



EVALUACIÓN DE PROCESOS COMBINADOS: PURIFICACIÓN DE QUITINA A PARTIR DE EXOSQUELETOS DE CAMARÓN (*Penaeus sp*) Y CHAPULÍN (*Sphenarium purpurascens*) †

[EVALUATION OF COMBINED PROCESSES: CHITIN PURIFICATION FROM SHRIMP (*Penaeus sp*) AND GRASSHOPPER (*Sphenarium purpurascens*) EXOSKELETONS]

Adolfo Amador-Mendoza^{1*}, José Manuel Juárez-Barrientos¹, Hipólito Hernández-Hernández¹, Laura Patricia Ramírez-Coutiño², Sergio Huerta-Ochoa³, Erasmo Herman-Lara⁴ and Jesús Rodríguez-Miranda⁴

¹Instituto de Agroingeniería, Universidad del Papaloapan Campus Loma Bonita. C.P. 68400. Av. Ferrocarril s/n, CD. Universitaria, Loma Bonita, Oax., México. E-mails: fito_adamme@hotmail.com, juarez_jose13@hotmail.com, polo13_87-08@hotmail.com

²Instituto de Biotecnología, Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec. C.P. 6830. Circuito Central #200, Colonia Parque Industrial, Tuxtepec, Oax., México. E-mails: raclape@yahoo.com.mx

³Universidad Autónoma Metropolitana. Depto. de Biotecnología. C.P. 09340. Av. San Rafael Atlixco No. 186, Iztapalapa, México, D. F. E-mails: sho@xanum.uam.mx

⁴Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tuxtepec. C.P. 68350. Calzada. Dr. Víctor Bravo Ahúja, No. 561, Col. Predio el Paraíso, Tuxtepec, Oaxaca, México. E-mails: erasmo_hl@hotmail.com, jesrodmir@gmail.com

*Corresponding author

SUMMARY

Background. Chitin is found in high concentration in insects, this being a new source of exploitation, due to the similarity in the content of chitin in exoskeletons of crustaceans compared to insects, especially those considered pests. **Objective.** Evaluate and compare the biological process of solid medium fermentation (SMF) combined with three treatments: ultrasonication, chemical and enzymatic hydrolysis in the purification of chitin from shrimp (*Penaeus sp*) and grasshopper (*Sphenarium purpurascens*) exoskeletons. **Methodology.** It consisted of the implementation of a pretreatment by fermentation in a solid medium (SMF) with chitinous samples (shrimp and grasshopper) combined with ultrasonication (20 kHz, 750 W, 120 min, 30 °C, 1/20 p/v), hydrolysis chemical (0.4 M NaOH, 0.6 N HCl, 38% NaClO, 1/15 p/v, 25 °C, 4 h) and enzymatic (Alcalase® 2.4L, 1:2 E:S, pH 7.5, 70 °C, 150 rpm, 300 min). **Results.** The combined treatments of SMF-ultrasonication, SMF-chemical hydrolysis, and SMF-enzymatic hydrolysis showed a higher percentage of deproteinization (84.82, 94.67, and 80.45%) and demineralization (82.12, 95.58, and 52%) with shrimp exoskeletons compared to shrimp exoskeletons grasshopper percentages (76.38, 92.04 and 78.71%) and (79.39, 95.37 and 51.79%) respectively. **Implications.** The chemical treatment generated greater protein and mineral removal compared to the other treatments, reaching yields of 54.45% in shrimp and 51.88% in grasshoppers. **Conclusion.** Ultrasonic waves extracted chitin in a shorter time (2h) with yields of 74.43% in shrimp and 78.02% in grasshoppers, reducing the amount of water.

Key words: Shrimp and grasshopper exoskeletons; combined processes; deproteinization; demineralization and chitin.

RESUMEN

Antecedentes. La quitina se encuentra en elevada concentración en insectos, siendo ésta una nueva fuente de explotación, debido a la similitud en el contenido de quitina en exoesqueletos de crustáceos en comparación con los insectos sobre todo con los considerados plaga. **Objetivo.** Evaluar y comparar el proceso biológico de la fermentación en medio sólido (FMS) combinado con tres tratamientos: Ultrasonificación, hidrólisis química y enzimática en la purificación de quitina a partir de exoesqueletos de camarón (*Penaeus sp*) y chapulín (*Sphenarium purpurascens*). **Metodología.** Consistió en la implementación de un pretratamiento por fermentación en medio sólido (FMS) con muestras quitinosas (camarón y chapulín) combinados con la ultrasonificación (20 kHz, 750 W, 120 min, 30 °C, 1/20

† Submitted April 25, 2022 – Accepted June 9, 2022. <http://doi.org/10.56369/tsaes.4240>



Copyright © the authors. Work licensed under a CC-BY 4.0 License. <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

ISSN: 1870-0462.

p/v), hidrólisis química (NaOH a 0.4 M, HCl a 0.6 N, NaClO al 38%, 1/15 p/v, 25 °C, 4 h) y enzimática (Alcalase® 2.4L, 1:2 E:S, pH 7.5, 70 °C, 150 rpm, 300 min). **Resultados.** Los tratamientos combinados de FMS-ultrasonificación, FMS-hidrólisis química y FMS-hidrólisis enzimática, mostraron un mayor porcentaje de desproteínización (84.82, 94.67 y 80.45%) y desmineralización (82.12, 95.58 y 52%) con exoesqueletos de camarón en comparación con los porcentajes del chapulín (76.38, 92.04 y 78.71%) y (79.39, 95.37 y 51.79%) respectivamente. **Implicaciones.** El tratamiento químico generó mayor remoción de proteínas y minerales en comparación con los demás tratamientos, alcanzando rendimientos de 54.45% en camarón y 51.88% en chapulín. **Conclusión.** Las ondas ultrasónicas extrajeron de quitina en un tiempo menor (2h) con rendimientos de 74.43% en camarón y 78.02% en chapulín, reduciendo la cantidad de agua.

Palabras clave: Exoesqueletos de camarón y chapulín; procesos combinados; desproteínización; desmineralización y quitina.

INTRODUCCIÓN

La quitina es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza y se encuentra principalmente en un gran número de organismos como los crustáceos, hongos, e insectos (Elieh-Ali-Komi y Hamblin, 2016; J.A. Salazar-Leyva *et al.*, 2014; King *et al.*, 2017). La importancia comercial de la quitina radica en la aplicación de diversas áreas como la biotecnología, farmacéutica, biomédica, alimenticia y agricultura (Chávez-Magdaleno *et al.*, 2018; Islem y Marguerite, 2015; Tharanathan y Kittur, 2003; Xu *et al.*, 2005). Por tal motivo, existe el interés comercial de la purificación de la quitina y sus derivados por la necesidad de tener sustratos y procesos más económicos. Se sabe que la quitina se encuentra en elevada concentración en insectos, siendo ésta una nueva fuente de explotación, debido a la similitud en el contenido de quitina en exoesqueletos de crustáceos en comparación con los insectos sobre todo con los considerados plaga. Últimamente se ha comenzado a explorar la extracción y caracterización de quitina y quitosano a partir de insectos, recientemente Monter *et al.*, 2016; 2016; Kaya *et al.*, 2015a; Sung *et al.*, 2016 han aislado, caracterizado y comparado quitina de diversas especies de chapulín, con el inconveniente de haber obtenido dicho recurso con rendimientos y pesos moleculares relativamente bajos en comparación con lo reportado en otros insectos. El procedimiento para obtenerlo consiste en aislarlo de proteínas, minerales; generalmente calcáreos y pigmentos. Las etapas de este procedimiento se denominan procesos de desproteínización, desmineralización y caracterización de la quitina en relación con su contenido de humedad, grado de desacetilación y contenido de nitrógeno, entre otros, permitiendo reconocer su calidad (Morillo de Montiel *et al.*, 2016). Por otra parte, el chapulín proveniente del estado de Oaxaca es un insecto polífago y representa un problema de importancia prioritaria para la agricultura, es considerado como una plaga en los cultivos de maíz, frijol, soya, alfalfa y sus infestaciones pueden llegar a ser de 30-40 chapulines/m² o más (Rios *et al.*, 2014), por lo que es posible su recolección permitiendo a cada familia de la localidad obtener alrededor de 50-70 kg de saltamontes

por semana. Se estima que al menos se extraen 75-100 toneladas (peso fresco) por año en este valle. Así mismo, esta investigación consistió en evaluar y comparar el proceso biológico de la fermentación en medio sólido (FMS) combinado con la implementación de tres tratamientos: físico (Ultrasonificación), químico (Hidrólisis química) y enzimático (Hidrólisis proteica) para la obtención y purificación de quitina a partir de exoesqueletos de camarón (*Penaeus sp*) y chapulín (*Sphenarium purpurascens*). Por tal motivo, el objetivo de esta investigación consta de cuatro partes importantes. La primera consistió en establecer nuevas fuentes de quitina. La segunda, en analizar el proceso biológico para la extracción de quitina por fermentación en medio sólido para la desproteínización y descalcificación del material obteniéndose quitina como producto final debida a su naturaleza amigable ecológicamente comparada con los métodos de preservación que involucran ácido o bases, que son ecológicamente agresivos y económicamente inviables. La tercera, en la implementación de un método físico para la obtención y purificación de quitina, como el ultrasonido, que sea amigable con el ambiente en el sentido de que permita emplear menos ácidos y se reduzca la cantidad de agua de lavado entre cada paso de purificación, lo anterior en virtud de los beneficios aportados por dicho método para lograr la reducción de tamaño, desproteínización, posible despigmentación y desmineralización, debido a la asociación entre proteína-minerales-pigmentos observada en la quitina. Por último, se evaluó mediante los perfiles hidrolíticos, las diferencias en los modos de acción de un mismo tipo de enzimas sobre sustratos similares en cuanto a solubilidad, grado de desacetilación y peso molecular. Por tal razón esta investigación propone un proceso de producción limpio para la obtención de quitina a partir de residuos marinos e insectos, evaluando por primera vez, procesos combinados como la ultrasonificación y tratamientos biológicos para la despolimerización.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra

Se utilizaron muestras de chapulines provenientes del mercado Benito Juárez de la ciudad de Ocotlán de Morelos, Oaxaca; y exoesqueletos de camarón obtenidos en el embarcadero zona industrial del puerto pesquero de Alvarado, Veracruz. Éstas se lavaron previamente con agua potable varias veces hasta que el agua dejó de verse turbia y finalmente se lavaron con agua destilada. Una vez limpios, se ultracongelaron a $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ y posteriormente se liofilizaron a temperatura $= -40\text{ }^{\circ}\text{C}$, y vacío de -133 mBar con una liofilizadora (Labconco 77540-00, MO, USA.). Una vez liofilizada las muestra, se molieron (Molino ProctorSilex[®] 72500RY, Japón) y tamizaron (Tamiz No. 50 Test Sieve[®] 090233332 Alemania) a un tamaño de partícula de $300\mu\text{m}$. Finalmente, la harina se almacenó en bolsas herméticas medianas de $18 \times 20\text{ cm}$ (Ziploc, Johnson y Sons, Inc., Racine, WI, USA) protegiéndola de la humedad y la luz hasta su posterior uso.

Fuente de carbono

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

Microorganismo

El microorganismo utilizado para la FMS fue la cepa ácido-láctica comercial *L. plantarum* BG-112. La cepa se reactivó en medio Man Rogosa Sharpe (MRS) incubándose a $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2.7 h en una incubadora (Felisa[®], FE-132AD, México) considerando el valor de μ_{max} para ser inoculadas posteriormente a cada uno de los desechos (Amador *et al.*, 2016).

Métodos

Pretratamiento por fermentación en medio sólido (FMS)

Consistió en la implementación de un pretratamiento por fermentación en medio sólido (FMS) con muestras quitinosas (camarón y chapulín) molidas y tamizadas,

éstas se mezclaron con melaza en una proporción de 18% (p/p) y esterilizaron a $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min, posteriormente, se inocularon al 5% (p/v base húmeda) con la cepa ácido láctica comercial *L. plantarum* BG-112 reactivadas previamente. Las fermentaciones fueron realizadas por triplicado en fermentadores tipo frasco con una capacidad de 1.5 kg (Tabla 1) durante 120 h a $38\text{ }^{\circ}\text{C}$. El producto fermentado de cada reactor se lavó con agua corriente secándola (Horno Felisa[®] FE-132AD México) a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h para su posterior combinación con los procesos de ultrasonificación, tratamiento químico y desproteínización enzimática respectivamente.

Ultrasonificación

Se aplicaron ondas ultrasónicas con una relación 1:20 (p/v) de quitina pretratada:disolvente (solución PEG- $\text{K}_2\text{B}_4\text{O}_7$ al 14%) a una frecuencia de 20 kHz a 750 W (Ultrasonic Processor[®] CPX750 USA) durante 120 min a una amplitud de 40% y temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, en vasos de precipitado de 2000 mL con una capacidad de 0.1 kg de muestra.

Hidrólisis química

La desproteínización se realizó mediante hidrólisis alcalina con una solución acuosa de hidróxido de sodio (NaOH) a 0.4 M, con una relación 1/15 peso/volumen (p/v) y agitación constante a 1000 rpm durante 1 h a una temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al término, la muestra sólida se lavó con agua corriente hasta la neutralidad. Posteriormente, se desmineralizaron las muestras mediante hidrólisis ácida con una solución de ácido clorhídrico (HCl) a 0.6 N en una relación 1/15 (p/v) y agitación constante de 1000 rpm durante 3 h. Una vez concluida se lavó con agua corriente hasta la neutralidad conforme a las condiciones determinadas por Cira *et al.*, (2002). Inmediatamente, se realizó un doble blanqueado el cual consistió en suspender los residuos desproteínizados y desmineralizados en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 38% bajo agitación constante (1000 rpm) a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 min. Al término del primer blanqueado, las muestras fueron filtradas y resuspendidas por segunda vez en hipoclorito bajo las condiciones antes descritas. Las muestras resultantes se lavaron hasta llegar a neutralidad y se secaron en una estufa a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h (Horno, marca: Felisa[®], modelo: FE-132AD, México).

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

Muestras	Dimensiones del frasco (cm)	Altura de llenado (cm)	Cantidad de mezcla total (g)	Volumen ocupado (cm^3)	Densidad aparente (g/cm^3)
Camarón y Chapulín	25 de alto y 12 de diámetro	20	1,500	2,261.95	0.67

Hidrólisis enzimática

Se utilizó la enzima comercial Alcalase® 2.4L (SIGMA-ALDRICH, USA), la cual es una proteasa (Subtilisina A) de *Bacillus licheniformis*, con una relación Enzima:Sustrato (1:2) y suspendidas en buffer de fosfato de potasio 50 mM a pH 7.5, como requisitos para esta enzima comercial según su hoja técnica. La reacción procedió incubando a una temperatura controlada de 70 °C a 150 rpm durante 300 min. La enzima se inactivó por calentamiento (≥ 90 °C por 3 min) antes de ser centrifugada (10,000 rpm, 15 min, 4 °C) (Gildberg y Stenberg, 2001). La fase líquida y sólida se separó para su posterior análisis de proteína por el método Kjeldahl (AOAC, 2012).

Análisis

Análisis de la melaza y muestras quitinosas

Se tomaron muestras por triplicado (3 a 5 g por determinación) de melaza y exoesqueletos de chapulín y camarón para sus respectivos análisis: % humedad (H), actividad de agua (Aw), % cenizas, potencial de hidrógeno (pH), % grasas y % proteínas.

Análisis de las muestras tratadas

Acordes a los métodos estándar (AOAC, 2012), se cuantificó el % de proteínas y % de minerales (cenizas) en las muestras quitinosas resultantes de los diferentes tratamientos de purificación en los exoesqueletos de camarón y chapulín. Por último, los porcentajes de desmineralización (% DM) y desproteínización (% DP) fueron calculados por la Ecuación (1).

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

Donde, “Y” es el porcentaje de desmineralización o desproteínización, “ x_0 ” y “ x_f ” son el porcentaje inicial y final del contenido de cenizas o proteínas respectivamente, “ s_0 ” y “ s_f ” el peso inicial y final de las muestras tratadas (g) respectivamente.

Caracterización de las muestras quitinosas

Determinación de solubles

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

Determinación del peso molecular

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

$$[\eta] = k PM^a \quad (2)$$

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

Obtención de espectros infrarrojo (FTIR)

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

Análisis Estadístico

Se llevó a cabo un diseño completamente al azar en los experimentos variando la fuente y tipo de tratamiento. El porcentaje de humedad, cenizas, acidez, pH, proteínas y color, fueron considerados como las variables de respuesta utilizándose el programa MINITAB® versión 21.0 (2021). Así mismo, se realizó una comparación de medias agrupadas con un análisis de varianza (ANDEVA) y una comparación con la prueba de Tukey para verificar si las diferencias fueron estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis proximal de la melaza y fuentes quitinosas

En la Tabla 2 se presentan los resultados del análisis proximal, se encontró que el porcentaje de humedad de la melaza empleada fue de $23.11 \pm 0.01\%$, cenizas de $9.51 \pm 0.02\%$, proteínas de $4.25 \pm 0.02\%$, grasas 0.5 ± 0.01 , pH 5.43 ± 0.01 y actividad de agua (A_w) de 0.67 ± 0.01 . Por otra parte, el porcentaje de humedad del camarón y chapulín fue de 43.75 ± 0.01 y $21.28 \pm 0.03\%$, cenizas 14.8 ± 0.08 y $19.21 \pm 0.04\%$, proteínas de 49.72 ± 0.09 y 52.96 ± 0.01 , grasas 1.38 ± 0.01 y 8.77

± 0.08 y A_w de 0.69 ± 0.04 y 0.77 ± 0.03 . Así mismo, se observó que si existe diferencia significativa entre los porcentajes proximales de la melaza y las fuentes quitinosas ($P < 0.05$). Estos porcentajes se encuentran por debajo de la media a los reportados por Monter *et al.*, 2016; Amador *et al.*, 2016; Kaya *et al.*, 2015. Esto es debido a que las proteínas, minerales y contenido de grasas como componentes principales varía dependiendo de la especie, parten del organismo, estado de nutrición y ciclo reproductivo.

Tabla 2. Composición proximal de la melaza y fuentes quitinosas.

Determinación	Melaza	Exoesqueleto	
		Camarón	Chapulín
Humedad (%)	23.11 ± 0.01	43.75 ± 0.01	21.28 ± 0.03
Cenizas (%)	9.51 ± 0.02	14.8 ± 0.08	19.21 ± 0.04
Proteínas (%)	4.25 ± 0.02	49.72 ± 0.09	52.96 ± 0.01
Grasas (%)	0.5 ± 0.01	1.38 ± 0.01	8.77 ± 0.08
pH	5.43 ± 0.01	7.8 ± 0.09	4.14 ± 0.06
A_w	0.67 ± 0.01	0.69 ± 0.04	0.77 ± 0.03

¹ Promedio de tres repeticiones \pm error estándar de las pruebas realizadas por triplicado.

Pretratamiento por fermentación en medio sólido

En el pretratamiento de la fermentación en medio sólido, se observó que existió un porcentaje de desproteínización de 23.2 ± 0.08 y $27.8 \pm 0.16\%$ de proteína residual y un porcentaje de desmineralización de 7.1 ± 0.04 y $7.1 \pm 0.02\%$ de cenizas residual, con los

sustratos de exoesqueletos de camarón y chapulín respectivamente. Obteniendo un mayor porcentaje desproteínización y desmineralización con el sustrato de exoesqueletos de camarón de 56.08 y 51.79% en comparación con el de chapulín de 51.05 y 47.77% respectivamente (Figura 1). No obstante, estos valores fueron 40% más bajos que los reportados por Castro *et al.*, 2018; Neves *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2016; Francisco *et al.*, 2015 y Pacheco *et al.*, 2011, quienes emplearon hasta de 7 días de fermentación. Este efecto se debió a la producción de ácido láctico generado por la cepa *L. plantarum* BG-112 durante la fermentación, el cual reacciona con el carbonato de calcio presente en los exoesqueletos produciendo lactato de calcio, donde precipita y son removidos durante el lavado de agua. Al mismo tiempo, las enzimas proteolíticas producidas por la cepa y las presentes en los exoesqueletos en combinación con la temperatura y el pH, llevan a cabo la desproteínización. Por último, se realizó un análisis estadístico utilizando el %DP y %DM como variables de respuesta ($P \leq 0.05$), este análisis mostró que hay diferencia significativa entre estos dos sustratos, la diferencia puede deberse a que la composición química varía entre las especies y la naturaleza de los complejos quitina-proteína.

Tratamiento combinado de FMS-Ultrasonificación

En la combinación de la FMS-Ultrasonificación (Figura 2), se obtuvo un porcentaje de proteína residual de 8.1 ± 0.09 y $10.1 \pm 0.09\%$ y un porcentaje de cenizas residual de 3.05 ± 0.49 y $4.5 \pm 0.43\%$ con los sustratos de exoesqueletos de camarón y chapulín respectivamente, existiendo un aumento de 31.07 y 28.00% de desproteínización; y un 28.61 y 27.60% de desmineralización respectivamente en comparación con los tratamientos de FMS, y coexistiendo un aumento de 68.98 y 63.99% de desproteínización; y un

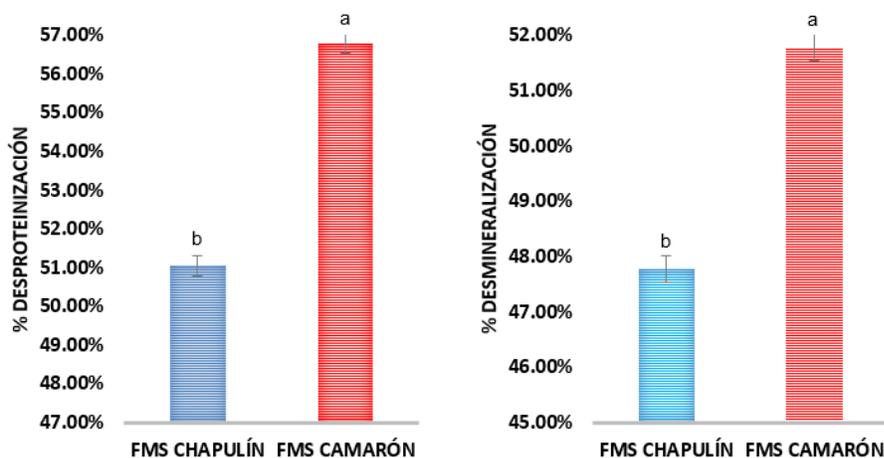


Figura 1. Desproteínización y desmineralización durante la fermentación en medio sólido de exoesqueletos de camarón y chapulín.

65.66 y 64.2% de desmineralización en comparación con el tratamiento por ultrasonificación. En consecuencia, se observó que si existe diferencia significativa en los %DP y %DM entre los tratamientos de FMS, Ultrasonificación y FMS-Ultrasonificación ($P < 0.05$), alcanzando un mayor porcentaje desproteínización y desmineralización con el sustrato de exoesqueletos de camarón de 84.82 y 82.12% en comparación con el de chapulín de 76.38 y 79.39% respectivamente. Este efecto es originado por la fermentación generando ácido láctico y en combinación con los factores ocasionado por la ultrasonificación (calor, presión y turbulencia); acelera la transferencia de masa en las reacciones químicas, crea nuevos caminos de reacción, rompiendo y desprendiendo partículas (cavitación en las proximidades de una superficie sólida) o incluso generar productos diferentes a partir de los obtenidos en condiciones convencionales. Estos valores fueron 5% más bajos que los reportados por Martín *et al.*, 2017 y Barreto *et al.*, 2001. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que ellos emplearon disolventes ácido-alcalinos combinado con ondas ultrasónicas, lo que constituye un riesgo para la integridad personal y el medio ambiente.

Tratamiento combinado de FMS-Hidrólisis química

En el tratamiento combinado de FMS-Hidrólisis química (Figura 3), se obtuvo un porcentaje de proteína residual de 8.1 ± 0.09 y $10.1 \pm 0.09\%$ y un porcentaje de cenizas residual de 2.86 ± 0.23 y $4.5 \pm 0.05\%$ con los sustratos de exoesqueletos de camarón y chapulín respectivamente, existiendo un aumento de 40.99 y 37.85% de desproteínización; y un 48.6 y 43.79% de desmineralización respectivamente en comparación con el tratamiento de FMS, y de la misma forma, existiendo un aumento de 1.12 y 2.87% de desproteínización; y un 2.19 y 4.55% de

desmineralización respectivamente en comparación con los tratamientos de hidrólisis química. Recíprocamente, se alcanzó un mayor porcentaje desproteínización y desmineralización con el sustrato de exoesqueletos de camarón de 94.67 y 95.58% en comparación con el de chapulín de 92.04 y 96.37% respectivamente. En cuanto al análisis estadístico, se observó que si existe diferencia significativa en los %DP y %DM entre los tratamientos de FMS, Hidrólisis química y FMS- Hidrólisis química entre estos dos sustratos ($P \leq 0.05$). De igual modo, se observó que estos valores están 6% por arriba que los reportados por Sáenz *et al.*, 2019; Martín *et al.*, 2017; Monter Miranda *et al.*, 2016, Amador *et al.*, 2016 y Bajaj *et al.*, 2011. Como desventaja del método, se tiene el empleo de aproximadamente 31L de agua por cada 50g de material quitinoso procesado. Aspecto por considerar para validar el empleo de otros métodos de procesamiento.

Tratamiento combinado de FMS-Hidrólisis Enzimática

En el tratamiento combinado de FMS-Hidrólisis Enzimática (Figura 4), se obtuvo un porcentaje de proteína residual de 10.5 ± 0.28 y $12.13 \pm 0.1\%$ y un porcentaje de cenizas residual de 7.1 ± 0.3 y $10.07 \pm 0.3\%$ con los sustratos de exoesqueletos de camarón y chapulín respectivamente, existiendo un aumento de 27.66 y 23.63% de desproteínización; y ligeramente un 0.02 y 0.21% de desmineralización respectivamente en comparación con la FMS. Por otra parte, igualmente existió un aumento de 58.27 y 57.42% de desproteínización; y un 52 y 47.79% de desmineralización respectivamente en comparación con el tratamiento de hidrólisis enzimática. En relación con el análisis estadístico, se observó que, si existe diferencia significativa en los %DP y %DM entre los tratamientos de FMS, Hidrólisis enzimática y FMS-Hidrólisis enzimática entre estos dos sustratos ($P \leq 0.05$).

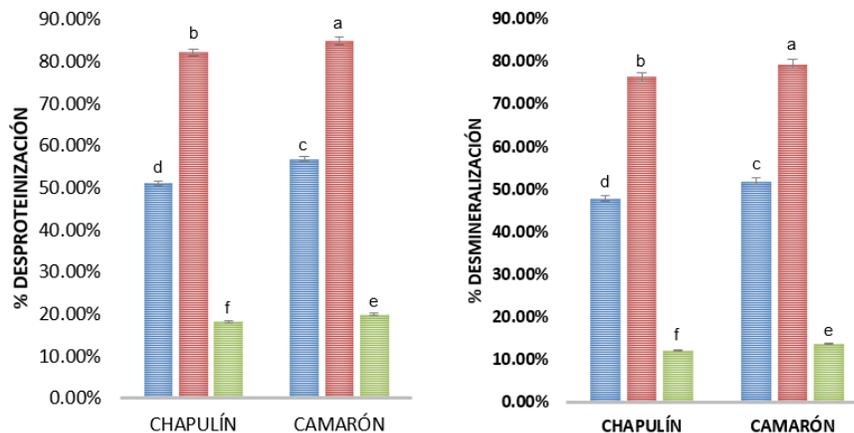


Figura 2. Desproteínización y desmineralización utilizando la FMS (▨), ultrasonificación (▧) y FMS + ultrasonificación (▩) en exoesqueletos de camarón y chapulín.

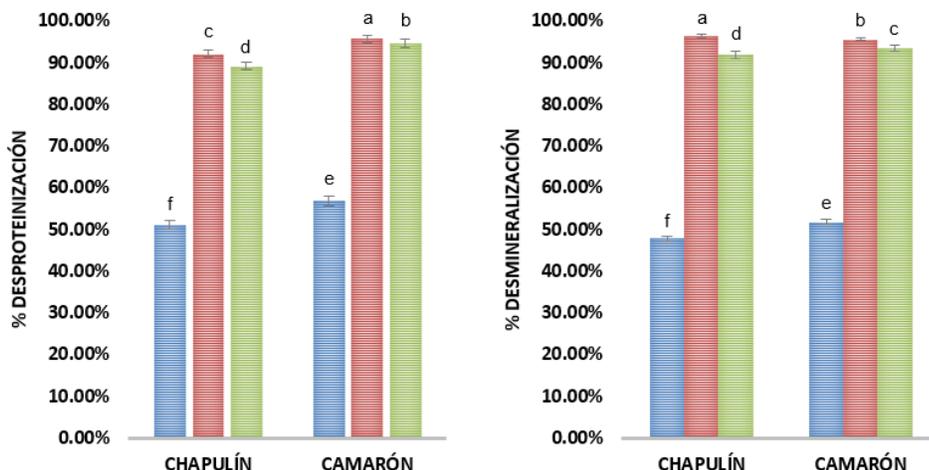


Figura 3. Desproteinización y desmineralización utilizando FMS (▨), hidrólisis química (▧) y FMS + hidrólisis química (▩) en exoesqueletos de camarón y chapulín.

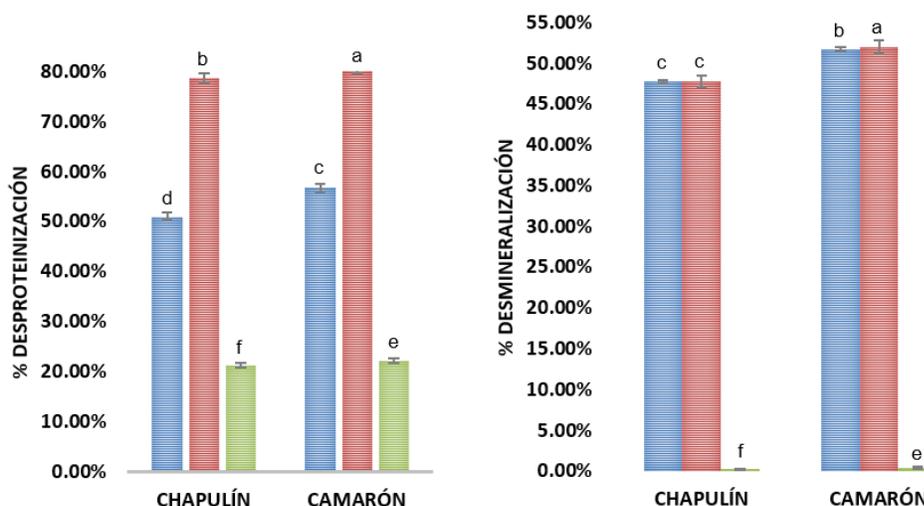


Figura 4. Desproteinización y desmineralización utilizando FMS (▨), hidrólisis enzimática (▧) y FMS + hidrólisis enzimática (▩) en exoesqueletos de camarón y chapulín.

Alcanzando, un mayor porcentaje desproteinización y desmineralización con el sustrato de exoesqueletos de camarón de 80.45 y 52.00% en comparación con el de chapulín de 78.71 y 51.79% respectivamente. Este efecto ocurre debido a que las enzimas hidrolizaron los péptidos de las proteínas en combinación con las enzimas proteolíticas presentes en los exoesqueletos, produciendo un menor deterioro de la estructura de la quitina. Los porcentajes de desproteinización obtenidos fueron superiores en un 13%, en comparación con los reportados por Cisneros *et al.*, 2019 y Dey *et al.*, 2011. Esto indica que el uso del tratamiento combinado FMS-hidrólisis enzimática arrojan mejores resultados que los reportados por los autores mencionados.

Caracterización de muestras quitinosas

El estudio por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) fue realizado en muestras quitinosas que provenían de exoesqueletos de camarón (Figura 5) obtenidas por un pretratamiento de fermentación en medio sólido combinado con la ultrasonificación, hidrólisis química y enzimática. En este estudio pueden distinguirse en los tres tratamientos las señales típicas del infrarrojo de la quitina, como es la señal de vibración -OH a 3277 cm^{-1} , también se determinaron las bandas de mediana intensidad características de C-H y COCH_3 presentado en los espectros, a 2931 cm^{-1} y 2874 cm^{-1} se observaron las bandas de la amida I y II a 1622 cm^{-1} y 1538 cm^{-1} la cual es característica para quitinas con conformación cristalina tipo α (Focher *et al.*, 1992),

también se observaron las bandas de los grupos característicos, tales como C-O a 1031 cm^{-1} . Sin embargo, en la misma figura se muestra el espectro de quitina comercial (Sigma-Aldrich México) espectro color rosa, donde se aprecian los grupos funcionales característico de las quitinas obtenidas, se ven diferencias en los tres tratamientos combinados con respecto al estándar comercial. Estas quitinas obtenidas presentaron 0.5, 0.7 y 0.9% de insolubles en

ácido acético (0.1 M), es decir una solubilidad de 93.22, 93.545 y 93.083%, los porcentajes de desacetilación calculados fueron de 83.054, 85.235 y 90.013% y peso molecular (PM) de 112.934, 206.507 y 222.338 kDa respectivamente, estando por debajo del peso molecular de la quitina comercial utilizado como referencia fue de 300 kDa para la α -quitina de camarón de bajo peso molecular.

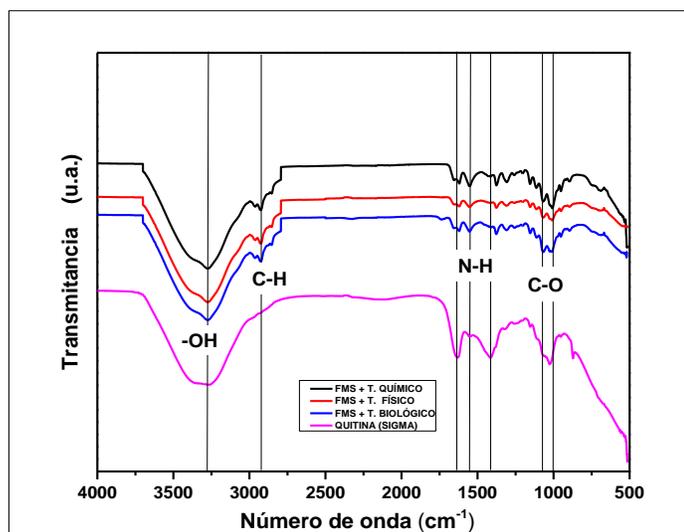


Figura 5. Espectros FTIR de las quitinas obtenidas por fermentación en medio sólido combinado con hidrólisis química (—), ultrasonificación (—), hidrólisis enzimática (—) y quitina comercial (Sigma-Aldrich México) (—) a partir de exoesqueletos de camarón.

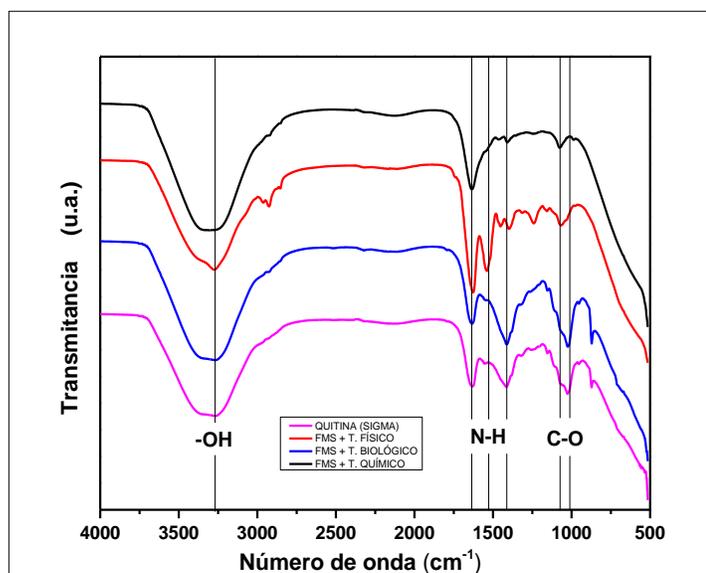


Figura 6. Espectros FTIR de las quitinas obtenidas por fermentación en medio sólido combinado con hidrólisis química (—), ultrasonificación (—), hidrólisis enzimática (—) y quitina comercial (Sigma-Aldrich México) (—) a partir de exoesqueletos chapulín.

Por otra parte, en los espectros infrarrojos de absorción FTIR de la quitina producida a partir de exoesqueletos de chapulín (Figura 6), se exhiben en los tres tratamientos una banda intensa y ancha a 3270 cm^{-1} asociada al grupo OH, se observaron las bandas de la amida I y II a 1635 cm^{-1} y 1428 cm^{-1} correspondientes a la quitina, también se observan las bandas de los grupos característicos de la quitina, tales como C-O a 1073 cm^{-1} . No obstante, en el espectro del proceso FMS + Hidrólisis química no aparece un pico correspondiente al grupo amida, esto se atribuye al efecto de la hidrólisis alcalina con hidróxido de sodio. Estas quitinas presentaron 0.6, 0.9 y 1.0% de insolubles en ácido acético (0.1 M), es decir una solubilidad de 87.53, 86.23 y 90%, los porcentajes de desacetilación calculados fueron de 74.074, 82.146 y 87.45%, y peso molecular (PM) de 139.138, 219.226 y 226.952 kDa respectivamente, estos valores de peso molecular fueron superiores a los reportados por Kaya *et al.*, (2015), quienes obtuvieron un peso molecular de 5.2 a 6.8 kDa a partir de siete especies de chapulín (*A. simularix*, *A. strepens*, *D. fractaand*, *D. laticornis*, *O. miniata*, *O. caerulea*, *P. cognata*), estando también, por debajo del peso molecular de la quitina comercial (300 kDa).

CONCLUSIONES

La fermentación en medio sólido (FMS) de camarón y chapulín influyó en la desproteización (56.82 y 51.05%) y desmineralización (51.79 y 47.77%) respectivamente. Sin embargo, la metodología a base del tratamiento combinado de FMS + Hidrólisis química obtuvo mayor porcentaje de desproteización (94.04%) y desmineralización (96.37%), aunque con el inconveniente de que se efectuaron lavados continuos con un gasto de 18-20 L/130 g de muestra. Por otra parte, el uso de las ondas ultrasónicas a partir del pre-tratamiento de la FMS influyó en los porcentajes desproteización (84.82 y 82.12%) y desmineralización (79.39 y 76.38%) en los sustratos de camarón y chapulín respectivamente. En cuanto a la hidrólisis enzimática a partir del pre-tratamiento por FMS, existió un aumento del 27.66 y 23.63% de desproteización; y un 0.02 y 0.21% de desmineralización respectivamente, aumentando el efecto de la hidrólisis de proteínas en los exoesqueletos de chapulín. Se ha demostrado que a partir de la fermentación en medio sólido como pre-tratamiento aplicado en los métodos químicos, enzimáticos y ultrasónicos son una herramienta eficiente que nos permite desproteizar y desmineralizar los exoesqueletos chapulín y camarón para la obtención de quitina, siendo la ultrasonificación un método amigable con el ambiente en el sentido de la reducción de la cantidad de agua de lavado entre cada paso de purificación.

Acknowledgments

Funding. To the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the scholarship granted to pursue a doctorate in biotechnology (scholarship number 19428) through project CB-2011/169477 within the program of the Universidad del Papaloapan.

Conflict of interests. There is no conflict of interest to declare by the authors.

Compliance with ethical standards. The work did not involve experimentation with animals and was carried out according to procedures accepted by the Universidad del Papaloapan.

Data availability. The data is available upon reasonable request to Adolfo Amador Mendoza, fito_adamme@hotmail.com.

Author contribution statement (CRediT). **A. Amador-Mendoza**—conceptualization, investigation, methodology, writing, original draft., **J. M. Juárez-Barrientos**—writing, supervision, original draft., **H. Hernández-Hernández**—writing, supervision., **L. P. Ramírez-Coutiño**—writing, review & editing., **S. Huerta-Ochoa**—methodology, supervisión, writing, original draft, **E. Herman-Lara**—methodology, supervisión, writing, original draft, **J. Rodríguez-Miranda**—methodology, supervisión, writing, original draft.

REFERENCIAS

- Amador Mendoza, A., Huerta Ochoa, S., Herman Lara, E., Membrillo Venegas, I., A. Aguirre Cruz, A., M.A. Vivar Vera, M. A. and Ramírez Coutiño, L., 2016. Efecto de la purificación química, biológica y física en la recuperación de quitina de exoesqueletos de camarón (*Penaeus sp*) y chapulín (*Sphenarium purpurascens*). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 15, pp. 711-725. <https://doi.org/10.24275/rmiq/bio1020>.
- AOAC., 2012. Association of Official Analytical Chemist 2005. *Methods of Analysis* (19th ed.). AOAC 33, 749, 2012. Moisture in Flour, AOAC 7,132, 2012. Ash of Flour, AOAC, 37,924 Acidity (Titrable) of Fruit Product, AOAC 43, 689, 2012. Microchemical Determination of Nitrogen. Washington, D.C. AOAC
- Bajaj, M., Winter, J. and Gallert, C., 2011. Effect of deproteination and deacetylation conditions on viscosity of chitin and chitosan extracted from crangon shrimp waste. *Biochemical Engineering Journal*, 56, pp. 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.05.006>.

- Barreto, C., Signini, R. and Campana, F., 2001. On the sonication of chitin: effects on its structure and morphology and influence on its deacetylation. *Polymer Bulletin*. 47, pp. 183–190. <https://doi.org/10.1007/s002890170010>.
- Castro, R., Guerrero I. and Bórquez, R., 2018. Chitin extraction from *Allopetrolisthes punctatus* crab using lactic fermentation. *Biotechnology Reports*. 20, pp. 24–56. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00287>.
- Chávez Magdaleno, M. E., Luque Alcaraz, A. G., Gutiérrez Martínez, P., Cortez Rocha, M. O., Burgos Hernández, A., Lizardi Mendoza, J. and Plascencia Jatomea, M., 2018. Effect of chitosan-pepper tree (*Schinus molle*) essential oil biocomposites on the growth kinetics, viability and membrane integrity of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 17, pp. 29–45. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2018v17n1/Chávez>.
- Cira, L., Huerta, S. and Shirai, K., 2002. Fermentación láctica de cabezas de camarón (*Penaeus sp*) en un reactor de fermentación sólida. *Revista mexicana de ingeniería química*. 1, pp. 45–48. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62010206>.
- Cisneros Pérez, I., Curbelo Hernández, C., Andrade Díaz, C., and Giler Molina, J. M., 2019. Evaluación de la extracción enzimática de quitina a partir del exoesqueleto de camarón. *Centro azúcar*. 46(1), pp. 51–63. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2223-48612019000100051&lng=es&nrm=iso.
- Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. 2013. *Anuario estadístico de Acuicultura y Pesca*, 2013. México. 213, pp. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2223-48612019000100051&lng=es&tlng=es
- Elieh Ali Komi, D. and Hamblin, M. R., 2016. Chitin and chitosan: production and application of versatile biomedical nanomaterials. *International Journal of Advanced Research*. 4, pp.24–11. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5094803/pdf/nihms774320.pdf>.
- Focher, B., Naggi, A., Torri, G., Cosani, A. and Terbojevich, M. 1992. Chitosans from *Euphausia superba*. 2: Characterization of solid state structure. *Carbohydrate Polymers*. 18, pp. 43–49. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(92\)90186-T](https://doi.org/10.1016/0144-8617(92)90186-T).
- Francisco, F. C, Simora. R. M. C. and Nuñal, S. N., 2015a. Deproteinization and demineralization of shrimp waste using lactic acid bacteria for the production of crude chitin and chitosan. *International Journal of the Bioflux Society*. 8, pp. 107–115. <http://www.bioflux.com.ro/docs/2015.107-115.pdf>
- Gildberg, A. and Stenberg, E., 2001. A new process for advanced utilization of shrimp waste. *Process Biochemistry*. 36, pp. 809–812. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00278-8](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00278-8).
- Islem, Y. and Marguerite, R., 2015. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Marine Drugs*. 13, pp.1133–1174. <https://doi.org/10.3390/md13031133>.
- Kasaai, M.R., Arul J. and Charlet, C., 2000. Intrinsic viscosity molecular weight relationship for chitosan. *Journal of Polymer Science*. 38, pp. 2591–2598. [https://doi.org/10.1002/1099-0488\(20001001\)38:19<2591::AID-POLB110>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1099-0488(20001001)38:19<2591::AID-POLB110>3.0.CO;2-6).
- Kaya, M., Lelesius, E., Nagrockaitė, R., Sargin, I., Arslan, G., Mol, A., Baran, T., Can, E. and Bitim, B., 2015. Differentiations of Chitin Content and Surface Morphologies of Chitin Extracted from Male and Female Grasshopper Species. *PLoS ONE* 10, e0115531. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115531>.
- King, C., Shamshina, J. L., Gurau, G., Berton, P., Khan, N. F. A. F. and Rogers, R. D., 2017. A platform for more sustainable chitin films from an ionic liquid process. *Green Chemistry*. 19, pp. 117–126. <https://doi.org/10.1039/C6GC02201D>.
- Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V. and Lee, D.U. 2004. Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends in Food Science and Technology*. 15, pp. 261–266. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.12.001>.
- Kohmei, K.L. A., Toshiya, N., Keiichi, T., Yutaka, Y. and Masahiko, E., 1993. Depolymerization of hyaluronan by sonication. *Glycoconjugate Journal*. 10, pp. 435–439. <https://doi.org/10.1007/BF00737963>.
- Liñán Cabello, M. A. and Paniagua, M. J., 2002. Bioactive roles of carotenoids and retinoids in

- crustaceans. *Aquaculture Nutrition*. 10, pp. 299-309. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2002.00221.x>.
- Liñán Cabello, M. A. and Paniagua M. J., 2004. Induction factors derived from carotenoids and vitamin A during the ovarian maturation of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture International*. 12, pp. 583-592. <https://doi.org/10.1007/s10499-004-1088-7>.
- Mao S, A. C., Mäder, K. and Kissel, T., 2007. Characterization of chitosan and its derivatives using asymmetrical flow field-flow-fractionation: A comparison with traditional methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 45, pp. 736-741. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.08.012>.
- Martín, L., Medina, T., Patrón, V., Ramirez, A. T. and Pacheco, L., 2017. Obtención de quitosano a partir del exoesqueleto de camarón mediante extracción asistida por ultrasonido. Memorias de congreso XXXVIII Encuentro Nacional de la AMIDIQ 9 al 12 de mayo de 2017, Ixtapa-Zihuatanejo, Guerrero, México.
- Monter, Miranda, J., Tirado Gallegos, J., Zamudio Flores, P., Rios Velasco, C., Ornelas Paz, J.D. J., Salgado Delgado, R., Espinosa Solis, V. and Hernández Centeno, F., 2016. Extracción y caracterización de propiedades fisicoquímicas, morfológicas y estructurales de quitina y quitosano de *Brachystola magna* (Girard). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 15, pp. 749-761. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62048168007>.
- Morillo de Montiel, N. J. and Belandria Briceño, J. C., 2008. Recuperación de quitina a partir de los residuos sólidos generados del procesamiento industrial de crustáceos. *Revista cubana de química*. 3, pp. 17-26. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=443543715003>.
- Muthukumar, S., Kentish, S., Lalchandani, S., Ashokkumar, M. and Mawson, R., 2005. The optimisation of ultrasonic cleaning procedures for dairy fouled ultrafiltration membranes. *Ultrasonics Sonochemistry*. 12, pp. 29-35. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2004.05.007>.
- Neves, A. C., Zanette, C., Grade, S., T., Schaffer, J. V., Alves, H. J. and Arantes, M. K., 2017. Optimization of lactic fermentation for extraction of chitin from freshwater shrimp waste. *Acta Scientiarum. Technology*. 39, pp.2-125. DOI: <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v39i2.29370>.
- Pacheco, N., Garnica, M., Ramírez, J.Y., Flores, B., Gimeno, M., Bárzana E. and Shirai K., 2009. Effect of temperature on chitin and astaxanthin recoveries from shrimp waste using lactic acid bacteria. *Bioresource Technology*. 100, pp. 2849-2854. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.01.019>.
- Porras Barrientos, L.D., González Hurtado, M.I., Ochoa González, O.A., Sotelo Díaz, L.I., Camelo Méndez, G.A. and Quintanilla Carvajal, M.X., 2015. Colorimetric image analysis as a factor in assessing the quality of pork ham slices during storage. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 14, pp. 243-252. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62041194002>.
- Ramírez, R, J.C. 2009. Aprovechamiento de fauna de acompañamiento del camarón y subproductos pesqueros mediante la elaboración de ensilado de pescado. Tesis de doctorado en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, México. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382008000300003&lng=es&tlng= .
- Rao, M.S., Muñoz, J. and Stevens, W.F., 2000. Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 54, pp. 808-813. <https://doi.org/10.1007/s002530000449>.
- Ríos Velasco, C., Berlanga Reyes, D.I., Valdez Licano, R., Romo Chacón, A., Acosta Muñoz, C. H., Zamudio Flores, P. B., Sepulveda Ahumada, D. R. and Jacobo Cuellar, J. L., 2014. Caracterización y control microbial del chapulín gordinglón *Brachystola magna* Girard en frijol en el Estado de Chihuahua. Folleto Técnico. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Fundación Produce Chihuahua. <https://docplayer.es/40163547-Caracterizacion-y-control-microbial-del-chapulín-gordinflon-brachystola-magna-girard-en-frijol-en-el-estado-de-chihuahua.html>.
- Riou, M. and Christide, J.P., 2010. Cryptic Color Change in a Crab Spider (*Misumena vatia*): Identification and Quantification of Precursors

- and Ommochrome Pigments by HPLC. *Journal of Chemical Ecology*. 36, pp. 412–423. <https://doi.org/10.1007/s10886-010-9765-7>.
- Sun, T., Liu, X., Sun, G., Long, R. and Liu, Z., 2016. Grasshopper plague control in the alpine rangelands of the qilian mountains, China. A socio-economic and biological approach. *Land Degradation & Development*. <https://doi.org/10.1002/ldr.2494>.
- Salazar Leyva, J.A., Lizardi Mendoza, J., Ramírez Suarez, J.C., García Sánchez, G., Ezquerra Brauer, J.M., Valenzuela Soto, E.M., Carvallo Ruiz, M.G., Lugo Sánchez, M.E. and Pacheco Aguilar, R., 2014. Utilización de materiales a base de quitina y quitosano en la inmovilización de proteasas: efectos en su estabilización y aplicaciones. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 13, pp. 129-150. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382014000100011&lng=es&tlng=es
- Shaofang, L., Jie S., Lina, Y., Chushu, Z., Jie B., Feng, Z., Mingjing, Q., Chen, J. and Qingli, Y., 2012. Extraction and Characterization of Chitin from the Beetle *Holotrichia parallela* Motschulsky. *Molecules*. 17, pp. 4604-4611. <https://doi.org/10.3390/moléculas17044604>.
- Shrinivas, M and Stevens, W., 2005. Chitin production by *Lactobacillus* fermentation of shrimp biowaste in a drum reactor and its chemical conversion to chitosan. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 80, pp. 1080-1087. <https://doi.org/10.1002/jctb.1286>.
- Sini, T.K., Santhosh, S. and Mathew, P.T., 2007. Study on the production of chitin and chitosan from shrimp shell by using *Bacillus subtilis* fermentation. *Carbohydrate Research* 342, pp. 2423–2429. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.06.028>.
- Sorokulova, I., Krumnow, A., Globa, L. and Vodyanoy, V., 2009. Efficient decomposition of shrimp shell waste using *Bacillus cereus* and *Exiguobacterium acetylicum*. *Journal Industrial Microbiology Biotechnology*. 36, pp. 1123– 1126. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0587>.
- Soto León, S., Zazueta Patrón, I. E., Piña Valdez, P., Nieves Soto, M., Reyes-Moreno, C. and Contreras-Andrade, I. 2014. Extracción de lípidos de *Tetraselmis suecica*: proceso asistido por ultrasonido y solventes. *Revista mexicana de ingeniería química*. 13, pp. 723-737. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382014000300007&lng=es&tlng=es.
- Tharanathan, R. N. and Kittur, F. S., 2003. Chitin the undisputed biomolecule of great potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 43, pp. 61-87. <https://doi.org/10.1080/10408690390826455>.
- Wahyuntari, B. J. and Setyahadi, S., 2011. Process Design of Microbiological Chitin Extraction, *Microbiology Indonesia*. 5, pp. 39-45. <https://doi.org/10.5454/mi.5.1.7>.
- Xu, Y., Gallert, C. and Winter, J., 2008. Chitin purification from shrimp wastes by microbial deproteination and decalcification. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 79, pp. 687–697. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1471-9>.
- Zadorozhny, P. A., Borisovets, E. E., Yakush, E. V., and Davidyuk, T. S., 2008. Change of Carotenoid Composition in Crabs during Embryogenesis. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 44, pp. 450-461. <https://doi.org/10.1134/S0022093008040054>.
- Zhang H., Yun S., Song L., Zhang Y. and Zhao Y., 2016. The preparation and characterization of chitin and chitosan under large-scale submerged fermentation level using shrimp by-products as substrate. *International Journal of Biological Macromolecules*. 96, pp. 334–339. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.017>.