

Production of extracellular chitinase from *Serratia marcescens* QM B1466 using chitin from shrimp shells waste

Eduardo A. Ramones, Gisela B. Páez, Zulay M. Mármol, José Ferrer and Marisela Rincón

*Escuela de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad del Zulia
Apartado 526, Maracaibo, Venezuela.*

E-mail: jferrer@luz.ve, gpaez@luz.ve, eramones@luz.ve

Abstract

Chitin from shrimp shells was prepared to evaluate the production of extracellular chitinase from *Serratia marcescens* QM B1466 in submerged culture under controlled conditions of temperature (28°C), shaking (150 rpm) and pH (7,7).

To determine the composition of chitin on the shell, the material was ground, classified by sieving, deproteinized and demineralized. The proximate waste analysis indicates a high content of crude protein (36,11%). The highest chitinase activity during the enzymatic hydrolysis process was 1,91 μmols , equivalent to N-acetylglucosamine produced per ml of filtered culture; this determines the enzyme capacity of hydrolysis on the crystalline chitin. The percentage of chitin conversion during fermentation (73%) is the result of this activity. The N-acetylglucosamine produced is used by the bacterium for growth, which was adjusted to the Monod model .

Key words: Extracellular chitinase, shrimp shells, chitin.

Producción de quitinasa extracelular de *Serratia marcescens* QM B1466 utilizando quitina del desecho de conchas de camarones

Resumen

La quitina de las conchas de camarones fue preparada para evaluar la producción de quitinasa extracelular de la *Serratia marcescens* QM B1466 en un cultivo sumergido bajo condiciones controladas de temperatura (28°C), agitación (150 rpm) y pH (7,7).

Para determinar la composición de quitina en la concha, el material fue molido y clasificado en tamices, desproteinizado y desmineralizado. El análisis proximal del desecho, indica un alto contenido de proteína cruda, 36,11%. La máxima actividad de quitinasa durante el proceso de hidrólisis enzimática fue, 1,91 μmoles equivalentes de N-acetilglucosamina producidos por ml de cultivo filtrado; esto determina la capacidad de hidrólisis de la enzima sobre la quitina cristalina. El porcentaje de conversión de la quitina, durante la fermentación, (73%), es el resultado de esta actividad. La N-acetilglucosamina producida es utilizada por la bacteria para su crecimiento el cual se ajustó al modelo de Monod.

Palabras clave: Quitinasa extracelular, conchas de camarón, quitina.

Introducción

En los últimos años se han conceptualizado los procesos de manejo de los desechos sólidos con el objeto de generar nuevas fuentes de utilización y reducir el efecto contaminante que éstos producen. Una consideración ordenada y eficiente de los problemas específicos, debidamente identificados y la combinación de los diversos elementos funcionales, (recolección del desecho generado; transferencia y transporte; procesado y recuperación; y disposición final) permiten establecer esquemas adecuados para el manejo de estos desechos, optimizando los sistemas para proporcionar las soluciones, de acuerdo con todas las restricciones impuestas por los usuarios y los que son afectados o controlan su uso [1].

La transformación e industrialización de los productos del mar originan materiales orgánicos en descomposición, sustancias inorgánicas que pueden ser tóxicas y organismos patógenos. Estos desechos dispuestos en playas, mares y fuentes de agua dulce, producen un alto grado de contaminación afectando la capacidad autopurificadora de estas aguas y causando daños irreversibles a los ecosistemas.

En el aprovechamiento de los desechos generados por la explotación e industrialización de los productos pesqueros surgen como alternativa los procesos de bioconversión mediante los cuales se pueden obtener compuestos químicamente bien definidos, tales como proteínas, carbohidratos, grasas, enzimas, vitaminas y antibióticos, que tienen una apreciable aplicación en la industria alimentaria y en la medicina. La hidrólisis enzimática conduce a la obtención de un único producto a través de un sistema enzimático extracelular de un microorganismo específico, capaz de digerir la materia insoluble (quitina). Este producto es la N-acetilglucosamina, de especial utilidad en los procesos de producción de proteína unicelular, en la industria alimentaria (como edulcorante), con propósitos farmacéuticos y químicos, y en el crecimiento de bacterias intestinales [2].

Aproximadamente el 75% del peso total del camarón se considera desecho y del 14 al 28% del peso total de este desecho es quitina, principal componente estructural del exoesqueleto de este crustáceo [3].

Después de la celulosa la quitina es probablemente el polisacárido más abundante en la naturaleza. La quitina es un biopolímero insoluble, de alto peso molecular de cadenas β , (1-4) N-acetilglucosamina. Estudios recientes han sido dirigidos hacia la utilización de quitina β como sustrato para la transformación a productos de utilidad. La producción de quitinasa microbiana ha recibido especial atención como un paso importante en los procesos de bioconversión de los desechos de conchas de camarón, [4] y se considera como una de las variables principales en estos procesos, estimada en un 12% del costo total de producción [5]. Según mencionan algunos autores, la quitinasa activa juega un papel importante en la ecología de muchas bacterias marinas, algunas de ellas patógenas como el *Vibrio cholerae*. Interacciones entre estos microorganismos y materiales quitináceos son consideradas de gran interés para el control indirecto en la epidemiología de enfermedades [6].

Los productos de la hidrólisis de la quitina pueden ser usados en la producción de proteína unicelular para la alimentación animal, en la industria química y farmacéutica. Se ha reportado una extensa gama de microorganismos capaces de producir quitinasa extracelular en estado homogéneo, entre estos se mencionan hongos como, *Streptomyces antibioticus*, *Aspergillus niger*, *Streptomyces sp.* y *Streptomyces orientalis* [7] y de bacterias como *Serratia marcescens* W 200, *Aeromonas liquefaciens* 2327-ICPB, *Serratia marcescens* 2875-ICPB [8], *Arthrobacter sp.* y *Escherichia coli* [7].

La quitinasa se encuentra en una gran variedad de organismos vivos tales como caracoles, crustáceos, insectos, vertebrados, y en semillas de judías, pero la fuente más importante son los microorganismos [9].

La quitinasa extracelular de *Serratia marcescens* QM B1466 fue caracterizada por Monreal y Reese [9], después de seleccionarla de 100 microorganismos estudiados, por ser esta la más activa en la producción de la enzima. El sistema enzimático de *S. marcescens* difiere de muchos otros sistemas quitinolíticos que solo actúan sobre quitina hinchada, éste también puede hidrolizar la quitina cristalina. La quitinasa fue modelada como un sistema de dos enzimas que hidroliza la quitina a N-acetilglucosamina, éste fue

descrito como un compuesto de dos hidrolasas separadas: (i) una endoquinasa [poly- β -1,4- (2-acetamida-2-dexoxi) D-glucosa glicohidrolasa] la cual produce polímeros de NAGA soluble de bajo peso molecular, el dímero N,N-diacetil quitobiosa predominante y (ii) una quitobiasa (acetil-amida-dexoxi-glucohidrolasa) la cual hidroliza los intermedios a NAGA [10].

El objetivo del presente estudio fue utilizar la quitina obtenida de conchas de camarones procesados en la región zuliana como sustrato para la producción de quitinasa extracelular de la *Serratia marcescens* QM B1466. El desecho fue debidamente caracterizado y evaluado en sus propiedades físico-químicas. También fue estudiada la cinética de crecimiento del microorganismo utilizado en el medio con quitina y la descomposición de este sustrato durante el proceso de fermentación.

Procedimiento Experimental

Materiales

Desechos de conchas de camarón

Las conchas de camarones se obtuvieron de una planta procesadora ubicada en Maracaibo, Estado Zulia, de camarones *Penaeus vannamei* procedentes del Golfo de Venezuela.

Organismo

Se utilizó *Serratia marcescens* QM B1466, proveniente de la American Type Culture Collection, (ATCC), ésta se obtuvo en estado liofilizado y fue debidamente rehidratada y activada según especificaciones del proveedor.

Metodología

Pretratamiento: El pretratamiento del desecho de conchas de camarón incluyó la reducción de tamaño, desproteinización y desmineralización.

Reducción de tamaño: Las conchas de camarón fueron molidas y clasificadas con tamices de mallas de 20 a 70 (0,85 - 0,21 mm).

Desproteinización y desmineralización: Con el objetivo de obtener quitina semipurificada de las conchas de camarón, éstas se trataron con ácido y base para remover residuos proteicos y

calcáreos. La quitina molida y tamizada fue tratada con una solución de HCl 0,6 N mezclada en una relación 11:1 durante 3 horas a 28°C. Después de filtrada y lavada, se mezcló con una solución de NaOH al 1% durante 24 horas a 28°C, la quitina fue secada y tamizada en mallas entre 20 y 70 para obtener un tamaño de partícula de 0,85 y 0,21mm [4].

Caracterización: Se evaluaron las propiedades físico-químicas en términos de proteínas, grasas, cenizas, materia seca (análisis proximal o de Weende) [11], y composición de quitina en la concha de camarón.

Quitina: El porcentaje de quitina en base seca se determinó gravimétricamente después de la desmineralización y desproteinización del desecho de conchas de camarón.

Quitina coloidal: 25 gramos de quitina molida y tamizada se suspendieron en 250 ml de ácido fosfórico al 85% y se almacenaron a 4°C durante 24 horas. A la mezcla se le adicionó 2 litros de agua desionizada, se filtró y lavó hasta obtener un pH entre 5,0 y 5,5 en el filtrado. Luego, se resuspendió en agua desionizada y se adicionó hidróxido de sodio 1N para subir el pH a 7,0. La mezcla se centrifugó a 8.000 x g, 10 min., se separaron los pellets de quitina y se almacenó a 4°C hasta su uso. La concentración de quitina se calculó por secado hasta peso constante a 50°C, [12].

Fermentación: Cepas de *Serratia marcescens* QM B1466, mantenidas en cuñas de agar nutritivo fueron utilizadas para preparar una suspensión de esporas que luego fue transferida a frascos erlenmeyer de 250 ml, con 50 ml de medio mineral y quitina (6 g/L) esterilizada a 121°C y 15 psi. durante 15 min. El pH del medio de cultivo fue ajustado antes de la esterilización a 8,3 con una solución de NaOH al 4% p/v. Después de autoclavado el pH del medio fue 7,7; controlado durante la fermentación por la adición de un buffer de fosfato [9]. El cultivo por carga se hizo por triplicado.

Medio de cultivo: La composición del medio de fermentación (Bennett y Hood, 1980) fue en g/L: quitina pretratada, 6,0; extracto de levadura (Merck), 1,0; KH₂PO₄, 0,2; K₂HPO₄, 0,8; (NH₄)SO₄, 0,5; MgSO₄ · 7H₂O, 0,2; FeCl₃ · 2H₂O, 0,01; ZnSO₄ · 7H₂O, 0,001 [4].

Contaje de células: El contaje de células se realizó por triplicado mediante el método de conteo directo, haciendo diluciones apropiadas en solución salina (0.85%) y un medio sólido de composición en g/L: Agar nutritivo (Merck), 15,0; bactotripton (Merck), 10,0; extracto de levadura (Merck), 5,0 [4]. Las placas fueron incubadas a 28°C durante 24 h.

Consumo de sustrato: Para determinar la descomposición por pérdida de peso de la quitina en el cultivo puro, se usó una variación del método propuesto por Carroad y Tom [8]. Se calentó la quitina a 100°C durante una hora con hidróxido de potasio al 10% p/v, luego se adicionaron 2 ml de hipoclorito al 50% en caliente para terminar de digerir la materia celular, se pasó por filtros de vidrio, se secó durante 24 horas a 105°C y finalmente se determinó gravimétricamente la quitina remanente.

Actividad quitinolítica: Un mililitro de filtrado del cultivo se incubó con 1 ml de quitina coloidal al 1% en un buffer de fosfato citrato (N/20, pH 6,6) durante 1 hora [9]. En 1 ml de sobrenadante se midió el azúcar reductor por el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) [13], usando una curva patrón de N-acetilglucosamina. Una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima requerida para producir 1 μmol de N-acetilglucosamina bajo estas condiciones.

Determinación de la velocidad específica de crecimiento, μ_m y la constante de saturación, k_s , rendimiento celular, $Y_{x/s}$, y la constante de mantenimiento, m_s : Los parámetros, μ_m , k_s , se determinaron a partir de los resultados experimentales obtenidos de la concentración celular y sustrato consumido durante el crecimiento de la *Serratia marcescens* bajo el fundamento del modelo de Monod [14], que sugiere la siguiente ecuación:

$$r_x = \frac{dx}{dt} = \frac{\mu_m Sx}{k_s + S} \quad (1)$$

donde r_x es la velocidad de crecimiento celular ($\text{Kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$); S es la concentración de sustrato ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$), y x_v es la concentración de células viables ($\text{Kg} \cdot \text{m}^{-3}$) estas son variables que se obtienen de los datos experimentales; μ_m , es la velocidad específica máxima de crecimiento (h^{-1}); y K_s , la

constante de saturación para el sustrato ($\text{Kg} \cdot \text{m}^{-3}$). Todos estos parámetros son característicos de algunos microorganismos para un proceso que guarde las mismas condiciones de temperatura, pH, concentración del sustrato y otras condiciones ambientales [15].

Si se grafican los dobles recíprocos de las variables, μ y S , esto es, $1/\mu$ vs $1/S$, se obtienen los parámetros μ_m y k_s (determinación gráfica por Lineweaver-Burk).

$$\frac{1}{\mu} = \frac{k_s \cdot 1}{\mu_m S} + \frac{1}{\mu_m} \quad (2)$$

donde, k_s / μ_m es la pendiente y $1 / \mu_m$ es la ordenada al origen de la línea recta.

La relación de la masa celular formada y la masa del sustrato requerido se define como el factor de rendimiento, $Y_{x/s}$ ($\text{Kg} \text{ células} \cdot \text{Kg} \text{ de fuente de carbono}^{-1}$). La velocidad de consumo de sustrato es una variable dependiente del factor de rendimiento de la biomasa sobre el sustrato, $Y_{x/s}$ y la constante de mantenimiento, m_s ($\text{Kg} \text{ de fuente de carbono} \cdot \text{Kg} \text{ de células}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) [15].

La ecuación (3) define la velocidad de consumo del sustrato, y los parámetros $Y_{x/s}$ y m_s se determinan de la misma manera que para el caso de μ_m y k_s .

$$r_s = \frac{r_x}{Y_{x/s}} + m_s x_v \quad (3)$$

La ecuación final de la recta que permite hallar por el método gráfico estos valores, queda de esta forma:

$$\frac{r_s}{x_v} = \frac{1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{r_x}{x_v} + m_s \quad (4)$$

donde, $1/Y_{x/s}$ es la pendiente de la recta y m_s , es la ordenada al origen.

Resultados y Discusión

Caracterización del desecho de conchas de camarón

El análisis proximal del desecho de conchas de camarón secado a 32°C durante varios días, molidas y tamizadas hasta obtener un diámetro de partícula entre 0.85 mm y 0.21 mm, muestra un 36.6% de proteína nativa, 22.2% de quitina, 4.1% de grasas y 36.1% de cenizas. Estos resul-

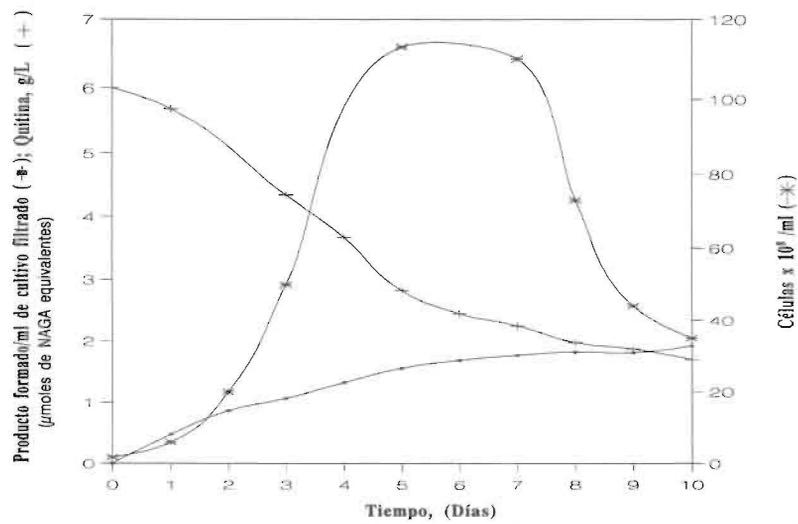


Figura 1. Actividad de la quitinasa, concentración del sustrato y crecimiento celular durante el cultivo de *S. marcescens* en un medio con quitina.

tados indican un alto contenido de proteína nativa (36,6%), la cual convierte a este desecho en una importante materia prima en los procesos de recuperación de proteínas. Este valor es mucho menor a los obtenidos por Romo y col. (63,5%) [16], en el material de desecho del procesamiento de *krill* y ligeramente menor a los reportados por García y col. (39,6%) [17], en conchas de camarón. En el primer caso, las especies estudiadas determinan la diferencia entre estos porcentajes, y en el segundo caso la variación está sujeta a las diferentes temporadas de recolección del camarón.

El alto contenido de quitina se ubica entre la reportada por Ashford y col., citada por Revah y col. [3] para conchas de camarones. La quitina es el constituyente principal de la estructura de la concha y su asociación con la proteína y el CO_3Ca define la cantidad presente en este crustáceo. Esta quitina puede ser utilizada como sustrato en un proceso de bioconversión a proteína unicelular aumentando la importancia del desecho de conchas de camarón como fuente de proteína [17]. El porcentaje de cenizas determinado en este análisis (36,1%), es elevado comparado con el obtenido por Romo y col. (11,2%) [16] en conchas de *krill*. Bough y col. [18] reportan valores entre 31-35% en conchas de camarón y García y col. (28,1%) [17] en el mismo tipo de desecho. Este porcentaje representa el material inorgánico que no se destruye al incinerar la muestra y contiene minerales esenciales que junto con la

proteína nativa deben ser desincorporados de la estructura del desecho para que la quitina cristalina pueda ser degradada por la hidrólisis enzimática de la *S. marcescens* QM B1466. El porcentaje de grasa obtenido (4,1%) es relativamente bajo, esto se debe a la exposición por varios días del material al proceso de secado, volatilizándose algunos ácidos orgánicos y aceites que son considerados en el método de análisis. Esto se reafirma con el alto valor de materia seca obtenido, (87,96%).

Cultivo por carga de *S. Marcescens* QM B1466

Producción de quitinasa extracelular durante el crecimiento de la *S. marcescens* QM B1466

La Figura 1, muestra el progreso de la fermentación de la *S. marcescens* QM B1466 en un medio basal con quitina como la única fuente de carbono. La producción del sistema enzimático quitinasa fue expresado en μmoles de N-acetilglucosamina equivalentes formados en el cultivo filtrado en un periodo de 10 días. Desde las primeras 24 horas del cultivo se observa una producción de quitinasa acelerada hasta los 4 días siguientes, esto se relaciona con el incremento de la densidad de células y la quitina consumida en este periodo. Después del quinto día este incremento es moderado, proporcionalmente al consumo del sustrato, a pesar de la disminución del

Tabla 1
Parámetros del modelo para el cultivo de *S. marcescens* QM B1466 en un medio con quitina

Concentración de quitina inicial (g/L)	μ_m^a (h^{-1})	K_s^a (gquitina /L)	$Y_{x/s}^b$ (10^7 cel./gquitina)	m_s^b (gquitina/ 10^7 cel.h)
6	0,149	9.046	4,95	5,81

^a Corr. = 0,948. ^b Corr. = 0,986

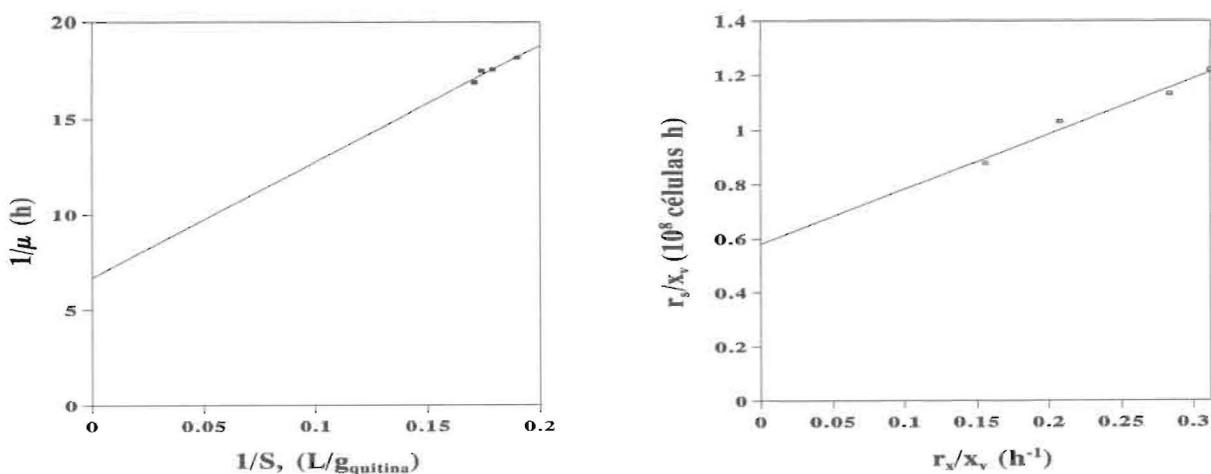


Figura 2. Determinación de los parámetros de crecimiento celular, a) μ_m y K_s ; b) $Y_{x/s}$ y m_s , por el método de línea recta de Lineweaver-Burk.

crecimiento del microorganismo. Como se observa, la producción de quitinasa no se vió minimizada en toda la fermentación lo que determina que no se produjo degradación por proteasas extracelulares [12]. La reducción de la cantidad de partículas de quitina al final de la fermentación en el medio es el resultado de la actividad enzimática. La máxima producción de quitinasa durante la fermentación fue 1,91 μ moles de NAGA equivalentes, siendo este valor ligeramente mayor al obtenido por Rowena y col. [12] para el mismo sustrato y tiempo de cultivo (1.21 μ mol de NAGA).

En este estudio el porcentaje de pérdida de peso del sustrato, quitina fue 73%. Carroad y Col. [8] obtuvieron valores menores cuando utilizaron el mismo sustrato y otros microorganismos, incluyendo la *S. marcescens* QM B1466.

Estos autores también evaluaron el porcentaje de pérdida de peso utilizando quitina en forma coloidal obteniendo mejores resultados como consecuencia de la mayor área de superficie ex-

puesta para la reacción (92,6% cuando utilizaron *Serratia marcescens* QM B466) [19]

Parámetros de crecimiento celular, μ_m , K_s , $Y_{x/s}$ y m_s .

La Tabla 1 muestra los parámetros de crecimiento celular sobre quitina de conchas de camarón que definen el modelamiento de la fermentación, los cuales fueron determinados por el método de línea recta de Lineweaver-Burk de la Figura 2 (a, b). Los resultados demuestran que el comportamiento del microorganismo utilizado en el proceso de fermentación estudiado cumple con el modelo de Monod, y son similares a los reportados por Cosio y col. [4], basados en el modelo de Boulton.

El modelo experimental de la fermentación queda definido cuando se sustituyen estos parámetros en las ecuaciones de velocidad de crecimiento y consumo de sustrato descritas por Monod.

1. Crecimiento celular:

$$\frac{dx}{dt} = r_x \quad (5)$$

Sustituyendo los valores de μ_m y k_s en la ecuación (1) de la velocidad de crecimiento se tiene,

$$r_x = \frac{0,149S}{9,046 + S} x_r \quad (6)$$

Fuente de carbono:

$$\frac{ds}{dt} = r_s \quad (7)$$

Sustituyendo los parámetros, $Y_{x/s}$ y m_s , la ecuación (4) queda definida como se muestra:

$$r_x = \frac{r_s}{4,95 \cdot 10^7} + 5,81 \cdot 10^{-7} x \quad (8)$$

Conclusiones

1. La quitina de la concha de camarón es un sustrato adecuado para el crecimiento de la *S. marcescens* QM B1466 y la producción de quitinasa extracelular, en un cultivo sumergido bajo condiciones controladas.

2. La actividad enzimática en el cultivo es alta, (1,91 μ moles de NAGA equivalentes/ml), determinando su capacidad de hidrólisis sobre la quitina, siendo el azúcar reductor N-acetilglucosamina el único producto de esta hidrólisis.

3. El incremento de la actividad enzimática es proporcional al consumo del sustrato. La conversión de la quitina durante la fermentación (73%), es el resultado de esta actividad.

4. El cultivo de la *Serratia marcescens* QM B1466 en el medio utilizado, con quitina como única fuente de carbono cumple con el modelo de crecimiento celular de Monod. Los parámetros de crecimiento, μ_m , k_s , $Y_{x/s}$ y m_s determinados, definen este modelo.

Agradecimiento

Se agradece al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia el financiamiento de esta investigación. No. de Proyecto 1767-94.

Referencias Bibliográficas

- Hernández, D.: "Contaminación Ambiental. Causas, efectos y control". Editorial Universo de Venezuela C. A. Maracaibo Venezuela. (1990). 158-165.
- Ping, J.; and Chang, K. "Immobilization of Chitinase on a Reversibly Soluble - Insoluble Polymer for Chitin Hydrolysis". J. Chem. Tech. Biotechnol., 60. (1994). 133 - 140.
- Revah-Moiseev, S.; and Carroad, A. "Conversion of the Enzymatic Hydrolysate of Shellfish Waste Chitin to Single-Cell Protein". Biotechnology and Bioengineering, XXIII. (1981). 1067-1078.
- Cosio, Y.; Fisher, R.; and Carroad, P. "Bioconversion of Shellfish Chitin Waste: Waste Pretreatment, Enzyme Production, Process Design, and Economic Analysis". Journal of Food Science. 47 (1982) 901-905.
- Young, M., E.; Bell, R., L., and Carroad, P., A. "Kinetics of Chitinase Production. I. Chitin Hydrolysis". Biotechnology and Bioengineering, XXVII. (1985). 769-775.
- O'Brien, M.; and Colwell, R. "A Rapid Test for Chitinase Activity that Uses 4-Methyl-umbelliferyl-N-acetyl- β -D-Glucosaminide". Applied and Environmental Microbiology, 53. (7) (1987). 1718-1720.
- Ohtakara, A.; Mitsutomi, M., and Uchida, Y. "Purification and Some Properties of Chitinase from *Vibrio sp.*" J. Ferment. Technol., 3 (1979). 169-177.
- Carroad, P., and Tom, R. "Bioconversion of Shellfish Chitin Wastes: Process Conception and selection of Microorganisms". Journal of Food Science, 43. (1978). 1158 - 1161.
- Monreal, J.; and Reese, E. "The chitinase of *Serratia marcescens*". Canadian Journal of Microbiology, 15. (1969). 689 - 696.
- Reid, J., and Ogrydziak, D. "Chitinase-Overproducing Mutant of *Serratia marcescens*". Applied and Environmental Microbiology, 41. (1981). 664 - 669.
- Ferrer, O. "Manual de Laboratorio. Técnicas de análisis químico cuantitativo aplicadas a las Ciencias Agropecuarias". L.U.Z. Venezuela. (1994). A4-B9.

12. Rowena, R., and Cabib, E. "Serratia marcescens Chitinase: One-Step Purification and Use for the Determination of Chitin". *Analytical Biochemistry*, 127. (1982). 402 - 412.
13. Miller, G. L. "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar". *Anal. Chem.*, 31. (1959). 426-428.
14. Monod J. *Recherches sur la Croissance des Cultures Bactériennes*. 2nd edn. (1942) Hermann, Paris.
15. McNeil, B., and Harvey, L. "Fermentación. A practical approach." Oxford University Press, U.S.A. (1990). 65-78.
16. Romo, C.; Anderson, C. "Determination of Optimum Parameters for Protein Isolation from Krill (*Eufasia superba*) Waste Products". *Journal of Food Science*. 44 (5). (1979). 1425-1429.
17. García, H.; Páez, G.; Ferrer, J.; Mármol, Z. y Ramones E. "Obtención de proteína unicelular a partir de desechos de conchas de camarón utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* K1V-1116. 9^{nas} Jornadas Científico Técnicas de Ingeniería". I. (1995). 261-269.
18. Bough, W.; Salter, W.; Wu, A.M.C, and Perkins, B. "Influence of Manufacturing Variables on the Characteristics and Effectiveness of Chitosan Products, *Biotech. and Bioengineering*. 20. (1978). 1931-1936.
19. Young, M.; Bell, R. and Carroad, P. "Kinetics of Chitinase Production. II. Relationship between Bacterial Growth, Chitin Hydrolysis and Enzyme Synthesis." *Biotechnology and Bioengineering*, XXVII. (1985). 776 - 780.

Recibido el 12 de Marzo de 1996

En forma revisada el 18 de Junio de 1997