



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Estandarización de un proceso de extracción de colágeno a partir de los residuos de fileteo de tilapia (*Oreochromis sp*) y cachama (*Piaractus brachypomus*)

Ing. Jenifer Carolina Serrano Gaona

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ingeniería, Área Curricular de Ingeniería Química y Ambiental

Bogotá D.C., Colombia

2011



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Standardization of a process for extracting
collagen from filleting waste from tilapia
(*Oreochromis sp*) and cachama (*Piaractus
brachypomus*)**

Ing. Jenifer Carolina Serrano Gaona

National University of Colombia

College of Engineering, School Curricular Chemical and Environmental Engineering

Bogotá D.C., Colombia

2011

Estandarización de un proceso de extracción de colágeno a partir de los residuos de fileteo de tilapia (*Oreochromis sp*) y cachama (*Piaractus brachypomus*)

Ing. Jenifer Carolina Serrano Gaona

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ingeniería Química

Director:

D. Eng. Mario Enrique Velásquez Lozano

Línea de Investigación:

Bioprocesos

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Procesos Químicos y Bioquímicos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ingeniería, Área Curricular de Ingeniería Química y Ambiental

Bogotá D.C., Colombia

2011

A mi papito por enseñarme a luchar y a no descansar hasta obtener lo que nos proponemos, por su cariño, gracias infinitas por siempre.

“Solo viven aquellos que luchan” Víctor Hugo.

Agradecimientos

A mi mamá por no permitir que los sueños se desvanezcan en la noche. A mis hermanos, Sandra, Andrés y Marcela por confiar en mí siempre.

A ti mi amor por tu paciencia, tu colaboración y tu cariño en todos los momentos.

A mis amigos y compañeros del posgrado por los buenos momentos y su continuo apoyo.

Al Profesor Mario Enrique Velásquez por su acertada dirección, su colaboración y gestión en la consecución de recursos para la realización de este trabajo.

Al Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, ICTA, especialmente al Sr. Álvaro Jiménez. Al Laboratorio de Ingeniería Ambiental, a su coordinador Ing. Jorge Manrique y su analista Johana Torres por su apoyo en la realización de análisis fisicoquímicos.

A la Universidad Nacional de Colombia, al Departamento de Ingeniería Química y Ambiental. A Ricardo Cortez, Edgar Martínez y Helber Lesmes por su continua colaboración.

A la empresa MetaFish Food Company S.A., al Dr. Enrique Torres y a la Asociación de Acuicultores del Meta, ACUIORIENTE

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural por la financiación del proyecto: "Producción de colágeno a partir de los residuos del proceso de fileteo de tilapia (*Oreochromis sp*) y cachama (*Piaractus Brachypomus*)".

A todas aquellas personas que no se mencionan pero que de alguna manera hicieron posible este trabajo.

Resumen

Se estandarizó un proceso de extracción y purificación de colágeno ácido soluble a partir de pieles de tilapia (*Oreochromis sp*) y de cachama (*Piaractus brachypomus*) utilizando análisis estadísticos. Los resultados indicaron que el rendimiento de colágeno ácido soluble fue de 33,3% en base seca. El patrón de alto peso molecular utilizado para SDS – PAGE reveló que el colágeno obtenido de pieles de tilapia o de pieles de cachama es colágeno tipo I. La temperatura de desnaturalización (T_d) del colágeno obtenido de piel de tilapia fue cercana a 29 °C mientras para el colágeno obtenido de piel de cachama fue de 33 °C.

Palabras clave: Colágeno, Extracción, Proteasa, Piel de Pescado, *Oreochromis sp*, *Piaractus brachypomus*.

Abstract

The extraction and purification processes of acid soluble collagen from Tilapia (*Oreochromis sp*) and Cachama (*Piaractus brachypomus*) skins were studied and standardized using statistical tools. Some properties of the obtained collagen were determined. Acid soluble collagen yield of 33,3 % (dry base) was obtained. A high molecular weight standard used for SDS-PAGE revealed a Type I collagen obtained from the two studied skins. The denaturalization temperatures (T_d) were 29°C and 33°C for collagen extracted and purified from Tilapia and Cachama skins, respectively.

Keywords: Collagen, Isolation, Protease, Fish Skin, *Oreochromis sp*, *Piaractus brachypomus*

Contenido

Lista de Figuras	XV
Lista de Tablas	XVII
Introducción	1
1. Generalidades	5
1.1 Estructura de las proteínas	5
1.2 Propiedades de las proteínas	6
1.2.1 Capacidad amortiguadora	6
1.2.2 Solubilidad	6
1.2.3 Desnaturalización.....	7
1.2.4 Especificidad.....	7
1.3 Colágeno: proteína estructural.....	8
1.4 Síntesis del colágeno.....	9
1.5 Usos y aplicaciones del colágeno	10
1.6 Fuentes de obtención	13
1.7 Estado del arte	14
1.8 Estado de la investigación: proceso de extracción.....	16
1.9 Estado de la investigación: técnicas de caracterización del colágeno.....	20
2. Planteamiento del problema	23
2.1 Hipótesis.....	24
2.2 Objetivos	24
2.2.1 General.....	24
2.2.2 Específicos.....	24
3. Caracterización de la materia prima	25
3.1 Metodología.....	25
3.1.1 Muestreo de pieles de tilapia y cachama.....	25
3.1.2 Caracterización de las pieles.....	26
3.2 Materiales y equipos.....	27
3.3 Resultados y Discusión.....	27
4. Estandarización del proceso de extracción y purificación de colágeno	31
4.1 Metodología.....	31
4.1.1 Montaje utilizado para las pruebas.....	32
4.1.2Decoloración.....	34
4.1.3 Hidrólisis en medio básico.....	35
4.1.4 Solubilización de colágeno.....	38
4.1.5Filtración	38
4.1.6 Precipitación salina	39

4.1.7	Diafiltración	39
4.2	Materiales y equipos.....	41
4.3	Resultados y Discusión.....	42
4.3.1	Decoloración	42
4.3.2	Hidrólisis en medio básico.....	43
4.3.3	Solubilización de colágeno.....	49
4.3.5	Precipitación salina	51
4.3.6	Diafiltración	53
4.3.7	Método estandarizado para la extracción de colágeno a partir de pieles de tilapia	
	55	
5.	 Caracterización del producto obtenido	57
5.1	Metodología.....	57
5.1.1	Pruebas físico-químicas	57
5.1.2	Pruebas microbiológicas	57
5.1.3	Determinación de la temperatura de desnaturalización	58
5.1.4	Electroforesis en gel de poliacrilamida, SDS – PAGE	58
5.2	Materiales y equipos.....	58
5.3	Resultados y análisis	59
5.3.1	Pruebas físico-químicas	59
5.3.2	Pruebas microbiológicas	60
5.3.3	Determinación de la temperatura de desnaturalización	61
5.3.4	Electroforesis en gel de poliacrilamida, SDS – PAGE	62
6.	 Conclusiones y Recomendaciones	65
7.	 Recomendaciones	67
8.	 Bibliografía	69
ANEXOS		73

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1-1: Formula estructural de la prolina y la hidroxiprolina.	5
Figura1-2: Estructura de las fibras de colágeno.	8
Figura1-3:Histograma: número de artículos por año (2000 – 2010)	14
Figura1-4: Red de colaboración entre autores.	15
Figura1-5: Red de palabras clave.	15
Figura1-6: Gel de electroforesis (SDS-Poliacrilamida) con muestras de colágeno de diferentes fuentes.	20
Figura4-1: Termograma paracolágeno obtenido de piel de tilapia – pruebas preliminares.	32
Figura 4-2: Sistema de Filtración Tangencial Millipore tipo Lab-Scale.	40
Figura4-3: Interacción de la temperatura y la concentración de hipoclorito de sodio.	42
Figura4-4: Efecto del tiempo para el tratamiento con hipoclorito de sodio.	43
Figura4-5: Interacción de la temperatura y la concentración de hidróxido de sodio.	44
Figura4-6: Efecto del tiempo para el tratamiento con el hidróxido de sodio.	44
Figura4-7: Resultados Diseño Experimental Anexo E – Pieles de Tilapia.	46
Figura4-8: Resultados Diseño Experimental Anexo E – Pieles de Cachama.	47
Figura4-9: Estudio del efecto del tiempo en el tratamiento enzimático de pieles de tilapia y cachama.	48
Figura4-10: Superficie de respuesta para el tratamiento ácido a pieles de tilapia, t = 2h.	49
Figura4-11: Superficie de respuesta para el tratamiento ácido a pieles de tilapia, t = 5h.	50
Figura4-12: Superficie de respuesta tratamiento ácido a pieles de cachama, t = 2h.	51
Figura4-13: Superficie de respuesta tratamiento ácido a pieles de cachama, t = 5h.	51
Figura4-14: Efecto de la concentración de cloruro de sodio y el pH en la solubilidad del colágeno ácido soluble.	52
Figura4-15: Determinación de la presión trans-membranal óptima, TMP.	53
Figura4-16: Diagrama de flujo del proceso de obtención de colágeno a partir de pieles de tilapia.	55
Figura 4-17: Diagrama de flujo del proceso de obtención de colágeno a partir de pieles de cachama.	56
Figura5-1: Termograma para el colágeno obtenido a partir de pieles de tilapia.	61
Figura 5-2: Termograma para el colágeno obtenido a partir de pieles de cachama.	62
Figura 5-3: Gel de Electroforesis de poliacrilamida – SDS.	63

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1-1: Contenido de aminoácidos del colágeno tipo I de piel humana y de pescado.	12
Tabla 1-2: Principales etapas del proceso de extracción y condiciones utilizadas por algunos autores en el proceso de extracción de colágeno a partir de pieles de pescado.	19
Tabla 3-1: Características organolépticas evaluadas a las pieles frescas.	26
Tabla 3-2: Análisis proximal y contenido de hidroxiprolina de las pieles de tilapia y cachama.	28
Tabla 4-1: Resultados actividad proteolítica de la enzima Protex 6L.	45
Tabla 4-2: Resultados actividad proteolítica de la enzima TanG Plus.	46
Tabla 4-3: Resultados diafiltración de la solución de colágeno al 0,05%.	54
Tabla 5-1: Requisitos físico-químicos del colágeno según NTC 3750.	60
Tabla 5-2: Pruebas microbiológicas del colágeno según NTC 3750.	60

Introducción

Las proteínas más abundantes en la matriz extracelular son aquellas que pertenecen a la familia del colágeno (Gelse *et al.* 2003). El colágeno es la proteína más abundante de origen animal (Muyonga *et al.* 2004), que constituye aproximadamente el 25 - 30% de todas las proteínas de los organismos animales (Bae *et al.* 2008), es un componente importante de todos los tejidos conectivos del cuerpo (músculos, dientes, huesos y piel) (Potaros *et al.* 2009), pero se concentra especialmente en los tejidos asociados a la piel y los huesos (Nakamura *et al.*, 2003. Tomado de:(Woo *et al.* 2008)) y también se encuentra en el tejido intersticial de prácticamente todos los órganos, donde pueden contribuir a la estabilidad de los tejidos y órganos, y mantener su estructura e integridad. (Gelse *et al.* 2003).

El colágeno se caracteriza por tener una estructura interna de triple hélice, por lo cual su alta resistencia y propiedades de retención de humedad. La principal función del colágeno es mantener la estructura de los tejidos animales y mejorar la fuerza, resistencia y flexibilidad de los tejidos. Cuando se va perdiendo la calidad y cantidad de esta proteína, la piel va disminuyendo su elasticidad, también se presenta fragilidad en uñas, pérdida de elasticidad del cabello, aparición de manchas tipo lunar en brazos y manos, endurecimiento de los tejidos y las válvulas cardíacas, fragilidad de los discos intervertebrales y desgaste de meniscos.

Gracias a estas características, el colágeno es de gran importancia en el campo de los materiales biomédicos y biomateriales y en la industria farmacéutica y cosmética. En el campo de los biomateriales, el colágeno resalta por su aplicabilidad en la Ingeniería de Tejidos demostrándose mediante estudios que las esponjas de colágeno permiten la adhesión celular y la proliferación de células específicas (Lu *et al.* 2004). En el sector cosmético se ha utilizado para la prevención y tratamiento de arrugas, en la producción de

parches para heridas y en el desarrollo de medicamentos con liberación de los principios activos.

Inicialmente, el colágeno se obtiene principalmente de origen porcino y bovino, pero la comunidad científica busca nuevas fuentes de extracción de la proteína debido al rechazo generado por las enfermedades bovinas que pueden pasar a los humanos y las creencias de carácter religioso. Una fuente que actualmente se estudia es la piel de pescado, producto del proceso de fileteo. Los piscicultores presentan estas pieles como material no deseado.

Con el desarrollo de las aplicaciones enunciadas, el colágeno se ha convertido en un producto de alta demanda en diferentes sectores productivos del país. Actualmente en Colombia el colágeno requerido por el mercado es importado a empresas de origen europeo que obtienen el colágeno de pieles de pescado tales como la tilapia roja (*Oreochromis sp*) y la carpa (*Cyprinus carpio*), y una mínima proporción es producido en el país a partir de cuero de bovinos.

Debido a la creciente demanda de colágeno y al aumento de la producción de filetes es importante que en el país se estudie un proceso de extracción de colágeno a partir de pieles de pescados, que permitiría suplir las necesidades del mercado nacional con un producto de calidad y mejor precio, consiguiendo un aumento en la cifra de empleos generados y en la ganancia de los sectores productivos.

Con base en la hipótesis de que “las pieles provenientes del proceso de fileteo de tilapia negra (*Oreochromis sp.*) y cachama (*Piaractus brachypomus*) son potenciales materias primas sustitutas de los tradicionales bovina y porcina en la obtención de colágeno tipo I. Este colágeno posee ventajas de comercialización por encontrarse libre de enfermedades contagiosas de origen bovino y prejuicios debido a creencias religiosas”, el presente trabajo tiene como objetivo estandarizar un proceso de extracción de colágeno a partir de los residuos del proceso de fileteo de tilapia y cachama, disminuyendo la contaminación en los cuerpos de agua en las zonas piscícolas y ofreciendo un producto de calidad a los diferentes sectores industriales que lo requieran.

Es necesario aclarar que no es propósito de esta tesis realizar la optimización del proceso de extracción y purificación estandarizado en este trabajo. Por otro lado, la caracterización del producto obtenido permitió determinar si el producto presenta las tres cadenas polipeptídicas características del colágeno y conocer propiedades físico-químicas y microbiológicas generales, que permiten al producto cumplir con los lineamientos de la Norma Técnica Colombiana para colágeno tipo I, NTC 3750 (ICONTEC, 1995).

El documento se dividió en cinco capítulos. En el primero se presenta el estado del arte de la extracción de colágeno a partir de pieles de pescado y un marco teórico que contiene generalidades sobre las proteínas, como estructura y propiedades, y sobre el colágeno como su estructura, síntesis, usos y aplicaciones y fuentes de obtención. En el capítulo dos se plantea el problema de investigación, la hipótesis y los objetivos.

En el tercero se presenta el procedimiento de muestreo y la metodología utilizada para caracterizar las pieles de ambas especies, con un análisis proximal y la cuantificación de hidroxiprolina, así como los resultados y el análisis de estos. En el capítulo cuarto se presenta el diseño de experimentos y la metodología usada para definir las etapas y las condiciones de operación que permiten la extracción de colágeno a partir de las pieles de tilapia y cachama, así como los resultados y el análisis de estos.

Y en el capítulo cinco se encuentra la metodología utilizada para la caracterización del producto obtenido, los resultados de estas pruebas, como corridas de electroforesis y termogramas obtenidos por calorimetría diferencial de barrido. Finalmente se tienen las conclusiones y las recomendaciones para futuros trabajos en el tema de extracción de colágeno a partir de pieles de pescado.

Este proyecto fue financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural en el marco del programa de generación de valor agregado en productos y subproductos de tilapia y cachama para exportación. Se realizó con el apoyo de la empresa MetaFish Food Company S.A. y la asociación de acuicultores del Meta, ACUIORIENTE, y se desarrollo en las instalaciones de los Laboratorios de Ingeniería Química y del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, ICTA, de la Universidad Nacional de Colombia, UN.

1. Generalidades

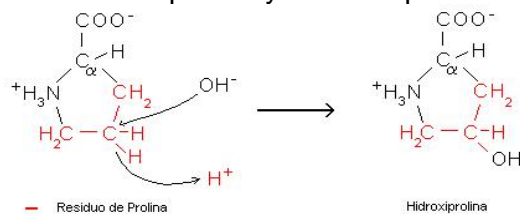
A continuación se describe brevemente la estructura y propiedades características de las proteínas, luego se profundiza en el colágeno, comentando generalidades como estructura, síntesis, usos y aplicaciones y las fuentes de obtención. Por último se describe el estado de la investigación en extracción de colágeno a partir de pieles de tilapia y cachama, describiendo los métodos utilizados por otros autores y las principales pruebas de caracterización para el colágeno obtenido por estos métodos.

1.1 Estructura de las proteínas

Todas las proteínas son polímeros, y los α -aminoácidos son los monómeros que se combinan para formarlas. Es de nuestro especial interés la prolina, un aminoácido cíclico, que posee características similares a los aminoácidos alifáticos como la alanina y la glicina.

La prolina tienen la capacidad de modificarse químicamente una vez se ha ensamblado en las proteínas, para convertirse en 4-hidroxiprolina, como se ilustra en la Figura 1-1.

Figura 1-1: Formula estructural de la prolina y la hidroxiprolina.



Tomado de: (Mathews *et al.* 2002)

Las moléculas proteicas poseen cuatro niveles de organización estructural: primaria (secuencia), secundaria (plegado local), terciaria (plegado global) y cuaternaria (asociación de varias cadenas).

En el primer nivel de organización, la secuencia de aminoácidos, viene dada por la secuencia de DNA del gen para cada proteína. La estructura primaria es fundamental para la forma tridimensional que tendrá la proteína. Cualquier modificación en la secuencia de aminoácidos podría ocasionar un cambio en la estructura tridimensional y afectará la función biológica de la proteína.

A medida que la cadena de aminoácidos se va ensamblando, empiezan a tener lugar interacciones entre los diversos aminoácidos de la cadena. Pueden formarse puentes de hidrógeno entre el hidrógeno del amino de un aminoácido y el oxígeno del carboxilo de otro. A causa de estas uniones la cadena polipeptídica se pliega, adoptando dos posibles configuraciones espaciales que constituyen lo que se conoce como estructura secundaria de una proteína. Estas dos configuraciones son las llamadas α -hélice y β -hoja plegada.

La α -hélice, se caracteriza por formar una estructura geométrica en espiral, muy uniforme, en la que cada vuelta está constituida por 3,6 aminoácidos. Esta hélice se mantiene mediante puentes de hidrógeno entre el hidrógeno del grupo amino del enlace peptídico de un aminoácido y el oxígeno del grupo carboxilo del cuarto residuo mas delante de la hélice. Dentro de este grupo se pueden mencionar proteínas estructurales como el colágeno, la queratina, elastina(Mathews *et al.* 2002).

1.2 Propiedades de las proteínas

1.2.1 Capacidad amortiguadora

Las proteínas tienen un comportamiento anfótero y esto las hace capaces de neutralizar las variaciones de pH del medio, ya que pueden comportarse como un ácido o una base y por tanto liberar o retirar protones (H^+) del medio donde se encuentran.

1.2.2 Solubilidad

Las proteínas son solubles en agua cuando adoptan una conformación globular. La solubilidad es debida a los radicales (-R) libres de los aminoácidos que, al ionizarse,

establecen enlaces débiles (puentes de hidrógeno) con las moléculas de agua. Así, cuando una proteína se solubiliza queda recubierta de una capa de moléculas de agua (capa de solvatación) que impide que se pueda unir a otras proteínas lo cual provocaría su precipitación (insolubilización). Esta propiedad es la que hace posible la hidratación de los tejidos de los seres vivos.

1.2.3 Desnaturalización

La desnaturalización de una proteína se refiere a la ruptura de los enlaces que mantenían sus estructuras cuaternaria, terciaria y secundaria, conservándose solamente la primaria. En estos casos las proteínas se transforman en filamentos lineales y delgados que se entrelazan hasta formar compuestos fibrosos e insolubles en agua. Los agentes que pueden desnaturalizar a una proteína pueden ser: calor excesivo; sustancias que modifican el pH; alteraciones en la concentración; alta salinidad; agitación molecular; etc. El efecto más visible de éste fenómeno es que las proteínas se hacen menos solubles o insolubles y que pierden su actividad biológica.

La mayor parte de las proteínas experimentan desnaturalizaciones cuando se calientan entre 50 y 60 °C; otras se desnaturalizan también cuando se enfrían por debajo de los 10 a 15 °C. La temperatura a la cual una proteína se desnaturaliza es la temperatura de desnaturalización, T_d .

1.2.4 Especificidad

Es una de las propiedades más características y se refiere a que cada una de las especies de seres vivos es capaz de fabricar sus propias proteínas (diferentes de las de otras especies) y, aún, dentro de una misma especie hay diferencias proteicas entre los distintos individuos. Esto no ocurre con los glúcidos y lípidos, que son comunes a todos los seres vivos.

La enorme diversidad proteica inter-específica e intra-específica es la consecuencia de las múltiples combinaciones entre los aminoácidos, lo cual está determinado por el ADN de cada individuo.

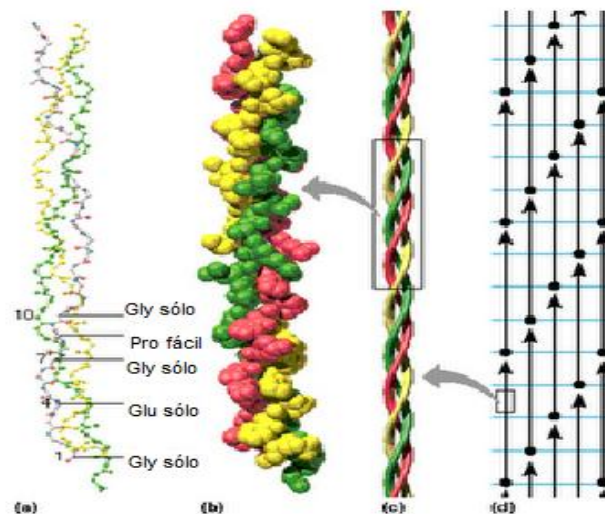
La especificidad de las proteínas explica algunos fenómenos biológicos como: la compatibilidad o no de trasplantes de órganos; injertos biológicos; sueros sanguíneos; etc., o los procesos alérgicos e incluso algunas infecciones.

1.3 Colágeno: proteína estructural

La molécula de tropocolágeno es la unidad básica de la fibra de colágeno, es una hélice triple de tres cadenas polipeptídicas, cada una de ellas con aproximadamente 1000 residuos. Esta estructura helicoidal triple, que se presenta en la Figura1-2 a y b, es característica del colágeno. Las cadenas individuales son hélices orientadas a la izquierdas, con aproximadamente 3,3 residuos/vuelta. Tres de estas cadenas se enrollan unas alrededor de las otras hacia la derecha, con enlaces de hidrogeno que se extienden entre ellas.

El examen del modelo revela que cada tercer residuo, que debe encontrarse cerca del centro de la hélice triple, solo puede ser glicina. Cualquier cadena lateral distinta de Gly sería demasiado voluminosa. La formación de las hélices individuales del tipo colágeno también resulta favorecida por la presencia de prolina o hidroxiprolina en la molécula de tropocolágeno. Un conjunto que se repite en la secuencia es la forma Gly-X-Y, donde X suele ser prolina e Y, prolina o hidroxiprolina. Para realizar adecuadamente sus múltiples funciones, el colágeno presenta un gran número de variantes genéticas en los organismos superiores.

Figura1-2: Estructura de las fibras de colágeno.



Tomado de: (Mathews *et al.* 2002)

El colágeno es excepcional en su extensa modificación de prolina a hidroxiprolina. La mayoría de los enlaces de hidrógeno entre las cadenas en la hélice triple se establecen entre protones amidas y oxígenos carbonilo, aunque los grupos –OH de la hidroxiprolina también parecen participar en la estabilización de la estructura.

Las moléculas individuales de tropocolágeno se empaquetan juntas formando una fibra de colágeno de una manera específica, Figura 1-2 c. Cada molécula tiene una longitud de aproximadamente 300 nm y se solapa con su vecina en aproximadamente 64 nm, produciendo el aspecto característico de bandas de las fibras que aparecen en la Figura 1-2 d. Esta estructura proporciona una resistencia notable: las fibras de colágeno de los tendones tienen una resistencia comparable a la del cable de cobre de alta resistencia.

Parte de la dureza del colágeno se debe al entrecruzamiento de las moléculas de tropocolágeno mediante una reacción que utiliza las cadenas laterales de la lisina. Algunas de las cadenas laterales de la lisina se oxidan para dar lugar a derivados aldehídos, que, a continuación, pueden reaccionar con un residuo de lisina o bien unos con otros mediante una condensación aldólica y deshidratación para dar lugar a un entrecruzamiento. Este proceso sigue a lo largo de la vida, y los entrecruzamientos que se acumulan hacen que el colágeno sea cada vez menos elástico y más quebradizo.

El colágeno tiene algunas variantes genéticas que identifican los 26 tipos de colágeno (Sato *et al.* 2002) designados como tipo I-tipo XXVI. Los diferentes tipos de colágenos se caracterizan por diferencias en sus propiedades físicas, debidas a sus diferencias en la secuencia de aminoácidos. En el Anexo A se encuentra información recolectada sobre características de algunos tipos de colágeno.

1.4 Síntesis del colágeno

Cuando una célula se divide para formar dos, se sintetizan todo tipo de macromoléculas portadoras de información, entre ellas las proteínas. Los procesos moleculares que subyacen bajo este flujo genético de información pueden dividirse en tres etapas, que se describen a continuación:

1. Replicación: es la copia de las dos cadenas de un DNA de doble cadena.
2. Transcripción: es el proceso por el que se copia una cadena de DNA en una molécula de RNA complementaria.

3. Traducción: es cuando una secuencia de RNA dicta una secuencia proteica. Luego de la traducción las proteínas sufren modificaciones y el colágeno es un importante ejemplo de ello. En primer lugar el polipéptido recién traducido se hidroxila y, a continuación, se unen los azúcares para dar procolágeno. El procolágeno contiene alrededor de 1 500 residuos, de los cuales aproximadamente 500 están en las regiones N-terminal y C-terminal que no tienen la secuencia característica de la fibra de colágeno descrita previamente.

Tres moléculas de procolágeno enrollan sus regiones centrales formando una hélice triple, mientras que las regiones N-terminal y C-terminal se pliegan formando estructuras globulares. Las hélices triples de procolágeno se exportan a continuación al espacio extracelular; en este punto las regiones terminales se separan mediante enzimas específicas, dejando sólo la hélice triple de tropocolágeno.

A continuación, estas moléculas se ensamblan dando lugar a las formaciones escalonadas que se muestran en la Figura 1-2c. Finalmente, los entrecruzamientos pegan juntas a las moléculas formando una fibra dura de colágeno.

1.5 Usos y aplicaciones del colágeno

Gracias a sus características químicas únicas, el colágeno se ha utilizado en diversos campos de la industria (Bae *et al.* 2008), tiene aplicaciones en materiales biomédicos, en la industria farmacéutica, cosmética y en alimentos (Potaros *et al.* 2009).

Actualmente el colágeno tiene aplicaciones muy importantes en el campo de los **materiales biomédicos y biomateriales**. Un biomaterial es una sustancia, elemento o combinación de estos, ya sean sintéticos o naturales, que pueden utilizarse para reemplazar parcial o definitivamente una función que desempeña alguna parte del cuerpo humano, también se ha definido como un elemento capaz de adaptarse al cuerpo humano y desarrollar una función específica (Villela 2004). Los biomateriales más usados son las aleaciones metálicas, polímeros, cerámicos y sustancias biológicas. Entre las sustancias biológicas, el colágeno ha sido uno de los más empleados y más comerciales.

Los biomateriales han tenido gran importancia para la Ingeniería de Tejidos, ya que este campo se basa en la utilización de estos materiales. Al respecto se han realizado diferentes estudios para demostrar la aplicabilidad del colágeno como biomaterial en la

ingeniería de tejidos. Se han demostrado aplicaciones en la ingeniería de tejidos cardiovascular con el desarrollo de un “scaffold”¹ de colágeno, que tiene la función de permitir la adhesión celular y la proliferación de las células específicas del tejido a tratar (Lu *et al.* 2004). También las esponjas de colágeno son usadas comúnmente como biomaterial biodegradable, las cuales se han empleado en implantes de tejido conectivo del hueso, prótesis para la regeneración del nervio y apósitos para heridas (Schoof *et al.* 2001). Se ha aplicado en la ingeniería de tejido de cartílago (Riesle *et al.* 1998) y en la ingeniería de tejido óseo (Bitar *et al.* 2007).

En la industria farmacéutica y cosmética tiene gran importancia la aplicación de colágeno, gracias a las bondades que esta proteína tiene. Se ha utilizado para la prevención y tratamiento de arrugas, en la producción de parches para heridas y en el desarrollo de medicamentos con liberación de los principios activos. A partir de los 25 años de edad se va perdiendo colágeno del organismo humano lo que va produciendo señales de envejecimiento. Para disminuir este efecto, se han desarrollado diferentes productos a base de colágeno que permitan detener en cierta medida este proceso o por lo menos retrasarlo.

Es así como se han creado productos como cremas, geles, lociones y mascarillas, además de inyecciones subcutáneas para aplicarse directamente en la piel. Como se menciono anteriormente dicha proteína se encuentra extendida en gran parte del organismo por lo que también hace parte de la salud del cabello, por esto se han desarrollado productos como shampoo, acondicionadores y tratamientos capilares a base de colágeno, que eviten la aparición de signos de debilitamiento como la horquilla.

Pero el colágeno no solo se ha utilizado en aplicaciones cosméticas; desde hace pocos años se ha empezado a introducir en el mercado de los **complementos nutricionales** de uso oral. Esta aplicación tiene ventajas frente al uso de cremas y lociones ya que el complemento alimenticio penetra hasta las capas más profundas de la piel, gracias a que los aminoácidos que componen el colágeno son absorbidos y utilizados para la regeneración del tejido conjuntivo, en el desarrollo de este producto se ha utilizado el

¹ Estructura porosa que sirve de soporte, son también llamados esponjas.

colágeno marino por su mayor disponibilidad en contraposición con el colágeno tradicional.

Respecto al colágeno para el tratamiento de heridas, se han desarrollado productos como parches y apósitos o gasas, los cuales tienen grandes beneficios al momento de la cicatrización. Se ha evidenciado que la fuerza tensil de las cicatrices se aumento en un 40% y también que acelera la reparación tisular, disminución de la respuesta inflamatoria local, beneficia la capacidad para reducir la carga bacteriana e incentiva la formación de tejido conectivo (González Tuero *et al.* 2004)

A continuación se presenta la Tabla 1-1 donde se compara el perfil de aminoácidos del colágeno presente en la piel humana y en la piel de peces como la tilapia nilótica, como porcentaje total.

Tabla 1-1: Contenido de aminoácidos del colágeno tipo I de piel humana y de pescado.

Aminoácido	% aminoácido en colágeno Tipo I (piel humana) (Devlin 2004)	% aminoácido en colágeno Tipo I (piel de pescado) (Zeng <i>et al.</i> 2009)
Alanina	11	11,9
Arginina	5	5,8
Asparagina	5	4,2
Glutamina	7	6,9
Glicina	33	35,6
Histidina	0,5	0,6
Isoleucina	1	0,8
Leucina	2	2,0
Lisina	2	2,0
Metionina	0,6	0,5
Fenilalanina	1	1,3
Prolina	13	12,8
Serina	4	3,2
Treonina	2	2,2
Triptófano	2	0
Tirosina	0,3	0,3
Valina	2	1,7
4 - hidroxiprolina	8,6	8,2
TOTAL	100	100

Como se puede observar en la Tabla 1-1 las diferencias en el contenido de aminoácidos presentes en el colágeno de piel humana y de pescado son pequeñas, en el caso más notable la diferencia en el porcentaje de glicina es igual a 2,6 %. Esto indicaría que el colágeno obtenido de pieles de pescado puede ser empleado en la formulación de productos cosméticos o implantes a base de colágeno para seres humanos sin que generen respuesta inmune por parte del paciente.

1.6 Fuentes de obtención

La principal fuente de extracción de colágeno ha sido hasta el momento de los residuos del beneficio de especies bovinas y de la piel, huesos y cartílagos de cerdo (Wang *et al.* 2008). Estas fuentes tradicionales de colágeno presentan dificultades y son inapropiados para muchos grupos religiosos y étnicos debido a limitaciones socio-culturales. En el caso del judaísmo y el Islam se prohíbe el consumo de productos relacionados con el cerdo, y para los hindúes se prohíbe el consumo de productos relacionados con las vacas (Karim and Bhat 2009), y también se ven restricciones en su consumo por condiciones de salud ya que se teme ante enfermedades como la de la encefalopatía espongiiforme bovina y la fiebre aftosa (Potaros *et al.* 2009). También existen otro tipo de limitaciones como son los costos de obtención de colágeno de bovinos, ya que se ve afectado por el alto valor que tiene el levante de este tipo de animales y de la baja productividad en colágeno.

Debido a la problemática anterior ha sido de gran importancia encontrar fuentes alternativas de materia prima para la obtención de colágeno, entre las estudiadas se encuentran las que se pueden obtener del medio acuático (Senaratne *et al.* 2006) como son la piel, huesos y escamas de pescado.

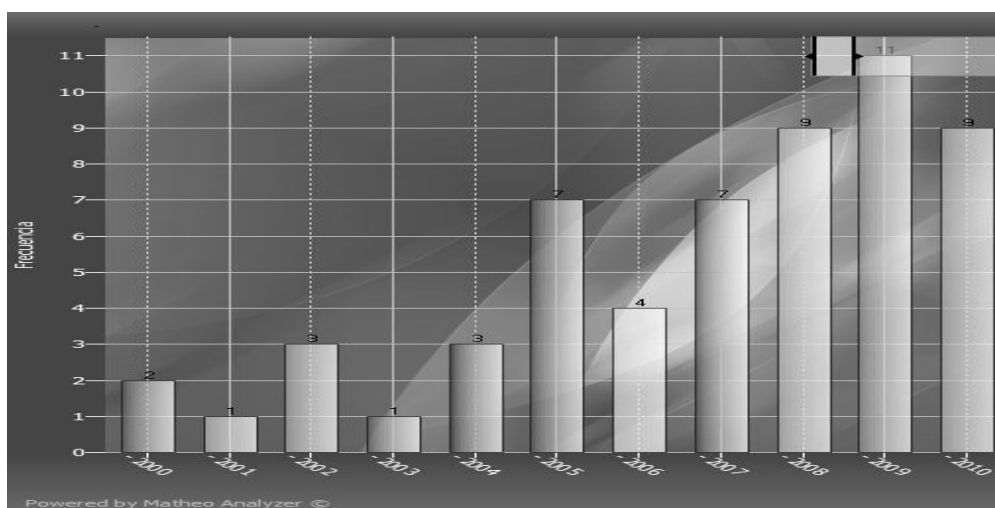
Con la búsqueda de nuevas fuentes de colágeno se han realizado diferentes estudios para evaluar las propiedades funcionales del colágeno de origen de pescado, analizando las pieles de pescados de agua dulce y agua salada (Woo *et al.* 2008), por ejemplo: bacalao común ((Sadowska *et al.* 2003), perca común (Muyonga *et al.* 2004), carpa gris (Zhang *et al.* 2007), tiburón bambú (Kittiphattanabawon *et al.* 2010), carpa plateada (Zhang *et al.* 2009) y tilapia nilótica (Zeng *et al.* 2009). Estos artículos se han concentrado en analizar el colágeno obtenido y en proponer procesos de obtención de colágeno a partir de las pieles de estas especies.

1.7 Estado del arte

La búsqueda² de artículos científicos publicados en Journals a partir del año 2000 en la base de datos Science Direct disponible en la Universidad Nacional de Colombia, permitió identificar el estado de la investigación científica en el tema de extracción de colágeno a partir de piel de pescado, encontrando 63 registros y se presenta el siguiente análisis:

En primer lugar se realiza un histograma, Figura 1-3, donde se presenta el número de artículos publicados desde el año 2000 al día de hoy, en este gráfico se observa que el número de publicaciones aumenta con el transcurso del tiempo lo que indica que el tema es de actualidad. Esto nos permite estar a la vanguardia de la investigación y el desarrollo de nuevos productos con base en desechos de pescado.

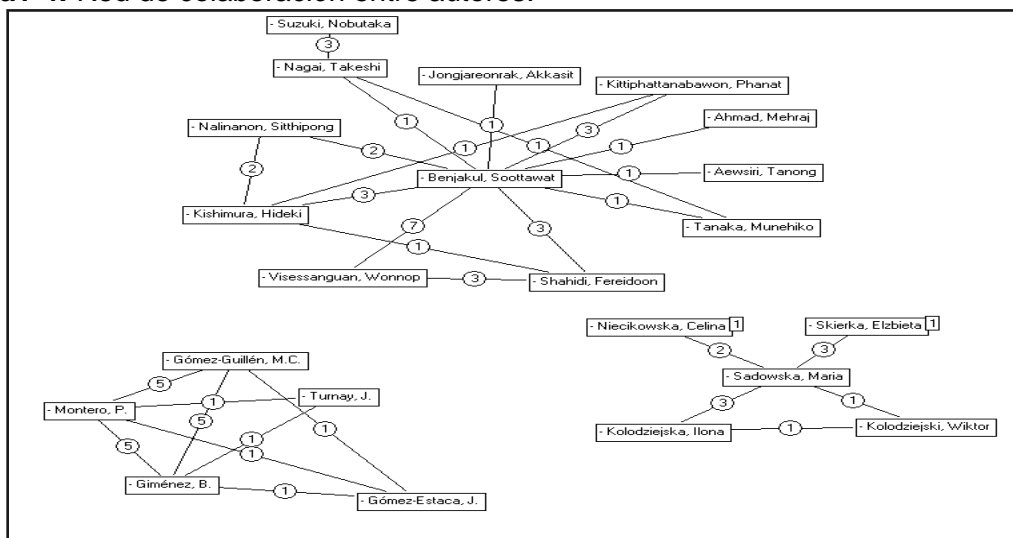
Figura1-3:Histograma: número de artículos por año (2000 – 2010)



Posteriormente se realiza una red de colaboración entre autores, Figura 1-4, con mayor número de publicaciones. Se observa la presencia de tres redes de colaboración: la primera y más grande es la red de investigadores de Japón y China, la segunda y tercera con igual número de integrantes de España y Polonia, respectivamente.

²Collagen fish skin and TITLE-ABSTR-KEY(extraction or isolation) AND LIMIT-TO(Food Chemistry,Food Hydrocolloids,Bioresource Technology,LWT - Food Science and Technology,Process Biochemistry,Aquaculture")

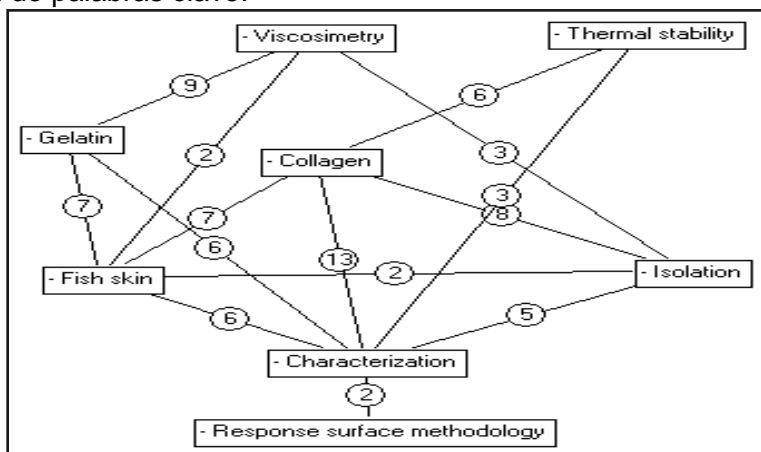
Figura1-4: Red de colaboración entre autores.



Se observa que ningún país latinoamericano posee publicaciones en el tema, de lo que se puede concluir que desarrollar conocimiento al respecto puede generar ventajas competitivas para el país, ya que se estaría generando innovación en el uso de subproductos en la región.

En último lugar se presenta una red que relaciona las palabras clave en la investigación, Figura 1-5. Con esta red podemos ver que cuando se habla de colágeno existe una fuerte relación con la caracterización tanto del producto obtenido como de la materia prima, principalmente por análisis proximal de las pieles de pescado y para el producto obtenido: electroforesis en gel, cromatografía líquida de alta eficiencia, HPLC, e infrarrojo con transformada de Fourier.

Figura1-5: Red de palabras clave.



1.8 Estado de la investigación: proceso de extracción

La primera investigación realizada en Japón (Nagai and Suzuki 1999) tuvo como objetivo describir la preparación de colágeno a partir de piel, hueso y aletas de pescado y estudiar las propiedades térmicas de este colágeno. En esta investigación reportan la extracción de colágeno de pieles de varias especies de peces, entre las que se encuentran: perca japonesa (*Lateolabrax japonicus*), caballa (*scomber japonicus*) y tiburón toro japonés (*Heterodontus japonicus*).

Los procesos de extracción y purificación de colágeno a partir de piel de pescado propuestos por los investigadores constan de 8 etapas: eliminación de la grasa con alcohol, solubilización en medio ácido y procesos de centrifugación, precipitación salina, centrifugación, redisolución de la proteína, diálisis en medio ácido y por último liofilización.

Luego de obtener el producto cuantificaron el colágeno presente en la muestra, mediante la técnica colorimétrica de cuantificación de hidroxiprolina, con el fin de calcular el rendimiento obtenido en el proceso, para el caso de la perca japonesa se obtuvo 51,4 %, la caballa 49,8 % y para el tiburón toro japonés 50,1 %, porcentajes en base del peso seco liofilizado.

Por último el autor caracterizó el producto obtenido, determinando si es colágeno tipo I mediante la técnica de electroforesis, realizando una comparación del peso molecular de las cadenas α y β de colágeno con un patrón de pesos moleculares. Una propiedad muy importante es la estabilidad térmica de la proteína, por lo que se determinó la temperatura de desnaturalización midiendo la viscosidad a diferentes temperaturas.

La temperatura de desnaturalización para el colágeno obtenido de piel de la perca japonesa es 26,5 °C, de la caballa es 25,6 °C y del tiburón toro japonés es 25,0 °C. Estos valores están 10 °C por debajo de la temperatura encontrada para el colágeno de piel de porcinos. “Así mismo, el colágeno derivado de especies de pescado que habitan en ambientes fríos tiene un menor contenido de hidroxiprolina y muestran una menor estabilidad térmica que aquellos que viven en ambientes cálidos. Esto se debe a que la hidroxiprolina es envuelta en enlaces hidrogeno, lo cual estabiliza la estructura de la triple hélice del colágeno” (Muyonga *et al.* 2004).

Por último se plantea que aunque la industria ha limitado el consumo a colágeno de mamíferos; la piel, los huesos y las aletas de pescado claramente tienen potencial como una fuente alternativa de colágeno, (Nagai and Suzuki 1999).

Luego de la investigación mencionada muchos autores han venido estudiando el proceso de extracción de colágeno extracción de colágeno a partir de piel de pescado debido a que los resultados mostrados por(Nagai and Suzuki 1999) indican que el rendimiento de la piel es superior al rendimiento encontrado en huesos y aletas.

En 2006, China contribuyó en un 67 % al suministro mundial de animales acuáticos cultivados, esta cifra permite comprender porque es el país con mayor investigación en el tema de extracción de colágeno de piel de pescado y aprovechamiento de subproductos de la piscicultura. Las especies que se cultivan comúnmente son la carpa con 74,8 %, la tilapia con 4,20 % y la brema con 3,30 % de la producción acuícola de aguas dulces en China durante 2003 (FAO 2007-2011).

En la revisión bibliográfica realizada se encontró que a partir de la investigación mencionada anteriormente distintos autores han propuesto mejoras a los procesos de extracción y purificación teniendo en cuenta que han trabajado con especies de pescado distintas. Respecto al proceso de adecuación las pieles se lavan, se cortan en pequeños trozos (entre 1cm^2 o $0,5\text{cm}^2$) y por último se almacenan en congeladoras hasta el momento de realizar las pruebas, esta etapa no ha sido modificada por los distintos autores.

El proceso de extracción cuenta con varias etapas, la primera comúnmente es la eliminación de la proteína no colágena de la piel utilizando hidróxido de sodio, el cual hidroliza las proteínas permitiendo su eliminación con lavados posteriores. El control de esta etapa debe ser cuidadoso debido a que el hidróxido de sodio puede hidrolizar el colágeno presente en las pieles.

Pocos autores como {Zhang, 2007 #23} reportan la etapa de blanqueamiento de las pieles, esto se debe a que muchas investigaciones se realizan con pieles de pescado de colores claros como blanco o rojo, el colágeno obtenido de estas pieles no presenta el color grisáceo que presenta el colágeno proveniente de pieles oscuras.

Para eliminar la grasa presente en las pieles es posible emplear detergentes pero debido a que estos dejan residuos químicos en el producto, su difícil recuperación y altos costos en los últimos estudios se han usado alcoholes de bajo peso molecular, estos alcoholes no dejan residuos y pueden ser recuperados fácilmente gracias a su baja presión de vapor.

En la etapa de solubilización del colágeno es posible utilizar ácido acético o pepsina en medio ácido, la selección entre uno y otro debe tener en cuenta el uso final de la proteína extraída, ya que mientras el ácido acético solubiliza la proteína la pepsina la hidroliza para que siendo una molécula más pequeña se solubilice. Es por esto que es ampliamente utilizado el ácido acético en lugar de la pepsina en las investigaciones.

Por último se encuentra el proceso de purificación que tiene como primera etapa la precipitación con cloruro de sodio para separar la proteína de la anterior solución ácida, seguida de la etapa de centrifugación y re-solubilización para finalmente dializar y eliminar los iones cloruro y sodio libres solubles durante la precipitación. En la Tabla 1-2 se muestran las etapas del proceso de extracción y las variaciones realizadas por distintos autores.

Todos los reportes indican que la temperatura de trabajo es 4°C a menos que se indique lo contrario, con el fin de evitar al máximo la desnaturalización de la proteína. Se observa que aunque el proceso de extracción a nivel de laboratorio consta de etapas relativamente sencillas, el estudio de cada etapa requiere un análisis cuidadoso de cada una de las variables que intervienen en ellas. Es por esto que estudiar este proceso permitirá aprovechar la investigación ya desarrollada para proponer un proceso de extracción de colágeno de piel de pescados como la tilapia y la cachama producidas en el oriente del país.

Tabla 1-2: Principales etapas del proceso de extracción y condiciones utilizadas por algunos autores en el proceso de extracción de colágeno a partir de pieles de pescado.

Autor	Especie	Eliminación proteína - NaOH	Decoloración	Eliminación grasa	Solubilización - Ac.acético	Precipitación Salina
(Zhang et al. 2007)	Carpa herbívora (<i>Ctenopharyngodon idella</i>)	al 0,1 M por 12 h 1:30 (p/v) ³	H ₂ O ₂ al 3 % por 48 h	Detergente al 0,5 % por 6 h	al 0,5 M por 24 h 1:30 (p/v) ⁴	NaCl 1,5 M
(Wang et al. 2008)	Carpa herbívora (<i>Ctenopharyngodon idella</i>)	al 0,1 M por 6 h 1:20 (p/v)	---	Dietileter por 24 h 1:20 (p/v)	al 0,54 M por 32 h 24,7 °C	NaCl 2,6 M
(Duan et al. 2009)	Carpa (<i>Cyprinus carpio</i>)	al 0,1 M por 3 h 1:8 (p/v)	---	Detergente al 1 % por 8 h 1:10 (p/v)	al 0,5 M por 72 h	NaCl 2,5 M
(Zeng et al. 2009)	Tilapia del Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	al 0,1 M por 48 h 1:30 (p/v)	---	Butanol al 10 % por 24 h 1:30 (p/v)	al 0,5 M por 72 h 1:50 (p/v)	NaCl 2,3 M
(Potaros et al. 2009)	Tilapia del Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	al 0,1 M por 4 h 1:20 (p/v)	---	---	al 0,5 M por 24 h 1:70 (p/v)	NaCl 0,9 M
(Zhang et al. 2009)	Carpa dorada (<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>)	al 0,1 M por 6 h 1:8 (p/v)	---	Butanol al 10 % por 8 h 1:10 (p/v)	al 0,5 M por 72 h	NaCl 2,5 M

Fuente: el autor

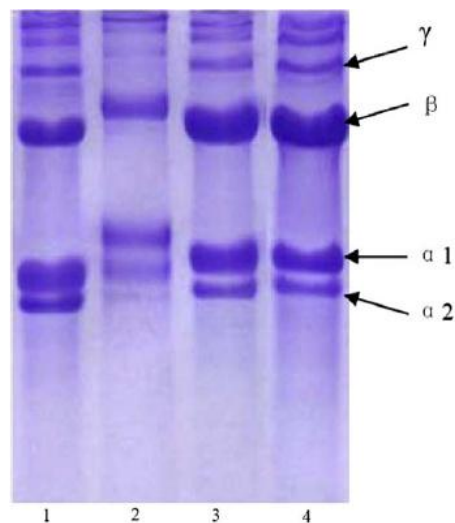
3

⁴ Esta solución de ácido acético contenía 1% (p/p) de pepsina.

1.9 Estado de la investigación: técnicas de caracterización del colágeno

Por último se encuentran las pruebas de caracterización. Primero se asegura que el producto obtenido es colágeno tipo I comparándolo con patrones de alto peso molecular mediante la técnica de electroforesis, que se define como el movimiento de partículas cargadas en un campo eléctrico. La movilidad de las partículas está determinada de forma proporcional al voltaje aplicado y la carga neta de la molécula y de forma inversamente proporcional a la fricción de la molécula; esta última depende de la forma y el tamaño de la misma.

Figura1-6: Gel de electroforesis (SDS-Poliacrilamida) con muestras de colágeno de diferentes fuentes.



Colágeno de bacalao (1), becerro (2), carpa plateada (3) y de carpa común (4).

Tomado del reporte de (Zhang *et al.* 2009)

El patrón de SDS-PAGE muestra que el colágeno consiste en cadenas α , su regulador de voltaje (cadena β), y pequeñas cantidades de un componente γ . Todos los colágenos están compuestos por lo menos de dos diferentes cadenas α , $\alpha 1$ y $\alpha 2$, y la densidad de $\alpha 1$ es mayor que la de $\alpha 2$. Se puede observar que los pesos moleculares de las subunidades (cadenas $\alpha 1$, $\alpha 2$ y β) del colágeno de piel de carpa son mayores que los del colágeno extraído de piel de becerro. Una gran cantidad de cadenas β pudo verse en todos los

colágenos, esto significa que los colágenos son ricos en inter e intra-enlaces moleculares (Zhang *et al.* 2009).

Igualmente es necesario cuantificar el colágeno presente en la muestra por medio de la técnica colorimétrica de cuantificación del % de hidroxiprolina, (aminoácido característico de los colágenos), que dependiendo de la fuente tiene un factor para determinar el % de colágeno. Este cálculo permite realizar el balance de materia e indicar el rendimiento del proceso, para el caso de tilapia del Nilo 39,4 % en base seca (Zeng *et al.* 2009), la carpa común 41,3 % (Duan *et al.* 2009), la carpa herbívora 19,3 % (Wang *et al.* 2008) y 46,6 % (Zhang *et al.* 2007). Es posible explicar estas diferencias en los resultados con los diferentes procesos de extracción o a las distintas especies así como el medio de cultivo y el tipo de alimentación.

El colágeno es una proteína termo-inestable, la cual puede desnaturalizarse a temperatura ambiente. En general, el colágeno de pescado puede variar mucho en su composición de aminoácidos, especialmente los niveles de aminoácidos (prolina e hidroxiprolina) entre especies de pescados y la cantidad de hidroxiprolina depende del medio ambiente en el cual habita el pescado y afecta la estabilidad térmica del colágeno (Muyonga *et al.* 2004). Es por esto que es necesario determinar la temperatura de desnaturalización del colágeno así como controlar la temperatura durante todas las etapas del proceso.

La temperatura de desnaturalización puede determinarse mediante estudios reológicos o de calorimetría diferencial de barrido (DSC). La curva de desnaturalización térmica puede obtenerse graficando el cambio fraccional de la viscosidad con la temperatura. La temperatura de desnaturalización, T_d , es determinada como la temperatura a la cual el cambio de viscosidad es del 50%. En el caso del DSC, se grafica el cambio del flujo de calor con la temperatura y la T_d es la temperatura máxima o mínima (según el diagrama). Para la carpa plateada la T_d fue 29 °C (Zhang *et al.* 2009), carpa herbívora de 28,4 °C (Zhang *et al.* 2007), tilapia del Nilo de 32 °C (Zeng *et al.* 2009), carpa común de 28 °C (Duan *et al.* 2009).

En resumen, podemos decir que la investigación en el tema de extracción de colágeno a partir de pieles de pescado esta en desarrollo y cada especie tiene un proceso de extracción diferente, con esto se presenta la necesidad de estandarizar un proceso para extraer colágeno de pieles de tilapia y cachama cultivada en Colombia ya que como se observo anteriormente las etapas y condiciones del proceso pueden verse afectadas así como las características del producto obtenido, por al medio ambiente, la temperatura y la alimentación.

2. Planteamiento del problema

La obtención de colágeno a partir de pieles de tilapia y cachama tiene un impacto significativo en tres ámbitos importantes como son el ambiental, el comercial y el económico. Respecto al ámbito ambiental se presenta como una alternativa de solución a la problemática ambiental generando productos que aprovechan los subproductos de la industria piscícola, y también tiene impacto en cuanto a la coherencia que tiene con las tendencias actuales de uso de ingredientes naturales con mínimos riesgos ambientales durante su proceso de producción y la reducción en el uso de químicos en su elaboración.

En el comercial, cobra importancia respecto a los mercados a los cuales puede dirigirse, y que se han perdido con el colágeno tradicional por aspectos culturales y de salud, además de nuevos mercados que se crearían por ser un producto de fuente de materia prima diferente a los usados comúnmente, también se beneficia por nuevas formas de promoción ya que actualmente es muy importante para el consumidor conocer las ventajas que el desarrollo de un producto tiene en los aspectos sociales, ambientales y económicos. Otro factor importante en este ámbito es el direccionamiento del producto hacia nichos de mercado que valoran lo natural, el cual toma cada vez mayor importancia.

Con relación al aspecto económico, tiene importancia tanto para la industria piscícola como para sectores como el cosmético o el farmacéutico, ya que la realización de este proyecto jalonaría la cadena piscicultora y se llegaría a convertir en parte de los actores primarios de la cadena cosmética o farmacéutica como son los proveedores de ingredientes naturales, esta situación le brinda al piscicultor una nueva oportunidad de desarrollo económico; para los sectores cosmético y farmacéutico la importancia

económica radica en la disminución de los costos de producción lo que a su vez generará precios competitivos de los productos en los mercados internacionales.

2.1 Hipótesis

Las pieles provenientes del proceso de fileteo de tilapia y cachama son potenciales materias primas sustitutas de los tradicionales bovina y porcina en la obtención de colágeno tipo I. Este colágeno está libre de enfermedades contagiosas de origen bovino, y posee ventajas de comercialización frente a las fuentes tradicionales libre de prejuicios debidos a creencias religiosas.

2.2 Objetivos

2.2.1 General

Estandarizar un proceso que permita la extracción de colágeno a partir de las pieles de tilapia y cachama producto del proceso de fileteo.

2.2.2 Específicos

- Caracterizar las pieles de tilapia y cachama cuantificando el contenido de proteína, de grasa, de cenizas y de hidroxiprolina.
- Definir a nivel de laboratorio las etapas y evaluar las condiciones para la extracción de colágeno a partir de pieles de tilapia y cachama.
- Determinar propiedades del producto obtenido como peso molecular y temperatura de desnaturalización.

3. Caracterización de la materia prima

Con el fin de conocer la materia prima se realizó un análisis proximal, donde se determinó el porcentaje de proteína, grasa, cenizas y humedad. Así mismo se cuantificó el colágeno presente en las pieles mediante la determinación del porcentaje de hidroxiprolina en las mismas. Para estos análisis se seleccionaron pieles de tilapia y cachama realizando un muestreo de la materia prima proveniente de la empresa MetaFish Food Company S.A.

3.1 Metodología

3.1.1 Muestreo de pieles de tilapia y cachama

En el muestreo se aplicaron pruebas sensoriales que permitieron evaluar de manera sencilla la calidad de las pieles de pescado para la producción de colágeno. Se realizó un muestreo simple por atributos. Se establecieron los parámetros: nivel de calidad aceptable (NCA)⁵, $\alpha = 1\%$, y el nivel de aceptación⁶ como normal, para determinar el tamaño del muestreo (según DIN ISO 2859 primera parte) y posteriormente con la tabla de NCA para inspección normal se obtienen la cifra de aceptación y de rechazo para el lote.

De cada especie de pescado llegaron aproximadamente 250 pieles, equivalentes a 3 kilogramos. Estas fueron congeladas y almacenadas diferenciando la especie en bolsas de polietileno, cada una con 1kg de piel. La Tabla 3-1 muestra las características organolépticas evaluadas a las pieles.

⁵Máximo porcentaje de artículos defectuosos en un lote que pueden ser considerados aceptables en promedio.

⁶Determina la relación entre el tamaño del lote y el tamaño de la muestra, I, II o III.

Tabla 3-1: Características organolépticas evaluadas a las pieles frescas.

Parámetro	Estándar de calidad	Cumple	
		Si	No
Apariencia	Brillante	X	
Color	No decolorada	X	
Textura	Firme y elástica	X	
Olor	Característico a pescado fresco	X	

Fuente: el autor

Todas las pieles incorporadas al presente estudio debieron cumplir con los parámetros de calidad mencionados en la Tabla 3-1.

3.1.2 Caracterización de las pieles

Con el fin de caracterizar la materia prima inicial se realizó el análisis proximal a 12 pieles de cada especie, según indicó el muestreo, las pieles fueron cortadas en trozos de 1 x 1 cm, y almacenadas hasta el momento de realizar los análisis.

- Cuantificación de humedad: siguiendo el método oficial de la Asociación Oficial de Químicos Analistas por sus siglas en ingles, AOAC Internacional, No. 950.46 del año 1998.
- Cuantificación de materia grasa, extracción con éter: siguiendo el método oficial de la AOAC No. 960.39 del año 1998.
- Cuantificación de proteínas, método de Kjeldhal: siguiendo el método oficial de la AOAC No. 928.08 del año 1998.
- Cuantificación de cenizas totales, método gravimétrico: siguiendo el método de la AOAC No. 920.153 del año 1998.
- Cuantificación del contenido de Hidroxiprolina: se sigue el método descrito en la Norma Técnica Colombiana NTC 3750, (ICONTEC 1995).

3.2 Materiales y equipos

Para la determinación de la materia grasa se utilizó arena, éter de petróleo grado analítico de Merck S.A. y el montaje Soxhlet para recuperación de vapores. Estas pruebas se realizaron en el Laboratorio de Análisis Físico-Químico del ICTA.

La determinación de proteína total por el método de Kjeldhal requirió de solución de ácido sulfúrico 97%, catalizador de sulfato de potasio (97% p/p) y sulfato cúprico (3% p/p), solución de hidróxido de sodio 10 M, solución de ácido bórico 4% p/v, indicador de Tashiro (rojo de metilo y azul de metileno), los reactivos necesarios para la preparación de estas soluciones fueron grado analítico de Merck S.A. Estas pruebas se realizaron en los equipos: Digestor de Proteína *Foss - Tecator 2006* (Dinamarca) y Unidad de Destilación *Foss - Kjeltex System 1002* (Dinamarca) ubicados en el Laboratorio de Análisis Físico-Químico del ICTA.

Para cuantificar el aminoácido Hidroxiprolina se utilizaron los reactivos: ácido sulfúrico 3,5 N y 3 N, sulfato de cobre 0,05 M, hidróxido de sodio 2,5 M, peróxido de hidrógeno 6%, p-dimetil amino benzaldehído al 5% en n-propanol, los reactivos necesarios para la preparación de estas soluciones fueron grado analítico de Merck S.A. Se utilizó como patrón de hidroxiprolina (*trans-4-Hydroxy-L-proline*) de Aldrich. Los equipos utilizados fueron Autoclave, Espectrofotómetro *Thermo Scientific - Genesys UV10* (USA) y Criotermostato de Circulación *Julabo - F12* (USA). Estas pruebas se realizaron en el Laboratorio de Ingeniería Bioquímica del LIQ en la UN.

3.3 Resultados y Discusión

A continuación en la Tabla 3-2 se presentan los resultados del análisis proximal y de la determinación del contenido de hidroxiprolina de las pieles de tilapia y de cachama, así mismo se relacionan los resultados del análisis proximal de carpa plateada obtenidos por (Zhang *et al.* 2009), se compara con esta especie ya que su piel es oscura como la piel de las especies estudiadas aquí.

Tabla 3-2: Análisis proximal y contenido de hidroxiprolina de las pieles de tilapia y cachama.

Muestra	Humedad	Composición proximal (% Base Seca)			Hidroxiprolina mg/g muestra
		Proteína	Grasa	Cenizas	
Piel de tilapia	67,50 ± 0,53	76,13±5,90	43,83±8,96	1,44± 0,40	15,11 ± 2,14
Piel de cachama	64,30 ± 0,89	31,58± 0,88	82,60± 10,31	0,96± 0,22	22,33 ± 2,91
Piel de carpa plateada	65,3 ± 0,08	99,71± 0,90	4,41± 0,12	1,15± 0,20	27,1 ± 0,39

Debido a que no se hallaron reportes sobre el análisis proximal y la cuantificación de hidroxiprolina en pieles de tilapia y cachama, es necesario realizar una comparación de los resultados obtenidos para estas dos especies con los resultados obtenidos para la piel de carpa plateada en otra investigación.

En la Tabla 3-2 se observa que el porcentaje de proteína de las pieles de carpa es 23% superior al presentado por las pieles de tilapia y 68% superior a las pieles de cachama. Las dos especies estudiadas aquí y cultivadas en el Departamento del Meta presentan un mayor contenido de grasa que las pieles de carpa plateada procedentes de la provincia de Jiangsu en China (Zhang, 2009). Y aunque la piel de cachama presenta un menor contenido de proteína que las pieles de tilapia, su contenido de hidroxiprolina es superior y en consecuencia su contenido de colágeno también.

El mayor porcentaje de proteína presente en las pieles de carpa plateada es debido a que en los países donde la actividad acuícola es tan importante como en China, se han realizado mejoras genéticas o cruces entre especies con el fin de aumentar la productividad de músculo para la producción de filetes (FAO, 2007), permitiendo así mismo la disminución de la grasa en la piel de los pescados como el caso de la Carpa Plateada.

El mayor contenido de hidroxiprolina de la piel de cachama, 22,33 mg/g muestra, indica que el colágeno obtenido de esta especie será térmicamente más estable que el colágeno obtenido de la piel de tilapia, {Muyonga, 2004 #29}. El alto contenido de grasa de las pieles de cachama supondrá un tratamiento más agresivo para la eliminación de esta que en el caso de las pieles de tilapia. Teniendo en cuenta que la temperatura de trabajo es un factor importante en el proceso de extracción de colágeno y ya que el

colágeno de la piel de tilapia será menos estable que el obtenido de la piel de cachama se dio prioridad en algunas etapas del proceso al estudio de las pieles de tilapia en lugar de las pieles de cachama.

4. Estandarización del proceso de extracción y purificación de colágeno

4.1 Metodología

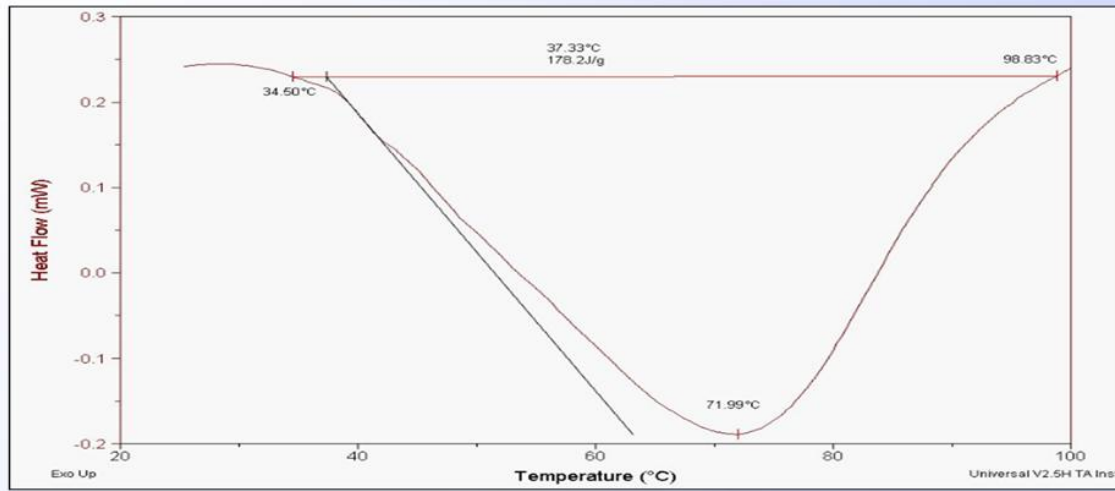
Con base en la revisión bibliográfica y en los resultados del análisis proximal de las pieles, se realizaron ensayos preliminares que permitieron la definición de las etapas del proceso y fijar algunas condiciones como la agitación y la relación peso de piel : volumen líquido para todas las etapas. Así mismo se definieron para cada etapa del proceso, los factores de estudio y variables de respuesta para formular los distintos diseños experimentales.

En los artículos consultados se manejan relaciones peso de piel : volumen de solución de 1:8 (p/v) (Duan *et al.* 2009) y hasta 1:30 (p/v) (Zeng *et al.* 2009) para las primeras etapas y para la etapa de solubilización ácida desde 1:30 (p/v) hasta 1:100 (p/v) (Wang *et al.* 2008). Durante los ensayos preliminares se observó que trabajar con relación de peso de piel : volumen de solución igual a 1:10 (p/v) para todas las etapas de extracción permite que las pieles entren en completo contacto con la solución respectiva de cada etapa.

El intervalo de temperatura estudiado no coincide con los datos reportados en distintos artículos (Nagai and Suzuki 1999; Sadowska *et al.* 2003; Zeng *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2009) donde el proceso se desarrolla a temperaturas iguales o menores a 4 °C, con el fin de prevenir la desnaturalización total o parcial del colágeno. Teniendo en cuenta los reportes encontrados de la temperatura de desnaturalización del colágeno obtenido a partir de pieles de distintas especies de pescado y que el colágeno obtenido de peces que habitan aguas cálidas es térmicamente más estable que el obtenido de especies de aguas frías, en este trabajo fue posible trabajar a temperaturas superiores a 4 °C y superiores a las ambientales con el fin de disminuir los costos de operación reflejo de la refrigeración y los tiempos de reacción.

El colágeno obtenido en los ensayos preliminares fue analizado mediante la técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC), el resultado fue un termograma, donde se observa la temperatura de desnaturalización, Figura 4-1.

Figura4-1: Termograma paracolágeno obtenido de piel de tilapia – pruebas preliminares.



De este termograma se obtuvo que la temperatura de desnaturalización de la proteína es igual a 37,33 °C, y aproximado a los datos reportados por otras investigaciones (Potaros *et al.*,2009; Zeng *et al.*,2009). Con este dato preliminar se posible definir la temperatura máxima de trabajo durante el proceso.

4.1.1 Montaje utilizado para las pruebas

El montaje empleado para la definición del proceso de extracción se compone de un reactor de vidrio enchaquetado con volumen nominal de 400 ml sin deflectores, un agitador de paletas planas inclinadas, un motor con indicador digital IKA RW-20 (Alemania) y un Criotermostato de Circulación Julabo - F12 (USA).

Algunas características geométricas importantes del tanque reactor y del agitador son:

- Diámetro del tanque, $D_t = 10$ cm
- Altura del líquido en el tanque, $H = 10$ cm
- Diámetro del agitador, $D_a = 5$ cm
- Altura del agitador sobre el fondo del tanque, $E = 5$ cm

- Ancho de las paletas del agitador, $W = 1 \text{ cm}$
- Largo de las paletas del agitador, $L = 2,25 \text{ cm}$

La agitación de todas las etapas debe asegurar que el líquido se encuentre en régimen turbulento para aumentar la transferencia de calor y de masa y de esta manera hacer un proceso más eficiente. Aunque no se realizó un diseño del tanque y del sistema de agitación fue necesario mantener la velocidad de agitación en 650 rpm para que el sistema permaneciera en flujo turbulento. Con esto se asegura que esta condición del proceso sea escalable en un futuro.

La Ec. 6-155 {Perry, 2008 #45} ilustra el cálculo del Número de Reynolds para tanques agitados, la densidad y la viscosidad del medio se aproxima a los valores para el agua ya que se trabajan soluciones a bajas concentraciones:

$$\rho = 1000 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3} \{Perry, 2008 \#45\}$$

$$\mu = 0,1 \text{ Pa} \cdot \text{s} \{Perry, 2008 \#45\}$$

$$N = 650 \text{ rpm} = 68,07 \text{ rad/s}$$

$$N_{Re} = \frac{D_a^2 N \rho}{\mu} = \frac{(0,05\text{m})^2 \left[650 \text{rpm} * \left(\frac{2\pi}{60\text{s}} \right) \right] 1000 \text{kg/m}^3}{0,1 \text{Pa} \cdot \text{s}} = 1701,7$$

Este N_{Re} indica que en las inmediaciones del agitador el flujo es turbulento mientras en los lugares más alejados de este en el reactor el flujo es laminar, teniendo en cuenta que el reactor es un tanque pequeño de 10 cm de diámetro y 12 cm de altura es posible suponer que el sistema se encuentra en flujo turbulento. La potencia P consumida por el impulsor se comprende sin dimensiones en un grupo llamado el número de potencia, Ec. 6-156 {Perry, 2008 #45}:

$$N_p = \frac{P}{\rho N^3 D^5}$$

La Figura 10.5c de {Walas, 1988 #47} relaciona N_{Re} con el Número de potencia, N_p , para diferentes tipos de agitadores. Se seleccionó en esta Figura la curva 13 para un agitador

de paletas planas inclinadas sin deflectores, si $N_{Re} \approx 1700$ el N_p es aproximadamente igual a 2 y la potencia requerida del motor es:

$$P = 2 * 1000 \text{ km}/\text{m}^3 * (68,07 \text{ rad}/\text{s})^3 * (0,05\text{m})^5 = 197,13\text{W}$$

4.1.2 Decoloración

Durante los ensayos preliminares no se realizó ninguna etapa de blanqueamiento de las pieles, y se observó que el producto obtenido tenía un color grisáceo no aceptado según la NTC 3750. Fue necesario entonces, incluir una etapa de blanqueamiento, como agente blanqueador se selecciono el hipoclorito de sodio, NaClO, por ser de los más económicos en el mercado. Así mismo se aprovecha la propiedad desinfectante de este producto, el cual permite eliminar los microorganismos que puedan estar en las pieles y posiblemente alteren algunas etapas posteriores del proceso.

En esta etapa son factores de tratamiento importantes la concentración de NaClO, el tiempo de reacción, la temperatura y la relación peso de piel : volumen de solución (p/v), de estos factores se estudiaron los tres primeros y la relación se mantuvo constante en 1:10 (p/v). En el caso del tiempo este fue incorporado al diseño de experimentos como un factor – bloque, que es apropiado cuando el objetivo del experimento es comparar los efectos de diferentes tratamientos promediados sobre un rango de condiciones experimentales distintas.

Debido a que en las pieles y el sobrenadante de la etapa están presentes muchos compuestos entre ellos grasa y proteína, así como microorganismos y células cromatóforas, las células que proporcionan el color a la piel, se decidió que la variable respuesta fuera el porcentaje de sólidos totales presentes en el sobrenadante ya que permite de manera rápida cuantificar estos compuestos y células. La determinación de sólidos totales se realizo siguiendo el método oficial de la AOAC No. 950.46 del año 1998.

Para el diseño experimental se utilizo el diseño de tipo factorial, donde se analizan todas las posibles combinaciones de los niveles de los factores en cada réplica del experimento. Para el factor temperatura se tienen 3 niveles, 10 - 20 - 30 °C, estas temperaturas son menores a la temperatura de desnaturalización, como se muestra en la

Figura 4-1. Muestras para la concentración de NaClO son dos, 0,525% y 0,262% (p/v), se evaluaron estas bajas concentraciones para evitar que permanezcan trazas en el producto final. El diseño experimental se muestra en el Anexo B.

4.1.3 Hidrólisis en medio básico

La función de esta etapa es eliminar las proteínas distintas al colágeno presentes en la piel de pescado. En los artículos consultados, esta eliminación se realiza con hidróxido de sodio, igualmente puede realizarse con enzimas proteolíticas específicas o no para el colágeno. En este trabajo se realizó la comparación de la capacidad de eliminación de proteínas del hidróxido de sodio, de la enzima Protex 6L y la enzima Tan G Plus.

- Tratamiento con hidróxido de sodio, NaOH: este producto es un agente irritante que al entrar en contacto con las proteínas de los tejidos vivos produce su rompimiento por efectos de hidrólisis. Luego de la hidrólisis los aminoácidos y péptidos más pequeños se liberan al medio acuoso, pero al ser una base fuerte podría así mismo hidrolizar la molécula de colágeno a pesar de ser una molécula fibrosa y resistente, por esta razón no se manejaron altas temperaturas ni concentraciones de la solución.

Los factores de tratamiento relevantes para esta etapa son la concentración de la solución de NaOH, el tiempo de reacción, la temperatura y la relación peso de piel : volumen de solución (p/v), de estos factores se estudiaron los tres primeros y la relación se mantuvo constante en 1:10 (p/v). En la revisión se encontró que el tiempo para esta etapa es de aproximadamente 6 horas (Nagai, T., *et al.* 2000), se realizaron ensayos preliminares y se encontró que luego de 3 horas de hidrólisis la concentración de la solución de NaOH no varía sustancialmente. Por esta razón el tiempo de cada ensayo será de 3 horas, y se tomarán muestras cada 30 minutos para realizar la agrupación por bloques del diseño de experimentos, que se muestra en el Anexo C.

Para el diseño experimental se utilizó el diseño de tipo factorial, para el factor temperatura se estudiaron los niveles, 10 - 20 - 30 °C, valores menores a la temperatura de desnaturalización encontrada para el producto obtenido de ensayos preliminares, y para la concentración de NaOH, se evaluaron los niveles 0,1 – 0,2 – 0,3 N.

Debido a que determinar la proteína total presente en las pieles con el método Kjeldhal es un procedimiento tedioso y costoso y a que cuantificar la proteína en el sobrenadante por el método de Bradford no es factible, por la alta turbidez de la muestra que traería interferencias a la lectura del espectrofotómetro y a la imposibilidad de filtrarla, se continuó con el porcentaje de sólidos totales presentes en el sobrenadante como variable respuesta.

- Tratamiento con proteasas: las peptidasas o proteasas se encuentran naturalmente en organismos vivos, donde se usan para la digestión molecular y la reducción de proteínas no deseadas. Estas enzimas catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas. Las peptidasas reconocen residuos C-terminales, cuya cadena lateral contiene un grupo aromático o alifático.

Las proteasas pueden romper ya sean enlaces peptídicos específicos (*proteólisis limitada*), dependiendo en la secuencia de aminoácidos de la proteína, o pueden reducir un péptido completo a aminoácidos. (*Proteólisis ilimitada*). Esta propiedad permitió utilizar proteasas para eliminar proteínas diferentes al colágeno presentes en las pieles de pescado.

- a) Tratamiento con enzima Protex 6Lde Genencor®: esta proteasa alcalina líquida derivada de una cepa seleccionada de *Bacillus licheniformis* con amplias aplicaciones en el procesamiento de proteínas, recuperación de plata de material fílmico y la producción de alimento de mascotas, puede digerir todas las proteínas presentes en la piel incluyendo el colágeno. La falta de especificidad podría involucrar una pérdida del producto de interés por lo que el siguiente paso fue estudiar una enzima selectiva al colágeno, comparando la relación costo – beneficio de cada una de las enzimas.

La ficha técnica de la enzima, indica las condiciones óptimas de trabajo con la enzima, pH igual a 9,5 y temperatura de 60 °C, condiciones que dependerán de variables del proceso como pH o temperatura, tiempo, naturaleza del sustrato y concentración. Como no es posible trabajar a la temperatura óptima reportada por el proveedor, se definió la temperatura de trabajo igual a 35 °C, ya que es la máxima temperatura a la cual la proteína de interés no se desnaturaliza.

El pH al cual se trabajaron las pruebas fue el pH recomendado por la ficha técnica igual a 9,5, este valor se consiguió con una solución tampón de carbonato de sodio y bicarbonato de sodio. Con estas condiciones fijas se determina la actividad proteolítica, la cual se basa en la cuantificación de aminoácidos solubles a pH ácido que son liberados por la hidrólisis del enlace peptídico mediado por proteasas. Estos aminoácidos, especialmente la tirosina, absorben en el espectro UV y son directamente proporcionales a la actividad enzimática en la muestra. El procedimiento para determinar la actividad proteolítica, donde UP son los μg de aminoácidos equivalentes a tirosina en 1 ml liberados por minuto, utilizando L-Tirosina como patrón a 280 nm, se describe en el Anexo D.

b) Tratamiento con enzima Genencor® TanG Plus de Genencor®: esta proteasa granulada alcalina, derivada de una cepa genéticamente modificada de *Bacillus subtilis* es especialmente utilizada para la degradación de componentes no colágenos del cuero durante los procesos de curtiembre.

La ficha técnica de la enzima indica las condiciones óptimas de trabajo con la enzima, pH alrededor de 8,6 y temperatura entre 40 – 50 °C, condiciones que dependerán de variables del proceso como pH o temperatura, tiempo, naturaleza del sustrato y concentración. Como no es posible trabajar a la temperatura óptima reportada por el proveedor, se definió la temperatura de trabajo igual a 35 °C, ya que es la máxima temperatura a la cual la proteína no se desnaturaliza.

El pH al cual se trabajaron las pruebas fue el pH recomendado por la ficha técnica igual a 8,6, este valor se consiguió con una solución tampón de tetraborato de sodio y fosfato biácido de potasio. Con estas condiciones fijas se determina la actividad proteolítica, partiendo de una solución de 1 g de enzima en 10 ml de solución tampón, siguiendo el procedimiento descrito en el Anexo D.

Para restringir el intervalo de estudio de la cantidad de enzima utilizada por cantidad de piel, se consultó un reporte de {Song, 2011 #48} y se encontró que utilizan como máximo 3% (g enzima/100 g proteína). Se decide entonces evaluar dentro del diseño de experimentos del Anexo E los niveles 0,5 – 1,5 - 3% (g enzima/100 g proteína) para el factor concentración de enzima, estos valores en unidades de actividad corresponden a 22,9 – 11,4 y 3,8 UP/g de enzima, respectivamente. Como la actividad enzimática de

cada enzima es diferente, estas mismas actividades indican diferentes cantidades de enzima. Para el análisis de los resultados se cuantificó la proteína total y la hidroxiprolina presente en las pieles tratadas luego de ser lavado con abundante agua (1:10 (p/v)) por 10 minutos, con estas determinaciones se reconoció cual de las relaciones E:S estudiadas para las dos enzimas disminuyo el contenido de proteínas diferentes al colágeno en la piel.

4.1.4 Solubilización de colágeno

En esta etapa se solubiliza en medio ácido el colágeno presente en la matriz de la piel, con esta etapa termina el proceso de extracción. Los reportes indican al ácido acético como el agente utilizado para solubilizar el colágeno, (Nagai and Suzuki 1999; Wang *et al.* 2008; Duan *et al.* 2009) en concentraciones cercanas a 0,5 M.

Los factores de tratamiento importantes para esta etapa son la concentración de la solución ácida, el tiempo de reacción, la temperatura y la relación peso piel : volumen de solución (p/v), de estos factores se estudiaron los tres primeros y la relación se mantuvo constante en 1:10 (p/v). Se aplico un diseño D-optimal, donde la temperatura se evaluó entre 15 °C y 35°C, y la concentración de ácido acético entre 0,1 M y 0,5 M. El diseño de experimentos, se muestra en el Anexo F.

En la revisión bibliográfica se encontró que el tiempo para esta etapa es de hasta 3 días a 4 °C utilizando ácido acético 0,5 M (Zeng *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2009), en los ensayos preliminares a 25 °C se observo que luego de 5 horas las pieles se habían solubilizado por lo que en el diseño se tomaron muestras de solución en la hora 2 y 5 de cada ensayo.

La respuesta de estos ensayos fue la cuantificación de proteína total por el método de Bradford, usando albumina de suero bovino (BSA), como patrón de calibración. El procedimiento para la determinación de proteínas por este método se muestra en el Anexo G.

4.1.5 Filtración

Para eliminar los sólidos no disueltos en la solución de ácido acético se utilizo un filtro de acero inoxidable de malla No. 20 según la norma ASTM E11-09.

4.1.6 Precipitación salina

En esta etapa se recupera el colágeno de la solución ácida precipitándolo con una solución de cloruro de sodio a un pH determinado, gracias a las cargas iónicas que esta sal proporciona a la proteína permitiendo su precipitación.

Se estudio el efecto de la concentración de cloruro de sodio en la solubilidad del colágeno. 2,5 mililitros de la solución de colágeno 0,5 g/l en ácido acético al 0,5 M se mezcla con 5 mililitros de una solución de cloruro de sodio en ácido acético a diferentes concentraciones, 6%, 9% y 18% (p/v), para obtener una concentración final de cloruro de sodio igual a 4%, 6% y 12% (p/v) respectivamente. Las soluciones se agitan y se disuelven 2 ml en 4 ml de agua desionizada, 1 ml de esta nueva solución se colorea con 1 ml de reactivo de Bradford, para realizar la medición siguiendo el protocolo del Anexo G.

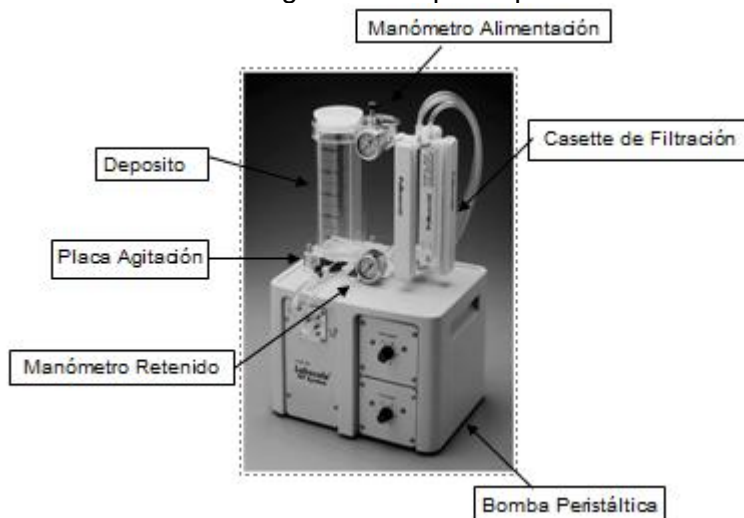
4.1.7 Diafiltración

La diafiltración es una modificación de la ultrafiltración en la cual se adiciona agua o solución diluyente a la alimentación con el fin de facilitar el permeado de algunos componentes a través de la membrana.

El precipitado producto de la etapa de precipitación salina se re-disuelve en una solución de ácido acético 0,5M hasta obtener una concentración de 0,05% de colágeno, esta nueva solución de colágeno se pre-filtra utilizando una membrana de celulosa de 0,22 μm en un tanque de presurización en acero inoxidable 316 marca Millipore Corp.

La solución pre-filtrada se diafiltra, para eliminar los iones cloruro y sodio de la solución de colágeno, utilizando el sistema de filtración tangencial Millipore, tipo *Lab-Scale*, que se observa en la siguiente Figura 4-2. Este sistema está compuesto por un deposito con capacidad de 500 ml, bomba peristáltica, placa agitadora y los manómetros requeridos para controlar la presión de alimentación, P_1 , y de salida de permeado del cassette de filtración, P_2 . Este sistema de filtración fue proporcionado por Purificación y Análisis de Fluidos S.A.

Figura 4-2: Sistema de Filtración Tangencial Millipore tipo Lab-Scale.



El cassette de filtración Pellicon XL50 marca Millipore, contiene una membrana de polietersulfona, compuesto de celulosa y fluoruro de polivinilideno hidrofílico (PVDF), con un peso molecular de corte de 50 kDa y 50 cm² de área de filtración.

Es necesario antes de utilizar estos cassetes de filtración realizar la prueba de integridad que consiste en hallar la permeabilidad normalizada del cassette de filtración con agua para tener control del nivel de taponamiento de la membrana. Luego se realizó la excursión de presión, que es la determinación de la presión trans-membranal óptima, por sus siglas en inglés, TMP óptima.

$$TMP_{optima} = \frac{P_1 + P_2}{2}$$

Se estudiaron diferentes presiones de alimentación y de permeado, pero manteniendo una diferencia de presión, ΔP fija e igual a 10 psi. La TMP óptima es aquella donde el flux es máximo e indica la menor área de filtración. Se alimenta la solución de colágeno en ácido acético al tanque de alimentación, el nivel de este tanque permanecerá constante durante la prueba adicionando solución 0,5M de ácido acético, manteniendo constante la TMP óptima se inicia la diafiltración. Se reportan los datos: P_1 , P_2 , tiempo, volumen de permeado y conductividad en el retenido.

Se calculó posteriormente el flux de permeado (L/m².h) para cada ensayo y con el promedio de ellos se calcula el área de filtración necesaria para el volumen real de corrido. Teniendo en cuenta que las pruebas se realizaron con 5 diavolumenes.

4.2 Materiales y equipos

Además del montaje mencionado al inicio de la sección anterior se utilizaron los reactivos: hipoclorito de sodio (13%) grado técnico marca Campota, hidróxido de sodio, ácido acético y cloruro de sodio todos estos de grado analítico marca Merck.

En la etapa enzimática se utilizaron las enzimas Protex 6L y TanG Plus de Genencor, suministradas por Merquiand Ltda, las soluciones tampón se prepararon a partir de bicarbonato de sodio, carbonato de sodio, tetraborato de sodio y fosfato biácido de potasio grado analítico marca Merck S.A. registrando con el medidor de pH *Thermo Scientific – Orion4 Star* (Dinamarca). Además patrón de L-Tirosina de Merck S.A., patrones de albumina de sérica bovina (BSA) de Bio-Rad (USA) y Reactivo de Bradford de Bio-Rad (USA).

La determinación de proteína total por el método de Kjeldhal requirió de solución de ácido sulfúrico 97%, catalizador de sulfato de potasio (97% p/p) y sulfato cúprico (3% p/p), solución de hidróxido de sodio 10 M, solución de ácido bórico 4% p/v, indicador de Tashiro (rojo de metilo y azul de metileno), los reactivos necesarios para la preparación de estas soluciones fueron grado analítico de Merck S.A. Estas pruebas se realizaron en los equipos: Digestor de Proteína *Foss - Tecator 2006* (Dinamarca) y Unidad de Destilación *Foss - Kjeltex System 1002*(Dinamarca) ubicados en el Laboratorio de Análisis Físico-Químico del ICTA y en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental de la UN.

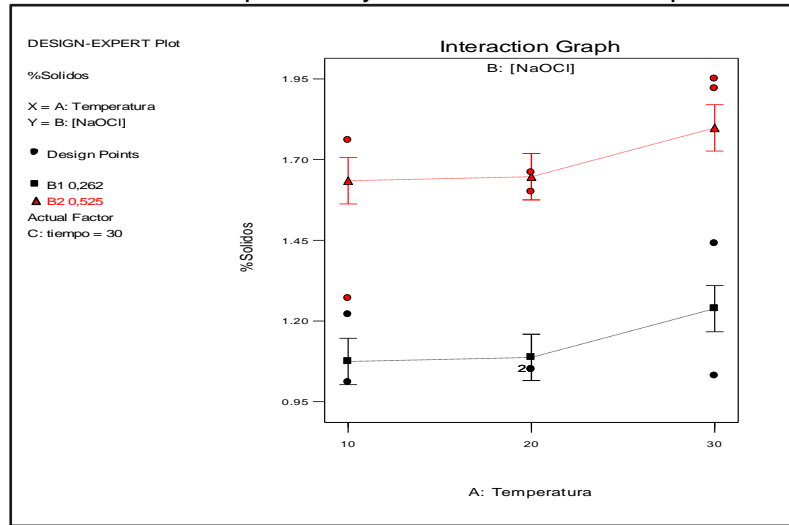
Para cuantificar el aminoácido Hidroxiprolina se utilizaron los reactivos: ácido sulfúrico 3,5 N y 3 N, sulfato de cobre 0,05 M, hidróxido de sodio 2,5 M, peróxido de hidrogeno 6%,p-dimetil amino benzaldehído al 5% en n-propanol, los reactivos necesarios para la preparación de estas soluciones fueron grado analítico de Merck S.A. Se utilizó como patrón de hidroxiprolina (trans-4-Hydroxy-L-proline) de Aldrich. Los equipos utilizados fueron Autoclave, Espectrofotómetro *Thermo Scientific - Genesys UV10* (USA) y Criotermostato de Circulación Julabo - F12 (USA). Estas pruebas se realizaron en el Laboratorio de Ingeniería Bioquímica del LIQ en la UN.

4.3 Resultados y Discusión

4.3.1 Decoloración

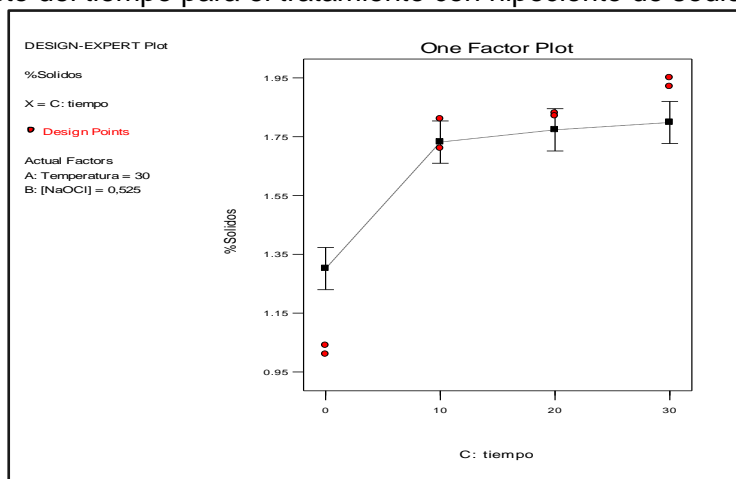
Los resultados de las pruebas planteadas en el diseño experimental del Anexo B para el tratamiento de pieles de tilapia con hipoclorito de sodio fueron analizados con el software estadístico Design Expert. Del análisis de varianza se concluye que los efectos principales son estadísticamente significativos mientras las interacciones dobles y triples no lo son.

Figura4-3: Interacción de la temperatura y la concentración de hipoclorito de sodio.



De la Figura 4-3 se observa que a mayores temperaturas de trabajo y concentraciones de hipoclorito de sodio, para el tiempo de 30 minutos, se consiguen mayores porcentajes de sólidos totales, cuando la concentración es 0,525% el porcentaje de sólidos es 0,51% mayor que cuando la concentración es 0,262%. Porcentajes mayores de sólidos totales nos indican la eliminación de compuestos presentes en la piel que no son deseados en el producto final o pueden interferir con etapas posteriores.

Figura4-4: Efecto del tiempo para el tratamiento con hipoclorito de sodio.



Por último la Grafica 4-4 muestra que no hay un incremento considerable en el porcentaje de sólidos luego de 10 minutos, por lo que se selecciona este tiempo como el necesario para la etapa de decoloración.

Para las pieles de cachama se aplican las mismas condiciones de proceso definidas con las pieles de tilapia: temperatura de 30 °C, concentración de hipoclorito de sodio de 0,525% (p/v) y tiempo de contacto de 10 minutos.

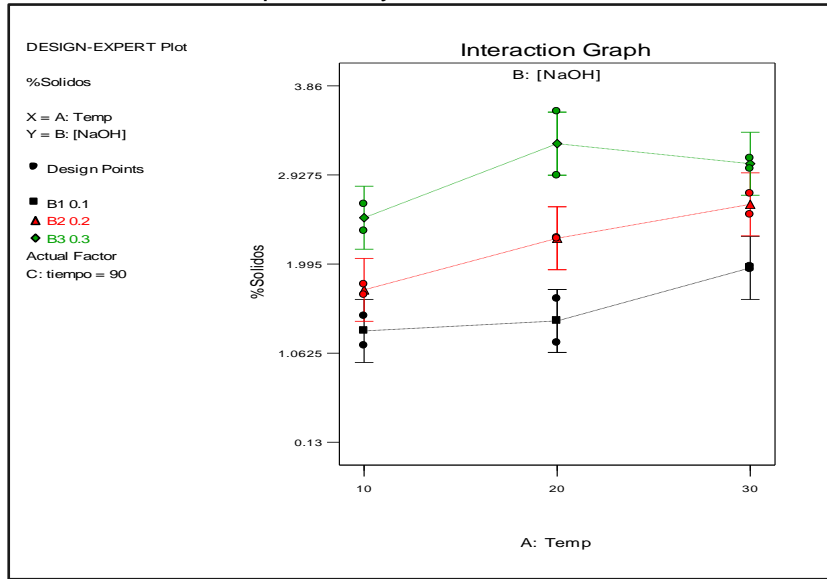
4.3.2 Hidrólisis en medio básico

Antes de realizar las pruebas de hidrólisis en medio básico las pieles de tilapia se trataron con hipoclorito de sodio a las condiciones definidas en el paso anterior (T = 30 °C, [NaClO] = 0,525% (p/v), t = 10 min).

- Tratamiento con hidróxido de sodio, NaOH:

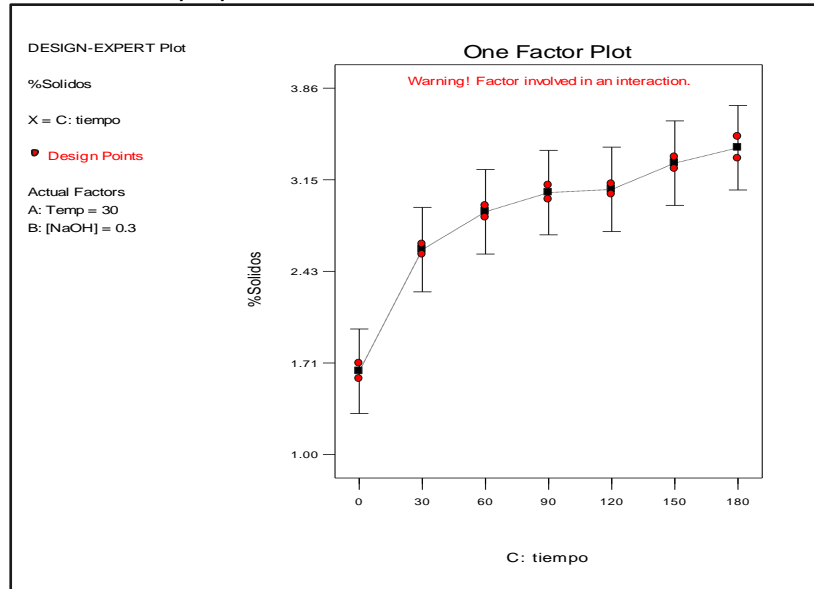
Para el estudio del tratamiento químico de las pieles de tilapia con hidróxido de sodio se analizaron los resultados de las pruebas planteadas en el diseño experimental del Anexo C con ayuda del software estadístico Desing Expert. El análisis de varianza muestra que los efectos principales y las interacciones dobles (temperatura - concentración de hidróxido de sodio y temperatura - tiempo) son estadísticamente significativas a diferencia de la interacción concentración - tiempo y la interacción triple.

Figura4-5: Interacción de la temperatura y la concentración de hidróxido de sodio.



En la 4-5 se aprecia que el porcentaje de sólidos totales aumenta con el incremento de la temperatura, obteniéndose un mayor porcentaje de sólidos cuando se trabaja a 30 °C. En cuanto a la concentración de la solución de hidróxido de sodio, en los ensayos realizados con una solución de NaOH 0.3 M se obtiene una mayor concentración de sólidos totales en el sobrenadante.

Figura4-6: Efecto del tiempo para el tratamiento con el hidróxido de sodio.



Del efecto del tiempo en el porcentaje de sólidos totales cuando $[\text{NaOH}] = 0,3 \text{ M}$ y $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, Figura4-6, se observa que transcurridos 90 minutos el porcentaje de sólidos no

aumenta considerablemente, por lo que se define el tiempo necesario para este tratamiento como 1,5 horas.

- Tratamiento con proteasas:

Teniendo en cuenta la curva de calibración para la composición de L-Tirosina reportada en el Anexo D, y siguiendo el protocolo de este mismo Anexo, se diluye 1 ml de enzima Protex 6L en 10 ml de solución tampón pH = 9,5 y trabajando a temperatura de 35 °C y tiempo de 60 minutos, se obtienen los datos necesarios para el cálculo de la actividad enzimática, con la siguiente ecuación:

$$UP/ml = \frac{Conc. LTirosina * Dilución * PM LTirosina}{tiempo de reacción}$$

La dilución final de la enzima Protex 6L en la solución es 1:30 y el peso molecular de la L-Tirosina es 181,19 g/mol. En promedio la actividad proteolítica de la enzima Protex 6L es **154,3 UP/ml** de enzima, este resultado tiene una desviación estándar de 0,04. Los valores calculados se muestran en la Tabla 4-1.

Tabla 4-1: Resultados actividad proteolítica de la enzima Protex 6L.

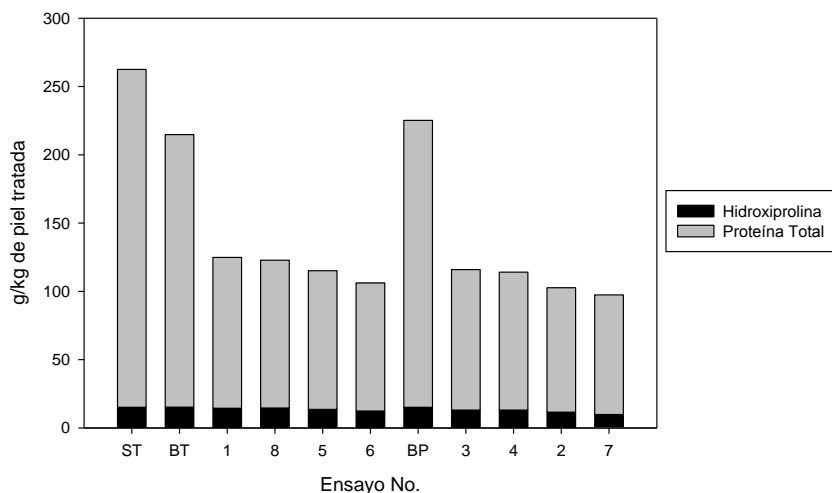
# TUBO	Abs	Abs corregida	UP/ml
1	2,438	2,270	164,055
2	2,227	2,059	148,843
3	2,243	2,075	149,997
4	0,168	Blanco de Enzima	

La dilución final de la enzima TanG Plus en la solución es 1:300. En promedio la actividad proteolítica de la enzima TanG Plus es **1702,45 UP/mL** de enzima, este resultado tiene una desviación estándar de 94,37. Los valores calculados se muestran en la Tabla 4-2.

Tabla 4-2: Resultados actividad proteolítica de la enzima TanG Plus.

# TUBO	Abs	Abs corregida	UP/mL
1	2,707	2,131	1929,77
2	2,692	2,116	1916,22
3	2,519	1,943	1759,96
4	0,576	Blanco de Enzima	

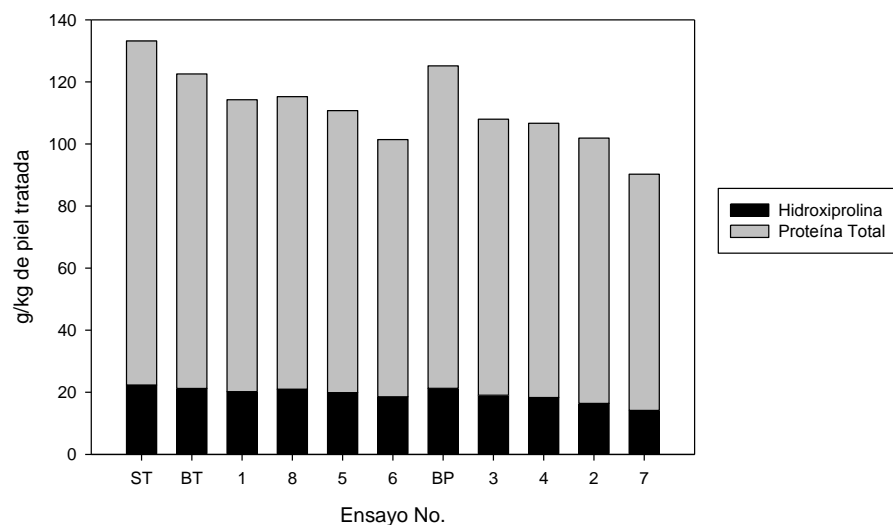
Se aplicó el diseño experimental del Anexo E a pieles de tilapia y cachama, los resultados de la cuantificación de proteína total e hidroxiprolina presentes en las pieles tratadas se muestran en las Figuras 4-7 y 4-8, respectivamente. ST son los resultados para las pieles sin tratamiento, BT y BP son los blancos sin enzima TanG Plus y Protex 6L, respectivamente.

Figura4-7: Resultados Diseño Experimental Anexo E – Pieles de Tilapia.

El análisis de varianza de los resultados obtenidos de las pruebas con pieles de tilapia indica que para el caso de la variable proteína total el efecto del tipo de enzima no es estadísticamente significativo ($P=0,791$) a diferencia de la relación enzima:sustrato ($P=0,03$). Para el caso de la variable hidroxiprolina los dos efectos estudiados son estadísticamente significativos. Para los resultados obtenidos de las pruebas con pieles de cachama el análisis de varianza indica que los efectos estudiados son estadísticamente significativos.

En la Figura 4-7 para las pieles de tilapia y en la Figura 4-8 para las pieles de cachama se observa una relación inversa entre el aumento de las unidades de actividad y la disminución de la proteína total presente en las pieles. Con esto fue posible seleccionar la enzima TanG Plus al 3% para el tratamiento de las pieles tanto de tilapia como de cachama ya que esta enzima disminuye la proteína total a una cantidad aproximadamente igual que la enzima Protex 6L pero mantiene la cantidad de hidroxiprolina, comprendida como colágeno, constante con respecto a las pieles sin ningún tratamiento.

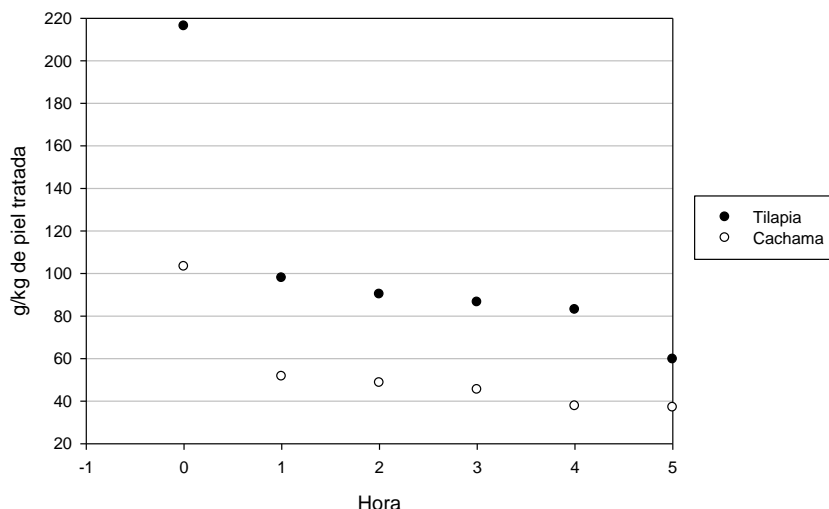
Figura4-8: Resultados Diseño Experimental Anexo E – Pieles de Cachama.



Otro factor para seleccionar la enzima TanG Plus son los costos ya que para tratar 1 kg de pieles se requieren 0,65 g de esta enzima lo cual costaría \$32,5 mientras que trabajar con la enzima Protex 6L costaría \$300/kg de piel tratada para obtener los mismos resultados.

Las condiciones de operación para la etapa enzimática definidas hasta el momento son temperatura de 35 °C y pH = 8,6, con el fin de evaluar el efecto del tiempo se realizó una prueba a estas condiciones con 3% de enzima durante 5 horas tomando muestras cada hora, a las cuales se les determinó el contenido de proteína total.

Figura4-9: Estudio del efecto del tiempo en el tratamiento enzimático de pieles de tilapia y cachama.



Los resultados del efecto del tiempo, Figura4-9, en el tratamiento enzimático de las pieles de tilapia muestran un comportamiento decreciente de la proteína total con el transcurso del tiempo, aunque entre la tercer y la cuarta hora se mantenga constante y luego de la quinta hora disminuya solo en 23 unidades. Estos resultados permiten determinar que con tiempo de residencia superior a 3 horas el beneficio obtenido por el tratamiento enzimático no es sustancial y por lo tanto este debe ser el tiempo límite para el tratamiento de pieles de tilapia a las condiciones mencionadas anteriormente.

Sobre el efecto del tiempo en el tratamiento enzimático de pieles de cachama, se observa un comportamiento decreciente de la proteína total con el transcurso del tiempo donde luego de 4 horas la cantidad de proteína total se mantiene constante. Estos resultados permitieron definir el tiempo del tratamiento enzimático para las pieles de cachama en 4 horas.

Concluida la experimentación en esta etapa del proceso, es posible observar que la enzima TanG Plus aunque presenta un mayor costo por kilogramo y se asocia al uso de sales para mantener constante el pH no aumenta los costos de producción debido a las cantidades mínimas que se utilizan en el tratamiento, así mismo es un tratamiento menos agresivo con las pieles y con el ambiente en comparación con el tratamiento químico con hidróxido de sodio.

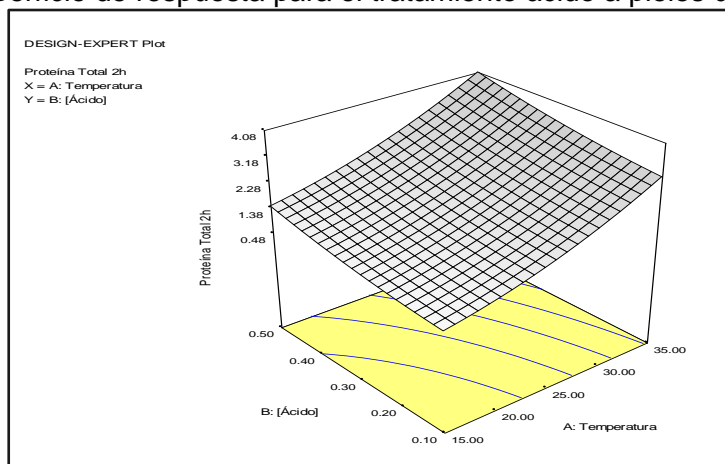
El tratamiento con hidróxido de sodio a su vez requeriría una etapa adicional donde se elimine la grasa de las pieles, esta etapa es suprimida si se trabaja con enzimas, ya que estas eliminan una gran cantidad de grasa presente en las pieles, esto es posible asegurarlo luego de las pruebas realizadas durante la investigación aunque no se realizó una determinación de la grasa total presente en las pieles luego del tratamiento enzimático o químico. Estos beneficios así como los buenos resultados obtenidos permitieron seleccionar el tratamiento enzimático sobre el químico para la eliminación de proteínas no colágenas en las pieles de pescado.

4.3.3 Solubilización de colágeno

Antes de realizar las pruebas de solubilización en medio ácido las pieles de tilapia y cachama se trataron con hipoclorito de sodio a las condiciones definidas ($T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $[\text{NaClO}] = 0,525\%$ (p/v), $t = 10\text{ min}$). Luego de ellos las pieles de tilapia y cachama se trataron con 3% de enzima TanG Plus en una solución con $\text{pH} = 8,6$ y $T = 35\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 3 y 4 horas respectivamente.

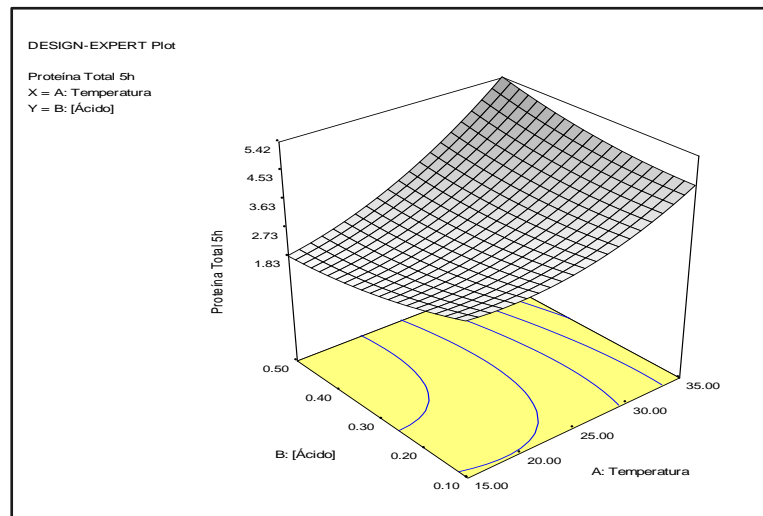
El diseño de experimentos planteado en el Anexo F permitió estudiar los resultados mediante superficies de respuesta con ayuda del software estadístico Design Expert, la Figura 4-10 muestra el efecto que tiene la temperatura y la concentración de ácido en el contenido de proteína total, determinada por el método de Bradford, en el líquido sobrenadante luego de 2 horas de tratamiento a las pieles de tilapia.

Figura4-10: Superficie de respuesta para el tratamiento ácido a pieles de tilapia, $t = 2\text{ h}$.



A continuación en la Figura 4-11 se observan los efectos antes mencionados en el contenido de proteína total en el sobrenadante luego de 5 horas de tratamiento de las pieles de tilapia con ácido. Para los datos de 2 h y 5 h el análisis de varianza indica que los efectos principales son estadísticamente significativos.

Figura4-11: Superficie de respuesta para el tratamiento ácido a pieles de tilapia, t = 5h.



En las dos superficies de respuesta se puede observar que la combinación de la temperatura de 35 °C y la concentración de ácido igual a 0,5 M permiten una mayor solubilización del colágeno, observándose esto en un incremento en la concentración de proteína en el sobrenadante, así mismo comparando las Figuras 4-11 y 4-12 se observa que luego de transcurridas 5 horas el colágeno presente en las pieles de tilapia se solubiliza en mayor proporción.

Se aplicó el mismo diseño de experimentos del Anexo F a las pieles de cachama, se toman muestras luego de 2 y 5 horas de tratamiento y se analizan los resultados con ayuda del software estadístico Design Expert. Los resultados se muestran en las Figuras 4-12 y 4-13.

En las superficies de respuesta se observa que la combinación de la temperatura de 35 °C y la concentración de ácido igual a 0,5 M permiten una mayor solubilización del colágeno, al igual que en el tratamiento de las pieles de tilapia, así mismo comparando las Figuras 4-12 y 4-13 se observa que luego de transcurridas 5 horas el colágeno presente en las pieles de tilapia se solubiliza en mayor proporción.

Figura4-12: Superficie de respuesta tratamiento ácido a pieles de cachama, t = 2h.

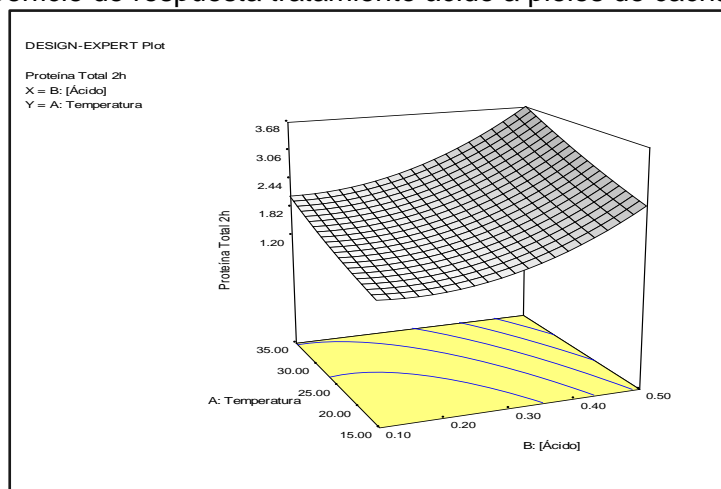
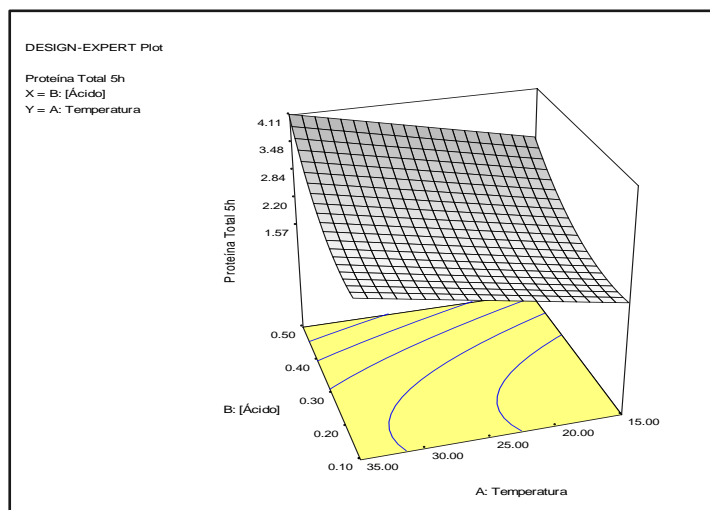


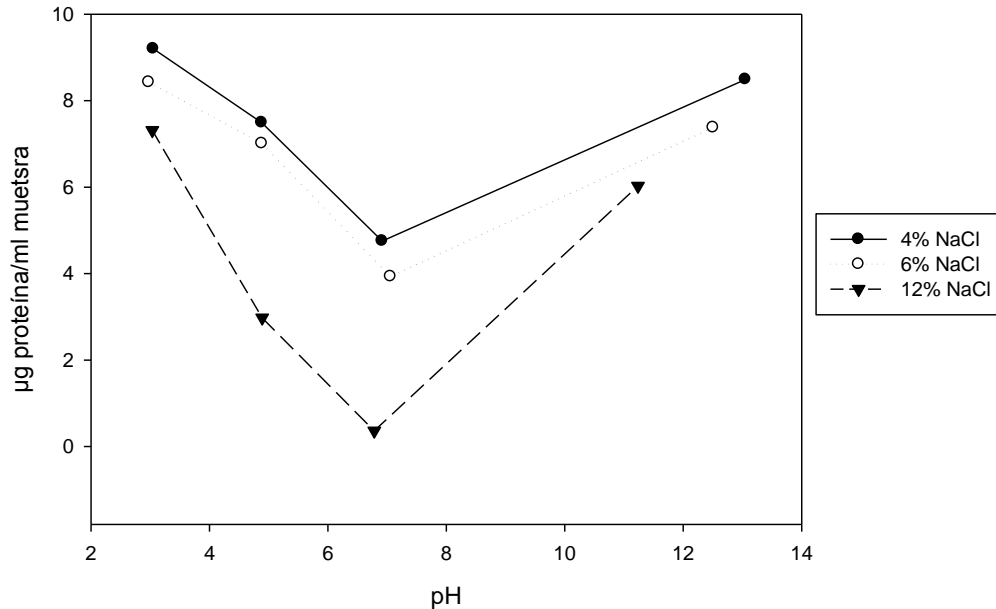
Figura4-13: Superficie de respuesta tratamiento ácido a pieles de cachama, t = 5h.



4.3.5 Precipitación salina

Los resultados de la determinación de proteína total por el Método de Bradford al sobrenadante luego de la adición de diferentes concentraciones de cloruro de sodio se muestran en la Figura4-14.

Figura4-14: Efecto de la concentración de cloruro de sodio y el pH en la solubilidad del colágeno ácido soluble.



Analizando el efecto del pH sobre la solubilidad es posible observar que el punto máximo de solubilidad se obtiene cuando el pH es 3, mientras que cuando el pH es cercano a 7 se presenta el mínimo de solubilidad y un cambio de pendiente en las tendencias que indica el punto isoeléctrico (PI) del colágeno. Y cuando el pH pasa a valores alcalinos de nuevo se incrementa la solubilidad.

De acuerdo a Vojdani (1996) {Zeng, 2009 #16} cuando el pH es menor o mayor al punto isoeléctrico, la carga neta de los residuos de las moléculas de proteína es mayor y la solubilidad se incrementa por las fuerzas de repulsión entre cadenas. En contraste las cargas totales netas de las moléculas de proteína son cero y las interacciones hidrofóbicas aumentan, permitiendo la precipitación y la floculación en el punto isoeléctrico. {Zeng, 2009 #16} reporta el valor del punto isoeléctrico para el colágeno obtenido de piel de tilapia (*Oreochromis niloticus*) en el valor de pH cercano a 7 y referencia el reporte de Foegeding *et al.* (1996) donde se indica que el punto isoeléctrico del colágeno se encuentra entre pH 6 – 9.

Con respecto a la concentración de cloruro de sodio se observa a que mayores concentraciones de NaCl la solubilidad disminuye. Esto sugiere que el incremento de la

fuerza iónica causa interacciones hidrofóbicas entre las moléculas de proteína y entonces la solubilidad disminuye.

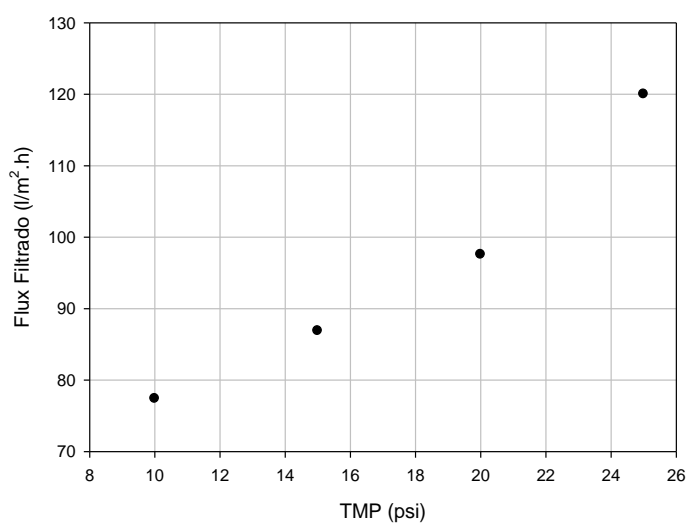
Con estos resultados es posible trabajar en dos puntos, el primero con 12% NaCl sin necesidad de cambiar el pH de la solución de colágeno ácido soluble y el segundo con la misma concentración de 12% de NaCl pero a pH = 7 lo cual indicaría el uso de solución tampón. Se selecciona el punto donde el pH = 3 y 12% NaCl ya que el uso de solución tampón requerirá un estudio más profundo de las fuerzas iónicas involucradas al adicionar al medio sales distintas al cloruro de sodio.

Para mejorar el rendimiento del proceso recuperando mas proteína del medio ácido, es necesario estudiar concentraciones mayores de cloruro de sodio si no se cambia el pH a valores cercanos a 7, esto no es estudiado aquí debido a que el interés no es optimizar la etapa de precipitación salina.

4.3.6 Diafiltración

En primer lugar se realizó la determinación de la presión trans-membranal óptima, TMP, teniendo en cuenta que $\Delta P = 10$ psi, el área de filtración del cassette de filtración utilizado es 50cm^2 y la temperatura de trabajo fue de 20°C .

Figura4-15: Determinación de la presión trans-membranal óptima, TMP.



La presión trans-membranal óptima es aquella donde el flux de permeado, J_{permeado} , es máximo, de la Figura 4-15 se observa TMP máximo es igual a 25 psi. A continuación se muestran los resultados de las pruebas de diafiltración de la solución de colágeno al 0,05% en ácido acético manteniendo la presión trans-membranal constante e igual a 25 psi, $P_1 = 30$ psi y $P_2 = 20$ psi.

Tabla 4-3: Resultados diafiltración de la solución de colágeno al 0,05%.

Tiempo (min)	V_{permeado} (ml)	$V_{\text{permeado ac.}}$ (ml)	F_{permeado} (ml/min)	J_{permeado} ($l/m^2 \cdot h$)	$J_{\text{Dia}} \text{volumen}$ ($l/m^2 \cdot h$)	NaCl (mg/ml)
4	35	35	8,75	105,00		
6,05	25	60	12,20	146,34		
10,77	30	90	6,36	76,27		
14,93	34	124	8,17	98,08		
18,17	26	150	8,02	96,30	99,06	1335
21,85	30	30	8,15	97,83		
26,48	40	70	8,64	103,67		
28,85	20	90	8,44	101,27		
32,18	30	120	9,01	108,11		
35,42	30	150	9,26	111,11	104,35	800
38,53	32	32	10,29	123,47		
41,52	33	65	11,04	132,44		
45,08	30	95	8,43	101,12		
48,25	28	123	8,83	105,99		
50,87	27	150	10,31	123,66	116,50	606
56,82	60	60	10,08	121,01		
59,87	30	90	9,84	118,03		
62,93	30	120	9,80	117,65		
65,87	30	150	10,20	122,45	120,00	527
68,63	30	30	10,87	130,43		
74,58	60	90	10,08	121,01		
77,22	30	120	11,36	136,36		
82,1	30	150	6,15	73,77	110,91	490

El final de esta prueba estuvo marcado por el valor de concentración de iones en el permeado, cuando el tiempo fue igual a 82,1 minutos la concentración de iones en el permeado fue igual a la concentración de iones en la solución de ácido acético inicial.

Con los datos reportados en la Tabla 4-3 obtenemos el flux promedio de permeado durante la corrida, $J_{\text{permeado}} = 111,81 \text{ l/m}^2 \cdot \text{h}$, el flux promedio de diavolumenes, $J_{\text{Diavolumen}} = 110,16 \text{ l/m}^2 \cdot \text{h}$ en un tiempo de 82,1 minutos. Ahora es posible calcular el área necesaria para filtrar 100 l de solución de colágeno al 0,05% que corresponden a 500 l a través de la membrana considerando los 5 diavolumenes utilizados:

$$V_{\text{real de prueba}} = 150\text{ml} * 5\text{diavolumenes} = 750 \text{ ml}$$

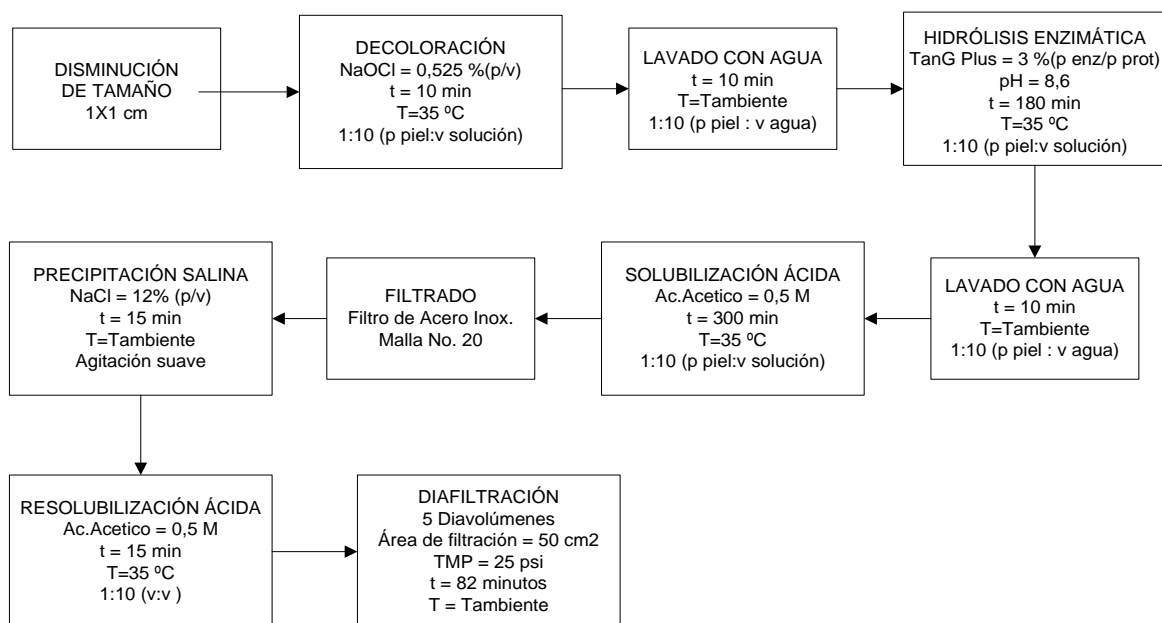
$$A_{\text{min.proceso}} = \left(110,16 \frac{\text{l}}{\text{m}^2 \cdot \text{h}} \right)^{-1} * \frac{500\text{l}}{1,22\text{h}} = 3,72\text{m}^2$$

Con un factor de seguridad del 40% tenemos que el área necesaria para filtrar 100 l de solución de colágeno al 0,05% es $4,83 \text{ m}^2$.

4.3.7 Método estandarizado para la extracción de colágeno a partir de pieles de tilapia

A continuación se muestra el diagrama de flujo del proceso de obtención de colágeno a partir de pieles de tilapia.

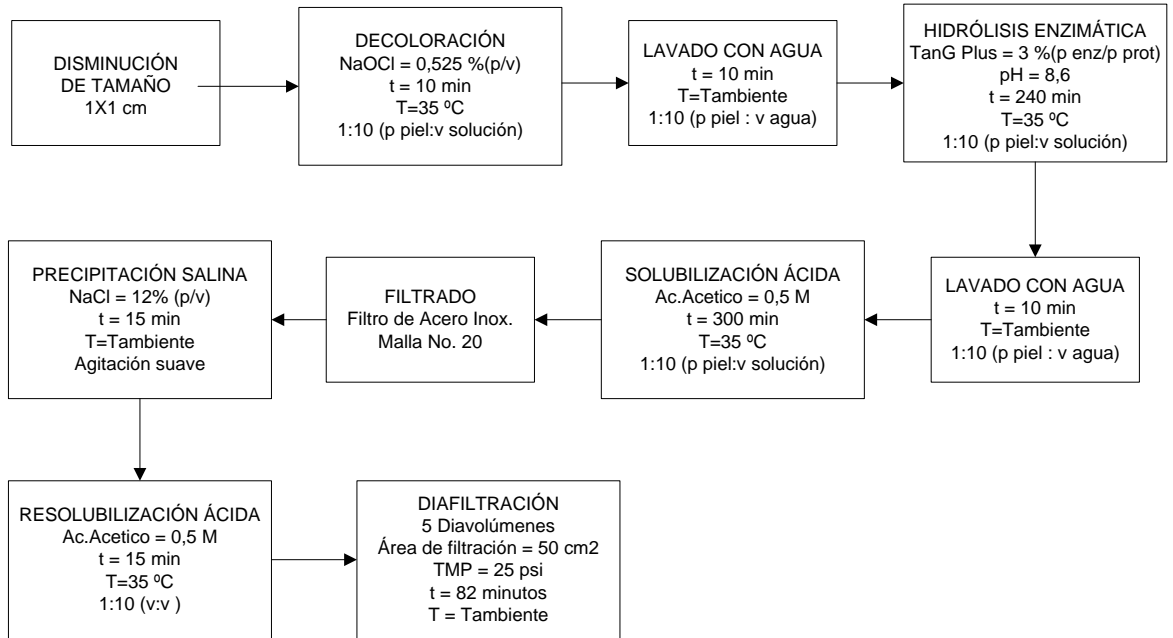
Figura4-16: Diagrama de flujo del proceso de obtención de colágeno a partir de pieles de tilapia.



4.3.8 Método estandarizado para la extracción de colágeno a partir de pieles de cachama

A continuación se muestra el diagrama de flujo del proceso de obtención de colágeno a partir de pieles de cachama.

Figura 4-17: Diagrama de flujo del proceso de obtención de colágeno a partir de pieles de cachama.



5. Caracterización del producto obtenido

5.1 Metodología

La norma técnica colombiana, NTC 3750, indica los requisitos físico-químicos y microbiológicos que debe cumplir el colágeno para fines cosméticos, aunque el fin de esta investigación no es la producción de colágeno para la industria cosmética se aplicaran las pruebas mencionadas en la norma ya que esta es la única en el país para colágeno. Estas pruebas serán preliminares para futuros estudios donde se aplique el colágeno producido siguiendo la metodología descrita en las Figuras 4-16 y 4-17.

5.1.1 Pruebas físico-químicas

- pH: la determinación del pH se realizo en el equipo correspondiente y la muestra húmeda se limpia mediante un filtro Chaman N° 41, para lograr una lectura precisa.
- Contenido de sólidos totales (%):siguiendo el método oficial de la AOAC Internacional, No. 950.46 del año 1998.
- Cuantificación de cenizas totales, método gravimétrico: siguiendo el método de la AOAC No. 920.153 del año 1998.
- Cuantificación del contenido de Hidroxiprolina: se sigue el método descrito en la Norma Técnica Colombiana NTC 3750, (ICONTEC 1995). El contenido de colágeno en la muestra es igual al contenido de hidroxiprolina multiplicado por 7,46.

5.1.2 Pruebas microbiológicas

Para estas pruebas se sigue el método descrito en la Norma Técnica Colombiana NTC 3750, (ICONTEC 1995).

5.1.3 Determinación de la temperatura de desnaturalización

En la calorimetría diferencial de barrido (DSC) aparece en muchas ocasiones el problema del solapamiento de procesos, de este modo, dos o más procesos pueden confundirse debido a que suceden a las mismas temperaturas y bajo las mismas condiciones, para minimizar este problema se recurre a la utilización del DSC con modulación de temperatura o MTDSC. Al aplicar los métodos de transformada de Fourier, la señal total se desconvoluciona matemáticamente en dos partes, a saber, una señal de flujo de calor reversible y una señal de calor irreversible. La primera se relaciona con el componente de la capacidad calorífica del termograma y la segunda se relaciona con los procesos cinéticos.

La transición térmica del colágeno fue determinada en un calorímetro diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés) Universal V2.5H TA Instrument, aplicando un método modulado donde se evaluó el intervalo de temperatura entre 10 y 60 °C con una velocidad de calentamiento de 1 °C/min. Nitrógeno fue utilizado como refrigerante y el sistema se equilibra a 10 °C por 5 minutos luego del escáner. La calibración del equipo se realizó con un patrón de Indio (In).

5.1.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida, SDS – PAGE

La electroforesis es un método analítico – semipreparativo, en el que se separan biomoléculas, en dependencia entre otros factores de su carga y bajo la acción de un campo eléctrico. La electroforesis SDS – PAGE fue desarrollada siguiendo el método de Laemmli (1970) usando un gel de separación de 5% y otro concentrador del 4%. Las muestras fueron mezcladas con solución de Laemmli (62,5mM Tris-HCl, pH 6,8, 25 % glicerol, 2 % SDS, 0,01% azul de bromofenol) y β -mercaptoetanol, luego calentadas a temperatura de ebullición durante 15 minutos. Las muestras son sometidas a electroforesis con voltaje constante (100 V). Luego de la electroforesis, el gel fue coloreado con azul de Coomassie y decolorados con agua caliente. 20 μ l de muestra fueron cargados en cada pozo.

5.2 Materiales y equipos

Para cuantificar el aminoácido Hidroxiprolina se utilizaron los reactivos: ácido sulfúrico 3,5 N y 3 N, sulfato de cobre 0,05 M, hidróxido de sodio 2,5 M, peróxido de hidrogeno

6%,p-dimetil amino benzaldehído al 5% en n-propanol, los reactivos necesarios para la preparación de estas soluciones fueron grado analítico de Merck S.A. Se utilizo como patrón de hidroxiprolina (trans-4-Hydroxy-L-proline) de Aldrich. Los equipos utilizados fueron Autoclave, Espectrofotómetro *Thermo Scientific - Genesys UV10* (USA) y Criotermostato de Circulación Julabo - F12 (USA). Estas pruebas se realizaron en el Laboratorio de Ingeniería Bioquímica del LIQ en la UN.

Además los medios de cultivo para los análisis microbiológicos: Agar recuento en placa estándar (APHA) para mesófilos, Agar extracto de levadura – glucosa – oxitetraciclina (OGYE) para hongos y levaduras, Agar de cristal violeta rojo neutro - bilis – glucosa (VRBG) para entero bacterias, Agar azul de metileno – eosina (EMB) para Gram-negativos, Agar triptona sulfodiazina neomicina (TSN) para *Clostridium*, Agar Cetrimide para *Pseudomonas*, Agar sulfito de bismuto para *Salmonella* y Agar Baird – Parker para *Staphylococcus Aureus*. Estos análisis se realizar en el laboratorio de microbiología del Departamento de Farmacia de la UN.

Para la preparación del gel de electroforesis se utilizaron las soluciones: acrilamida/Bis (30% T, 2.67% C), SDS 10 % (p/v), 1.5 M Tris- HCl, pH 8.8, 0.5 M Tris HCl, pH 6.8, Persulfato de amonio 10% (p/v), N,N,N',N' tetra-metiletilendiamina (TEMED): Para la preparación de la muestra se utilizo: Buffer de muestra Laemmli y β -mercaptoetanol Además del buffer de corrida 10x, pH 8.3 El patrón de peso molecular de amplio rango preteñido. Todos los reactivos y patrones de Bio-Rad (USA). Se utilizo la celda de electroforesis Bio-Rad *Mini-PROTEAN Tetra Cell* (USA) y la fuente de poder Bio-Rad *Power Pac HC* (USA).

5.3 Resultados y análisis

A continuación se muestran los resultados obtenidos para la caracterización de los productos finales obtenidos con el método descrito en este trabajo a partir de piel de tilapia y piel de cachama.

5.3.1 Pruebas físico-químicas

La Norma Técnica Colombiana NTC 3750 {ICONTEC, 1995 #41} indica los requisitos mínimos que debe cumplir el colágeno ácido soluble para la industria cosmética, estos

requisitos y los resultados de las pruebas realizadas al colágeno obtenido siguiendo la metodología propuesta en este trabajo se muestran en la Tabla 5-1 y 5-2.

Tabla 5-1: Requisitos físico-químicos del colágeno según NTC 3750.

Requisito	Valor Requerido	Valor Obtenido Producto Final
pH	(3 - 4)	3,2
Contenido de sólidos (%)	5 máx.	0,9
Hidroxiprolina (%)	0,134 min.	0,136
Colágeno soluble (%)	1 min.	1,01
Cenizas (%)	1 máx.	0,5

De la Tabla 5-1 se observa que el producto obtenido cumple con los requisitos físico-químicos de la NTC 3750.

5.3.2 Pruebas microbiológicas

La Tabla 5-2 muestra los requisitos microbiológicos y los resultados de las pruebas realizadas al colágeno obtenido siguiendo la metodología propuesta en este trabajo, donde se aprecia que el colágeno obtenido de piel de tilapia y el obtenido de piel de cachama cumplen con los requerimientos de la reglamentación colombiana. Esto demuestra que el tratamiento de decoloración permite la reducción de la carga microbiana por debajo de los requerimientos de la Norma Técnica Colombiana.

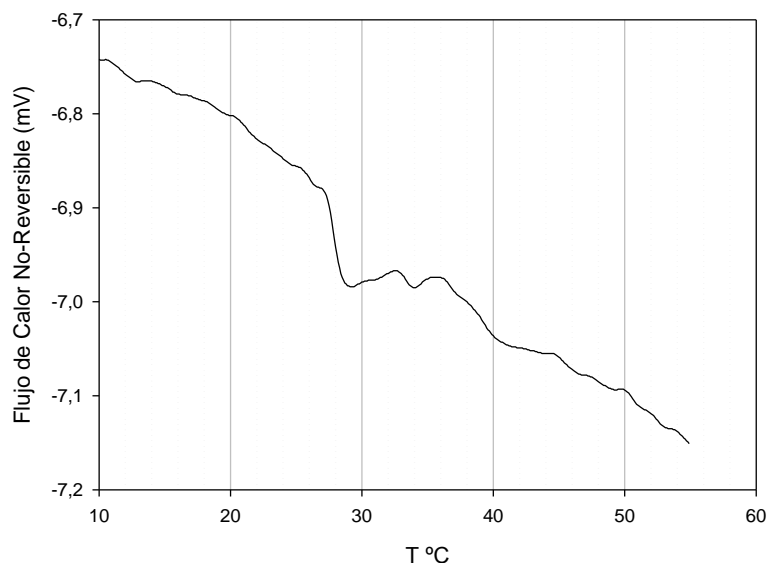
Tabla 5-2: Pruebas microbiológicas del colágeno según NTC 3750.

Requisitos	Requerido	Determinado
Recuento total de mesófilos	<100 UFC/g	<10 UFC/g
Microorganismos patógenos	Ausentes	Ausentes
Hongos y Levaduras	< 10 UFC/g	<10 UFC/g

5.3.3 Determinación de la temperatura de desnaturalización

A continuación se muestran los resultados de flujo de calor no-reversible (mV) para el colágeno obtenido a partir de pieles de tilapia y de pieles de cachama.

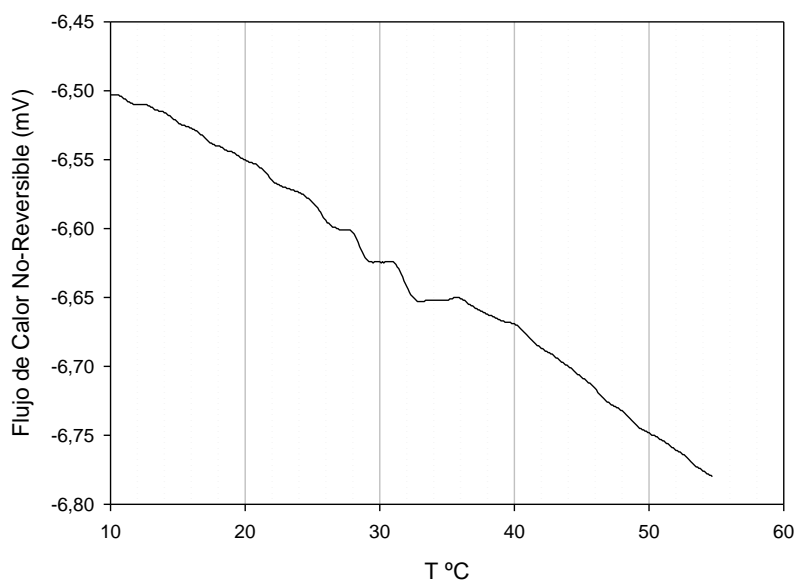
Figura5-1: Termograma para el colágeno obtenido a partir de pieles de tilapia.



El colágeno final obtenido a partir de pieles de tilapia presento una temperatura de desnaturalización igual a 29 °C, este valor es 8 °C menor a la temperatura encontrada en las pruebas preliminares. Es necesario tener en cuenta que el termograma de la muestra preliminar no se desarrollo por el método modulado como las muestras finales, así que la lectura preliminar de la temperatura de desnaturalización pudo ser errónea debido a las interferencias que se pueden ocasionar por no desconvolucionar las señales de flujo de calor.

En el termograma igualmente se observa un pico en el flujo de calor no-reversible que en el caso de las proteínas indica el desdoblamiento de esta y la pérdida de su estructura secundaria o terciaria, debido a esto es posible afirmar que el colágeno obtenido de pieles de tilapia no se desnaturalizó debido a las temperaturas de trabajo superiores a la temperatura de desnaturalización mostradas por el termograma.

Figura 5-2: Termograma para el colágeno obtenido a partir de pieles de cachama.



Para el caso del colágeno obtenido a partir de pieles de cachama se observa en la Figura 5-2 que la temperatura de desnaturalización es cercana a 33°C, al igual que en el caso anterior gracias a este pico de temperatura es posible afirmar que este colágeno no se desnaturalizó durante el proceso de extracción.

Estos resultados confirman que a mayores contenidos de hidroxiprolina de la piel del pescado, para la piel de cachama 22,33 mg/g piel y para la piel de tilapia 15,11 mg/g, el colágeno obtenido a partir de estas pieles es térmicamente más estable. Esto se observa cuando el valor de la temperatura de desnaturalización del colágeno obtenido a partir de pieles de cachama, $T_d = 33^\circ\text{C}$, es superior a la temperatura de desnaturalización del colágeno obtenido a partir de pieles de tilapia, $T_d = 29^\circ\text{C}$.

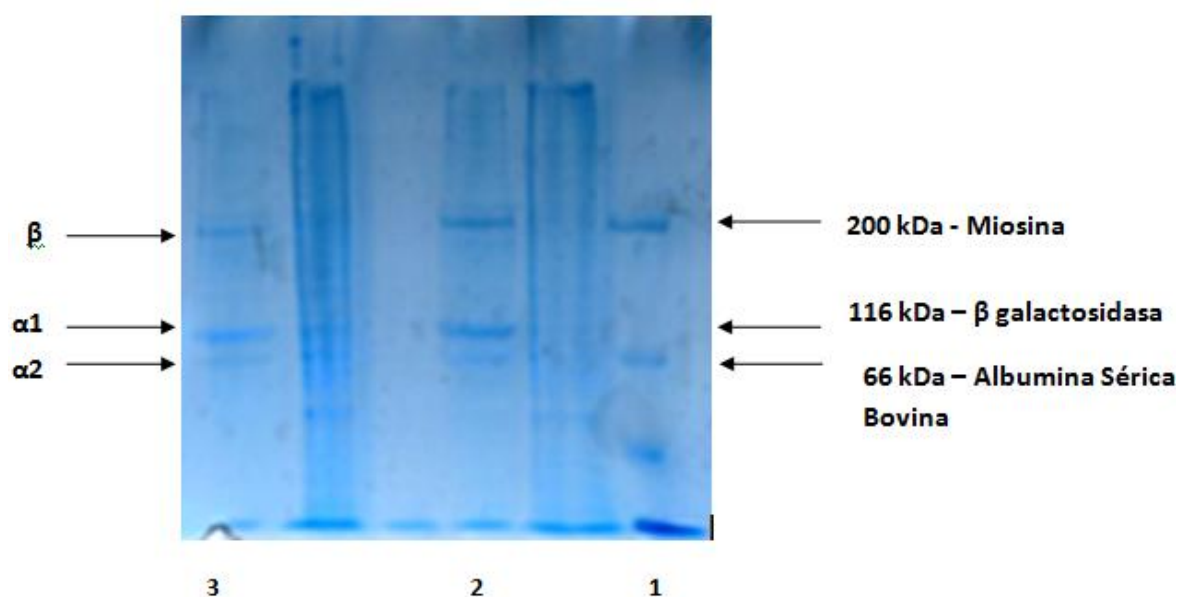
5.3.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida, SDS – PAGE

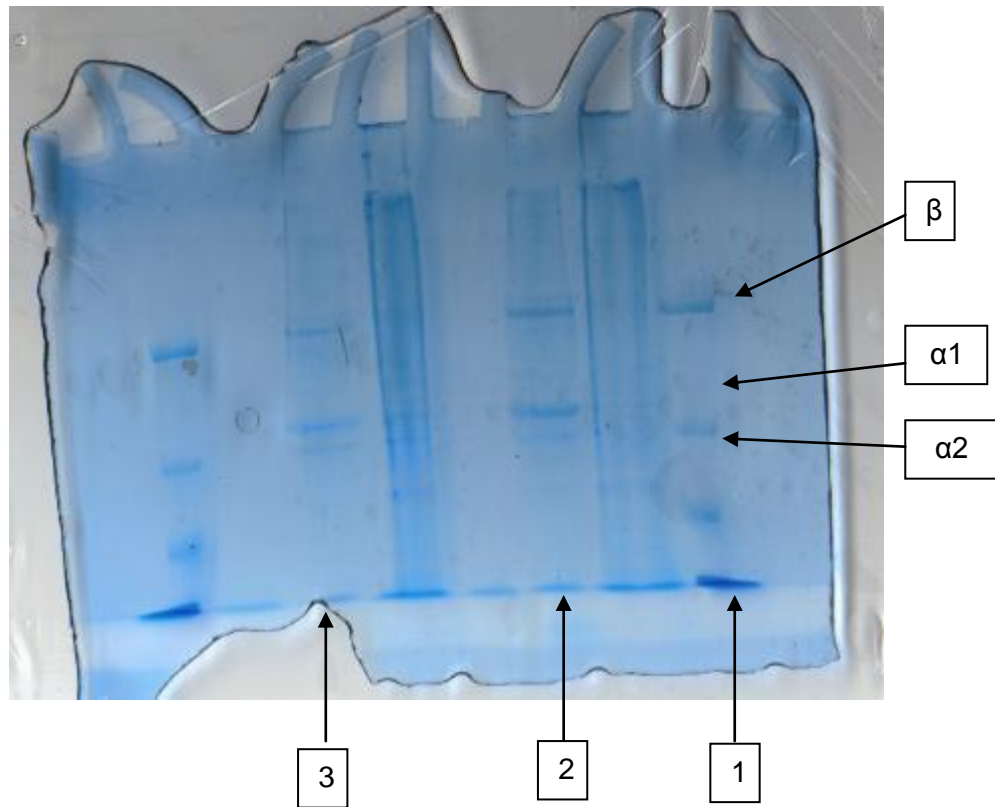
El gel de poliacrilamida al 5% se utilizó como gel separador ya que permite la separación de moléculas de entre 60 – 212 kD. Se encontró que tanto el colágeno de piel de tilapia como el extraído de piel de cachama se componen principalmente por dos cadenas (α_1 y

α_2) Los componentes de alto peso molecular, como la cadena β también se observan en la Figura 5-3.

El comportamiento de las muestras de tilapia y cachama es similar al presentado por colágeno tipo I obtenido a partir de piel de becerro y otras especies de pescado por otros autores como {Zhang, 2009 #28}, {Zhang, 2009 #27} {Zeng, 2009 #16}. Estos resultados sugieren que el colágeno obtenido a partir de pieles de tilapia y de cachama mediante el proceso estandarizado en este trabajo es colágeno tipo I.

Figura 5-3: Gel de Electroforesis de poliacrilamida – SDS.





En el carril 1 se muestra en patrón de peso molecular de alto rango, en el 2 la muestra de colágeno obtenido a partir de pieles de tilapia y en 3 la muestra de de colágeno obtenido a partir de pieles de cachama.

6. Conclusiones

Según los resultados de este trabajo las pieles de tilapia y cachama provenientes del proceso de fileteo son una fuente alternativa a las pieles de bovinos y porcinos para la extracción de colágeno tipo I.

Se caracterizaron las pieles de tilapia y cachama provenientes de MetaFish Food Company S.A. en el Departamento del Meta, y se encontró que la piel de cachama presenta un mayor contenido de grasa y de hidroxiprolina que la piel de tilapia. Estas características la hacen más elástica y resistente a los tratamientos del proceso.

Se estandarizó un proceso de extracción y purificación de colágeno a partir de pieles de tilapia y cachama. Este proceso se evaluó por separado para cada especie pero es posible aplicarlo a una mezcla de pieles de ambas especies siguiendo la metodología que se estableció para las pieles de cachama.

Durante el estudio de las etapas del proceso se observó la importancia de incluir una etapa de blanqueamiento de las pieles cuando estas sean de color oscuro con el fin de eliminar las células cromatóforas, este blanqueo es necesario para obtener un producto que cumpla con el requerimiento de color de la NTC 3750.

El uso de enzimas proteolíticas en lugar de hidróxido de sodio en la etapa de eliminación de proteínas no colágenas ofrece mejores resultados, especialmente cuando se utilizan enzimas selectivas al colágeno.

Se obtuvo colágeno a partir de las pieles de tilapia y de cachama. El colágeno obtenido es del tipo I según los resultados de electroforesis y cumple con los requisitos físico-químicos y microbiológicos de la normatividad colombiana.

El rendimiento del proceso se calculó en 1 g de colágeno por 10 g de piel que se procesen, lo cual indica un 33,3 % en base seca.

Se comprobó que cuando las pieles evaluadas presentan un mayor contenido de hidroxiprolina el colágeno obtenido a partir de esta piel es térmicamente más estable, para nuestro caso de estudio el colágeno obtenido de piel de cachama presenta una temperatura de desnaturalización superior al colágeno obtenido de piel de tilapia.

7. Recomendaciones

Las pieles que se incorporen al proceso deben tener una composición proximal y un contenido de hidroxiprolina similar a las pieles objeto de estudio en este trabajo para obtener los mismos resultados.

Realizar un estudio del proceso de extracción utilizando una mezcla de pieles de tilapia y cachama con el fin de revisar el rendimiento del proceso.

La etapa de solubilización ácida requerirá tiempos superiores a 5 horas para solubilizar el total del colágeno presente en las pieles.

Para la etapa de precipitación se requiere el estudio de mayores concentraciones de cloruro de sodio manteniendo el pH constante para obtener mayores recuperaciones de colágeno y aumentar el rendimiento del proceso.

El estudio de la etapa de diafiltración debe realizarse con soluciones de colágeno de concentraciones mayores a 0,05% con el fin de disminuir los volúmenes de procesamiento, cuidando no obstruir los poros de la membrana.

Realizar un seguimiento del contenido de colágeno en las pieles durante las etapas de extracción con el fin de buscar las etapas donde se pierda el producto de interés.

Es necesario realizar un perfil de aminoácidos del colágeno obtenido con el fin de definir su composición exacta. Además para futuras aplicaciones, como ingeniería de tejidos o cosméticos es necesario realizar pruebas que permitan observar el efecto del producto en el cuerpo humano, su efectividad y calidad.

8. Bibliografía

- Bae, I., K. Osatomi, et al. (2008). "Biochemical properties of acid-soluble collagens extracted from the skins of underutilised fishes." Food Chemistry**108**(1).
- Bitar, M., V. Salih, et al. (2007). "Effect of multiple unconfined compression on cellular dense collagen scaffolds for bone tissue engineering." J Mater Sci: Mater Med**18**: 237–244.
- Devlin, T. (2004). Bioquímica, libro de texto con aplicaciones clínicas. Barcelona, Editorial Reverté S.A.
- Duan, R., Z. J., et al. (2009). "Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*)." Food Chemistry**112**: 702-706.
- FAO. (2007-2011). "Visión general del sector acuícola nacional. China. National Aquaculture Sector Overview Fact Sheets." Retrieved 4 de abril, 2011, from http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_china/es.
- Gelse, K., E. Pöschl, et al. (2003). "Collagens - structure, function, and biosynthesis." Advanced Drug Delivery Reviews**55**: 1531 - 1546.
- González Tuero, J., R. Rodríguez Ramírez, et al. (2004). "Heridas. Métodos de tratamiento." Retrieved 4 de abril, 2011, from http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol8_1_04/san07104.htm.
- Hunter, R. J. (1981). "Zeta Potential in Colloid Science- Principles and Applications." Academic Press**New York** 59-121.
- ICONTEC (1995). Productos para la industria cosmética: Colágeno soluble. NTC 3750. Bogotá D.C.
- Karim, A. A. and R. Bhat (2009). "Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins." Food Hydrocolloids**23**: 563-576.

- Kittiphattanabawon, P., S. Benjakul, et al. (2010). "Isolation and Characterisation of collagen from the skin of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*)."
Food Chemistry**119**(41519-1526).
- Lu, Q., K. Ganesan, et al. (2004). "Novel porous aortic elastin and collagen scaffolds for tissue engineering." Biomaterials**25**: 5227-5237.
- Mathews, C., K. van Holde, et al. (2002). Bioquímica. Madrid, Pearson Educación, S.A.
- Muyonga, J. H., C. G. B. Cole, et al. (2004). "Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*)."
Food Chemistry**85**: 81-89.
- Nagai, T. and T. Suzuki (1999). "Isolation of collagen from fish waste material: (skin, bone and fins)."
Food Chemistry**68**: 277-281.
- Potaros, T., N. Raksakulthai, et al. (2009). "Characteristics of collagen from Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin isolated by two different methods." Kasetsart Journal**43**: 584-593.
- Ricard-Blum, S. and F. Ruggiero (2005). "The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane." Pathologie biologique**53**: 430 - 442.
- Riesle, J., A. P. Hollander, et al. (1998). "Collagen in Tissue-Engineered Cartilage: Types, Structure, and Crosslinks." Journal of Cellular Biochemistry**71**: 313–327
- Sadowska, M., I. Kolodziejska, et al. (2003). "Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*)."
Food Chemistry**81**(2): 257-262.
- Sato, K., K. Yomogida, et al. (2002). "Type XXVI collagen, a new mMember of the collagen family, is specifically expressed in the testis and ovary." The journal of biological chemistry**277**(4): 37678-37684.
- Schoof, H., J. Apel, et al. (2001). "Control of Pore Structure and Size in Freeze-Dried Collagen Sponges." Journal of Biomedical Materials Research**58**(4): 352-357.
- Senaratne, L., P. Park, et al. (2006). "Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish (*Lagocephalus gloveri*) skin." Bioresource technology**97**: 191-197.
- Villela, I. J. (2004). Evaluación a la Microestructura y a las Propiedades Mecánicas del Acero Inoxidable 316LS y del Titanio Ti-6Al-4V como Biomateriales. Departamento de Ingeniería Mecánica, Escuela de Ingeniería, Universidad de las Américas Puebla.

-
- Wang , L., X. An, et al. (2008). "Isolation and characterisation of collagens from the skin, scale and bone of deep-sea redfish (*Sebaste mentella*)." Food Chemistry**108**(2): 616-623.
- Woo, J. W., S. J. Yu, et al. (2008). "Extraction optimization and properties of collagen from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) dorsal skin." Food Hydrocolloids**22**(5): 879-887.
- Zeng, S., C. Zhang, et al. (2009). "Isolation and characterisation of acid-solubilised collagen from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)." Food Chemistry**116**(2): 879-883.
- Zhang, J., R. Duan, et al. (2009). "Characterisation of acid-soluble collagen from skin of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*)." Food Chemistry**2009**: 318-322.
- Zhang, M., W. Liu, et al. (2009). "Isolation and characterisation of collagens from the skin of largefin longbarbel catfish (*Mystus macropterus*)." Food Chemistry**115**: 826-831.
- Zhang, Y., W. Liu, et al. (2007). "Isolation and partial characterization of pepsin-soluble collagen from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)." Food Chemistry**103**: 906-912.

ANEXOS

ANEXO A

Características de algunos tipos de colágeno (Gelse *et al.* 2003; Ricard-Blum and Ruggiero 2005)(Sato *et al.* 2002).

Tipo	Organización molecular	Distribución tisular	Detalles estructurales
I	$[\alpha 1(I)]_2 [\alpha (I)]$	Dermis – Hueso – Tendón – Ligamentos – Cornea	fibrillas estriadas de 20 a 100 nm de diámetro, agrupándose para formar fibras de colágeno mayores
II	$[\alpha 1(II)]_3$	Cartílago – Núcleo pulposo y el humor vítreo del ojo	fibrillas finas de 10 a 20 nanómetros, pero en otros microambientes puede formar fibrillas más grandes, indistinguibles morfológicamente del colágeno tipo I
III	$[\alpha 1(III)]_3$	Tejido conjuntivo laxo - Vasos sanguíneos – Dermis	constituyente importante de las fibras de 50 nanómetros que se han llamado tradicionalmente <i>fibras reticulares</i>
IV	$[\alpha 1(IV)]_2$ $[\alpha 2(IV)]$	Membrana basal - placas anclaje	No se polimeriza en fibrillas, sino que forma un fieltro de moléculas orientadas al azar, asociadas a proteoglicanos y con las proteínas estructurales laminas y fibronectina
V	$[\alpha 1(V)] [\alpha 2(V)]$ $[\alpha 3(V)]$	Cornea – Hueso – pulmón	Se asocia con el tipo I

VI	[α 1(VI)] [α 2(VI)] [α 3(VI)]	Dermis – cartílago – placenta – discos intervertebrales	Sirve de anclaje de las células en su entorno. Se asocia con el tipo I
VII	[α 1 (VII)] ₃	Piel – mucosa oral - cérvix	
VIII	[α 1(VIII)] ₂ [α 2(VIII)]	Células endoteliales	
IX	[α 1 (IX)] [α 2 (IX)] [α 3 (IX)]	Cartílago - cornea	Interactúa con el tipo II
X	[α 1 (X)] ₃	Cartílago hipertrófico y mineralizado	
XI	[α 1 (XI)] [α 2 (XI)] [α 3 (XI)]	Cartílago	Interactúa con los tipos II y IX.
XII	[α 1 (XII)] ₃	Tendones - ligamentos	Interactúa con los tipos I y III.
XIII	[α 1 (XIII)] ₃	Intestinos – Epidermis – folículo piloso	Interactúa con los tipos I y III.
XIV	[α 1 (XIV)] ₃	Dermis – tendón – vasos sanguíneos	
XV	[α 1 (XV)] ₃	Fibroblastos – células de músculos lisos	
XVI	[α 1 (XVI)] ₃	Fibroblastos - queratinocitos	
XVII	[α 1 (XVII)] ₃	Uniones dermis - epidermis	
XVIII	[α 1 (XVIII)] ₃	Pulmón	
XIX	[α 1 (XIX)] ₃	Miosarcoma humano	
XX	[α 1 (XX)] ₃	Epitelio corneal – piel del embrión	
XXI	[α 1 (XXI)] ₃	Paredes de vasos sanguíneos	
XXVI		Testículo y Ovario de adultos	

ANEXO B

Diseño experimental y resultados para el estudio de la etapa de blanqueamiento de pieles de tilapia con hipoclorito de sodio, con el apoyo del software estadístico Design Expert.

Ensayo No.	T (°C)	% NaCl	tiempo (min)	% sólidos	Ensayo No.	T (°C)	% NaCl	tiempo (min)	% sólidos
1	30	0,262	30	1,03	25	10	0,525	0	1,24
2	10	0,262	0	0,6	26	10	0,262	20	0,97
3	10	0,525	10	1,67	27	20	0,525	20	1,64
4	10	0,262	10	0,91	28	30	0,525	10	1,71
5	30	0,262	10	1,01	29	30	0,525	20	1,82
6	10	0,525	20	1,64	30	10	0,525	0	1,19
7	20	0,262	0	0,62	31	20	0,525	20	1,65
8	10	0,262	30	1,01	32	20	0,262	10	0,99
9	20	0,262	20	1,02	33	20	0,262	10	0,99
10	10	0,262	20	1,11	34	30	0,525	20	1,83
11	20	0,525	0	1,19	35	30	0,262	10	1,37
12	30	0,262	30	1,44	36	10	0,525	20	1,58
13	10	0,262	10	1,03	37	30	0,262	20	1,32
14	20	0,525	10	1,61	38	30	0,525	30	1,95
15	10	0,525	10	1,55	39	30	0,525	0	1,04
16	20	0,262	30	1,05	40	10	0,525	30	1,76
17	30	0,262	0	0,64	41	20	0,525	10	1,51
18	30	0,525	10	1,81	42	30	0,525	0	1,01
19	10	0,262	0	0,57	43	20	0,262	0	0,66
20	20	0,262	20	1,02	44	20	0,525	0	1,26
21	20	0,525	30	1,66	45	30	0,262	0	0,98
22	10	0,262	30	1,22	46	30	0,525	30	1,92
23	30	0,262	20	1,06	47	20	0,525	30	1,6
24	10	0,525	30	1,27	48	20	0,262	30	1,05

ANEXO C

Diseño experimental para el estudio de la etapa de hidrólisis química en medio básico de pieles de tilapia, con el apoyo del software estadístico Design Expert.

Ensayo No.	T (°C)	NaOH M	tiempo (min)	% sólidos	Ensayo No.	T (°C)	NaOH M	tiempo (min)	% sólidos
1	20	0.1	120	1,87	64	30	0.3	0	1,71
2	30	0.1	120	2,72	65	10	0.3	0	1,44
3	20	0.2	120	2,35	66	30	0.1	0	0,65
4	10	0.3	60	2,31	67	20	0.3	180	3,45
5	10	0.2	30	1,46	68	10	0.1	120	1,38
6	30	0.1	90	1,94	69	20	0.3	90	3,59
7	30	0.1	30	1,89	70	20	0.3	120	3,19
8	10	0.2	150	1,93	71	30	0.2	0	1,03
9	10	0.2	0	0,86	72	10	0.1	60	1,35
10	30	0.1	180	2,81	73	30	0.3	150	3,32
11	10	0.1	30	0,86	74	20	0.2	60	2,09
12	10	0.2	120	1,87	75	30	0.2	150	3,14
13	10	0.1	120	1,36	76	10	0.2	120	1,87
14	10	0.2	180	1,97	77	10	0.3	60	2,65
15	30	0.2	60	2,23	78	10	0.1	150	1,48
16	30	0.3	180	3,31	79	30	0.2	90	2,51
17	20	0.3	90	2,92	80	30	0.1	0	0,14
18	20	0.1	150	1,16	81	30	0.2	120	2,76
19	20	0.3	150	3,47	82	20	0.3	60	3,59
20	20	0.2	60	2,18	83	20	0.2	180	2,5
21	30	0.2	150	2,84	84	10	0.1	180	1,75
22	30	0.2	30	1,88	85	10	0.3	0	1,64
23	30	0.3	30	2,64	86	30	0.2	30	2,19
24	20	0.2	30	2,02	87	30	0.2	90	2,73
25	10	0.3	150	2,54	88	10	0.2	0	1,06
26	20	0.2	0	1,23	89	30	0.3	90	2,99
27	20	0.3	180	3,16	90	30	0.3	180	3,48
28	20	0.2	150	2,45	91	20	0.1	90	1,17
29	10	0.2	90	1,67	92	10	0.3	120	3,86
30	30	0.3	0	1,59	93	20	0.3	150	3,3
31	10	0.2	60	1,57	94	10	0.3	120	2,76
32	20	0.1	60	1,02	95	30	0.2	180	3,36
33	20	0.1	180	0,14	96	30	0.1	150	2,27
34	30	0.1	30	1,43	97	20	0.2	90	2,26

35	10	0.3	180	2,56	98	30	0.1	120	2,21
36	10	0.2	30	1,36	99	10	0.2	90	1,78
37	10	0.1	0	0,46	100	10	0.3	90	2,34
38	10	0.2	60	1,61	101	10	0.3	30	1,99
39	20	0.1	0	0,24	102	30	0.3	30	2,56
40	20	0.3	0	1,59	103	10	0.1	180	1,78
41	30	0.1	90	1,97	104	20	0.1	90	1,63
42	20	0.2	90	2,27	105	20	0.3	30	2,42
43	30	0.1	60	1,94	106	10	0.2	150	2,29
44	10	0.2	180	2,02	107	20	0.2	150	2,37
45	30	0.3	60	2,94	108	30	0.2	120	2,97
46	30	0.3	150	3,23	109	10	0.1	30	1,13
47	10	0.1	0	1,48	110	20	0.1	120	1,8
48	20	0.1	0	0,6	111	30	0.2	0	1,28
49	20	0.3	0	1,82	112	10	0.3	90	2,62
50	20	0.3	60	2,7	113	20	0.1	180	1,97
51	10	0.1	90	1,14	114	10	0.3	30	2,12
52	20	0.2	0	1,1	115	30	0.1	60	0,13
53	20	0.2	180	2,5	116	10	0.1	90	1,45
54	20	0.3	120	2,95	117	30	0.1	180	2,75
55	20	0.1	30	0,79	118	30	0.3	120	3,11
56	30	0.1	150	2,82	119	30	0.3	120	3,03
57	30	0.3	90	3,1	120	10	0.3	180	2,95
58	10	0.1	60	1,16	121	30	0.2	60	2,53
59	20	0.1	60	1,26	122	10	0.1	150	1,61
60	10	0.3	150	2,88	123	20	0.1	150	1
61	20	0.3	30	2,27	124	20	0.2	120	2,33
62	30	0.2	180	2,87	125	20	0.1	30	1,07
63	20	0.2	30	1,72	126	30	0.3	60	2,85

ANEXO D

D.1 Procedimiento para la realización de la curva de calibración de L-Tirosina para la determinación de la actividad proteolítica, siguiendo el método descrito por {Hübner, 1993 #43}.

a) Preparación de las soluciones de concentración conocida 0.1 – 1 $\mu\text{mol/ml}$: empleando la fórmula de $V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$ se preparan 5 soluciones que tengan un volumen final de 2 ml. Este procedimiento se realiza por triplicado.

Tabla A-1: Preparación de soluciones de Tirosina

Concentraciones $\mu\text{mol/ml}$	Solución concentrada de tirosina (ml)	Solución tampón pH según la enzima
0.1	0.2	1.8
0.3	0.6	1.4
0.5	1	1
0.7	1.4	0.6
0.8	1.6	0.4

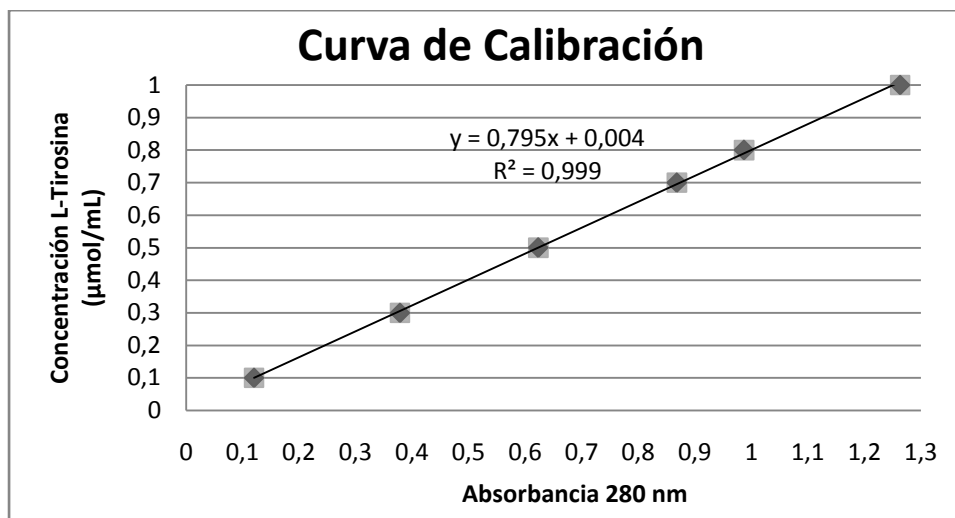
b) Determinación de tirosina por luz ultravioleta: tomar cada una de las soluciones, incluyendo la de 1 $\mu\text{mol/ml}$ y leer absorbancia a 280nm en espectrofotómetro de luz ultravioleta, utilizando como blanco solución tampón, el pH es determinado por la enzima.

c) Cálculos: con los datos obtenidos realizar el promedio de las absorbancias correspondientes a cada concentración y hacer regresión lineal de absorbancia en función de la concentración, verificar que el coeficiente de determinación (R^2) sea mayor o igual a 0.99

$$Abs_{280nm} = m \cdot C + b$$

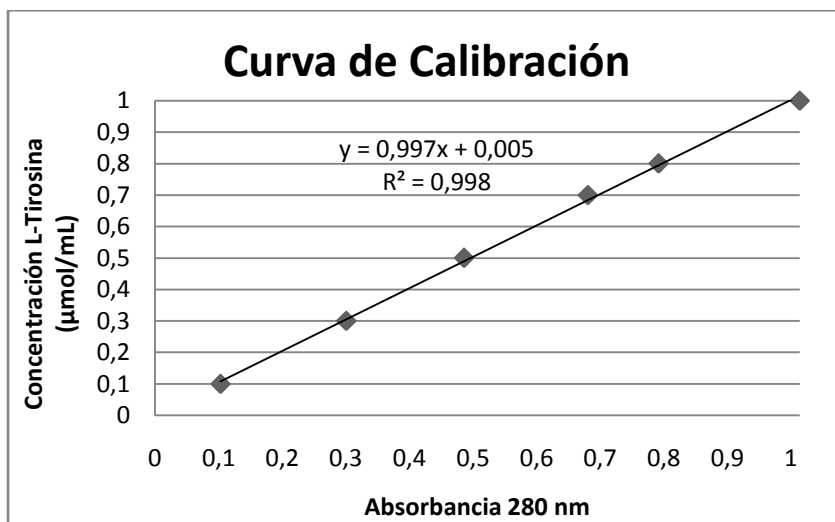
d) Resultados: se presenta a continuación la prueba con tampón de carbonatos pH igual a 9,5 que será la curva de calibración para la enzima Protex 6L.

Figura A-1. Curva de calibración para la composición de L-Tirosina, pH = 9,5.



Se presenta en la Figura A-2 los resultados de la prueba con tampón de tetraborato de sodio y carbonato de sodio pH igual a 8,6 que será la curva de calibración para la enzima TanG Plus.

Figura A-2. Curva de calibración para la composición de L-Tirosina, pH = 8,6.



D.2 Procedimiento para la determinación de la actividad proteolítica, teniendo en cuenta las curvas de calibración anteriores.

a) Procedimiento

- Si la muestra es líquida, centrifugarla por 10 minutos a 5000 rpm.

- Transferir el extracto crudo (sobrenadante) a un tubo estéril.
- Filtrar la muestra con membrana 0.45 μm .
- Transferir 1 ml de extracto crudo a cada uno de los tubos de 13 x 100mm que contienen 1 ml de caseína 1% p/v en solución tampón, el pH es determinado por la enzima. La prueba se debe realizar por triplicado. Incluir los blancos de sustrato que está compuesto de 1 ml de solución tampón, el pH es determinado por la enzima, y 1 ml de extracto crudo y el blanco de la enzima que tiene 1 ml de caseína al 1 % y 1 ml de solución tampón, el pH es determinado por la enzima.
- Incubar en un baño a 35° C durante 60 minutos.
- Sumergir los tubos en hielo y adicionar 1 ml de ácido tricloro-acético 15% (p/v) con el fin de precipitar la caseína no hidrolizada.
- Centrifugar por 20 minutos a 4000rpm, para separar la caseína no hidrolizada por la enzima.
- Realizar las lecturas de densidad óptica en espectrofotómetro a 280 nm. Verificar la interferencia de los blancos. Si los valores de la absorbancia son superiores a 1 se debe hacer dilución de la muestra y volver a procesar.
- Si la muestra es sólida en el paso 4 lo recomendable es diluir, para el caso de la enzima TanG Plus se realizó una dilución de 1g de enzima en 10 ml de solución tampón pH 8,6 y se realizó el mismo procedimiento excluyendo el primer paso.

b) Cálculos: con los datos obtenidos calcular la concentración de aminoácidos de acuerdo con la curva de calibración y multiplicar por la dilución si es necesario. Determinar el promedio de la concentración y reportar como UP.

Los resultados de esta prueba son reportados en Unidades Proteolíticas (UP), definida como la cantidad de enzima que libera un μmol de aminoácidos equivalentes a tirosina por minuto por litro, bajo las condiciones de la prueba.

ANEXO E

Diseño experimental y resultados de estudio de la etapa de hidrólisis enzimática en medio básico para pieles de tilapia y de cachama, con el apoyo del software estadístico Design Expert.

Ensayo No.	Enzima	% Enzima	TILAPIA		CACHAMA	
			Proteína Total ⁷	Hidroxiprolina ⁸	Proteína Total	Hidroxiprolina
1	Protex 6L	0.50	110,40	14,43	94,042	20,21
2	TanG Plus	0.50	91,15	11,54	85,449	16,43
3	Protex 6L	3.00	102,94	13,06	88,923	19,05
4	TanG Plus	3.00	100,96	13,12	88,341	18,33
5	Protex 6L	0.50	87,50	13,63	90,865	19,88
6	TanG Plus	0.50	84,95	12,40	82,860	18,43
7	TanG Plus	1.50	87,50	10,90	76,087	14,16
8	Protex 6L	1.50	108,20	14,62	94,231	20,99
	BP	0	210,00	15,15	103,906	21,27
	BT	0	199,61	15,17	101,316	21,24

Estudio del tiempo requerido para la etapa de hidrólisis enzimática, cuando T = 35°C, 3% (g enzima/g proteína total), pH = 8,6.

tiempo (h)	Proteína Total Tilapia	Proteína Total Cachama
0	216,32	103,25
1	97,86	51,59
2	90,20	48,61
3	86,48	45,40
4	82,97	37,72
5	59,66	37,02

⁷ g proteína total / kg de muestra

⁸ g hidroxiprolina / kg de muestra

ANEXO F

Diseño experimental y resultados del estudio de la etapa de solubilización en medio ácido para pieles de tilapia y cachama, con el apoyo del software estadístico Design Expert.

Ensayo No.	T (°C)	Ac. acético M	TILAPIA		CACHAMA	
			Proteína Total 2h	Proteína Total 5h	Proteína Total 2h	Proteína Total 5h
1	25	0,5	2,48	3,09	2,49	2,86
2	25	0,1	1,43	3,53	3,11	3,72
3	25	0,3	1,77	2,66	1,83	2,27
4	35	0,5	3,67	4,53	2,47	2,9
5	15	0,5	1,8	1,25	3,64	4,03
6	15	0,3	0,94	2,25	1,45	1,82
7	35	0,1	2,67	4,45	2,03	2,59
8	15	0,1	0,43	3,06	2,5	2,99
9	35	0,3	3,31	5,02	2,1	2,63
10	35	0,1	3,25	4,4	1,53	1,98
11	35	0,5	4,53	6,24	1,25	1,68
12	15	0,5	1,07	2,48	3,67	4,1

ANEXO G

Método Bradford: Esta técnica se basa en la unión de un colorante, Coomassie Blue G-250 (también Serva Blue) a las proteínas. El colorante, en solución ácida, existe en dos formas una azul y otra naranja. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre. Este método es sensible (1-15 µg), simple, rápido, barato y pocas sustancias interfieren en su determinación. Entre las sustancias que interfieren están los detergentes y las soluciones básicas.

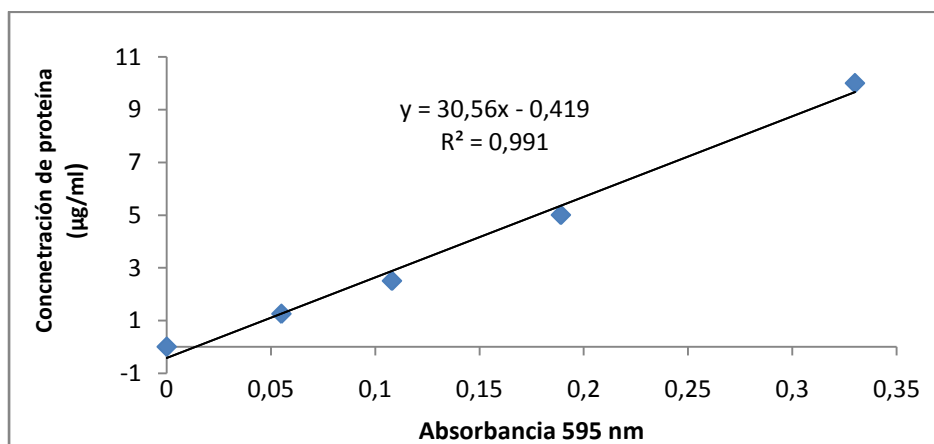
a) Preparación de curva patrón:

La curva patrón se realizará utilizando las soluciones patrón de albúmina sérica bovina incluidas en el kit de Bradford suministrado por Bio-Rad.

Tabla A-3: Preparación de soluciones para la curva de calibración – Método de Bradford.

Tubo No.	Volumen estándar (µl)	Fuente de estándar (mg/ml)	Volumen diluyente (µl) - Agua	Concentración final de proteína (µg/ml)
1	35	1,0	3465	10
2	35	0,5	3465	5
3	35	0,25	3465	2,5
4	35	0,125	3465	1,25
B	-	-	3200	0

Los resultados y la regresión de la calibración se muestran a continuación:



b) Procedimiento para la determinación de proteína total por el método de Bradford en muestras de colágeno:

- Efectuar el análisis en duplicado
- Realizar diluciones de la muestra hasta que la lectura de absorbancia se encuentre en el rango de la curva de calibración. Se realizaron diluciones 1:10, 1:20, 1:50 y 1:100 para las muestras de colágeno.
- Tomar 1 ml de cada dilución y colorearlo con 1 ml del reactivo de Bradford. Mezclar con ayuda de un vortex e incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.
- Con longitud de onda igual a 595 nm, medir la absorbancia de las muestras contra la muestra blanco, donde no hay presencia de proteína.

✓ *Cálculos:*

Con la función lineal dada por la curva patrón, tendremos el porcentaje de proteína en la muestra:

$$C_{\text{proteína extracto}} = C_{\text{estándar}} * \frac{V_e}{V_m} * 100$$

Donde:

$E_{\text{estándar}}$: concentración obtenida de la curva patrón

V_e : volumen del ensayo

V_m : volumen de la muestra

La proteína presente en la piel de pescado es:

$$proteína_{\text{piel}} = C_{\text{proteína extracto}} * \frac{m_{\text{extracto}}}{g_{\text{piel}}}$$