

OBTENCIÓN DE QUITINA A PARTIR DEL ENDOESQUELETO DE POTA (*DOSIDICUS GIGAS*) POR DESMINERALIZACIÓN QUÍMICA Y DESPROTEINIZACIÓN BACTERIANA

EXTRACTION OF CHITIN FROM GIANT SQUID (*DOSIDICUS GIGAS*) ENDOSKELETON USING CHEMICAL DEMINERALIZATION AND BACTERIAN DEPROTEINIZATION

Linda Rocío Moya María Estela Ayala

Dirección de Investigaciones. Instituto Tecnológico Pesquero del Perú

Carretera a Ventanilla, km 5,200 Callao. mestela@itp.org.pe

RESUMEN

MOYA LR, AYALA ME. 2006.- Obtención de quitina a partir del endoesqueleto de "pota" (*Dosidicus gigas*) por desmineralización química y desproteínización bacteriana. *Bol invest Inst. tecnol. Pesq. Perú.* 7: 49-55.- Se obtuvo quitina a partir de plumas de calamar gigante o pota (*Dosidicus gigas*), mediante un proceso combinado de desmineralización química, utilizando HCl 1N y 2N, durante 3, 5 y 7 horas; y desproteínización microbiológica, utilizando la bacteria *Serratia marcescens*. La remoción de minerales más eficiente (99,21%) fue obtenida con la mayor concentración de ácido 2N durante 3 horas. La desproteínización más eficiente ocurrió utilizando un inóculo de $2,7 \times 10^{10}$ UFC/mL incubando a 35 °C durante 9 días. El bajo contenido de grasa y la carencia de pigmentos, son características de la muestra que constituyen una ventaja para la extracción de la quitina. Los resultados del estudio constituyen una alternativa de reducción del impacto ambiental procedente del procesamiento de pota.

PALABRAS CLAVE: *Dosidicus gigas*, calamar gigante, pota, quitina, quitosana, *Serratia marcescens*, desmineralización, desproteínización.

ABSTRACT

MOYA LR, AYALA ME. 2006. *Extraction of chitin from "giant squid" (Dosidicus gigas) endoskeleton using chemical demineralization and bacterian deproteinization* *Bol. invest. Inst. tecnol. pesq. Perú.* 7: 49-55.- Chitin was extracted from squid skeleton pens of giant squid (*Dosidicus gigas*) by means of a combined process: chemical demineralization using 1N and 2N HCl treatments for 3, 5 and 7 hours; and microbiologic deproteinization with the bacterium *Serratia marcescens*. The major efficiency of minerals removal was 99,21% using the higher acid concentration for 3 hours. The most efficient deproteinization was obtained with $2,7 \times 10^{10}$ CFU/mL inocula incubated at 35 °C for 9 days. The low fat content and the absence of pigments in the sample are advantageous characteristics for the chitin extraction. The results offer an alternative for environmental impact reduction from the giant squid processing.

KEYWORDS: *Dosidicus gigas*, giant squid, chitin, chitosana, *Serratia marcescens*, demineralization, deproteinization.

INTRODUCCIÓN

La quitina es un polisacárido considerado como el más distribuido

en la naturaleza después de la celulosa. Puede ser obtenido de diversas fuentes naturales, principalmente de los exoesqueletos de insectos y crustáceos,

de los endoesqueletos de moluscos, así como de las paredes celulares de hongos. Está compuesto de unidades de N-acetilglucosamina (beta - 1, 4 acetamido-D-glucosa). Su importancia radica en las diversas ventajas que su uso ofrece: es biológicamente reproducible¹, biodegradable, no contamina el ambiente, es biocompatible con tejidos animales y vegetales, no es tóxico, es biológicamente funcional y puede ser modificado químicamente, lo cual permite ampliar sus posibilidades de aplicación².

Las propiedades funcionales de este polímero y de su derivado desacetilado, la quitosana, son aplicadas tanto en productos como en sistemas vivos⁴ y conocidas bajo diversas formas^{2,3}. En alimentos, las aplicaciones de quitina y quitosana ofrecen un amplio rango que incluyen la bioconversión, la preservación de alimentos del deterioro microbiano, la formación de películas biodegradables, la recuperación del material de descarte del procesamiento de alimentos y la clarificación de jugos de frutas, entre otros⁴.

Quitina y quitosana pueden ser obtenidas mediante hidrólisis química y enzimática, además de tratamientos utilizando microorganismos que poseen fuerte actividad proteásica, quitinolítica y de quitinasas; entre estos *Serratia marcescens* ha sido descrita como una bacteria psicrótrofa, con gran capacidad de producción de lipasas y proteasas, especialmente durante el almacenamiento refrigerado de alimentos.^{5,6}

El procesamiento industrial de quitina a partir de los residuos de crustáceos marinos⁷ se ve limitado por razones de estacionalidad del recurso y debido al daño ambiental por utilizar sustancias químicas en su extracción. Así, además

de despigmentar, en el caso de los caparazones de cangrejo se requiere de desmineralización intensa para eliminar el gran contenido de carbonatos, y al trabajar caparazones de camarones y langostinos, el elevado contenido de proteínas escleróticas determina prolongadas hidrólisis químicas para su remoción³. Comparativamente, la extracción de quitina a partir de los endoesqueletos o plumas de moluscos presenta ventajas, debido a que estas estructuras además de ser cartilaginosas y flexibles, presentan poca cantidad de carbonatos y contienen β -quitina, la cual es más suave y presenta características superiores de permeabilidad al vapor, absorción y retención de humedad que la α -quitina, típica de crustáceos⁹.

En nuestro mar, el calamar gigante o pota, *Dosidicus gigas*, es un recurso de amplia distribución y densas poblaciones⁸; sin embargo, a pesar de que ha adquirido considerable importancia económica, no es un recurso totalmente aprovechado, siendo sus partes no comestibles, como las vísceras y plumas, desechadas al ambiente y convertidas en grandes contaminantes de los lugares donde son vertidos.

Se considera que la obtención de quitina a partir de las plumas de pota es de importancia tecnológica y ecológica, por lo cual se informa sobre los resultados de un estudio inicial del polímero a partir de este sustrato. En el desarrollo del estudio se han combinado dos procedimientos: 1) una acción química para la desmineralización o la separación de minerales, y 2) el uso de bacterias, en este caso, *Serratia marcescens*, para la etapa de desproteinización, actividad microbiológica que a su vez minimiza el impacto ambiental de los tratamientos químicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las plumas de pota fueron obtenidas de especímenes capturados y procesados en el puerto de Paita. Su caracterización fue realizada mediante análisis proximal de acuerdo a lo recomendado por la FAO¹⁰.

Preparación de la muestra

Las plumas fueron inicialmente lavadas con agua potable para eliminar suciedad y mucosidad y colocadas en canastillas, para escurrir y ser sometidas a secado a temperatura ambiente. Una vez secas, estas muestras fueron partidas manualmente en tamaños de 3 a 5 cm para facilitar la molienda, que fue realizada en un molino Fuyukama Hiroshima (Food Processing Manufacturer) serie N° ST425. La muestra pulverizada ("harina") fue pasada a través de un tamiz N° 8 marca Retsch, obteniéndose tamaños de partículas de 0,3 a 0,5 mm.

Desmineralización.

Las variables evaluadas en esta primera etapa fueron dos: concentración de HCl y tiempo de tratamiento. Se trabajó tomando como referencia las metodologías aplicadas por CAÑIPA y col. (1999)¹¹ y GARCÍA ALONSO y col.¹². Para el efecto, se colocaron 20 g de harina en 8 matraces con capacidad de 500 mL; en 4 de ellos se agregó 200 mL de HCl 1N y en los otros 4, HCl 2N. La relación masa:volumen establecida fue 1:10 (w:v), los matraces fueron colocados en un equipo de baño María con agitación de 150 rpm, durante 1, 3, 5 y 7 horas, a temperatura ambiente (20 a 25 °C).

Las muestras fueron filtradas y lavadas con agua potable hasta la neutralidad. Se realizó un enjuague final utilizando agua desionizada, y las muestras se secaron

durante 2 horas en una estufa a 80 °C con circulación de aire caliente y se pasaron a través de un tamiz (poro de diámetro 0,1 mm). El grado de desmineralización fue evaluado analizando el contenido de cenizas y cuantificando los minerales calcio, magnesio, potasio y sodio¹³.

Desproteínización

En esta etapa fue utilizada una cepa de la bacteria *Serratia marcescens*, la cual fue aislada e identificada¹⁴ de anchoveta congelada. Esta bacteria fue conservada en agar TSA (Tripticasa Soya), y reactivada en caldo BHI (cerebro corazón). Se evaluaron: la cantidad de inóculo, el tiempo y el grado de desproteínización.

Matraces conteniendo 5 g de muestra desmineralizada y 100 mL de medio basal (K_2HPO_4 1g, $MgSO_4$ 0,2 g, $FeSO_4$ 0,05 g, $CaCl_2$ 0,02 g para 1 L de agua destilada) fueron sometidos a esterilización a 121 °C por 15 minutos. Los inóculos agregados fueron 1 y 10 mL del cultivo, además de un blanco. Las condiciones de incubación fueron 35 °C durante 9 días. El inóculo agregado fue estandarizado y las lecturas de recuentos durante la incubación fueron realizadas midiendo la turbidez en el caldo de crecimiento (Butterfield), de tal forma que a 580 nm se obtenía una lectura espectrofotométrica entre 50 y 80% de transmitancia¹⁴.

La evaluación del grado de desproteínización fue realizada durante el lapso de incubación, correlacionando el crecimiento de la cepa en el medio de cultivo, con la solubilidad de la muestra en ácido fórmico y su contenido de nitrógeno proteico. Los recuentos fueron determinados mediante la metodología de prevertido en agar estándar de unidades formadoras de colonias UFC/mL¹⁴. La disolución de la muestra en ácido

fórmico fue realizada en una proporción 1:10 (w:v)^{3,4,5,6,16} y para la cuantificación de nitrógeno según KJELDAHL¹⁵, se tomó en cuenta el contenido de nitrógeno proteico en quitina (referido como 6,9%^{1,6,11,20}).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición proximal de la materia prima

La composición proximal de la materia prima en base seca fue 12,50% nitrógeno total, 5,08% cenizas; la cantidad de grasa fue escasa, 0,07%, lo cual resulta una ventaja para el proceso de extracción en términos económicos y de menor contaminación al ambiente. También el contenido de cenizas fue 5,08%, valor considerablemente menor respecto a otras fuentes de quitina como son los caparazones de langostinos (26,7%)¹⁷ y otros crustáceos, insectos, etc.^{3,6,11,16,17}, lo cual sugiere que para la obtención de quitina a partir de esta materia prima, no sería necesaria la aplicación de una etapa de desmineralización drástica como las que usualmente son aplicadas^{17,19,20}.

Desmineralización

Los valores de reducción del contenido de cenizas fueron considerables, comparados con los obtenidos por CAÑIPA y colaboradores¹¹ en caparazón desmineralizado de camarón (0,51 a 0,65% de cenizas), aplicando un tratamiento similar. En el presente trabajo mediante el tratamiento con HCl 1N por 3 horas se obtuvo el 98,8% de reducción de las sales minerales, en tanto que aumentando a 5 horas se logró eliminar el 99,21%. El valor máximo aludido también fue obtenido a partir de las 3 horas de tratamiento con HCl 2N (Tabla 1). Es evidente que la cantidad de cenizas en pluma de pota es

Tabla 1. Resultados de la desmineralización de la pluma de pota utilizando HCl 1 N Y 2N

HCl	Tiempo (horas)	Cenizas %
1N	3	0,06
	5	0,04
2N	7	---
	3	0,04
	5	0,04
	7	0,04

muy baja y la aplicación de un tratamiento más drástico, incrementando el tiempo y/o la concentración de ácido clorhídrico, no sería indispensable más aún cuando ello podría involucrar mayores costos.

En la Tabla 2 se presentan en la muestra, antes y después de ser sometidos a la etapa de desmineralización. Al utilizar HCl 1N por 3 horas se lograron reducciones significativas de los minerales evaluados, excepto en el contenido de calcio, cuyos valores se redujeron a sólo 69%.

En el caso de tratamientos más intensos, (HCl 2N durante 3, 5 y 7 horas) se observó resultados similares al anterior, sin embargo la aplicación de HCl 2N, a las 3 horas fue la más ventajosa respecto a la remoción de las sales de calcio, lo cual demostró que fueron las de mayor dificultad para su remoción, a diferencia de los otros minerales evaluados, especialmente de las sales de sodio cuyos valores fueron reducidos de modo apreciable.

Es interesante considerar que el aumento del tiempo de desmineralización no representa necesariamente ventajas para reducir minerales, así al observar los valores obtenidos, se puede apreciar una concentración de cantidad de calcio expresada en el aumento de sus valores,

Tabla 2. Eficiencia (%) de la desmineralización de plumas de pota

Concentración de HCl	Mineral	Contenido inicial ppm)	Tiempo					
			3 horas ppm (%)		5 horas ppm (%)		7 horas ppm (%)	
1N	Na	12900	25,08	(99,8)	26,89	(99,8)	---	
	K	1060	25,08	(97,6)	12,41	(98,8)	---	
	Mg	370	20,05	(94,6)	21,31	(91,6)	---	
	Ca	880	266,70	(69,7)	510,16	(42,0)	---	
2N	Na	12900	22,22	(99,8)	16,44	(99,9)	140,60	(98,9)
	K	1060	22,22	97,9)	6,46	(99,4)	21,28	(97,9)
	Mg	370	21,26	(94,3)	16,28	(95,6)	41,39	(88,8)
	Ca	880	163,67	(81,4)	195,8	(77,7)	394,60	(55,2)

comportamiento que podría ser atribuido a la sobresaturación del ácido clorhídrico. Potasio, magnesio, calcio y principalmente sodio, habrían pasado a formar sales de tipo cloruro, reacción que habría sido favorecida por la elevada concentración de ácido clorhídrico.

Se considera que las variables más adecuadas para desmineralizar la pluma de pota son HCl en concentración 2N durante 3 horas.

Desproteínización

El contenido de UFC/mL en los inóculos iniciales fue $2,3 \times 10^9$ UFC/mL en 1 mL y $2,7 \times 10^{10}$ UFC/mL en 10 mL. La reducción del contenido de proteínas en la muestra guardó relación con el crecimiento del inóculo (Tabla 3), con la disolución de

la "harina" y con los resultados de los valores de nitrógeno final (Tablas 4 y 5).

En ambos casos se observa en los primeros días una reducción inicial en el recuento del número de microorganismos, hasta de dos ciclos logarítmicos. Este comportamiento parece indicar la adaptación del inóculo a un medio que se encontraba carente de una fuente de carbono, tal como el medio basal utilizado y consecuentemente un efecto de escasa o ninguna actividad proteolítica inicial, lo cual fue corroborado en las pruebas de dilución en ácido fórmico (Tabla 4).

A partir del tercer día se aprecia la recuperación en el cultivo con inóculo de 10 mL, que indicaría su adaptación y actividad metabólica relacionada directamente al consumo de carbono del

Tabla 3.- Crecimiento de *S. marcescens* en harina de pluma de pota desmineralizada

Inóculo de <i>Serratia marcescens</i> UFC/mL	Tiempo de crecimiento (días)						
	1	2	3	5	6	7	9
1 mL	$2,3 \times 10^9$	$1,3 \times 10^7$	1×10^7	1×10^7	$1,5 \times 10^9$	$1,0 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$
10 mL	$2,7 \times 10^{10}$	$1,9 \times 10^8$	2×10^9	$1,4 \times 10^9$	2×10^9	$1,4 \times 10^8$	2×10^9

Tabla 4. Dilución en ácido fórmico de la harina de pluma de pota

Tiempo de Incubación (días)	Inóculo		Blanco
	1 mL	10 mL	
3	-	-	-
5	+	+++	-
7	+++	+++	-
9	++++	++++	-

- sin dilución

+ solubilidad escasa (las partículas absorben el ácido y se hinchan)

+ solubilidad mediana, quedan partículas insolubles

++++ partículas solubles mayor del 90%

sustrato proteico. A su vez, guarda relación con el grado de solubilización del sustrato en ácido fórmico, característica que se hace evidente en forma notoria desde el quinto día, de acuerdo a la observación realizada; y se considera óptima al noveno día de incubación.

El cultivo con inóculo de 1 mL también presentó una ligera tendencia de recuperación a partir del quinto día, que se hace más evidente al día 7.

Las muestras de pluma desmineralizada y desproteinizada sometidas a dilución en ácido fórmico, mostraron una rápida y total disolución al contacto con el ácido fórmico, formando una sustancia fluida y muy viscosa, a diferencia de las muestras blanco que no fueron tratadas y que

Tabla 5. Resultados de la eficiencia en la desproteinización de plumas de pota utilizando *Serratia marcescens*

Inóculo inicial	Log UFC/g	N proteico %		Eficiencia %
		inicial %	Final %	
1 ml	9,43	5,54	1,81	68,7
10 ml	10,48	5,54	0,52	91,0

permanecieron en precipitación como partículas hinchadas sin disolver.

El comportamiento de la curva de crecimiento no indica en apariencia, mayores diferencias al utilizar ambas cantidades de inóculo con fines de desproteinizar el sustrato; sin embargo, al evaluar los resultados referidos a la cantidad de nitrógeno (Tabla 5) sí se observa evidente ventaja al utilizar el inóculo mayor.

Diversos investigadores^{16,19,20,21}, afirman que es improbable encontrar quitina totalmente libre de proteínas, se conoce que aún tratamientos drásticos difícilmente rompen enlaces covalentes establecidos entre quitina y proteína además de otros enlaces mantenidos con aminoácidos no aromáticos¹⁶.

El valor de la eficiencia obtenida, al inocular 10 mL de la cepa, es el más cercano al obtenido por Cañipa¹¹, quien refiere 97% trabajando mediante metodologías de desproteinización química utilizando NaOH en cefalotórax de camarón^{11, 17, 18, 20}.

CONCLUSIONES

La desmineralización química de la pluma de pota utilizando HCl 2N (1/10), durante 3 horas a 150 rpm. a temperatura ambiente permitió la remoción del 99,21% de sales minerales en la muestra.

La adición de 3×10^{10} UFC/mL de la bacteria *Serratia marcescens* incubando durante 9 días fue la más adecuada lograr la mayor desproteinización.

El bajo contenido de grasa y la carencia de pigmentos, son características de la muestra que constituyen una ventaja para la extracción de quitina.

REFERENCIAS

1. Kafetzopoulos D, Martinou A, Bouriotis V. (1993) Bioconversion of chitin to chitosan: Purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucro rouxii*. *Proce. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993; 90: 2564 - 2568.
2. You-Jin Jeon, Fereidoon Shahidi and Se-Young Kim. (2000) Preparation of Chitin and Chitosan Oligomers and Their Applications in Physiological Functional Foods. *Food Rev. Int.*, 16(2): 159-176.
3. Tharanathan N. Rudrapatnam and Kittur Farooqahmed. (2003) Chitin-The Undisputed Biomolecule of Great Potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(1): 61-87.
4. Synowiecki J. and Ali Al-Khateeb, N. (2003). Production, Properties and some new applications of Chitin and its Derivatives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43(2): 145-171.
5. Abdou Adham M. (2003). Purification and Partial Characterization of Psychrotrophic *Serratia marcescens* Lipase. *Dairy Science* 86:127 - 132
6. Knorr, D., and Klein J. (1984) Production and Conversion of Chitosan with Cultures of *M. rouxii* or *P. blakesleenus*. *Biotech. Letters*, vol 8,(10): 691-694.
7. Lower E., (1984). Polymers from the sea chitin and chitosan. *Manufacturing Chemist.* 73-75pp.
8. Ministerio de la Producción (2004). Anuario Estadístico. *Nutritional Composition of Squid*
9. Okusumi Masayo (2000). *Nutritional and Functional Properties of Squid and Cuttlefish. National Cooperative Association of Squid Processors.* 142-155 pp.
10. FAO. (1986) *Food and Nutrition Paper. Tomo 14 / 7 Food Analysis: General Techniques, additives, contaminants and composition.* 328 pp.
11. Cañipa A. J.; Escobedo, G.; García, R. S.; Durand De Bazúa (1999). Producción de pigmentos, quitina y quitosano a partir de residuos de la industria camaronera. Parte 1: separación química de pigmentos y quitina. *Industria Alimentaria*.
12. García Alonso, Nieto Villar J. M.; Rodríguez, A.; Henríquez Rodríguez, R. Método para el aprovechamiento de la langosta común. Instituto de Química y Biología Experimental. publicación CU 21658 A1, Certificado de Autor De Invención, República de Cuba
13. AOAC. (1993). *Methods of Analysis for Nutrition Labeling*, 968.08
14. Bacteriological Analytical Manual for FDA. January 2001. Edition 8 Chapter 3. 1998.
15. AOAC. (1993). *Methods of Analysis for Nutrition Labeling*. 981.10.
16. Sromova, D. and Lysek, H. (1990). Visualization of chitin-protein layer formation in *Ascaris lumbricoides*
17. Ayala Galdos M. E., (1992). Obtención de quitina del caparazón de Langostino y su aplicación como crioprotector en filetes congelados de jurel. Tesis para optar el grado de Magister Scientiae. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima. Mimeografiada. 133 pp.
18. Cira Luis A., Huerta S., Hall G., Shirai K., (2002). Tesis para optar el fermentación de shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemistry* 37 (2002) 1359-1366.
19. No, H. K.; Meyers, S.P. y Lee, K. S. 1989. Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste. *J. Agric. Food Chem.*, 37(3): 575-79.
20. Muzzarelli, R.A.A. 1978. *Chitin*. Pergamon Press. Londres, Inglaterra.
21. Austin, P. R.; Brine, C. J.; Castle, J.E. y Zihahis, J.P. (1981). *Chitin: New Facets of Research.* Science, 212: 749-53.
22. Parada, L. G.; Crespín, G. D.; Miranda, R.; Katime, I. (2004). Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar y valorización potenciométrica. *Revista Iberoamericana de Polímeros.* 5 (1): 17-27
23. Paul A., and Southgate D. (1985). *The Composition of Foods.* Elsevier/North-Holland Biomedical Press. p. 7.