



**Casa abierta al tiempo**  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

**OBTENCIÓN DE QUITINA A PARTIR DE DESECHOS PESQUEROS MEDIANTE  
UN SISTEMA DE CULTIVO CON *Rhizopus oligosporus* y *Lactobacillus spp.***

**T E S I S**  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA**  
P R E S E N T A

**BIOL. RUT ARANDAY GARCÍA**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**DRA. CONCEPCIÓN KEIKO SHIRAI MATSUMOTO**

Julio 2013

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNCP) del CONACYT, con la referencia 001465”.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biopolímeros del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto. El trabajo experimental se llevó a cabo con financiamiento del Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (No. PICSA 11-69).

México D.F. a 19 de julio de 2013

El H. Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

***Obtención de quitina a partir de desechos pesqueros mediante un sistema de cultivo con *Rhizopus oligosporus* y *Lactobacillus spp.****

que presentó:

**Biol. Rut Aranday García**

**Comité tutorial:**

**Directora de tesis:**

**Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto.**

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Biotecnología.  
Laboratorio de Biopolímeros.

**Presidente:**

**Dr. Miquel Gimeno Seco.**

Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.



**Secretario:**

**Dr. Alberto López Luna**

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Biotecnología.  
Laboratorio de Biopolímeros.



**Vocales:**

**Dra. Emma Berta Gutiérrez-Cirlos Madrid**

Universidad Nacional Autónoma de México. Unidad de Biomedicina, Laboratorio 2,  
Facultad de Estudios Superiores Iztacala.



**M. en B. Zaizy Rocha Pino**

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Biotecnología.  
Laboratorio de Biopolímeros.



## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Keiko Shirai Matsumoto por toda la ayuda brindada, la paciencia y la asesoría a lo largo de este trabajo.

A la Dra. Emma Berta Gutiérrez-Cirlos Madrid, por la revisión de éste trabajo, la atención y asesoría brindadas.

Al Dr. Alberto López Luna, por la asesoría, las consultas, los favores, los consejos y la gran disposición que siempre presentó para brindarme su ayuda.

Al Dr. Miquel Gimeno Seco por las sugerencias y consejos brindados durante la revisión de este trabajo.

A la M. en B. Zaizy Rocha Pino, por los consejos, sugerencias, apoyo y asesoría brindadas en lo relacionado a este trabajo.

Al Dr. Ladislao Arias Margarito por la disposición que siempre presentó para brindarme ayuda y resolver mis dudas.

A todos los integrantes del laboratorio T-166 por la ayuda y disposición brindadas.

A mis compañeros de laboratorio por brindarme siempre su ayuda.

A mis compañeros y amigos Itzel Jimena, Monse, Lupita, Marco, Andrés, Carmen, Facundo, Itzel Ramírez, Alfonso. Gracias por la ayuda, los consejos, las asesorías, las pláticas, las bromas, gracias por orientarme y corregirme cuando lo necesitaba, gracias por siempre estar dispuestos a ayudar, gracias por escucharme cuando lo necesite y más que nada, gracias por haber sido parte de esta grandiosa etapa en mi vida.

A la Familia Ibarra Toquero por brindarme ayuda en momentos de necesidad, por apoyarme y ayudarme en todo momento, pero sobre todo, gracias por permitirme formar parte de su familia.

A la Universidad Autónoma Metropolitana, porque dentro de esta institución logré aprender y desarrollarme.

## DEDICATORIAS

Antes que nada, gracias a Dios por permitirme continuar y fijarme nuevas metas, por darme la capacidad y fuerza necesaria, así como darme el apoyo necesario mediante todas las personas que me rodean.

A mi esposa Sharai, por ser mi mayor inspiración y apoyo. Por todos esos momentos en que estuviste conmigo, por toda tu ayuda, porque sin ti, no podría estar donde estoy ahora. Por todas las veces que leíste artículos conmigo, que me acompañaste a la escuela, que me ayudaste a investigar, que fuiste por mí cuando salía muy tarde, que me consolaste cuando algo no salía bien, que te quedaste despierta conmigo hasta la madrugada mientras terminaba mi trabajo, por distraerme cuando estaba muy estresada, por cuidarme cada vez que me enfermaba. Te amo por ser la persona más increíble que he conocido, por ser tan cariñosa, tan auténtica, tan especial, tan única. Eres la persona con la que quiero estar siempre. Tú eres mi familia.

A mis papas y mi hermana, por siempre confiar en mis capacidades y por preocuparse por mí.

A todos mis amigos, especialmente a Odín, por siempre estar al pendiente de mí y brindarme su amistad y apoyo después de tanto tiempo.

A todas las personas que he conocido hasta ahora, y que con su sola presencia me han dado las bases para ser quien soy.

## CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABLAS	III
LISTA DE ABREVIATURAS	IV
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 PRODUCCIÓN DE CAMARÓN	3
1.2 MICROORGANISMOS ENCONTRADOS EN EL CAMARÓN	3
1.3 QUITINA	4
1.4 OBTENCIÓN DE QUITINA	5
1.5 ENSILADO BIOLÓGICO	6
1.6 DESMINERALIZACIÓN BIOLÓGICA	6
1.7 DESPROTEINIZACIÓN BIOLÓGICA	8
1.8 EXTRACCIÓN BIOLÓGICA DE QUITINA	8
1.9 PIGMENTOS	9
1.10 ANTECEDENTES	9
2 JUSTIFICACIÓN	14
3 HIPÓTESIS	15
4 OBJETIVOS	15
5 METODOLOGÍA	16
5.1 ASPECTOS GENERALES	16
5.1.1 DESECHOS DE CAMARÓN	16
5.1.2 MICROORGANISMOS	16
5.2 PRIMERA ETAPA	16
5.3 SEGUNDA ETAPA	17
5.4 TERCERA ETAPA	18
5.5 ANÁLISIS DE MUESTRAS	18
5.5.1 ANÁLISIS DE CULTIVOS	18
5.5.2 pH y ATT (ACIDEZ TOTAL TITULABLE)	19
5.5.3 ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL	19
5.5.3.1 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD	19
5.5.3.2 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE CENIZAS	20
5.5.3.3 DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO TOTAL, NITRÓGENO PROTEICO Y NITRÓGENO DE QUITINA	20

	5.5.3.4 DETERMINACIÓN DE LOS PORCENTAJES DE DESMINERALIZACIÓN Y DESPROTEINIZACIÓN _____	21
	5.5.4 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES _____	21
	5.5.5 DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS _____	22
	5.5.6 CARACTERIZACIÓN DE PRODUCTO FINAL: QUITINA _____	22
	5.5.6.1 EXTRACCIÓN DE PIGMENTOS _____	22
	5.5.6.2 ANÁLISIS POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE INFRARROJO (ATR-FTIR) _____	22
	5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO _____	22
6	RESULTADOS _____	25
	6.1 DESECHOS DE CAMARÓN _____	25
	6.2 PRIMERA ETAPA _____	25
	6.2.1 pH, ATT, ÁCIDO LÁCTICO Y ÁCIDO ACÉTICO _____	25
	6.2.2 ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL _____	30
	6.2.3 CONSUMO DE AZÚCARES _____	32
	6.3 SEGUNDA ETAPA _____	33
	6.4.1 pH, ATT, ÁCIDOS ORGÁNICOS _____	33
	6.4.2 ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL _____	41
	6.4.3 CONSUMO DE AZÚCARES _____	42
	6.5 CARACTERIZACIÓN DE PRODUCTOS FINALES _____	43
	6.6 TERCERA ETAPA _____	45
	6.6.1 pH y ATT _____	46
	6.6.2 ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL _____	46
	6.7 ANÁLISIS GENERAL _____	48
7	CONCLUSIONES _____	51
8	PERSPECTIVAS _____	51
9	BIBLIOGRAFÍA _____	52

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estructura química de la quitina _____	5
FIGURA 2. Esquema del ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs _____	7
FIGURA 3. Esquema de la metodología aplicada _____	24
<i>Primera etapa</i>	
FIGURA 4. pH inicial y final de los cultivos de <i>R</i> y <i>L</i> con glucosa en desperdicios de camarón a 30°C _____	26
FIGURA 5. ATT de los cultivos de <i>R</i> y <i>L</i> con glucosa en desperdicios de camarón a 30°C _____	27
FIGURA 6. Ácido láctico (mmol/g) de los cultivos <i>R</i> y <i>L</i> con glucosa en desperdicios de camarón a 30°C _____	29
FIGURA 7. Ácido acético (mmol/g) de los cultivos <i>R</i> y <i>L</i> con glucosa en desperdicios de camarón a 30°C _____	30
FIGURA 8. %DM de los cultivos <i>R</i> y <i>L</i> con glucosa en desperdicios de camarón a 30°C _____	30
FIGURA 9. %DP de los cultivos <i>R</i> y <i>L</i> con glucosa en desperdicios de camarón a 30°C _____	31
<i>Segunda etapa</i>	
FIGURA 10. pH inicial, medio (120 h para <i>L/R</i> y 72 h para <i>R/L</i> ) y final (192 h) de cultivos con 20% de glucosa en desperdicios de camarón a 30°C inoculados con dos niveles de inóculo de <i>R</i> y 5% (v/v) de <i>L</i> _____	34
FIGURA 11. ATT de los tiempos medios (120 h para <i>L/R</i> y 72 h para <i>R/L</i> ) y finales (192 h) de cultivos con 20% de glucosa en desperdicios de camarón a 30°C inoculados con dos niveles de inóculo de <i>R</i> y 5% (v/v) de <i>L</i> _____	35
FIGURA 12. Ácido láctico (mmol/g) en muestras finales de cultivos con 20% de glucosa en desperdicios de camarón a 30°C inoculados con dos niveles de inóculo de <i>R</i> y 5% (v/v) de <i>L</i> _____	36
FIGURA 13. Ácido acético (mmol/g) en muestras finales de cultivos con 20% de glucosa en desperdicios de camarón a 30°C inoculados con dos niveles de inóculo de <i>R</i> y 5% (v/v) de <i>L</i> _____	36
FIGURA 14. Ácido cítrico (mmol/g) en muestras finales de cultivos con 20% de glucosa en desperdicios de camarón a 30°C inoculados con dos niveles de inóculo de <i>R</i> y 5% (v/v) de <i>L</i> _____	37
FIGURA 15. Ácido succínico (mmol/g) en muestras finales de cultivos con 20% de glucosa en desperdicios de camarón a 30°C inoculados con dos niveles de inóculo de <i>R</i> y 5% (v/v) de <i>L</i> _____	38
FIGURA 16. Ácido fumárico (mmol/g) en muestras finales de cultivos con 20% de glucosa en desperdicios de camarón a 30°C inoculados con dos niveles de inóculo de <i>R</i> y 5% (v/v) de <i>L</i> _____	38
FIGURA 17. Ácido málico (mmol/g) en muestras finales de cultivos con 20% de glucosa en desperdicios de camarón a 30°C inoculados con dos niveles de inóculo de <i>R</i> y 5% (v/v) de <i>L</i> _____	39
FIGURA 18. Ácido oxálico (mmol/g) en muestras finales de cultivos con 20% de glucosa en desperdicios de camarón a 30°C inoculados con dos niveles de inóculo de <i>R</i> y 5% (v/v) de <i>L</i> _____	40
FIGURA 19. %DM en muestras finales de cultivos con 20% de glucosa en desperdicios de camarón a 30°C inoculados con dos niveles de inóculo de <i>R</i> y 5% (v/v) de <i>L</i> _____	41
FIGURA 20. %DP en muestras finales de cultivos con 20% de glucosa en desperdicios de camarón a 30°C inoculados con dos niveles de inóculo de <i>R</i> y 5% (v/v) de <i>L</i> _____	42
FIGURA 21. Concentración de glucosa en muestras iniciales y finales de cultivos con 20% de glucosa en desperdicios de camarón a 30°C inoculados con dos niveles de inóculo de <i>R</i> y 5% (v/v) de <i>L</i> _____	43
FIGURA 22. Espectro infrarrojo (ATR-FTIR) comparando muestras de Quitina Cruda de los diferentes cultivos con una muestra de Quitina Pura _____	44
<i>Tercera etapa</i>	

<b>FIGURA 23. pH y ATT del cultivo R/L con nivel de inóculo <math>10^3</math> con 20% de glucosa en desperdicios de camarón a 30°C</b>	<b>46</b>
<b>FIGURA 24. %DM del cultivo R/L con nivel de inóculo <math>10^3</math> con 20% de glucosa en desperdicios de camarón a 30°C</b>	<b>47</b>
<b>FIGURA 25. %DM del cultivo R/L con nivel de inóculo <math>10^3</math> con 20% de glucosa en desperdicios de camarón a 30°C</b>	<b>48</b>

## LISTA DE TABLAS

TABLA 1. Diseño experimental para la primera etapa de tratamiento biológico de desperdicios de camarón para obtención de quitina _____	17
TABLA 2. Diseño experimental para la segunda etapa de tratamiento biológico de desperdicios de camarón para obtención de quitina _____	18
TABLA 3. Análisis Químico Proximal de los lotes de desechos de camarón _____	25
TABLA 4. Consumo de azúcares ( $\Delta S$ ) de los cultivos <i>R</i> y <i>L</i> _____	32

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATT: ACIDEZ TOTAL TITULABLE

%C : PORCENTAJE DE CENIZAS

CONAPESCA : COMISIÓN NACIONAL DE ACUACULTURA Y PESCA

DP : DESPROTEINIZACIÓN

DM : DESMINERALIZACIÓN

G :GLUCOSA

%H : PORCENTAJE DE HUMEDAD

HPLC : CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA

L : *Lactobacillus spp* B2

QC : QUITINA CRUDA

R : *Rhizopus oligosporus*

SAGARPA: SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN

SIAP: SERVICIO DE INFORMACIÓN AGROALIMENTARIA Y PESQUERA

## RESUMEN

La quitina, biopolímero componente del exoesqueleto de crustáceos, se extrae comúnmente mediante métodos químicos, lo que genera problemas ambientales así como disminución del peso molecular de la quitina disminuyendo sus aplicaciones posteriores. En virtud de lo anterior, el presente trabajo estudió la extracción biológica de quitina mediante fermentación con dos microorganismos en un sistema en dos etapas, *Lactobacillus spp* B2 (120 h) y *Rhizopus oligosporus* (72 h). *Lactobacillus* es una bacteria láctica que desmineraliza el desperdicio de camarón debido a los ácidos orgánicos producidos, mientras que el hongo es altamente proteolítico. Se utilizó glucosa como fuente de azúcar. Se llevaron a cabo tres etapas experimentales, la primera consistió en evaluar distintas combinaciones del orden de inoculación de los microorganismos y concentraciones de fuente de carbono (10%, 20% y 30%). Las mejores combinaciones fueron R/L (inoculación inicial con el hongo y posteriormente la bacteria) y L/R (inoculación inicial con la bacteria y posteriormente el hongo), ambas adicionado glucosa al 20% en cada etapa. En la segunda etapa experimental, se probaron los mejores cultivos con inóculo de *Lactobacillus spp* B2 (5%) y dos niveles de inóculo de *R. oligosporus* ( $2.8 \times 10^3$  y  $2.8 \times 10^5$ ), encontrándose que la combinación R/L con nivel de inóculo  $10^3$  fue el más efectivo en la remoción de minerales (68.2%) y proteína (83%). En la tercera etapa experimental, se realizó una cinética con el mejor cultivo determinándose humedad, cenizas y proteína cada 24 h, encontrándose que los niveles más altos de desmineralización y desproteínización se observaron a las 96 h de cultivo, no presentando diferencias significativas con las 192 h totales. Se le realizó un espectro infrarrojo a la quitina cruda del mejor tratamiento, y se observó que el biopolímero resultante presentó las bandas características de la quitina, necesitando sólo purificaciones menores. Con base en estos resultados, se concluye que *Rhizopus oligosporus* (72 h a nivel  $2.8 \times 10^3$ ) seguido de *Lactobacillus spp* B2 (120 h a 5%) es el mejor tratamiento para la obtención biológica de quitina.

## ABSTRACT

Chitin, the biopolymer on the exoskeleton of crustaceans, is commonly extracted by chemical means, which causes environmental problems as well as reduction of chitin quality. Therefore, in this study, biological extraction of chitin was carried out by fermentation with two microorganisms, *Lactobacillus* spp B2 (120 h) and *Rhizopus oligosporus* (72 h) in several multistep processes. The lactic acid bacteria demineralize the shrimp waste, whereas the highly proteolytic fungus remove protein. Glucose was employed as carbon source. The study was performed in three experimental stages. Initially, combination of sequences of microorganism inoculations with three concentrations of the carbon source (10, 20 and 30%) were tested. The best combinations were R/L (fungi followed by bacteria) and L/R (bacteria followed by fungus), both sequences with addition of 20% of glucose. In the second experimental stage, the selected treatments were tested with two levels of inoculum of *R. oligosporus* ( $2.8 \times 10^3$  and  $2.8 \times 10^5$ ) and *Lactobacillus* spp B2 (5%), finding that the combination R/L with  $2.8 \times 10^3$  inoculum level was the most effective in removing minerals (68.2%) and protein (83%). In the third experimental stage, we performed kinetics with the best treatment and determinate moisture, ash and protein every 24 h, finding that higher levels of demineralization and deproteinization look at 96 h of culture, showing no significant difference after 192 h. Infrared spectrum was acquired with crude chitin from the best treatment; it was observed the characteristic bands of chitin, requiring only minor purifications. Based on these results, we conclude that *Rhizopus oligosporus* (72 h at  $2.8 \times 10^3$  inoculum level) followed by *Lactobacillus* spp B2 (120 h at 5%) is the best treatment for biological chitin extraction.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 PRODUCCIÓN DE CAMARÓN

El camarón se encuentra en el primer lugar de producción pesquera en México debido a su valor. La tasa media de crecimiento anual fue de 4.70% en los últimos 10 años, esto debido al incremento de la actividad acuícola así como al aumento de las exportaciones, siendo Estados Unidos de América, Japón y Francia los destinos principales (CONAPESCA, 2012).

A nivel mundial, México ocupa el sexto lugar en producción de camarón, octavo lugar en la producción de camarón silvestre y tercer lugar en producción de camarón congelado (SAGARPA, 2009).

De acuerdo al registro del 2010, los estados con mayor producción en la República Mexicana son Sinaloa, Sonora, Nayarit y Baja California Sur; los cuáles, junto con otros estados con menor producción, alcanzaron un total de 167,015 ton, siendo Sinaloa el estado con mayor producción. De la producción total; 104,612 ton provienen de mar abierto mientras que el resto provienen de camarón cultivado así como de esteros y bahías.

Aproximadamente, el 45% del total es desperdicio, lo que genera un fuerte problema ambiental (Cira et al, 2002). Por esto, la utilización del desperdicio para la obtención de biopolímeros y compuestos de valor agregado es una alternativa para el aprovechamiento de desechos así como la disminución de problemas ambientales.

### 1.2 MICROORGANISMOS ENCONTRADOS EN EL CAMARÓN

Dentro de los microorganismos que pueden encontrarse en el desperdicio de camarón se encuentran los géneros: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Carynebacterium*, *Flavobacterium*, *Alteromonas*, *Moraxella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Serratia*, *Vibrio*, *Clostridium*, hongos filamentosos y levaduras (Centeno y Rodríguez, 2007). La mayor parte de los microorganismos mencionados son los causantes de la formación de aminas, como la putrescina y cadaverina, responsables del olor y apariencia de la

putrefacción (Lakshmanan et al, 2002), los cuáles pueden proliferar aún en condiciones de refrigeración durante su almacenamiento.

La cantidad de hongos y levaduras en el desecho de camarón es mucho menor que la cantidad de bacterias, sin embargo; los hongos encontrados tienen mucha mayor actividad quitinolítica que las bacterias, aunque esta actividad aumenta directamente con el tiempo y temperatura en la que se encuentre el desperdicio (Swiontek-Brzezinska et al, 2007), por lo que al estar en congelación, la actividad es lenta.

Dentro de los microorganismos del género *Bacillus* encontrados, algunos tipos identificados son *B. lentimorbis*, *B. licheniformis*, *B. marinus* y *B. subtilis* (Phelps y McKillip, 2002).

### 1.3 QUITINA

En los últimos años, ha crecido el interés en desarrollar procesos enfocados al reuso de materiales de desecho, esto debido al potencial comercial de los productos que pueden obtenerse, así como aspectos ambientales. Uno de estos desechos son los restos de productos pesqueros (Gimeno et al, 2007), de los cuales pueden obtenerse varios compuestos con aplicación industrial, entre ellos la quitina.

La quitina es el principal componente estructural del exoesqueleto de invertebrados, tales como crustáceos e insectos, encontrándose también presente en la pared celular de la mayoría de los hongos y gran cantidad de algas. Es uno de los biopolímeros más abundante en la tierra, tan abundante como la celulosa (Voet et al, 2008), lo que lo convierte en una fuente constante de material renovable. La quitina (homopolímero compuesto por residuos de *N*-acetil-*D*-glucosamina unidos por enlaces  $\beta$ -(1, 4)) (Fig. 1) y su derivado desacetilado, el quitosano; han tomado importancia con base a sus distintas aplicaciones, que van desde el área farmacéutica hasta la cosmética (Waldeck et al, 2006). La quitina es un polisacárido cristalino que puede encontrarse en tres formas cristalográficas que son  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -. La primera es la isoforma más abundante, la cual esta compactada en una estructura cristalina con cadenas antiparalelas, lo que favorece la formación de puentes de hidrógeno y con esto la cristalinidad. Esta es la forma que se

encuentra en los caparazones de los crustáceos. La  $\beta$ -quitina tiene una fuerza intermolecular más débil que la  $\alpha$ -quitina debido a que su arreglo es paralelo y esto ocasiona menor estabilidad. La  $\beta$ -quitina se encuentra comúnmente en calamares. La  $\gamma$ -quitina es una mezcla de las dos quitinas anteriores (Ramírez-Coutiño et al, 2006; Hirano, 1999). La  $\alpha$ -quitina es la más abundante y estable, mientras que las otras dos se presentan en pequeñas proporciones y tienden a ser transformadas en  $\alpha$ -quitina al ser diluidas o extraídas mediante el uso de ácidos (Kurita, 2001).

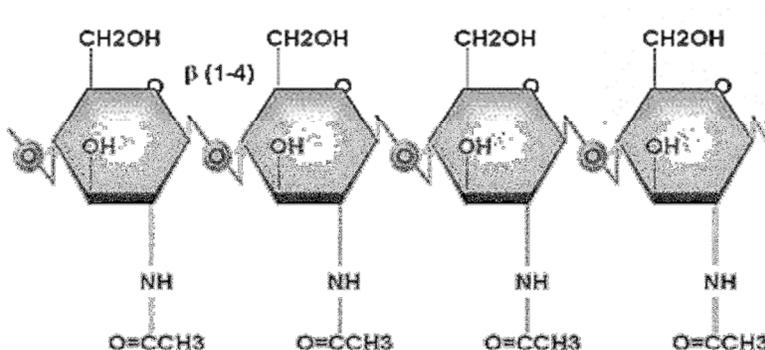


Fig. 1. Estructura química de la quitina

#### 1.4 OBTENCIÓN DE QUITINA

La quitina comercial ( $\alpha$ -quitina) se obtiene de los exoesqueletos de camarón y cangrejo principalmente, los cuáles están unidos a carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ), proteínas y grasa, así como pigmentos; por lo que es necesaria una purificación que puede llevarse a cabo mediante dos tipos de tratamientos. El primero es un tratamiento químico que se basa en la utilización de ácidos (HCl) y bases (NaOH) fuertes para la desmineralización y desproteización de los desperdicios para facilitar la obtención de la quitina pura; así como la extracción de pigmentos, los cuáles pueden ser también alterados por el uso de soluciones químicas para la desmineralización y desproteización (Cocoletzi et al, 2009).

El segundo procedimiento involucra el tratamiento biológico, que es la utilización de distintos microorganismos, entre los que destacan las bacterias pertenecientes a *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia* y algunos hongos del género *Candida* (Hsing-Chen et al, 2001; Jung, et al, 2006; Waldeck, et al, 2006). La finalidad en ambos procedimientos es remover

proteínas, minerales, lípidos y pigmentos asociados a la quitina; para obtener así un biopolímero puro (Xu et al, 2008).

### 1.5 ENSILADO BIOLÓGICO

El ensilado biológico es un proceso de conservación en el cual los ácidos adicionados o producidos inhiben el crecimiento de patógenos. En la purificación de quitina, los microorganismos fermentadores utilizados secretan ácidos orgánicos que bajan el pH impidiendo la proliferación de otros microorganismos (Shirai et al, 2001), y contribuyen también en la solubilización de minerales *in situ*, como el carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) y a la desproteínización mediante enzimas (Cira et al, 2002). También se utilizan microorganismos que a pesar de no ser fermentadores, tienen una fuerte actividad proteolítica. En algunos casos, la utilización de microorganismos fermentadores junto con microorganismos proteolíticos puede facilitar la extracción y contribuir a la sustitución de los métodos químicos (Jung et al, 2006).

Los microorganismos utilizados para el ensilado biológico son principalmente bacterias, debido a su capacidad fermentadora y la alta producción de ácidos orgánicos. Sin embargo, son pocas las bacterias que presentan gran actividad proteolítica, lo que dificulta obtener un alto grado de desproteínización en el ensilado. Se ha estudiado el efecto de enzimas o la cofermentación de dos tipos de bacterias, una fermentadora y otra con actividad proteolítica, como método para la obtención de quitina (Juárez, 2012; Jung et al, 2006).

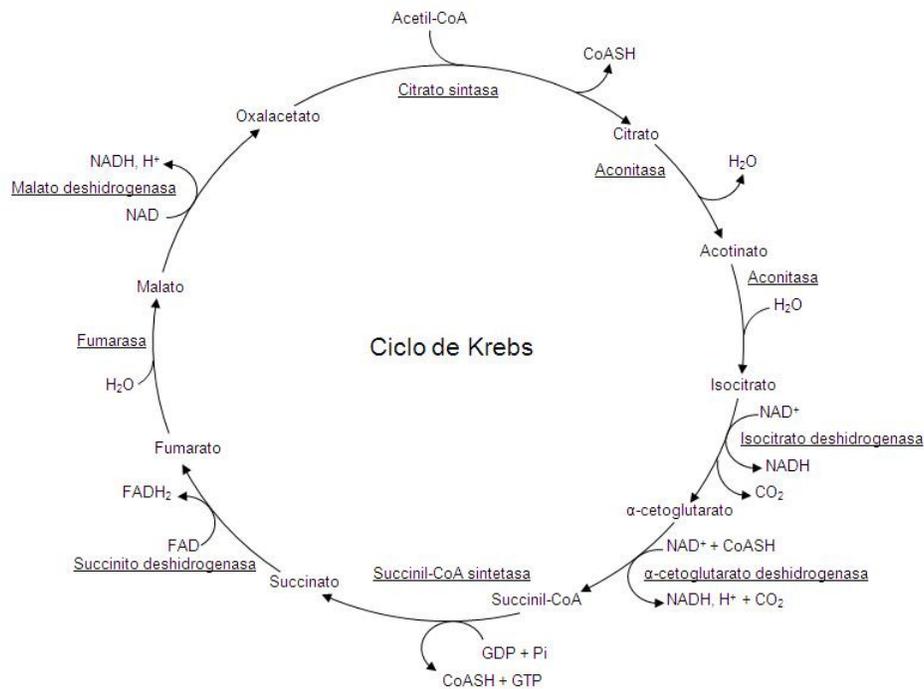
### 1.6 DESMINERALIZACIÓN BIOLÓGICA

Uno de los objetivos del ensilado biológico es la utilización de los ácidos orgánicos generados para la desmineralización del desperdicio de camarón, donde uno de los compuestos que se busca remover es el  $\text{CaCO}_3$ . Para esto, se recurre comúnmente a la fermentación por bacterias lácticas, cuyo principal ácido orgánico generado es el ácido

láctico (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>). Éste ácido puede obtenerse por bacterias lácticas homofermentativas, dónde el ácido láctico es el único generado; o por bacterias lácticas heterofermentativas, que además de producir ácido láctico, también producen ácido acético, ácido fórmico, ácido succínico, etanol y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (Flores-Albino et al, 2012).

Dentro de los hongos, microorganismos como las levaduras generan etanol y CO<sub>2</sub>, mientras que otros hongos, como el género *Aspergillus*, producen ácidos provenientes del metabolismo aerobio (Fig. 2), como el ácido cítrico, glucónico, fumárico, kójico, itacónico (Ward 2012) así como ácido láctico por parte de varios géneros de *Rhizopus*, incluido *R. oligosporus* (Huang et al 2003; Guo et al, 2010; Phruksawan et al, 2012). Los ácidos kójico e itanónico son poco producidos y son casi exclusivos de las diferentes especies de *Aspergillus*.

Dentro de los ácidos orgánicos mencionados, los más eficientes para la remoción del CaCO<sub>3</sub> (100.0869 g/mol) son el ácido cítrico (192.124 g/mol), ácido málico (139.09 g/mol), ácido succínico (118.09 g/mol), ácido fumárico (116.07 g/mol), ácido láctico (90.08 g/mol) y ácido oxálico (90.03 g/mol) (Merck index, 2013).



**Fig. 2. Esquema del ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs**

## 1.7 DESPROTEINIZACIÓN BIOLÓGICA

Muchos géneros de distintos tipos de bacterias y hongos pueden producir enzimas proteolíticas, generalmente son exoenzimas que pueden difundir en el medio donde se encuentran. Las bacterias más conocidas por su actividad proteolítica son los géneros *Bacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas* y *Serratia* (Gonçalves et al, 2013; Hong et al 2012).

Los hongos, al igual que las bacterias, presentan alta actividad proteolítica. Los géneros más utilizados para la producción de proteasas son *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* y *Rhizopus* (Ward 2012)

## 1.8 EXTRACCIÓN BIOLÓGICA DE QUITINA

Los hongos son también fermentadores, pero poco se sabe sobre su efectividad en la obtención de quitina, ya que son pocos los hongos utilizados con este fin, entre estos se encuentra el género *Candida* (Waldeck, et al, 2006). Esto puede deberse a que a pesar de su posible utilización para la desproteización por su alta producción de enzimas, la mayoría de los hongos cuentan con quitinasas, como es el género *Lecanicillum* (Ramírez-Coutiño et al, 2006); lo que puede alterar la calidad de la quitina que se obtenga; además de que hay gran variedad de hongos que generan toxinas; las cuáles normalmente van dirigidas a representantes del género *Bacillus* (Kobayashi et al, 1992).

Con base en lo anterior, puede buscarse un método que combine las ventajas obtenidas por bacterias fermentadoras y por hongos no productores de toxinas con poca actividad quitinolítica. Entre estos se menciona *Lactobacillus plantarum*, lactobacilo utilizado para la obtención de quitina (Pacheco et al, 2011; Gimeno et al, 2007) y *Rhizopus oligosporus*, zigomiceto utilizado en la producción industrial de enzimas, elaboración de alimentos fermentados, tratamiento de aguas residuales (Jia-Shin et al, 2011) y la obtención de agentes antioxidantes (Feng et al, 2010). Estos microorganismos son generalmente reconocidos como seguros (GRAS, por sus siglas en inglés) (Nitayavardhana y Kanal, 2010).

*R. oligosporus* es un hongo que puede utilizarse con éxito para la obtención de quitina ya que produce una gran cantidad de proteasas y lipasas (Ikrem-UI-Haq et al, 2003; Iftikhar et al, 2010), además de no ser quitinolítico (Takaya et al, 1998).

No existen reportes del uso de bacterias y hongos en cofermentación, sin embargo es importante considerar que algunos hongos segregan sustancias antibióticas que pueden inhibir el crecimiento bacteriano, lo que generaría resultados no deseados en la purificación de quitina. Esto indica que el tratamiento biológico puede llevarse a cabo en un sistema en dos etapas, que evitaría la interacción directa entre bacteria y hongo; permitiendo que cada microorganismo desarrolle su capacidad proteolítica o fermentadora sin competencia.

## 1.9 PIGMENTOS

Pigmentos como astaxantina, cantaxantina, astaceno, luteína y el  $\beta$ -caroteno se encuentran en los caparazones de crustáceos, lo que les da la coloración rojiza-naranja conocida. Estos pigmentos suelen extraerse con disolventes como el cloroformo, acetato de etilo, etanol, éter, o mezcla de disolventes; sin embargo, la acetona grado industrial en relación 1:15 p/v es más eficaz para la extracción de astaxantina en comparación con los solventes mencionados (Gimeno et al, 2007).

## 1.10 ANTECEDENTES

La fermentación ácido láctica es una alternativa biológica para la obtención de quitina, lactobacilos aislados de los mismos desechos de camarón, como lo reporta Shirai y colaboradores en el 2001, quienes establecieron las condiciones de cultivo adecuadas para la obtención de quitina mediante ensilado biológico, encontrando que 10% de glucosa y 5% de inóculo con base al volumen de residuo son las condiciones óptimas para el ensilado. Cira y colaboradores en el 2002, utilizaron estos lactobacilos para realizar fermentación láctica, obtuvieron un biopolímero final con mejores características que

aquel obtenido por métodos químicos, aun cuando fue necesaria la utilización de un método químico suave combinado con el ensilado biológico para eliminar la proteína residual obtenida. Este resultado es similar al obtenido por Pacheco y colaboradores en el 2011, ya que aunque la quitina obtenida por fermentación ácido láctica mostró mayor grado de cristalización y menor grado de despolimerización, nuevamente fue necesaria una combinación con métodos químicos para eliminar los restos de minerales y proteínas en la quitina cruda. En el trabajo de Flores-Albino y colaboradores en el 2012, se utilizaron desechos de cangrejo para la obtención de quitina mediante una fermentación sumergida de *Lactobacillus plantarum*, obteniéndose alto porcentaje de acetilación (95%) y porcentaje de desmineralización bajo (56%) comparándolo con trabajos en fermentación en medio sólido.

En el ensilado, además de eliminar minerales y proteína para la purificación de quitina, también deben eliminarse pigmentos, siendo el principal la astaxantina. Su extracción involucra el uso de disolventes (Gimeno et al, 2007). En este trabajo, la extracción de astaxantina de desechos de camarón fermentados y su comparación con hidrólisis alcalina, dio como resultado mayor extracción utilizando acetona en comparación con otros disolventes como el etanol o el tetrafluoroetano.

En los trabajos mencionados, la fermentación contribuye en gran manera con la desmineralización mediante el ácido láctico, pero la eliminación de proteína se ve disminuida lo que ocasiona que ambos procesos necesiten complementarse con la extracción por métodos químicos. Por esta razón, se buscan alternativas para que la extracción biológica mediante la utilización de diversos microorganismos que tengan una mayor actividad proteolítica que los lactobacilos utilizados comúnmente, como fue el trabajo de Jung y colaboradores en el 2006, quienes trabajaron con *Lactobacillus paracasei* sub. *tolerans* para la generación de ácido láctico y *Serratia marcescens* para la disminución de proteína mediante una cofermentación y observaron una disminución considerable de proteína y minerales utilizando ambos microorganismos, lo que genera la obtención de quitina más pura que con el uso de un solo organismo fermentador.

En el trabajo antes mencionado, los dos microorganismos que se manejan son bacterias, pero puede tomarse en cuenta que otros microorganismos, como los hongos, tienen también alta actividad proteolítica y que pueden utilizarse junto con las bacterias lácticas para la obtención de quitina. Un ejemplo de esto fue la utilización del hongo *Candida parapsilosis* como microorganismo fermentador para la obtención de quitina de restos de camarón por Hsing-Chen y colaboradores en 2001, quienes obtuvieron una alta eficiencia en la obtención de quitina en comparación con métodos químicos.

*Rhizopus oligosporus* presenta una alta actividad proteolítica como lo informa Ikram-UI-Haq y colaboradores en 2003, quienes utilizaron a *R. oligosporus* para la producción de enzimas de uso industrial, entre ellas proteasas, así mismo el trabajo de Jia-Shin y colaboradores en 2011, quienes logran purificar y caracterizar una serie de peptidasas provenientes de un cultivo de *R. oligosporus*, además de observar la liberación de una gran cantidad de proteasas al medio de cultivo durante la fermentación.

*R. oligosporus* produce otras enzimas, como lipasas con actividad en un intervalo de pH 5 a 8.5 (Iftikhar *et al* 2010). Esto indica que además de la producción de proteasas en el hongo las lipasas pueden encargarse los lípidos y contribuir a la obtención biológica de quitina con alto grado de pureza.

Otro tipo de compuestos sintetizados por el hongo y que pueden dar un resultado no deseable en la obtención de quitina, son las quitinasas, enzimas que pueden degradar la quitina. Yanai y colaboradores en 1992, realizaron un estudio sobre *Rhizopus oligosporus*, en el que purificaron dos quitinasas y secuenciaron sus genes codificantes, encontrando que las quitinasas y su secuencia fueron similares a las quitinasas encargadas del crecimiento micelial en otras especies. Este resultado fue apoyado por Takaya y colaboradores, en 1998, quienes encontraron una tercera quitinasa y al secuenciar el gen; no solo concordaron con lo obtenido por Yanai, si no que observaron la ausencia de actividad de esta quitinasa aun cuando se incorpora quitina en el medio de cultivo lo que indica que las quitinasas son constitutivas (parte de la célula) y no las inducibles (extracelulares).

Otro factor adverso que pudiera observarse en la extracción biológica de quitina mediante hongos es la producción de otros metabolitos utilizados para interactuar con el medio y otros organismos, siendo un ejemplo los antibióticos. Kobayashi y colaboradores en 1992, purificaron y caracterizaron una sustancia antibiótica de *R. oligosporus*, encontrando que es una sustancia estable desde pH ácido hasta alcalino y que su principal espectro de inhibición se encuentra sobre bacterias Gram positivas, principalmente bacilos. Esto indica que un sistema de cofermentación con bacterias lácticas no sería conveniente ya que el antibiótico generado por el hongo inhibiría el crecimiento de los lactobacilos.

Existen reportes de los requerimientos nutricionales del hongo como el de Nitayavardhana y Kanal en 2010, que muestra la realización de un cultivo de *R. oligosporus* en etanol proveniente de la fermentación de azúcar, comprobando que el hongo no solo puede crecer en el medio, si no que facilita la obtención del etanol al procesar otros compuestos que son subproductos de la producción de bioetanol y que generan contaminación, como la vinaza. Los mismos autores, en el 2011, buscando nuevamente la capacidad del hongo para procesar otros subproductos, encuentran que *R. oligosporus* puede crecer en un medio de glicerol crudo obtenido como resultado de la producción de bioetanol a partir de maíz. Otro medio de cultivo empleado para *R. oligosporus* son las leguminosas, como es el caso del trabajo de Feng y colaboradores en 2010, quienes utilizaron a *R. oligosporus* como agente infeccioso que ocasione estrés en especies vegetales comestibles y aumentando la síntesis de metabolitos antioxidantes en las mismas para mejorar su capacidad nutritiva, lo que también corrobora la naturaleza no tóxica del hongo. También se ha utilizado la harina de arroz para el cultivo del hongo para producir fitasas (Azeke *et al* 2011).

Con base en lo anterior observamos que el hongo puede crecer en medios sencillos que incluyan principalmente una fuente de carbono para su crecimiento, la cual puede provenir de desechos de especies vegetales, ya sean naturales o previamente tratadas.

Dentro de los medios de cultivo, se probaron melazas de caña de azúcar (Flores-Albino *et al*, 2012) y desechos del maíz, donde el primero fue utilizado para *Lactobacillus spp* en

cultivo sumergido para obtención de quitina y el segundo se utilizó directamente para el crecimiento de *Rhizopus oligosporus* (Oduguwa et al, 2008)

Aunque hay trabajos, que mencionan la capacidad de *Rhizopus oligosporus* para degradar la fibra lignocelulosa tanto de olote como de otras fuentes debido a la actividad de celulasas; hay que considerar que el objetivo es la obtención de quitina por lo que es conveniente dar al hongo una fuente de carbono de fácil degradación para que sus enzimas se concentren en los componentes de los desechos de camarón.

## 2 JUSTIFICACIÓN

La producción de camarón en México es muy alta, lo que genera una gran cantidad de residuos, que al no ser tratados para la obtención de otros compuestos de valor agregado, son una fuente de contaminación.

El proceso tradicional de obtención de quitina de los residuos pesqueros consiste en el uso de ácidos y bases fuertes para la desmineralización y la desproteínización, respectivamente. Sin embargo, estos procesos pueden dar como resultado una quitina con características indeseables, causar la hidrólisis del polímero (Waldeck et al, 2006), son fuentes de contaminantes y no permiten la obtención de moléculas de valor agregado como proteínas o pigmentos (Pacheco et al, 2011). Por estas razones, surgen alternativas como el ensilado biológico, que implica la utilización de microorganismos para generar ácido, así como la producción de enzimas que contribuyen a la desproteínización (Jung et al, 2006), eliminando de este modo la necesidad de utilizar un método químico (Cira et al 2001).

Dentro de los estudios previos, destaca la utilización de bacterias para la obtención de quitina; pero no existen reportes sobre la posible aplicación de hongos filamentosos para la extracción de este biopolímero. Si se considera que hay hongos fermentadores con un alto grado de actividad proteolítica y lipolítica que no generan toxinas, como *Rhizopus oligosporus* y que su aplicación en un sistema en dos etapas junto con una bacteria fermentadora ampliamente estudiada, como es *Lactobacillus* puede mejorar los porcentajes de desmineralización y desproteínización en la extracción de quitina.

### **3 HIPÓTESIS**

El uso de un sistema de fermentación en etapas utilizando a *Rhizopus oligosporus* y *Lactobacillus plantarum* aumentará significativamente los porcentajes de desproteínización y desmineralización de los desperdicios de camarón para la extracción biológica de quitina.

### **4 OBJETIVOS**

#### *General*

- Extracción de quitina a partir de desecho de camarón mediante un sistema de cultivo con *Rhizopus oligosporus* y *Lactobacillus spp* B2.

#### *Particulares*

- Establecimiento de las condiciones de cultivo adecuadas para cada uno de los microorganismos.
- Caracterización de los productos obtenidos en cada etapa y producto final.

## 5 METODOLOGÍA

### 5.1 ASPECTOS GENERALES

#### 5.1.1 *Desechos de camarón*

Los desperdicios de camarón se obtuvieron del mercado de pescados y mariscos de la Ciudad de México y fueron molidos hasta obtener un tamaño de partícula aproximado de 1mm. Se congelaron a -20° C hasta su uso. En total se utilizaron 3 lotes de desechos de camarón a los cuales se les realizó un análisis químico proximal (humedad, cenizas y proteína). Cada lote se utilizó de manera correspondiente con el número de etapa experimental.

#### 5.1.2 *Microorganismos*

##### *Rhizopus oligosporus*

El hongo (R) fue inoculado en placas con agar papa dextrosa (PDA), se incubó durante 5 días a 30°C y se mantuvo a 4°C. El inóculo se preparó transfiriendo asadas cargadas con el hongo en matraces Erlenmeyer con PDA, los cuales se incubaron de 5 a 7 días a 30°C. Posteriormente, se cosecharon las esporas en una solución estéril de 0.1% (p/v) de Tween 80.

##### *Lactobacillus sp (B2)*

La bacteria ácido láctica (L) utilizada en este estudio fue previamente aislada de desechos de camarón (Cira et al, 2002). La cepa se mantuvo en tubos con agar Man Rogosa Sharpe (MRS) a 4°C. El inóculo se preparó transfiriendo de 2 a 3 asadas cargadas del cultivo en caldo MRS y se incubaron a 30°C por 24h hasta obtener  $10^9$  ufc/ml.

### 5.2 PRIMERA ETAPA

Como primera etapa se realizaron 7 cultivos con distintas proporciones de glucosa, desperdicios de camarón (40 g) y una cantidad de inóculo de R ( $10^3$  esporas/g de materia

húmeda) y/o *L* (5%) para determinar la concentración de glucosa y el orden de inoculación de microorganismos más efectivo para la obtención de quitina. Los tratamientos son mostrados en la tabla 1. Los matraces Erlenmeyer de 250 ml con los tratamientos se cubrieron con tapón de gasa y algodón, y se incubaron sin agitación durante 72 h a 30 °C (*R*) y por 120 h a la misma temperatura (*L*), tomando muestras iniciales, a las 72 o 120 h (al término de la fermentación con el primer microorganismo inoculado) y finales (196 h), para realizar los análisis de muestras (sección 5.5-5.5.5). Las muestras fueron posteriormente filtradas para separar el sólido del licor obtenido.

Una vez obtenidos los cultivos con mayores porcentajes de desmineralización y desproteización se procedió a realizar nuevos cultivos tomando en cuenta la concentración de glucosa y la combinación de microorganismos utilizada.

**Tabla 1. Diseño experimental para la primera etapa de tratamiento biológico de desperdicios de camarón para obtención de quitina**

Tratamientos	Microorganismo inicial	Microorganismo final	Glucosa (%)
1 (Rg)	<i>R. oligosporus</i>		10,20, 30
2 (Lg)		<i>Lactobacillus</i>	10*
3 (Lg/R)	<i>Lactobacillus</i>	<i>R. oligosporus</i>	10*
4 (R/Lg)	<i>R. oligosporus</i>	<i>Lactobacillus</i>	10*
5 (Rg/L)	<i>R. oligosporus</i>	<i>Lactobacillus</i>	10,20,30
6 (Rg/Lg)	<i>R. oligosporus</i>	<i>Lactobacillus</i>	10,20,30 (x2) <sup>+</sup>
7 (Lg/Rg)	<i>Lactobacillus</i>	<i>R. oligosporus</i>	10,20,30(x2) <sup>+</sup>

\*El nivel de glucosa para las fermentaciones con *Lactobacillus* fue previamente establecido y reportado por Shirai y col., (2001). El nivel se adicionó sólo en la inoculación de *Lactobacillus*.

<sup>+</sup> Las concentraciones de glucosa se aplicaron para ambos microorganismos.

<sup>°</sup> El tiempo de cultivo para *R. oligosporus* fue de 72 h, para *Lactobacillus* fue de 120 h.

### 5.3 SEGUNDA ETAPA

Una vez determinados los mejores tratamientos de la primera etapa (sección 5.6) se realizaron 6 cultivos más con una sola concentración de glucosa (20%), sin cambiar el nivel de inóculo de *L*. Se probó adicionalmente un nuevo nivel de inóculo de *R*:  $2.8 \times 10^5$  esporas/g de materia húmeda; además de utilizar el nivel de inóculo ya mencionado

( $2.8 \times 10^3$ ) como se observa en la tabla 2. Se tomaron muestras iniciales, medias (120 h para L y 72 h para R) y finales (192 h) para realizar los análisis de muestras (sección 5.5) y así determinar cuál es el tratamiento más efectivo para la obtención de quitina.

La quitina resultante de esta segunda etapa fue caracterizada como se describe en la sección 5.5.6.

**Tabla 2. Diseño experimental para la segunda etapa de tratamiento biológico de desperdicios de camarón para obtención de quitina\***

Tratamientos	Microorganismo inicial	Microorganismo final	Inóculo (esporas/g de materia húmeda)
1 (R)	<i>R. oligosporus</i>		$2.8 \times 10^3$
2 (R)	<i>R. oligosporus</i>		$2.8 \times 10^5$
3 (L/R)	<i>Lactobacillus</i>	<i>R. oligosporus</i>	$2.8 \times 10^3$
4 (L/R)	<i>Lactobacillus</i>	<i>R. oligosporus</i>	$2.8 \times 10^5$
5 (R/L)	<i>R. oligosporus</i>	<i>Lactobacillus</i>	$2.8 \times 10^3$
6 (R/L)	<i>R. oligosporus</i>	<i>Lactobacillus</i>	$2.8 \times 10^5$

\*Nivel de glucosa 20%. Los tratamientos 1 y 2 fueron extendidos hasta 192 h, igualando los tiempos de los tratamientos 3-6 (72 h para R y 120 h para L)

#### 5.4 TERCERA ETAPA

Se tomó el mejor tratamiento de la segunda etapa experimental para la realización de cinéticas tomando muestras cada 24 h hasta completar las 192 h totales del tiempo de fermentación. Para cada tiempo se determinó el pH, ATT, humedad, cenizas y proteína.

La metodología general de las tres etapas experimentales se esquematiza en la figura 3.

#### 5.5 ANÁLISIS DE MUESTRAS

##### 5.5.1 Análisis de cultivos

Cada muestra obtenida fue filtrada con un tamiz de 595  $\mu\text{m}$  para separar la parte sólida del licor. El licor fue almacenado en refrigeración ( $4^\circ\text{C}$ ) mientras que el sólido fue secado

a 60° C durante 3 días. El análisis químico proximal, %DM, %DP y la caracterización de la quitina obtenida se llevaron a cabo sobre el residuo sólido de la muestra (sin enjuague previo) así como del desperdicio de camarón seco. Los análisis de pH, ATT, ácidos orgánicos y azúcares se llevaron a cabo sobre el licor de las muestras.

### 5.5.2 pH y ATT

El licor se diluyó en agua destilada en proporción 1:10. La determinación de pH se realizó mediante la utilización de un electrodo (Conductronic pH 20, México). Para la determinación de ATT fueron tituladas utilizando hidróxido de sodio (NaOH) al 0.1 N hasta llegar a pH 8 y en la etapa experimental 1 se expresó como mmol de ácido láctico por gramo de licor mediante la ecuación 1a y 1b. En las etapas experimentales 2 y 3, se expresó como mmol de ácido oxálico por gramo de licor mediante las mismas ecuaciones.

$$\%ATT = \left[ \frac{(\text{Volúmen titulante})(\text{Normalidad titulante})(0.09)}{\text{Muestra}} \right] \times 100 \quad (1a)$$

$$\text{Ácido láctico (mmol/g)} = \left[ \frac{\%ATT / 100}{90} \right] \times 1000 \quad (1b)$$

### 5.5.3 *Análisis Químico Proximal*

#### 5.5.3.1 Determinación del porcentaje de humedad (%H)

El porcentaje de humedad fue determinado después de secar 0.5g de muestra sólida en crisoles a peso constante durante 24h a 110° C en una estufa con temperatura controlada, calculando el porcentaje por diferencia de pesos con la ecuación 2 (AOAC, 1990).

$$\%H = \left[ \frac{\text{Peso crisol con muestra sin humedad} - \text{peso crisol}}{\text{Peso muestra}} \right] \times 100 \quad .(2)$$

### 5.5.3.2 Determinación del porcentaje de cenizas (%C)

El porcentaje de cenizas fue determinado después de la combustión de aproximadamente 0.5g de muestra sólida en crisoles a peso constante, en una mufla a 650° C, durante 6 h obteniendo así la diferencia de pesos (Ecuación 3) (AOAC, 1990).

$$\%C = \left[ \frac{\text{Peso crisol con cenizas} - \text{peso crisol}}{\text{Peso seco de muestra}} \times 100 \right] - 100 \quad (3)$$

### 5.5.3.3 Determinación de Nitrógeno total, Nitrógeno proteico y Nitrógeno de quitina

El nitrógeno total y el nitrógeno de quitina se determinaron por el método de Kjeldahl, llevando a cabo una combustión en húmedo de la muestra por calentamiento con ácido Sulfúrico concentrado en presencia de catalizadores para reducir el nitrógeno orgánico de la muestra hasta amoniaco, el sulfato de amonio producido se alcaliniza y se destila para desprender el amoniaco que posteriormente es atrapado y titulado (ecuación 4).

$$\text{Nitrógeno total} = \text{Nitrógeno proteico} + \text{Nitrógeno no proteico} \quad (4)$$

El porcentaje de nitrógeno de proteína corregido se calculó mediante la sustracción del nitrógeno de quitina (valor de referencia 5.9923) del nitrógeno total y se multiplicó por el factor 6.25.

#### 5.5.3.4 Determinación de los porcentajes de desmineralización y desproteínización.

Los porcentajes de desmineralización y desproteínización en los cultivos se calcularon utilizando la ecuación 5 (Pacheco, et al 2011)

$$Y(\%) = \frac{[(X_0 \times S_0) - (X_R \times S_R)]}{(X_0 \times S_R)} \times 100 \quad (5)$$

Donde:

Y = % de desmineralización o desproteínización  
X<sub>0</sub> = cenizas o proteína de la muestra de camarón  
X<sub>R</sub> = cenizas o proteína de la muestra fermentada  
S<sub>0</sub> = peso de la muestra de camarón en base seca  
S<sub>R</sub> = peso de la muestra fermentada en base seca

#### 5.5.4 *Determinación de azúcares*

La determinación de azúcares totales de los tratamientos se determinó por HPLC usando glucosa como estándar en un equipo Agilent 1260 infinity acoplado a un detector de índice de refracción (IR). Se utilizó una columna Aminex HPX-87H 300mmx7.8mm, la fase móvil fue 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 40°C y flujo de 0.3 ml/min. Las muestras líquidas analizadas fueron diluidas en agua desionizada 1:10 y centrifugadas a 10,000 rpm durante 20 minutos; se tomó 1 ml de sobrenadante y se diluyó nuevamente 1:10. La muestra fue filtrada utilizando una membrana de 45 µm e inyectada mediante un automuestreador.

El pico correspondiente a la glucosa se determinó mediante el tiempo de retención del estándar y se integró para determinar su concentración con base en una curva estándar.

### 5.5.5 *Determinación de ácidos orgánicos*

La determinación de ácidos orgánicos se llevó a cabo por HPLC con las mismas condiciones descritas anteriormente para la determinación de azúcares, utilizando un detector de longitud de onda multivariable a 210 nm (MWE) y un detector de índice de refracción (IR). Los estándares utilizados fueron ácido láctico, ácido acético, ácido succínico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido málico y ácido oxálico.

### 5.5.6 *Caracterización de producto final: Quitina*

#### 5.5.6.1 Extracción de pigmentos

Se realizó la extracción de pigmentos (astaxantina) utilizando acetona como disolvente en una proporción 1:15 (p/v) (Gimeno et al, 2007).

#### 5.5.6.2 Análisis por espectrofotometrías de infrarrojo (FTIR)

Los espectros por infrarrojo de desperdicios de camarón y Quitina cruda, QC, (pulverizados y tamizados hasta obtener un tamaño de partícula < 177  $\mu\text{m}$ ). El análisis espectrofotométrico fue realizado en un sistema ATR equipado con un cristal de zinc y selenio (modelo Spectrum 100 ATR FTIR Perkin Elmer, Estados Unidos) aplicando 16 escaneos por muestra.

## 5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En cada etapa experimental se realizó un diseño completamente al azar factorial y la prueba post-hoc Tukey-Kramer con un  $\alpha < 0.05$  para determinar cuál es el tratamiento con

el menor pH, mayor concentración de ácidos orgánicos, mayor porcentaje de desmineralización y desproteización; siendo estos las variables de respuesta.

Los resultados de los cultivos que mostraron mejor respuesta fueron analizados estadísticamente con la misma prueba.

En la tercera etapa experimental, el análisis estadístico se llevó a cabo para determinar el tiempo de fermentación en el que el cultivo muestra mejor respuesta esperada.

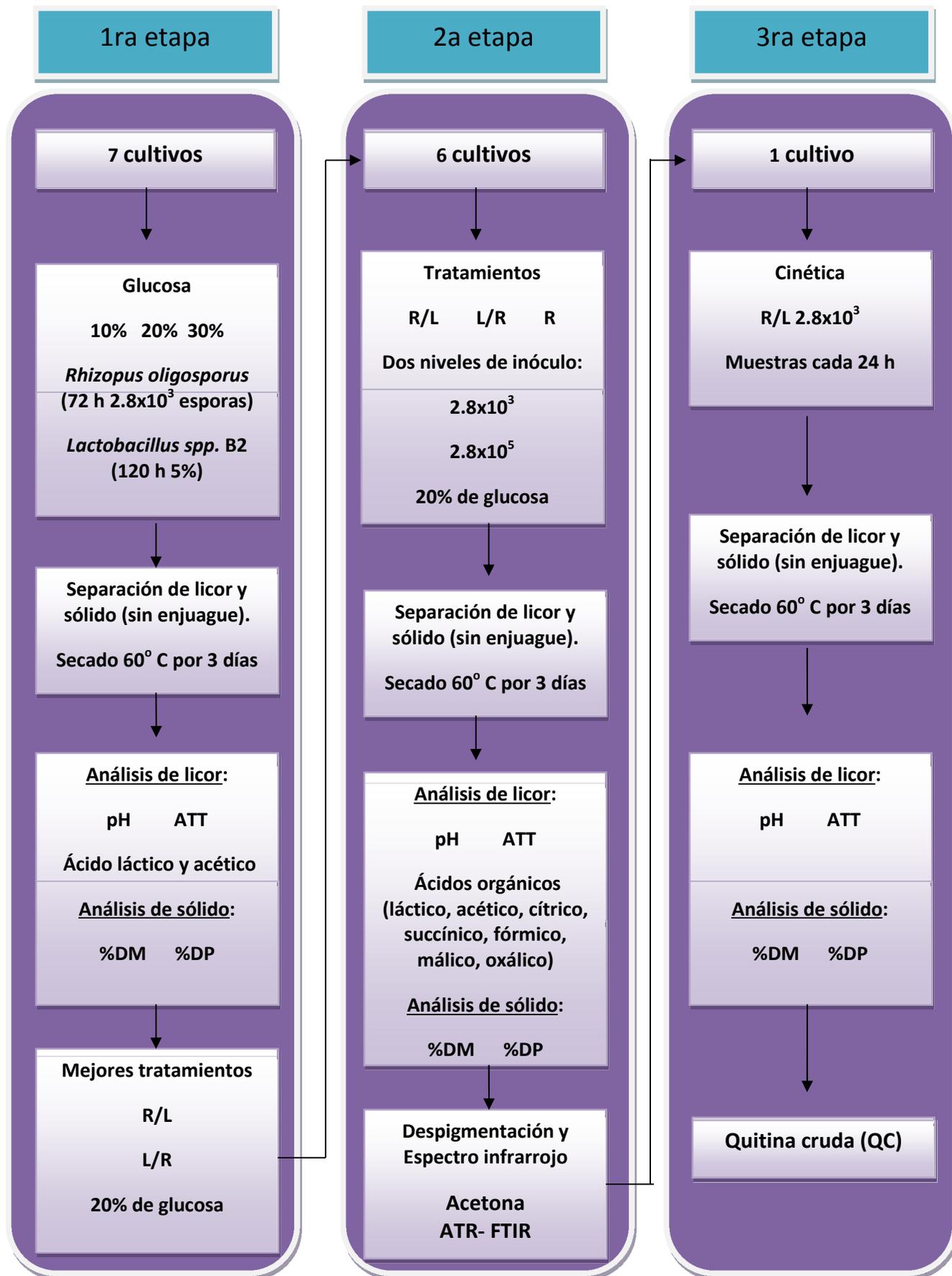


Figura 3. Esquema de la metodología aplicada

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se muestran el análisis químico proximal del desperdicio de camarón, tomado como base para determinar los porcentajes de desmineralización (DM%) y desproteización (DP%); los resultados de los análisis de las tres etapas experimentales (pH, ATT, ácidos orgánicos, DM%, DP% y azúcares totales) y la caracterización de la quitina cruda obtenida del cultivo con los mejores resultados.

### 6.1 Desechos de camarón

Los porcentajes de humedad, ceniza y proteína se muestran en la tabla 3.

**Tabla 3. Análisis químico proximal de los lotes de desechos de camarón**

Lote	Humedad (%)	Cenizas (%)	Proteína (%)
1	6.74 ± 0.46	20.80 ± 0.90	49.59 ± 10.16
2	11.35 ± 0.2	16.15 ± 0.82	49.71 ± 7.69
3	7.48 ± 0.8	23.10 ± 1.09	53.04 ± 2.91

### 6.2 Primera etapa

#### 6.2.1 Análisis de muestras (cultivos)

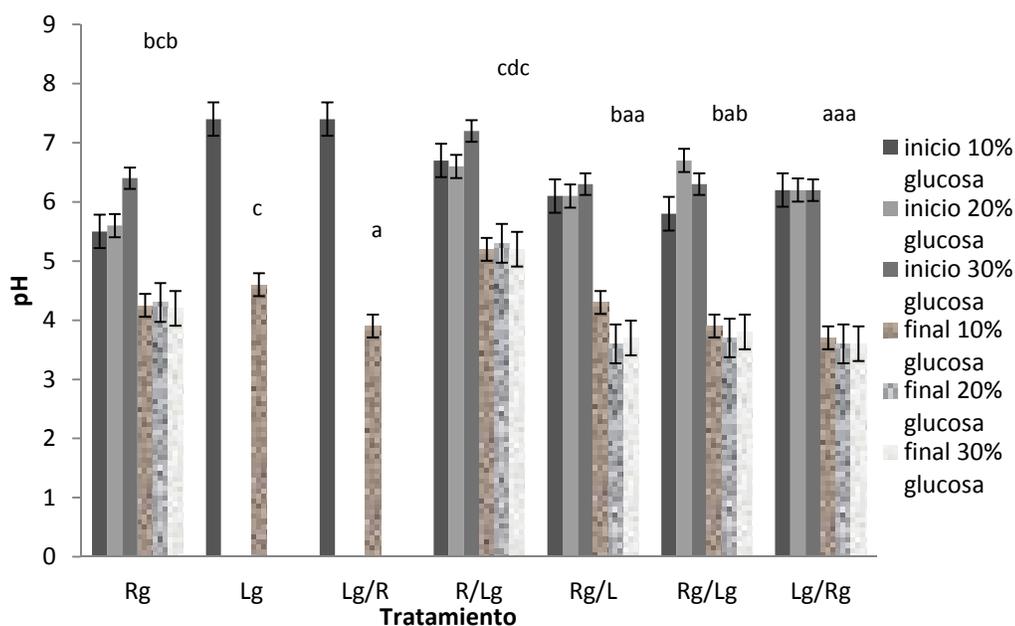
Las muestras consistieron en una parte sólida y una parte líquida (licor) sobre las cuáles se llevaron a cabo las determinaciones correspondientes.

#### 6.2.2 pH, ATT, ácido láctico y ácido acético.

La figura 4 muestra el cambio entre el pH inicial y el pH final en los tratamientos con glucosa, dentro de los cuales, los que tienen menor pH: el tratamiento 3 con *Lactobacillus spp* (L) con 10% de glucosa y después *Rhizopus oligosporus* (R); el tratamiento 5 con *Rhizopus oligosporus* y *Lactobacillus spp* con 20 y 30% de glucosa, el tratamiento 6 con *Rhizopus oligosporus* con 20% de glucosa combinado con *Lactobacillus spp* con 10% de

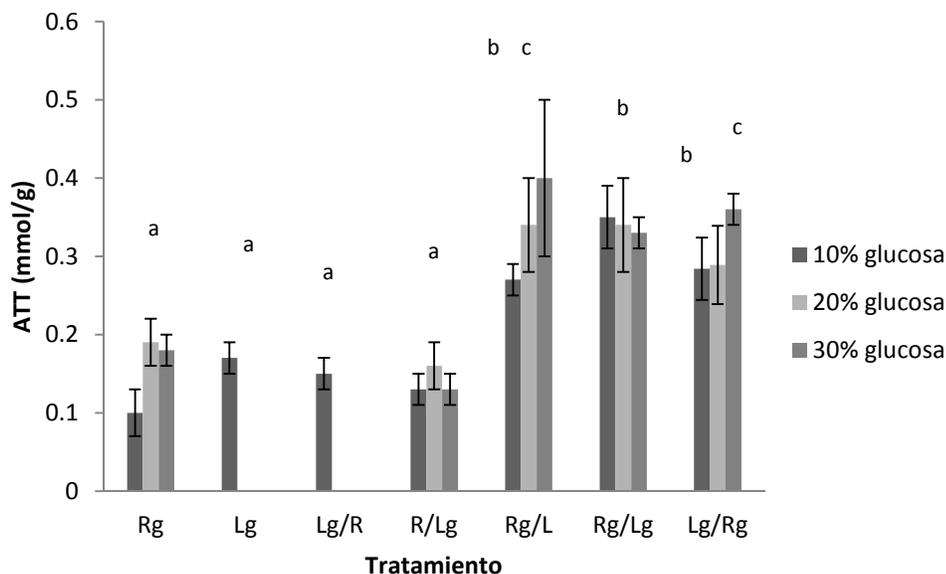
glucosa también y el tratamiento 7 con *Lactobacillus spp* con los tres niveles de glucosa combinado con *Rhizopus oligosporus* con los tres niveles de glucosa (Tabla 1).

Se observa que no solo la concentración de glucosa fue una variable significativa en la disminución de pH, ya que la combinación de microorganismos resultó ser igualmente significativa, pues se obtiene una media más baja al utilizar ambos microorganismos en lugar de uno solo.



**Figura 4. pH inicial y final de los cultivos de *R* y *L* con glucosa en desperdicios de camarón a 30°C. Letras diferentes indican grupos significativamente diferentes (Tukey-Kramer  $\alpha < 0.05$ ).**

En la figura 5 se observa la producción de ATT (expresada como mmol de ácido láctico por gramo de licor), que varió desde 0.03 hasta 0.3 mmol/g, y presentan el mismo comportamiento que los resultados de pH; puesto que los tratamientos 5 (R/L), 6 (R/L) y 7 (L/R) presentan las medias más altas correspondiendo al pH más bajo.



**Figura 5. ATT de los cultivos de R y L con glucosa en desperdicios de camarón a 30°C. Letras distintas indica grupos significativamente distintos (Tukey-Kramer  $\alpha < 0.05$ ).**

En el caso de la ATT, la combinación de microorganismos también fue una variable significativa además de la concentración de glucosa, que al igual que en los resultados de pH, es de 20% y 30%. Sin embargo, las últimas fermentaciones presentan cantidades superiores a 0.3 mmol/g, lo cual se debe a que la glucosa fue añadida desde el inicio del tratamiento en comparación con el tratamiento 4 (R/L), que a pesar de tener la misma combinación de microorganismos (R/L), tiene menores concentraciones de ácido. Esto se debe a que la glucosa fue añadida en tiempo medio y no al inicio como en los últimos tratamientos. Con esto se confirma que la adición de azúcar es necesaria, ya que el hongo no tuvo la fuente de carbono suficiente para iniciar su metabolismo.

Con base en lo observado en los resultados de pH y ATT, se esperan obtener medias altas en las concentraciones de ácidos orgánicos, de los cuáles, en esta primera etapa se determinaron ácido láctico y ácido acético por HPLC.

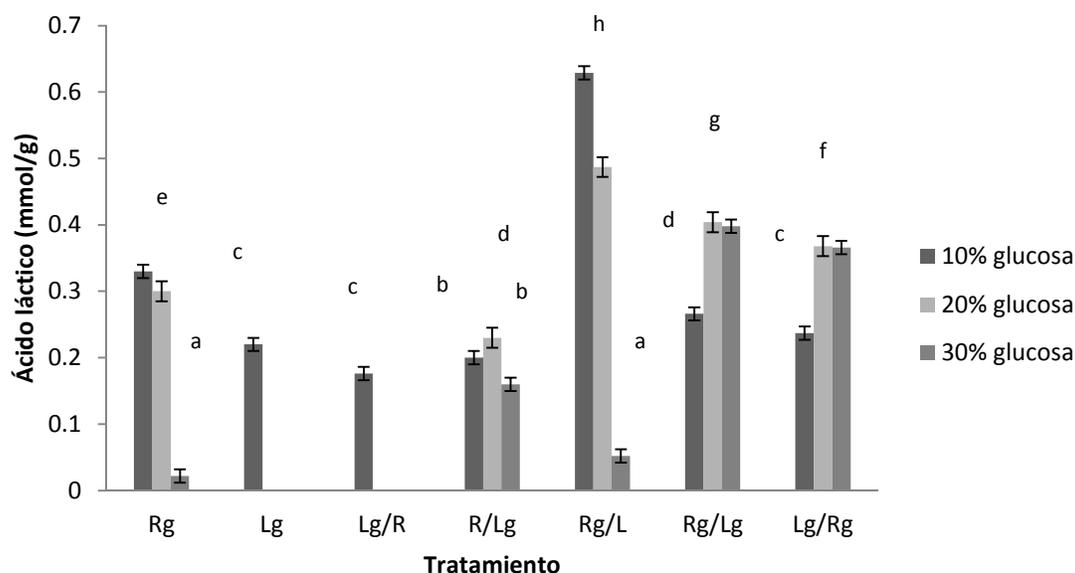
Dentro de los ácidos orgánicos, el ácido láctico es primordial debido a su influencia en la desmineralización de los desechos de camarón (Shirai et al, 2001; Cira et al, 2002),

además de ser el principal ácido producido por bacterias homofermentativas y el ácido encontrado en mayor concentración en los tratamientos de la primera etapa (Fig 6 y 7).

Las concentraciones de ácido láctico variaron desde 0.02 hasta 0.62 mmol/g, siendo nuevamente el tratamiento 5 con *Rhizopus oligosporus* y *Lactobacillus spp* el cultivo con mayor producción (Figura 6). En este caso, la mayor concentración de ácido láctico se presentó al utilizar 10% de glucosa, ya que inclusive puede observarse que a mayor concentración de glucosa, la concentración de ácido láctico disminuye drásticamente. Esto puede deberse a la probable desproteínización del medio, la cual produce compuestos alcalinos que pueden reaccionar con el ácido formando lactato, disminuyendo así la concentración de ácido láctico conforme avanza el tiempo de fermentación. Esto puede también ocasionar que el pH deje de disminuir como consecuencia de la neutralización continua (figura 4), por lo que el pH se mantiene constante en los tiempos finales del cultivo. La producción de ácido puede también ser baja debido a que el metabolismo del hongo pudo ser aerobio durante una parte de la fermentación (72 h), ya que queda aeración disponible por el espacio de cabeza al colocar la fermentación, por lo que no hay tiempo suficiente para generar mayor concentración de ácido láctico.

En los cultivos 6(L/R) y 7(R/L) las concentraciones de ácido láctico fueron similares en las concentraciones con 20 y 30% de glucosa. Puede observarse también que el ácido láctico estuvo presente en todas las fermentaciones, aún en aquella donde sólo se empleó *Rhizopus oligosporus*, lo que concuerda con reportes de la producción de ácido láctico por parte de este hongo, así como otros hongos del género *Rhizopus* (Huang et al, 2003; Guo et al, 2010; Phrueksawan et al, 2012). Otra razón puede ser que el desperdicio de camarón tiene ya una microbiota por lo que tanto el hongo como los microorganismos propios del desperdicio pudieron aprovechar la glucosa. Sin embargo, las concentraciones de ácido láctico del cultivo sólo con el hongo, son mayores al 10% de glucosa, que aquellos que comienzan su fermentación con *Lactobacillus*. Esto puede deberse a que el tiempo de fermentación fue de 72 h para este tratamiento, mientras que aquellos con *Lactobacillus*, fue desde 120 h (siendo el único microorganismo), hasta 192 h en combinación con *Rhizopus oligosporus*, por lo tanto, en el tiempo de fermentación más corto, puede no

haber suficiente desproteinización para neutralizar el ácido, lo que no ocurre en tiempos de fermentación más largo. También hay que tomar en cuenta que a excepción del cultivo sólo con *Lactobacillus*, a los cultivos combinados se les agregó glucosa dos veces, lo que también es un factor para la producción de ácido láctico.



**Figura 6. Ácido láctico (mmol/g) de los cultivos de R y L con glucosa en desperdicios de camarón a 30°C. Letras distintas indican grupos significativamente distintos (Tukey-Kramer  $\alpha < 0.05$ ).**

En cuanto a la producción de ácido acético esta fue menor a  $5 \times 10^{-5}$  mmol/g (Fig. 7) a comparación con la del ácido láctico (Fig. 6). Esto indica que la mayor producción de ácido fue por *Lactobacillus* incluyendo otros lactobacilos presentes en el desperdicio del camarón, así como distintos géneros de *Bacillus* (*B. licheniformis*, *B. lentimorbis*, *B. marinus* y *B. subtilis*) (Phelps y McKillip, 2002), géneros de *Corynebacterium* que pueden producir ácido láctico, succínico y acético (Zhu et al, 2013) y la producción por parte de *Rhizopus oligosporus* tal como se observa con el tratamiento 1 donde solo el hongo fue empleado. La cantidad de ácidos indica que deben presentarse altos porcentajes de desmineralización (Pacheco et al, 2011).

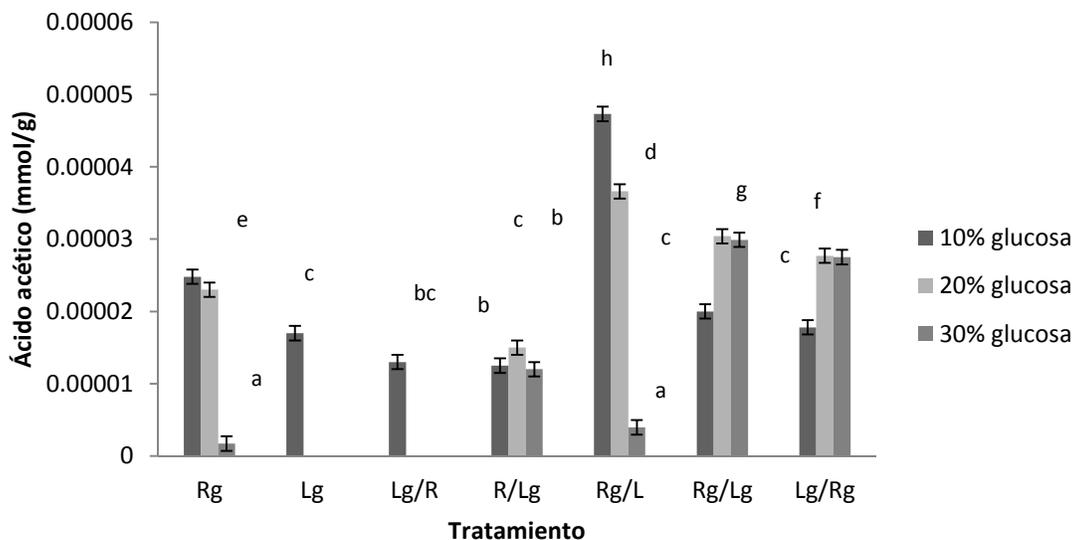


Figura 7. Ácido acético (mmol/g) de los cultivos de *R* y *L* con glucosa en desperdicios de camarón a 30°C. Letras distintas indican grupos significativamente distintos (Tukey-Kramer  $\alpha < 0.05$ ).

### 6.3.3 Análisis químico proximal

Los %DM de los tratamientos se muestran en la figura 8. La desmineralización presenta el comportamiento del pH, ya que a menor pH mayor es el %DM, por lo que los cultivos con menor valor de pH final son los que presentan los %DM más altos.

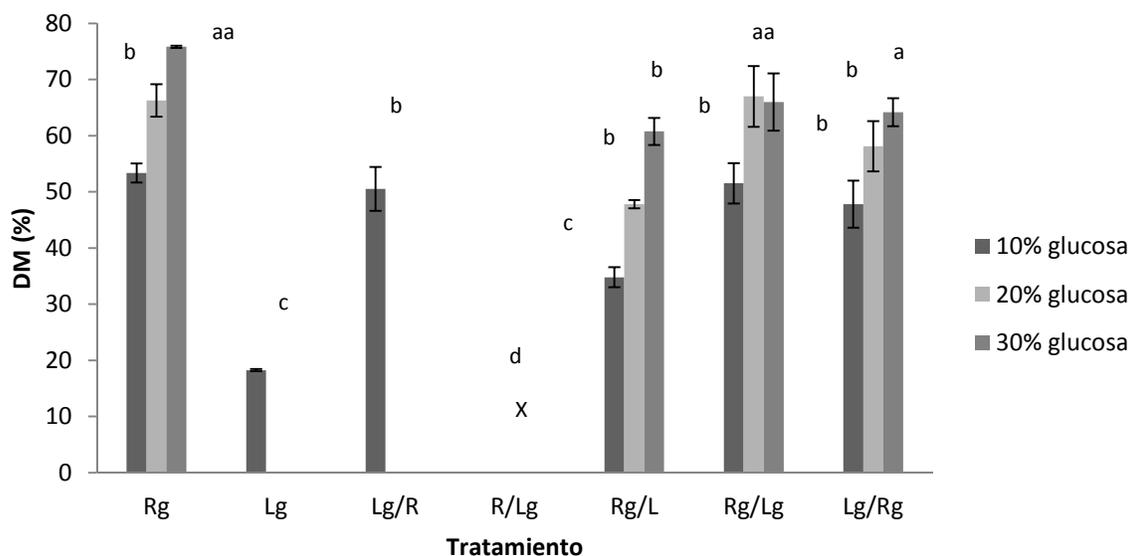
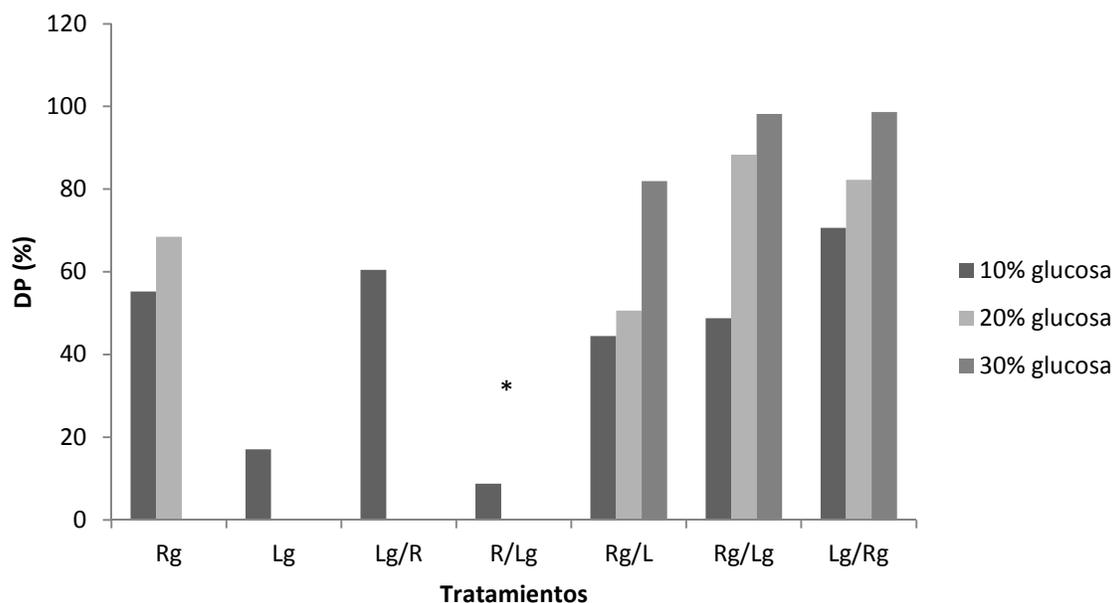


Figura 8. %DM de los cultivos de *R* y *L* con glucosa en desperdicios de camarón a 30°C. Letras distintas indican grupos distintos (Tukey-Kramer  $\alpha < 0.05$ ).

Los %DM variaron desde el 18% hasta el 75%. Los mejores tratamientos fueron el 1 (R), el 5 (R/L), el 6 (R/L) y el 7 (L/R), donde los tres últimos fueron los mejores en cuanto a la disminución de pH y presentar altos valores de ATT y concentraciones de ácido láctico y acético, lo que confirma que también los %DM altos.

El tratamiento 4 (R/L) no presentó desmineralización, resultado que al igual que las bajas concentraciones de ATT se debe a la ausencia de glucosa al inicio del cultivo. Nuevamente, los componentes del desperdicio de camarón no fueron suficientes para el hongo corroborando la necesidad de una fuente de azúcar iniciadora.

Los %DP variaron desde 8% hasta 98% (Fig. 9), encontrando los mayores porcentajes en los tratamientos L/R y R/L con 30% de glucosa. El tratamiento 4(R/L) presentó baja desproteínización al aplicar glucosa al 10%, lo que puede deberse a que no se agregó glucosa al inicio de fermentación, sólo en el tiempo medio. Al presentarse un valor tan bajo en este cultivo, no fueron determinadas las concentraciones al 20% y 30%\*.



**Figura 9. %DP de los cultivos R y L con glucosa en desperdicios de camarón a 30°C.**

#### 6.3.4 Consumo de azúcares

Se determinaron los azúcares restantes en los cultivos mediante HPLC, para así obtener el consumo ( $\Delta S$ ) de los mismos. Al obtener el consumo, se observó que en todos los tratamientos, más del 98% de los azúcares fueron consumidos, sin importar el porcentaje de azúcar añadido al inicio (Tabla 4).

Tabla 4. Consumo de azúcares ( $\Delta S$ ) de los cultivos *R* y *L*

<b>Tratamiento (microorganismo- concentración)</b>	<b><math>\Delta S</math> (%)</b>	<b><math>\Delta S</math> (mmol/g)</b>
<b>R10</b>	99.21	11.0175
<b>R20</b>	99.99	22.208
<b>R30</b>	99.15	33.034
<b>L10</b>	99.99	11.103
<b>L10/R</b>	99.99	11.104
<b>R/L10</b>	99.99	44.419
<b>R/L20</b>	99.98	88.822
<b>R/L30</b>	99.984	177.651
<b>R10/L</b>	99.99	44.418
<b>R20/L</b>	99.79	88.654
<b>R30/L</b>	99.7	177.158
<b>R10/L10</b>	99.87	88.727
<b>R20/L20</b>	99.74	177.219
<b>R30/L30</b>	99.7	354.304
<b>L10/R10</b>	99.64	88.526
<b>L20/R20</b>	99.67	121.754
<b>L30/R30</b>	99.72	210.407

Con base en el análisis estadístico efectuado, se determinó que los tratamientos con %DM y %DP más altos fueron aquellos que utilizaron sólo a *Rhizopus oligosporus*; así como los

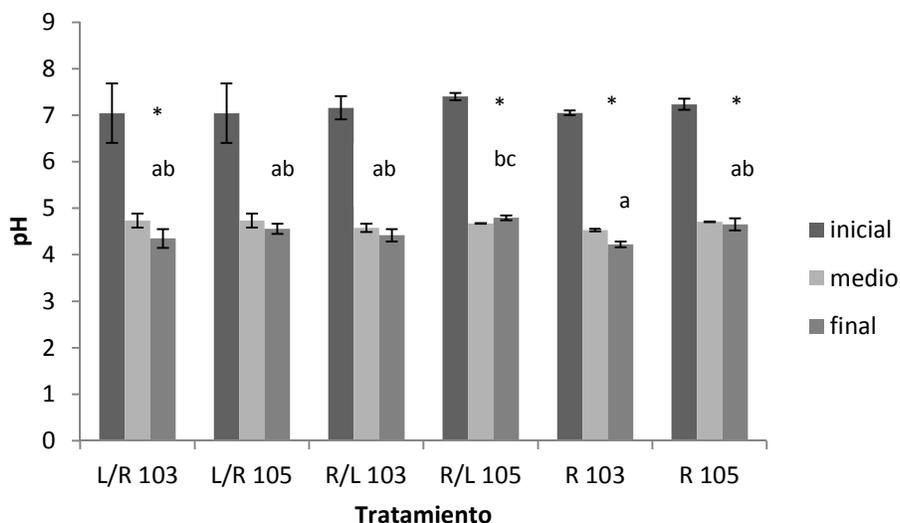
cultivos con *R. oligosporus* en combinación con *Lactobacillus spp* B2, ambos con un 20% de glucosa. Estos tratamientos también presentaron mayor producción de ácidos orgánicos. Aun cuando el %DP de los tratamientos con L/R y R/L fue mayor, el %DM fue el factor de respuesta para elegir los tratamientos de la siguiente etapa. En estos tratamientos, las concentraciones de glucosa al 20% fueron las que presentaron la media significativamente más alta. En el tratamiento R, el %DP fue menor, pero el %DM es igual a los tratamientos L/R y R/L con 20% de glucosa.

#### 6.4 *Segunda etapa*

Con base en los resultados anteriores, la segunda etapa experimental fue llevada a cabo utilizando los tratamientos R, R/L y L/R con 20% de glucosa, cantidad de azúcar que fue agregada con cada microorganismo; es decir, 20% con el hongo y 20% con la bacteria. El cultivo R fue alargado hasta 192 h, para igualarlo con los otros dos cultivos.

##### 6.4.1 pH, ATT, ácidos orgánicos

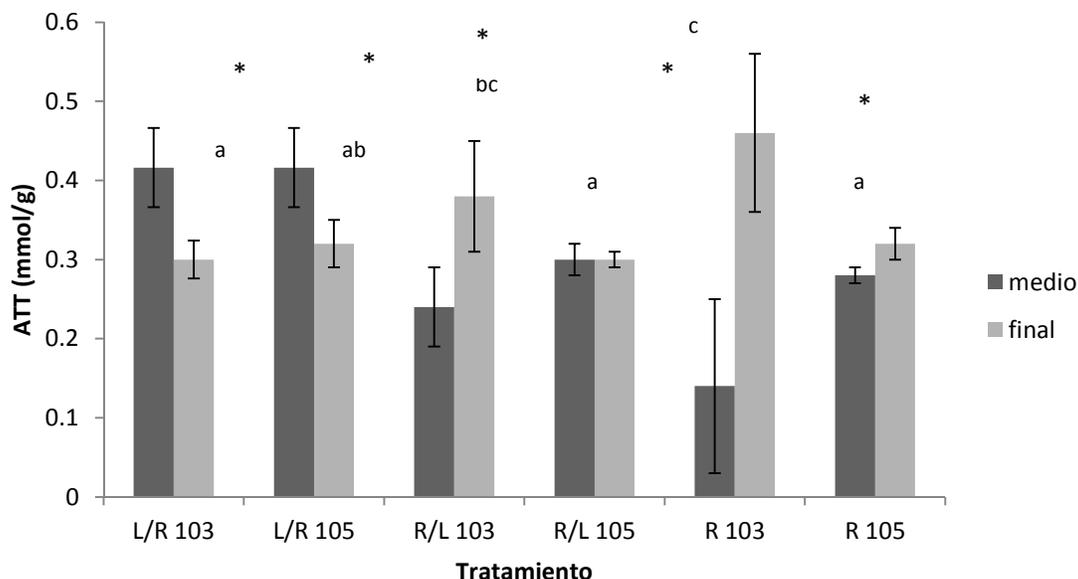
En todos los cultivos, el pH inicial se encontró en 7 aproximadamente, mientras que el pH final con la media más baja fue de 4.53 correspondiente al cultivo R con inóculo de  $10^3$ , sin embargo, el valor no mostró diferencias significativas con los demás tratamientos a excepción de R/L con inóculo de  $10^5$  que presentó la media final de pH más alta (Fig. 10). Al comparar los valores de pH de tiempo medio con sus respectivos valores finales, se observó que hay diferencias significativas entre ambos tiempos, a excepción de los tratamientos L/R  $10^5$  y R/L  $10^3$ .



**Figura 10. pH inicial, medio (120 h para L/R y 72 h para R/L) y final (192 h) de cultivos con 20% de glucosa en desperdicios de camarón a 30°C inoculados con dos niveles de inóculo de *R* y 5% (v/v) de *L*. Letras diferentes indican grupos significativamente diferentes (Tukey-Kramer  $\alpha < 0.05$ ). \* Indica que hay diferencias significativas entre tiempo medio y tiempo final.**

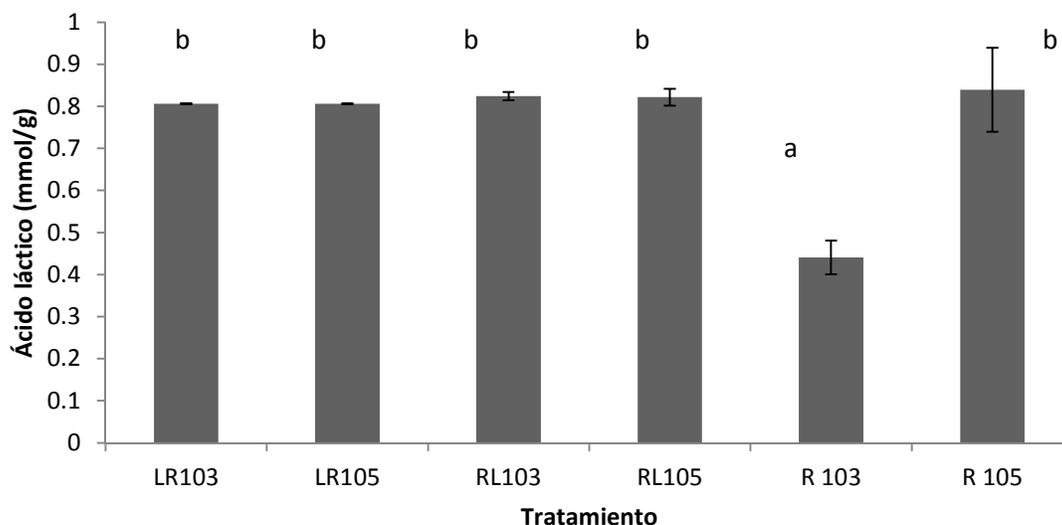
En los tratamientos L/R en sus dos niveles de inóculo se observó que la ATT (Fig. 11) fue más baja en el tiempo final que en el medio, lo que puede ser resultado de la neutralización de compuestos liberados por la desproteización en los cultivos (aminas principalmente), sin embargo; la disminución de la ATT no causó un aumento del pH final, como se ve en la figura 10. En estos dos últimos tratamientos, el comportamiento fue contrario a los cultivos R/L 10<sup>3</sup>, R 10<sup>3</sup> y R 10<sup>5</sup>, ya que la ATT aumentó en lugar de disminuir, por lo que la desmineralización debe ser más alta que en los tratamientos L/R. El único tratamiento que se mantuvo igual en tiempo medio y final fue R/L 10<sup>5</sup>, comportamiento que pudo ser parecido al comportamiento de los cultivos L/R. Todos los demás tratamientos presentaron diferencias significativas entre tiempo inicial y tiempo final.

En la figura 11 se observó que el tratamiento con la media final más alta de ATT fue R 10<sup>3</sup>, resultado similar al pH final registrado para el mismo cultivo. Sin embargo, éste tratamiento fue igual al cultivo R/L 10<sup>3</sup>, por lo que ambos presentaron la mayor cantidad de ATT (expresada como mmol de ácido oxálico por gramo de licor).



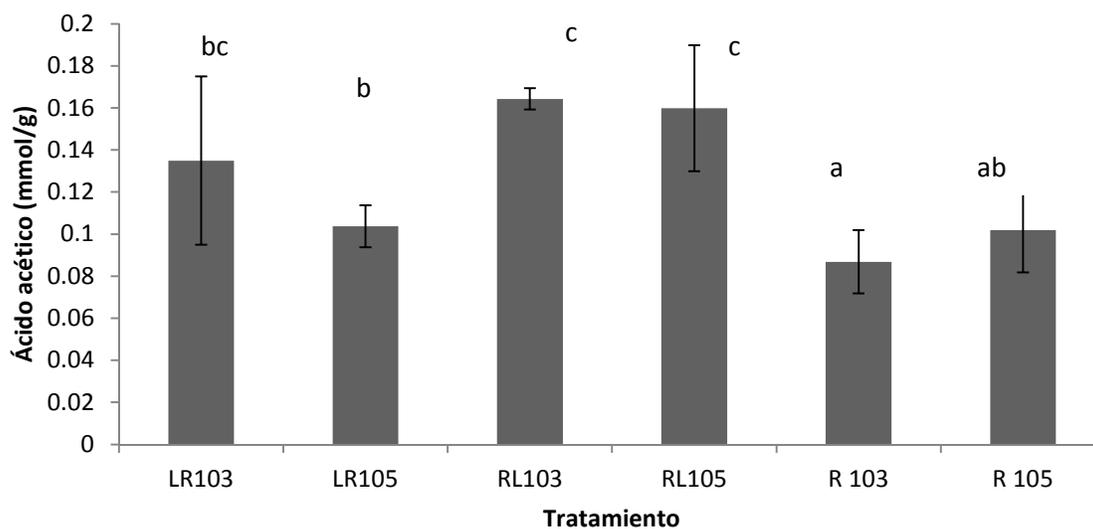
**Figura 11. ATT de los tiempos medios (120 h para L/R y 72 h para R/L) y finales (192 h) de cultivos con 20% de glucosa en desperdicios de camarón a 30°C inoculados con dos niveles de inóculo de *R* y 5% (v/v) de *L*. Letras diferentes indican grupos significativamente diferentes (Tukey-Kramer  $\alpha < 0.05$ ). \* indica que hay diferencias significativas entre tiempo medio y tiempo final.**

La concentración de ácido láctico en los cultivos se muestra en la figura 12, encontrándose que fue muy parecida para la mayoría de los cultivos no presentando diferencias significativas entre ellos (Tukey-Kramer  $\alpha < 0.05$ ). El tratamiento R  $10^3$  fue el que presentó la media menor, sin embargo, puede deberse al hecho de que la fermentación fue llevada a cabo por un inóculo menor del hongo y la generación de ácido láctico es por lo tanto menor en comparación con el inóculo  $10^5$ . La concentración de ácido láctico del cultivo R con mayor inóculo es igual a los tratamientos con *Lactobacillus*, lo que sugiere que tanto el hongo sólo como su combinación con la bacteria genera la misma cantidad de ácido láctico, aunque hay que considerar igualmente la producción de otros ácidos orgánicos.



**Figura 12. Ácido láctico (mmol/g) en muestras finales de cultivos con 20% de glucosa en desperdicios de camarón a 30°C inoculados con dos niveles de inóculo de *R* y 5% (v/v) de *L*. Letras diferentes indican grupos significativamente diferentes (Tukey-Kramer  $\alpha < 0.05$ )**

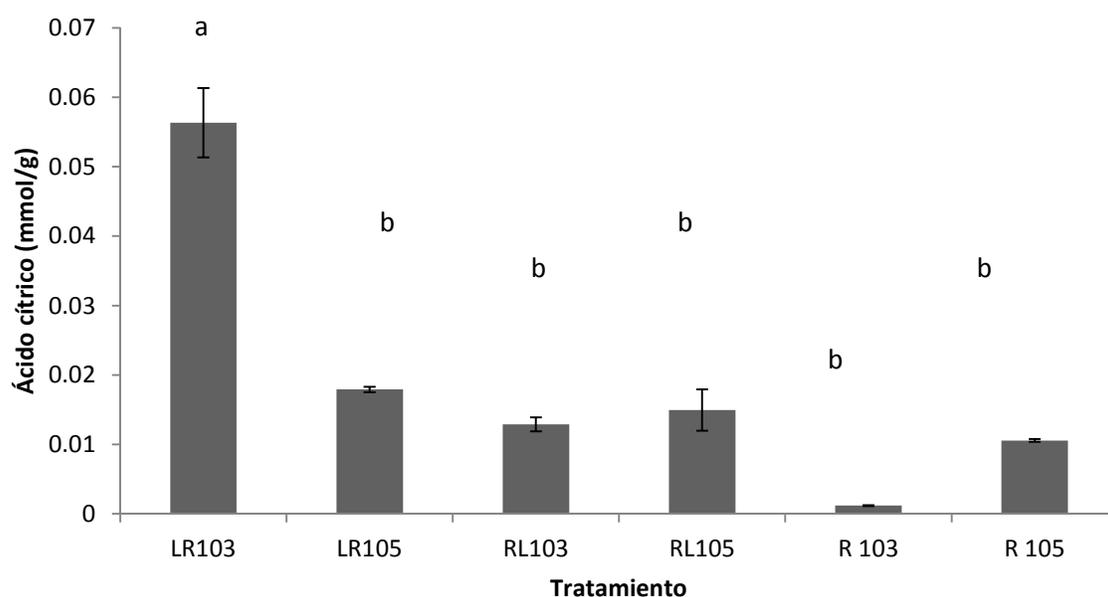
La concentración de ácido acético tiene distinto comportamiento al ácido láctico (Fig. 14). Las concentraciones del ácido acético son menores en comparación con el ácido láctico, siendo la concentración promedio de 0.1 mmol/g y 0.8 mmol/g respectivamente.



**Figura 13. Ácido acético (mmol/g) en muestras finales de cultivos con 20% de glucosa en desperdicios de camarón a 30°C inoculados con dos niveles de inóculo de *R* y 5% (v/v) de *L*. Letras diferentes indican grupos significativamente diferentes (Tukey-Kramer  $\alpha < 0.05$ ).**

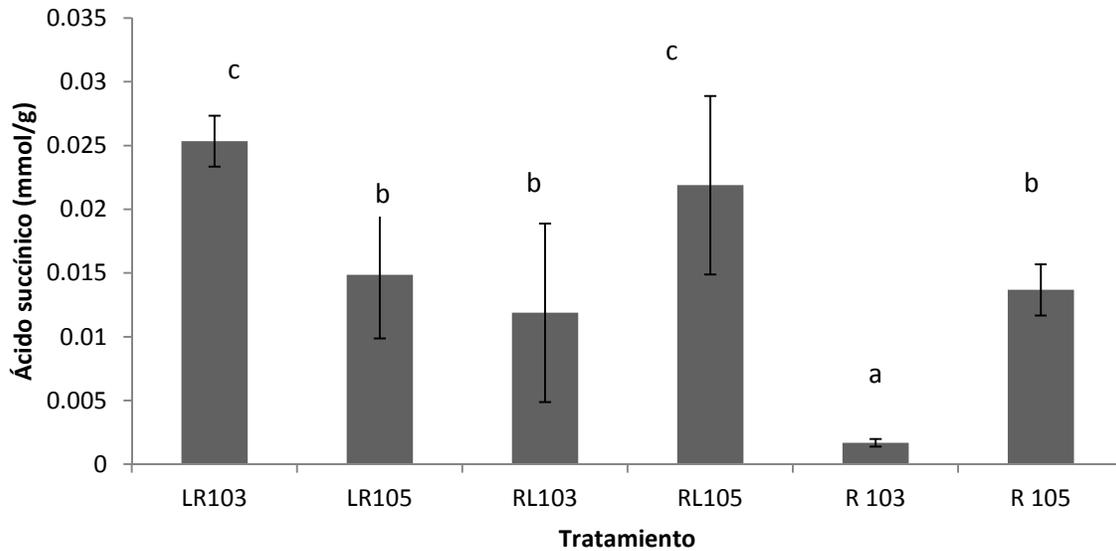
Los tratamientos R/L obtuvieron la media mayor, junto con el cultivo L/R  $10^3$ . Estos 3 tratamientos también obtuvieron la mayor concentración de ácido láctico.

El ácido cítrico (Fig 14) tuvo mayor concentración en el cultivo L/R  $10^3$ , mientras que los demás tratamientos no tuvieron diferencias significativas entre sí. Nuevamente, éste cultivo presentó la mayor media en otro ácido orgánico, junto con los ácidos acético y láctico. Sin embargo, la cantidad de ácido cítrico en todos los cultivos fue mucho menor que los dos ácidos anteriores, por lo tanto, hay una prevalencia del metabolismo anaerobio en las bacterias y el hongo. Esto también se relaciona con el hecho de que ningún cultivo presentó crecimiento visible de micelio, característico de metabolismo aerobio.



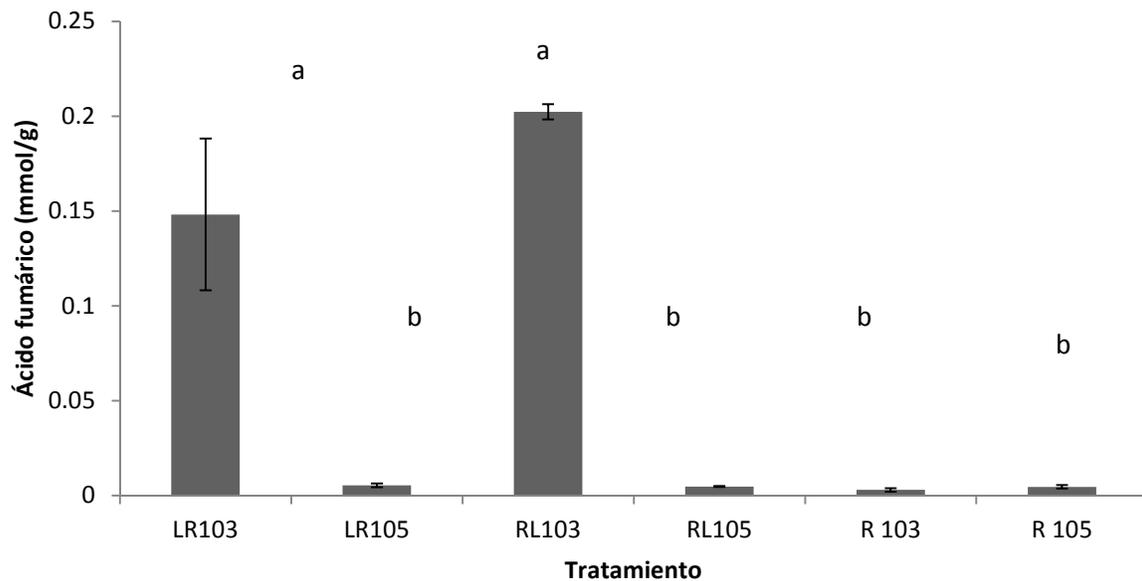
**Figura 14. Ácido cítrico (mmol/g) en muestras finales de cultivos con 20% de glucosa en desperdicios de camarón a 30°C inoculados con dos niveles de inóculo de *R* y 5% (v/v) de *L*. Letras diferentes indican grupos significativamente diferentes (Tukey-Kramer  $\alpha < 0.05$ ).**

El ácido succínico (Fig. 15) se presentó en mayor concentración en los cultivos L/R<sup>3</sup> y R/L 10<sup>5</sup> dónde el primero sigue presentando las medias más altas en los ácidos orgánicos. Éste ácido se encontró en cantidad mucho menor que los tres ácidos anteriores, comparándolo sólo con el ácido cítrico, las concentraciones están reducidas en un 50% aproximadamente, lo que concuerda con la producción de éste ácido en metabolismo aerobio.



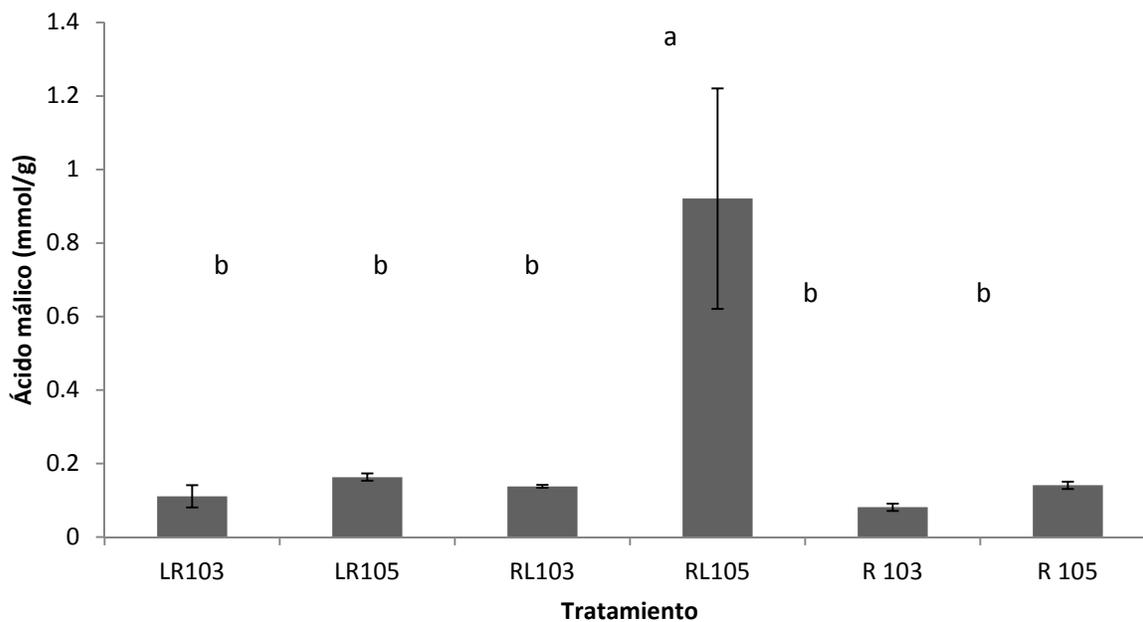
**Figura 15. Ácido succínico (mmol/g) en muestras finales de cultivos con 20% de glucosa en desperdicios de camarón a 30°C inoculados con dos niveles de inóculo de *R* y 5% (v/v) de *L*. Letras diferentes indican grupos significativamente diferentes (Tukey-Kramer  $\alpha < 0.05$ ).**

El ácido fumárico (Fig. 16) presentó la mayor concentración en los cultivos L/R 10<sup>3</sup> y R/L 10<sup>3</sup>, llegando casi a 0.2 mmol/g en éste último. Los demás tratamientos tienen cantidades mucho menores, pues apenas se acercan a 0.02 mmol/g.



**Figura 16. Ácido fumárico (mmol/g) en muestras finales de cultivos con 20% de glucosa en desperdicios de camarón a 30°C inoculados con dos niveles de inóculo de *R* y 5% (v/v) de *L*. Letras diferentes indican grupos significativamente diferentes (Tukey-Kramer  $\alpha < 0.05$ ).**

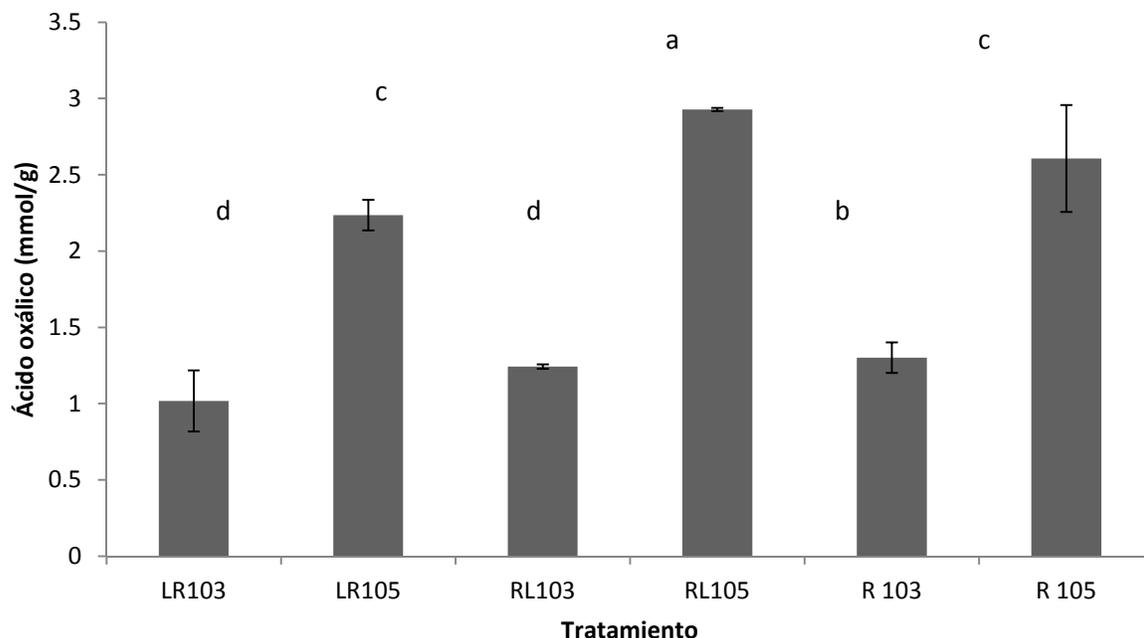
El ácido málico (Fig. 17) se presentó en cantidades mayores al ácido cítrico y succínico, ya que la concentración es similar a la del ácido acético y en el caso del tratamiento R/L  $10^5$ , que obtuvo la media mayor, la concentración es similar a las obtenidas en el ácido láctico.



**Figura 17. Ácido málico (mmol/g) en muestras finales de cultivos con 20% de glucosa en desperdicios de camarón a 30°C inoculados con dos niveles de inóculo de *R* y 5% (v/v) de *L*. Letras diferentes indican grupos significativamente diferentes (Tukey-Kramer  $\alpha < 0.05$ ).**

La figura 18 muestra las concentraciones de ácido oxálico, las cuáles son mayores que las concentraciones de los demás ácidos orgánicos determinados, ya que todos los tratamientos superan 1 mmol/g llegando a superar los 2 mmol/g. La media significativamente más alta de ácido oxálico se observó en el tratamiento R/L  $10^5$  mientras que las medias más bajas corresponden a los tratamientos L/R  $10^3$  y R/L  $10^3$ . El tratamiento con la media más alta fue también el que presentó la mayor concentración de ácido málico.

En la figura 18 se muestra que las medias de los tratamientos con nivel de inóculo de hongo de  $10^5$  presentan en general concentraciones mayores que el nivel de inóculo  $10^3$ .



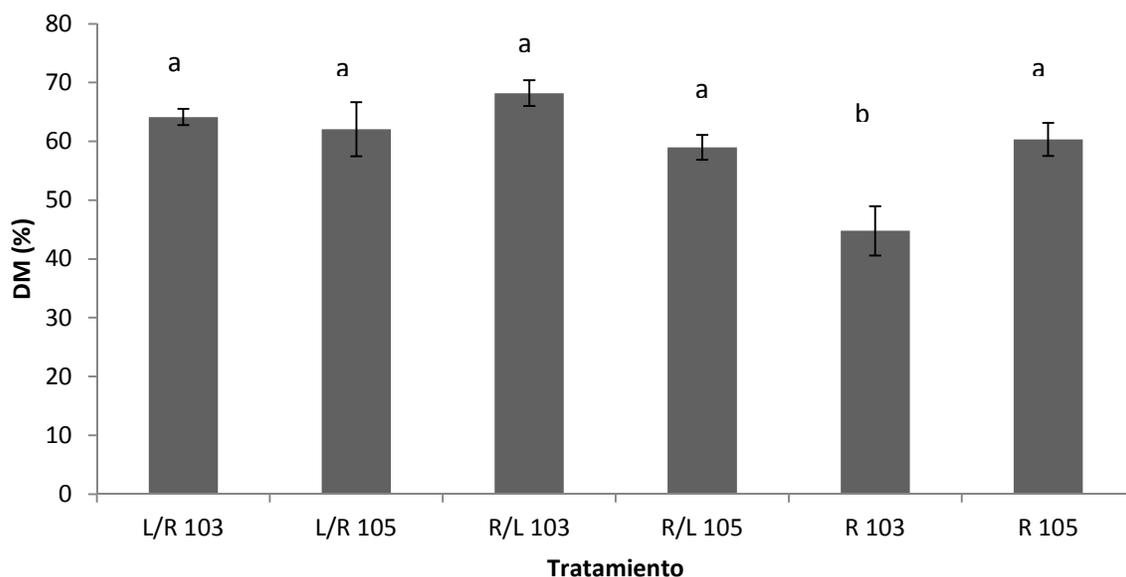
**Figura 18. Ácido oxálico (mmol/g) en muestras finales de cultivos con 20% de glucosa en desperdicios de camarón a 30°C inoculados con dos niveles de inóculo de *R* y 5% (v/v) de *L*. Letras diferentes indican grupos significativamente diferentes (Tukey-Kramer  $\alpha < 0.05$ ).**

Al analizar las concentraciones de los ácidos orgánicos determinados y su relación con los 6 tratamientos, se encuentra que los cultivos L/R 10<sup>3</sup> y R/L 10<sup>5</sup> presentaron las mayores cantidades en 5 de los 7 ácidos orgánicos. El primer tratamiento obtuvo las mayores concentraciones de ácidos láctico, acético, cítrico, succínico y fumárico. El segundo tratamiento obtuvo también las mayores concentraciones en los ácidos láctico, acético y succínico; pero además en los ácidos málico y oxálico. Tomando en cuenta las concentraciones de cada ácido orgánico en cada cultivo, puede decirse que el tratamiento R/L 10<sup>5</sup> debería lograr el mayor %DM, ya que los ácidos málico y oxálico, que pueden desmineralizar mayor cantidad de moles de CaCO<sub>3</sub>, se encuentran en mucho mayor concentración que los ácidos succínico y fumárico del tratamiento L/R 10<sup>3</sup>.

Otro aspecto a notar es que en la mayor parte de los tratamientos, el ácido que se encontró en mayor concentración fue el ácido oxálico, ácido con el que se expresó la ATT y que no es producido por bacterias homofermentativas.

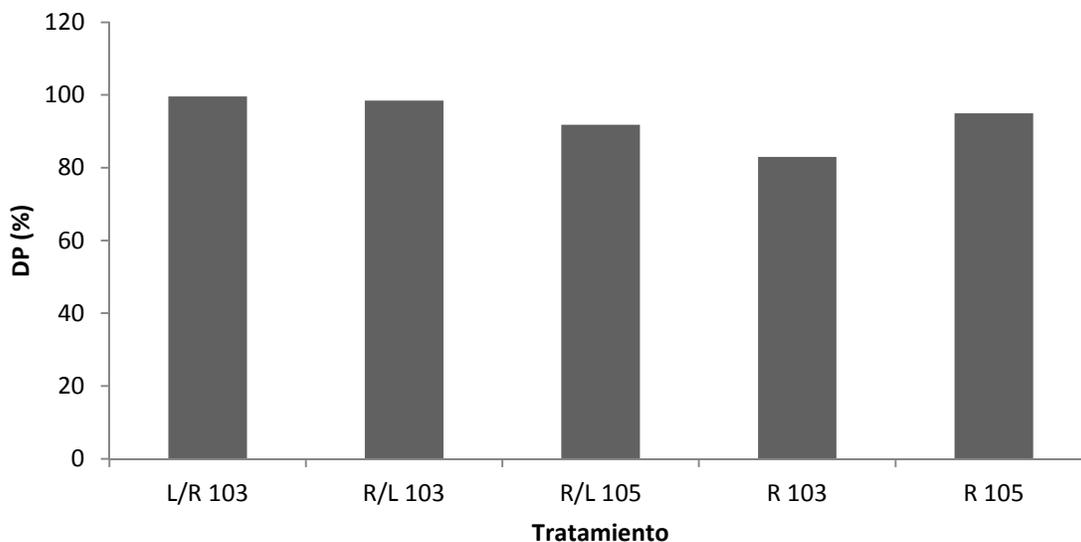
### 6.4.3 Análisis químico proximal

Los porcentajes de desmineralización se muestran en la figura 19, dónde se observa que el porcentaje final osciló entre 59% y 68%. Estos valores son similares a los encontrados en los cultivos iniciales, los cuales presentaban valores superiores a 60%. Sin embargo, se observa que no hay diferencias significativas entre los tratamientos, a excepción del cultivo R 10<sup>3</sup>, que presentó la media más baja. Ya que los tratamientos presentaron %DM estadísticamente iguales, las distintas concentraciones de ácidos orgánicos determinadas en cada tratamiento tampoco presentan diferencias, ya que aunque hubo tratamientos con mayor cantidad de ácidos como el láctico, málico y oxálico, no tuvieron mayor influencia en la desmineralización que los tratamientos con menor cantidad de éstos mismos ácidos, por lo tanto; en aspectos de desmineralización, cualquiera de los tratamientos es aceptable.



**Figura 19. %DM en muestras finales de cultivos con 20% de glucosa en desperdicios de camarón a 30°C inoculados con dos niveles de inóculo de *R* y 5% (v/v) de *L*. Letras diferentes indican grupos significativamente diferentes (Tukey-Kramer  $\alpha < 0.05$ ).**

En la figura 20 se observan los %DP, observándose que todos son superiores al 90%, con excepción del cultivo R 10<sup>3</sup>. Los cultivos L/R y R/L, ambos con nivel de inóculo 10<sup>3</sup> son los que presentan los valores más altos, 99.61% y 98.4% respectivamente.



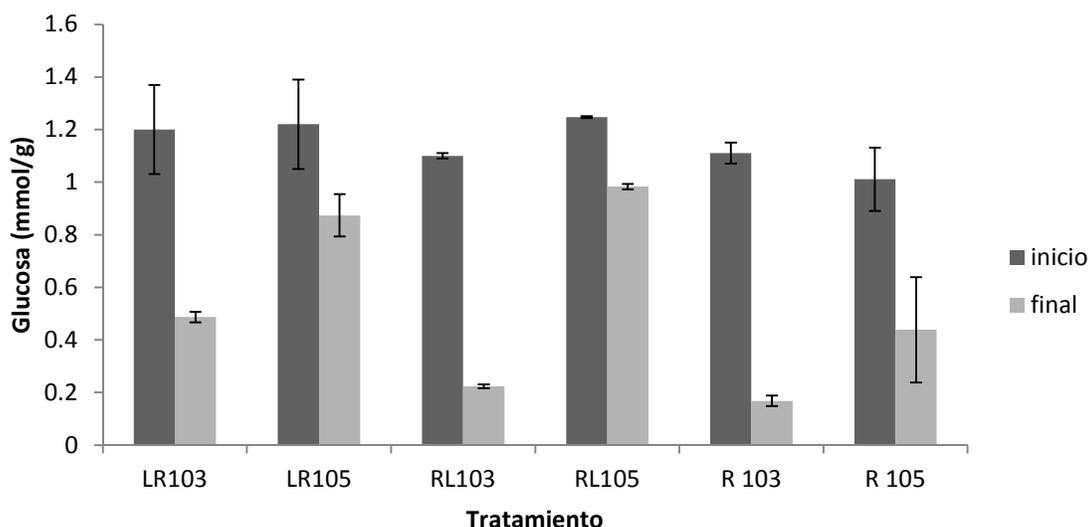
**Figura 20. %DP en muestras finales de cultivos con 20% de glucosa en desperdicios de camarón a 30°C inoculados con dos niveles de inóculo de *R* y 5% (v/v) de *L*. El cultivo L/R 10<sup>5</sup> no se muestra\*.**

El cultivo L/R 10<sup>5</sup> no se muestra en la figura 20\*, ya que el valor determinado de nitrógeno total fue menor que el valor de referencia de nitrógeno de quitina, lo que resultaba en %DP superiores al 100%.

#### 6.4.4 Consumo de azúcares (glucosa)

En todos los cultivos se observó una disminución en la concentración de glucosa comparando los tiempos iniciales y finales; por lo que hubo consumo de la misma. En la figura 21 se muestra que en los tratamientos con nivel de inóculo del hongo de 10<sup>3</sup> tienen mayor consumo de glucosa que los tratamientos con inóculo 10<sup>5</sup>, lo que puede deberse a que el primer nivel de inóculo fue preparado con dos diluciones, siendo la primera dilución en agua y la segunda dilución en el desperdicio de camarón. El segundo nivel de inóculo no se elaboró con dos diluciones, si no con una sola dilución directa en el desperdicio de camarón. Esta forma de preparar el inóculo de esporas fue probablemente la causa por la que la glucosa pudo metabolizarse mejor en los tratamientos con nivel de inóculo 10<sup>3</sup>, puesto que al haber más agua disponible en el sistema y al tener temperatura de 30° C, la glucosa pudo disolverse mejor; esto si se toma en cuenta que a esa

temperatura pueden disolverse hasta 140 g de glucosa en 100 g de agua, cantidad de agua presente en las fermentaciones con inóculo  $10^3$ . Con base en lo mencionado, los microorganismos pudieron aprovechar la glucosa más fácilmente que aquellos cultivos con inóculo  $10^5$ , dónde no se añadió agua al sistema (Fig 20).



**Figura 21. Concentración de glucosa en muestras iniciales y finales de cultivos con 20% de glucosa en desperdicios de camarón a 30°C inoculados con dos niveles de inóculo de *R* y 5% (v/v) de *L*.**

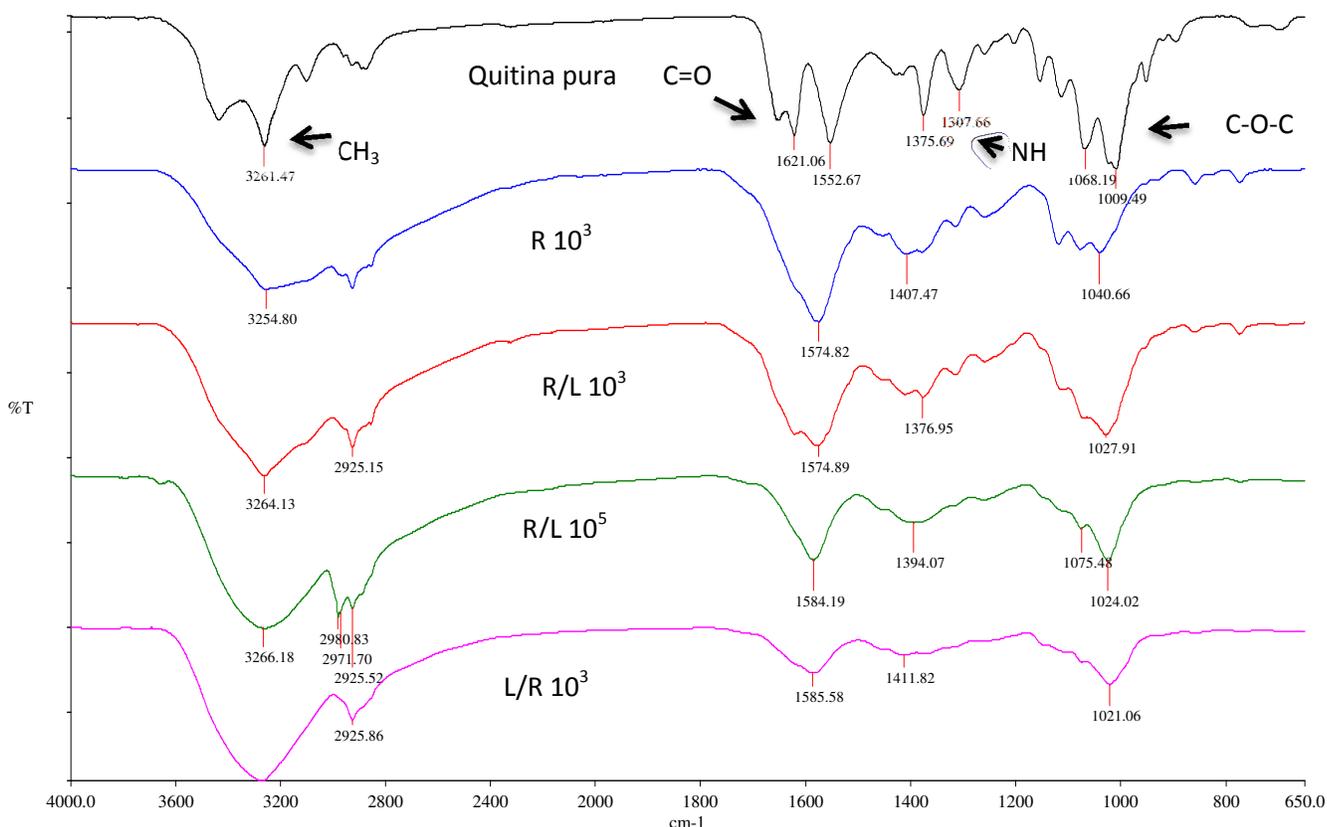
De acuerdo al análisis estadístico efectuado, los porcentajes de desmineralización son iguales para todos los tratamientos, excepto el cultivo R con nivel de inóculo  $10^3$  cuya media es la más baja. Aunque no hay diferencias significativas entre los 5 tratamientos restantes, se observa que el tratamiento R/L  $10^3$  presentó la media más alta.

### 6.5 Caracterización de productos finales

Con base en los resultados de los porcentajes de desmineralización, se obtuvo que aunque la mayoría de los tratamientos no presentan diferencias significativas, hubo tratamientos con mayor concentración de ácidos orgánicos que presentaron las medias más altas de desmineralización. Los tratamientos L/R  $10^3$ , R/L  $10^3$  y R/L  $10^5$  presentan las medias más

altas, por lo que la quitina cruda obtenida (tiempo final) en cada una de ellas, fue caracterizada mediante espectroscopía infrarroja.

Los espectros infrarrojos de las muestras finales de los cultivos ya despigmentados, que son llamados quitina cruda (QC); se observan en la figura 21, donde son comparadas con un espectro de quitina pura. Pueden observarse los picos característicos de la quitina: CH<sub>3</sub>, C=O, NH y C-O-C, los cuales se mencionan en el espectro de quitina pura. Al hacer la comparación se observó que el espectro de R/L 10<sup>3</sup> ya comienza a presentar los picos correspondientes a los grupos carbonilo y amino; esto indica que es la que presenta mejor purificación; aunque aún se requiere una purificación (desproteización y desmineralización) mayor para obtener quitina pura. Los espectros de QC de los cultivos R 10<sup>3</sup>, R/L 10<sup>5</sup> y L/R 10<sup>3</sup> no presentan estos picos; por lo que requieren mayor tratamiento que R/L para conseguir quitina pura.



**Figura 22. Espectro infrarrojo (ATR-FTIR) comparando muestras de Quitina Cruda de los diferentes cultivos con una muestra de Quitina Pura.**

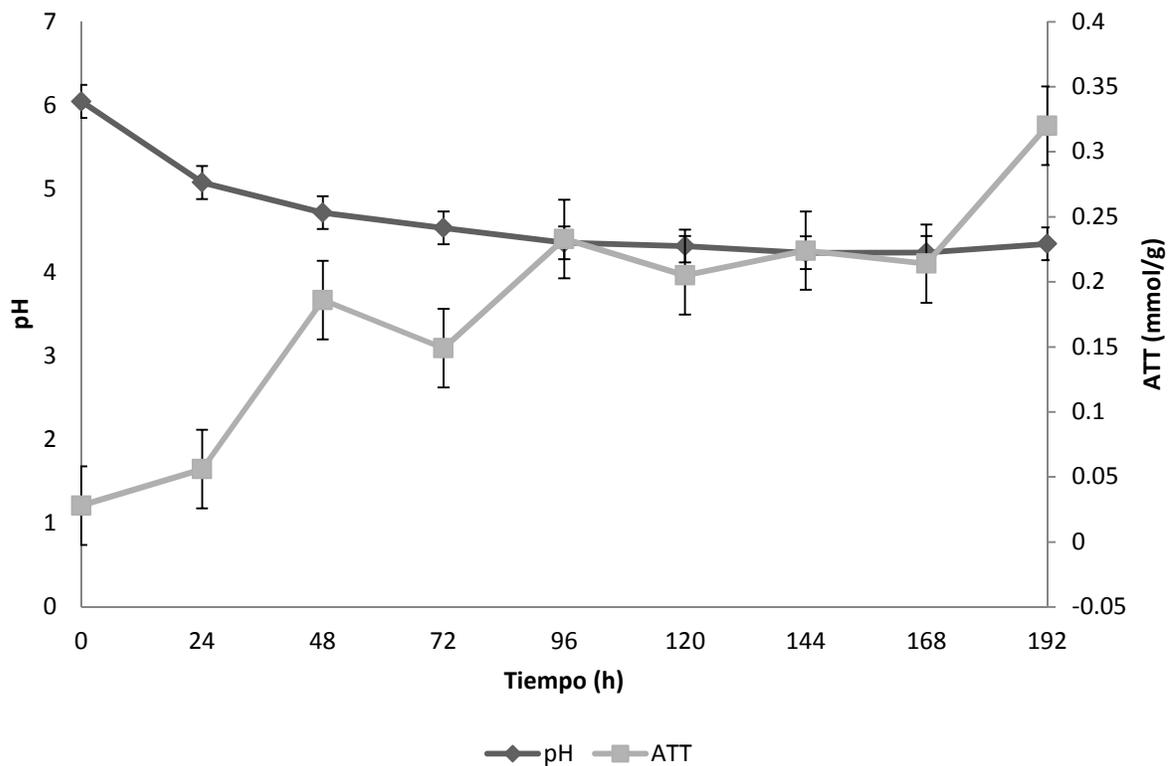
Con base en los resultados de desmineralización y espectros infrarrojos se llegó a la conclusión de que el tratamiento R/L  $10^3$  presentó una mayor purificación y por lo tanto, la quitina cruda obtenida necesita pasos posteriores de purificación menos exhaustivos en comparación con los otros tratamientos. A pesar de que éste cultivo obtuvo la media mayor en la generación de sólo 3 ácidos orgánicos (ácidos láctico, acético y fumárico), estadísticamente presentó el mismo porcentaje de desmineralización que los otros cultivos, aunque la media general fue la mayor de todos los tratamientos. Otro aspecto es que al tener el nivel de inóculo de *R. oligosporus* de  $10^3$ , nivel que se obtuvo al diluir las esporas primero en agua destilada y posteriormente en el desperdicio de camarón, no es necesaria la inversión de más recursos como lo sería para tener una cantidad de esporas más alta como  $10^5$ , además de que la cantidad de agua agregada al sistema pudo ser un factor que mejoró la purificación de la quitina mediante el aumento de %DM.

## 6.6 *Tercera etapa*

Al determinar que el tratamiento con mejores resultados fue R/L  $10^3$ , se realizaron cinéticas del tratamiento, tomando muestras cada 24 h hasta las 192 h totales. A cada muestra se le realizaron las siguientes determinaciones: pH, ATT, humedad, cenizas y proteína. Éstos últimos se utilizaron para calcular los %DM y %DP.

### 6.6.1 pH y ATT

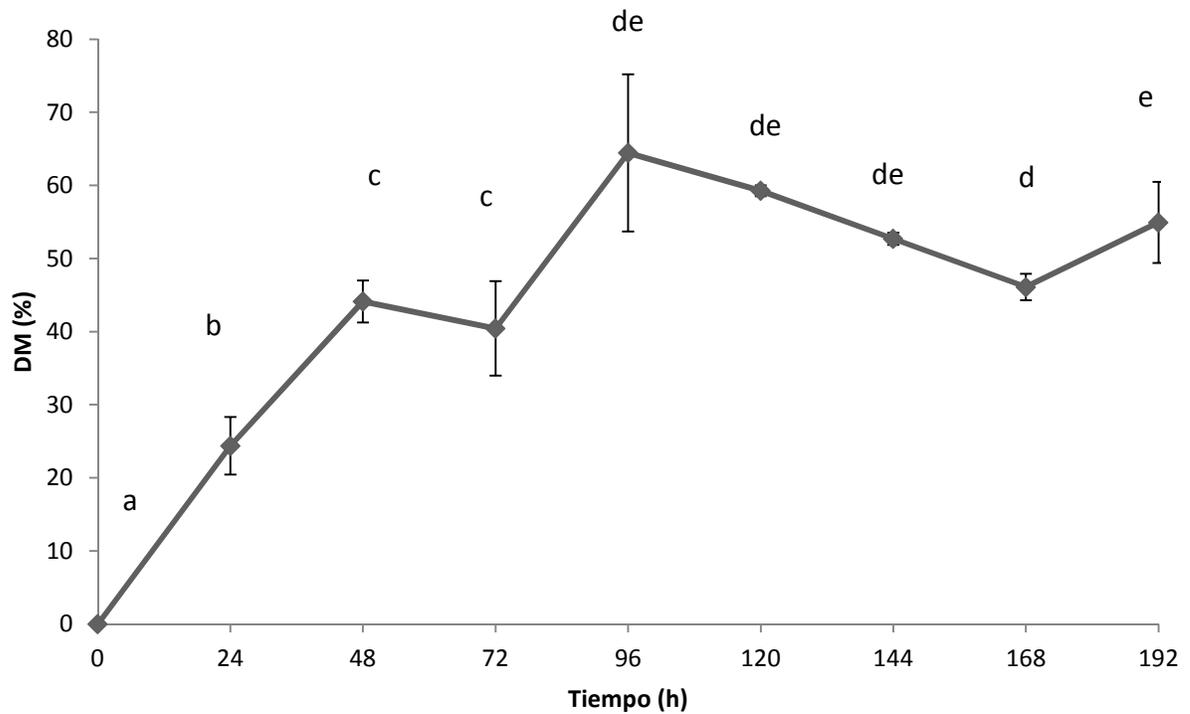
El pH inicial se encontró en 6 aproximadamente, mientras que el final fue de 4.3, valor que coincide con el pH del cultivo realizado en la segunda etapa, sin embargo; es un valor ligeramente alto en comparación con los cultivos iniciales donde el pH disminuyó a valores de 3.2-3.8. La ATT (expresada como mmol de ácido oxálico por gramo de licor) varió entre 0.45 y 0.57 mmol/g (Fig. 22).



**Figura 23. pH y ATT del cultivo R/L con nivel de inóculo  $10^3$  con 20% de glucosa en desperdicios de camarón a 30°C.**

### 6.6.2 Análisis Químico Proximal

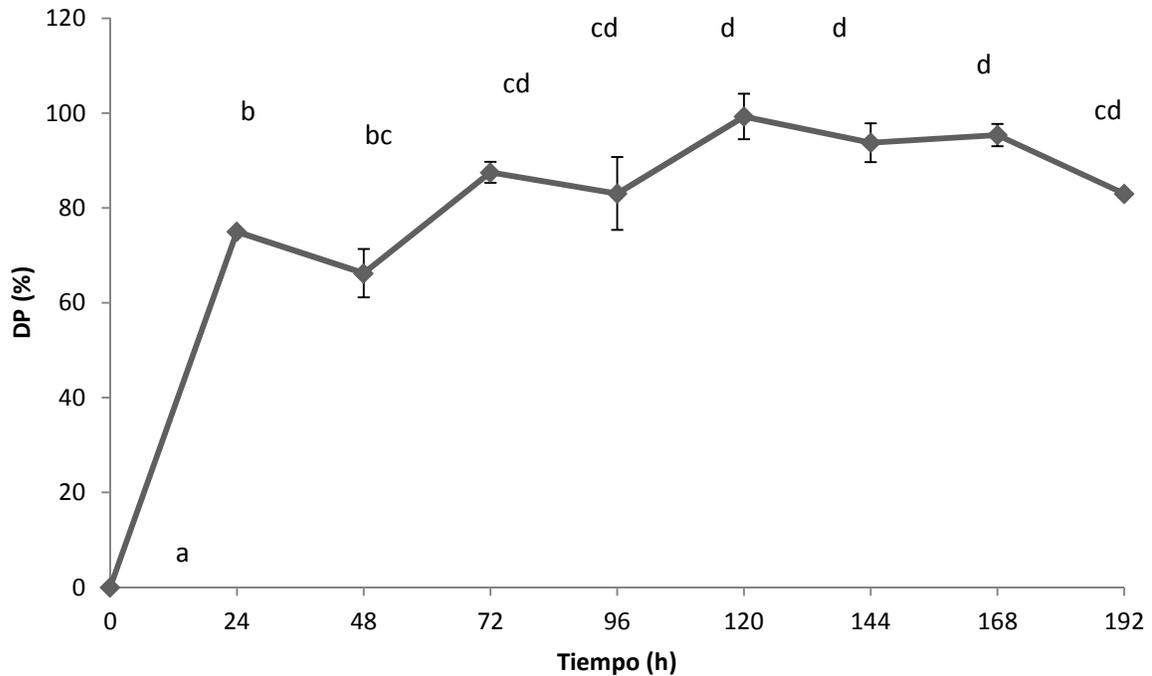
Los %DM se muestran en la figura 23, donde se observa que el porcentaje final fue 55%. El valor se encuentra por debajo de los encontrados en los cultivos iniciales, los cuales presentaban valores superiores a 60%. Esto puede deberse a la alta cantidad de cenizas en el lote de camarón, que fue de 23% en comparación con el 16% y 20% de los lotes anteriores (Tabla 3).



**Figura 24. %DM del cultivo R/L con nivel de inóculo  $10^3$  con 20% de glucosa en desperdicios de camarón a 30°C. Las letras diferentes indican grupos significativamente diferentes (Tukey-Kramer  $\alpha < 0.05$ ).**

También se observa que el %DM a las 96 h en el cultivo no presenta diferencias significativas con los porcentajes del tiempo final.

Los %DP (Fig 24) tuvieron un resultado distinto a los %DM, ya que fueron valores mayores que aquellos presentados en los cultivos iniciales, que fueron de 80% aproximadamente. Puede observarse que a las 72 h, se alcanza el mayor %DP, tiempo que estadísticamente es igual a la desproteínización a las 192 h, aunque el valor final es menor a los registrados en las muestras de tiempos anteriores.



**Figura 25. %DP del cultivo R/L con nivel de inóculo  $10^3$  con 20% de glucosa en desperdicios de camarón a 30°C. Letras diferentes indican grupos significativamente diferentes (Tukey-Kramer  $\alpha < 0.05$ ).**

## 6.7 ANÁLISIS GENERAL

Con base en los resultados, concluimos que el tiempo de fermentación a las 92 h es suficiente para alcanzar los máximos %DM y %DP, aun cuando la mayor concentración de ácido se alcanza hasta las 192 h, lo que indica que si la fermentación continuara por más tiempo los porcentajes de desmineralización podrían aumentar.

En cuanto a la desproteínización, puede que a mayor tiempo de fermentación también aumente el %DP, pero es posible que efectuar un lavado a la quitina cruda obtenida tenga también efecto para remover proteína así como para remover minerales. También debe considerarse que el %DP en la segunda etapa fue de 98%, por lo que el lote de desperdicio de camarón tiene influencia sobre la desproteínización pues como se muestra en la tabla 3, el lote 2 utilizado en la segunda etapa tiene menor porcentaje de proteína que el lote 3 utilizado en la tercera etapa experimental.

Los porcentajes de desmineralización y desproteínización obtenidos en el cultivo en cinética fueron de 54.9% y 83% respectivamente. Comparado con la investigación realizada por Jung y colaboradores en el 2006, quienes obtuvieron 97.2% de desmineralización y un 52.6% de desproteínización en un cultivo multietapas con dos bacterias, se observa que la desmineralización es mayor a lo obtenido en esta investigación; sin embargo, los porcentajes de desproteínización son mucho menores en comparación con el porcentaje obtenido en éste trabajo. Por otra parte, la investigación de Zhang y colaboradores en 2012 fue realizada igualmente con dos bacterias, obteniendo %DM y %DP de 93% y 94% respectivamente, aunque los autores hacen notar que al llevarlo a cabo en frascos con agitación no lo recomiendan a grandes escalas, aspecto que en nuestro trabajo no es limitante puesto que no llevamos a cabo agitación de los cultivos. Younes y colaboradores en el 2012 encontraron un valor de desproteínización de 88% utilizando enzimas obtenidas de *Bacillus subtilis*. Aunque el tiempo de incubación de la enzima fue menor, si tomamos en cuenta que los %DP resultantes de la segunda etapa experimental son superiores a los determinados en el cultivo en cinética, el %DP es aún menor, sin mencionar que la investigación citada no utiliza la fermentación como medio de desmineralización, si no que utiliza HCL para desmineralizar las muestras ya desproteínizadas. Cira y colaboradores en el 2002 obtuvieron 87% de desmineralización y valores menores al 90% de desproteínización, por lo que la presente investigación supera la desproteínización encontrada por su investigación. La investigación de Ghorbel-Bellaaj y colaboradores en 2012 presenta %DM y %DP de 78% y 95% respectivamente al utilizar diferentes cepas de *Bacillus*. El %DM es superior al presentado en éste trabajo, pero el %DP es similar, sin embargo, hay que considerar que los investigadores llevaron a cabo un pretratamiento del desperdicio de camarón, puesto que lo lavaron y esterilizaron antes de inocular, tratamientos que no fueron llevados a cabo en nuestro trabajo.

Otro aspecto a discutir es el hecho de que el nivel de inóculo  $10^3$  resultara más efectivo que el inóculo  $10^5$ . La investigación de Sarrette y colaboradores en 1992 reportó que un mayor contenido de humedad en un cultivo con *Rhizopus oligosporus* mejora el crecimiento del mismo así como la expresión de polisacáridasas. Esto puede explicar

porque un nivel de inóculo menor pero con mayor disponibilidad de agua tuvo mejores efectos.

No puede determinarse completamente la ausencia de una sustancia antibiótica por parte de *Rhizopus oligosporus* (Kobayashi et al, 1992), ya que se observó producción de ácido láctico con la presencia del hongo que ha sido reportado como productor de ácido láctico en menor cantidad que otras especies de *Rhizopus*, las cuales son utilizadas para producción específica de éste ácido orgánico ya que presentan mejores características para ciertas aplicaciones, como la producción de ácido poliláctico (Phrueksawan et al, 2012; Huang et al, 2013) que el ácido láctico generado por bacterias.

Con la información obtenida puede observarse que *R. oligosporus* es un hongo fermentador con actividad de proteasas y lipasas, que eliminarían la cantidad de proteína, lípidos y minerales en el residuo de camarón sin degradar la quitina, por lo que al utilizarlo en un cultivo con lactobacilos puede mejorarse la calidad de la quitina obtenida.

## 7 CONCLUSIONES

\*El mejor tratamiento para la obtención biológica de quitina es aquel con *Rhizopus oligosporus* como microorganismo iniciador (72 h) a un nivel de inóculo de  $2.8 \times 10^3$  esporas, seguido de *Lactobacillus spp* B2 (120 h) al 5%.

\* El nivel de inóculo  $10^3$ , obtenido por dos diluciones dónde la primera es efectuada en agua destilada y la segunda directamente sobre el desecho de camarón, obtuvo mejores resultados que el nivel  $10^5$ , esto puede deberse al uso de mayor contenido de agua en el primer nivel de inóculo.

\*Los %DM fueron altos en el cultivo R/L  $10^3$ , ya que superó el 65% de remoción de minerales, aun cuando en el cultivo en cinética fue menor al 60%. La producción de ácido oxálico y ácido láctico, así como la adición de agua destilada contribuyeron principalmente a la desmineralización.

\*Los %DP obtenidos fueron altos en comparación con investigaciones que sólo utilizan microorganismos; aun cuando hay reportes con porcentajes superiores al 90%, ya que éstos emplean enzimas directamente en la fermentación o realizan procedimientos con microorganismos que difícilmente pueden repetirse a gran escala.

\*La utilización de *Rhizopus oligosporus* es una alternativa para la extracción biológica de quitina, ya sea como único microorganismo o en combinación con bacterias lácticas.

## 8 PERSPECTIVAS

\*Evaluar la presencia de sustancias antibióticas por parte de *Rhizopus oligosporus*.

\*Confirmar crecimiento de microorganismos inoculados.

\*Probar otros niveles de inóculo con mayor cantidad de agua disponible.

\*Continuar con la caracterización de la quitina cruda obtenida (Peso molecular, grado de acetilación e índice de cristalinidad), así como determinar la no despolimerización del biopolímero.

\*Probar fuentes de carbono alternativas que aumenten la actividad de proteasas de *Rhizopus oligosporus*.

## 10 BIBLIOGRAFÍA

- 1- AOAC. (1990). Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C. 13th edition.
- 2- Azeke, M.A., Greiner, R., Jany, K. (2011). Purification and characterization of two intracellular phytases from the tempeh fungus *Rhizopus oligosporus*. *Journal of Food Biochemistry*. **35**:213-227.
- 3- Centeno, B. S., Rodríguez, B.R. (2007). Actividad enzimática de bacterias frecuentes en camarones (*Litopenaeus schmitti*), mejillones (*Perna viridis*) y calamares (*Loligo plei*) congelados producidos en Cumaná, Estado Sucre, Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. **27** no.1.
- 4- Cira, L.A., Huerta, S., Hall, G.M., Shirai, K. (2002). Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemistry*. **37**:1359-1366.
- 5- Cocolletzi, H.H., Almanza, E.A., Agustín, O.F., Nava, V.E.L., Cassellis, E.R. (2009). Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Superficies y vacío*. **22**:57-60.
- 6- CONAPESCA, (2012). Seguimiento mensual de camarón de cultivo.
- 7- Feng, S., Song, L., Lee, Y.K., Huang, D. (2010). The effects of fungal stress on the antioxidant contents of Black Soybeans under germination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **58**:12491-12496.
- 8- Flores-Albino, B., Arias, L., Gómez, J., Castillo, A., Gimeno, M., Shirai, K. (2012). Chitin and L(+)-lactic acid production from crab (*Callinectes bellicosus*) wastes by fermentation of *Lactobacillus sp.* B2 using sugar cane molasses as carbon source. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. **35**:1193–1200.
- 9- Ghanem, A., Ghaly, A.E., Chaulk, M. (2004). Effect of shrimp processing procedures on the quality and quantity of extracted chitin from shells of Northern shrimp. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. **12**:63-79.

- 10- Ghorbel-Bellaaj, O., Younes, I., Maâlej, H., Hajji, S., Nasri, M. (2012). Chitin extraction from shrimp shell waste using *Bacillus* bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*. **51**:1196– 1201
- 11- Gimeno, M., Ramírez-Hernández, J.Y., Martínez-Ibarra, C., Pacheco, N., García-Arrazola, R., Bárzana, E., Shirai, K. (2007) One-solvent extraction of astaxanthin from lactic acid fermented shrimp wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **55**:10345-10350.
- 12- Gonçalves, M. S., Soares, B. D.M., Dantas, V. M. C. (2013). Development of a PCR method for detecting proteolytic psychrotrophic bacteria in raw milk. *International Dairy Journal* **29**: 8-14.
- 13- Guo, Y., Yan, Q., Jian, Z., Teng, C., Wang, X. (2010). Efficient production of lactic acid from sucrose and corncob hydrolysate by a newly isolated *Rhizopus oryzae* GY18. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **37**:1137–1143.
- 14- Hirano S. (1999). Chitin and chitosan as novel biotechnological materials. *Polymer International*. **48**: 732-734.
- 15- Hong, T.K., Flint, S., Palmer, J., Andrews, P., Bremer, P., Lindsay, D. (2012). Proteolysis produced within biofilms of bacterial isolates from raw milk tankers. *International Journal of Food Microbiology*. **157**:28–34.
- 16- Huang, L.P., Jin, B., Lant, P., Zhou, J. (2003). Biotechnological production of lactic acid integrated with potato wastewater treatment by *Rhizopus arrhizus*. *Journal of Chemical and Technology and Biotechnology*. **78**:899-906.
- 17- Hsing-Chen, C., Ken-Aun, P., Sheu-der, W., Wei-Huin, M. (2001). Isolation of chitin from shrimp shells deproteinized by *Candida parapsilosis*. *Food Science and Agricultural Chemistry*. **3**:114-120.
- 18- Iftikhar, T., Niaz, M., Zia, M.A., Ikram-Ul-Haq (2010). Production of extracellular lipases by *Rhizopus oligosporus* in a stirred fermentor. *Brazilian Journal of Microbiology*. **41**:1124-1132.

- 19- Ikram-Ul-Haq, Mukhtar, H., Daudi, S., Ali, S., Qadeer, M.A. (2003) .Production of proteases by a locally isolated mould culture under lab conditions. *Biotechnology*. **1**:30-36.
- 20- Jia-Shin, L., Shuo-Kang, L., Yeh, C., Wei-De, L., Chao-Hung, K. (2011). Purification and characterization of a novel extracellular tripeptidyl peptidase from *Rhizopus oligosporus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **59**:11330-11337.
- 21- Juárez, C.C.J., (2012). Obtención y caracterización de quitina biológica y su desacetilación a quitosano. *Tesis para obtención de grado maestría en biotecnología*. Universidad Autónoma Metropolitana, México.
- 22- 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.
- 23- Kobayashi, S., Okazaki, N., Koseki, T. (1992). Purification and characterization of an antibiotic substance produced from *Rhizopus oligosporus* IFO 8631. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. **56**:94-98.
- 24- Kurita, K. (2001). Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Progress in Polymer Science*. **26**:1921–1971.
- 25- Lakshmanan, R., Jeya, S. R., Jeyasekaran, G. (2002). Survival of amine-formation bacteria during the ice storage of fish and shrimp. *Food Microbiology*. **19**:617-625.
- 26- Nitayavardhana, S., Khanal, S.K. (2010). Innovative biorefinery concept for sugar-based ethanol industries: Production of protein-rich fungal biomass on vinasse as an aquaculture feed ingredient. *Bioresource Technology*. **101**:9078-9085.
- 27- Oduguwa, O.O., Edema, M.O., Ayeni, A.O. (2008). Physico-chemical and microbiological analyses of fermented corncob, rice bran and cowpea husk for use in composite rabbit feed. *Bioresource technology*. **99**:1816-1820.

- 28- Pacheco, N., Garnica-González, M., Gimeno, M., Bárzana, E., Trombotto, S., David, L., Shirai, K. (2011). Structural characterization of chitin and chitosan obtained by biological and chemical methods. *Biomacromolecules*. **12**:3285-3290.
- 29- Phelps, R.J., McKillip, J.L. (2002). Enterotoxin Production in Natural Isolates of Bacillaceae outside the *Bacillus cereus* Group. *Applied Environmental Microbiology* **68**: 3147-3151.
- 30- Phruksawan, P., Kulpreecha, S., Sooksai, S., Thongchul, N. (2012). Direct fermentation of L(+)-lactic acid from cassava pulp by solid state culture of *Rhizopus oryzae*. *Bioprocess Biosystems Engineering*. **35**:1429–1436.
- 31- Ramírez-Coutiño, L.; Marín-Cervantez, M.C., 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.
- 32- Sarrette, M., Nout, M.J.R., Gervais, P., Rombouts, F.M. (1992). Effect of water activity on production and activity of *Rhizopus oligosporus* polysaccharidases. *Applied Microbiology Biotechnology*. **37**:420-425.
- 33- SAGARPA (2009). Anuario Estadístico.
- 34- Shirari, K., Guerrero, I., Huerta, S., Saucedo, G., Castillo, A., González, R.O., Hall, G.M. (2001). Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation. *Enzyme and Microbial Technology*. **28**:446-452
- 35- Swiontek-Brzezinska, M., Lalke-Porczyk, E., Donderski, W. (2007). Chitinolytic activity of bacteria and fungi isolated from shrimp exoskeletons. *Oceanological and Hydrobiological Studies, International Journal of Oceanography and Hydrobiology*. **36**:101-111.
- 36- Takaya, N., Yamazaki, D., Horiuchi, H., Ohta, A., Takagi, M. (1998). Intracellular chitinase gene from *Rhizopus oligosporus*: molecular cloning and characterization. *Microbiology*, **144**:2647-2654.
- 37- Voet, D., Voet, J.G., Pratt, C.W. (2008). Fundamentals of Biochemistry. Life at the molecular level. 3<sup>rd</sup> Edition. John Wiley & Sons, Inc, USA; p. 230.

- 38- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**(12):7879-7885.
- 39- Ward, O.P. (2012). Production of recombinant proteins by filamentous fungi. *Biotechnology Advances*. **30**:1119–1139.
- 40- Xu, Y., Gallert, C., Winter, J. (2008). Chitin purification from shrimp wastes by microbial deproteinization and decalcification. *Environmental Biotechnology*. **79**:687-697.
- 41- Yanai, K., Takaya, N., Kojima, N., Hiriouchi, H., Ohta, A., Takagi, M. (1992). Purification of two chitinases from *Rhizopus oligosporus* and isolation and sequencing of the encoding genes. *Journal of Bacteriology*. **174**:7398-7406.
- 42- Younes, I., Ghorbel-Bellaaja, O., Nasria, R., Chaabounib, M., Rinaudoc, M., Nasria, M. (2012). Chitin and chitosan preparation from shrimp shells using optimized enzymatic deproteinization. *Process Biochemistry*. **47**:2032–2039.
- 43- Zhang, H., Yin, W., Deng, Y., Wang, D., Zhao, Y. (2012). Production of chitin from shrimp shell powders using *Serratia marcescens* B742 and *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 successive two-step fermentation. *Carbohydrate Research*. **362**:13–20.
- 44- Zhu, N., Xia, H., Wang, Z., Zhao, X., Chen, T. (2013). Engineering of Acetate Recycling and Citrate Synthase to Improve Aerobic Succinate Production in *Corynebacterium glutamicum*. *PLoS ONE* **8**(4): e60659. doi:10.1371/journal.pone.0060659

## 10.1 BIBLIOGRAFÍA ELECTRÓNICA

- 1- Merck Index on line: <<http://www.rsc.org/Merck-Index/>>