

Estudio de los cambios químicos en microensilados de exoesqueletos de camarón (*Litopeneus vanamei*) y chapulín (*Sphenarium purpurascens*) durante la fermentación en medio sólido

Study of chemical changes in shrimp (*Litopeneus vanamei*) and grasshopper (*Sphenarium purpurascens*) exoskeletons microsilages during fermentation in solid medium

Adolfo Amador Mendoza^{1*}, Humberto Rafael Bravo Delgado², Ana Rosa Ramírez Seañez¹ y Hipólito Hernández Hernández¹

¹ Instituto de Agroingeniería, Universidad del Papaloapan Campus Loma Bonita. C.P. 68400. Av. Ferro-carril s/n, CD. Universitaria, Loma Bonita, Oax., México.

² Universidad Tecnológica de Tehuacán. C.P. 75859. Prolongación de 1 sur 1101, San Pablo Tepetzingo, Tehuacán, Puebla, México.

RESUMEN

La fermentación en medio sólido es una técnica utilizada para la producción de quitina, pigmentos, proteínas y lípidos. En el presente trabajo se evaluaron los cambios en la composición química y microbiológica en micro ensilados de exoesqueletos de camarón (*Litopeneus vanamei*) y chapulín (*Sphenarium purpurascens*) fermentados con un inoculo comercial de *Lactobacillus plantarum* AVG-112. Se determinó la cantidad de melaza para la fermentación, la composición proximal y la cuenta microbiológica de los ensilados. Los desechos se mezclaron con melaza de caña de azúcar como fuente de carbono y se inoculó usando una cepa comercial (*Lactobacillus plantarum* AVG-112). A los 5 d de fermentación ambos ensilados presentaron características físicas y químicas aceptables. Los coliformes totales, mohos y levaduras no estuvieron presentes siendo inhibidos por el proceso de ensilaje. Concluimos que la fermentación en medio sólido tiene características adecuadas para su utilización como suplemento en alimentos para organismos acuáticos.

Palabras clave: Fermentación en medio sólido; exoesqueleto; camarón; chapulín.

ABSTRACT

Fermentation in a solid medium is a technique used for the production of chitin, pigments, proteins and lipids. In the present work, changes in the chemical and microbiological composition were evaluated in micro silages of shrimp (*Litopeneus vanamei*) and grasshopper (*Sphenarium purpurascens*) exoskeletons, fermented with a commercial inoculum of *Lactobacillus plantarum* AVG-112. The amount of molasses for fermentation, proximal composition and microbiological count of the silages, were determined. The waste was mixed with sugarcane molasses as a carbon source and inoculated using a commercial strain (*Lactobacillus plantarum* AVG-112). After 5 days of fermentation, both silages presented acceptable physical and chemical characteristics. Total coliforms, molds and yeasts were not present and were inhibited by the ensiling process. We concluded that fermentation in a

solid medium has suitable characteristics for use as a food supplement for aquatic organisms.

Keywords: Fermentation in solid medium; shrimp; grasshopper; exoskeletons.

INTRODUCCIÓN

Los desechos de camarón como subproductos, por lo general son considerados basura en México y su incorrecta disposición genera daños ambientales. No obstante, muchos reportes señalan que son una fuente importante de compuestos de interés industrial, entre ellos la quitina y el quitosano, ampliamente estudiados en distintas áreas, incluida la de salud, debido a los efectos benéficos que les confieren. De acuerdo con los datos de la Comisión Nacional de Pesca y Acuicultura (CONAPESCA), durante el periodo 2020-2021 se reportó una captura de 249 mil 958 ton de camarón. Por otro lado, el chapulín (*Sphenarium purpurascens* Ch.), es un alimento habitual en algunas regiones de México. Se trata de saltamontes (*Orthoptera*), que los mexicanos fríen y comen con sal y limón. En Oaxaca se publicitan en los mejores hoteles y restaurantes como una delicia típica de la región. El chapulín tiene un alto contenido de proteínas de acuerdo con lo reportado por Torruco *et al.* (2019); aunque no se considera un desecho, el chapulín tiene una vida de anaquel de 3 a 5 días, y por ello, algunos comerciantes y productores locales se ven en la necesidad de tirarlo. Esto ocasiona el desperdicio de proteína de alta calidad y un aumento de la contaminación ambiental. Dentro de los aprovechamientos más sustentables de estos desechos se encuentra la producción de ensilados de desechos de crustáceos para la elaboración de alimentos para aves, ganado y peces, mediante la fermentación en estado sólido (FES) (Nigam *et al.*, 2000). El objetivo del proceso es el aumento parcial del contenido proteico de los alimentos, mejorando además las posibilidades de conservación, cambiando sus características fisicoquímicas y sensoriales. Los sustratos utilizados deben proporcionar un buen ambiente de crecimiento de la flora microbiana y permitir la síntesis de las diferentes enzimas (Pandey *et al.*, 2003). Dentro de los aspectos más importantes

*Autor para correspondencia: Adolfo Amador Mendoza
e-mail: fito_adamme@hotmail.com

Recibido: Febrero 28 de 2023

Aceptado: Enero 17 de 2024

Publicado: Febrero 27 de 2024

para la fermentación en sólido se encuentran: la selección del microorganismo y sustrato adecuado, optimización de parámetros del proceso, aislamiento y purificación del producto. Para la selección del sustrato hay que evaluar si se requiere un sustrato específico o si el objetivo es obtener un producto específico de un sustrato adecuado. Los parámetros del proceso y su optimización son importantes, así como ciertos parámetros fisicoquímicos y bioquímicos tales como: el tamaño de las partículas del sustrato, humedad inicial, pH y pretratamiento del mismo, humedad relativa, temperatura de incubación, agitación y aireación, edad y tamaño del inóculo, la suplementación de nutrientes, fuente de carbono e inductores, extracción de producto y depuración (Cira, 2000; Pandey *et al.*, 2003; Pacheco *et al.*, 2009; Peniche, 2006 y Ramirez *et al.*, 2009). Los ensilados biológicos se basan en la fermentación ácido-láctica y son un excelente producto proteínico de alto valor biológico que se ha empleado para la alimentación animal y se ha elaborado con diversas especies de crustáceos y desechos de peces (Vidotti, 2003). Algunas cepas de bacterias ácido-lácticas son capaces de degradar las aminas biogénicas empleando las amino-oxidasas, lo que reduce la concentración de ellas (Dapkevicius, *et al.*, 2000), reduciendo así el crecimiento de hongos, bacterias patógenas y responsables de la putrefacción; así la acidez de la fermentación permite la estabilidad de aminoácidos, como isoleucina, treonina, cistina, metionina y lisina, manteniendo valores similares a los de la harina de pescado (Viddotti *et al.*, 2003), por lo que, estos ensilados pueden utilizarse como suplemento en dietas con base en harina de pescado como aporte de proteína para la nutrición acuícola. La fermentación en medio sólido de residuos de crustáceos y una producción de ácido láctico *in situ* por bacterias ácido lácticas inducen la licuefacción del residuo semisólido y se produce una disminución en el pH así como la activación de proteasas que desproteinizan los residuos. Un efecto colateral de la fermentación en medio sólido es la producción de ácido láctico por la fermentación de carbohidratos, que conduce a una desmineralización de los residuos y una precipitación parcial de los iones de calcio como lactato de calcio (Xu *et al.*, 2008; Gimeno *et al.*, 2007). La fermentación del residuo de camarón resulta en un licor rico en proteínas, minerales y carotenoides (especialmente astaxantina), así como una fracción sólida rica en quitina. La fracción líquida puede ser utilizada como suplemento de proteínas y minerales para consumo humano o alimentación animal (Shirai *et al.*, 2001; Cira *et al.*, 2002; Bashkar *et al.*, 2007). La utilidad de la preservación por medio de fermentación es debida a su naturaleza amigable, ecológicamente comparada con los métodos de preservación que involucran ácidos o bases, o el secado, que son ecológicamente agresivos y económicamente no viables (Bahskar *et al.*, 2007). La fermentación del desperdicio para recuperar quitina, reemplaza considerablemente el proceso químico (Bahskar *et al.*, 2007); sin embargo, para producir una quitina de calidad estándar, la proteína y minerales residuales de la quitina cruda deben ser removidos mediante tratamientos suaves con álcalis y ácidos (Cira *et al.*, 2002; Sini

et al., 2007). También se ha reportado el uso de proteasas para la desproteización de caparzones de crustáceos, que evitaría el tratamiento alcalino. Además de la aplicación de exoenzimas, algunas bacterias proteolíticas son usadas para la desproteización de caparzones desmineralizados (Sini *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2008). Jung *et al.* (2005) realizaron la fermentación láctica para la desmineralización de los residuos de carapacho del cangrejo rojo utilizando *Lactobacillus paracasei* subesp. tolerans KCTC-3074. Diversas concentraciones de glucosa se adicionaron como una primera fuente de carbono y varias cantidades del cultivo bacteriano se inocularon como cultivo iniciador. Rao *et al.* (2000), determinaron los factores que afectan al *Lactobacillus plantarum* durante la fermentación de los desechos de camarón en la producción de quitina y licor de proteína. El objetivo de la fermentación fue posible por la secreción de proteasas y la reducción del pH, ésta se favoreció agregando ácido cítrico, en sustitución del ácido acético, incrementando con ello hasta un 88% la desproteización y a 90 % la desmineralización. El propósito del presente trabajo fue determinar los cambios en la composición química y microbiológica de micro ensilados de exoesqueletos de camarón (*Litopeneus vanamei*) y chapulín (*Sphenarium purpurascens*), durante el proceso de fermentación con un inóculo comercial de *Lactobacillus plantarum* AVG-112 como pretratamiento para la obtención de quitina cruda.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de las muestras

Para la realización de este proyecto se utilizaron dos fuentes quitinosas, la primera fueron desechos de chapulín (*Sphenarium purpurascens*) adquiridos en la comunidad de Ocotlán en la ciudad de Oaxaca y la segunda, los desechos de camarón obtenidos en puntos de venta del centro de Tuxtepec, Oaxaca. Ambas muestras se congelaron a - 5 °C, posteriormente se molieron y tamizaron (No. 50) a un tamaño de partícula de 300 µm.

Fuente de Carbono

Se utilizó como fuente de carbono melaza de caña de azúcar (Ingenio Adolfo López Mateos, Tuxtepec, Oaxaca, México) que se adicionó en una proporción de 18 % (p/p) a los substratos quitinosos (Ramírez-Ramírez *et al.*, 2009; Amador *et al.*, 2022).

Microorganismo

El microorganismo probado para la fermentación fue la cepa ácido láctica comercial *Lactobacillus plantarum* BG-112 (Raff, S.A. de C.V., grupo italiano Clerici-Sacco). Se realizó una cinética de crecimiento reactivándose en medio Man, Rogosa y Sharpe (MRS) incubándose a 38 °C por 2.5 h (Incubadora, marca: Felisa®, modelo: FE-132AD, México). Para la inoculación de cada uno de los desechos se consideró el valor de la velocidad específica de crecimiento (μ), calculada por la ecuación de Monod (Monod, 1949; Han y Levenspiel, 1988):

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S} \quad (1)$$

Donde μ_{\max} es la máxima velocidad de crecimiento específico (0.198 h^{-1}) y K_s es el parámetro de saturación del sustrato (g/l), también definido como la concentración de sustrato a la cual la velocidad μ es igual a la mitad de μ_{\max} .

Condiciones de fermentación ácido láctica

Los desechos molidos se mezclaron con 18 % (p/p base húmeda) de melaza, inoculándose posteriormente con 5 % (p/v base húmeda) de medio de cultivo man rogosa sharpe (MRS) con la cepa ácido láctica comercial. Se emplearon frascos de poliuretano de 30 mL con dimensiones de 5.5 cm de alto y 3.0 cm de ancho, llenados siguiendo el criterio geométrico y condiciones de fermentación establecidas por Ramírez-Ramírez (2009) resumidas en la Tabla 1. Por último, se incubaron a 30°C durante intervalos de tiempo de 24, 48, 74, 96 y 120 h colocándose en una incubadora a $38 \pm 1^\circ\text{C}$ (Cira *et al.*, 2002).

Tabla 1.- Dimensiones y cantidad de carga de los microensilados de camarón y chapulín.

Table 1.- Dimensions and load quantity of shrimp and grasshopper microsilages.

| Muestra | Altura de llenado (cm) | Cantidad de mezcla (g) | Volumen ocupado (cm^3) | Densidad aparente (g/cm^3) |
|----------|------------------------|------------------------|-----------------------------------|--|
| Camarón | 3.9 | 3.5 | 27.56 | 1.27 |
| Chapulín | 3.9 | 4.0 | 27.0 | 1.15 |

Análisis de las muestras

Evaluación del ensilado

La evaluación física del ensilado se realizó de acuerdo a Bertullo (1989) considerando las condiciones de olor, color y consistencia. Únicamente participaron 5 personas en la evaluación.

Determinación de pH y Acidez Total Titulable (ATT)

La fracción sólida se diluyó al 1 % (p/v) en agua destilada y se colocó en una parrilla con agitación magnética para medir el pH usando un potenciómetro (Orion 920A), inmediatamente después se determinó la acidez total titulable (ATT) con NaOH 0.1 N durante 120 h cada 24 h.

Análisis bromatológico

El contenido de humedad y cenizas, se determinaron empleando los métodos estándar (AOAC, 1990). El nitrógeno se determinó por el método Kjeldahl para proteína cruda ($N \times 6.25$) y finalmente los carbohidratos se obtuvieron por diferencia. Los cálculos se hicieron en base húmeda y todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

Análisis microbiológico

Se estudió la relación entre el crecimiento microbiano con respecto a la acidificación de los microensilados a las 120 h. Para formar diluciones decimales, las muestras fueron

homogeneizadas en una solución salina isotónica 0.09 % de NaCl. El crecimiento microbiano fue determinado por conteo en placa de colonias usando medio de agar para métodos estándar, man, rogosa y sharpe (MRS) y agar papa dextrosa (PDA) para: mesófilicos totales, coliformes totales, bacterias ácido lácticas (BAL) y cuenta total de hongos y levaduras, respectivamente (Borrás *et al.*, 2020).

Determinación de la actividad de agua

Para este análisis se utilizó un analizador de humedad denominado Aqualab PAWKIT® (Medidor de Actividad de Agua).

Análisis estadístico

A los datos obtenidos de la evaluación de pH y porcentaje de ácido láctico durante el proceso de ensilado para las diferentes proporciones de melaza, se les realizó una comparación de medias agrupadas con un análisis de varianza (ANDEVA) y una comparación con la prueba de Tukey para verificar si las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Se utilizó el programa MINITAB® Versión 19 (Minitab Inc., State College, Pennsylvania, USA, 2020).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Constitución de la melaza sobre la fermentación

El ensilaje biológico requiere la adición de carbohidratos altamente fermentables para facilitar la acción de las bacterias lácticas, debido a que en el camarón y en el chapulín existen escasas cantidades de estos compuestos (Jay, 2000; Plascencia *et al.* 2002). Entre otras fuentes de carbono, la melaza de caña de azúcar ha sido la más utilizada para este propósito en concentraciones desde 5 hasta 40 % (Zahar *et al.*, 2002). El porcentaje de humedad de la melaza, empleada fue de $23.11 \pm 0.01 \%$, el de las cenizas de $9.51 \pm 0.02 \%$, el de proteínas de $4.25 \pm 0.02 \%$, el pH 5.43 ± 0.01 y la actividad de agua (aw) de 0.67 ± 0.01 . La concentración de la fuente de carbono fue de 18 % (p/p) para la fermentación de la mezcla de exoesqueletos de camarón y chapulín. Como iniciador se utilizó la cepa *Lactobacillus plantarum* ABG- 112 y las muestras sin inóculo fueron usadas como control. La fermentación fue realizada en microsilos tipo frasco durante 120 h, considerando el valor de la velocidad específica de crecimiento para la fase exponencial (μ_{\max}) = 0.198 h^{-1} como se muestra en la Figura 1.

Dimensiones y cantidad de carga de los microsilos

Las fermentaciones fueron realizadas en microsilos tipo frasco durante 120 h con las dimensiones geométricas que se muestran en la Tabla 1.

Caracterización física de los ensilados

En la Tabla 2 y 3, se presentan las características físicas del ensilado durante cinco días de fermentación, donde se observa que el color de los microensilados de camarón fue más claro (marrón claro) que los ensilados del chapulín, que fueron más oscuros (marrón oscuro), esto debido al color natural de la especie, teniendo en cuenta las proporciones de melaza. El olor indicó en ambos ensilados que son ácidos y ligeramente

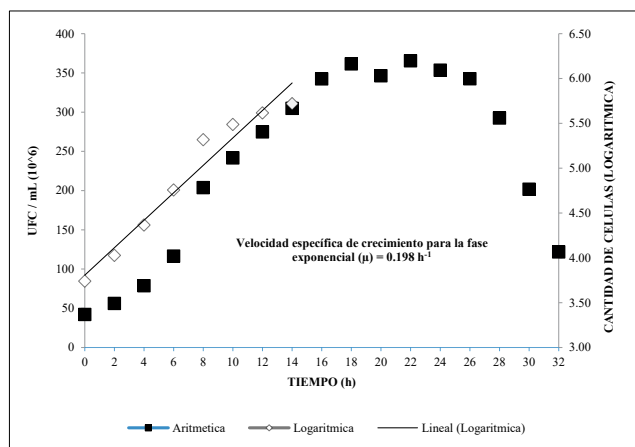


Figura 1.- Gráfica semilogarítmica de la concentración (UFC) de *L. Plantarum* AVG-112 en medio man rogosa sharpe (MRS) incubándose a 38 °C por 2.5 h.
Figure 1.- Semilog graph of *L. plantarum* AVG-112 concentration (CFU) in man rogosa sharpe medium (MRS) incubating at 38 °C for 2.5 h.

Tabla 2.- Evaluación física de la calidad de los ensilados propuesta por Bertullo (2009), de acuerdo a sus características.

Table 2.- Physical evaluation of silages quality proposed by Bertullo (2009), according to their characteristics.

| Atributo | Bueno | Regular | Inaceptable |
|--------------|---------------------------|-----------------------------------|----------------------|
| Olor | Ácido Suave | Picante Penetrante | Pútrido Rechazable |
| Color | Amarronado Grisáceo Claro | Amarronado Claro-Oscuro, Grisáceo | Gris Oscuro Negruzco |
| Consistencia | Líquido | Líquido Pastoso o Licuado | Pastoso |

Tabla 3.- Evaluación sensorial de la calidad de los microensilados biológicos elaborados a partir de desechos de camarón y chapulín.

Table 3.- Sensory evaluation of the quality of biological micro-silage made from shrimp and grasshopper waste.

| Ensilado | Olor | Color | Consistencia |
|----------|--------------------------------------|-------------------|---|
| Camarón | Dulce-Ácido con suave olor a Camarón | Marrón Claro | Pastosa con poco líquido en la base de la pasta |
| Chapulín | Ácido-Ligeramente Picante | Amarronado Oscuro | Pastosa con poco líquido en la base de la pasta |

picantes, similares y agradables, sin ningún indicio de proceso de descomposición lo cual coincide con los resultados de Vidotti *et al.* (2003) que encontró que los ensilados originan productos con características diferentes, atendiendo a la especie utilizada. Otro indicador es la consistencia, la cual fue pastosa en porque a pesar de que se observó presencia de líquido exudado y gas, la cantidad no era suficiente para darles una consistencia pastosa-líquida. Los microensilados presentaron color amarronado grisáceo claro y aroma dulce agradable con débil olor a camarón y chapulín, lo cual fue debido principalmente al efecto enmascarante de la melaza residual. Además, la actividad del inóculo pudo contribuir a la producción de compuestos aromáticos vía actividad proteolítica que mejora las propiedades sensoriales del producto (Terrones y Reyes, 2018). Estas características pueden

hacer atractivo el ensilado de pescado producido para ser aplicado en la formulación de dietas para animales.

Composición química proximal

En las Tablas 4 y 5 se presentan los valores de actividad de agua (A_w), pH, % de acidez total titulable (ATT), % de humedad (H), % de cenizas y % de nitrógeno (N) a diferentes tiempos de fermentación (0, 24, 48, 74, 96 y 120 h) en los microensilados de exoesqueletos de ambos subproductos adicionados con 18 % de melaza (p/p) y 5 % (v/v) de *L. Plantarum* ABG-112. Se encontró que la humedad fue ligeramente menor en los ensilados de camarón a las 24, 48, y 72 h, lo mismo que la concentración de proteínas, en comparación con los microensilados de chapulín. La proteína en el ensilado del camarón es aparentemente menor por el mayor contenido de humedad y las cenizas entre el material crudo y el ensi-

Tabla 4.- Valores de actividad de agua (A_w), pH, % acidez total titulable (ATT), % humedad (H), % cenizas y % nitrógeno (N) a diferentes tiempos de fermentación en microensilados de exoesqueletos de chapulín.

Table 4.- Water activity (A_w), pH, % total titratable acidity (ATT), % moisture (H), % ashes and % nitrogen (N) values at, different fermentation times in grasshopper exoskeletons micro silages.

| Tiempo de fermentación (h) | A_w | pH | %ATT | %H | % Cenizas | % N |
|----------------------------|-------------|------------|------------|-------------|--------------|--------------|
| 0 | 0.975 ±0.01 | 4.81 ±0.01 | 4.77 ±0.01 | 8.013 ±0.01 | 21.347 ±0.02 | 46.708 ±0.01 |
| 24 | 0.975 ±0.01 | 4.22 ±0.02 | 4.98 ±0.01 | 5.725 ±0.01 | 21.102 ±0.02 | 45.764 ±0.01 |
| 48 | 0.97 ±0.01 | 4.21 ±0.01 | 5.07 ±0.01 | 3.996 ±0.01 | 19.989 ±0.01 | 40.934 ±0.01 |
| 74 | 0.965 ±0.01 | 4.13 ±0.01 | 5.22 ±0.01 | 3.732 ±0.01 | 19.819 ±0.02 | 39.983 ±0.01 |
| 96 | 0.965 ±0.02 | 4.11 ±0.02 | 6.37 ±0.01 | 3.452 ±0.02 | 19.774 ±0.02 | 38.245 ±0.01 |
| 120 | 0.96 ±0.01 | 3.96 ±0.01 | 8.93 ±0.02 | 3.361 ±0.01 | 19.657 ±0.01 | 38.945 ±0.01 |

Tabla 5.- Valores de actividad de agua (A_w), pH, % acidez total titulable (ATT), % humedad (H), % cenizas y % nitrógeno (N) a diferentes tiempos de fermentación (0, 24, 48, 74, 96 y 120 h) en microensilados de exoesqueletos de camarón.

Table 5.- Water activity (A_w), pH, % total titratable acidity (ATT), % moisture (H), % ashes and % nitrogen (N) values, at different fermentation times (0, 24, 48, 74, 96 and 120 h) in shrimp exoskeletons micro silages.

| Tiempo de fermentación (h) | A_w | pH | %ATT | %H | % Cenizas | % N |
|----------------------------|-------------|------------|------------|-------------|--------------|--------------|
| 0 | 0.975 ±0.02 | 4.78 ±0.01 | 4.71 ±0.01 | 8.061 ±0.01 | 19.213 ±0.01 | 45.372 ±0.01 |
| 24 | 0.975 ±0.01 | 4.56 ±0.01 | 5.98 ±0.02 | 5.389 ±0.02 | 19.112 ±0.02 | 42.862 ±0.03 |
| 48 | 0.970 ±0.02 | 4.45 ±0.01 | 6.07 ±0.01 | 3.997 ±0.01 | 18.898 ±0.01 | 38.769 ±0.01 |
| 74 | 0.970 ±0.01 | 4.20 ±0.01 | 7.22 ±0.01 | 3.468 ±0.03 | 18.713 ±0.01 | 37.987 ±0.01 |
| 96 | 0.965 ±0.01 | 4.19 ±0.01 | 8.6 ±0.01 | 3.360 ±0.01 | 18.594 ±0.03 | 36.919 ±0.02 |
| 120 | 0.960 ±0.01 | 3.90 ±0.01 | 8.99 ±0.01 | 3.355 ±0.01 | 18.387 ±0.01 | 36.306 ±0.01 |

lado para ambas especies. El contenido de humedad inicial en el tiempo cero del ensilado del camarón y chapulín fue 8.061 ± 0.76 y 8.013 ± 0.77 %, respectivamente; en el ensilado de camarón, fue considerablemente mayor al reportado por Fagbenro *et al.* (1994), quienes obtuvieron valores de humedad de alrededor del 7.0 % y también superior al reportado por León (2003), quien obtuvo 5.62 % de humedad. Por otra parte, se observó que existió una disminución del contenido de nitrógeno en los ensilados de camarón y chapulín de 9.07 y 7.77 %, respectivamente, desde valores de 45.3721 ± 0.46 y 46.7088 ± 0.37 % (0 h) a 36.3061 ± 0.26 y 38.9453 ± 0.34 % (120 h), respectivamente. Por lo tanto, se puede inferir que con la adición de inóculo se presenta una mayor actividad proteolítica en los ensilados de camarón, lo cual puede verse reflejado en un aumento de la digestibilidad de sus proteínas para ser aprovechadas más eficientemente en alimentación animal (Vidotti *et al.*, 2003), Tal desproteínización se atribuye también a las enzimas presentes en el desecho de camarón, las cuales actúan sobre las proteínas, provocando la hidrólisis y dando lugar a la producción de un lixiviado (Shirai *et al.*, 1999). En los ensilados el extracto libre de nitrógeno se presentó un valor superior a la materia prima, lo que resulta de agregar melaza a los desechos para el proceso de fermentación (Vidotti *et al.*, 2003; Ramírez *et al.*, 2009). Una vez transcurridos los 5 días de fermentación, los microensilados de ambas fuentes presentaron una disminución en la producción de ácido láctico y, por lo tanto, un aumento en el pH. Esto se debió muy probablemente a la inhibición que pudieron sufrir las BAL por el aumento en la concentración de oxígeno durante el muestreo anterior, ya que, en la mayoría de los casos, la presencia de oxígeno suprime el desarrollo de las BAL, siendo mucho más eficiente el uso de oxígeno por microorganismos con una cadena respiratoria funcional para la producción de energía. Estos resultados fueron satisfactorios y permitieron demostrar la posibilidad de obtener un producto estable a tiempos cortos. La actividad de agua disminuyó considerablemente durante el proceso, de 0.975 al inicio hasta valores de 0.96 a los 5 d de fermentación para los dos microensilados, sin haber existido diferencia significativa entre ellos ($p > 0.05$). Sin embargo, según lo establecen Madigan *et al.* (2003), en todos los ensilados los valores de A_w fueron importantes para la supervivencia de las BAL y la inhibición de microorganismos dañinos, lo cual permitió mantener estable el producto.

Análisis Microbiológico

Los valores microbiológicos de los ensilados a las 120 h se presentan en la Tabla 6. El ensilado de camarón presentó valores de 132×10^6 UFC/g de bacterias mesófilas aerobias incubadas 48 ± 2 h y el ensilado de chapulín de 230×10^6 UFC/g. En la determinación de coliformes totales en placa, ambos ensilados mostraron ausencia, quedando dentro del límite máximo establecido por la Norma Oficial Mexicana (NOM-027-SSA1) (400 UFC/g). También se observó ausencia de mohos y *Salmonella sp*, esto sugiere que los microorganismos patógenos son inhibidos por el proceso de ensilaje. Por

Tabla 6.- Resultados de los análisis microbiológicos en los ensilados biológicos de los exoesqueletos de camarón y chapulín.

Table 6.- Results of the microbiological analyzes in the biological silages of shrimp and grasshopper exoskeletons.

| Muestras | Aerobias Mesófilas (UFC/g) | Coliformes Totales (UFC /g) | Mohos y Levaduras (UFC /g) | <i>Salmonella sp</i> (UFC /g) |
|----------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| Camarón | 132×10^6 | Ausente | Ausente | Ausente |
| Chapulín | 230×10^6 | Ausente | Ausente | Ausente |

otra parte, se considera que la disminución en el valor de pH y la alta acidez favorece el desarrollo de los microorganismos ácido lácticos en los ensilados lo que se puede constatar por la disminución general de los coliformes y la ausencia de *Salmonella* al final del tiempo de fermentación; la incorporación de sorbato de potasio es necesaria previniendo la contaminación del producto fermentado por levaduras que asimilan el ácido láctico.

CONCLUSIONES

Se demostró la posibilidad de reutilizar las dos fuentes de exoesqueletos para producir ensilados por fermentación en medio sólido. Este tratamiento biológico influyó en la desproteínización y desmineralización de ambas fuentes. El camarón fue el sustrato que mejor se desproteínizó y desmineralizó en comparación con el chapulín. Los resultados obtenidos demuestran la importancia de los desechos de crustáceos, que pueden ser transformados mediante fermentación ácido láctica en ensilados, adquiriendo alto valor agregado y minimizando los problemas de impacto ambiental y pueden utilizarse como suplemento parcial de la harina de pescado en dietas prácticas en general. Las condiciones microbiológicas de los ensilados indican que la fermentación de estos desechos es inocua y puedan emplearse como insusos en dietas para para alimentación animal.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad del Papaloapan (UNPA) y al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el financiamiento del proyecto.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaramos no tener conflicto de interés.

REFERENCIAS

- Amador, M. A., Juárez, J. M., Hernández, H., Ramírez, L. P., Huerta, S., Herman, E. y Rodríguez, M. J. 2022. Evaluación de procesos combinados: purificación de quitina a partir de exoesqueletos de camarón (*Penaeus sp*) y chapulín (*Sphenarium purpurascens*). Tropical and Subtropical Agroecosystems, 102: 1-12.
- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C.
- Bashkar, N., Suresh, P., Sakhare, P., Sachindra, N. 2007. Shrimp biowaste fermentation with *Pediococcus acidolactici* CFR2182: Optimization of fermentation conditions by

- response surface methodology and effect of optimized conditions o deproteination/demineralization and carotenoid recovery, *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1427-1434.
- Bertullo, V. 2009. Proyecto de fabricación industrial de ensilado biológico de pescado en Uruguay. Informe de pesca No. 538. FAO. 90 p.
- Borrás, L. M., Valiño. E. C., Elías, A., Martínez, J. J., Sanabria, A. M. y Becerra, Mónica. L. 2020. Fermentación en estado sólido de residuos poscosecha de *Solanum tuberosum* y un preparado microbiano. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 54 (4): 525-533.
- Cira, L. A., Huerta, S., Hall, G. M. y Shirai, K. 2002. Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemistry*. 37:1359-1366.
- Cira L. 2000. Escalamiento de un proceso para la recuperación de quitina a partir de desechos de camarón. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa - México.
- Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. 2020. Anuario estadístico de Acuicultura y Pesca. Comisión nacional de acuicultura y pesca. Edición 2020. México. 21 pp.
- Dapkevičius, L. N. E., Nout, J. R., Rombouts, F. M., Houben, J. H. y Wymenga, W. 2000. Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* 57: 107-114.
- Fagbenro, O., Jauncey, K. y Haylor, G. 1994. Nutritive value of diets containing dried lactic acid fermented fish silage and soybean meal for juvenile *Oreochromis niloticus* and *Clarias gariepinus*. *Aquatic Living Resource*. 7: 79-85.
- Gimeno, M., Ramírez, J., Martínez, C., Pacheco, N., García, R., Barzana, E. y Shirai, K. 2007. One-Solvent extraction of astaxanthin from lactic acid fermented shrimp wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 10345-10350.
- Jay, J.M. 2000. *Modern food microbiology*. 6th edition, Aspen publication, Gaithersburg, Maryland, USA.
- Jung W. J., Jo G. H., Kuk J. H., Kim K. Y. 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.
- León, F.J. 2003. Consumo voluntario y digestibilidad de nutrientes de heno de gramíneas tropicales nativas y ensilaje de sorgo y el efecto de la suplementación con residuos fermentados de pescadería. MS Tesis. Universidad de Puerto Rico. RUM. 63pp.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. y Parker, J. 2003. *Brock, Biología de los microorganismos*, 10ª edición, Madrid, Pearson-Prentice Hall.
- Nigam, P., Armour, G., Banat, I. M., Singh, D. y Marchant, R. 2000. Physical removal of textile dyes from effluents and solid-state fermentation of dye-adsorbed agricultural residues. *Bioresour. Technol.* 72:219-226.
- Pacheco, N., Garnica, M., Ramírez, J.Y., Flores, B., Gimeno, M., Bárzana E., Shirai K. 2009. Effect of temperature on chitin and astaxanthin recoveries from shrimp waste using lactic acid bacteria, *Bioresource Technology* 100, 2849-2854.
- Pandey, A. 2003. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 13: 81-84. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00121-3](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00121-3)
- Peniche, C. 2006. Estudios sobre quitina y quitosana. Universidad de la Habana. Facultad de Química - Cuba.
- Plascencia, J. M., Olvera, M. A., Arredondo, J. L., Hall, G. M. y Shirai, K. 2002. Feasibility of fishmeal replacement by shrimp head silage protein hydrolysate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) diets. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 82: 753-759.
- Ramírez C.L., Espinosa M.J., Peter M.G y Shirai K. 2010. The effect of pH on the production of chitinolytic enzymes of *Verticillium fungicola* in submerged cultures. *Bioresource Technology*. 101: 9236-9240.
- Ramírez, C.L., Marín, M.C., Huerta, S., Revah, S. y Shirai, K. 2006. Enzymatic hydrolysis of chitin in the production of oligosaccharides using *Lecanicillium fungicola* chitinases. *Process Biochemistry*. 41: 1106-1110.
- Ramírez Ramírez, J. C. 2009. Aprovechamiento de fauna de acompañamiento del camarón y subproductos pesqueros mediante la elaboración de ensilado de pescado.
- Rao, M. S. y Stevens, W. F. 2005. Chitin production by *Lactobacillus* fermentation of shrimp biowaste in a drum reactor and its chemical conversion to chitosan. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80: 1080-1087.
- Rao, M.S., Muñoz, J. y Stevens, W.F. 2000. Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste. *Appl. Microbiol. Biotech.*, 54: 808-813
- Shirai K. 1999. Utilización de desperdicios de camarón para recuperación de quitina. Proteínas y pigmentos por vía microbiana. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa - México.
- Sini, T.K., Santhosh, S. y Mathew, P.T. 2007. Study on the production of chitin and chitosan from shrimp shell by using *Bacillus subtilis* fermentation. *Carbohydrate Research* 342, 2423-2429.
- Terrones, E. E. y Reyes, A. W. 2018. Efecto de dietas con ensilado biológico de residuos de molusco en el crecimiento del camarón *Cryphiops caementarius* y tilapia *Oreochromis niloticus* en co-cultivo intensivo. *Scientia Agropecuaria*. (2): 167-176.
- Torrucó, J.G., Hernández, S. B., Herman, L. E., Martínez, S. C., Juárez, B. J. y Rodríguez. 2019. Chemical, functional and thermal characterization, and fatty acid profile of the edible grasshopper (*Sphenarium purpurascens* Ch.). *Eur Food Res Technol*. 245: 285-292.
- Vidotti, R. M., Carneiro, D., Macedo, V. E. y Carneiro, D. J. 2003. Amino acid composition of processed fish silage using different raw materials. *Animal Feed Science and Technology*. 105, 199-204.
- Xu, Y., Gallert, C. y Winter J. 2008. Chitin purification from shrimp wastes by microbial deproteination and decalcification. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79, 687-697.
- Zahar M., Benkerroum, N., Guerouali, A., Laraki, Y. y Yakoubi, K. 2002. Effect of temperature, anaerobiosis, stirring and salt addition on natural fermentation silage of sardine and sardine wastes in sugarcane molasses. *Bioresour Technol.* 82(2):171-176.