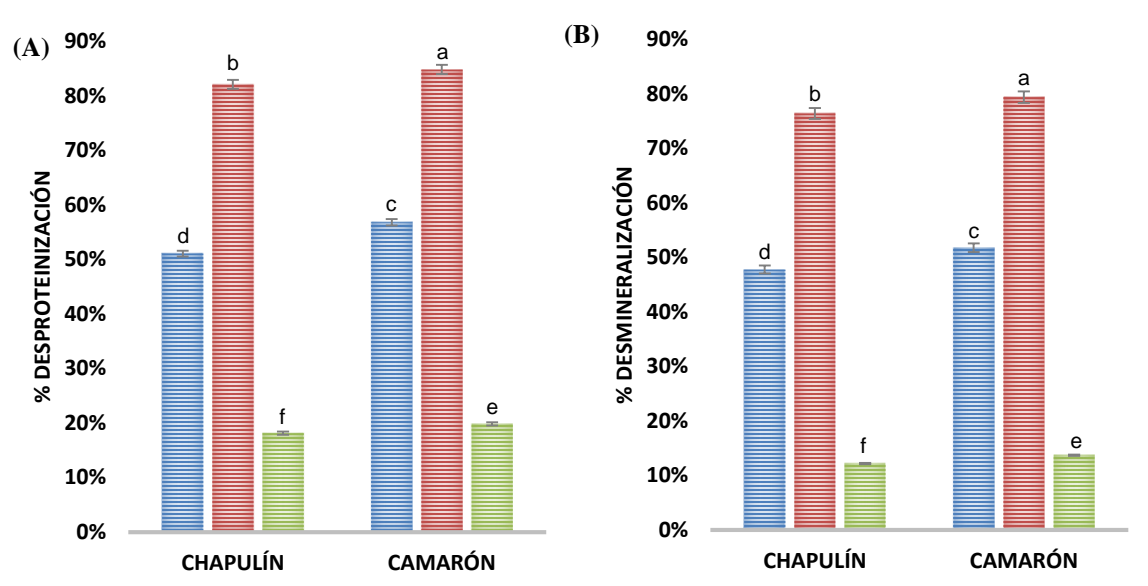


Fig. 19. Desproteínización (A) y desmineralización (B) utilizando la FMS (≡), Sonicación (≡) y FMS + Sonicación (≡) en exoesqueletos de camarón y chapulín. ^{a, b, c, d, e, f} Las medias en las columnas que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

9.7.3. TRATAMIENTO COMBINADO DE FMS-HIDRÓLISIS QUÍMICA

En el tratamiento combinado de FMS-Hidrólisis química, se obtuvo un contenido de proteína residual de 8.156 ± 0.09 y $10.186 \pm 0.09\%$ y un contenido de cenizas residual de 2.864 ± 0.23 y $4.537 \pm 0.05\%$ con los sustratos de exoesqueletos de camarón y chapulín respectivamente, se observó (figura 20) un aumento de 40.99 y 37.85% de desproteínización; y un 48.6 y 43.79% de desmineralización respectivamente en comparación con el tratamiento de FMS, y de la misma forma, existió un aumento de 1.12 y 2.87% de desproteínización; y un 2.19 y 4.55% de desmineralización respectivamente en comparación con el tratamientos de hidrólisis química. Recíprocamente, se alcanzó un mayor contenido de desproteínización y desmineralización con el sustrato de exoesqueletos de camarón de 94.67 y 95.58% en comparación con el de chapulín de 92.04 y 96.37% respectivamente. Se encontró diferencia significativa entre estos dos sustratos ($P < 0.05$) (Anexo A-25 al A-26).

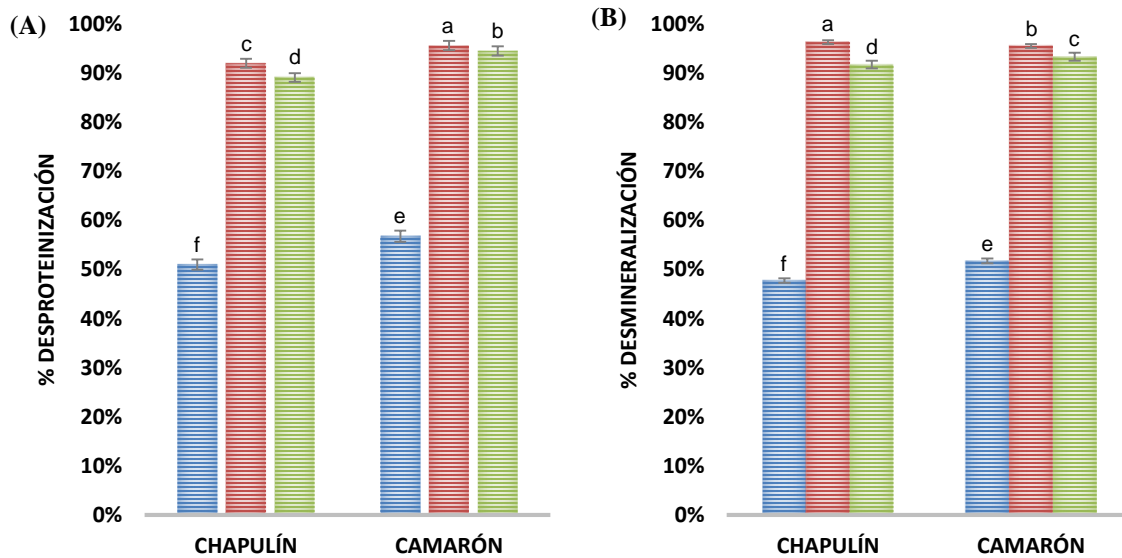


Fig. 20. Desproteínización (A) y desmineralización (B) utilizando FMS (≡), T. Químico (≡) y FMS + T. Químico (≡) en exoesqueletos de camarón y chapulín. ^{a, b, c, d, e, f} Las medias en las columnas que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

9.7.4. TRATAMIENTO COMBINADO DE FMS-HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

En el tratamiento combinado de FMS-Hidrólisis Enzimática, se obtuvo un contenido de proteína residual de 10.5 ± 0.28 y $12.13 \pm 0.1\%$ y un contenido de cenizas residual de 7.10 ± 0.3 y $10.069 \pm 0.3\%$ con los sustratos de exoesqueletos de camarón y chapulín respectivamente, se observó (figura 21) un aumento de 27.66 y 23.63% de desproteínización; y ligeramente un 0.02 y 0.21% de desmineralización respectivamente en comparación con la FMS. Por otra parte, igualmente existió un aumento de 58.27 y 57.42% de desproteínización; y un 52 y 47.79% de desmineralización respectivamente en comparación con el tratamiento de hidrólisis enzimática. Alcanzando, un mayor contenido de desproteínización y desmineralización con el sustrato de exoesqueletos de camarón de 80.45 y 52.00% en comparación con el de chapulín de 78.71 y 51.79% respectivamente. Se encontró diferencia significativa entre estos dos sustratos ($P < 0.05$) (Anexo A-27 al A-28).

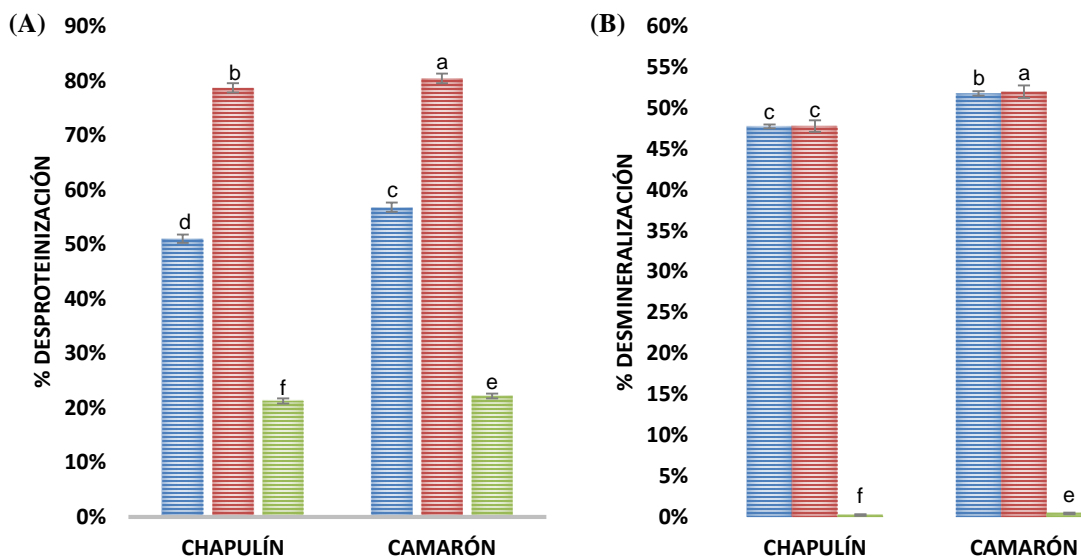


Fig. 21. Desproteínización (A) y desmineralización (B) utilizando FMS (■), T. Enzimático (■) y FMS + T. Enzimático (■) en exoesqueletos de camarón y chapulín. a, b, c, d, e, f Las medias en las columnas que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

9.7.5. CARACTERIZACIÓN DE MUESTRAS QUITINOSAS

El estudio por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) fue realizado en muestras quitinosas que provenían de exoesqueletos de camarón (figura 22) obtenidas por un pretratamiento de fermentación en medio sólido combinado con los tratamientos químico, físico y enzimático. En este estudio distinguió en los tres tratamientos las señales típicas del infrarrojo de la quitina, como es la señal de vibración -OH a 3277 cm^{-1} , también se determinaron las bandas de mediana intensidad características de C-H y COCH_3 presentado en los espectros, a 2931 y 2874 cm^{-1} se observaron las bandas de la amida I y II a 1622 y 1538 cm^{-1} la cual es característica para quitinas con conformación cristalina tipo α (Focher *et. al.*, 1992). Además, se observan las bandas de los grupos característicos, tales como C-O a 1031 cm^{-1} . Sin embargo, en la misma figura se muestra el espectro de quitina comercial (espectro color rosa), donde se aprecian los grupos funcionales característicos de las quitinas obtenidas, además se ven diferencias en los tres tratamientos combinados con respecto al estándar comercial. Las quitinas obtenidas presentaron una solubilidad en ácido acético (0.1 M) de 93.22, 93.545 y 93.083% para los tratamientos combinados químicos, físicos y enzimáticos respectivamente, los contenidos de desacetilación calculados fueron de 83.054, 85.235 y 90.013% y peso molecular de 112.934, 206.507 y 222.338 kDa

respectivamente, estando por debajo del peso molecular de la quitina comercial utilizado como referencia fue de 300 kDa para la α -quitina de camarón de bajo peso molecular.

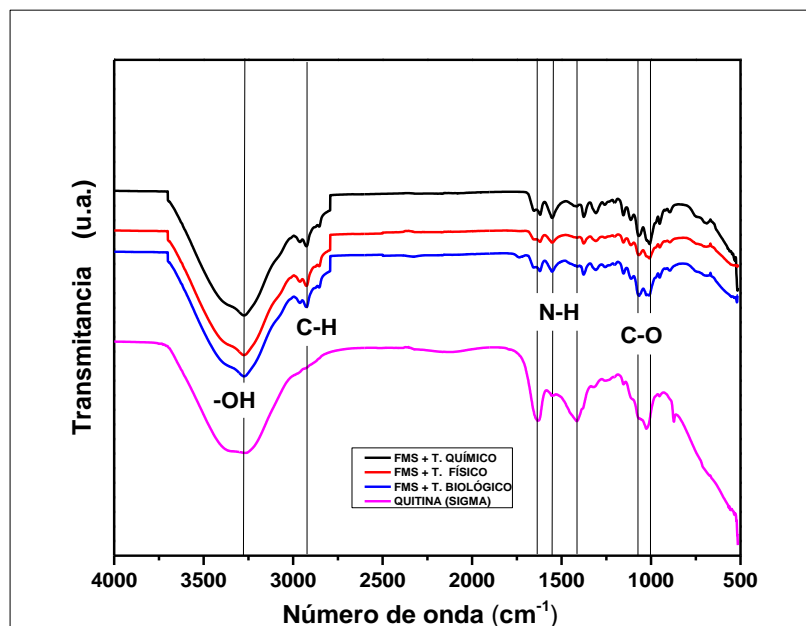


Fig. 22. Espectros FTIR de las quitinas obtenidas por fermentación en medio sólido combinado con el tratamiento químico (—), físico (—), enzimático (—) y quitina (Sigma) (—) a partir de exoesqueletos de camarón.

Por otra parte, en los espectros infrarrojos de absorción FTIR de la quitina producida a partir de exoesqueletos de chapulín (figura 23), se exhibió en los tres tratamientos una banda intensa y ancha a 3270 cm^{-1} asociada al grupo OH, se observan las bandas de la amida I y II a 1635 y 1428 cm^{-1} correspondientes a la quitina, también se observó las bandas de los grupos característicos de la quitina, tales como C-O a 1073 cm^{-1} . No obstante, en el espectro del proceso FMS + T. Químico no aparece un pico correspondiente al grupo amida, esto se atribuyó al efecto de la hidrólisis alcalina con hidróxido de sodio. Estas quitinas presentaron una solubilidad de solubilidad de 87.53, 86.23 y 90% en ácido acético (0.1 M), los contenidos de desacetilación calculados fueron de 74.074, 82.146 y 87.45%, y peso molecular de 139.138, 219.226 y 226.952 kDa respectivamente, estos valores de peso molecular fueron superiores a los reportados por Kaya *et al.* (2015), quienes obtuvieron un peso molecular entre 5.2 a 6.8 kDa a partir de siete especies de chapulín (A.

simultarix, *A. strepens*, *D. fractaand*, *D. laticornis*, *O. miniata*, *O. caeruleascens*, *P. cognata*).

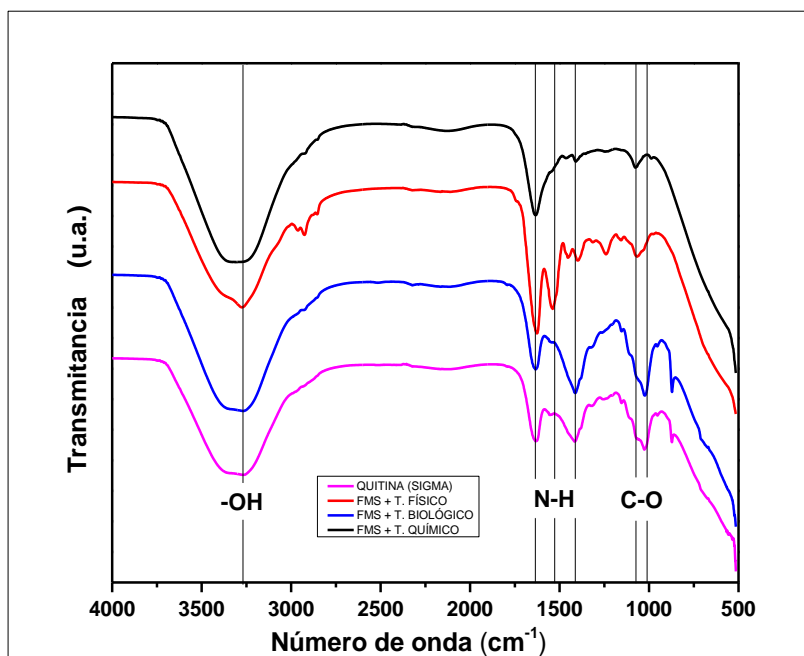


Fig. 23 Espectros FTIR de las quitinas obtenidas por fermentación en medio sólido combinado con los tratamientos químico (—), físico (—), enzimático (—) y quitina (Sigma) (—) a partir de exoesqueletos de chapulín

X. CONCLUSIONES

- 1^a La fermentación en medio sólido (*L. plantarum* BG-112) de camarón y chapulín influyó en la desproteínización (56.82 y 51.05%) y desmineralización (51.79 y 47.77%) respectivamente; siendo ésta, la mejor alternativa como pre-tratamiento para la obtención de quitina. El camarón fue el sustrato que mayormente se desproteínizó y desmineralizó en comparación con el chapulín.
- 2^a Con el tratamiento combinado de FMS + Químico, se obtuvo una mejor purificación de quitina a partir de exoesqueletos de camarón y chapulín. El camarón fue el sustrato que mejor se desproteínizó (94.04%) y el chapulín el sustrato que mejor desmineralizó (96.37%). Sin embargo, cabe mencionar que para la eliminación de los residuos químicos se efectuaron lavados continuos con un gasto de 18-20 litros/130 g de muestra.
- 3^a El tratamiento de FMS + ultrasonido disminuyó el tiempo (120 min) de extracción en comparación con los demás tratamientos, alcanzando porcentajes desproteínización (84.82 y 82.12%) y de desmineralización (79.39 y 76.38%) en los sustratos de camarón y chapulín respectivamente,. Siendo un método amigable con el ambiente en el sentido de la reducción de la cantidad de agua de lavado entre cada paso de purificación.
- 4^a El tratamiento enzimático a partir del pre-tratamiento por FMS en exoesqueletos de chapulín y camarón, se observó que existió un aumento del 27.66 y 23.63% de desproteínización; y ligeramente mayor con un 0.02 y 0.21% de desmineralización respectivamente con respecto a la FMS (*L. plantarum* BG-112). Por tal motivo, el efecto de la aplicación del tratamiento biológico (enzimático) aumentó el efecto de la hidrólisis de proteínas en los exoesqueletos de chapulín.

5^a Se ha demostrado que a partir de la fermentación en medio sólido como pretratamiento aplicado en los métodos químicos, enzimáticos y ultrasónicos son una herramienta eficiente que permitió desproteinizar y desmineralizar los exoesqueletos chapulín y camarón para la obtención de quitina, siendo este último el más eficiente en el sentido del medio ambiente.

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Agullo, E., Rodriguez, M.S., Ramos, V. y Albertengo, L. (2003). Present and future role of chitin and chitosan in food. *Macromolecular Bioscience* 3, 521-530.
2. Aidoo, K. E., Henry, B. and Wood, J. B. (1982). Solid state fermentation. *Advances of Applied Microbiology*. 28: 201-237.
3. Andersen, S.O. 1979. Biochemistry of the Insect Cuticle. *Ann. Rev. Entomol.* 24:29-61.
4. Andersen, S.O. 2010. Insect cuticular sclerotization. *Journal Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40: 166-178.
5. AOAC. (1990). *Methods of Analysis* (15th ed.). Association of Official Analytical Chemist. Washington, D.C
6. 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.
7. Atkins, P. W. y Jones, L., (2006). *Principios de Química: los caminos del descubrimiento*. 3ª ed. Ed. Médica Panamericana, España.
8. Atil H, Unver Y (2001) Multiple Comparisons. *OnLine Journal of Biological Sciences* 1(8): 723-727
9. Axelsson, L. *Lactic acid bacteria: classification and physiology* (1993). Salminen, S., von Wright, A., Ouwehand, A. Editors.
10. Aytekin O., Elibol M. (2010) Cocultivation of *Lactococcus lactis* and *Teredinobacter turnirae* for biological chitin extraction from prawn waste, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 33, 393–399, DOI 10.1007/s00449-009-0337-6.
11. Bajaj M., Winter J., Gallert C. (2011) Effect of deproteination and deacetylation conditions on viscosity of chitin and chitosan extracted from *Crangon crangon* shrimp waste, *Biochemical Engineering Journal* (56), 51– 62.

12. Balachandran B (2006). A semi-analytical tool based on geometric nonlinearities for microresonator design. *Journal of Micromechanics and Microengineering* 16(3): 512.
13. 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.
14. Barreto-Cardoso Márcia, Signini Roberta, Campana-Filho Sérgio Paulo. On the sonication of chitin: effects on its structure and morphology and influence on its deacetylation. *Polymer Bulletin* 47, 183–190 (2001).
15. 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.
16. Beaney P.; Lizardi-Mendoza, J. and Healy, M. (2005). Comparison of chitins produced by chemical and bioprocessing methods. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 80, no. 2, p. 145-150. [CrossRef]
17. Bezzerides, A. L., McGraw, K J., Parker, R. S. y Hussein, J. (2007). Elytra color as a signal of chemical defense in the Asian ladybird beetle *Harmonia axyridis*. *Behav Ecol Sociobiol* (2007) 61:1401–1408.
18. Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye-binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
19. Bradford, M. (2005). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye-binding. *Anal. Biochem* 72: 248-254.
20. Brennan, P. J., Nikaido, H., 1995. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem.* 64, 29-63.
21. Castellan, J. (2012). Obtención y caracterización de quitina biológica y su desacetilación a quitosano
22. Chandumpai A, Singhpibulporn N, Faroongsarng D, Sornprasit P. Preparation and physic-chemical characterization of chitin and chitosan from the pens of the

- squid species, *Loligo lessoniana* and *Loligo formosana*. *Carbohydr Polym.* 2004; 58:467–474. doi: 10.1016/j.carbpol.2004.08.015
23. Chen, A. S., Taguchi, T., Sakai, K., Kikuchi, K., Wang, M. W., Miwa, I., (2003). Antioxidant activities of chitobiose and chitotriose. *Biol. Pharm. Bull.* 26: 1326-1330.
 24. Chuan L. 2006. Review of fungal chitinases. Department of Plant Pathology. 161: 345 – 360.
 25. Cira L, Huerta S, Hall G, Shirai K. 2002. Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemistry.* 37:1359-1366.
 26. Cira L. 2000. Escalamiento de un proceso para la recuperación de quitina a partir de desechos de camarón. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa - México.
 27. 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.
 28. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. (2013). Anuario estadístico de Acuicultura y Pesca. Comisión nacional de acuicultura y pesca. Edición 2013. México. 213 pp.
 29. Friedman, M.R. and Gaden, EL. (1970). Growth and acid production by *Lactobacillus delbrueckii* in a dialysis culture system. *Biotechnol. Bioeng.* 12:961–974.
 30. GAGNÉ, N. Production of chitin and chitosan from crustacean waste and their use as a food processing aid. Montreal. July, 1993 [Online]. Department of Food Science and Agricultural Chemistry McGill University, A Thesis submitted to the Faculty of Graduate Studies and Research in partial fulfillment of the requirements of the decree of laster of Science.
 31. Gagné, N. Production of chitin and chitosan from crustacean waste and their use as a food processing aid. Montreal. July, 1993 [Online]. Department of Food Science and Agricultural Chemistry McGill University, A Thesis submitted to the Faculty of Graduate Studies and Research in partial fulfillment of the requirements of the decree of laster of Science.

32. García-Carreño F. 1991. Proteases in food technology. *Biotechnology Education*. 2:(4): 150-153.
33. Gildberg A, Stenberg E. 2001. A new process for advanced utilization of shrimp waste. *Process Biochemistry*. 36:809-812.
34. Gimeno M, Ramírez J, Martínez C, Pacheco N, García R, Barzana E, Shirai K. 2007. One-Solvent extraction of astaxantina from lactic acid fermented shrimp wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55:10345-10350.
35. 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.
36. Gouda Fouad, D. R., (2008). Chitosan as an antimicrobial compound: Modes of action and resistance mechanisms. Rheinischen Friedrich Wilhelms Uni-versität, Bonn, Germany. Tesis doctoral, p. 215.
37. Guibal, E. 2004. Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: A review. *Separation and Purification Technology*, 38: 43-74.
38. Healy, M., Green, A. and Healy, A. (2003) Bioprocessing of marine crustacean shell waste. *Acta Biotechnol.*, 23(2-3):151-160.
39. 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*.
40. Hernández-Núñez C., Varo-Arguello W., Leyva-Reyes N., Ramírez-Barragán C., Delgado-Fornué E., Andrade-Ortega J. (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*.
41. Hernández-Núñez C., Varo-Arguello W., Leyva-Reyes N., Ramírez-Barragán C., Delgado-Fornué E., Andrade-Ortega J. (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*.

42. Hielscher, T. (2005): Producción de ultrasonidos de tamaño Nano dispersiones y emulsiones, en: Actas del Congreso Europeo de nanosistemas ENS'05.
43. Hirano S. 1999. Chitin and chitosan as novel biotechnological materials. *Polymer International*. 48: 732-734.
44. Hunter Lab, (2000). Universal Software Version 4.0 and Above User's Manual. Hunter Associates Laboratory. Pp.470. Virginia, USA.
45. IBRAHIM, Farag. Partial Purification and Characterization of Chitin Deacetylase from *Mucor rouxii*. [Online]. Montreal, Canada March, 1999 39 p. Food Science & Agricultural Chemistry Department Macdonald Campus, McGill University Ste Anne de Bellevue.
46. Jay, J.M. (1982). Antimicrobial properties of diacetyl. *Applied Environmental Microbiology*. 44: 525-532
47. Jay, J.M. (2000). *Modern food microbiology*. 6th edition, Aspen publication, Gaithersburg, Maryland, USA.
48. 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.
49. Kardas I., Struszczyk M.H., Kuchaska M., Van den Broek L., Van Dam J., Ciechanska D. (2012). Chitin and chitosan as functional biopolymers for industrial applications. En P. Kardas (Ed.), *Polysaccharide Research: The European Polysaccharide Network of Excellence (EPNOE): Research Initiatives and Results* (p.p 329-337).
50. Karki, B., Lamsal, B.P., Grewell, D., Pometto III, A.L., van Leeuwen, J., Khanal, S.K., & Jung, S. (2009a). Functional properties of soy protein isolates produced from ultrasonicated defatted soybean flakes. *Journal of American Oil Chemists Society*, 86, 1021-1028
51. 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.

-
52. Kaya, M., Baran, T., Asan-Ozusaglam, M., Cakmak, Y. S., Tozak, K. O., Mol, A., Montes, A. y Sezen, G. (2015). Extraction and characterization of chitin and chitosan with antimicrobial and antioxidant activities from cosmopolitan Orthoptera species (Insecta). *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 20, 168-179.
 53. 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.
 54. Kohmei Kubo L. A., Toshiya Nakamura, Keiichi Takagaki, Yutaka Yoshida And Masahiko Endo. Depolymerization of hyaluronan by sonication. *Glycoconjugate Journal* (1993) 10:435-439.
 55. Kohmei, K.L. A., Toshiya, N., Keiichi, T., Yutaka, Y., Masahiko, E. (1993) Depolymerization of hyaluronan by sonication. *Glycoconjugate Journal* 10, 435-439.
 56. Liñán-Cabello Marco Agustín, Paniagua-Michel Jesús. (2002). Bioactive roles of carotenoids and retinoids in crustaceans. *Aquaculture Nutrition*, 299-309.
 57. Liñán-Cabello Marco Agustín, Paniagua-Michel Jesús. (2004). Induction factors derived from carotenoids and vitamin A during the ovarian maturation of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture International* 12, 583-592.
 58. 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(3), 855-863
 59. Lorimer JP, Mason TJ, Cuthbert TC, Brookfield EA. 1995. Effect of ultrasound on the degradation of aqueous native dextran. *Ultrason. Sonochem.* 2:55–57
 60. Martin, A.H., Grolle, K., Bos, M.A., Cohen, M.A. y van Vliet, T. (2002). Network forming properties of various proteins adsorbed at the air/water interface in relation to foam stability. *Journal of Colloid and Interface Science* 254, 175–183.
 61. Mason TJ. 2007. Developments in ultrasound—non-medical. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 93:166–75.
-

-
62. Mason, T.J. (2007). Developments in ultrasound—non-medical. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* 93, 166–75.
 63. Matsufuji, H., Matsui, T., Ohshige, S., Kawasaki, T., Osajima, K., y Osajima, Y. (1995). Antihypertensive effects of angiotensin fragments in SHR. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 59: 1398–1401.
 64. Matsui, L., Tanaka, T., Maki, T., Osajima, Y., y Matsumoto, K. (2000). Depressor effect of wheat germ hydrolysate and its novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide, Ile-Val-Tyr, and the metabolism in rat and human plasma. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, 23: 427–431.
 65. Matsui, T.; Hayashi, A.; Tamaya, K.; Matsumoto, K.; Kawasaki, T.; Murakami, K., y Kimoto, K.-I. (2003). Depression effect induced by dipeptide, Val-Tyr, in hypertensive transgenic mice is due, in part, to the suppression of human circulating renin-angiotensina system. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 30: 262-265.
 66. Megías, C., Yust, M. M., Pedroche, J., Lquari, H., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F., y Vioque, J. (2004). Purification of an ACE inhibitory peptide after hydrolysis of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 1928-1932.
 67. Monrrone, J.J. (2005). Hacia una síntesis biogeográfica de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 76: 207-252
 68. Morais, H.A., Silvestre, M.P.C., Silva, V.D.M., Silva, M.R., Simoes, A.C. & Silveira, J.N. (2013). Correlation between the degree of hydrolysis and the peptide profile of whey protein concentrate hydrolysates: Effect of the enzyme type and reaction time. *American Journal of Food Technology*, 8: 1-16.
 69. Morales-Guerrero, J. C., Vázquez-Mata, N., y Bressani-Castignoli, R. (2009). El amaranto, características físicas, químicas, toxicológicas y funcionales y aporte nutricio. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. México, D.F. 269 p.
 70. Mulawarman, J., Hallmann, D., Bell, B., Holtwiesche, K., Sikora, R. A., (2001). Effects of natural products on soil organisms and plant health enhancement. *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet.* 66: 609-617.
-

71. Mulawarman, J., Hallmann, D., Bell, B., Holtwiesche, K., Sikora, R. A., (2001). Effects of natural products on soil organisms and plant health enhancement. *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet.* 66: 609-617.
72. Mulawarman, J.M. Roshetko, S.M. Sasongko y D. Irianto. 2003. Tree seed management - seed sources, seed collection and seed handling: a field manual for field workers and farmers. International Centre for Research in Agroforestry (ICRAF) and Winrock International. Bogor, Indonesia. 54 p.
73. Muthukumar, T. and S. Prakash. 2009. Arbuscular mycorrhizal morphology in crops and associated weeds in tropical agroecosystem. *Mycorrhizae*, 50: 233-239.
74. Muthukumaran S, Kentish S, Lalchandani S, Ashokkumar M, Mawson R, *et al.*, 2005. The optimisation of ultrasonic cleaning procedures for dairy fouled ultrafiltration membranes. *Ultrason. Sonochem.* 12:29–35
75. Muthukumaran, 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.
76. National Academy of Sciences. (1984). Amaranth: Modern prospects for an ancient crop. National Academy Press, Washington D.C.
77. Nielsen, M.P., Petersen, D., y Dambmann, C. (2001). Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science.* 66(5): 642-646.
78. Ondetti, M. A. y Cushman, D. W. (1982). Enzymes of the reninangiotensin system and their inhibitors. *Annual Review of Biochemistry*, 51: 283-308.
79. Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2013). *Global Health Observatory. Raised blood pressure. Situation and trends.*
80. 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, 2849.
81. 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.
82. Pandya, Y. & Knorr, D. 1991. Diffusion characteristics and properties of chitosan coacervate capsules. *Process Biochem.* 26:75-81.
83. Parvathy, S., Oppong, S. Y., Karran, E. H., Buckle, D. R., Turner, A. J. y Hooper, N. M. (1997). Angiotensin-converting enzyme secretase is inhibited by zinc metalloprotease inhibitors and requires its substrate to be inserted in a lipid bilayer. *Biochemical Journal*, 327:37-43.
84. Peniche C. 2006. Estudios sobre quitina y quitosana. Universidad de la Habana. Facultad de Química - Cuba.
85. Porrás-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(2), 243-252.
86. Qin, C. Q., Du, Y. M., Xiao, L., Li, Z., Gao, X. H., (2002). Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity. *Int. J. Biol. Macromol.* 31: 111-117.
87. Raina A, y Datta A. (1992). Molecular cloning of a gene encoding a seed specific protein with nutritional and balanced aminoacid composition from *Amaranthus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 80: 11774-11778.
88. Ramírez L., Marín M., Huerta S., Revah S., Shirai K. 2006. Enzymatic hydrolysis of chitin in the production of oligosaccharides using *Lecanicillium fungicola* chitinases. *Process Biochemistry.* 41: 1106-1110
89. Ramírez, R, 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.
90. Ramirez-Coutiño L, Espinosa-Marquez J, Peter M. G, Shirai K. 2010. The effect of pH on the production of chitinolytic enzymes of *Verticillium fungicola* in submerged cultures. *Bioresource Technology.* 101: 9236-9240.
-

91. Ramirez-Coutiño, L., Marin-Cevantes, M. del C., Huerta, S., Revah, S., and Shirai, K., (2006), Enzymatic hydrolysis of chitin in the production of oligosaccharides using *Lecanicillum fungicola* chitinases. *Process Biochemistry*. 41:1106-1110.
92. Ramírez-Ramírez, J. C. (2009). Aprovechamiento de fauna de acompañamiento del camarón y subproductos pesqueros mediante la elaboración de ensilado de pescado.
93. Rao, M. S. and Stevens, W. F. (2005). Chitin production by *Lactobacillus* fermentation of shrimp biowaste in a drum reactor and its chemical conversion to chitosan. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80: 1080-1087.
94. Rao, M.S., Muñoz, J. and Stevens, W.F. (2000). Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste. *Appl. Microbiol. Biotech.*, 54: 808–813
95. Reddy, S.G., Henrickson, R. L. and Olson, H. C. (2008). the influence of lactic cultures on ground beef quality. *Journal of Food Science*. 35 (6): 787 – 791.
96. Rinaudo, M (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications, progress in Polymer science. 31-7-603-632.
97. 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.
98. Rødde R.H., Einbu A., Varum K.M. 2008. A seasonal study of the chemical composition and chitin quality of shrimp shells obtained from northern shrimp (*Pandalus borealis*). *Carbohydrate Polymers*, 71:388–393.
99. 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(3), 649-663.
100. Rosas Peralta M., Lara Esqueda, A., Pastelín Hernández, G., Velázquez Monroy, O., Martínez Reding, J., Méndez Ortiz, A., Lorenzo Negrete, J. A., Estrada C. L. González Hermsillo, A., Herrera Acosta, J., y Tapia Conyer, R.

- (2005). Re-encuesta Nacional de Hipertensión Arterial (RENAHTA): consolidación mexicana de los factores de riesgo cardiovascular. Cohorte nacional de seguimiento. *Archivos de Cardiología de México*, 75: 96-111.
101. Rosas, M., Pastelín, G., Reding-Martínez, J., y Herrera-Acosta J. (2004). Hipertensión arterial en México. Guías y recomendaciones para su detección, control y tratamiento. *Archivos de Cardiología de México*, 74: 134-157.
102. Rossetti, M.R., Defagó, M.T., Carpinella, M.C, Palacios, S.M. y Valladares G. (2008). Actividad biológica de extractos de *Melia azedarach* sobre larvas de *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 67(1-2): 115-125
103. Rutherford S.M. (2010). Methodology for determining degree of hydrolysis of proteins in hydrolysates: a review. *Journal of AOAC International*, 93(5): 1515-1522.
104. SAGARPA (2012). Cierre de la producción agrícola por estado <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>
105. Salazar-Leyva, J.A., Lizardi-Mendoza, J., Ramírez-Suarez, J.C., García-Sánchez, G., Ezquerro-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(1), 129-150.
106. Salazar-Vega, I. M., Segura-Campos, M. R., Chel-Guerrero, L. A., y Betancur-Ancona, D. A. (2012). Antihypertensive and antioxidant effects of functional foods containing chia (*Salvia hispanica*) protein hydrolysates. *Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry*, Dr. Benjamin Valdez (Ed). (pp 381-398).
107. Sani, H. A., Rahamat, A., Ismail, M., Rosli, R., y Endrini, S. (2004). Potential anticancer effect of red spinach (*Amaranthus gangengitus*) extract. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 13(4): 396-400.
108. Sauer, J. D. (1967). The grain amaranths and their relatives: a revised taxonomic and geographic survey. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 54:103-137.

-
109. Sauer, J. D. (1993). Historical geography of crop plants: a select roster. CRC Press. Los Angeles, USA. 320 p.
 110. Scow, T. D., Smith, G. E., y Shaughnessy, F. A. (2003). Combination therapy with ACE inhibitors and angiotensin-receptor blockers heart failure. *Clinical Pharmacology*, 68(9): 1795-1798.
 111. Segura-Campos, M. R., Peralta-González, F., Castellanos-Ruelas, A., Chel-Guerrero, L. A. y Betancur-Ancona, D. A. (2013). Effect of *Jatropha curcas* peptide fractions on the angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity. *BioMed Research International*, vol. 2013, article ID 541947, (1-8).
 112. Segura-Campos, M., Chel-Guerrero, L. y Betancur Ancona, D. (2013). Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias. Barcelona: OmniaScience.136
 113. 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.
 114. 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.
 115. Shukla, S. Bhargava, A., Chatterjee, A., Srivastava, J., Singh, N. y Singh, S. P. (2006). Mineral profile and variability in vegetable amaranth (*Amaranthus tricolor*) *Plant Foods for Human Nutrition*, 61: 23-28.
 116. 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.
 117. Skeggs, L. T., Kahn, J. R. y Shumway, N. P. (1956). The preparation and function of the hypertensin converting enzyme. *Journal of Experimental Medicine*, 103: 295-299.
 118. Soriano-Santos, J., Iwabuchi, S., & Fujimoto, K. (1992). Solubility of amaranth seed proteins in sodium sulphate and sodium chloride: the main factor in quantitative extraction for analysis. *International Journal of Food Science & Technology*, 27(3): 337-346.
-

-
119. 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. DOI 10.1007/s10295-009-0587.
 120. 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(3), 723-737.
 121. Soubrier, F.; Hubert, C., Testut, P.; Nadaud, S.; Alhenc-gelas, F., y Corvol, P. (1993). Molecular biology of the angiotensin I converting enzyme: I. Biochemistry and structure of the gene. *Journal of Hypertension*, 11: 471-476.
 122. Suslick KS, Didenko Y, Feng MM, Hyeon T, Kolbeck KJ, et al. 1999. Acoustic cavitation and its chemical consequences. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. A* 357:335–53.
 123. Tamás, C., Kisgyörgy, B. N., Rakszegi, M., Wilkinson M.D., Yang, M.S., Lang, L., Tamás, L. y Bedö, Z. (2009). Transgenic approach to improve wheat (*Triticum aestivum* L.) nutritional quality
 124. Tardioli, W.P., Fernández-Lafuente, R., Guisán, M.J. y Giordano, C.R.L. (2003). Design of new immobilized-stabilized carboxypeptidase A derivative for production of aromatic free hydrolysates of proteins. *Biotechnology Progress*, 19(2): 565-574.
 125. Tharanathan, R.; Kittur, F.; 2003. Chitin-the undisputed biomolecule of great potential. *Crit. Rev. Food Sci.* 43(1), 61-87.
 126. Torruco-Uco, J. G. (2009). Efecto antihipertensivo de fracciones peptídicas bioactivas obtenidas a partir de frijol lima (*Phaseolus lunatus*) y frijol Jamapa (*Phaseolus vulgaris*) Tesis de doctorado. Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Yucatán.
 127. Touyz, R.M. (2004) Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells: implications in cardiovascular disease. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37(8): 1263-1273.
-

-
128. Touyz, R.M. y Schiffrin E.L. (2000). Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacological Review*, 52(4): 639-672.
 129. Tovar-Pérez, E. G., Guerrero-Legarreta, I., Farrés-González, A. y Soriano-Santos, J. (2009). Angiotensin I-converting enzyme – inhibitory peptide fractions from albumin 1 and globulin as obtained of amaranth grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 116: 437-444.
 130. Tsigos I., Martinou A., Kafetzopoulos D. Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. Institute of Molecular Biology and Biotechnology. Foundation of Research and Technology 205-312
 131. Turner, A.J. y Hooper, N.M. (2002). The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23:177-183.
 132. Tzacos, A.G, Galanis, A., Spyroulias, G.A., Cordopatis, P., Manessi-Zoupa, E. y Gerotheranassis, I.P. (2003). Structure-function discrimination of the N- and C-catalytic domains of human angiotensin-converting enzyme: implications for Cl- activation and peptide hydrolysis mechanisms. *Journal of Protein Engineering*, 16(12): 993-1003.
 133. Valdez A.U., Espinoza J.D., Sandoval G.C., Balagurusamy N., Hernandez A. M., De-la-Garza I., Contreras J.C. (2010) Screening of Industrial Enzymes for Deproteinization of Shrimp Head for Chitin Recovery, *Food Science Biotechnology*, 19(2), 553-557. DOI 10.1007/s10068-010-0077.
 134. Valdez-Peña, A.U., Espinoza-Peña, J.D., Balagurusamy, N., Sandoval-Fabian, G.C., Hernandez-Ribera, A., De-la-Garza-Rodriguez and Contreras-Esquivel J.C. (2010). Screening of Industrial Enzymes for Deproteinization of Shrimp Head for Chitin Recovery. *Food Science Biotechnology*. 19: 553-557.
 135. Van der Ven C., Gruppen, H., De Bont, A. B. D. y Voragen J. G. A. (2002). Correlations between biochemical characteristics and foam-forming and stabilizing ability of whey and casein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 2938-2946.
 136. Villanueva, A., Vioque, J., Sanchez-Vioque, R., Clemente, A., Bautista, J. y Millán F. (1999). Production of an extensive sunflower protein hydrolysate by
-

- sequential hydrolysis with endo- and exo- proteases. *International Journal of Fats and Oils*, 50: 472-476.
137. Villanueva, O. y Arnao, I. (2007). Purificación de una proteína de 35 kDa rica en lisina, de la fracción albúmina de *Amaranthus caudatus* (kiwicha). *Anales de la Facultad de Medicina*, 68(4): 344-350.
138. Wahyuntari B., Junianto, Setyahadi S. (2011) Process Design of Microbiological Chitin Extraction, *Microbiology Indonesia*, 5, 1, 39-45.
139. Waldeck J, Daum G, Bisping B, Meinhardt F (2006). Isolation and molecular characterization of chitinase deficient *Bacillus licheniformis* strains capable of deproteinization of shrimp shell waste to obtain highly viscous chitin. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(12): 7879-7885.
140. Wang, W. y Gonzales de Mejía, E. (2005). A new Frontier in Soy Bioactive Peptides that May Prevent Age-Related Chronic Diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 4: 63-78.
141. www.conapesca.gob.mx. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2013 de la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. P.p. 25.
142. Xu Y., Gallert C., Winter J. 2008. Chitin purification from shrimp wastes by microbial deproteination and decalcification. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79:687–697.
143. Xu, Y., Gallert, C., Winter J. (2008). Chitin purification from shrimp wastes by microbial deproteination and decalcification. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79, 687–697.
144. Yamaguchi, S. Itoh, M. Suzuki, M. Sakane, A. Osaka. “The chitosan prepared from crab tendon, characterization and mechanical properties”. *Biomaterials*, 24, 2031–2036, 2003.
145. Yang, Y., Marczak, E. D., Yokoo, M., Usui, H. y Yoshikawa, M. (2003). Isolation and antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from spinach rubisco. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 4897-4902.
146. Yust, M. M., Pedroche, J., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Vioque, J., y Millán, F. (2003). Production of ace inhibitory peptides by digestión of chickpea legumin with alcalase. *Food Chemistry*, 81: 363-369.

-
147. 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(4): 450-461.
 - Martínez-González, J. C. (2010). Variedades sobresalientes de amaranto en el estado de Tlaxcala. Centro de Investigación Regional Centro INIFAP Tlaxcala. Desplegable para productores No. 8.
 148. Zhang, H., Z. G. Wang, Z. N. Zhang, J. Wu, J. Zhang, and J. S. He. 2007. Regenerated-Cellulose/Multiwalled- Carbon-Nanotube composite fibers with enhanced mechanical properties prepared with the ionic Liquid 1-Allyl-3-methylimidazolium Chloride. *Advanced Materials*, 19 (5): 698-704.
 149. Shimahara, K., Y. Takiguchi, T. Kobayashi, K. Uda and T. Sannan, 1989. Screening of mucoraceae strains suitable for chitosan production. In: Skjak-Brack, G., T. Anthonsen and P. Sanford (eds.), *Chitin and Chitosan*. pp: 171–8. London, Elsevier Applied Science
 150. Wang, L. T., Lee, F. L., Tai, C. J. & Kasai, H. (2007). Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA–DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 1846–1850.
 151. YI-SU O., ING-LUNG S., YEW-MIN T. and SAN-LANG W. Protease produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 and its application in the deproteinization of shrimp and crab shell wastes [Online]. *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 27, Issues 1-2, July 2000, Pages 3-10
 152. Valdez-Peña, A.U., Espinoza-Peña, J.D., Balagurusamy, N., Sandoval-Fabian, G.C., Hernandez-Ribera, A., De-la-Garza-Rodriguez and Contreras-Esquivel J.C. (2010). Screening of Industrial Enzymes for Deproteinization of Shrimp Head for Chitin Recovery. *Food Science Biotechnology*. 19: 553-557.

XII. ANEXOS

Anexo A-1

Análisis de varianza del % Humedad durante fermentación en medio sólido de exoesqueletos de camarón y chapulín.

% HUMEDAD contra SUSTRATOS (CAMARÓN, CHAPULÍN), TRATAMIENTO (LA-3, BG112 Y SP1)

Fuente	GL	SC	CM	F	P
SUSTRATO	1	12.2409	12.2409	60.54	0.004
TRATAMIENTO	3	12.5357	4.1786	20.67	0.017
Error	3	0.6066	0.2022		
Total	7	25.3832			

S = 0.4497 R-cuad = 97.61% R-cuad(adj) = 94.42%

Agrupación de información utilizando el método Tukey (CAMARÓN)

	N	Promedio	Agrupamiento
BLANCO	3	46.86020	A
LA-3	3	44.98750	B
SP1	3	44.42000	C
BG112	3	43.02420	D

Agrupación de información utilizando el método Tukey (CHAPILÍN)

	N	Promedio	Agrupamiento
BLANCO	3	46.86020	A
LA-3	3	44.98750	B
SP1	3	44.42000	C
BG112	3	43.02420	D

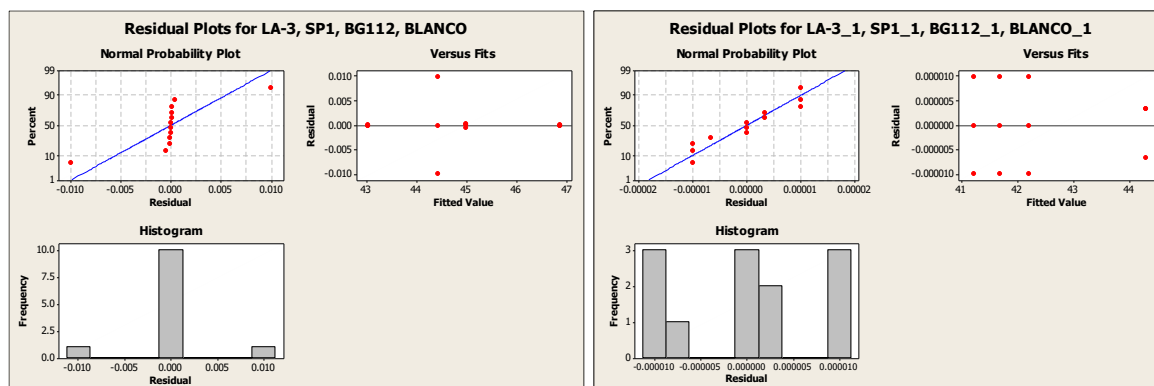


Fig. 24. Gráficas de residuos de medias del %Humedad por la prueba de Tukey durante la fermentación en medio sólido de exoesqueletos de camarón y chapulín.

Anexo A-2

Análisis de varianza del contenido de Cenizas durante fermentación en medio sólido de exoesqueletos de camarón y chapulín.

% CENIZAS contra SUSTRATOS (CAMARÓN, CHAPULÍN), TRATAMIENTO (LA-3, BG112 Y SP1)

Fuente	GL	SC	CM	F	P
SUSTRATO	1	61.3555	61.3555	41.04	0.008
TRATAMIENTO	3	28.4821	9.4940	6.35	0.082
Error	3	4.4854	1.4951		
Total	7	94.3231			

S = 1.223 R-cuad= 95.24% R-cuad(adj) = 88.90%

Agrupación de información utilizando el método Tukey (CAMARÓN)

	N	Promedio	Agrupamiento
BLANCO	3	15.47680	A
SP1	3	9.89020	B
LA-3	3	9.40200	C
BG112	3	9.01020	D

Agrupación de información utilizando el método Tukey (CHAPILÍN)

	N	Promedio	Agrupamiento
BLANCO_1	3	18.43220	A
SP1_1	3	16.09180	B
LA-3_1	3	15.81920	C
BG112_1	3	15.58000	D

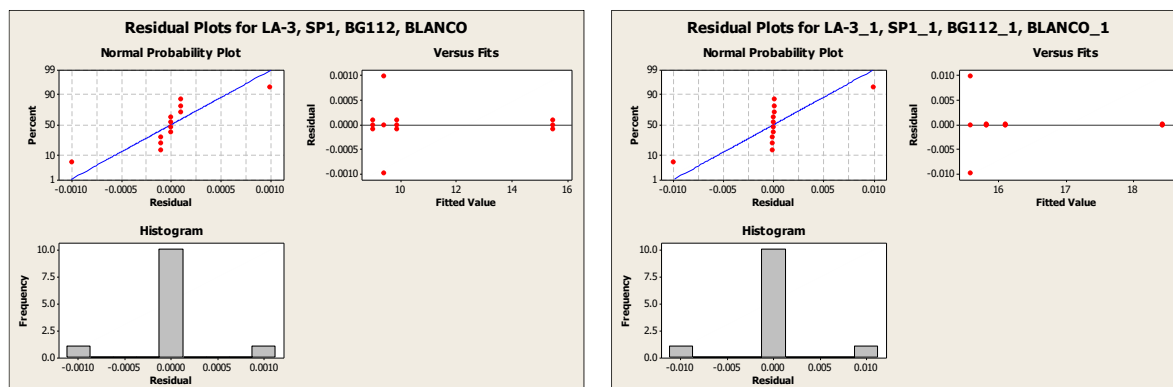


Fig. 25. Gráficas de residuos de medias del %Cenizas por la prueba de Tukey durante la fermentación en medio sólido de exoesqueletos de camarón y chapulín.

Anexo A-3

Análisis de varianza del % ATT durante fermentación en medio sólido de exoesqueletos de camarón y chapulín.

% ATT contra SUSTRATOS (CAMARÓN, CHAPULÍN), TRATAMIENTO (LA-3, BG112 Y SP1)

Fuente	GL	SC	CM	F	P
SUSTRATO	1	0.0660	0.06605	6.18	0.009
TRATAMIENTO	3	10.8607	3.62024	338.79	0.000
Error	3	0.0321	0.01069		
Total	7	10.9588			

S = 0.1034 R-cuad= 99.71% R-cuad(adj) = 99.32%

Agrupación de información utilizando el método Tukey (CAMARÓN)

	N	Promedio	Agrupamiento
BG112	3	3.08400	A
LA-3	3	2.75700	B
SP1	3	2.35700	C
BLANCO	3	0.00010	D

Agrupación de información utilizando el método Tukey (CHAPILÍN)

	N	Promedio	Agrupamiento
BG112_1	3	2.95300	A
LA-3_1	3	2.42420	B
SP1_1	3	2.12000	C
BLANCO_1	3	0.00000	D

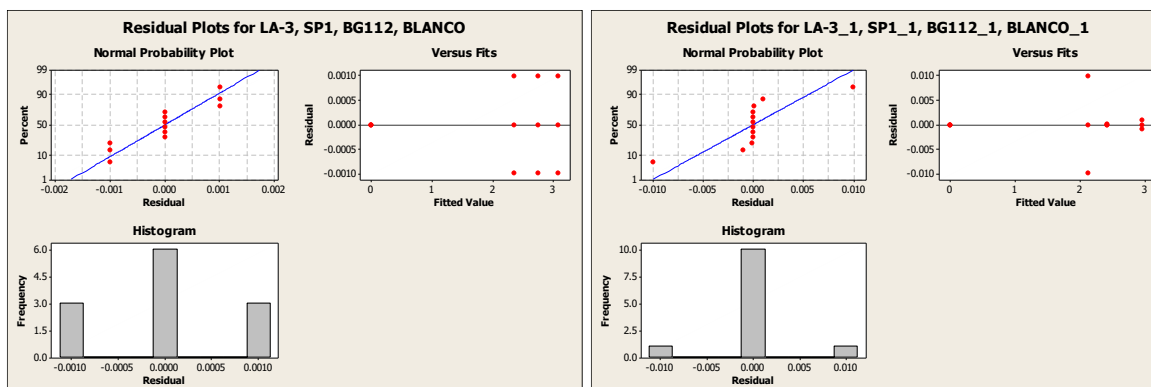


Fig. 26. Gráficas de residuos de medias del %ATT por la prueba de Tukey durante la fermentación en medio sólido de exoesqueletos de camarón y chapulín.

Anexo A-4

Análisis de Varianza del pH durante fermentación en medio sólido de exoesqueletos de camarón y chapulín.

pH contra SISTRATOS (CAMARÓN, CHAPULÍN), TRATAMIENTO (LA-3, BG112 Y SP1)

Fuente	GL	SC	CM	F	P
SUSTRATO	1	5.7885	5.78850	11.11	0.045
TRATAMIENTO	3	10.7983	3.59943	6.91	0.073
Error	3	1.5628	0.52092		
Total	7	18.1495			

S = 0.7217 R-cuad= 91.39% R-cuad(adj) = 79.91%

Agrupación de información utilizando el método Tukey (CAMARÓN)

	N	Promedio	Agrupamiento
BLANCO	3	8.40000	A
SP1	3	5.11000	B
LA-3	3	4.74000	C
BG112	3	4.38000	D

Agrupación de información utilizando el método Tukey (CHAPILÍN)

	N	Promedio	Agrupamiento
BLANCO_1	3	5.19000	A
SP1_1	3	3.68400	B
LA-3_1	3	3.55000	C
BG112_1	3	3.38000	D

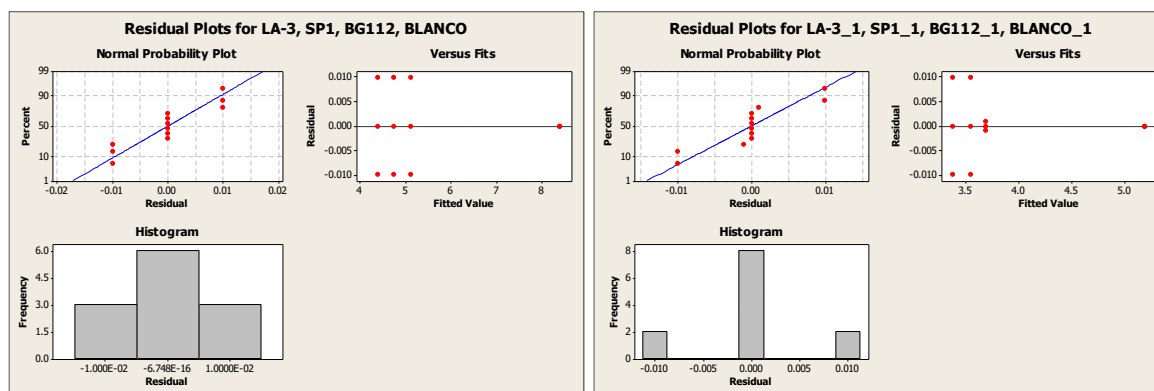


Fig. 27. Gráficas de residuos de medias del pH por la prueba de Tukey durante la fermentación en medio sólido de exoesqueletos de camarón y chapulín.

Anexo A-5

Análisis de Varianza de la concentración de proteína soluble durante fermentación en medio sólido de exoesqueletos de camarón y chapulín.

Proteína Soluble contra SUSTRATOS (CAMARÓN, CHAPULÍN), TRATAMIENTO (LA-3, BG112 Y SP1)

Fuente	GL	SC	CM	F	P
SUSTRATO	1	5.767	5.7674	2.20	0.005
TRATAMIENTO	3	180.762	60.2540	22.99	0.014
Error	3	7.862	2.6207		
Total	7	194.392			

S = 1.619 R-cuad= 95.96% R-cuad(adj) = 90.56%

Agrupación de información utilizando el método Tukey (CAMARÓN)

	N	Promedio	Agrupamiento
BG112	3	27.6115	A
LA-3	3	26.3756	B
SP1	3	24.5435	C
BLANCO	3	16.0978	D

Agrupación de información utilizando el método Tukey (CHAPILÍN)

	N	Promedio	Agrupamiento
BG112_1	3	32.2622	A
LA-3_1	3	27.3906	B
SP1_1	3	23.6980	C
BLANCO_1	3	18.0698	D

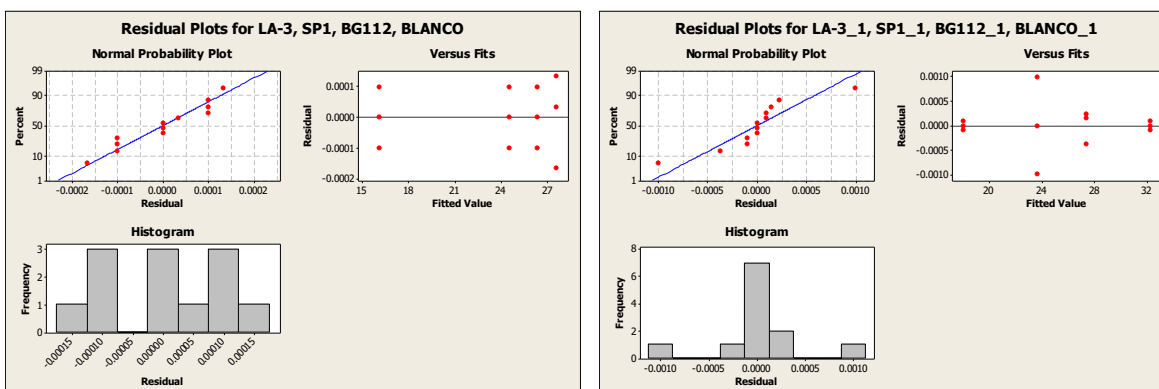


Fig. 28. Gráficas de residuos de medias del contenido de proteína soluble por la prueba de Tukey durante la fermentación en medio sólido de exoesqueletos de camarón y chapulín.

Anexo A-6

Análisis de Varianza de °HEU de durante fermentación en medio sólido de exoesqueletos de camarón y chapulín.

ANDEVA DE DOS FACTORES:

°HEU contra SUSTRATOS (CAMARÓN, CHAPULÍN), TIEMPO (t=0, t=120)

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Factor	1	105.8400	105.8400	1058400.00	0.000
Error	4	0.0004	0.0001		
Total	5	105.8404			

S = 0.01 R-cuad = 100.00% R-cuad(adj) = 100.00%

Agrupación de información utilizando el método Tukey (CAMARÓN)

	N	Promedio	Agrupamiento
t=120	3	24.7200	A
t=0	3	16.3200	B

Agrupación de información utilizando el método Tukey (CHAPILÍN)

	N	Promedio	Agrupamiento
t=120_1	3	26.3167	A
t=0_1	3	15.3200	B

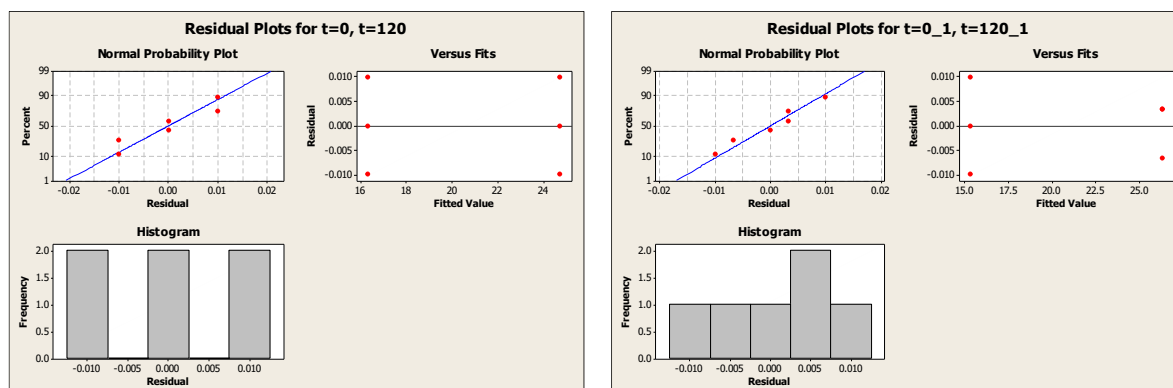


Fig. 29. Gráficas de residuos de medias de °Heu por la prueba de Tukey durante la fermentación en medio sólido de exoesqueletos de camarón y chapulín.

Anexo A-7

Análisis de Varianza de *S de durante fermentación en medio sólido de exoesqueletos de camarón y chapulín

***S contra SUSTRATOS (CAMARÓN, CHAPULÍN), TIEMPO (t=0, t=120)**

Fuente	GL	SC	CM	F	P
SUSTRATO	1	25.00	25.00	2500.00	0.013
TIEMPO	1	56.25	56.25	5625.00	0.008
Error	1	0.01	0.01		
Total	3	81.26			

S = 0.1 R-cuad= 99.99% R-cuad(adj) = 99.96%

Agrupación de información utilizando el método Tukey (CAMARÓN)

	N	Promedio	Agrupamiento
t=120	3	31.12000	A
t=0	3	23.74667	B

Agrupación de información utilizando el método Tukey (CHAPILÍN)

	N	Promedio	Agrupamiento
t=120_1	3	26.2300	A
t=0_1	3	18.6400	B

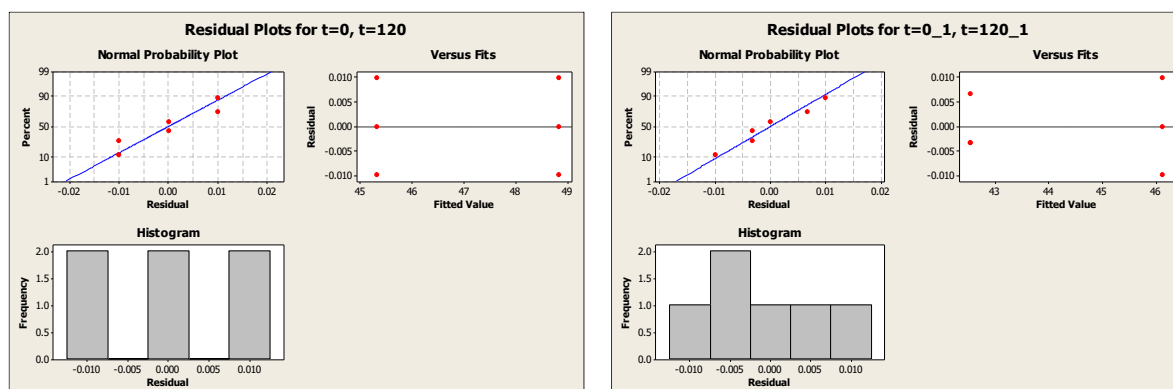


Fig. 30. Gráficas de residuos de medias de *S por la prueba de Tukey durante la fermentación en medio sólido de exoesqueletos de camarón y chapulín.

Anexo A-8

Análisis de Varianza de *S de durante fermentación en medio sólido de exoesqueletos de camarón y chapulín

*L contra SUSTRATOS (CAMARÓN, CHAPULÍN), TIEMPO (t=0, t=120)

Fuente	GL	SC	CM	F	P
SUSTRATO	1	12.6025	12.6025	5041.00	0.009
TIEMPO	1	7.5625	7.5625	3025.00	0.012
Error	1	0.0025	0.0025		
Total	3	20.1675			

S = 0.05 R-cuad= 99.99% R-cuad(adj) = 99.96%

Agrupación de información utilizando el método Tukey (CAMARÓN)

	N	Promedio	Agrupamiento
t=0	3	48.8400	A
t=120	3	45.3200	B

Agrupación de información utilizando el método Tukey (CHAPILÍN)

	N	Promedio	Agrupamiento
t=0_1	3	46.12000	A
t=120_1	3	42.54333	B

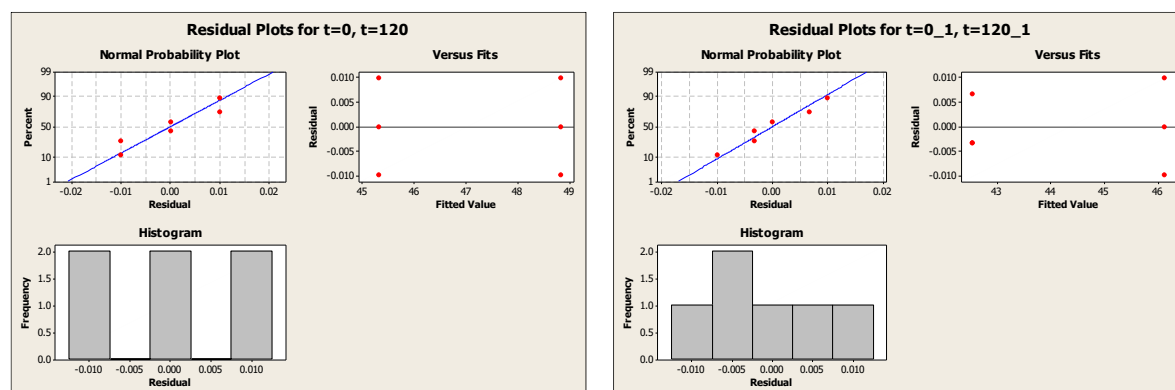


Fig. 31. Gráficas de residuos de medias de *L por la prueba de Tukey durante la fermentación en medio sólido de exoesqueletos de camarón y chapulín.

Anexo A-9

Análisis de Varianza del %Proteína de durante el tratamiento Químico de exoesqueletos de camarón y chapulín

% PROTEINA contra SUSTRATOS (CAMARÓN, CHAPULÍN), TRATAMIENTO (S/TRATAMIENTO, T. ACIDO, T. ALCALINO, T. BLANQUEADO)

Fuente	GL	SC	CM	F	P
SUSTRATO	1	18.21	18.21	159.77	0.001
TRATAMIENTO	3	4527.73	1509.24	13241.40	0.000
Error	3	0.34	0.11		
Total	7	4546.28			

S = 0.3376 R-cuad= 99.99% R-cuad(adj) = 99.98%

Agrupación de información utilizando el método Tukey (CAMARÓN)

	N	Promedio	Agrupamiento
S/TRATAMIENTO	3	49.7320	A
T. ACIDO	3	48.9620	B
T. ALCALINO	3	2.5620	C
T. BLANQUEADO	3	0.5400	D

Agrupación de información utilizando el método Tukey (CHAPILÍN)

	N	Promedio	Agrupamiento
S/TRATAMIENTO_1	3	52.9720	A
T.ACIDO_1	3	51.2720	B
T. ALCALINO_1	3	5.7320	C
T. BLANQUEADO_1	3	3.8900	D

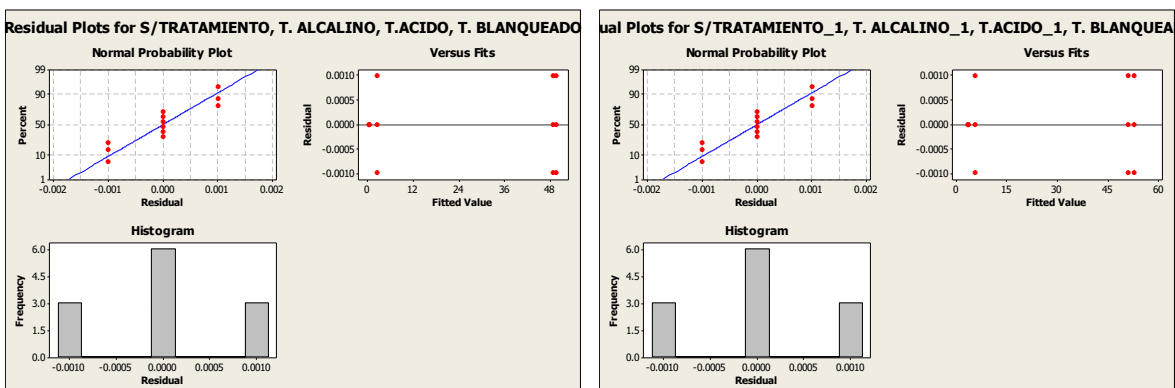


Fig. 32. Gráficas de residuos de medias del %Proteína por la prueba de Tukey durante el tratamiento Químico de exoesqueletos de camarón y chapulín

Anexo A-10

Análisis de Varianza del %Desproteínización de durante el tratamiento Químico de exoesqueletos de camarón y chapulín

% DESPROTEINIZACION contra SUSTRATOS (CAMARÓN, CHAPULÍN), TRATAMIENTO (S/TRATAMIENTO, T. ACIDO, T. ALCALINO, T. BLANQUEADO)

Fuente	GL	SC	CM	F	P
TRATAMIENTO	3	17211.1	5737.03	721.45	0.000
SUSTRATO	1	13.2	13.18	1.66	0.288
Error	3	23.9	7.95		
Total	7	17248.1			

S = 2.820 R-cuad= 99.86% R-cuad(adj) = 99.68%

Agrupación de información utilizando el método Tukey (CAMARÓN)

	N	Promedio	Agrupamiento
T. BLANQUEADO_1	3	92.6640	A
T. ALCALINO_1	3	89.1720	B
T.ACIDO_1	3	3.2267	C
S/TRATAMIENTO_1	3	0.0000	D

Agrupación de información utilizando el método Tukey (CHAPILÍN)

	N	Promedio	Agrupamiento
T. BLANQUEADO_1	3	92.6640	A
T. ALCALINO_1	3	89.1720	B
T.ACIDO_1	3	3.2267	C
S/TRATAMIENTO_1	3	0.0000	D

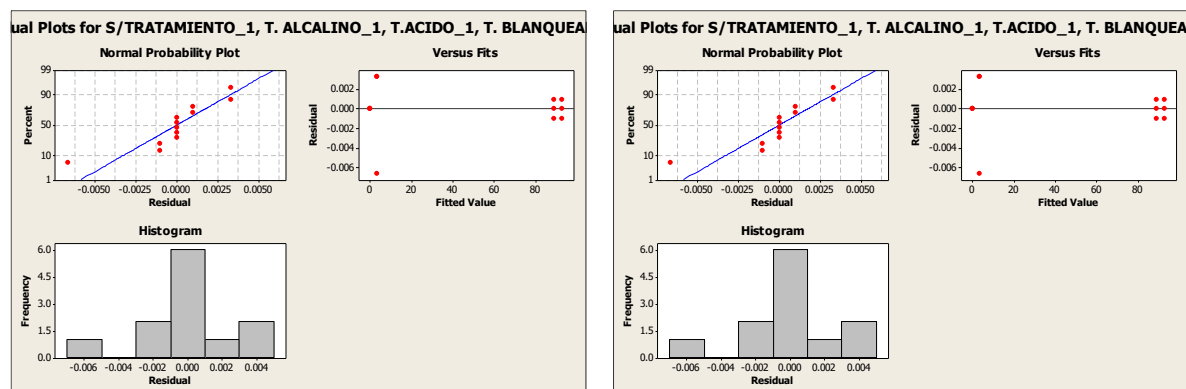


Fig. 33. Gráficas de residuos de medias del %Desproteínización por la prueba de Tukey durante el tratamiento Químico de exoesqueletos de camarón y chapulín

Anexo A-11

Análisis de Varianza del %Cenizas de durante el tratamiento Químico de exoesqueletos de camarón y chapulín

% CENIZAS contra SUSTRATOS (CAMARÓN, CHAPULÍN), TRATAMIENTO (S/TRATAMIENTO, T. ACIDO, T. ALCALINO, T. BLANQUEADO)

Fuente	GL	SC	CM	F	P
SUSTRATO	1	509.60	509.603	2.97	0.018
TRATAMIENTO	3	1417.11	472.370	2.75	0.214
Error	3	514.99	171.665		
Total	7	2441.71			

S = 13.10 R-cuad= 78.91% R-cuad(adj) = 50.79%

Agrupación de información utilizando el método Tukey (CAMARÓN)

S/TRATAMIENTO	N	Promedio	Agrupamiento
S/TRATAMIENTO	3	43.2920	A
T. ALCALINO	3	42.9727	B
T. ACIDO	3	2.8620	C
T. BLANQUEADO	3	0.7920	D

Agrupación de información utilizando el método Tukey (CHAPILÍN)

S/TRATAMIENTO_1	N	Promedio	Agrupamiento
S/TRATAMIENTO_1	3	19.2120	A
T. ALCALINO_1	3	4.6620	B
T. ACIDO_1	3	1.5720	C
T. BLANQUEADO_1	3	0.6220	D

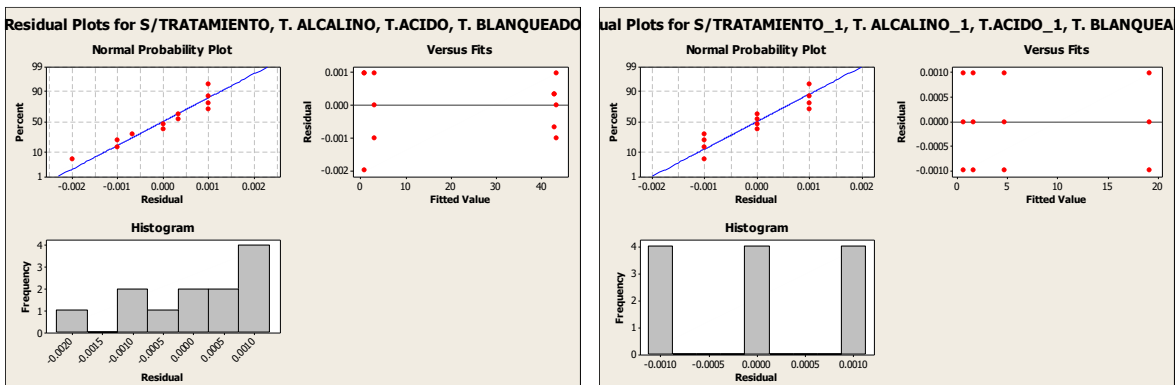


Fig. 34. Gráficas de residuos de medias del %Cenizas por la prueba de Tukey durante el tratamiento Químico de exoesqueletos de camarón y chapulín

Anexo A-12

Análisis de Varianza del %Desmineralización de durante el tratamiento Químico de exoesqueletos de camarón y chapulín

% DESMINERALIZACIÓN contra SUSTRATOS (CAMARÓN, CHAPULÍN), TRATAMIENTO (S/TRATAMIENTO, T. ACIDO, T. ALCALINO, T. BLANQUEADO)

Fuente	GL	SC	CM	F	P
TRATAMIENTO	3	13014.4	4338.14	6.01	0.088
SUSTRATO	1	647.8	647.82	0.90	0.413
Error	3	2166.9	722.32		
Total	7	15829.2			

S = 26.88 R-cuad= 86.31% R-cuad(adj) = 68.06%

Agrupación de información utilizando el método Tukey (CAMARÓN)

	N	Promedio	Agrupamiento
T. BLANQUEADO	3	98.1920	A
T. ACIDO	3	93.3920	B
T. ALCALINO	3	0.7220	C
S/TRATAMIENTO	3	0.0000	D

Agrupación de información utilizando el método Tukey (CHAPILÍN)

	N	Promedio	Agrupamiento
T. BLANQUEADO	3	98.1920	A
T. ACIDO	3	93.3920	B
T. ALCALINO	3	0.7220	C
S/TRATAMIENTO	3	0.0000	D

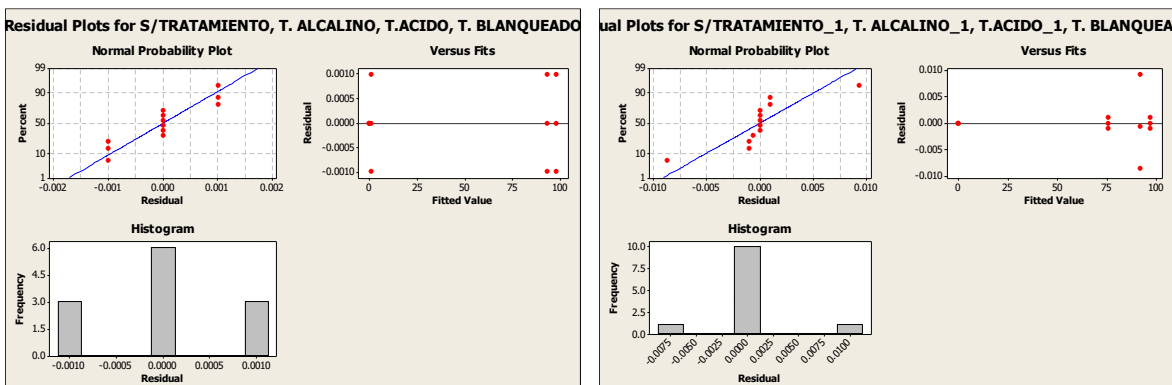


Fig. 35 Gráficas de residuos de medias del %Desmineralización por la prueba de Tukey durante el tratamiento Químico de exoesqueletos de camarón y chapulín

Anexo A-13

Análisis de Varianza del °H de durante el tratamiento Químico de exoesqueletos de camarón y chapulín

°HEU contra SUSTRATOS (CAMARÓN, CHAPULÍN), TRATAMIENTO (S/TRATAMIENTO, T. ACIDO, T. ALCALINO, T. BLANQUEADO)

Fuente	GL	SC	CM	F	P
TRATAMIENTO	3	1315.59	438.530	30.53	0.009
SUSTRATO	1	4.50	4.500	0.31	0.615
Error	3	43.09	14.363		
Total	7	1363.18			

S = 3.790 R-cuad= 96.84% R-cuad(adj) = 92.62%

Agrupación de información utilizando el método Tukey (CAMARÓN)

	N	Promedio	Agrupamiento
S/TRATAMIENTO	3	35.1200	A
T. ALCALINO	3	28.7200	B
T.ACIDO	3	27.4200	C
T. BLANQUEADO	3	0.0000	D

Agrupación de información utilizando el método Tukey (CHAPILÍN)

	N	Promedio	Agrupamiento
T.ACIDO_1	3	31.1200	A
T. ALCALINO_1	3	28.2000	B
S/TRATAMIENTO_1	3	26.5200	C
T. BLANQUEADO_1	3	0.0000	D

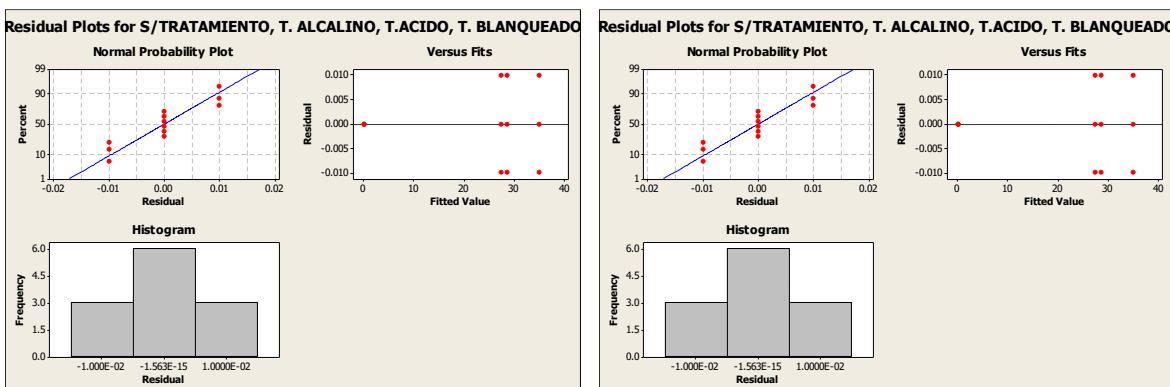


Fig. 36. Gráficas de residuos de medias del %Desmineralización por la prueba de Tukey durante el tratamiento Químico de exoesqueletos de camarón y chapulín

Anexo A-14

Análisis de Varianza del *S de durante el tratamiento Químico de exoesqueletos de camarón y chapulín

***S contra SUSTRATOS (CAMARÓN, CHAPULÍN), TRATAMIENTO (S/TRATAMIENTO, T. ACIDO, T. ALCALINO, T. BLANQUEADO)**

Fuente	GL	SC	CM	F	P
SUSTRATO	1	5289.06	5289.06	29.70	0.012
TRATAMIENTO	3	653.02	217.67	1.22	0.436
Error	3	534.33	178.11		
Total	7	6476.42			

S = 13.35 R-cuad= 91.75% R-cuad(adj) = 80.75%

Agrupación de información utilizando el método Tukey (CAMARÓN)

	N	Promedio	Agrupamiento
T. BLANQUEADO	3	100.0000	A
T.ACIDO	3	97.6200	B
T. ALCALINO	3	90.2000	C
S/TRATAMIENTO	3	68.2200	D

Agrupación de información utilizando el método Tukey (CHAPILÍN)

	N	Promedio	Agrupamiento
T.ACIDO_1	3	55.1200	A
T. ALCALINO_1	3	38.9200	B
S/TRATAMIENTO_1	3	33.9200	C
T. BLANQUEADO_1	3	22.2000	D

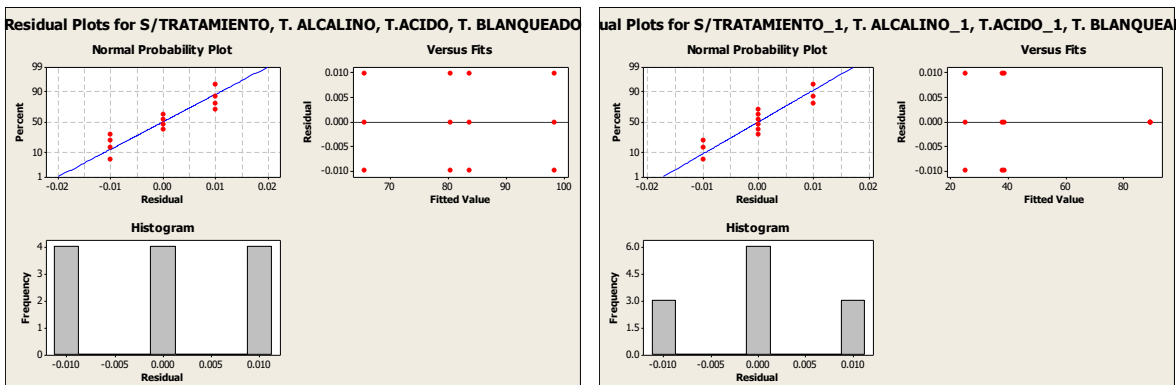


Fig. 37. Gráficas de residuos de medias de *S por la prueba de Tukey durante el tratamiento Químico de exoesqueletos de camarón y chapulín

Anexo A-15

Análisis de Varianza del *L de durante el tratamiento Químico de exoesqueletos de camarón y chapulín

***L contra SUSTRATOS (CAMARÓN, CHAPULÍN), TRATAMIENTO (S/TRATAMIENTO, T. ACIDO, T. ALCALINO, T. BLANQUEADO)**

Fuente	GL	SC	CM	F	P
SUSTRATO	1	2363.28	2363.28	16.31	0.027
TRATAMIENTO	3	2555.04	851.68	5.88	0.090
Error	3	434.82	144.94		
Total	7	5353.15			

S = 12.04 R-cuad= 91.88% R-cuad(adj) = 81.05%

Agrupación de información utilizando el método Tukey (CAMARÓN)

	N	Promedio	Agrupamiento
T. BLANQUEADO	3	98.4200	A
T. ACIDO	3	83.7200	B
T. ALCALINO	3	80.4200	C
S/TRATAMIENTO	3	65.5200	D

Agrupación de información utilizando el método Tukey (CHAPILÍN)

	N	Promedio	Agrupamiento
T. BLANQUEADO_1	3	89.4000	A
T. ACIDO_1	3	38.4200	B
T. ALCALINO_1	3	37.8200	C
S/TRATAMIENTO_1	3	24.9200	D

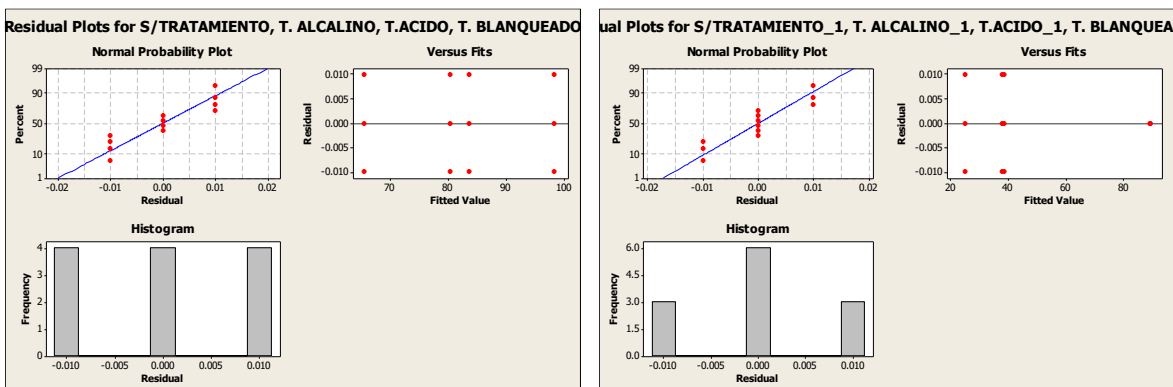


Fig. 38. Gráficas de residuos de medias de *L por la prueba de Tukey durante el tratamiento Químico de exoesqueletos de camarón y chapulín

Anexo A-16

Análisis de Varianza del % Cenizas durante el tratamiento de Ultrasonicación en exoesqueletos de camarón y chapulín

% CENIZAS versus TRATAMIENTO, SUSTRATO

Fuente	GL	SC	CM	F	P
TRATAMIENTO	2	0.4800	0.2400	16.02	0.059
SUSTRATO	1	27.4462	27.4462	1831.90	0.001
Error	2	0.0300	0.0150		
Total	5	27.9562			

S = 0.1224 R-cuad = 99.89% R-cuad(adj) = 99.73%

Agrupación de información utilizando el método Tukey (CAMARÓN)

N	Promedio	Agrupamiento
30%_3	13.300420	A
35%_3	13.001200	B
40%_3	12.771200	C

Agrupación de información utilizando el método Tukey (CHAPILÍN)

N	Promedio	Agrupamiento
30%_1_3	17.707920	A
35%_1_3	17.345112	B
40%_1_3	16.852052	C

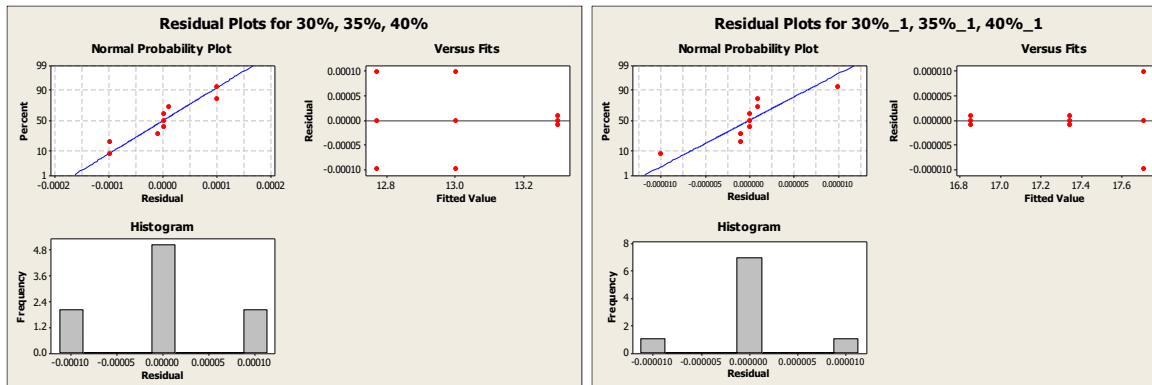


Fig. 39. Gráficas de residuos de medias del %Cenizas por la prueba de Tukey durante el pretratamiento de ultrasonicación de exoesqueletos de camarón y chapulín.

Anexo A-17

Análisis de Varianza del contenido de proteína soluble durante el tratamiento de Ultrasonicación en exoesqueletos de camarón y chapulín

Fuente	GL	SC	CM	F	P
TRATAMIENTO	2	1251.5	625.7	48.41	0.020
SUSTRATO	1	16734.5	16734.5	1294.66	0.001
Error	2	25.9	12.9		
Total	5	18011.9			

S = 3.595 R-cuad = 99.86% R-cuad(adj) = 99.64%

Agrupación de información utilizando el método Tukey (CAMARÓN)

	N	Promedio	Agrupamiento
40%	3	233.9220	A
35%	3	215.8520	B
30%	3	203.8320	C

Agrupación de información utilizando el método Tukey (CHAPILÍN)

	N	Promedio	Agrupamiento	
40%	1	3	133.6692	A
35%	1	3	109.5920	B
30%	1	3	93.4720	C

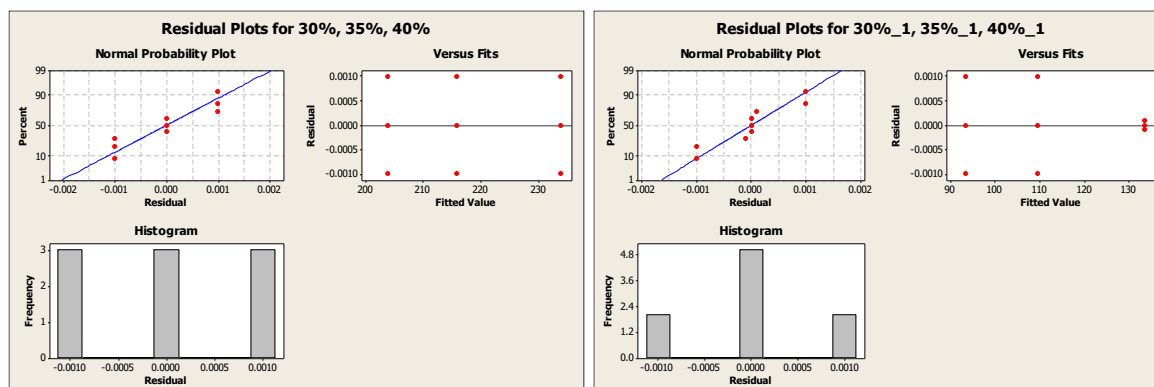


Fig. 40. Gráficas de residuos de medias del contenido de proteína soluble por la prueba de Tukey durante el pretratamiento de ultrasonicación de exoesqueletos de camarón y chapulín.

Anexo A-18

Análisis de Varianza de °H durante el tratamiento de Ultrasonicación en exoesqueletos de camarón y chapulín

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Factor	3	418.3425	139.4475	1394475.00	0.000
Error	8	0.0008	0.0001		
Total	11	418.3433			

S = 0.01 R-cuad = 100.00% R-cuad(adj) = 100.00%

Agrupación de información utilizando el método Tukey

	N	Promedio	Agrupamiento
°H_0_1	3	41.6200	A
°H_0	3	30.5200	B
°H_120	3	28.1200	C
°H_120_1	3	26.5200	D

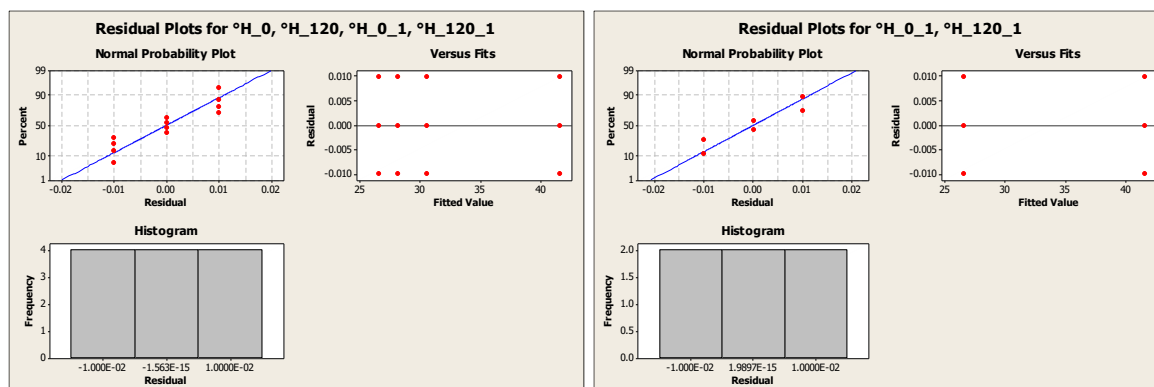


Fig. 41. Gráficas de residuos de medias de °H por la prueba de Tukey durante el pretratamiento de ultrasonicación de exoesqueletos de camarón y chapulín.

Anexo A-19

Análisis de Varianza de *S durante el tratamiento de Ultrasonicación en exoesqueletos de camarón y chapulín

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Factor	3	3606.203	1202.068	12020675.00	0.000
Error	8	0.001	0.000		
Total	11	3606.203			

S = 0.01 R-cuad = 100.00% R-cuad(adj) = 100.00%

Agrupación de información utilizando el método Tukey

	N	Promedio	Agrupamiento
°S_0	3	68.2200	A
°S_0_1	3	67.4200	B
°S_120_1	3	33.9200	C
°S_120	3	32.4200	D

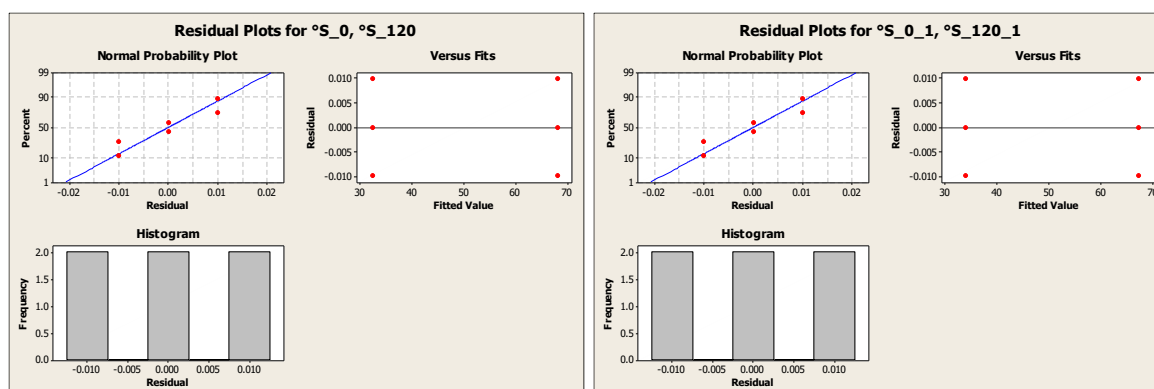


Fig. 42. Gráficas de residuos de medias de *S por la prueba de Tukey durante el pretratamiento de ultrasonicación de exoesqueletos de camarón y chapulín.

Anexo A-20

Análisis de Varianza de *S durante el tratamiento de Ultrasonicación en exoesqueletos de camarón y chapulín

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Factor	3	7808	2603	6.69	0.007
Error	12	4665	389		
Total	15	12472			

S = 19.72 R-cuad = 62.60% R-cuad(adj) = 53.25%

Agrupación de información utilizando el método Tukey

	N	Promedio	Agrupamiento
°L_120	4	78.09	A
°L_0	4	66.19	B
°L_0_1	4	30.50	C
°L_120_1	4	27.17	D

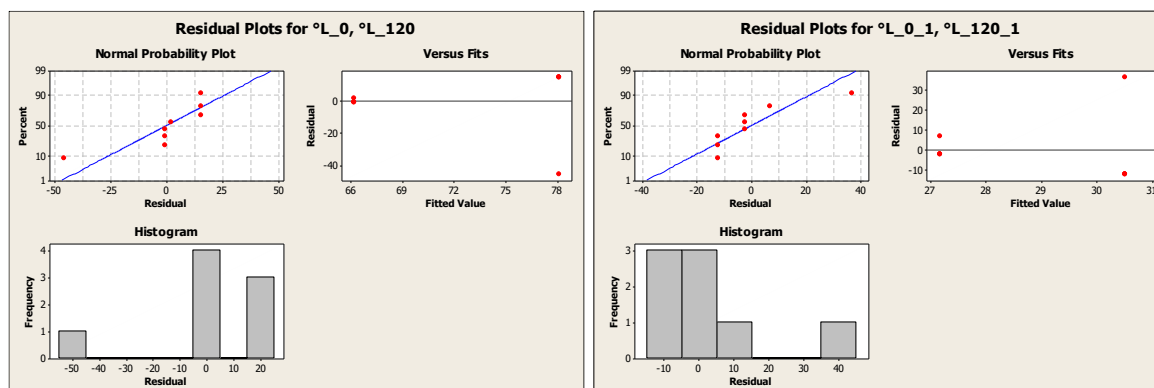


Fig. 43. Gráficas de residuos de medias de *L por la prueba de Tukey durante el pretratamiento de ultrasonicación de exoesqueletos de camarón y chapulín.

Anexo A-21

Análisis de Varianza del %DP durante el pretratamiento de fermentación en medio sólido de exoesqueletos de camarón y chapulín.

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Factor	1	49.93935	49.93935	49939350.00	0.000
Error	4	0.00000	0.00000		
Total	5	49.93935			

S = 0.001000 R-cuad = 100.00% R-cuad(adj) = 100.00%

	N	Promedio	Agrupamiento
CAMARON	3	56.82200	A
CHAPULÍN	3	51.05200	B

Anexo A-22

Análisis de Varianza del %DM durante el pretratamiento de fermentación en medio sólido de exoesqueletos de camarón y chapulín.

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Factor	1	24.24060	24.24060	24240600.00	0.000
Error	4	0.00000	0.00000		
Total	5	24.24060			

S = 0.001 R-Sq = 100.00% R-Sq(adj) = 100.00%

Agrupación de información utilizando el método Tukey

	N	Promedio	Agrupamiento
CAMARÓN_1	3	51.79200	A
CHAPULÍN_1	3	47.77200	B

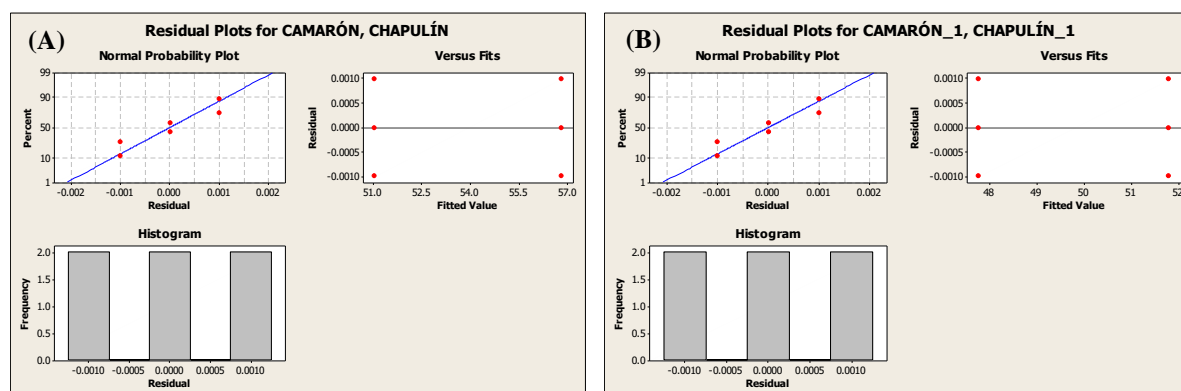


Fig. 44. Gráficas de residuos de medias del %DP (A) y DM (B) por la prueba de Tukey durante el pretratamiento de fermentación en medio sólido de exoesqueletos de camarón y chapulín.

Anexo A-23

Análisis de Varianza del %DP durante Tratamiento combinado de FMS-Ultrasonicación de exoesqueletos de camarón y chapulín.

Fuente	GL	SC	CM	F	P
TRATAMIENTO	2	4168.09	2084.04	294.83	0.003
SUSTRATO	1	7.62	7.62	1.08	0.408
Error	2	14.14	7.07		
Total	5	4189.84			

S = 2.659 R-cuad = 99.66% R-cuad(adj) = 99.16%

	N	Promedio	Agrupamiento
FMS+SONICACIÓN	3	84.8120	A
FMS+SONICACIÓN_1	3	82.1213	B
FMS	3	56.8220	C
FMS_1	3	51.0520	D
SONICACION_1	3	19.8420	E
SONICACION	3	18.1320	F

Anexo A-24

Análisis de Varianza del %DM durante Tratamiento combinado de FMS-Ultrasonicación de exoesqueletos de camarón y chapulín.

Fuente	GL	SC	CM	F	P
TRATAMIENTO	2	4241.25	2120.63	2750.31	0.000
SUSTRATO	1	12.27	12.27	15.91	0.057
Error	2	1.54	0.77		
Total	5	4255.06			

S = 0.8781 R-cuad= 99.96% R-cuad(adj) = 99.91%

	N	Promedio	Agrupamiento
FMS+SONICACIÓN	3	79.3920	A
FMS+SONICACIÓN_1	3	76.3820	B
FMS	3	51.7920	C
FMS_1	3	47.7720	D
SONICACION	3	13.7320	E
SONICACION_1	3	12.1820	F

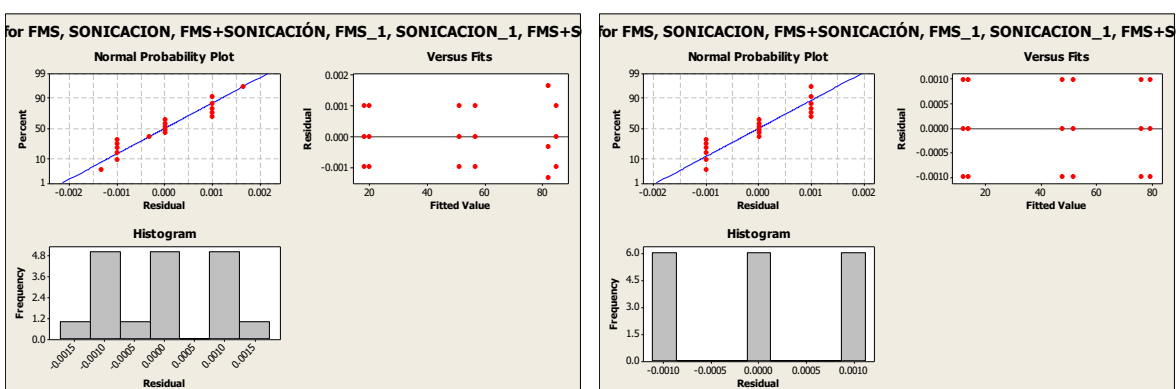


Fig. 45. Gráficas de residuos de medias del %DP (A) y DM (B) por la prueba de Tukey durante Tratamiento combinado de FMS-Ultrasonicación de exoesqueletos de camarón y chapulín.

Anexo A-25

Análisis de Varianza del %DP durante Tratamiento combinado de FMS-Hidrólisis química de exoesqueletos de camarón y chapulín.

Fuente	GL	SC	CM	F	P
TRATAMIENTO	2	2023.93	1011.96	1558.03	0.001
SUSTRATO	1	36.41	36.41	56.05	0.017
Error	2	1.30	0.65		
Total	5	2061.64			

S = 0.8059 R-cuad = 99.94% R-cuad(adj) = 99.84%

	N	Promedio	Agrupamiento
FMS+T. QUIMICO	3	95.6720	A
T. QUIMICO	3	94.5520	B
FMS+T. QUIMICO_1	3	92.0420	C
T. QUIMICO_1	3	89.1720	D
FMS	3	56.8220	E
FMS_1	3	51.0520	F

Anexo A-26

Análisis de Varianza del %DM durante Tratamiento combinado de FMS-Hidrólisis química de exoesqueletos de camarón y chapulín.

Fuente	GL	SC	CM	F	P
TRATAMIENTO	2	2652.88	1326.44	458.60	0.002
SUSTRATO	1	3.84	3.84	1.33	0.368
Error	2	5.78	2.89		
Total	5	2662.50			

S = 1.701 R-cuad = 99.78% R-cuad(adj) = 99.46%

	N	Promedio	Agrupamiento
FMS+T. QUIMICO_1	3	96.3720	A
FMS+T. QUIMICO	3	95.5820	B
T. QUIMICO	3	93.3920	C
T. QUIMICO_1	3	91.8207	D
FMS	3	51.7920	E
FMS_1	3	47.7720	F

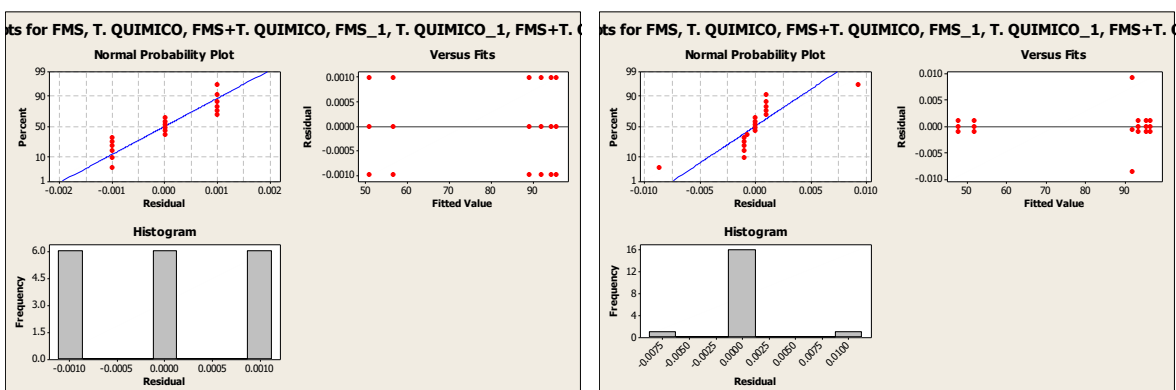


Fig. 46. Gráficas de residuos de medias del %DP (A) y DM (B) por la prueba de Tukey durante Tratamiento combinado de FMS-Hidrólisis química de exoesqueletos de camarón y chapulín.

Anexo A-27

Análisis de Varianza del %DP durante Tratamiento combinado de FMS-Hidrólisis Enzimática de exoesqueletos de camarón y chapulín.

Fuente	GL	SC	CM	F	P
TRATAMIENTO	2	3265.36	1632.68	638.00	0.002
SUSTRATO	1	11.84	11.84	4.63	0.164
Error	2	5.12	2.56		
Total	5	3282.33			

S = 1.600 R-Sq = 99.84% R-Sq(adj) = 99.61%

	N	Promedio	Agrupamiento
T. ENZIMATICO	3	52.2000	A
FMS	3	51.7920	B
T. ENZIMATICO_1	3	47.7920	C
FMS_1	3	47.7720	C
FMS+T. ENZIMATICO	3	0.4520	D
FMS+T. ENZIMATICO_1	3	0.2520	E

Anexo A-28

Análisis de Varianza del %DM durante Tratamiento combinado de FMS-Hidrólisis Enzimática de exoesqueletos de camarón y chapulín.

Fuente	GL	SC	CM	F	P
TRATAMIENTO	2	3360.37	1680.18	494.44	0.002
SUSTRATO	1	11.76	11.76	3.46	0.204
Error	2	6.80	3.40		
Total	5	3378.92			

S = 1.843 R-cuad= 99.80% R-cuad(adj) = 99.50%

	N	Promedio	Agrupamiento
T. ENZIMATICO	3	80.4520	A
T. ENZIMATICO_1	3	78.7120	B
FMS	3	56.8220	C
FMS_1	3	51.0520	D
FMS+T. ENZIMATICO	3	22.1820	E
FMS+T. ENZIMATICO_1	3	21.2920	F

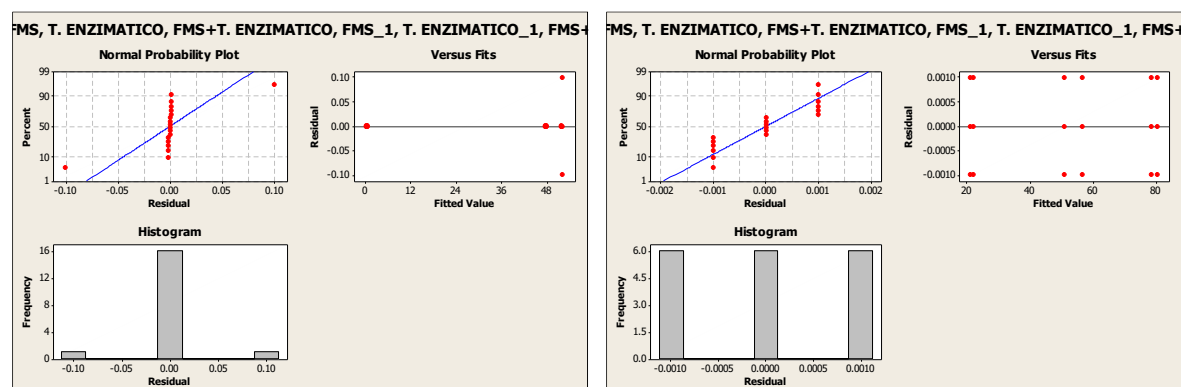


Fig. 47. Gráficas de residuos de medias del %DP (A) y DM (B) por la prueba de Tukey durante Tratamiento combinado de FMS-Hidrólisis Enzimática de exoesqueletos de camarón y chapulín.

Anexo B-1

Modelación del % Humedad durante fermentación en medio sólido de exoesqueletos de camarón y chapulín.

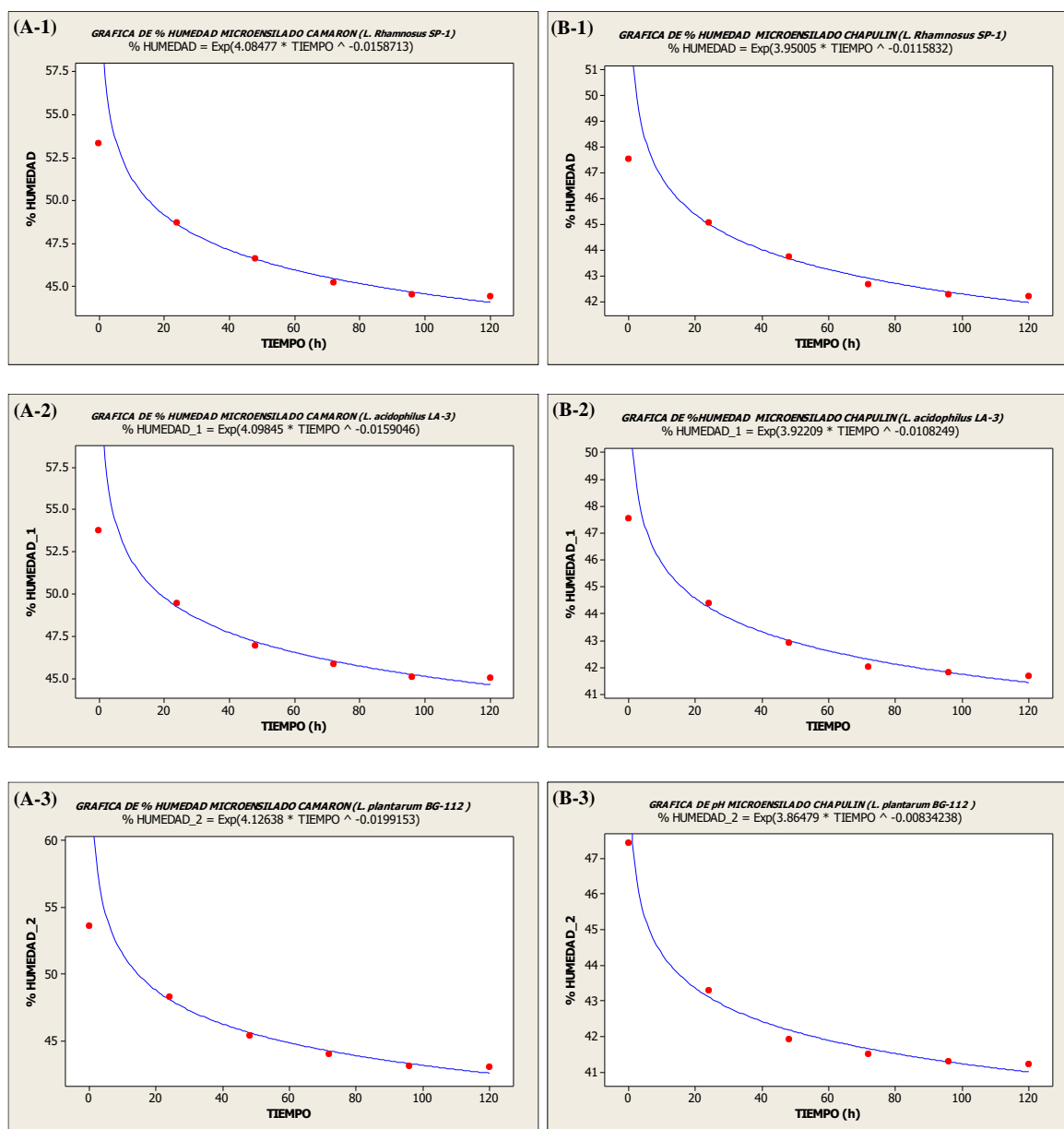


Fig. 48. Modelaciones del % Humedad para la fermentación ácido láctica de exoesqueletos de Camarón (A) y Chapulín (B) utilizando *L. rhamnosus* SP-1(1), *L. acidophilus* LA-3 (2) y *L. plantarum* BG-112 (3)

Anexo B-2

Modelación del % Cenizas durante fermentación en medio sólido de exoesqueletos de camarón y chapulín.

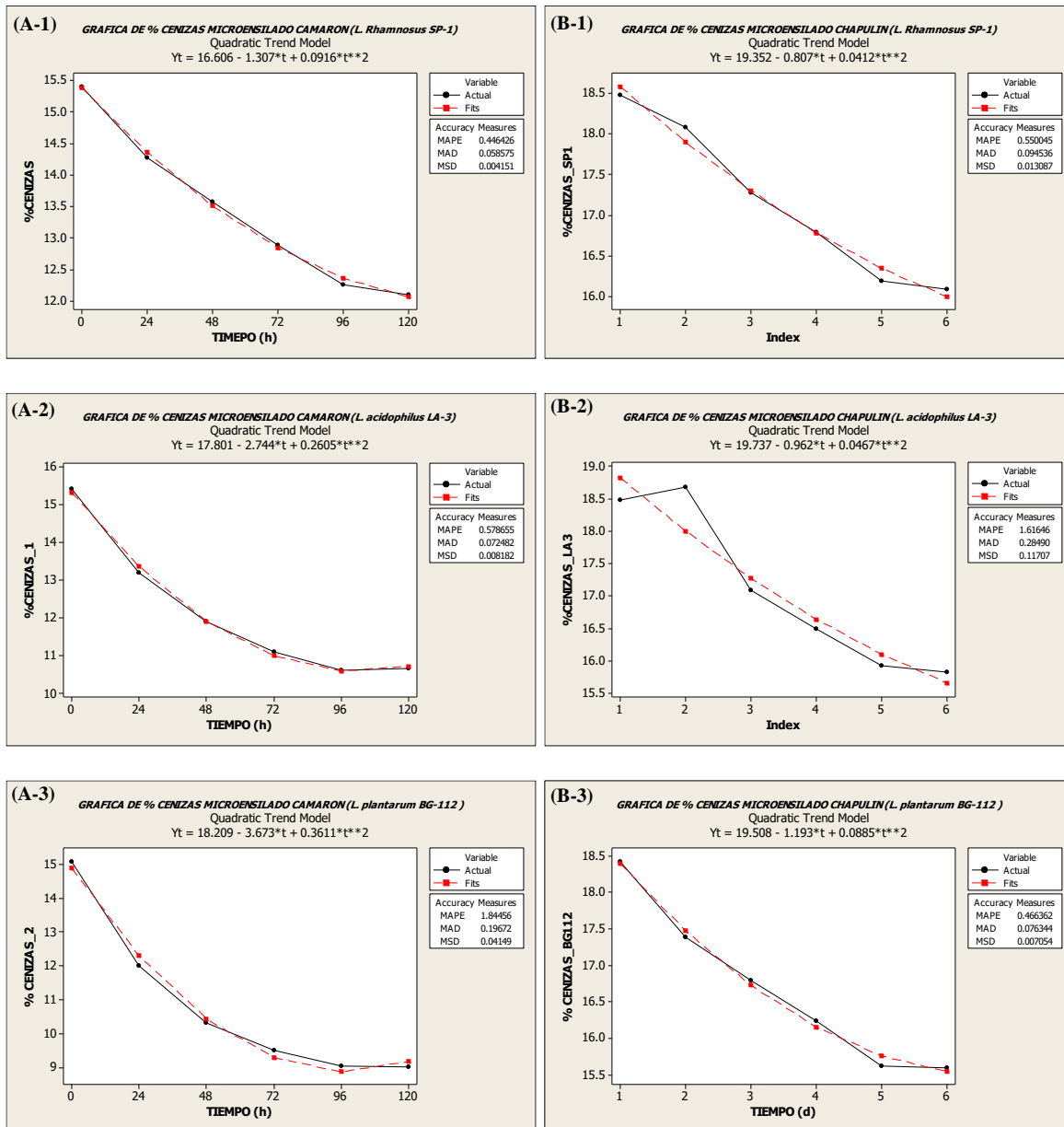


Fig. 49. Modelaciones del % Cenizas para la fermentación ácido láctica de exoesqueletos de Camarón (A) y Chapulín (B) utilizando *L. rhamnosus* SP-1(1), *L. acidophilus* LA-3 (2) y *L. plantarum* BG-112 (3)

Anexo B-3

Modelación del % ATT durante fermentación en medio sólido de exoesqueletos de camarón y chapulín.

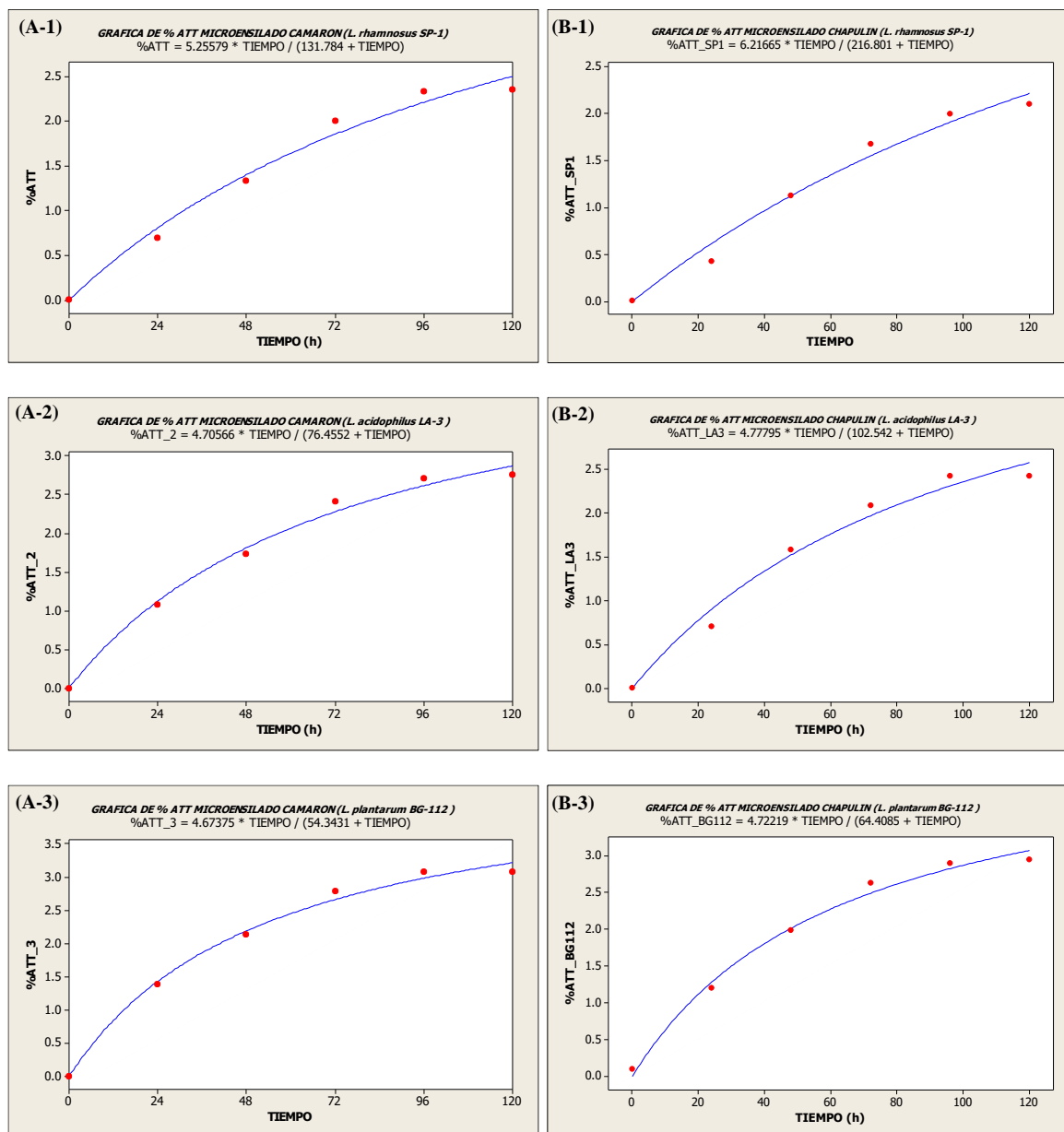


Fig. 50. Modelaciones del % ATT para la fermentación ácido láctica de exoesqueletos de Camarón (A) y Chapulín (B) utilizando *L. rhamnosus* SP-1(1), *L. acidophilus* LA-3 (2) y *L. plantarum* BG-112 (3).

Anexo B-4

Modelación del pH durante fermentación en medio sólido de exoesqueletos de camarón y chapulín.

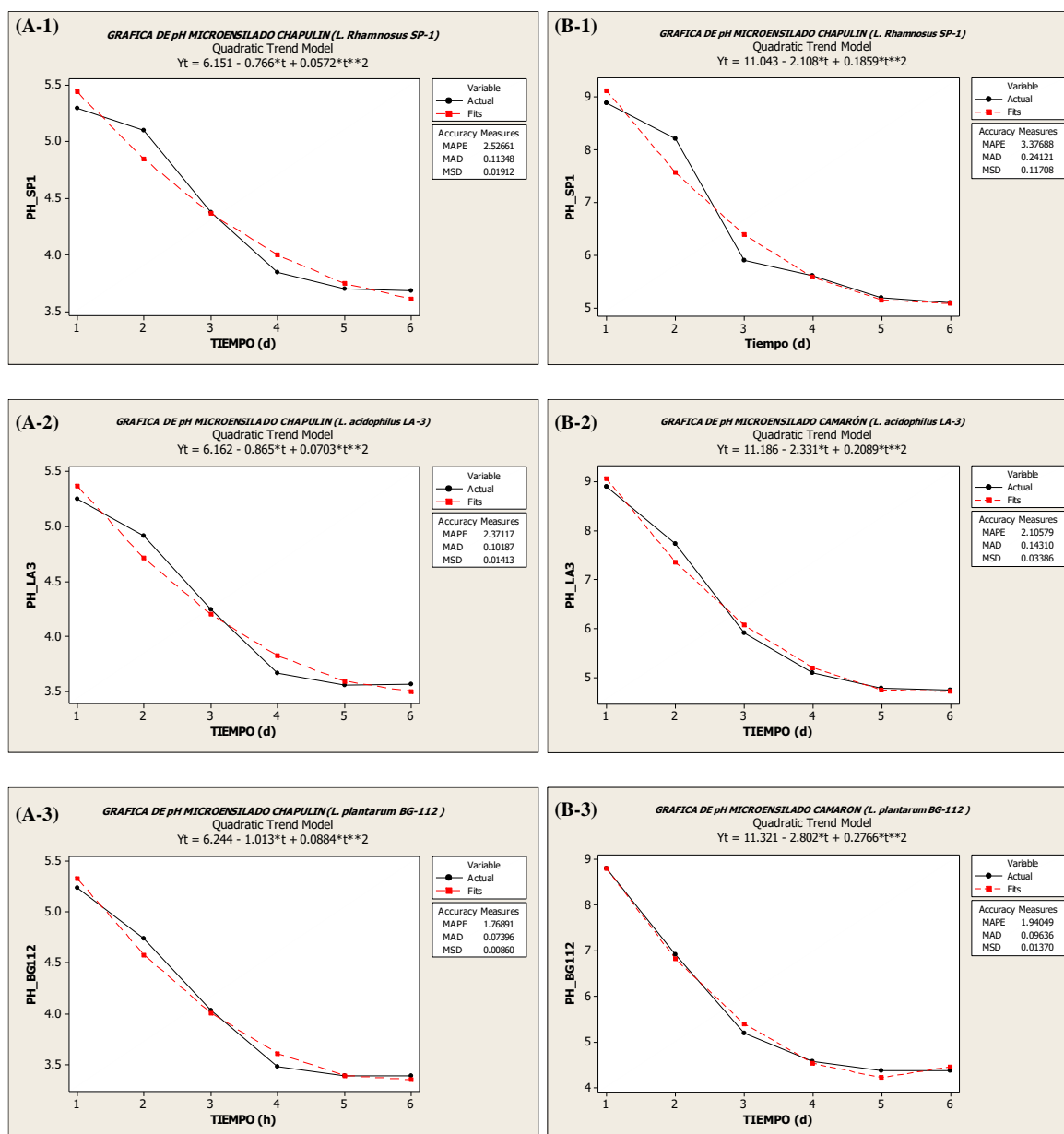


Fig. 51. Modelaciones del pH para la fermentación ácido láctica de exoesqueletos de Camarón (A) y Chapulín (B) utilizando *L. rhamnosus* SP-1(1), *L. acidophilus* LA-3 (2) y *L. plantarum* BG-112 (3).

XII. ARTICULOS Y PRESENTACIONES EN CONGRESOS DERIVADOS DE ESTA TESIS

1. ***“Effect of chemical biological and physical purification on chitin recovery from exoskeletons of shrimp (penaeus sp) and grasshopper (sphenarium purpurascens)”*** A. Amador-Mendoza, S. Huerta-Ochoa, E. Herman-Lara, I. Membrillo-Venegas, A. Aguirre Cruz, M. A. Vivar Vera, L. Ramírez-Coutiño. Revista Mexicana de Ingeniería Química. (2016).
2. ***“Comparative Study of Biological Microensilados from Grasshopper Exoskeletons of Shrimp and Solid Fermentation in Half”***. XXXV Meeting of the Mexican Academy of Research and Education in Chemical Engineering A.C. (AMIDIQ). Puerto Vallarta, Jalisco (2015)
3. ***“Fermentation Waste and Obtaining Chitinous Biotechnological Interest Compounds as an Alternative to The Reduction of Organic Pollutants from”*** XIII International Congress and XIV National Congress of Environmental Science Sustainable Management. Acapulco, Guerrero/México (2015).
4. ***“Efecto del método de fermentación en medio sólido y Sonicación en la desproteínización y desmineralización de camarón (Penaeus sp) y chapulin (Sphenarium purpurascens) para la obtención de quitina”*** A. Amador-Mendoza, S. Huerta-Ochoa, E. Herman-Lara, I. Membrillo-Venegas, A. Aguirre Cruz, M. A. Vivar Vera. VII Simposio Iberoamericano de Quitina. Sociedad Iberoamericana de Quitina (SIAQ). Nuevo Vallarta, Nayarit, Mexico (2015).
5. ***“Fermentación en medio sólido por vía microbiana como pretratamiento para la obtención de quitina con potencial en la biorremediación agrícola aplicables en la región de la chinantla”***. XLI Aniversario del Instituto Tecnológico de la Cuenca del Papaloapan. Tuxtepec, Oaxaca, México (2014).