

EXTRACCIÓN DE QUITINA UTILIZANDO ÁCIDO LÁCTICO

Dra. Marinela Nazareth Colina Rincón^{1,2*}, Lic. Karen Dianne Medina Robles¹, Ing. Jose Alejandro Vargas Colina², MSc. Dianela Isabel Rincón Prieto², Lic. Rossana Arismendi², Lic. Brinolfo Montilla¹

¹Universidad del Zulia. Facultad Experimental de Ciencias. Departamento de Química. Laboratorio de Química Ambiental. Maracaibo 4011. Zulia. Venezuela.

²Empresa INNOVACION AMBIENTAL QUITOSANO CA. Av 4 San Francisco No 29-25. Zulia, Venezuela.

*Autor para la correspondencia. E-mail: colinamarinela@gmail.com

Recibido: 15-5-2017 / Aceptado: 14-8-2017

RESUMEN

En este trabajo, se evaluó la extracción de quitina a partir de desechos de crustáceos involucrando la fermentación láctica generando ácido láctico para la desproteínización y desmineralización del material, usando suero de leche y azúcar como sustrato y fuente de carbono, por un periodo de 2 y 3 semanas a temperatura ambiente. Los resultados mostraron que la concentración óptima de azúcar para la extracción de quitina de un 10% m/v, evidenciando un descenso del pH y consecuente aumento de la acidez total titulable. Al incrementar el tiempo de fermentación de 2 a 3 semanas, los procesos de desmineralización y desproteínización mejoraron dando como resultado un porcentaje de ceniza de 2,68% el cual indica una buena remoción de minerales presentes en los desechos de crustáceos. Además, el porcentaje de remoción resultó de un 96,62% para el magnesio (Mg^{2+}), 95,62% de potasio (K^+) y 92,82% de calcio (Ca^{2+}). El espectro de FTIR mostró las bandas de los grupos funcionales característicos de la quitina.

Palabras clave: Desechos de crustáceos, quitina, azúcar, suero de leche, fermentación.

CHITIN EXTRACTION USING LACTIC ACID

ABSTRACT

In this work, the extraction of chitin from crustacean waste involving lactic acid fermentation was studied, this generating lactic acid as product of deproteinization and demineralization of the material. Milk serum and sugar as substrate and carbon source were used, for a period of 2 y 3 weeks at room temperature. The results showed that the optimal sugar concentration for chitin extraction was 10% m/v, evidencing a decrease in pH and a consequent increase in titratable total acidity, by increasing the fermentation time of 2 to 3 weeks. The results were better with a percentage of ash of 2.68%, indicating a good removal of minerals present in crustacean wastes. In addition, the percentage of removal resulted in a 96.62%, the rate of removal for magnesium (Mg^{2+}), 95.62% potassium (K^+) and 92.82% of calcium (Ca^{2+}). The FTIR spectrum revealed the bands from the functional groups that characterize chitin.

Key words: Crustacean wastes, Chitin, Sugar, Buttermilk, fermentation.

1. INTRODUCCIÓN

La quitina (poli- β -(1,4)-N-acetil-D-glucosamina) es un polisacárido de importancia, que se encuentra distribuida en la naturaleza y es uno de los polímeros más abundantes y de fácil obtención (Larez 2006; Rinaudo 2006; Duarte y col., 2002). Es el segundo polisacárido más abundante después de la celulosa, y un tipo de recurso natural renovable, que presenta propiedades como biocompatibilidad, biodegradabilidad y actividad no tóxica. (Colina y col., 2014). Es uno de los componentes principales de las paredes celulares de los hongos y del exoesqueleto de crustáceos e insectos (Hernandez y col., 2009; Jakymec y col., 2001). El contenido de quitina en crustáceos es entre 2-12% del total de su masa corporal (Ayala y col., 2014).

La extracción de quitina a partir del caparazón de crustáceos se lleva a cabo mediante un tratamiento químico que se realiza en dos etapas consecutivas: 1) Desproteización, la cual consiste en tratar los caparazones de los crustáceos con una solución acuosa diluida de hidróxido de sodio a temperatura alta con el fin de disolver la proteína 2) Desmineralización, que se realiza empleando soluciones diluidas de ácido clorhídrico a temperatura de 20 °C. (Ayala y col., 2014). Por otro lado, los efluentes de la industria lechera, como lo es el suero de leche, es un fuerte contaminante para sistemas ecológicos acuáticos, debido a que poseen una alta demanda bioquímica de oxígeno (Carrilo 2006). Lo que genera un gran impacto ambiental ya que, en muchos casos, no se tiene un buen sistema de recolección o deposición del mismo. Sin embargo, para un buen aprovechamiento de este desecho se puede implementar la fermentación ácido láctica. Una fermentación ácido láctica involucra el uso de bacterias del ácido láctico (*Lactobacilo* o *Lactobacillus*) (Hernandez y col., 2009) siendo un género de bacterias Gram positivas, capaces de convertir la lactosa y azúcares en ácido láctico.

En relación a lo antes expuesto, en este trabajo se propone la extracción usando un procedimiento amigable para el medio ambiente de la quitina partiendo de desechos de crustáceos utilizando ácido láctico; producto de una fermentación ácido láctica usando suero de leche y azúcar, contribuyendo al aprovechamiento de los desechos tanto de la industria láctea como camaronera o cangrejera.

La quitina es un biopolímero considerado a menudo como un derivado de la celulosa, la quitina es blanca, insoluble, dura, inelástica y es obtenida generalmente por un tratamiento químico y posee una gran masa molecular (Juárez 2010; Belandria, J.; Morillo, N., 2008; Parada y col., 2004; López 2009; Mármol y col., 2009). La quitina está compuesta por

Extracción de Quitina Utilizando Ácido Láctico

residuos de N-acetil-D-glucosamida, unidos por enlaces β -(1, 4) (**Figura 1**). Cuenta con tres diferentes formas cristalográficas: α -, β - y γ -quitinas.

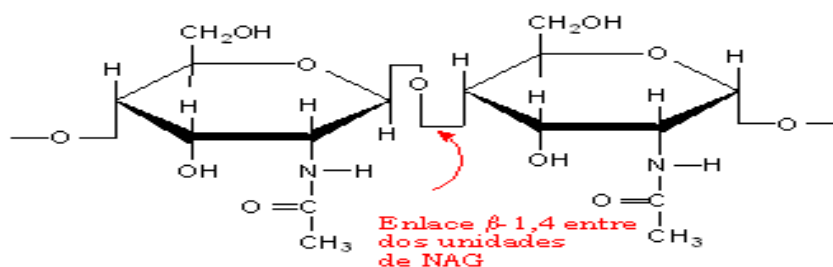


Figura 1. Estructura de la quitina.

Comparando la abundancia natural de las estructuras polifórmicas, se encuentra que la α -quitina es la más abundante y estable, mientras que las otras dos se presentan en pequeñas proporciones y tienden a ser transformadas en α -quitina (Juárez 2010; Larez 2003; Crini 2005; Percot y col., 2003). Aunque muchos métodos se pueden encontrar en la literatura para la eliminación de las proteínas y minerales de los crustáceos, el método químico utiliza para eliminar las proteínas de la muestra, una solución de NaOH (1–10%) a temperaturas entre 65 y 100 °C durante un período de 1 a 24 horas (desproteínización), la eliminación del carbonato de calcio utiliza un tratamiento ácido con soluciones diluidas de HCl, aunque también se han utilizado otros ácidos como H_2SO_3 , HNO_3 , CH_3COOH , HCOOH (desmineralización) (Perentena y col., 2015). La quitina resultante es desacetilada, si la quitina es desacetilada en más de un 50% se produce el quitosano.

El suero de leche es el subproducto más abundante de la industria láctea, es el residual obtenido de la manufactura del queso. Este subproducto es de difícil aceptación en el mercado (Cira y col., 2002) aunque actualmente se está siendo utilizado por deportistas. La fermentación láctica se ha propuesto como alternativa para el tratamiento de estos desechos, ya que ofrece atractivas ventajas, tales como; bajos costos de inversión, lo cual es muy importante en lugares donde no se cuenta con infraestructura, dar un uso integral a los desechos, ya que se puede separar productos de alto valor comercial como quitina, pigmentos y proteínas (Urribarri y col., 2004).

La fermentación láctica es un proceso celular anaeróbico donde se utiliza glucosa para obtener energía y donde el producto de desecho es el ácido láctico. Este proceso lo realizan muchas bacterias (llamadas bacterias lácticas), hongos, algunos protozoos y en los tejidos animales. Un ejemplo de este tipo de fermentación es la acidificación de la leche. Ciertas bacterias (*Lactobacillus*, *Streptococcus*) al desarrollarse en la leche utilizan la lactosa como fuente de energía. La lactosa, al fermentar, produce energía que es aprovechada por las

bacterias, y el ácido láctico es eliminado. La coagulación de la leche (cuajada) resulta de la precipitación de la caseína, proteínas de la leche y ocurre por el descenso de pH (acidificación), debido a la presencia de ácido láctico (Urribarri y col., 2004). Los estudios por fermentación láctica involucran el uso de bacterias del ácido láctico (*Lactobacillus*) para la desproteinización y descalcificación del material, obteniéndose quitina como producto final. (Urribarri y col., 2004; Parra 2009).

Las bacterias ácido lácticas son microorganismos que generan ácido láctico como único producto de fermentación (Parra 2010). Tienen diversas aplicaciones, siendo una de las principales la fermentación de alimentos como la leche, carne y vegetales, para obtener productos como yogurt, queso, encurtidos, embutidos, ensilados, entre otros (González y col., 2003; Duran y col., 1997). Las bacterias ácido lácticas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, para su adecuado crecimiento requieren de azúcares como glucosa y lactosa, además de aminoácidos, vitaminas y otros factores de crecimiento, la temperatura es uno de los factores más importantes que influyen en el crecimiento de las mismas. Las bacterias lácticas están conformadas por un amplio grupo de bacterias no esporuladas, Gram positivas que metabolizan un amplio rango de azúcares. Los mayores productores de ácido láctico pertenecen a las familias Streptococcaceae (géneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerobacter* y *Gemella*) y Lactobacillaceae (género *Lactobacillus*) (Ramírez y col., 2011; Estela y col., 2007; Serna, L; Rodríguez, A, 2005; Vásquez y col., 2009).

El ácido láctico es el hidroxíácido más sencillo que existe, y un compuesto químico con gran demanda a nivel mundial, el mismo, es ampliamente utilizado en las industrias alimentaria, farmacéutica, médica y cosmética, como materia prima para síntesis orgánica, como purgante en forma de lactato de calcio o lactato de magnesio, como removedor de sales de calcio y en la producción de plásticos biodegradables (Araya y col., 2010; Gil, R. Dominguez, A, 2007). El ácido láctico puede producirse por biotransformación o por síntesis química. La síntesis química requiere de costosos y complicados procedimientos de obtención y separación para lograr un producto final con la pureza deseada. Por otro lado, para la producción de ácido láctico por biotransformación se requiere de sustratos carbonosos complejos, tales como glucosa, lactosa, almidón y celulosa; la forma más rentable es por medio de una glucólisis (Serna, L; Rodríguez, A, 2007; AOAC 1990; Escorcia y col., 2009).

2. METODOLOGIA

2.1. Materiales

Se utilizaron los desechos de caparazones de crustáceos provenientes del Lago de Maracaibo, Venezuela. Para la desproteinización de los mismos se utilizó NaOH (98%, Riedel de Haën) y sulfito de sodio (Merck, G.A.) como agente antioxidante, luego fueron desmineralizados con HCl al 36% (Riedel de Haën). Para la obtención de quitina utilizando ácido láctico se realizó una fermentación láctica, usando suero de leche del Estado Zulia, Venezuela, subproducto proveniente de la elaboración de queso, azúcar y melaza como fuente de carbono. Para la fermentación se usó un fermentador de fabricación propia, usando un envase de plástico de 2 L, al cual se le adaptó una manguera de plástico, por medio de la cual se tomaba las muestras líquidas durante el proceso de fermentación. Para la caracterización fisicoquímica se empleó un Espectrómetro FTIR marca Shimadzu modelo FTIR 8300, estufa (Oven SO-030), una mufla (Thermolyne). Para evaluar los minerales se usó un Espectrofotómetro de emisión de plasma acoplado a un espectrómetro de masas (ICP-MS) (Agilent Technologies 7500). Para la desmineralización los desechos de caparazones de crustáceos provenientes de la planta procesadora (Promarca) se recolectaron 8 kg de desechos al azar.

2.2. Métodos

Obtención de quitina con HCl: Los desechos de cangrejos se molieron en el molino industrial (Acerinox) a un tamaño promedio de 10 cm, para posteriormente desproteinizarlos, colocando los desechos de crustáceos luego en un reactor de 10,3 m³ en el cual se trataron con una solución de NaOH en una relación 1:1 (m/v) y sulfito de sodio como agente antioxidante, para evitar la degradación del material. Luego se calentó a 100-110 °C, para disolver las proteínas. Se procedió a lavar repetidas veces con abundante agua destilada, se secaron los desechos a temperatura ambiente por 24 horas. Los desproteinizados obtenidos se trataron con una solución de HCl a temperatura ambiente, variando la concentración y tiempos de reacción, los desechos desmineralizados se secaron al sol para decolorarlos y así obtener la quitina. La quitina obtenida se lavó con abundante agua, hasta un pH cercano a 7 (Beany y col., 2005).

2.2.1. Obtención de quitina con ácido láctico proveniente de fermentación láctica

El proceso de fermentación se llevó a cabo en un fermentador, donde se depositaron los desechos triturados y el suero de leche enriquecido con azúcar al 5% m/v, 10% m/v y 15% m/v en proporción 1:2; con melaza al 5% v/v, 10%v/v en la misma proporción, estas mismas concentraciones se llevaron a cabo para evaluar la capacidad desmineralizante del ácido láctico pero partiendo de conchas de cangrejo desproteinizadas. La fermentación por lote se

realizó por un periodo de 2 y 3 semanas a temperatura ambiente. Cada 24 horas la mezcla fue agitada por lapsos de tiempos de 10 a 30 min. Seguidamente fueron tomadas alícuotas de 50 mL del licor cada 24 horas. El licor recolectado del fermentador permitió evaluar la remoción de minerales provenientes del caparazón de crustáceos durante la fermentación láctica (Marcia y col., 2011). Al final del proceso la quitina obtenida se lavó con abundante agua y se secó al sol por 24 horas para decolorarlas.

2.3. Análisis químico de las muestras

El análisis químico del licor recolectado del fermentador permitió evaluar el aumento de la concentración de ácido láctico en el sistema y la remoción de minerales provenientes del caparazón de crustáceos durante la fermentación láctica.

2.3.1. Determinación del porcentaje de acidez total titulable (% ATT)

Se colocaron 2 mL del licor-muestra, 50 mL de agua destilada y 5 gotas de fenolftaleína en un matraz Erlenmeyer de 125 mL. La muestra se tituló con una solución estandarizada de NaOH 0,1 M.

2.3.2. Determinación de Minerales

Se realizó en muestras sólidas, antes y después del proceso de obtención de quitina, y en líquidas antes, durante y al final del proceso de fermentación por (ICP-MS). Las muestras se trataron de la siguiente manera: Para las muestras sólidas se pesaron 0,1 g de muestra sólidas en cápsulas de teflón, luego se les añadió 3 mL de ácido nítrico (HNO_3) y 3 mL de agua, se colocaron en bombas de digestión y se llevaron a estufa a una temperatura entre 105-110 °C por 2 horas, al final se llevó a un volumen de 25 mL con agua desionizada. Para las muestras líquidas se colocaron 3 mL de muestra en capsulas de teflón, adicionando 1 mL de HNO_3 , colocándose en bombas de digestión y llevando a estufa a una temperatura de entre 105-110 °C por 2 horas, luego se enraso a 25 mL.

2.3.3. Caracterización fisicoquímica de las quitinas obtenidas

El contenido total de cenizas se determinó por el Método Oficial de Análisis Químico (AOAC) (Escorcia y col., 2009). Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) Los espectros de quitina se tomaron elaborando pastillas de bromuro de potasio (KBr) mezclando 2 mg de quitina con 148 mg de KBr seco. Las pastillas fueron medidas en un intervalo de 400-4000 cm^{-1} .

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción de Quitina Utilizando Ácido Láctico

Para la desproteinización de los desechos de cangrejos, se trataron las conchas de cangrejo con diluciones 0,5; 1,5; 2,5 M de NaOH a altas temperaturas (110-115 °C) en diferentes tiempos de reacción de 0,5; 1,0; 1,5 horas, alcanzando a desnaturalizar la proteína, esto es debido a que el NaOH rompe los enlaces de hidrógenos que mantienen las moléculas de las proteínas unidas, logrando que se separen y dispersen en la solución. La adición de Na₂SO₃ como antioxidante evita las rupturas de la unión 1-4 glicosídica de las cadenas poliméricas de la quitina, lo cual llevaría a la disminución del peso molecular de la misma. Como se puede apreciar en la **Tabla 1** para las distintas concentraciones de NaOH a medida que aumenta el tiempo de reacción hay en promedio un aumento de 8,5% de la concentración de proteínas, es decir que el aumento en la recuperación de proteínas con la concentración es solo 8,5%. Esto industrialmente no es significativo y eleva los costos de NaOH y también energía. Para una concentración de 0,5 M y un tiempo de reacción de 0,5 horas ya se ha recuperado el 92% de las proteínas siendo más aceptable y económico.

Tabla 1. Desproteinización del caparazón de cangrejo a distintas concentraciones de álcali y tiempos de reacción.

Concentración de NaOH (M)	Tiempo de reacción (H)	Concentración de proteínas (µg/mL)
0,5	0,5	4,33±23
	1,0	4,66±32
	1,5	4,72±29
1,5	0,5	4,47±28
	1,0	4,67±31
	1,5	4,86±27
2,5	0,5	4,51±32
	1,0	4,69±29
	1,5	4,99±33

Desmineralización con HCl: En este procedimiento ocurre la remoción de sales de carbonato de calcio (CaCO₃) y fosfato de calcio (Ca₃(PO₄)₂) y otros minerales presentes en los caparazones. En la **Tabla 2** se presentan los resultados obtenidos de la remoción de minerales del caparazón de cangrejo en tiempos de reacción y concentración de HCl distintos.

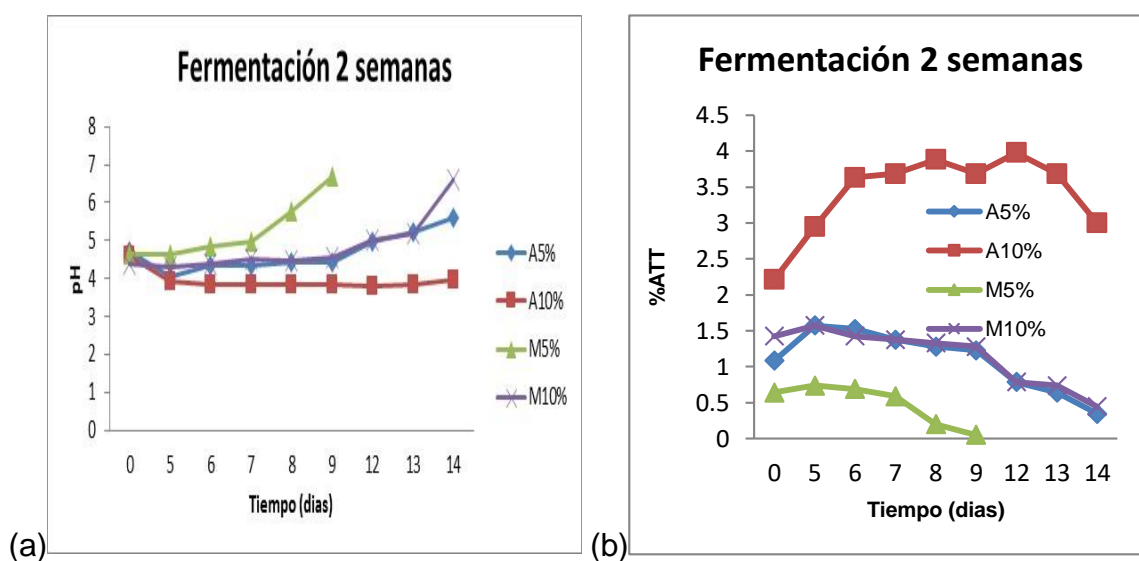
En la **Tabla 2** puede observarse que a medida que el tiempo de reacción se incrementa la concentración de minerales en solución, aumenta ligeramente en un 2% aproximadamente. Esto no es significativo por lo que sería suficiente 1 hora para la desmineralización. Con respecto a la concentración se puede apreciar que se incrementa la extracción de minerales cuando se pasa de una concentración de 1 M a 2 M es decir que para una concentración de HCl de 2 M y un tiempo de 2 horas es suficiente para una buena remoción.

Tabla 2. Remoción de minerales usando HCl a distintas concentraciones y tiempos de reacción.

Concentración HCl (M)	Tiempo (H)	Ca (mg/kg)	Mg (mg/kg)	K (mg/kg)
1	1	95,7	3.513,5	25,0
	2	98,5	3.659,0	25,8
2	1	150,2	3.854,5	55,0
	2	153,6	3.881,0	56,0

Extracción de quitina usando fermentación láctica: En el método biológico, la función de desproteínizar y desmineralizar el material están a cargo de las bacterias (*Lactobacillus*) a través de la fermentación ácido láctica, la cual causa una reducción gradual del pH y un aumento de la acidez total titulable (Duran y col., 1997). Los azúcares como lactosa, glucosa y aminoácidos presentes, sirven como fuente de energía para que las bacterias ácido lácticas puedan producir ácido láctico, el cual actuará sobre los caparazones de cangrejos (Parra 2010).

En los gráficos de la **Figura 2** se presenta el comportamiento del pH (a) y % ATT (b), que puede ser expresado como porcentaje de ácido láctico, en función del tiempo de fermentación ácido láctica en un periodo de 2 semanas para las distintas muestras. Se puede observar (**Figura 2a**) como a medida que transcurre el tiempo de fermentación fue decreciendo el pH en la muestra de A 10%, de un pH inicial del suero de 4,60 a un pH final de 3,98.

**Figura 2.** Variación del pH y el porcentaje de acidez total titulable durante la fermentación a las 2 semanas (a) pH y (b) % ATT (A: Azúcar M: Melaza).

Extracción de Quitina Utilizando Ácido Láctico

En la **Figura 2b**, se aprecia claramente como para la misma muestra el porcentaje de acidez total titulable aumenta y el cual puede ser expresado como porcentaje de ácido láctico, este comportamiento es el resultado de la producción metabólica de ácido láctico a partir de la fuente de carbono (Araujo y col., 2009), indicando un adecuado crecimiento de las bacterias lácticas presentes y una consecuente producción de ácido láctico a partir de la fuente de carbono (Cira y col., 2002).

En el proceso metabólico primeramente ocurre una separación de la sacarosa en glucosa y fructosa, y la lactosa en glucosa y galactosa. En la glucólisis, la glucosa se oxida para formar el ácido pirúvico, seguidamente por fermentación láctica este es transformado en ácido láctico (**Figura 3**) (Shirai y col., 2001).

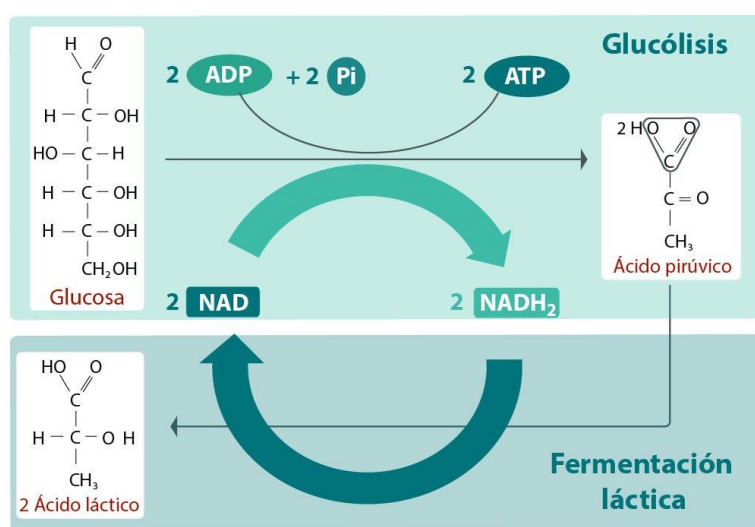


Figura 3. Producción metabólica de ácido láctico por fermentación láctica (Shirai y col., 2001).

La concentración de la fuente de carbono juega un papel importante en el crecimiento adecuado de las bacterias lácticas. Se ha encontrado en la literatura una concentración óptima para el adecuado crecimiento de las bacterias de un 10% de sacarosa, lo cual concuerda con los resultados mostrados en la **Figura 2**, donde también se observa que para la misma fuente de carbono (azúcar) a una menor concentración no se apreció una disminución del pH. Por tanto una concentración de 5% m/v de azúcar, no es suficiente fuente de energía para el adecuado crecimiento de las bacterias generadoras del ácido láctico. Por otro lado a una concentración mayor, es decir, 15 % m/v al transcurrir 3 días de fermentación el sistema se coaguló por completo formando una masa dentro del fermentador, esto se debe a la baja cantidad de agua en el sistema debido a la alta concentración de azúcar en el mismo, causando una posible putrefacción debido a la competencia de los organismos de descomposición con las bacterias lácticas por el azúcar metabolizable (Araujo y col., 2009).

Con respecto al uso de melaza como fuente de carbono para el crecimiento de las bacterias se puede determinar claramente según los resultados mostrados en la **Figura 2**, que la melaza no aporta a las bacterias la energía suficiente para su crecimiento debido a que en ningún momento de la fermentación ocurre un descenso del pH por tanto no hay una buena producción de ácido láctico, este comportamiento se puede atribuir a la concentración de azúcares metabolizables en la melaza que es aproximadamente 65% (Shirai y col., 2001). Al finalizar el tiempo de fermentación en el periodo de 2 semanas se observó que la muestra de A 5% donde no ocurrió una adecuada reducción de pH, mostrando las conchas de cangrejo algunas partes blandas y otras duras además de un olor desagradable, la condición de pH bajo reduce el crecimiento de bacterias o microorganismos, como las *Pseudomonas*, ya que promueven la putrefacción de los desechos de cangrejo (Shirai y col., 2001). Al no presentar un pH bajo las condiciones se optimizan para una putrefacción de los caparazones en el sistema. Para los caparazones donde se utilizó melaza como fuente de carbono, estos tomaron el color marrón característico de la misma; al tacto las conchas estaban más duras y el olor desagradable más acentuado en el líquido al finalizar la fermentación, incluso la menor concentración de melaza no completo las 2 semanas de estudio. Sin embargo, para la muestra donde se usó un 10% de azúcar m/v el licor al finalizar el proceso presento un color rojizo, con un olor ligeramente ácido pero a la vez dulce generado por la condición de bajo pH ayudando a conservar el licor. Las conchas de cangrejo estaban blandas con algunas zonas endurecidas, indicando una buena remoción de minerales por parte del ácido láctico producido. En los gráficos de la **Figura 4** se presenta el comportamiento del pH 4 (a) y % ATT 4 (b), que puede ser expresado como porcentaje de ácido láctico, en función del tiempo de fermentación ácido láctica en un periodo de 3 semanas para la muestra de 10% de concentración de azúcar.

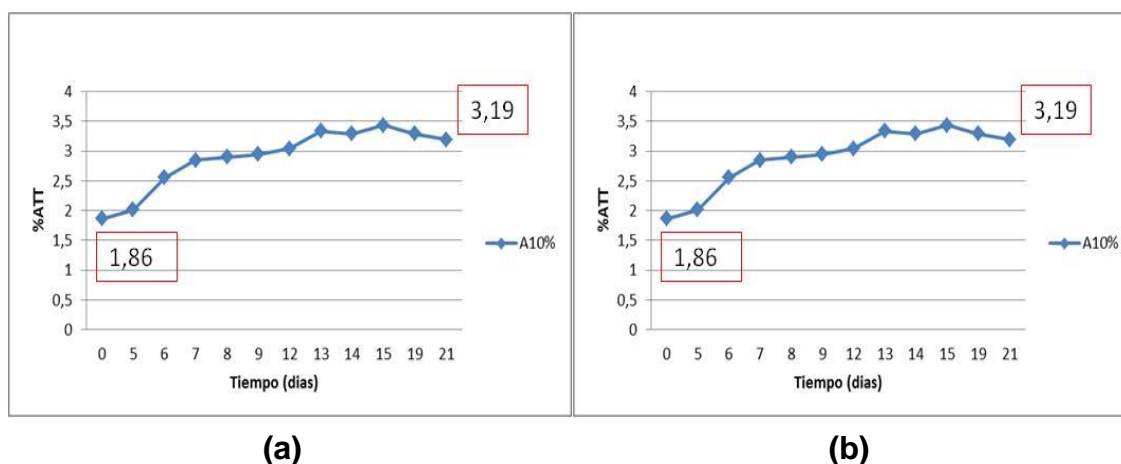


Figura 4. Variación del pH y el porcentaje de acidez total titulable durante la fermentación a las 3 semanas (a) pH y (b) % ATT (A: Azúcar M: Melaza)

Extracción de Quitina Utilizando Ácido Láctico

En el periodo de fermentación de 3 semanas solo la muestra de azúcar al 10% m/v se pudo mantener durante el tiempo del estudio en el cual se observa que al igual que para el tiempo de 2 semanas la muestra presenta disminución del pH en la **Figura 5 (a)**, de pH inicial de 4,66 a un pH final de 3,92 aumentando el % ATT de 1,86 a final de 3,19 en la **Figura 5 (b)**; con estos resultados se determina claramente que la concentración adecuada para el crecimiento de las bacterias lácticas y obtener una buena producción de ácido láctico es de 10% m/v de azúcar.

En el periodo de fermentación de 3 semanas se pudo apreciar que el licor al finalizar el proceso presentó un color rojizo indicando remoción de pigmentos asociados a la quitina en el caparazón cangrejo, con un olor ligeramente ácido pero a la vez dulce, las conchas de cangrejo estaban blandas en su totalidad, indicando una buena remoción de minerales por parte del ácido láctico producido. Al finalizar los estudios de 2 y 3 semanas se observó que las conchas presentaban restos de proteínas. Para remover dichas proteínas de la quitina obtenida las conchas se lavaron con abundante agua y se secaron al sol por 24 horas. El proceso de desproteínezación en la fermentación es realizada por las enzimas peptidasas, que están presentes de manera natural en el crustáceo. Dichas enzimas actúan rompiendo los enlaces peptídicos de las proteínas (Marcia y col., 2009).

Fermentación usando conchas desproteínezadas (CD): Para evaluar la capacidad desmineralizante del ácido láctico sobre los caparazones de cangrejos se colocaron en el fermentador conchas previamente desproteínezadas con suero enriquecido con la misma fuente de carbono y las concentraciones usadas anteriormente. En la **Figura 5** se presentan los gráficos de los resultados obtenidos de la fermentación durante un periodo de 3 semanas de conchas desproteínezadas.

En los gráficos mostrados en la **Figura 5 (a)** se aprecia claramente que en ningunas de las concentraciones usadas para las fuentes de carbono se evidencia un descenso de pH, solo para la concentración de A 10 % m/v se observó que durante las primeras dos semanas se mantuvo el pH casi estable, posteriormente en la tercera semana de fermentación el pH aumentó. En la **Figura 5 (b)** se encontró que no hubo un aumento del porcentaje de acidez total titulable que representa el porcentaje de ácido láctico en el sistema. Las bacterias ácido lácticas para su adecuado crecimiento requieren de azúcares como glucosa y lactosa, además de aminoácidos, vitaminas y otros factores de crecimiento. Al usar conchas desproteínezadas se priva de aminoácidos a las bacterias. Debido a esto no se observa aumento del ácido láctico en el proceso de fermentación, para la muestra de A 10 % m/v se mantuvo constante el pH, indicando que no solamente es indispensable una concentración

adecuada de azúcar sino también la presencia de proteínas para promover eficazmente el crecimiento de bacterias lácticas y así la producción de ácido láctico durante la fermentación.

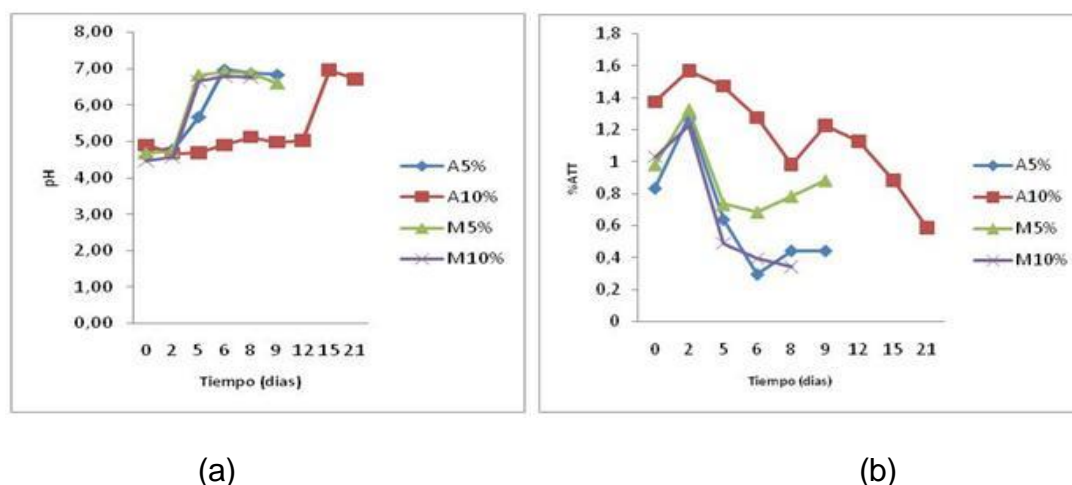


Figura 5. Variación del pH y el porcentaje de acidez total titulable durante la fermentación a las 3 semanas para cáscara previamente desproteinizadas (a) pH y (b) % ATT (A: Azúcar M: Melaza).

Al finalizar la fermentación en los periodos respectivos de 2 y 3 semanas se analizó la cantidad de minerales presentes en las quitinas obtenidas y en el licor de fermentación.

En la **Tabla 3** se presentan los resultados obtenidos para los minerales presentes en las quitinas obtenidas al final de cada proceso, donde se puede ver la concentración de magnesio (Mg), potasio (K) y calcio (Ca) encontrados en la concha sin ningún tipo de tratamiento, mostrando una concentración de 44,45 mg/L del Mg; 23,23 mg/L de K y 896,42 mg/L de Ca.

Tabla 3 Concentración de minerales en las quitinas obtenidas.

Muestra	Día	Mg (mg/L)	K (mg/L)	Ca (mg/L)
Caparazón de cangrejo sin tratar	-	44,45	23,38	896,42
A 5%	14	6,24	7,07	265,78
A 10%	14	4,39	6,15	219,98
	21	1,50	1,02	64,36
M 5%	12	10,91	10,40	413,20
M 10%	14	6,32	9,37	356,10
HCl	-	1,22	0,71	9,70

Se puede observar, que la quitina obtenida mediante tratamiento químico presenta la menor cantidad de minerales asociados, alcanzando un alto porcentaje de remoción, de 97,24% para el Mg, 96,93% para K y un 98,92% de Ca. Por otro lado en el proceso biológico, en las

Extracción de Quitina Utilizando Ácido Láctico

quitinas obtenidas en la muestra A 10% la concentración de los minerales en los sólidos es menor que para el resto de las muestras, corroborando así la concentración de 10% de azúcar como óptima para la formación de ácido láctico. En la fermentación llevada a cabo en 3 semanas se alcanzó un 96,62% de remoción del Mg; un 95,62% de remoción de K y un 92,82% de Ca la fermentación en un tiempo de 2 semanas alcanzó porcentajes de remoción de 90,10%; 73,67%; 75,46% respectivamente. Se pudo observar, que al extender el tiempo de fermentación de 2 a 3 semanas la cantidad de mineral que queda en la concha es mucho menor, indicando un mayor porcentaje de remoción de minerales. El ácido láctico formado mediante la fermentación, reacciona con los minerales asociados a la quitina en el caparazón de crustáceos, formando lactatos del mineral y logrando la desmineralización. En la **Tabla 4** se presentan los resultados obtenidos de la remoción de minerales del caparazón de crustáceos al licor producido.

Claramente los datos experimentales muestran que hubo un aumento en la concentración de minerales en el suero (día 0) al licor a finalizar la fermentación. En la desmineralización, 2 moléculas de ácido láctico reaccionan con una molécula del mineral permitiendo formación al lactato.

Tomando en cuenta que el calcio es el mineral más abundante asociado a la quitina en el caparazón se tiene:

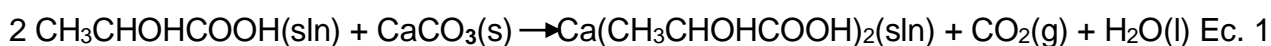


Tabla 4. Determinación de minerales en el líquido de fermentación.

Muestras	Día	Mg (mg/L)	K (mg/L)	Ca (mg/L)
Suero	0	2,33	4,00	61,35
A 5%	14	28,56	16,92	484,52
A10%	14	32,63	26,12	679,32
	21	38,56	40,23	768,02
M 5%	7	38,29	143,54	478,74
M 10%	14	38,78	160,73	438,84

Los lactatos producidos pueden ser recuperados del sistema, para su utilización en la industria de alimentos. En la tabla anterior, se puede ver para las muestras donde se usó melaza como fuente de carbono la concentración de magnesio y potasio en el licor al finalizar es muy elevado, debido a la concentración de estos minerales en la melaza. El contenido de

cenizas es un indicador de la efectividad del proceso de desmineralización debido a la eliminación de los minerales presentes, constituidos principalmente por carbonato de calcio (CaCO_3) y fosfato de calcio en menor proporción.

En la **Tabla 5** se aprecia con el ácido clorhídrico a 2 M y un tiempo de reacción de 50 minutos se presentó un contenido de cenizas de 1,99%, el cual está dentro del intervalo aceptado para este producto ($\leq 2\%$) grado alimenticio especificado por varias casas fabricantes.

Tabla 5. Porcentaje de cenizas de las quitinas obtenidas desmineralizadas con HCl

Concentración (M)	Tiempo (min)	Ceniza (%)
1	30	4,48
	40	4,46
	50	4,00
2	30	2,48
	40	2,09
	50	1,99
3	30	1,98
	40	1,97
	50	1,97

Este tratamiento se considera el más efectivo para la remoción de minerales, ya que la desmineralización se debe evitar altas concentraciones de ácido por la posibilidad de la degradación de la quitina.

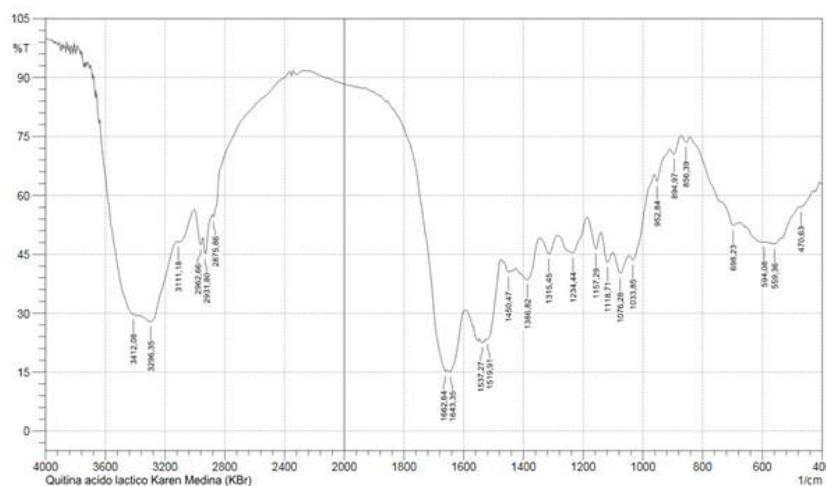
En la **Tabla 6**, se evidencia claramente que para la concentración de A 10% se obtuvo muy buena desmineralización debido a que la quitina obtenida presentó un bajo contenido de ceniza 2,68 %, un valor bastante cercano al aceptado. De acuerdo a los valores mostrados la eficiencia de la remoción de calcio en el proceso biológico depende grandemente de la cantidad de fuente de carbono añadido.

Tabla 6. Variación de las cenizas de las quitinas obtenidas partiendo de concha cruda (CC) y concha desproteínizada (CD).

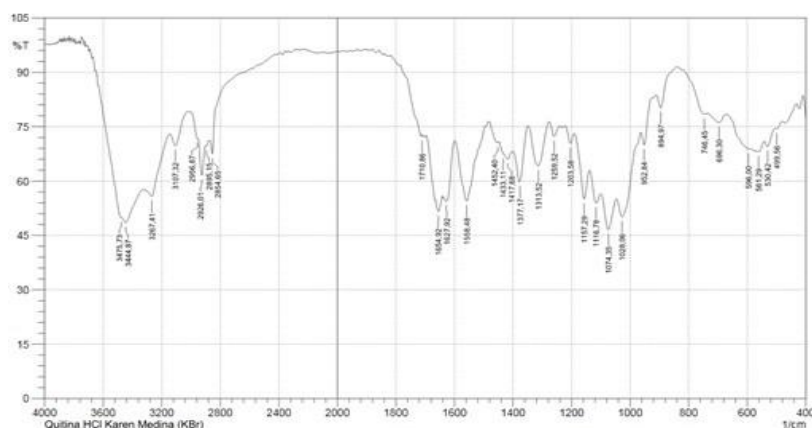
Muestra	Ceniza CC (%)	Ceniza CD (%)
A 5%	14,65	64,68
A10%	2,68	49,03
M 5%	41,16	69,40
M 10%	18,89	50,42

Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR): En la **Figura 6a** se muestra el espectro de infrarrojo de la quitina obtenida con ácido láctico en un periodo de fermentación de 3 semanas, revelando la presencia de grupos hidroxilo (-OH) que pertenecen a una vibración a $3600\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$, la banda a los 3296 cm^{-1} corresponde a la tensión del grupo N-H, mientras que la banda a los 2931 cm^{-1} corresponde a una vibración tensión del grupo C-H, se aprecian las bandas de la amida I y II cerca de los 1650 y 1550 cm^{-1} correspondientes a la quitina.

En la **Figura 6b** se aprecia el espectro de infrarrojo de la quitina extraída con previa desmineralización con ácido clorhídrico. Se puede ver la señal de vibración -OH a 3475 cm^{-1} , la banda a los 3267 cm^{-1} corresponde a la tensión del grupo N-H, mientras que la banda a los 2926 cm^{-1} cm corresponde a una vibración tensión del grupo C-H, se aprecian las bandas de la amida I y II cerca de los 1650 y 1550 cm^{-1} correspondientes a la quitina.



6(a)



6(b)

Figura 6 (a y b): 6a. Espectro FTIR de quitina obtenida con ácido láctico. 6b Espectro FTIR de quitina obtenida con ácido clorhídrico.

4. CONCLUSIONES

El azúcar resultó ser efectiva como fuente de carbono en vez de la melaza para el adecuado crecimiento de las bacterias ácido lácticas y la producción de ácido láctico, evidenciando un descenso del pH y un aumento del %ATT.

La fermentación láctica depende grandemente de la fuente de carbono y de la concentración de la misma para obtener quitina. Al incrementar el tiempo de fermentación de 2 a 3 semanas se incrementa la remoción de minerales en la concha dando un 2,68% de porcentaje de ceniza en la quitina obtenida. La obtención de quitina empleando fermentación láctica usando CD no presentó buenos resultados, ya que no evidencian descenso de pH ni aumento del %ATT.

La concentración óptima para la adecuada producción de ácido láctico vía fermentativa es el enriquecimiento del suero lácteo con azúcar 10 % m/v permitiendo la recuperación de productos de valor agregado.

Teniendo en cuenta los resultados mostrados anteriormente, la ventaja principal que tiene el tratamiento químico es el tiempo de reacción para obtener quitina, que es más corto en comparación con el método biológico o fermentación. Sin embargo, la extracción de quitina por fermentación láctica muestra como ventaja un mayor manejo de desechos (suero lácteo y conchas de cangrejo), aunque el tiempo de extracción del producto final es más largo que con tratamiento químico, presenta bajos costos, además de ser amigable al medio ambiente y en el cual no solamente se puede obtener quitina, sino lactato de calcio que puede ser recuperado y posteriormente usado en la industria de alimentos para la fortificación de bebidas.

Debido a que los problemas ambientales han ido aumentando con el desarrollo de la tecnología, esta investigación arrojó resultados que contribuyen al manejo de desechos para la elaboración de productos de alto valor agregado resultando ser más económico y amigable al medio ambiente.

5. REFERENCIAS

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists) 1990. Official Methods of Analysis, Methods 923.03 Cenizas, 16th Edition, USA, 4:40-42.
- Araujo, A; Costa, L; Muniz, E; Nascimento, A; Lourenço, L; Bergamasco, R. (2009). "Fermentacion de residuos de cangrejo y camaron para la obtención de quitinasas en medio sólido". Nucleo de Engenharia de Alimento Campus Univertitario de São Cristóvão, São Cristóvão- Brazil. 1-4.

Extracción de Quitina Utilizando Ácido Láctico

- Araya, C; Rojas, C; Velásquez, C. (2010). "Síntesis de ácido láctico, a través de la hidrólisis enzimática simultánea a la fermentación de un medio a base de un desecho de piña (Ananas Comosus), para sus uso como materia prima en la elaboración de ácido poliláctico". Revista Iberoamericana de Polímeros 11 (7): 407-416.
- Ayala, A.; Colina, M.; Molina, J.; Vargas, J.; Rincón, D.; Medina, J.; Rosales, L.; Cárdenas, H. (2014). "Evaluación de la actividad antifúngica del quitosano contra el hongo *Mycosphaerella Fijensis* Morelet que produce la Sigatoca negra que ataca el plátano". Revista Iberoamericana de polímeros 15 (6): 312-338.
- Beany, P.; Lizardi, J.; Healy, M. (2005). "Comparison of chitins produced by chemical and bioprocessing methods". Journal of Chemical Technology and Biotechnology 80 (2): 145-150.
- Belandria, J.; Morillo, N. (2008). "Recuperación de quitina a partir de los residuos sólidos generados del procesamiento industrial de crustáceos". Revista Cubana de Química XX (3): 17-26.
- Carrilo, J. (2006). "Tratamiento y reutilización del suero de leche". http://www.lactodata.com/lactodata/docs/lib/jose_luis_carrillo_tratamiento_reutilizacion_2002.pdf, consultada el 2-2-2015.
- Cira, L.; Huerta, S.; Shirai, K. (2002). "Fermentación láctica de cabezas de camarón (*Penaus* sp) en un reactor de fermentación sólida". Revista Mexicana de Ingeniería Química 1: 45-48.
- Colina, M.; Ayala, A.; Rincón, D.; Molina, J.; Medina, J.; Ynciarte, R.; Vargas, J.; Montilla, B. (2014). "Evaluación de los procesos para la obtención química de quitina y quitosano a partir de desechos de cangrejos. Escala piloto e Industrial". Revista Iberoamericana de Polímeros 15 (1): 21-43.
- Crini, G. (2005). "Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment". Progress in Polymer Science 30(1): 38-70.
- Duarte, M.; Ferreira, M.; Marvao, M.; Rocha, J. (2002). "An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR Spectroscopy". International Journal of Biological Macromolecules 31: 1-8.
- Duran, C.; Romero, C.; García, P.; Brenes, M. (1997). "Bacterias del ácido láctico en la fermentación de aceitunas de mesa". Grasas y aceites 48 (5): 297-311.
- Escorcía, D.; Hernández, D.; Sánchez, M.; Benavente, M. (2009). "Diseño y montaje de una planta piloto para la extracción de quitina y proteínas". Revista científica Nexo 22 (2): 45-55.
- Estela, W.; Rychtera, M.; Melzoch, K.; Quillama, E.; Egoavil, E. (2007). "Producción de ácido láctico por *Lactobacillus Plantarum* L10 en cultivos batch y continuo". Revista Peruana de Biología 14 (2): 271-275.
- Gil, R.; Dominguez, A. (2007). "Bioproducción de ácido láctico a partir de residuos de cascara de naranja: proceso de separación y purificación". Revista Tecnología, Ciencia y Educación 23 (2): 79-90.
- González, B.; Gómez, M.; Jiménez, Z. (2003). "Bacterias de prebióticos". Revista Salud Publica y Nutrición Vol. 4.
- Hernandez, H.; Águia, E.; Flores, O.; Viveros, E.; Ramos, E. (2009). "Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón". Superficies y Vacío 22 (3): 57-60.
- Jakymec, M.; Moran, H.; Páez, G.; Ferrer, J.; Mármol, Z.; Ramones, E. (2001). "Cinética de la producción de ácido láctico por la fermentación sumergida con lactosuero como sustrato". Revista Científica FCV-LUZ XI (1): 53-59.

- Juárez, C. (2010). "Estudio de uso de enzimas comerciales en la preparación de quitina a partir de desperdicios de camarón". Trabajo de Grado, Especialización en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, pp 1-10.
- Larez, C. (2003). "Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos". *Revista Iberoamericana de Polímeros* 4 (2): 91-109.
- Larez, C. (2006). "Quitina y quitosano: materiales del pasado presente y el futuro". *Avances en Química* 1 (2): 15-21.
- López, C. (2009). "Extracción de quitina del exoesqueleto del camarón blanco, para la obtención de quitosano utilizada como preservante de alimentos", Manta- Ecuador. pp 12-13.
- Marcia, E.; Malespín, J.; Sánchez, M.; Benavente, M. (2011). "Estudio de la fermentación láctica para la obtención de quitina a partir de desechos de crustáceos", Managua Nicaragua. pp 34,35.
- Mármol, Z.; Cardozo, J.; Carrasquero, S.; Páez, G.; Chandler, C.; Araujo, K.; Rincón, M. (2009). "Evaluación de polifenoles totales en vino blanco tratado con quitina". *Revista Facultad de Agronomía (LUZ)* 26: 423-442.
- Parada, L.; Crespín, G.; Miranda, R.; Katime, I. (2004). "Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar y valoración potencio métrica". *Revista iberoamericana de Polímeros* 5: 1.
- Parra, R. (2009). "Lactosuero: importancia en la industria de alimentos". *Revista facultad nacional de agronomía Medellín* 62 (1): 4967-4982.
- Parra, R. (2010). "Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos". *Facultad de Ciencias agropecuarias* 8 (1): 93-105.
- Percot, A.; Viton, C.; Domard, A. (2003). "Optimization of chitin extraction from shrimp shells". *Biomacromolecules* 4 (1): 12-18.
- Perentena, L.; González, C.; Celis, B.; Valbuena, A.; Colina, M. (2015). "Síntesis de bases de SCHIFF derivadas del quitosano por reacción con p-dimetilaminobenzaldihido y 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehido". *Revista Iberoamericana de Polímeros* 16 (1): 1-27.
- Ramírez, J.; Rosas, P.; Velásquez, M.; Ulloa, J.; Arce, F. (2011). "Bacterias lácticas importancia en los alimentos y sus efectos en la salud". *Revista Fuente* 2: 7.
- Rinaudo, M. (2006). "Chitin and chitosan: Properties and applications". *Progree in Polymer Science* 31: 603-632.
- Serna, L.; Rodríguez, A. (2005). "Producción biotecnológica de ácido láctico: Estado del arte". *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 5 (1): 54-65.
- Serna, L.; Rodríguez, A. (2007). "Producción económica de ácido láctico utilizando residuos de cosecha y jugo de caña de azúcar". *Revista Agricultura Técnica* 67 (1): 29-38.
- Shirai, K.; Guerrero, I.; Huerta, S.; Saucedo, G.; Castillo, A.; Gonzalez, R.; Hall, G. (2001). "Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation". *Enzyme and Microbial Technology* 28: 446-452.
- Urribarri, L.; Vielma, A.; Páez, G.; Ferrer, J.; Mármol, Z.; Ramones, E. (2004). "Producción de ácido láctico a partir de suero de leche utilizando *Lactobacillus helveticus* en cultivo continuo". *Revista científica FCV-LUZ XIV* (4): 297-302.
- Vásquez, S.; Suarez, H.; Zapata, S. (2009). "Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne". *Revista Chilena de Nutrición* 36 (1): 64-71.