

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

**DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA LA OBTENCIÓN DE HIDROLIZADOS DE
COLÁGENO A PARTIR DE DESECHOS DE
LA INDUSTRIA ACUÍCOLA UTILIZANDO PROCESOS ENZIMÁTICOS.**

PROYECTO DE GRADUACIÓN SOMETIDO A CONSIDERACIÓN DE LA ESCUELA DE
INGENIERÍA QUÍMICA COMO REQUISITO FINAL PARA OPTAR POR EL GRADO DE
LICENCIATURA EN INGENIERÍA QUÍMICA

MELISSA CHAVES PHILLIPS


CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO
SAN JOSE, COSTA RICA
Año 2019

“Desarrollo de un protocolo para la obtención de hidrolizados de colágeno a partir de desechos de la industria acuícola utilizando procesos enzimáticos.”

Proyecto de graduación sometido a consideración de la Escuela de Ingeniería Química como requisito final para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Química.

Sustentante: Melissa Chaves Phillips


Aprobado por:


Esteban Durán Herrera, Ph.D

Presidente de tribunal


Ing. Nay Mata Araya.

Directora de proyecto


Alfredo Lopez, Ph.D

Lector de proyecto

Sergio Madrigal Carballo, Ph.D

Lector de proyecto


M.Sc Adolfo Ulate Brenes.

Miembro Invitado

*“La innovación no nace de un sueño,
nace de la lucha”*

Simon Sinek

AGRADECIMIENTO

Deseado agradecer a todos aquellos que de una u otra manera permitieron la realización del proyecto. Primeramente, al Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot), quienes me abrieron las puertas para el desarrollo de este en sus instalaciones, me brindaron apoyo tanto material como intelectual para llevar a cabo la investigación. Al Laboratorio Nacional de Nanotecnología (LANOTEC) y al Laboratorio de Polímeros de la Universidad Nacional de Costa Rica (POLIUNA), por su asistencia en la realización de algunas de las pruebas de caracterización. Al grupo “Aqua corporación”, por brindar la materia prima de pieles de tilapia para llevar acabo las pruebas experimentales.

A mi comité asesor: Ing. Iray Mata Araya como mi directora de proyecto, quién siempre estuvo ahí como apoyo para resolver mis dudas y ofrecerme consejos, gracias por toda la paciencia y apoyo. Al Dr. Sergio Madrigal como lector de mi proyecto, y quién me brindó en un primer momento la oportunidad de desarrollar la investigación, y por siempre estar anuente a resolver cualquier consulta que tuviera. Al profesor Ing. Alfredo López por darme sugerencias para realizar las actividades y resolver mis consultas.

Un agradecimiento a la unidad de Bioprospección, en especial a Rodrigo y a Jorge, por ser un soporte, solventar mis dudas siempre que pudieron, y por darme consejos cada vez que los necesitaba; también por plantearme retos y sugerencias para desarrollar el proyecto.

A mi familia y compañeros de carrera, gracias, por siempre ser un apoyo y motivarme a dar lo mejor, durante mis años de estudio e investigación. Sin ustedes esto no hubiera sido posible.

RESUMEN

El presente trabajo se realizó en el Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot), y tuvo como objetivo el desarrollo de un protocolo, a escala de laboratorio, para la obtención de hidrolizados de colágeno a partir de desechos de la industria acuícola, utilizando específicamente piel de tilapia. Para ello se realizó un primer tratamiento que buscó la remoción de componentes no deseado en la materia prima, con el consecuente resultado de una matriz colágena más limpia; seguido de un segundo tratamiento enzimático que permitiera la hidrólisis de la proteína, para la obtención de péptidos de cadena corta y un proceso de recuperación del producto seco.

Se realizaron pruebas de caracterización iniciales a la materia prima, seguidas de ensayos preliminares tanto para el primer como para el segundo tratamiento enzimático, que permitieron establecer las variables y los niveles de estas a utilizar en los diseños estadísticos propuestos. Estos diseños tuvieron como objetivo la determinación de las mejores condiciones de tratamiento, y una vez obtenidas se procedió a realizar pruebas de caracterización intermedias y finales, para definir propiedades estructurales y de estabilidad del producto.

Para el primer tratamiento enzimático se trabajó bajo el efecto del pH, temperatura, relación entre el sustrato y enzima, y concentración de la enzima en el medio de digestión como variables experimentales. Se definió la agitación, la enzima y el medio como variables fijas, el porcentaje de extracción como variable respuesta, y se tomó en cuenta el porcentaje colágeno como información adicional para la definición de las mejores condiciones de trabajo para la digestión enzimática. Condiciones de pH de 6.50, tiempos de digestión de 35 minutos, temperaturas de 37.0°C, relaciones másicas entre sustrato: enzima de 20.0:1.0 y concentraciones de enzima en medio de 3.00 mg/mL; utilizando Papaína comercial extraída de latex de papaya producida en el país por la empresa Beyco, resultaron las más adecuadas, ya que permitieron obtener una extracción de un 98.75% \pm 0.36% de una matriz colágena más limpia.

Mediante el segundo tratamiento enzimático de la matriz recuperada durante la primera etapa se estudió el resultado de la digestión utilizando la papaína bajo las mismas variables experimentales que en la primera etapa, pero esta vez sobre el grado de hidrólisis de la proteína. Sin embargo, los niveles utilizados fueron diferentes, ya que se requirió de un mayor efecto sobre la matriz para el rompimiento de enlaces y la consecuente reducción en el tamaño de las cadenas de aminoácidos del colágeno. Las mejores condiciones obtenidas correspondieron a un pH de 6.15, temperatura de 45.0°C, relaciones másicas de sustrato:enzima de 1.0:1.0, concentración de enzima de 5.70 mg/mL, y tiempos de digestión de 22.5 horas, obteniéndose un grado de hidrólisis del 64.38% \pm 3.63%.

Gracias a las pruebas de caracterización se confirmó la identidad de la proteína obtenida como colágeno tipo I, debido a la presencia de bandas de absorción características para colágeno, según análisis de espectro infrarrojo y espectrofotometría UV-Vis. Tuvo características de hidrolizado, confirmado por la presencia de bandas con pesos moleculares de alrededor de 25 kDa o menores en el análisis electroforético, y la disminución de las temperaturas de descomposición con respecto a las de la proteína en su estado más intacto.

Se recomienda utilizar técnicas más exactas para cuantificar la pureza del colágeno hidrolizado, como por ejemplo mediante análisis espectrofotométrico por determinación de hidroxiprolina, o por comparación contra un estándar por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) o Cromatografía líquida rápida en proteínas (FPLC).

AGRADECIMIENTO.....	v
RESUMEN.....	vi
INTRODUCCIÓN	1
Capítulo 1. Fundamentación teórica.....	3
1.1 Pesca y acuicultura en Costa Rica	3
1.2 Matriz extracelular.....	5
1.2.1 Colágeno.....	5
1.2.2 Componentes no colágenos	7
1.3 Fuentes de obtención del colágeno	8
1.3.1 Tilapia.....	9
1.4 Aplicaciones del colágeno	9
1.5 Caracterización de materia prima	10
1.5.1 Análisis proximales	10
1.5.2 Hidroxiprolina	12
1.6 Obtención de colágeno hidrolizado	13
1.6.1 Tratamiento ácido.....	14
1.6.2 Tratamiento álcali.....	14
1.6.3 Tratamiento enzimático.....	15
1.7 Factores que afectan la reacción enzimática.....	17
1.7.1 Relación másica sustrato:enzima	17
1.7.2 Concentración de enzima	18
1.7.3 pH.....	18
1.7.4 Temperatura	19
1.7.5 Tiempo de reacción	20
1.8 Hidrólisis de colágeno	22
1.8.1 Hidrólisis básica	22
1.8.2 Hidrólisis ácida.....	22
1.8.3 Hidrólisis enzimática.....	23
1.9 Grado de hidrólisis.....	24
1.10 Caracterización de colágeno	26
1.10.1 Temperatura de desnaturalización.....	26
1.10.2 Espectroscopía IR.....	28
1.10.3 Caracterización térmica.....	30
1.10.4 Electroforesis.....	31
1.10.5 Espectro UV-Vis	33

1.10.6 Solubilidad.....	34
Capítulo 2. Metodología experimental, equipo y materiales.....	35
2.1 Materiales.....	37
2.2 Reactivos y equipos experimentales.....	37
2.2.1 Análisis proximal.....	37
2.2.2 Pruebas preliminares y primer tratamiento enzimático.....	38
2.2.3 Cuantificación de colágeno.....	39
2.2.4 Pruebas de caracterización después de primer tratamiento enzimático.....	39
2.2.5 Pruebas preliminares y segundo tratamiento enzimático.....	41
2.2.6 Cuantificación de grado de hidrólisis.....	42
2.2.7 Pruebas de caracterización después de segundo tratamiento enzimático.....	42
2.3 Metodología experimental.....	42
2.3.1 Caracterización inicial de piel de tilapia.....	42
2.3.2 Pruebas preliminares para primer tratamiento enzimático.....	50
2.3.3 Diseño experimental para primer tratamiento enzimático.....	52
2.3.4 Pruebas de caracterización después de primer tratamiento enzimático.....	54
2.3.5 Pruebas preliminares para segundo tratamiento enzimático.....	57
2.3.6 Diseño experimental para segundo tratamiento enzimático.....	58
2.3.7 Medición de grado de hidrólisis.....	60
2.3.8 Pruebas de caracterización para segundo tratamiento enzimático.....	62
Capítulo 3. Análisis de resultados experimentales.....	65
3.1 Caracterización inicial de la piel de tilapia.....	65
3.2 Pruebas preliminares para primer tratamiento enzimático.....	68
3.3 Primer tratamiento enzimático.....	74
3.4 Pruebas de caracterización después de primer tratamiento enzimático.....	87
3.4.1 Análisis infrarrojo.....	88
3.4.2 Análisis electroforético.....	90
3.4.3 Caracterización térmica.....	93
3.4.4 Temperatura de desnaturalización en solución.....	95
3.5 Pruebas preliminares para segundo tratamiento enzimático.....	97
3.6 Segundo tratamiento enzimático.....	100
3.7 Pruebas de caracterización después de segundo tratamiento enzimático.....	111
3.7.1 Espectro UV-Vis.....	111
3.7.2 Análisis Infrarrojo.....	112

3.7.3	Análisis electroforético	114
3.7.4	Caracterización térmica.....	116
3.7.5	Solubilidad	117
3.7.6	Temperatura de desnaturalización en solución	119
3.7.7	Protocolo para obtención de colágeno hidrolizado mediante procesos enzimáticos.....	120
Capítulo 4. Conclusiones y recomendaciones		122
4.1	Conclusiones.....	122
4.2	Recomendaciones	124
Capítulo 5. Bibliografía.....		125
Apéndices		138
A.	Datos experimentales.....	138
B.	Resultados intermedios.....	157
C.	Muestra de cálculo.....	170
Nomenclatura		177
Anexos		178

Índice de cuadros

Cuadro 1.1. Análisis proximal para piel de tilapia Wami, tilapia Plateada y tilapia Mosámbica.	11
Cuadro 1.2. Contenido de hidroxiprolina para diferentes especies (Gaona, 2011)	12
Cuadro 1.3. Temperatura de desnaturalización para diferentes especies.	28
Cuadro 1.4 Bandas características de absorción IR para el colágeno.	29
Cuadro 2.1. Reactivos y equipo para pruebas de análisis proximal de materia prima.	37
Cuadro 2.2 Reactivos y equipos utilizados para pruebas preliminares y primer tratamiento enzimático.	38
Cuadro 2.3 Reactivos y equipos utilizados para cuantificación de colágeno.	39
Cuadro 2.4 Reactivos y equipos utilizados para la determinación de la temperatura de desnaturalización	40
Cuadro 2.5 Reactivos y equipos para la elaboración de geles de electroforesis SDS-PAGE	40
Cuadro 2.6 Equipos para realización de análisis infrarrojo y análisis termogravimétrico. ..	41
Cuadro 2.7 Reactivos y equipos utilizados para pruebas preliminares y segundo tratamiento enzimático.	41
Cuadro 2.8 Reactivos y equipos utilizados para medición de grado de hidrólisis.	42
Cuadro 2.9 Reactivos y equipos utilizados para la generación de espectro UV-Vis y para determinación de solubilidad de colágeno hidrolizado.	42
Cuadro 2.10 Características de diseño factorial fraccionado para primer tratamiento enzimático de piel de tilapia.	53
Cuadro 2.11 Niveles de las variables experimentales a utilizar en el diseño factorial fraccionado para primer tratamiento enzimático de piel de tilapia.	53
Cuadro 2.12 Condiciones para Análisis termogravimétrico de muestra colágena después de primer tratamiento enzimático.	56
Cuadro 2.13 Variables y niveles en diseño de superficie de respuestas, para determinación de grado de hidrólisis después de segundo tratamiento enzimático.	59
Cuadro 3.1 Análisis proximal experimental de la piel de tilapia <i>Oreochromis niloticus</i> , en base húmeda.	65
Cuadro 3.2 Pruebas preliminares para obtención de matriz de colágeno a partir de piel de tilapia mediante primer tratamiento enzimático.	73

Cuadro 3.4 Temperaturas de eventos térmicos y pérdida de masa para fibras de colágeno nativo obtenido de la matriz colágena después de primer tratamiento enzimático e hidrólisis parcial ácida.....	94
Cuadro 3.5 Grados de hidrólisis promedio para tratamientos de diseño de superficie de respuestas para segundo tratamiento enzimático.	101
Cuadro 3.6 Grados de hidrólisis experimentales de confirmación y grados de hidrólisis predichos por modelo de superficie de respuestas.	108
Cuadro 3.7 Grado de hidrólisis para muestra por triplicado, según mejores condiciones de hidrólisis de diseño de superficie de respuestas, con medio de hidrólisis modificado sin EDTA.	110
Cuadro 3.8 Absorbancias para Amida III y anillo de Pirrolidina en colágeno nativo y colágeno hidrolizado, obtenidos de FTIR.	113
Cuadro 3.9 Números de onda de los picos de absorción en FTIR del colágeno nativo y colágeno hidrolizado enzimáticamente.	114
Cuadro 3.10 Temperaturas de eventos térmicos y pérdida de masa para colágeno hidrolizado enzimáticamente.....	116
Cuadro A.1. Mediciones de cambios de masa en piel de tilapia, para determinación de contenido mineral en pruebas de análisis proximal.	138
Cuadro A.2 Mediciones de cambios de masa en piel de tilapia, para determinación de contenido de humedad en pruebas de análisis proximal.	138
Cuadro A.3 Mediciones de cambios de masa en piel de tilapia, para determinación de contenido de humedad en pruebas de análisis proximal.	138
Cuadro A.4 Mediciones de cambio de masas de extracto graso en piel de tilapia, para determinación de contenido de grasa en pruebas de análisis proximal.....	139
Cuadro A.5 Preparación de soluciones madre, para curvas estándar de hidroxiprolina, para determinación de contenido de colágeno en pruebas de caracterización inicial de piel de tilapia.	139
Cuadro A.6 Alícuotas para preparación de puntos de curva estándar de hidroxiprolina, a partir de solución madre de 300 ug/mL, aforadas hasta 10 mL, para cuantificación de hidroxiprolina en pruebas de caracterización iniciales y pruebas preliminares de primer tratamiento enzimático.	139
Cuadro A.7 Absorbancias medidas a 558 nm para puntos de curva estándar, utilizados en cuantificación de hidroxiprolina para determinación de mejores condiciones de hidrólisis ácida, y para pruebas preliminares de primer tratamiento enzimático.....	139
Cuadro A.8. Condiciones de hidrólisis en H ₂ SO ₄ , y absorbancias medidas a 558 nm a hidrolizados de piel de tilapia para determinación de hidroxiprolina, en pruebas de caracterización inicial.....	140

Cuadro A.9. Condiciones de variables experimentales y masas en pruebas preliminares de primer tratamiento enzimático.	141
Cuadro A.10 Absorbancias medidas a 558nm para cuantificación de hidroxiprolina en matrices colágenas recuperadas después de primer tratamiento enzimático, para pruebas preliminares.	142
Cuadro A.11. Combinación de variables experimentales utilizadas para diseño factorial fraccionado del primer tratamiento enzimático.	143
Cuadro A.12 Preparación de solución madre de hidroxiprolina para curvas estándar, para cuantificación de hidroxiprolina en matrices recuperadas después de primera digestión enzimática en diseño factorial fraccionado.	143
Cuadro A.13. Alícuotas para preparación de puntos de curva estándar de hidroxiprolina, a partir de solución madre de 300 ug/mL, aforadas hasta 10 mL, para cuantificación de hidroxiprolina en corridas de diseño factorial de primer tratamiento enzimático.	143
Cuadro A.14. Absorbancias medidas a 558 nm para puntos de curva estándar, utilizados en cuantificación de hidroxiprolina y contenido de colágeno, en matrices recuperadas después de primer tratamiento enzimático de diseño factorial fraccionado.	144
Cuadro A.15 Masa de muestras iniciales, masa de enzima y volumen de medio utilizado durante la digestión, masa total recuperada después de digestión y masa utilizada para cuantificación de hidroxiprolina para diseño factorial de primer tratamiento enzimático.	145
Cuadro A.16. Absorbancias medidas a 558nm para cuantificación de hidroxiprolina en matrices colágenas recuperadas después de primer tratamiento enzimático, según diseño factorial fraccionado.	146
Cuadro A.18 Temperatura y viscosidad dinámica de soluciones de colágeno nativo en ácido acético 0.1 mol/L para determinación de temperatura de desnaturalización.	147
(Cont)Cuadro A.18. Temperatura y viscosidad dinámica de soluciones de colágeno nativo en ácido acético 0.1 mol/L para determinación de temperatura de desnaturalización.	148
Cuadro A.19 Parámetros de solución estándar de glicina utilizados para la determinación de grado de hidrólisis de colágeno después de segundo tratamiento enzimático.	148
Cuadro A.20 Absorbancias medidas a 340 nm de solución blanco y solución estándar de glicina por duplicado, utilizadas para la determinación del grado de hidrólisis de colágeno después de segundo tratamiento enzimático.	148
Cuadro A.21 Masa de muestras de matriz colágena pretratada, masa de enzima, volumen de medio utilizado, y condiciones de hidrólisis para pruebas preliminares de segundo tratamiento enzimático.	149
(Cont) Cuadro A.21 Masa de muestras de matriz colágena pretratada, masa de enzima, volumen de medio utilizado, y condiciones de hidrólisis para pruebas preliminares de segundo tratamiento enzimático.	150

Cuadro A.22 Absorbancias medidas a 340 nm para cuantificación de grado de hidrólisis después de segundo tratamiento enzimático, según pruebas preliminares.....	151
(Cont) Cuadro A.22 Absorbancias medidas a 340 nm para cuantificación de grado de hidrólisis después de segundo tratamiento enzimático, según pruebas preliminares.....	152
Cuadro A.23 Combinación de variables experimentales utilizadas para diseño central compuesto de superficie de respuestas para determinación de grado de hidrólisis después de segundo tratamiento enzimático.....	152
Cuadro A.24 Masa de muestras de matriz colágena pretratada, masa de enzima y volumen de medio utilizado las hidrólisis del diseño central compuesto de superficie de respuestas para grado de hidrólisis después de segundo tratamiento enzimático.....	153
Cuadro A.25 Absorbancias medidas a 340 nm a hidrolizados de colágeno para determinación de grado de hidrólisis después de segundo tratamiento enzimático, según diseño central compuesto de superficie de respuesta.	154
Cuadro A.26 Condiciones de tratamiento, masas de matriz colágena pretratada, masas de enzima y volúmenes de medio utilizado para tratamientos de confirmación de modelo de predicción, a partir de diseño central compuesto de superficie de respuestas, para grado de hidrólisis después de segundo tratamiento enzimático	155
Cuadro A.27 Absorbancias medidas a 340 nm para tratamientos de confirmación de modelo de predicción, por duplicado, a partir de diseño central compuesto superficie de respuestas, para grado de hidrólisis después de segundo tratamiento enzimático.....	155
Cuadro A.28 Absorbancias medidas a 340 nm para hidrólisis por triplicado según mejores condiciones de diseño de superficie de respuestas con medio de hidrólisis modificado sin EDTA.	156
Cuadro A.29 Transmitancias para Amida III y anillo de Pirrolidina en colágeno nativo y colágeno hidrolizado, obtenidos de FTIR.	156
Cuadro A.30 Absorbancias medidas a 220 nm de solución blanco y soluciones de colágeno de piel de ternero en ácido acético, utilizadas como puntos para la determinación de curva estándar de colágeno tipo I, para prueba de solubilidad.	156
Cuadro A.31 Absorbancias medidas a 220 nm para diferentes concentraciones de colágeno hidrolizado de piel de tilapia en solución de ácido acético 0.1 mol/L, para prueba de solubilidad.	157
Cuadro B.1 Mediciones de cambios de masa, y composición de ceniza en piel de tilapia, para determinación de contenido mineral en pruebas de análisis proximal.....	157
Cuadro B.2. Mediciones de cambios de masa, y composición de humedad en piel de tilapia, para determinación de contenido de humedad en pruebas de análisis proximal.....	158
Cuadro B.3 Mediciones de cambios de masa, y composición de humedad en piel de tilapia, para determinación de contenido de grasa en pruebas de análisis proximal.	158

Cuadro B.4 Medición de cambio de masa en extracto graso, después de extracción con solvente y evaporación, y composición de grasa, para determinación de contenido graso en pruebas de análisis proximal.....	158
Cuadro B.5 Absorbancias promedio y corregidas a 558 nm de puntos de curva estándar, para cuantificación de hidroxiprolina en la determinación de mejores condiciones de hidrólisis ácida, y preliminares de primer tratamiento enzimático.....	158
Cuadro B.6 Condiciones de hidrolisis en H ₂ SO ₄ y concentraciones de hidroxiprolina en hidrolizados de piel de tilapia, para pruebas de caracterización inicial.....	159
Cuadro B.7 Absorbancias promedio y concentración de hidroxiprolina en matrices recuperadas después de primera digestión enzimática con papaína, para pruebas preliminares.	160
Cuadro B.8 Porcentajes de extracción y de composición colágena obtenidos después de primer tratamiento enzimático con papaína, para pruebas preliminares.	161
Cuadro B.9 Absorbancias promedio y corregidas a 558 nm de puntos de curva estándar, para cuantificación de hidroxiprolina en la determinación de contenido de colágeno en matrices recuperadas después de primer tratamiento enzimático de diseño factorial fraccionado.....	161
Cuadro B.10 Absorbancia medidas y absorbancias corregidas, concentración de hidroxiprolina en matrices colágenas recuperadas de primer tratamiento enzimático, según diseño factorial fraccionado.....	162
Cuadro B.11 Porcentajes de extracción y composición obtenidos después de primer tratamiento enzimático con papaína en piel de tilapia, para tratamientos de diseño factorial fraccionado.....	163
Cuadro B.12 Temperaturas y cambios fraccionales de viscosidad de soluciones de colágeno nativo en ácido acético 0.1 mol/L, para determinación de temperatura de desnaturalización.	163
(Cont)Cuadro B.12 Temperaturas y cambios fraccionales de viscosidad de soluciones de colágeno nativo en ácido acético 0.1 mol/L, para determinación de temperatura de desnaturalización.	164
Cuadro B.13 Temperaturas y cambios fraccionales de viscosidad utilizados para determinación de temperatura de desnaturalización mediante interpolación	165
Cuadro B.14 Grado de hidrólisis para hidrolizados de colágeno obtenidos después de segundo tratamiento enzimático según condiciones de pruebas preliminares.....	165
(Cont) Cuadro B.14 Grado de hidrólisis para hidrolizados de colágeno obtenidos después de segundo tratamiento enzimático según condiciones de pruebas preliminares.....	166
Cuadro B.15 Grado de hidrólisis para diferentes condiciones de variables experimentales en segundo tratamiento enzimático, para diseño de superficie de respuestas.	167

Cuadro B.16 Grados de hidrólisis para tratamientos de confirmación de modelo de predicción a partir de superficie de respuestas de grado de hidrólisis después de segundo tratamiento enzimático.	168
Cuadro B.17 Grado de hidrólisis para muestra por triplicado, según mejores condiciones de hidrólisis de diseño de superficie de respuestas, con medio de hidrólisis modificado sin EDTA.	168
Cuadro B.18 Absorbancia promedio diluidas, factores de dilución y absorbancia promedio concentradas de soluciones a 220 nm de colágeno de piel de ternero en ácido acético, para determinación de curva estándar, para prueba de solubilidad.....	168
Cuadro B.19 Absorbancias promedio medidas a 220 nm para diferentes soluciones de colágeno hidrolizado de piel de tilapia en ácido acético 0.1 mol/L, para determinación de solubilidad.	169
Cuadro B.20 Concentraciones teóricas y prácticas para diferentes soluciones de colágeno hidrolizado en ácido acético 0.1 mol/L, para determinación de solubilidad.....	169

Índice de figuras

Figura 1.1 Producción mundial de la pesca de captura y acuicultura hasta el 2025.....	3
Figura 1.2 Producción de la acuicultura reportada en Costa Rica, a partir de 1990.....	4
Figura 1.3 Producción acuícola en toneladas métricas según especie para Costa Rica (Chacón & Santamaría, 2007).	4
Figura 1.4 a) Modelo de la estructura helicoidal del colágeno. Aminoácido de glicina en verde, prolina en gris e hidroxiprolina en morado. b) representación esquemática de la triple hélice	6
Figura 1.5 Velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato.....	17
Figura 1.6 Relación entre actividad enzimática y concentración de la enzima	18
Figura 1.7 Dependencia de la actividad enzimática de la papaína con respecto al pH	19
Figura 1.8 Dependencia de la actividad enzimática con respecto a la temperatura	20
Figura 1.9 Progreso de la reacción en términos de la energía libre	21
Figura 1.10 Concentración de reactivos y productos de reacción enzimática, con respecto al tiempo	21
Figura 1.11 Hidrólisis enzimática en colágeno.....	23
Figura 1.12 Curva de desnaturalización de una proteína.....	27
Figura 1.13 Enlace peptídico entre dos aminoácidos	29
Figura 1.14 Espectro IR de colágeno de bacalao y colágeno de salmón.....	30
Figura 1.15 Termograma básico de un polímero analizado mediante la técnica de termogravimetría.....	31
Figura 1.16 SDS-PAGE de extractos de colágeno tipo I de Tilapia <i>Oreochromis niloticus</i> soluble en ácido (ASC) y soluble en pepsina (PSC) y marcadores de alto peso molecular .	32
Figura 1.17. Espectro UV-Vis para colágeno ácido soluble (Yan et al., 2008).....	33
Figura 2. 1 Etapas para la obtención de hidrolizado enzimáticos de colágeno.	36
Figura 2.2 Diagrama de equipo Soxhlet para extracción de grasa.	44
Figura 2.3 Curva de color de acuerdo con concentración de hidroxiprolina.....	47
Figura 2.4 Hidrólisis ácida de muestras de piel de tilapia	48
Figura 2.5 Características del diseño de superficie de respuesta para determinación de grado de hidrólisis.....	60
Figura 3.1. Curva de hidrólisis para cuantificación de hidroxiprolina en piel de tilapia, utilizando diferentes tiempos de hidrólisis y concentraciones de H ₂ SO ₄	67

Figura 3.2 Matriz de colágeno después de primer tratamiento enzimático con papaína. ...	70
Figura 3.3. Gráficas de probabilidad normal de los residuos para diseño factorial fraccionado de extracción de una matriz de colágeno a partir de un primer tratamiento enzimático con papaína.	77
Figura 3.4 Prueba de igualdad de varianzas para diseño factorial fraccionado de extracción de una matriz de colágeno a partir de un tratamiento enzimático con papaína.	78
Figura 3.5 Residuos contra orden de corrida, para diseño factorial fraccionado de extracción de una matriz de colágeno a partir de un tratamiento enzimático con papaína. .	78
Figura 3.7 a) Efectos estandarizados. b) diagrama de Pareto, para significancia de variables en diseño factorial fraccionado de extracción de matriz colágena, a partir de primer tratamiento enzimático con papaína.	80
Figura 3.8 Efecto de la interacción entre temperatura y tiempo de digestión sobre la extracción de una matriz colágena, a partir de primer tratamiento enzimático con papaína en piel de tilapia, gracias a diseño factorial fraccionado.	81
Figura 3.9 Efecto de la interacción entre relación sustrato:enzima y la concentración de enzima en el buffer sobre la extracción de una matriz colágena, a partir de primer tratamiento enzimático con papaína en piel de tilapia, gracias a diseño factorial fraccionado.	83
Figura 3.10 Efecto de la interacción entre la concentración de enzima y el tiempo de digestión sobre la extracción de una matriz colágena, a partir de primer tratamiento enzimático con papaína en piel de tilapia, gracias a diseño factorial fraccionado.	83
Figura 3.11 Efecto de la interacción entre temperatura(°C) y concentración de enzima en buffer (mg/ml) sobre la extracción de una matriz colágena, a partir de primer tratamiento enzimático con papaína en piel de tilapia, gracias a diseño factorial fraccionado.	84
Figura 3.12 Efecto de la interacción entre relación sustrato:enzima (g/g) y tiempo de digestión (min) sobre la extracción de una matriz colágena, a partir de primer tratamiento enzimático con papaína en piel de tilapia, gracias a diseño factorial fraccionado.	85
Figura 3.13. Efecto de la interacción entre pH y relación sustrato:enzima sobre la extracción de una matriz colágena, a partir de primer tratamiento enzimático con papaína en piel de tilapia, gracias a diseño factorial fraccionado.	86
Figura 3.14 Diagrama de etapas de tratamiento para muestras sometidas a electroforesis y temperatura de desnaturalización.	88
Figura 3.15 Espectro infrarrojo para colágeno nativo obtenido de la matriz colágena después de primer tratamiento enzimático e hidrólisis parcial ácida.	90
Figura 3.16 Patrón de SDS-PAGE para fibras de colágeno nativo obtenido de la matriz colágena después de primer tratamiento enzimático e hidrólisis parcial ácida. Carril A1: Albúmina de suero bovino, carril M: Marcador de peso molecular, carril A: colágeno de piel de tilapia <i>Oreochromis Niloticus</i> en estudio (1 mg/mL), carril B: Colágeno de piel de tilapia <i>Oreochromis Niloticus</i> en estudio (0.75 mg/mL), carril C: colágeno de piel de tilapia	

<i>Oreochromis Niloticus</i> sp, obtenido previamente mediante pretratamiento básico y extracción ácida, utilizado como comparación.....	92
Figura 3.17 Termograma para fibras de colágeno nativo obtenido de la matriz colágena después de primer tratamiento enzimático e hidrólisis parcial ácida, con barrido de 25°C a 980°C con rapidez de 10°C/min.	95
Figura 3.18 Curva de desnaturalización para fibras de colágeno nativo obtenido de la matriz colágena después de primer tratamiento enzimático e hidrólisis parcial ácida	96
Figura 3.19. Grado de hidrólisis promedio, obtenido después de segundo tratamiento enzimático en matriz colágena de piel de tilapia, para diferentes condiciones experimentales en pruebas preliminares.	98
Figura 3.20 Recuperación de colágeno hidrolizado de pruebas preliminares después de segundo tratamiento enzimático utilizando bromelina o papaína.....	99
Figura 3.21 ANOVA de diseño central compuesto a partir de la determinación de grado de hidrólisis después de segundo tratamiento enzimático mediante programa JMP®.....	102
Figura 3.22. Prueba de probabilidad normal de residuos de diseño central compuesto a partir de la determinación de grado de hidrólisis después de segundo tratamiento enzimático mediante programa JMP®.	103
Figura 3.23 Prueba de igualdad de varianzas para diseño central compuesto a partir de la determinación de grado de hidrólisis después de segundo tratamiento enzimático mediante programa JMP®.....	104
Figura 3.24 Residuos contra orden de corrida para diseño central compuesto a partir de la determinación de grado de hidrólisis después de segundo tratamiento enzimático mediante programa JMP®.....	105
Figura 3.25 Parámetros estimados para modelo de grado de hidrólisis de diseño central compuesto a partir de la determinación de grado de hidrólisis después de segundo tratamiento enzimático mediante programa JMP®.	106
Figura 3.26 Valor de prueba de falta de ajuste y R ² para diseño central compuesto a partir de la determinación de grado de hidrólisis después de segundo tratamiento enzimático mediante programa JMP®.	107
Figura 3.28 Espectro infrarrojo para colágeno hidrolizado enzimáticamente de piel de tilapia <i>Oreochromis Niloticus</i>	113
Figura 3.29 Patrón de SDS-PAGE para colágeno hidrolizado enzimáticamente de piel de tilapia <i>Oreochromis Niloticus</i> , obtenida de un gel al 15%.	115
Figura 3.30 Termograma para colágeno hidrolizado enzimáticamente de piel de tilapia, con barrido de 20°C a 1000°C, con rapidez de 10°C/min.	117
Figura 3.31 Curva de solubilidad de colágeno hidrolizado enzimáticamente en ácido acético 0.1 mol/L.	118

Figura B.1 Curva estándar para cuantificación de hidroxiprolina en pruebas de caracterización iniciales y pruebas preliminares para primer tratamiento enzimático.....	159
Figura B.2 Curva estándar de hidroxiprolina para determinación de colágeno en matrices recuperadas después de primer tratamiento enzimático, de diseño factorial fraccionado.	161
Figura B.3 Curva estándar de colágeno I de piel de ternero para determinación de solubilidad	168

Índice de anexos

Anexo 1. Cuantificación de proteína total para piel de tilapia.....	178
Anexo 2. Preparación de medio Fosfato-cisteína-verseno 0.05 mol/L, para primer tratamiento enzimático. (Song, 2010).....	178
Anexo 3. Preparación de reactivo OPA para determinación de grado de hidrólisis.....	179
Anexo 4. Composición de gel de compactación a 4% y gel de separación al 8% y al 15% para electroforesis por SDS-PAGE.....	179
Anexo 5. Preparación de buffer para dilución de muestra para gel de electroforesis por SDS-PAGE.	179
Anexo 6. Aleatoriedad de corridas experimentales para diseño factorial fraccionado de primer tratamiento enzimático.	180
Anexo 7. Aleatoriedad de corridas experimentales para diseño central compuesto de superficie de respuesta para determinación de grado de hidrólisis después de segundo tratamiento enzimático.....	181
(Cont) Anexo 7. Aleatoriedad de corridas experimentales para diseño central compuesto de superficie de respuesta para determinación de grado de hidrólisis después de segundo tratamiento enzimático.....	182
Anexo 8. Cuantificación de proteína total en matriz colágena, después de primer tratamiento enzimático.....	183
Anexo 9. Preparación de medio de digestión Fosfato-cisteína-verseno original para hidrólisis enzimáticas realizadas en diseño central compuesto durante segundo tratamiento enzimático.....	184
Anexo 10. Aleatoriedad de corridas experimentales para diseño de superficie de respuestas de grado de hidrólisis para segundo tratamiento enzimático.....	185
(Cont) Anexo 10. Aleatoriedad de corridas experimentales para diseño de superficie de respuestas de grado de hidrólisis para segundo tratamiento enzimático.	186
Anexo 11. Preparación de medio Fosfato-cisteína para hidrólisis de matriz colágena.	187

INTRODUCCIÓN

El colágeno engloba toda una familia de proteínas de tipo fibroso que se ubican en piel, tendones, huesos y diversas partes del cuerpo de organismos pluricelulares. Su importancia a nivel de organismos radica en la habilidad para mantener unidas las células en los diversos tejidos del cuerpo. Constituye aproximadamente entre un 25% y 30% de las proteínas del organismo, lo que refuerza el valor de ésta para los seres vivos (Teijón, 2006).

Debido a la relevancia del colágeno señalada anteriormente, se busca en la actualidad diversas maneras de obtener dicho compuesto, y así ser utilizado como materia prima en numerosas aplicaciones de tipo biomédico, cosmético y en industria alimentaria. Se puede mencionar su uso como agente cicatrizante y como material utilizado en aparatos médicos con el objetivo de interactuar con sistemas biológicos, esto para la proliferación celular en la regeneración de tejido epitelial.

El colágeno puede ser utilizado como biomaterial. Este material presenta ventajas ya que se encuentra de manera abundante en gran cantidad de organismos, es biocompatible por lo que generaría respuestas adecuadas por parte de los tejidos receptores y además no es antigénico (*Ingeniería tisular para el tratamiento de las lesiones osteocondrales*, 2012).

La variedad de organismos de los que puede ser obtenido el colágeno es abundante. Puede ser adquirido de piel y huesos de animales vertebrados como el cerdo y ganado bovino. Sin embargo, esta fuente presenta desventajas para su uso biomédico, cosmético y farmacéutico debido a la cantidad de patógenos que contiene. Como fuente alternativa se ha propuesto la extracción de colágeno a partir de organismos de agua dulce y salada.

A través de los años, el creciente uso de especies acuáticas para consumo humano ha forjado inevitablemente la generación de subproductos derivados del procesamiento de tales variedades. Productos residuales tales como escamas, cartílagos o piel, que como fue mencionado anteriormente son una fuente destacable de proteínas.

El tratamiento de los desechos o subproductos de tales especies acuáticas es de vital interés, su uso para la extracción de colágeno representa dos beneficios: el primero se refiere al aprovechamiento de una amplia fuente de materia prima de interés en el área biomédica, cosmética e industrial, y la segunda corresponde a la reducción de focos de contaminación.

El colágeno en su forma natural tiene la desventaja de ser difícil de digerir y absorber por un organismo cuando se le es administrado, es por esto por lo que se buscan diversos métodos que permitan realizar cambios a la estructura de colágeno para adecuarlo a las condiciones necesitadas. Mediante un proceso de ruptura de los enlaces que unen diferentes péptidos en las cadenas largas del colágeno se logra la hidrólisis, es decir se obtienen cadenas de péptidos más pequeñas que poseen una mayor facilidad para ser utilizadas. A través de una hidrólisis mediante enzimas se busca hacer uso de ventajas que no presentan otros métodos como los que utilizan álcalis o ácidos, en donde se puede producir la destrucción de ciertos aminoácidos o un rendimiento más bajo.

El ingeniero químico está preparado para analizar las condiciones de operación y factores que pueden afectar el proceso, además puede determinar cuáles son los equipos necesarios para llevar las operaciones de extracción e hidrolización de colágeno.

Es de interés aclarar de antemano que dentro del proyecto no se realizaran estudios de factibilidad económica.

Capítulo 1. Fundamentación teórica

1.1 Pesca y acuicultura en Costa Rica

La acuicultura corresponde a una técnica de cultivo utilizada para aumentar la producción de organismos de tipo acuático, en donde el ser humano actúa a través de aspectos de cría, alimentación, y/o protección de las nuevas especies hasta el momento de su utilización. Se desarrolla como alternativa para la generación de peces que tienen su aplicación en alimentación o como materia prima en actividades industriales, y está dirigida principalmente a la producción de especies como la trucha y la tilapia (Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura, s.f).

Según datos recolectados sobre el estado mundial de la pesca, para el año 2014 se contó con aproximadamente 73.8 millones de toneladas de peces recogidos mediante acuicultura, representando así un 44.1% de la totalidad de pesca de captura y acuicultura para ese momento; esto significó un aumento si se compara con valores del 31.4% alcanzados para el 2004 y 42.1% en el 2012. Se espera que para el 2021 la acuicultura supere a la pesca de captura, y que para el 2025 represente un valor cercano al 52% tal y como se observa en la Figura 1.1 (FAO, 2016).

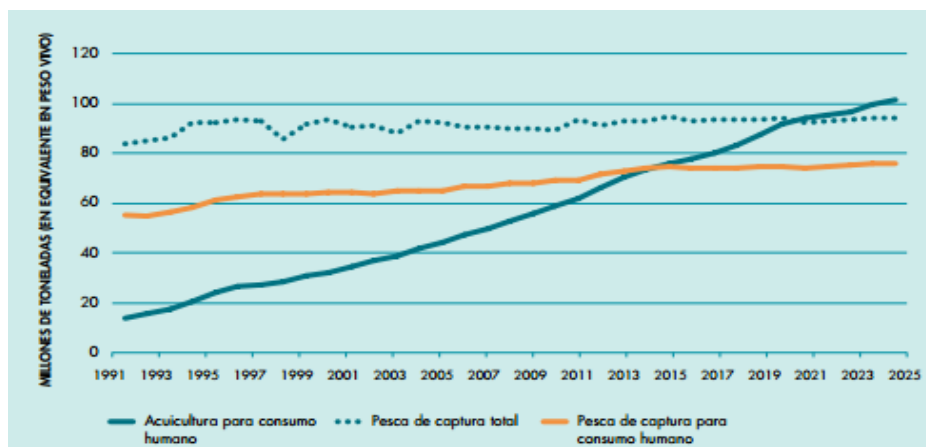


Figura 1.1 Producción mundial de la pesca de captura y acuicultura hasta el 2025 (FAO, 2016).

En Costa Rica la práctica acuícola ha ido en aumento especialmente en los últimos años, tal y como se muestra en la Figura 1.2.

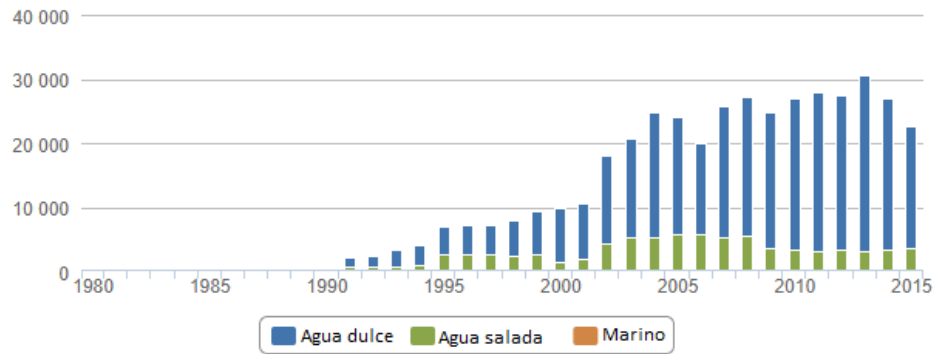


Figura 1.2 Producción de la acuicultura reportada en Costa Rica, a partir de 1990.

A nivel mundial variedades como el salmón, bagres, camarones, carpas y tilapia han logrado posicionarse como algunas de las especies de mayor consumo, principalmente debido a su aumento en producción acuícola, en contraposición a la captura en medios salvajes que se realizaba en años anteriores. Para nuestro país, según Chacón & Santamaría (2007), de las especies que más se adquieren mediante prácticas acuícolas es la tilapia, ya que representa uno de los mayores porcentajes en comparación con otras especies como la trucha o el camarón, como se incorpora en la Figura 1.3.

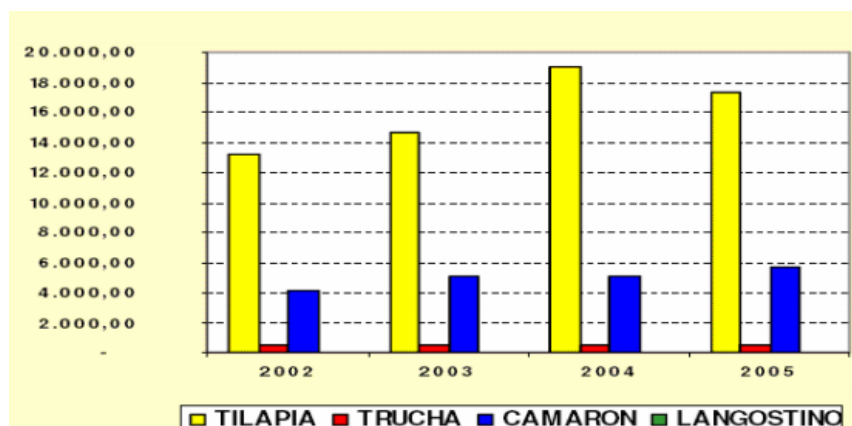


Figura 1.3 Producción acuícola en toneladas métricas según especie para Costa Rica (Chacón & Santamaría, 2007).

Uno de los principales intereses acuícolas es la utilización de sus productos como alimento para la población. Esto hace que una vez adecuado el crecimiento y características de la especie en cuestión, ésta sea procesada para la separación de su carne y se generen subproductos como las vísceras, escamas, o pieles que en muchas ocasiones son considerados como desechos por su menor provecho en el mercado.

Entre las principales consecuencias ambientales generadas a partir de los desechos de la industria pesquera se tienen la contaminación orgánica y química, cambios en los hábitats, y procesos de eutrofización correspondientes al enriquecimiento de fuentes de agua con nutrientes orgánicos para las plantas; por lo que se desarrolla interés en la búsqueda de alternativas que permitan la reutilización de esos subproductos.

1.2 Matriz extracelular

1.2.1 Colágeno

Las proteínas tienen diversas funciones dependiendo de su secuencia de aminoácidos, la presencia de diversos elementos orgánicos o la forma tridimensional de sus moléculas. Algunas se desempeñan como enzimas que permiten acelerar las reacciones químicas, algunas tienen funciones de reserva para almacenamiento de ciertos componentes como el caso de la ovoalbúmina, otras como el colágeno brindan funciones estructurales que permite la formación de tejidos y huesos (López Fandiño, 2014).

El colágeno corresponde entonces a una variedad de proteínas de tipo extracelular de mayor presencia en tejidos, huesos, y piel de organismos vivos; y en el caso del ser humano corresponde a un tercio del total de todas las proteínas en el cuerpo.

En su estructura primaria se tiene una cadena polipéptida que se caracteriza por la presencia de glicina, una de las proteínas más simples, en cada tercera posición de las secuencias repetitivas de –Gli-X-Y (Miksík, 2009); su estructura secundaria corresponde a una conformación helicoidal de la cadena polipéptida, es decir existe un enrollamiento de la

cadena sobre si misma; mientras que su estructura terciaria está formada a partir de tres cadenas diferentes polipeptidas, que se acomodan en una hélice triple; el arreglo cuaternario está formado a partir de la unión de diversas hélices o moléculas de colágeno en lo que se conoce como una supramolécula (Pratt & Kathleen, 2012).

El colágeno en su estructura más intacta de triple hélice se conoce como colágeno nativo. Al darse un desdoblamiento y rompimiento de las cadenas, se genera colágeno con cierto nivel de hidrólisis.

De la secuencia de aminoácidos de la estructura primaria mencionada anteriormente, los otros dos aminoácidos más frecuentes son la prolina y la hidroxiprolina, tal y como se muestra en la Figura 1.4, en donde la cantidad relativa de ambos depende del tipo de especie animal en la que se encuentra el colágeno. Por ejemplo, el colágeno de peces presenta una menor cantidad de hidroxiprolina que aquel proveniente de animales terrestres (Muralidharan, Jeya Shakila, Sukumar, & Jeyasekaran, 2013), y en el caso de especies acuáticas de aguas cálidas el contenido de prolina e hidroxiprolina es mayor que para el caso de especies de agua fría.

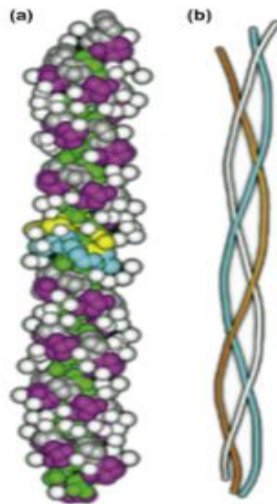


Figura 1.4 a) Modelo de la estructura helicoidal del colágeno. Aminoácido de glicina en verde, prolina en gris e hidroxiprolina en morado. b) representación esquemática de la triple hélice (Ebnesajjad, 2013).

La presencia de hidroxiprolina entre las cadenas de aminoácidos tiene un efecto relevante, ya que hace que la estabilidad térmica de la hélice aumente cuando se encuentra en la posición Y y no X de la cadena repetitiva (Shoulders & Raines, 2009). La trascendencia también radica en su uso para la cuantificación de colágeno, al ser este aminoácido casi único para esa estructura. Su determinación puede ser realizada a través de métodos de cromatografía líquida o mediante un ensayo colorimétrico por espectrofotometría (Hofman, Hall, Cleaver, & Marshall, 2011).

Existen diferentes tipos de colágeno, hasta el momento se han identificado alrededor de 29 variedades, que cambian de acuerdo con el tipo de cadenas de aminoácidos (cadenas α) que presentan en su estructura y a su secuencia de aminoácidos. El colágeno tipo I, por ejemplo, corresponde a uno de los componentes de mayor presencia en las matrices extracelulares; principalmente en huesos, tendones, órganos y piel; su triple hélice está formada a partir de dos cadenas α_1 , denominadas así por ser iguales entre ellas, y una α_2 que presenta una conformación diferente (Grumezescu, s. f.)

1.2.2 Componentes no colágenos

La matriz extracelular cuenta con diversos tipos de proteínas, entre ellas las colágenas y no colágenas. Las proteínas no colágenas, de las cuales se pueden destacar a la “matriz de proteínas multiadhesivas” tienen la función de unir los diferentes tipos de colágeno, polisacáridos y otros componentes que se pueden encontrar presentes en la estructura; también incluye a los proteoglicanos quienes tienen la función de ayudar a la difusión de moléculas entre tejidos, y son quienes confieren volumen a la estructura extracelular por contar con polisacáridos cargados dentro de su composición, quienes son altamente hidratados (Lodish et al., 2000).

1.3 Fuentes de obtención del colágeno

Como se ha mencionado anteriormente, el colágeno puede ser adquirido de diferentes fuentes animales, incluyendo especies terrestres como ganado bovino y porcino; además puede ser encontrada en animales de agua dulce o salada como pescado, medusas, o pepinos de mar.

Según Ramírez Guerra (2013), el colágeno de origen en mamíferos terrestres es el que representa un mayor uso debido a que supone más facilidad de ser obtenido, siendo el bovino obtenido principalmente de la piel y huesos de la vaca, y el porcino de piel y huesos de cerdo. Sin embargo, en los últimos años su consumo ha disminuido gracias a que se relaciona con enfermedades como la fiebre porcina y encefalopatías, además de que presenta pérdida de integridad estructural durante el proceso de extracción, lo que representa peligros para su uso en ciertas aplicaciones. Gracias a lo anterior, se muestra un creciente interés por desarrollar productos a partir de fuentes alternativas que representan mayor seguridad, tal como la piel, huesos o escamas de animales acuáticos; que comparten algunas características de tipo estructural con el colágeno de animales terrestres, pero se comportan diferente en algunas de sus propiedades químicas y físicas.

Las propiedades físicas y químicas del colágeno varían de acuerdo con la fuente, ya sea según el tipo de animal y también según el tipo de tejido que se utilice. En general, el colágeno de mamíferos y especies acuáticas presentan una estructura de redes con un modelo parecido, pero exhibe diferencias en la cantidad de aminoácidos presentes como la hidroxiprolina; además las temperaturas de desnaturalización son diferentes (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, s. f.) .

El colágeno obtenido de fuentes diferentes a las convencionales, como el derivado de especies acuáticas, tiene ventajas, por ejemplo: una mejor absorción al presentar un menor peso molecular, bajos procesos inflamatorios durante su uso, menos sustancias que puedan inducir la respuesta inmune del cuerpo (inmunógenos), e inclusive mayor aceptación en grupos poblacionales que por creencias religiosas o étnicas no admiten productos de origen bovino o porcino (K.S Silvipriya et al., 2015).

1.3.1 Tilapia

Correspondientes a la familia de los Cichlidae, esta especie de agua dulce representa una de las más utilizadas en los procesos de acuicultura, y se espera que se genere un aumento considerable en el desarrollo de esta debido a su alto consumo. Según informes, la producción mundial para el 2010 se encontraba alrededor de 4.3 millones de toneladas, y se espera que para el 2030 pase a casi el doble con valores cercanos a las 7.3 millones de toneladas (World Bank, 2013). Se le atribuye a la tilapia, específicamente a su piel, un contenido aproximado de 70% de humedad, entre un 14% y 22% de proteínas que contienen en su mayoría colágeno, mientras que el resto se puede dividir entre diversas sustancias minerales; aunque estos valores pueden cambiar dependiendo de la variedad en estudio. Es por esto por lo que su piel puede ser utilizada para extraer colágeno.

Estudios han determinado que, de todas las variedades de colágeno, el presente en mayor cantidad en la piel de tilapia es el tipo 1.

1.4 Aplicaciones del colágeno

El colágeno tiene aplicación industrial en la generación de productos emulsificantes, producción de gelatina para consumo humano, productos espesantes, y más recientemente en la elaboración de péptidos con actividades biológicas con propiedades antioxidantes y antihipertensivas (Ramírez Guerra HE, 2013).

Es conocido que el colágeno representa uno de los mayores componentes de las matrices extracelulares, por su capacidad para dar resistencia o fuerza a los tejidos biológicos, y por ser biocompatible; es por esto por lo que hay un creciente interés de este en su uso como biomaterial sustituto de tejidos vivos. Sus características también son aprovechadas en la fabricación de implementos médicos como válvulas para el corazón, hilos para suturas, apósitos para heridas, entre otros (Gaharwar, Sant, Hancock, & Hacking, s. f.).

El colágeno tiene propiedades dirigidas a la industria cosmética. El uso de polímeros como el colágeno, en productos que enmascaren las arrugas de la piel, es alto, ya que “ayudan a la retención de agua y disminuyen las pérdidas por humedad de la superficie de la piel, lo que resulta en una disminución del aspecto de las arrugas” (Kim, 2011).

1.5 Caracterización de materia prima

El análisis inicial de cualquier materia prima, para la evaluación de las características que la hacen apropiada para un proceso, es de interés. En el caso en donde se evalúe la posibilidad de obtener colágeno, toma relevancia conocer cuál es la composición de la materia prima en cuanto a la proteína de clave, y otros componentes como grasa, minerales y proteínas no colágenas para determinar si es necesaria su eliminación.

1.5.1 Análisis proximales

Los análisis sobre composición de alimentos o subproductos derivados a partir de éstos son conocidos como “análisis proximales”, y permiten una determinación cuantitativa en cuanto a contenido de cenizas, grasa, humedad, proteínas, y otros (Self, 2005). En este caso, su determinación es necesaria como etapa preliminar para la definición de los pasos a seguir en la obtención del colágeno; y para determinar el valor máximo teórico de colágeno que se podría obtener durante la extracción después del primer tratamiento enzimático.

- Contenido de humedad: Este se obtiene mediante la medición de pérdida de peso en una muestra cuando se da un proceso de deshidratación. Para ello se utiliza calor aplicado por un horno a temperaturas controladas (Owusu-Apenten, 2004).
- Contenido de ceniza: Cuantifica la cantidad de materia inorgánica o contenido mineral total presente en la muestra, una vez ha pasado por un proceso de ignición de su materia orgánica. Tiene como ventaja su seguridad y la no necesidad de utilizar otras sustancias químicas para su determinación (S. Nielsen, 2014).
- Contenido de grasa: Mediante el uso de solventes se realiza la extracción y cuantificación de todos aquellos componentes grasos presentes en el alimento. Generalmente se emplea dietil éter como solvente de extracción, sin embargo, éste

puede extraer en ocasiones otros componentes diferentes a las grasas, que sean afines y solubles en las condiciones utilizadas, por esta razón se recomienda usar muestras secas. Por el carácter higroscópico del éter, si se pone en contacto con muestras de alto contenido de humedad este se satura y la eficiencia de la extracción se reduce. El dietil éter extrae la mayoría de los componentes lipídicos no polares, sin embargo extrae pocos de los polares, por lo que muchas veces se recurre a otros solventes como éter de petróleo, cloroformo, metanol, etanol, hexano, pentano, benceno, entre otros; y su escogencia está determinada por aspectos como inflamabilidad, seguridad, costo o carácter higroscópico (AAFCO, 2014).

- Contenido de proteínas: Su análisis se realiza por el método de Kjeldahl, en donde se cuantifica el contenido total de nitrógeno de la muestra a analizar. El proceso consiste en una digestión en Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) utilizando un catalizador. Una vez determinada la cantidad de nitrógeno en la muestra, se puede relacionar matemáticamente con el contenido de proteína.

En el Cuadro 1.1 se presentan composiciones proximales para diferentes especies acuáticas, se tiene respectivamente la tilapia Wami, la tilapia Plateada, y tilapia Mosámbica. Tales valores se muestran a modo de comparación con la especie en estudio en este trabajo.

Cuadro 1.1. Análisis proximal para piel de tilapia Wami (*Oreochromis Urolepis*), tilapia Plateada (*Oreochromis Niloticus*) y tilapia Mosámbica (*Oreochromis Mossambicus*).

Análisis proximal	<i>Oreochromis Urolepis</i> ¹ (%)	<i>Oreochromis Niloticus</i> ² (%)	<i>Oreochromis Mossambicus</i> ³ (%)
Contenido de ceniza	4.24±0.35	0.61±0.01	0.51±0.09
Contenido de humedad	72.6±2.49	73.08±0.65	70.73±0.26
Contenido de grasa	3.85±0.22	4.38±0.02	-
Contenido de proteína	21.30±2.53	24.31±0.82	29.09±0.31

¹(Alfaro, Fonseca, Balbinot, Machado, & Prentice, 2013) / ⁽²⁾ (Hilbig, Fockink, Maluf, Boscolo, & Feiden, 2013) / ⁽³⁾ (Jamilah, Tan, Umi Hartina, & Azizah, 2011)

Las variaciones en cuanto a los valores de composición pueden deberse a diversos factores, siendo el principal de ellos por supuesto la diferencia entre las especies. Inclusive entre especies iguales es difícil obtener caracterizaciones parecidas si hay presentes diferencias anatómicas, fisiología, cambios en el clima durante el cual la especie es capturada, y cambios en la alimentación (Beltrán, 2006).

1.5.2 Hidroxiprolina

Corresponde a un aminoácido hidroxilado que se encuentra en la estructura del colágeno, y que provee estabilidad a la triple hélice. Su presencia en tejidos es de aproximadamente entre 12.5 y 13.0% con respecto al total de aminoácidos en el colágeno, y se encuentra en muy pocas proteínas aparte de este, por lo que es utilizada como parámetro para la cuantificación del mismo (Pubchem, 2004).

Esta prueba incluye la construcción de una curva estándar, realizada a partir de la absorbancia medida para diferentes concentraciones conocidas de soluciones de hidroxiprolina; y su uso para la comparación con muestras con una cantidad de colágeno desconocido, hidrolizadas ácidamente.

En el Cuadro 1.2 se presentan datos teóricos del contenido de hidroxiprolina en una variedad de piel de tilapia *Oreochromis sp*, además del de otras especies como referencia.

Cuadro 1.2. Contenido de hidroxiprolina para diferentes especies (Gaona, 2011).

Especie	Contenido de hidroxiprolina (mg/g muestra)
Piel de tilapia (<i>Oreochromis sp</i>)	15.11 ± 2.14
Piel de cachama	22.33 ± 2.91
Piel de carpa plateada	27.1 ± 0.39

La determinación del contenido de hidroxiprolina en una muestra está dada a partir de la siguiente relación (AOAC International, 2009):

$$H = \frac{h * V_{fh} * f_{d1} * f_{d2}}{m_h} \quad (1.1)$$

Donde:

H: Contenido de Hidroxiprolina, mg/g

h: Contenido de Hidroxiprolina, ug/ml.

V: Volumen de filtrado hidrolizado, ml.

f_{d1} : Primer factor de dilución.

f_{d2} : Segundo factor de dilución.

m_h : masa de muestra hidrolizada, g.

Según AOAC International (2009), una vez determinado el contenido de hidroxiprolina, es posible cuantificar la cantidad de colágeno, utilizando la siguiente fórmula:

$$C = H \times 8 \quad (1.2)$$

Donde:

C: Contenido de colágeno, g/100g.

1.6 Obtención de colágeno hidrolizado

Para lograr la obtención del colágeno, que se encuentra en diversas especies, se cuenta con variados métodos; esto ya que la cantidad de tipos de colágeno y fuentes de las que puede ser obtenido es grande, y las variaciones en su composición pueden afectar el rendimiento obtenido. Además, dependiendo del método utilizado para la extracción varía la solubilidad del colágeno (Davidson & Cooper, 1968).

El proceso de obtención de colágeno hidrolizado obedece a dos etapas principales; en la primera de ella se da una eliminación de componentes *no colágenos* que se encuentren en la materia prima, con lo que consecuentemente se obtiene una matriz sólida del colágeno deseado en base húmeda. La segunda etapa corresponde a la hidrólisis de la matriz colágena obtenida en la primera parte, para la generación de cadenas colágenas o péptidos más pequeños, dependiendo del nivel de hidrólisis.

El aislamiento de la matriz colágena más limpia del primer tratamiento se realiza generalmente mediante el uso de sustancias de naturaleza ácida o álcali, dependiendo de la identidad de lo que se quiera remover; sin embargo, también se presenta el uso de enzimas que permitan la eliminación de componentes no colágenos. La hidrólisis del colágeno también puede utilizar las mismas sustancias.

1.6.1 Tratamiento ácido

En el caso de tratamientos ácidos, se logra la remoción de proteínas ácidas, y según Kim (2014) es utilizada principalmente en desechos mamíferos. Es manejado para los tipos de colágeno que presentan menor grado de adhesión covalente, como el proveniente de piel de cerdo.

1.6.2 Tratamiento álcali

Permiten eliminar proteínas básicas debido a un debilitamiento en los enlaces que las unen a las fibras de colágeno.

La utilización de éste es favorable si se requiere la remoción de grandes cantidades de partículas no colágenas, y la ruptura de algunos enlaces dentro de las cadenas de colágeno. En él la identidad de la base utilizada no es tan significativa durante el pretratamiento, siendo por otro lado la temperatura y la concentración las condiciones que más se toman en cuenta.

1.6.3 Tratamiento enzimático.

Existen algunas diferencias estructurales en el colágeno proveniente de especies acuáticas con respecto al colágeno obtenido de especies de origen terrestre, por lo que para estos casos se recomienda el uso de una combinación de tratamientos tanto ácidos como básicos para un aumento en el rendimiento de colágeno (Kim, 2014).

La remoción de componentes no colágenos también puede ser realizada mediante el uso de enzimas. Se alcanza mediante la utilización de proteasas que tienen menor capacidad de degradar el colágeno, pero mayor capacidad de eliminar otras proteínas que puedan estar presentes en las pieles. Entre las enzimas que se utilizan mayormente en este tipo de proceso se tiene a la tripsina, pepsina, y otras de origen microbiano (Walsh, 2002).

Enzimas de origen vegetal también son utilizadas para trabajar sobre matrices protéicas. Por su capacidad para alterar la estructura de los tejidos conectivos; enzimas como la papaína, la bromelina o la ficina se han reportado en procesos para la obtención de colágeno en diferentes matrices.

En el caso del presente trabajo, se escogió la utilización de la Papaína y Bromelina para las pruebas preliminares, y posteriormente para los diseños experimentales; ambas de producción local, debido a que presentaron una mayor facilidad de adquisición y un relativo bajo precio, en comparación con otro tipo de enzimas grado analítico que habrían requerido su importación y por lo tanto mayor tiempo de espera para realizar las pruebas.

Papaína

La papaína es una enzima aislada mediante procesos de secado del latex de papaya. Pertenecce al grupo de las cisteína-proteasas; es decir, aquellas que cuentan con un residuo de cisteína en su estructura, que ayuda a que se dé la función catalítica de la enzima; a diferencia de otras como las metalo-proteasas en donde la catálisis se da por acción de metales (Devlin, 2004).

La enzima tiene capacidad de romper proteínas, algunos esteres de aminoácidos, y péptidos de cadenas cortas que contienen arginina, lisina, o fenilalanina en su estructura (Amri & Mamboya, 2012).

La papaína puede degradar muchas proteínas encontradas en los tejidos conectivos y músculos; sin embargo, presenta en condiciones específicas poca actividad en el colágeno nativo. Según Junqueira, Bignolas, Mourão, & Bonetti (1980), la papaína tiene la capacidad de hidrolizar y remover proteínas no colágenas, sin afectar el contenido de colágeno, mediante tiempos cortos de tratamiento con la enzima, de lo contrario si se puede dar afectación de la triple hélice de la estructura colágena.

Según estudios comparativos entre diferentes tipos de enzimas, las cisteína-proteasas presentan una mayor actividad en la digestión de proteínas no colágenas como los proteoglicanos; cuya digestión es la que precede a la de componentes colágenos. Por su efectividad en la acción sobre proteínas no colágenas, las cisteino-proteasas se utilizan en ciertas condiciones de digestión para un ataque inicial de las diferentes matrices; y después, según el objetivo esperado, se pueden realizar tratamientos con otras enzimas (Vincent Everts, Jean-Marie Delaisse, Wolf Korper, & Wouter Beertsen, 1998).

Existen diferentes componentes que pueden ayudar a la activación y estabilización de la papaína, para lograr su máxima actividad. Entre ellos se tiene la cisteína, “un agente reductor que adicionado a la enzima puede mejorar su actividad hasta 20 veces” o puede reactivarla en los casos en los que ha sido desactivada por otros agentes (Bekhit, 2017). El ácido etilendiaminotetraacético o EDTA también es utilizado en conjunto con la papaína debido a su capacidad para estabilizar la enzima (Worthington Biochemical corporation, s. f.).

Bromelina

Es una enzima presente tanto en el fruto como en la corona de la piña, con capacidad para romper enlaces péptidos. Corresponde a una mezcla de endopeptidasas tiólicas con algunas fosfatasas y glucosidasas.

Se ha reportado que su temperatura de trabajo óptimo se encuentra por encima de los 50°C, punto después del cuál existe un decaimiento rápido de su acción. El pH de máxima actividad se encuentra cercano a 7; sin embargo, presenta un segundo pico en pH 10 (Martins et al., 2014).

1.7 Factores que afectan la reacción enzimática

1.7.1 Relación másica sustrato:enzima

Existe una relación directa entre el sustrato y la enzima utilizada para realizar la proteólisis. La interacción entre sustrato y el sitio activo de la enzima debe darse en varios puntos para que el sustrato pueda ser unido, y la reacción ocurra.

Corresponde a una de las variables a las que se le presta mayor atención si se desea mejorar la selectividad de la enzima con la que se trabaja sobre el sustrato. Una variación en la cantidad de enzima utilizada en una reacción puede hacer que se limite el ámbito de actividad en la que trabaja (Downard, 2007).

La velocidad de catálisis que presentan la mayoría de las enzimas puede describirse tal y como se muestra en la Figura 1.5. En ella hay un aumento lineal, después del cual se da una estabilización hasta alcanzar un máximo a partir de cierta cantidad de sustrato.

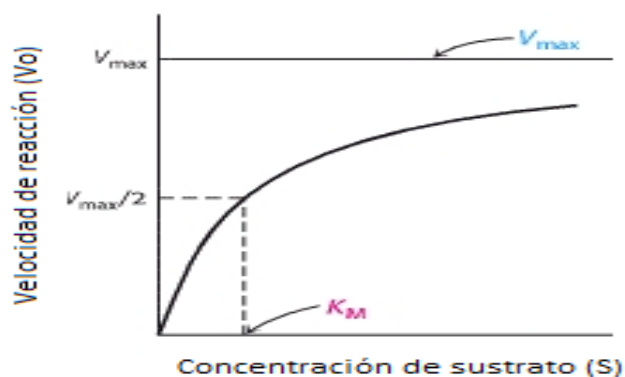


Figura 1.5 Velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2002).

1.7.2 Concentración de enzima

La tasa de reacción no siempre actúa de una manera lineal con respecto a la concentración de la enzima utilizada, tal y como se muestra en la Figura 1.6. Aunque este comportamiento es mostrado, especialmente en tiempos de reacción cortos, se pueden generar otros fenómenos.

La actividad enzimática puede ajustarse a curvas creciente o decreciente en función de la concentración de la enzima. Según Tucker & Woods (1995), el aumento en la actividad a mayor concentración de enzima está relacionado con una pseudo activación de la misma, y con un aumento en las posibilidades de re-asociación de la enzima, promovida por la presencia de ciertas sustancias en pequeñas cantidades en el medio de reacción; mientras que el decaimiento de la actividad puede ser resultado de una saturación o poca presencia de cofactores durante la reacción.

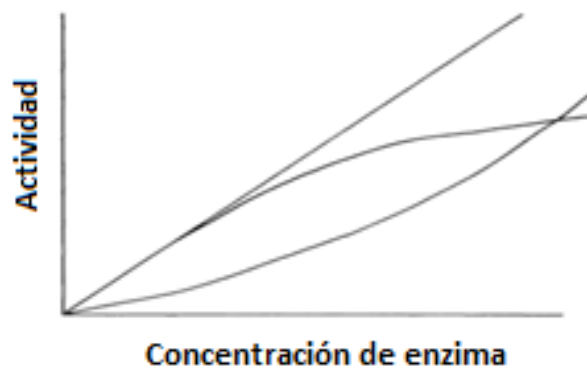


Figura 1.6 Relación entre actividad enzimática y concentración de la enzima (Tucker & Woods, 1995).

1.7.3 pH

Según Marwaha, Chopra & Panesar (2010), el pH del medio en el que actúan las enzimas también es determinante para el proceso de reacción. La actividad de una enzima presenta un nivel máximo a un determinado valor de pH; antes y después de alcanzar ese punto la

actividad enzimática disminuye, tal y como se muestra en la Figura 1.7, por lo que generalmente se presenta una curva en forma de campana.

El ámbito de pH óptimo habitual para las enzimas se encuentra entre 5 y 9, sin embargo, se tienen algunas excepciones de acuerdo con el tipo de sustrato que se utilice.

En el caso de la papaína, la actividad enzimática puede variar entre pH 4 y 8, aproximadamente.

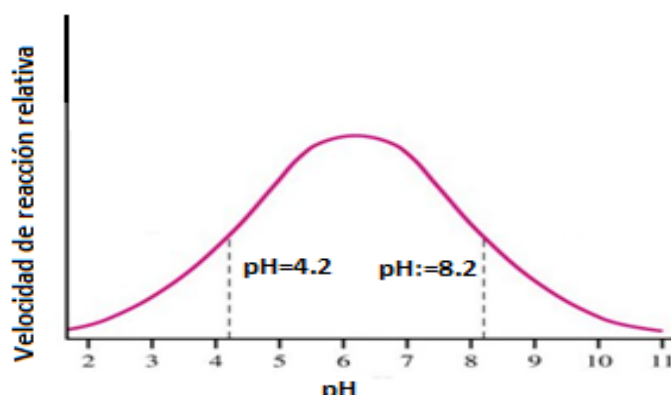


Figura 1.7 Dependencia de la actividad enzimática de la papaína con respecto al pH (Universidad de Maine, 2014).

1.7.4 Temperatura

De acuerdo con Shanmugan (2009), un aspecto que puede influenciar en la actividad de una enzima es la temperatura. Se presentan dos efectos: el primero es el de variar la velocidad de reacción, y el segundo es el de destruir las enzimas que actúan sobre el sustrato gracias a una desnaturalización. Al igual que con el pH, existe un ámbito de temperatura en donde las enzimas presentan una buena actividad enzimática, fuera de este se produce la inhabilitación, debido a un aumento en la energía que rompe los enlaces en la estructura de las enzimas.

Para la papaína, la temperatura óptima de trabajo se encuentra alrededor de los 50°C, lo que la hace muy termoestable; sin embargo, este valor puede cambiar dependiendo de las condiciones en las que se extrajo la enzima. Ésta contrasta con las temperaturas en donde se puede presentar una degradación del colágeno nativo, cuyos valores se encuentran entre los 55 °C y 65°C (Walsh, 2002); en este ámbito se presenta el debilitamiento de la triple hélice de la estructura de colágeno. Según Amri & Mamboya (2012)

En la Figura 1.8 se presenta una curva de dependencia típica entre actividad enzimática y temperatura.

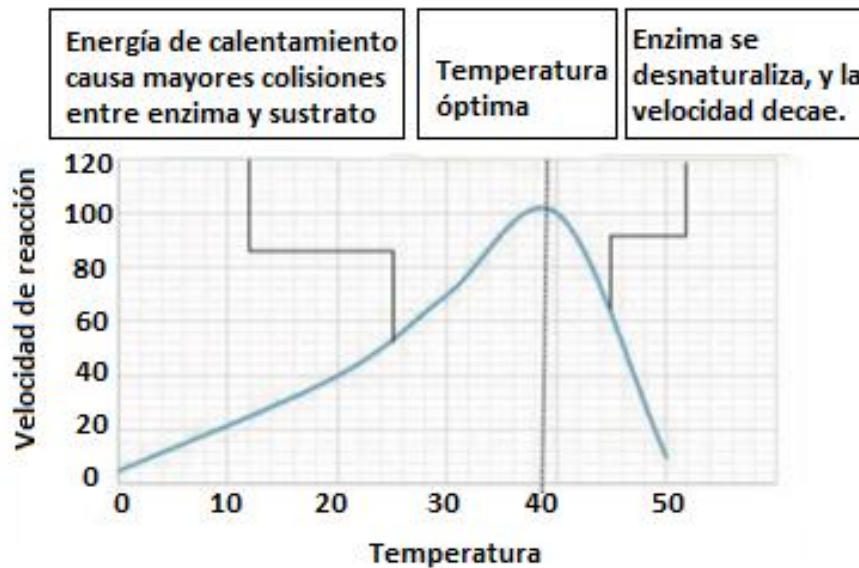


Figura 1.8 Dependencia de la actividad enzimática con respecto a la temperatura (Amid, 2015).

1.7.5 Tiempo de reacción

Las enzimas tienen como función actuar como catalizadores en una reacción con un sustrato específico, gracias a su capacidad de disminuir la energía de activación. Durante esta reacción se da la formación de un intermediario, debido a las fuerzas de atracción entre el sitio activo del sustrato y los grupos reactivos de la enzima; posteriormente se observa la generación del

producto, que incluyen a la enzima que ha sido regenerada durante el proceso (Chang, 2000). En términos gráficos, la reacción se presenta tal y como en la Figura 1.9.

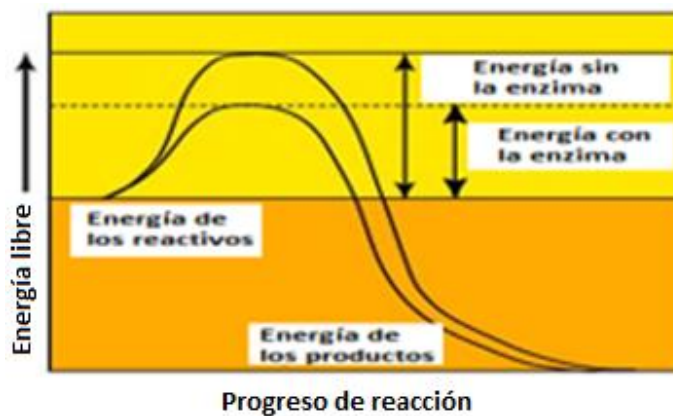


Figura 1.9 Progreso de la reacción en términos de la energía libre (General Principles of Catalysis, 2014).

Para la formación del intermediario y de los productos, es necesario cumplir con un tiempo de reacción, tal y como se observa en la Figura 1.10. De no permitir que la reacción se dé en el tiempo suficiente, la digestión puede realizarse de manera incompleta, sin alcanzarse el objetivo esperado.

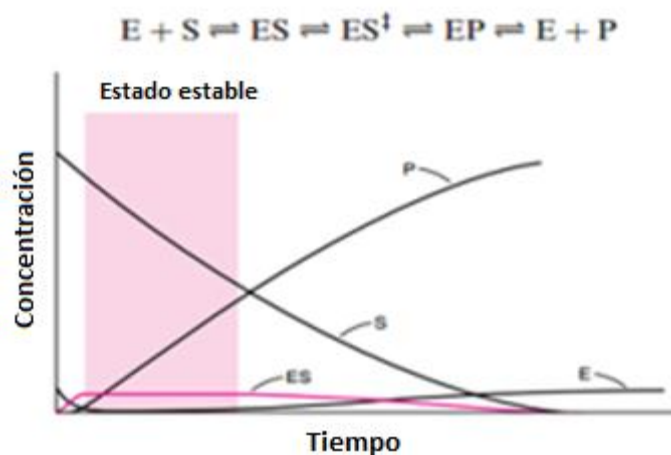


Figura 1.10 Concentración de reactivos y productos de reacción enzimática, con respecto al tiempo (Chang, 2000).

1.8 Hidrólisis de colágeno

1.8.1 Hidrólisis básica

En ella el principal reactivo utilizado es el hidróxido de sodio, y el hidrolizado obtenido muchas veces tiene poca funcionalidad. La proteína primero se solubiliza, generalmente mediante aplicación de calor, luego es agregado el agente básico, y se mantiene la temperatura en el punto deseado durante horas hasta que se obtiene el grado de hidrólisis necesario, luego el producto pasa a un proceso de evaporación y secado (Pasupuleti & Demain, 2010).

No es el método de hidrólisis de proteínas más utilizado, debido a que se sabe que algunos aminoácidos son destruidos por el agente álcali, lo que genera un cambio apreciable en la composición.

1.8.2 Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida de proteínas es realizada generalmente mediante el uso de ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, en donde el producto hidrolizado es obtenido a altas temperaturas y presiones. Después, es necesario un proceso de neutralización, antes de que se disponga del hidrolizado para el secado.

Corresponde al método más utilizado; sin embargo, dependiendo de las condiciones en las que se dé, puede tener un rendimiento bajo y destrucción de aminoácidos, por lo que se busca en muchos casos su combinación con otras técnicas para aumentar lo extraído (Whitehurst & Oort, 2009).

Gracias al uso de soluciones ácidas, aproximadamente el 2% del colágeno de los tejidos puede ser solubilizado, el 98% restante corresponde a “colágeno insoluble” que debe ser tratado mediante otras técnicas para su desintegración (Friess, 1997).

1.8.3 Hidrólisis enzimática

Las enzimas proteolíticas, para la hidrólisis, se encargan de la ruptura de enlaces entre péptidos en cierta área de la estructura del colágeno, tal y como se observa en la Figura 1.11, con lo que se logra la obtención de cadenas más pequeñas.

En el caso de hidrolizados a base de proteínas de pescado, las enzimas proteolíticas provenientes de microorganismos o de plantas son las más utilizadas, siendo la eficacia de hidrólisis el factor más utilizado para su elección, además de su costo.

Otro aspecto para tomar en cuenta en la elección de enzimas es el objetivo que se tenga pensado para el hidrolizado y sus características; por ejemplo, si se desea disminuir el crecimiento bacteriano en el producto, se puede optar por proteasas de carácter ácido; sin embargo, esto presenta como desventaja un bajo rendimiento de proteína. Enzimas en condiciones más básicas son utilizadas por lo tanto con mayor frecuencia (Kristinsson & Rasco, 2000).

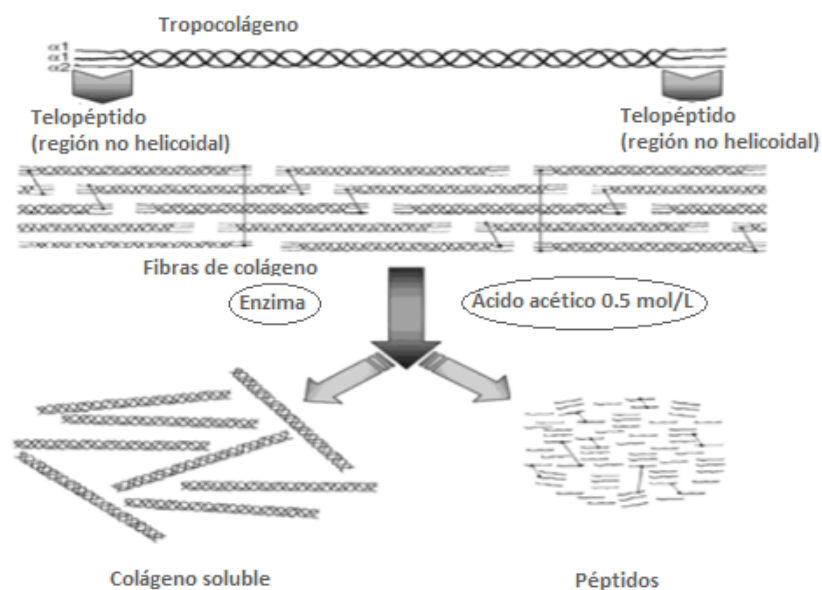


Figura 1.11 Hidrólisis enzimática en colágeno (Whitehurst & Oort, 2009).

Mediante el uso del método de hidrólisis enzimática se obtienen ventajas como: “la posibilidad de tener una reacción más selectiva que destruye menos los aminoácidos del colágeno, también se tiene una mayor pureza en el producto, y propiedades físicas y químicas más estables. Otras ventajas son la presencia de condiciones leves que evitan la corrosión de los equipos y un bajo consumo energético” (Yang & Shu, 2014).

1.9 Grado de hidrólisis

Para el grado de hidrolizado en una proteína, se determina la relación entre enlaces rotos y el número de enlaces totales entre péptidos por equivalente de proteína, cuyo valor es conocido como grado de hidrólisis, tal y como se representa en la siguiente fórmula.

$$DH = \frac{h^*}{h_{tot}^*} * 100\% \quad (1.3)$$

Donde:

h^* : número de enlaces hidrolizados.

h_{tot}^* : total de enlaces peptídicos por equivalente de proteína.

Existen diversos métodos que permiten cuantificar la cantidad de enlaces hidrolizados, siendo la técnica con pH-stato, reacciones con Ácido Trinitro Benzosulfónico (TNBS) y reacciones con o-ftalaldehído (OPA) los más utilizados (P. M. Nielsen, Petersen, & Dambmann, 2006).

Basada en el principio de que durante el proceso de hidrólisis se da una liberación de hidrógeno que permite la reducción del pH (Spellman, McEvoy, O’Cuinn, & FitzGerald, 2003), el método de pH-stato consiste en la cuantificación de una base, necesaria para neutralizar la reacción. La cantidad de base utilizada es proporcional al grado de hidrólisis

de la muestra. Esta metodología no es utilizada cuando se esperan grados de hidrólisis altos, ya que el consumo de reactivos hace que la medición sea costosa.

Mediante una reacción entre las aminas primarias de las proteínas y el TNBS, se permite la formación de un compuesto coloreado que absorbe a una longitud de onda de 340nm, y que puede ser cuantificado. El método presenta la desventaja del uso de reactivos altamente inestables y contaminantes, por lo que se han buscado métodos más eficientes para su sustitución. Además, se ha determinado que el cambio en la tonalidad el cromóforo en algunos casos no se comporta de manera lineal con respecto a la concentración de grupos aminos primarios, por lo que puede darse una sub o sobre estimación de los datos (Antranikian, 2005).

La metodología de medición mediante OPA consiste en una reacción de grupos aminos de proteínas con el o-ftalaldehido, en presencia de un grupo tiol, que es dado en este caso por el β -mercaptoetanol, y en donde se forma un compuesto cuya absorción se da a 340 nm. En esta técnica es utilizado un aminoácido como estándar como punto de comparación.

Para el método OPA, y siguiendo la ecuación para el grado de hidrólisis descrita inicialmente, es necesario relacionar la absorbancia obtenida después de la reacción, con el número de enlaces hidrolizados de colágeno. Esto se puede obtener de la siguiente manera, según lo descrito por P. M. Nielsen, Petersen, & Dambmann (2006). Se tiene que:

$$h^* = \frac{J * \frac{meq}{L} * \frac{V_m * 100}{m_m * P} - \beta}{\alpha} \quad (1.4)$$

$$J = \frac{Abs_{muestra} - Abs_{blanco}}{Abs_{estándar} - Abs_{blanco}} * F_d \quad (1.5)$$

Donde:

Ab_{muestra} : Absorbancia de la muestra.

Ab_{blanco} : Absorbancia del blanco de agua.

$Ab_{\text{estándar}}$: Absorbancia del estándar de aminoácido.

meq/L: miliequivalentes por litro del aminoácido utilizado para el estándar.

V_{mh} : Volumen de la muestra hidrolizada, L.

m_{m} : Masa de la muestra, g.

P: Porcentaje de proteína, %.

F_{d} : Factor de dilución.

α y β : Factores dependientes de la muestra hidrolizada.

El número total de enlaces totales dentro de la proteína es dependiente de cada fuente; sin embargo, existen tablas que ofrecen valores aproximados para diferentes materiales. Para el caso de especies de pescado, este valor corresponde a 8.6, mientras que α y β corresponde a 1.0 y 0.4 respectivamente.

1.10 Caracterización de colágeno

Durante la caracterización, se realizan pruebas que permitan definir propiedades físicas y químicas, específicas del producto obtenido, que ayudan a determinar aspectos de composición o pureza, estructura, y estabilidad. Gracias a estas propiedades, el producto puede ser comparado con otros, obtenidos mediante diferentes técnicas en otros estudios de referencia. Además, la determinación de características del colágeno es de utilidad si éste quiere ser a futuro utilizado como materia prima de otro proceso.

1.10.1 Temperatura de desnaturalización

De acuerdo con Nagai (1999), es posible determinar la temperatura de desnaturalización mediante el uso de curvas térmicas; obtenidas midiendo la viscosidad, o los cambios de

absorción de la luz UV, a diversas temperaturas de una solución de colágeno en ácido acético. La desnaturalización presenta cambios en las propiedades físicas de las proteínas, por lo que puede esperarse disminuciones en la viscosidad, tal y como se muestra en la Figura 1.12. Un seguimiento de alguna de estas propiedades permite obtener el punto en el cual se da el desdoblamiento helicoidal.

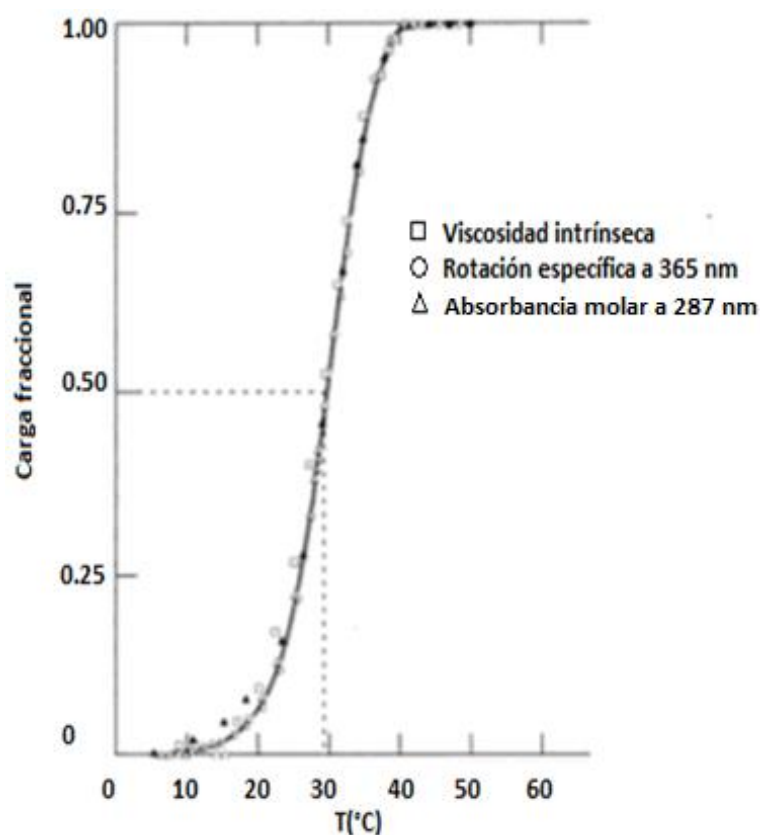


Figura 1.12 Curva de desnaturalización de una proteína (Voet & Voet, 2006).

La temperatura de desnaturalización del colágeno depende de diversos factores como: la especie de la cuál es obtenida la proteína, o el pH del medio si este se encuentra solubilizado. En el Cuadro 1.3 se presentan algunos datos de temperatura de desnaturalización para diferentes especies. Se puede notar que, incluso para el colágeno obtenido de la misma especie, pero de diferente variedad, la temperatura de desnaturalización puede ser distinta.

Cuadro 1.3. Temperatura de desnaturalización para diferentes especies.

Especie	T _d (°C)	Referencia
Colágeno porcino	37.0	(Nagai & Suzuki, 1999)
Colágeno de piel de tilapia (<i>Oreochromis sp</i>)	29.0	(Gaona, 2011)
Colágeno de piel de tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	32.0	(Zeng et al., 2009)

1.10.2 Espectroscopía IR

La espectroscopía infrarroja es una técnica ampliamente utilizada para analizar compuestos, ya que provee la posibilidad de determinar la presencia de diversos grupos funcionales, y cómo se encuentran unidos a través de enlaces. Se logra la obtención de información respecto a la composición e interacciones intermoleculares (Thomas, Rouxel, & Ponnamma, s. f.).

Las bandas de absorción de los diferentes grupos funcionales y enlaces presentes en las moléculas varían, dependiendo de la fuente de la cual sea obtenido el espectro, ya que, como todo compuesto, se tiene cierto nivel de individualidad entre las moléculas; sin embargo, el análisis de espectroscopía infrarroja puede determinar la unión de ciertos elementos dentro de las moléculas.

Según Thomas, Rouxel & Ponnamma (s.f), el espectro infrarrojo se logra gracias a la aplicación de radiación infrarroja en la muestra a analizar, y la determinación de las fracciones de esa energía que son absorbidas de acuerdo con la excitación de los enlaces de las moléculas.

Para las proteínas, los enlaces peptídicos son los enlaces entre amidas, tal y como se muestra en la Figura 1.13, y establecen la fuerza que mantiene unida a las proteínas. Gracias a la espectroscopia infrarroja es posible conocer los orígenes de las vibraciones de las bandas amidas.

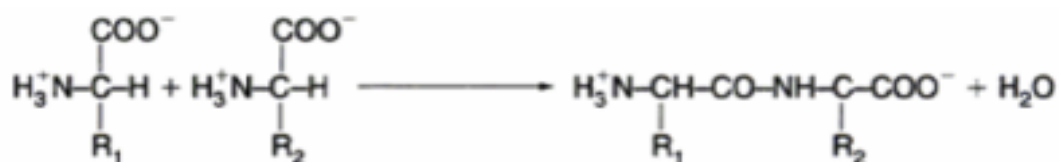


Figura 1.13 Enlace peptídico entre dos aminoácidos (Pacheco, 2004).

Análisis de espectroscopia infrarroja, han determinado posiciones e intensidades similares en las bandas amidas. En el caso del colágeno, se tienen bandas como las que se presentan en el Cuadro 1.4; en donde la amida A presenta vibraciones entre los enlaces N y H, la amida B vibraciones para enlaces en grupos CH₂, mientras que la amida I corresponde a las vibraciones de estiramiento entre los enlaces C=O, las de amidas II corresponden a las vibraciones entre N-H y entre C-N, mientras que las de amida III corresponden a una mezcla entre el estiramiento de los enlaces C-N y N-H.

Cuadro 1.4 Bandas características de absorción IR para el colágeno (Shanmugam, Ramasamy, Subhapradha, & Sudharsan, 2012).

Tipo de amida	Nº Onda (cm ⁻¹)
Amida A	~ 3 289
Amida B	~ 2 920 y 2 853
Amida I	~ 1 644
Amida II	~ 1 537 y 1 450
Amida III	~ 1 260, 1 078, 1 021 y 804

Diferencias en las especies de las que se obtiene el colágeno o el proceso de extracción utilizado, pueden generar discrepancias entre las absorciones teóricas y prácticas. Esto puede provocar un aumento o disminución de la intensidad de los picos, y el movimiento de las bandas a menores o mayores números de onda. A modo de ejemplificación, se muestra en la

Figura 1.14 una comparación entre colágeno de dos especies diferentes, y como esto presenta cambios en las bandas de absorción y la transmitancia asociada.

La espectroscopía infrarroja brinda información para el estudio de la estructura de las proteínas, y el doblaje o desdoblaje de las mismas. Mediante ésta, también, se puede monitorear las modificaciones de las proteínas, y reacciones de éstas catalizadas por enzimas (Barth, 2007).

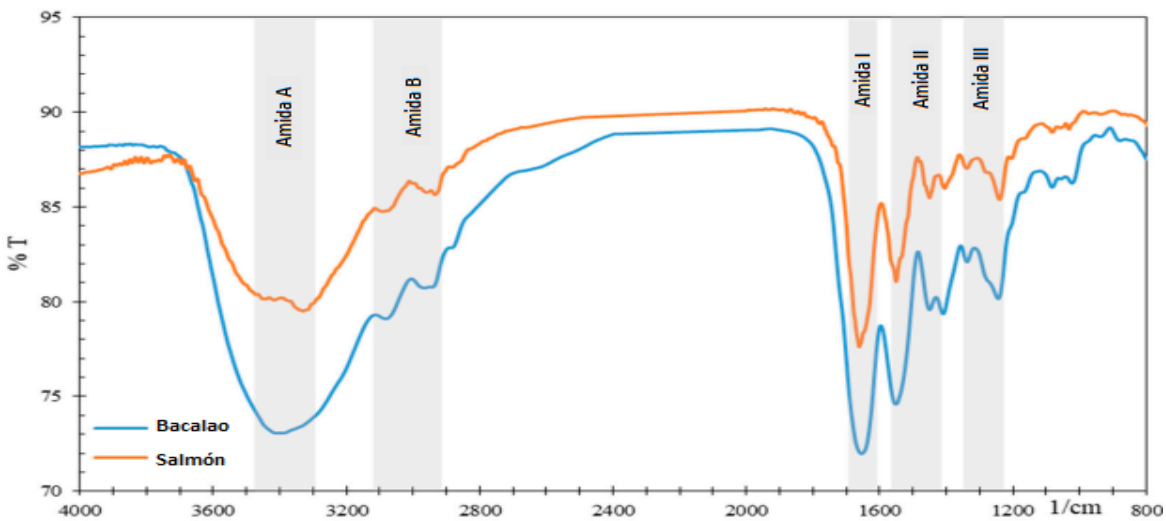


Figura 1.14 Espectro IR de colágeno de bacalao y colágeno de salmón (Alves, Marques, Martins, Silva, & Reis, 2017)

Utilizando esta técnica, en conjunto con otras como la electroforesis, se puede determinar el tipo de colágeno presente en las muestras.

1.10.3 Caracterización térmica

Un análisis térmico se realiza con el objetivo de examinar cuál es el comportamiento de un compuesto de interés, mediante la aplicación de cambios de temperatura en atmósferas controladas. Gracias a las variaciones de temperatura es posible generar una relación entre estas y las propiedades del material.

Según Balart Gimeno, Lopez Martinez & Garcia Sanoguera (2004) la termogravimetría es uno de esos métodos de análisis, en donde se tienen diferencias en la masa de las muestras producto de cambios en la temperatura, y es utilizada generalmente para estudiar las propiedades de estabilidad de un compuesto.

En la Figura 1.15 se presenta un termograma básico, donde se grafican datos de pérdida de peso contra temperatura. Se observa en la curva los diversos eventos que pueden atribuirse a pérdida de agua, sustancias volátiles, o procesos de degradación de la estructura.

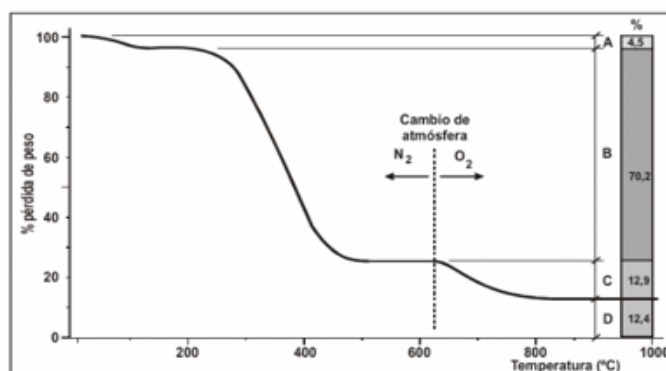


Figura 1.15 Termograma básico de un polímero analizado mediante la técnica de termogravimetría (Balart Gimeno, López Martínez, & García Sanoguera, 2004).

1.10.4 Electroforesis

Para analizar condiciones como pureza e identidad de proteínas, se utiliza la electroforesis. La técnica logra la separación de moléculas cuando les es aplicado un campo eléctrico, haciendo que se desplacen a diversas velocidades, de acuerdo con la relación entre masa y carga, hacia alguno de los electrodos.

En el caso de ciertas proteínas, las formas y tamaños de las moléculas son diferentes, pero las relaciones carga:masa parecidas; por lo que la técnica usual con soluciones líquidas no suele generar una buena separación. La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) genera una suspensión semisólida en agua; que permite,

al ser aplicada una corriente eléctrica sobre la mezcla de proteínas, la migración rápida de las más pequeñas a través del gel, en comparación con las proteínas más grandes (Lodish, 2005).

Mediante electroforesis con geles (SDS-PAGE) es posible obtener información sobre: “el peso molecular o carga de las proteínas, la pureza sobre una mezcla de proteínas en particular, y permite analizar muestras de diferentes fuentes comparándolas entre sí por contenido proteico”. Un cotejo del producto obtenido, contra patrones o bandas teóricas, permite asegurar o no que lo obtenido es colágeno y el tipo (I, II, etc.) (AES Application focus, s. f.).

En la Figura 1.16 se tiene un SDS PAGE de extractos de colágeno nativo por métodos de ácido soluble, y digestión con pepsina. En ella se puede observar, por ejemplo, la separación de las diferentes bandas características. Cada una puede ser identificada como diversas cadenas de aminoácidos que conforman el colágeno, denominadas como alfa, beta y gamma, que tienen una masa atómica molecular diferente denotada por unidades de kilodaltons (kDa).

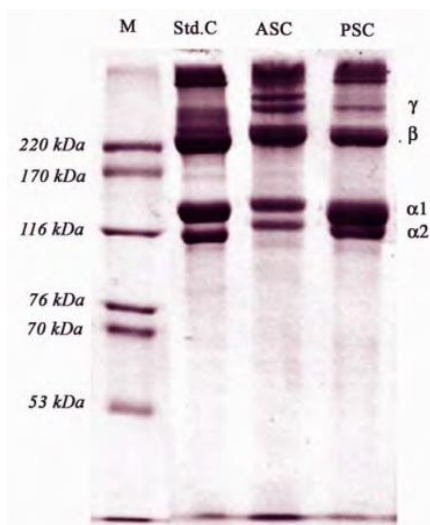


Figura 1.16 SDS-PAGE de extractos de colágeno tipo I de Tilapia *Oreochromis niloticus* soluble en ácido (ASC) y soluble en pepsina (PSC) y marcadores de alto peso molecular (Kumeresa, Sujithra, Kiruthiga, & JPrabhu, 2013)

El colágeno en su estado nativo presenta bandas por arriba de los 100 kDa, la gelatina al contar con una hidrólisis parcial presenta pesos entre los 90 kDa y 50 kDa, mientras que los

hidrolizados de colágeno generalmente presentan péptidos con pesos moleculares por debajo de los 40 kDa (Gorgieva & Kokol, 2011). La desnaturalización del colágeno es la que lleva a la pérdida de la triple hélice característica, lo cual se ve traducido en una disminución de los pesos moleculares de las proteínas obtenidas.

Mediante una comparación del gel de electroforesis de las muestras en sus diferentes estados de hidrólisis, se pueden observar los cambios en las estructuras, debido a la obtención de otras bandas. Se da una desaparición de las bandas alfa, beta y gamma (Rabotyagova, Cebe, & Kaplan, 2008) del colágeno nativo, para dar paso a otras bandas de menor peso molecular.

1.10.5 Espectro UV-Vis

Gracias a la medición de espectro en la zona ultravioleta-visible de una solución, se obtiene información importante sobre su composición. Puede ser utilizada entonces como un primer paso para la identificación de un compuesto, o para determinar hasta cierto punto su pureza.

El colágeno tipo I, por ejemplo, absorbe a longitudes de onda cercanas a los 220nm-230 nm, tal y como se observa en la Figura 1.17; a diferencia de otras proteínas que presentan picos importantes a longitudes de onda cercanas a los 280 nm, por la presencia de una gran cantidad de fenilalanina o tirosina (Yan et al., 2008). Picos de absorción diferentes a los esperados para el colágeno tipo I, pueden indicar la presencia de componentes adicionales, y por lo tanto impurezas.

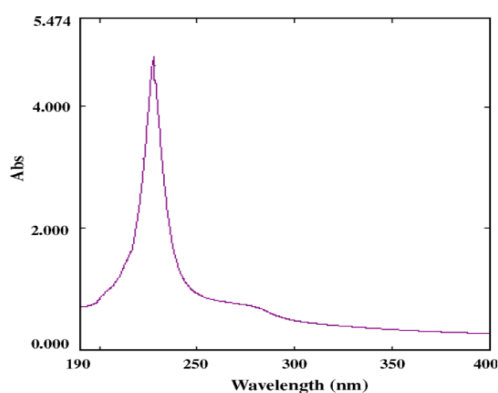


Figura 1. 17. Espectro UV-Vis para colágeno ácido soluble (Yan et al., 2008)

1.10.6 Solubilidad

La solubilidad corresponde a la máxima cantidad de un soluto que se puede disolver en un determinado volumen de solvente; es decir, después de este punto se obtiene soluciones sobresaturadas en donde el exceso de soluto no puede disolverse (Cabrera, 2007).

El conocer la solubilidad de las proteínas en un medio a diferentes condiciones, permite dilucidar características de su estructura, y posibles usos que se pueden dar al compuesto. La mayoría de las proteínas que son obtenidas para ser utilizadas en la formulación de nuevos productos en la industria cosmética, farmacéutica o alimenticia, se busca que tengan una solubilidad que les confiera la posibilidad de generar buenas emulsiones (Pelegrine & Gasparetto, 2005).

Dependiendo de la materia prima de la que sea obtenida, o de factores como el grado de hidrólisis, el medio en el que se encuentre, el pH, o la temperatura, el colágeno puede variar su solubilidad. En su estructura cuaternaria, dentro de organismos multicelulares o aislada, el colágeno es una proteína insoluble en agua; sin embargo, en su forma hidrolizada puede presentar características como baja viscosidad, y alta solubilidad (Iltchenco, Kempka, & Cristina Prestes, 2017).

Mediante la construcción de una curva estándar, que permita obtener una ecuación de recta que relacione la absorbancia con la concentración de una solución estándar de colágeno, se puede determinar la concentración de soluciones de la muestra de interés, y el punto en donde se da la saturación de la proteína en el medio.

Capítulo 2. Metodología experimental, equipo y materiales

En este capítulo se describen los materiales utilizados para el desarrollo de los diferentes objetivos del proyecto, así como los equipos y metodologías utilizadas para los mismos.

Primeramente, se realizó una caracterización de la materia prima inicial, piel de tilapia sin tratar, con el objetivo de determinar su composición en cuanto a contenido de grasa, proteína, humedad y minerales.

Se debe recordar que el objetivo principal fue la obtención de hidrolizados de colágeno, mediante la utilización de procesos enzimáticos en desechos de la industria acuícola. Para ello se desarrollaron dos etapas principales:

- 1) Se realizó un primer tratamiento enzimático, para la eliminación de *componentes no colágenos*, con la consecuente obtención de una matriz colágena, en base húmeda, y más limpia.
- 2) Un segundo tratamiento enzimático para la hidrólisis de la matriz colágena, y la obtención de péptidos.

Para la primera parte se realizaron inicialmente pruebas preliminares, en donde se definieron las variables, y niveles de esas variables a utilizar más adelante, experimentalmente, para un diseño factorial fraccionado. En él se registraron las condiciones más aceptables, que permitieron la mejor remoción de componentes no colágenos por un lado, y por otro la obtención de la matriz colágena limpia. El material obtenido bajo esas condiciones se caracterizó.

Debido a las características físicas del colágeno en la matriz derivada del primer tratamiento enzimático, cuya estructura todavía se encontró como cuaternaria insoluble, se le realizó una hidrólisis parcial *ácida*, con la cuál se transformó el colágeno a su forma fibrilar (estructura terciaria). Este producto fue conocido a partir de ese momento como colágeno nativo.

La hidrólisis ácida generó las condiciones apropiadas para las pruebas de caracterización de la proteína en su forma más intacta y soluble, que permitieron: la definición del tipo de colágeno presente, y un punto de comparación del colágeno intacto con respecto al colágeno hidrolizado enzimático con un carácter de péptidos más pequeños, obtenido más adelante en el estudio.

Durante la segunda etapa, se procedió a realizar pruebas preliminares de un tratamiento enzimático secundario para la obtención de hidrolizados. A partir de los resultados de estos ensayos, se generó un diseño experimental de superficie de respuestas para la hidrólisis de colágeno, que permitió determinar las mejores condiciones para la obtención de hidrolizados. Posteriormente se procedió a caracterizar el producto bajo las condiciones determinadas. Todo lo anterior se describe gráficamente en la Figura 2.1.

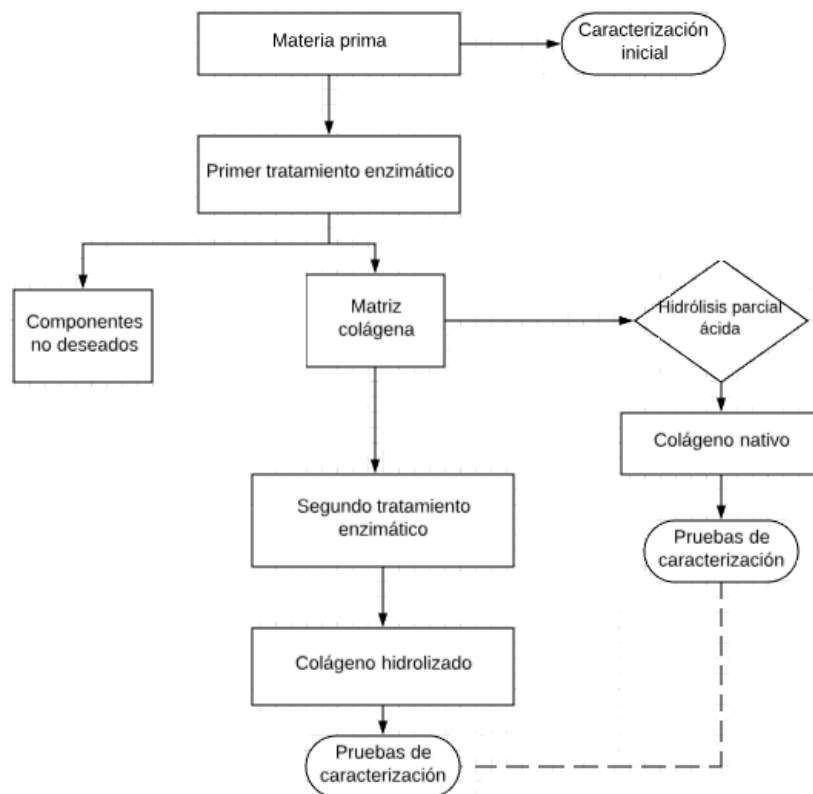


Figura 2. 1 Etapas para la obtención de hidrolizado enzimáticos de colágeno.

2.1 Materiales

La materia prima utilizada para obtención de colágeno fue piel de tilapia, de la variedad *Oreochromis Niloticus* o tilapia Nilótica. Fue brindada por la empresa AQUA Corporación Internacional, dedicada a la acuicultura, cuyas instalaciones se encuentran ubicadas en Cañas, Guanacaste, Costa Rica.

2.2 Reactivos y equipos experimentales

2.2.1 Análisis proximal

Para la caracterización inicial de la piel de tilapia se realizaron pruebas de contenido de: humedad, ceniza, grasa, y proteína. En el Cuadro 2.1 se presentan los reactivos y equipos utilizados

Cuadro 2.1. Reactivos y equipo para pruebas de análisis proximal de materia prima.

Reactivo/Equipo	Fabricante/Marca	Tipo	Pureza
Cápsulas de porcelana	-	-	-
Horno	Fisher Scientific	Isotemp programable	-
Balanza analítica	Mettler Toledo	AB204-S/fact	-
Hexano	Merck	ACS reagent	98%
Dedal de celulosa	-	-	-
Calentador	-	-	-
Rotavapor	Heidolph 1		
Extractor Soxlet	-	-	-

2.2.2 Pruebas preliminares y primer tratamiento enzimático

Para el tratamiento enzimático primario se realizaron, tanto pruebas preliminares como un diseño experimental, con la enzima proteasa Papaína. Esta es producida en Costa Rica por la empresa Beyco, y es obtenida del látex de papaya. Cuenta con una actividad enzimática de 70.000 TU/g.

En el Cuadro 2.2 se presentan los demás reactivos y equipos utilizados durante los tratamientos enzimáticos.

Cuadro 2.2 Reactivos y equipos utilizados para pruebas preliminares y primer tratamiento enzimático.

Reactivo/Equipo	Fabricante/Marca	Tipo	Pureza
Fosfato de sodio dibásico	J.T Baker	-	100%
Ácido etilendiaminotetraacético	Sigma Aldrich	Bio-ultra	>99%
L-cisteína	Merck	Biochemistry	-
Ácido acético glacial	Macron	ACS reagent	99.70%
Papaína	Bayco	Proteasa	-
Matraces	Isolab	-	-
Plantillas de agitación	Fisher Scientific	Isotemp	-
Termómetros	France	-	-
pH-metros	WTW	pH-720	-
Lector de microplacas	Biotek	Synergy	-

2.2.3 Cuantificación de colágeno

Los reactivos para la cuantificación de colágeno, necesaria tanto en las pruebas de caracterización iniciales, como en el diseño experimental de la primera etapa se presentan en el Cuadro 2.3.

Cuadro 2.3 Reactivos y equipos utilizados para cuantificación de colágeno.

Reactivo/equipo	Fabricante/Marca	Tipo	Pureza
Sulfato de cobre pentahidratado	Sigma Aldrich	Reagent plus	99%
Hidróxido de sodio	Sigma Aldrich	ACS reagent	99%
Ácido sulfúrico	Fermont	ACS reagent	97%
4-dimetilaminobenzaldehído	Sigma Aldrich	ACS reagent	99%
2-propanol	J.T Baker	ACS reagent	99.9%
L-hidroxiprolina	Merck	-	>99%
Agua de ósmosis	-	-	-
Lector de microplacas	Biotek	Synergy H1	-

2.2.4 Pruebas de caracterización después de primer tratamiento enzimático

Las pruebas de caracterización incluyeron la determinación de la temperatura de desnaturalización, electroforesis por geles SDS-PAGE, análisis infrarrojo, y temperatura de descomposición. Los reactivos y equipos utilizados para cada una de ellas se resumen en los cuadros siguientes.

Cuadro 2.4 Reactivos y equipos utilizados para la determinación de la temperatura de desnaturalización

Reactivo/Equipo	Fabricante/Marca	Tipo	Pureza
Ácido acético glacial	Macron	ACS	99.70%
Reómetro	Anton Paar	Physica MCR 51	-

Cuadro 2.5 Reactivos y equipos para la elaboración de geles de electroforesis SDS-PAGE

Reactivo/Equipo	Fabricante/Marca	Tipo	Pureza
Buffer tris-HCl (ph 6,8 y ph 8,8)	-	-	-
Acrilamida/bis	Sigma Aldrich	Electrophoresis reagent	-
Dodecilsulfato sódico	Merck	-	-
Tetrametiletilendiamina	Sigma-Aldrich	Molecular biology tested	99%
Persulfato de amonio	Sigma Aldrich	Grado reactivo	98%
2-propanol	J.T Baker		-
Azul de Coomassie-R	Sigma	Microscopy	-
Marcador molecular	Promega	10-225 kDa	-
Prensas para placas de vidrio	Biorad	Mini protean	-
Soporte para elaboración de geles	-	-	-
Fuente de poder	Fisher Scientific	FB 1000	-

Cuadro 2.6 Equipos para realización de análisis infrarrojo y análisis termogravimétrico.

Reactivo/Equipo	Fabricante/Marca	Tipo	Pureza
Espectrómetro	Thermo Fisher	Nicolet 6700 FT-IR.	-
Analizador termogravimétrico	TA instruments	TGA Q500 v20.13 Build 39	-

2.2.5 Pruebas preliminares y segundo tratamiento enzimático

Para el tratamiento enzimático secundario, se realizaron al igual que en el caso anterior, pruebas preliminares y un diseño experimental, en donde se ensayaron dos enzimas: la Papaína utilizada anteriormente; y Bromelina, extraída en Costa Rica por la empresa Bromé, a partir de la corona de la piña.

Los demás reactivos y equipos, utilizados para realizar la hidrólisis enzimática y para la cuantificación, se presentan a continuación:

Cuadro 2.7 Reactivos y equipos utilizados para pruebas preliminares y segundo tratamiento enzimático.

Reactivo/Equipo	Fabricante/Marca	Tipo	Pureza
Fosfato de sodio dibásico	J.T Baker	-	1
Ácido etilendiaminotetraacético	Sigma Aldrich	Bio-ultra	>99%
L-cisteína	Merck	Biochemistry	-
Ácido acético glacial	Macron	ACS reagent	0.997
Papaína	Bayco	Proteasa	-
Bromelina	Bromé	Proteasa	-
Matraces	Isolab	-	-
Plantillas de agitación	Fisher Scientific	Isotemp	-
Termómetros	France	-	-
pH-metros	WTW	pH-720	-

2.2.6 Cuantificación de grado de hidrólisis

Cuadro 2.8 Reactivos y equipos utilizados para medición de grado de hidrólisis

Reactivo/Equipo	Fabricante/Marca	Tipo	Pureza
Tetraborato de sodio decahidratado	Merck	ACS reagent	99.5%-103%
Dodecilsulfato sódico	Merck	-	-
o-Ftalaldehído	Sigma	HPLC	>97%
Metanol	J.K Baker	ACS reagent	100%
Lector de microplacas	Biotek	Synergy	-

2.2.7 Pruebas de caracterización después de segundo tratamiento enzimático.

Los equipos y reactivos utilizados para las pruebas de caracterización por SDS-PAGE, temperatura de descomposición, y análisis infrarrojo fueron los mismos que se manejaron para las pruebas de caracterización después del primer tratamiento enzimático.

Cuadro 2.9 Reactivos y equipos utilizados para la generación de espectro UV-Vis y para determinación de solubilidad de colágeno hidrolizado.

Reactivo/Equipo	Fabricante/Marca	Tipo	Pureza
Nanodrop	Thermo scientific	Espectrofotómetro	-
Vórtex	Velp Scientifica	-	-
Ácido acético glacial	Macron	ACS	99.70%

2.3 Metodología experimental

Según lo descrito anteriormente en la Figura 2.1, se tiene que:

2.3.1 Caracterización inicial de piel de tilapia.

Cuantificación de ceniza:

De acuerdo con el protocolo 923.03 (2005) de la AOAC, para la determinación de cantidad de minerales se realizó lo siguiente:

- a) Se calcinaron dos crisoles con su respectiva tapa durante 90 minutos a 101 °C, se enfriaron en desecador, y se pesaron después de alcanzar la temperatura ambiente, esto para asegurar que se encontraban totalmente secos.
- b) Se pesaron 4.0469g y 4.0349g de piel de tilapia previamente cortada en trozos pequeños.
- c) Las muestras fueron inflamadas en un horno a una temperatura de 550°C, hasta obtener ceniza gris claro, para luego ser enfriadas en desecador y pesadas.
- d) Nuevamente se ingresaron las muestras al horno, a la misma temperatura de 550°C. El procedimiento fue repetido hasta obtener masa constante.

Cuantificación de humedad:

Siguiendo la metodología propuesta por la AOAC, en su protocolo 950.46 (2005), se procedió de la siguiente manera para la determinación por duplicado del contenido de humedad:

- a) Se colocaron dos crisoles con su respectiva tapa en horno, a una temperatura de 101°C durante 90 minutos, y luego se trasladaron a un desecador hasta alcanzar temperatura ambiente (45 minutos aproximadamente).
- b) La piel de tilapia fue cortada en trozos pequeños, y se agregaron 4.0648 g y 4.0879 g de muestra en cada uno de los crisoles. Estos fueron secados previamente en el horno, a una temperatura de 101°C durante un periodo inicial de 16 horas.
- c) Los crisoles con muestra se trasladaron al desecador, para enfriarse sin permitir la ganancia de humedad, y una vez a temperatura ambiente se pesaron en balanza analítica.
- d) Las muestras se ingresaron nuevamente al horno, a la misma temperatura de 101°C durante 1 hora, y se pesaron nuevamente a temperatura ambiente después de transcurrido el tiempo.
- e) Los pasos c y d se realizaron hasta obtener masa constante.

Cuantificación de grasa:

Se siguió parte de la metodología de la AOAC (920.39), con modificación en cuanto al solvente de extracción:

- a) Se colocó un balón de extracción en la estufa, a una temperatura aproximada de 80°C. Este fue llevado a peso constante.
- b) Las muestras utilizadas fueron secadas previamente, siguiendo la misma metodología de remoción de humedad descrita anteriormente, ya que se recomienda eliminar el agua antes de realizar la extracción de grasas. Estas fueron colocadas en el dedal seco de extracción junto con 200 ml de hexano (en lugar de éter anhidro, para mayor seguridad y por disponibilidad del laboratorio).
- c) Se procedió a armar el equipo de Soxhlet, como se muestra en la Figura 2.2, y se ajustó la temperatura de la plantilla, para generar una velocidad aproximada de entre 6-8 gotas de condensación de la muestra. El tiempo de extracción fue de aproximadamente 8 horas.
- d) Una vez finalizada la extracción, se procedió a separar el hexano del extracto graso en un rotavapor. El extracto seco obtenido se pesó en balanza analítica.

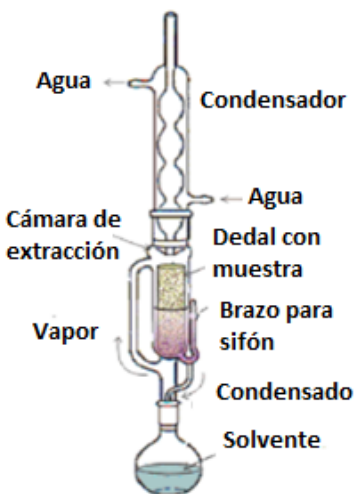


Figura 2.2 Diagrama de equipo Soxhlet para extracción de grasa. (*Experimentos de Química Orgánica*, s. f.).

Cuantificación de proteína:

La cuantificación fue realizada en un laboratorio externo al CENIBiot, ya que no se contó con el equipo Keldjahl necesario para la determinación de proteína total. El valor de contenido de proteína para la piel de tilapia según el informe del Laboratorio de Análisis y Servicios Químicos de la Universidad Nacional (LASEQ) se adjunta en el Anexo 1.

Cuantificación de contenido de colágeno en piel de tilapia, por determinación de hidroxiprolina:

Para la caracterización de piel de tilapia por contenido de colágeno, se realizaron modificaciones al protocolo dictado por la AOAC:

-En la *hidrólisis inicial* de las muestras, se utilizaron condiciones ácidas diferentes a las propuestas en la metodología original, al ser ejemplares diferentes. El protocolo inicial se encontraba adecuado a muestras cárnicas, mientras que en este caso se trabajó con piel de tilapia.

Mediante la hidrólisis se buscó la máxima liberación del aminoácido al medio, y su cuantificación. Bajo las condiciones propuestas originalmente en el protocolo, la determinación de Hidroxiprolina en la piel de tilapia no se encontró en su punto máximo; por lo que, debieron ubicarse las nuevas condiciones que permitieran una adecuada cuantificación del aminoácido. Cada substrato presenta características físicas distintas, lo que deriva en la necesidad de escenarios ácidos diferentes para el rompimiento de enlaces dentro de la proteína, y la consecuente liberación del aminoácido de interés.

Se encontró que modificaciones en las condiciones de hidrólisis en otros trabajos de investigación revisados como apoyo a este trabajo, no fueron prácticas desconocidas. En este proyecto, se realizó un cambio en el tiempo necesario para la hidrólisis; sin embargo, en otros casos se hizo uso de condiciones básicas para lograr el mismo objetivo, en menor cantidad de tiempo, tal es el caso de Hofman et al (2011).

-Para la cuantificación del aminoácido de interés, se tomó en cuenta las recomendaciones en cuanto a reactivos dictadas por Neuman & Logan (1949). Los recomendados por la metodología original no generaron los efectos esperados. Para los nuevos reactivos utilizados se modificaron las cantidades utilizadas; sin embargo, se siguió la proporción de estos.

Al basarse la cuantificación en una reacción colorimétrica, es necesario que se dé un cambio de color, consistente con la concentración del analito. En el caso de la metodología presentada por la AOAC, la reacción generada no dio valores de resultados consistentes, ya que en cada una de las pruebas y repeticiones realizadas las absorbancias fueron diferentes y poco reproducibles. La modificación en cuanto a los reactivos necesarios para generar el cambio de color para su detección mediante espectrofotometría, permitió la obtención de valores consistentes entre repeticiones y acorde a la concentración del aminoácido esperada

a) Construcción de curvas estándar de hidroxiprolina

Se realizaron curvas estándar, a partir de valores de concentración conocidos de hidroxiprolina de 0 ug/mL, 15.0 ug/mL, 45.0 ug/mL y 90.0 ug/mL, en donde se utilizó agua de ósmosis como blanco.

1. En viales (con tapa) se colocaron 36.5 μL de cada una de las disoluciones que conformaron la curva.
2. Se agregaron 36.5 μL de sulfato de cobre 0.01M, NaOH 2.5N y H_2O_2 al 6%; y se realizaron agitaciones periódicas, con ayuda de un vórtex, durante 5 minutos para eliminar excesos de H_2O_2 .
3. Los viales se taparon, y fueron colocados en un baño maría a una temperatura de 80°C, durante 5 minutos. Esta operación también ayudó a la eliminación de peróxido de hidrógeno en exceso, que pudiera hacer que la formación de color no se presentara intensamente.
4. Una vez terminado el proceso de calentamiento, se trasladaron los viales a un baño de agua y hielo para disminuir la temperatura.
5. Se adicionaron 146.0 μL de H_2SO_4 3N, se realizó agitación, y se agregaron 73.0 μL de p-dimetilaminobenzaldehído al 5%, preparado previamente en 2-propanol.

6. Nuevamente los tubos fueron colocados en baño maría, durante 16 minutos a una temperatura de 70°C y enfriados en baño de hielo rápidamente una vez terminada la reacción. En este punto se presentó un cambio de color, cuya tonalidad varió de acuerdo con la concentración de hidroxiprolina en la muestra; tal y como se observa a manera de ejemplo en la Figura 2.3.



Figura 2.3 Curva de color de acuerdo con concentración de hidroxiprolina

7. De cada tubo de ensayo se tomaron 60.0 μ L y se colocaron en una placa lectora, para leer su absorbancia a 558 nm en el lector de microplacas. Los valores se presentan en el Cuadro A.7.
- b) Hidrólisis de muestras para cuantificación de hidroxiprolina

Una vez realizada la curva estándar y tomados los datos de absorbancia, se procedió a la hidrólisis de las muestras de piel de tilapia. Esta permitió la liberación de los aminoácidos en el medio, y la posterior cuantificación de hidroxiprolina.

Fue necesario ajustar las condiciones de la hidrólisis ácida para la piel de tilapia, y así encontrar condiciones más apropiadas en cuanto a concentración de ácido sulfúrico y tiempo de hidrólisis; ya que las recomendadas por el protocolo de la AOAC no se consideraron adecuadas para el tipo de sustrato con el que se trabajó.

Ajuste del método:

1. Las muestras de piel de tilapia, cuyas masas utilizadas se encuentran en el Cuadro A.8, fueron colocadas en erlenmeyers con 30.0 mL de ácido sulfúrico a concentraciones 1.0 mol/L, 3.5 mol/L y 5.0 mol/L, tapadas con papel aluminio para evitar su evaporación, y situadas en plantilla. Los tiempos de hidrólisis estudiados fueron de entre 3.5 horas y 24 horas aproximadamente. En la Figura 2.4 se muestra una ilustración de la metodología empleada en la hidrólisis.



Figura 2.4 Hidrolisis ácida de muestras de piel de tilapia

2. Una vez terminado el periodo de hidrólisis se enfriaron las muestras en baño de hielo, y se realizaron dos diluciones consecutivas. En la primera de ellas se tomó la totalidad de la muestra hidrolizada, se trasvasó cuantitativamente a un balón de 100 mL y se aforó. El contenido de esta primera dilución fue filtrada para retener contenidos de grasa y partículas suspendidas.
 3. Para la segunda dilución se tomó 0.8 ml de la primera solución filtrada, y se diluyó hasta 10 mL en balón aforado. Esto fue necesario para ajustar la concentración de hidroxiprolina a valores medibles de absorbancia dentro de la curva estándar.
- c) Medición de hidroxiprolina en muestras de piel de tilapia hidrolizadas ácidamente.

Para la medición de hidroxiprolina, en cada una de las diferentes condiciones de hidrólisis expuestas anteriormente, se siguió el mismo procedimiento que para la medición de hidroxiprolina en la curva estándar.

1. En viales (con tapa) se colocaron 36.5 μL de cada una de las muestras hidrolizadas obtenidas después de la segunda dilución. Seguidamente, se agregaron 36.5 μL de sulfato de cobre 0.01M, NaOH 2.5N y H_2O_2 al 6%, y se realizaron agitaciones periódicas con ayuda de un vórtex durante 5 minutos, para ayudar a la eliminación de excesos de H_2O_2 .
2. Los viales se taparon, y fueron colocados en un baño a una temperatura de 80°C durante 5 minutos.
3. Se trasladaron los viales a un baño de agua y hielo para disminuir la temperatura. Se adicionaron 146 μL de H_2SO_4 3N con agitación, y se agregaron 73 μL de p-dimetilaminobenzaldehído al 5%.
4. Nuevamente los tubos fueron colocados en baño maría, durante 16 minutos a una temperatura de 70°C y enfriados en baño de hielo una vez terminado. En este punto se presenta un cambio de color, cuya tonalidad varía de acuerdo con la concentración de hidroxiprolina en la muestra.
5. De cada tubo de ensayo se tomaron 60 μL y se colocaron en una placa lectora, para leer su absorbancia a 558 nm en el lector de microplacas.

Una vez realizadas las mediciones de absorbancias, cuyos valores se encuentran en el Cuadro B.6, se calculó la hidroxiprolina presente para cada una de las muestras, y se construyeron curvas para cada una de las concentraciones del aminoácido contra el tiempo de hidrólisis, que se presentan en la Figura 3.1. Esto permitió dilucidar las mejores condiciones de hidrólisis para la medición de hidroxiprolina, que fueron las utilizadas a partir de ese momento para cuantificar el colágeno presente, después tanto de las pruebas preliminares como del diseño experimental del primer tratamiento enzimático.

2.3.2 Pruebas preliminares para primer tratamiento enzimático

Se buscó la obtención de una matriz colágena más limpia, a partir de la piel de tilapia, mediante la remoción de aquellos componentes no colágenos que la acompañan. Se realizaron pruebas preliminares de digestión con la enzima Papaína, para así determinar si existían condiciones de pH, temperatura, tiempo de digestión, relación enzima:sustrato y concentración de enzima en el medio, que permitieran una buena eliminación de componentes no colágenos, sin afectar o generar mucha pérdida del compuesto de interés.

Durante el primer tratamiento enzimático, el sustrato fue tomado como la *proteína total* presente en una muestra de piel de tilapia.

Para los procesos de digestión enzimática se tomaron diferentes condiciones de las variables anteriormente mencionadas y se procedió de la siguiente manera:

1. Se cortó la piel de tilapia en trozos pequeños. Estos fueron colocados en matraces junto con el volumen del medio para digestión, de interés en el estudio (preparado según Anexo 2), al pH necesario para cada caso. La mezcla se colocó en baño maría durante 10 minutos, para adecuar la temperatura a las condiciones necesarias para cada prueba, según lo presentado en el Cuadro A.9.
2. Una vez estabilizada la temperatura, se agregó la cantidad de papaína necesaria para cada prueba preliminar, igualmente según lo necesario para cada tratamiento del Cuadro A.9.
3. La digestión se llevó a cabo con los erlenmeyers en baño maría, utilizando plantillas de calentamiento para mantener la temperatura constante en cada una de las pruebas. El pH fue controlado mediante pH-metros durante todo el tiempo de digestión, y la agitación se mantuvo constante en 125 rpm.
4. Una vez terminados los procesos de digestión, se procedió a colocar los erlenmeyers en un baño a una temperatura aproximada de 80°C durante dos minutos, para asegurar la desactivación total de la enzima. Además, se enfrió la mezcla, y se centrifugó

durante 10 minutos, para recuperar la matriz que no fue digerida por la enzima y que fue de interés en este punto.

5. Se realizaron lavados con agua de ósmosis a la matriz recuperada, para remover cualquier excedente de Papaína que pudiera quedar adherido a las muestras. Este proceso fue repetido tres veces.
6. Las muestras de matriz colágena obtenidas después de la digestión enzimática fueron secadas rápidamente, para eliminar el exceso de humedad de su superficie, y fueron pesadas.
7. De la matriz colágena recuperada y pesada se tomó una muestra, y se realizó una hidrólisis ácida, junto con la medición de contenido de hidroxiprolina descrita anteriormente en el punto C.

La cuantificación de hidroxiprolina, después de la digestión enzimática primaria, permitió determinar si ésta tuvo algún efecto sobre el colágeno de la piel de tilapia, o solamente sobre los componentes no colágenos.

Como variable respuesta se tomó en cuenta el porcentaje de extracción, que correspondió a la cantidad de colágeno que se recuperó después de la digestión enzimática, con respecto al colágeno inicial antes de ese tratamiento; tal y como se presenta en la ecuación 2.1.

$$Extracción (\%) = \frac{Masa\ colágena_{después\ de\ digestión\ enzimática} (g)}{Masa\ colágena_{inicial\ en\ la\ piel\ de\ tilapia} (g)} * 100 \quad (2.1)$$

La matriz total se recuperó en base húmeda; y existía la posibilidad, según las condiciones del tratamiento, de que la enzima no tuviera un 100% de eficiencia en la remoción de todos los componentes no colágenos, por lo que podrían encontrarse residuos de algunos de estos en la matriz recuperada. Se tomó, por lo tanto, un parámetro auxiliar para determinar las condiciones más adecuadas de tratamiento, definido en este caso como porcentaje de colágeno, cuyo valor estuvo dado por:

$$\text{Colágeno (\%)} = \frac{\text{Masa colágena}_{\text{después de digestión enzimática}} (g)}{\text{Masa total de la matriz húmeda}_{\text{después de digestión enzimática}} (g)} * 100 \quad (2.2)$$

Las pruebas del diseño experimental para el primer tratamiento enzimático siguieron la misma metodología que las pruebas preliminares, en las condiciones consideradas más adecuadas para su estudio estadístico.

2.3.3 Diseño experimental para primer tratamiento enzimático

Al contar con cinco variables experimentales, se propuso el desarrollo de un *diseño factorial fraccionado*, que permitiera la obtención de los efectos principales e interacciones dobles entre las variables sobre la respuesta, siendo necesaria la información de un total de 15 interacciones importantes (5 principales y 10 interacciones dobles). De acuerdo con lo anterior, se planteó un diseño 2^{5-1} que contó con una resolución grado V, que proveyó información para 16 interacciones, y por lo tanto evitó la pérdida de información necesaria para un análisis adecuado. Se planeó la generación de 3 réplicas, que permitieran una mejor estimación de los errores experimentales, y por lo tanto la definición de diferencias significativas o no.

Se presenta en el Cuadro 2.10 la propuesta del diseño factorial fraccionado para la extracción de una matriz colágena a partir de la piel de tilapia, en donde como variables experimentales se tuvieron: el pH de la solución de digestión en donde se adicionó la enzima, la temperatura de la digestión, la concentración de enzima en el medio, la relación sustrato:enzima y el tiempo de digestión; éstas correspondieron a algunas de las variables que más afectan los procesos enzimáticos; mientras que como variable fija se definió la identidad de la enzima a utilizar en la digestión, la agitación, y la identidad del medio de hidrólisis; como variable respuesta se definió el porcentaje de extracción o recuperación de colágeno.

De acuerdo con la cantidad de variables experimentales, el gasto de materiales obtenido de las pruebas preliminares, y la materia prima disponible para los ensayos, se definió un diseño experimental con las condiciones que se presentan a continuación, con tres réplicas de cada corrida experimental para dar mayor confiabilidad al proceso.

Cuadro 2.10 Características de diseño factorial fraccionado para primer tratamiento enzimático de piel de tilapia.

Diseño	Resolución	Réplicas	Corridas experimentales
2^{5-1}	V	3	48

Los niveles de las variables experimentales se escogieron de acuerdo con información brindada por las pruebas preliminares, en las cuales se obtuvieron los mejores porcentajes de extracción. Adicionalmente se tomó en cuenta la información brindada por la variable respuesta auxiliar de porcentaje colágeno, además de información teórica recolectada. Los niveles se encuentran en el siguiente cuadro.

Para el montaje del diseño experimental se utilizó el programa Minitab 16, en el cual se obtuvo la propuesta de la aleatoriedad de las corridas. Los datos se presentan en el Anexo 6.

Cuadro 2.11 Niveles de las variables experimentales a utilizar en el diseño factorial fraccionado para primer tratamiento enzimático de piel de tilapia.

Variable	Nivel alto	Nivel bajo
pH	6.50	6.00
T (°C)	50.0	37.0
C _e (mg/ml)	5.00	3.00
R _{S:E}	25.0:1.0	20.0:1.0
t (min)	60.0	35.0

2.3.4 Pruebas de caracterización después de primer tratamiento enzimático

Una vez obtenidas las mejores condiciones para la primera digestión enzimática, se procedió a la caracterización de la matriz colágena obtenida.

Debido a la naturaleza física de la muestra recuperada, todavía en su estructura cuaternaria con características insolubles, y a las particularidades necesarias para realizar algunas de las pruebas de caracterización, en donde la solubilización de las muestras era necesaria, primero se realizó una *hidrólisis parcial ácida* de la matriz colágena en ácido acético 0.5 mol/L, y luego se dio una recuperación del colágeno, ahora en su estructura terciaria, con características de mayor solubilidad. Para las pruebas de caracterización se dio entonces una re-solubilización en el medio adecuado para cada uno de los ensayos, tal y como se describe a continuación.

Hidrólisis parcial ácida de colágeno, para pruebas de caracterización después de primer tratamiento enzimático

1. Se tomó 1.4256 gramos de la matriz sólida tratada previamente mediante digestión enzimática, y se colocó en matraz volumétrico junto con 78.41 mL de ácido acético 0.5 mol/L, en agitación constante durante 24 horas a una temperatura de 4°C.
2. Después de la solubilización se agregaron 10.0 mL de agua, a pH 4, para disminuir la viscosidad de la mezcla, y se filtró la solución a través de una malla de nylon.
3. Se ajustó el pH de la solución hasta un valor de 7, y se agregó NaCl, logrando una concentración de 2.0 mol/L.
4. La mezcla se dejó en agitación en frío durante 24 horas, y se centrifugó a 2 900 rpm durante 20 minutos, logrando la formación de grumos.
5. Se recuperó el colágeno hidrolizado parcialmente y precipitado, conocido como *colágeno nativo*, y se le realizaron lavados con agua de ósmosis para eliminar excesos de sal. Además, fue colocado en membranas de diálisis, cambiando el agua del medio constantemente para lograr una buena eliminación de cualquier residuo de sal. El

proceso se finalizó hasta asegurarse la no presencia de sales; ello se comprobó mediante pruebas de cloruros.

6. La muestra dializada fue congelada y liofilizada para su posterior uso en las pruebas de caracterización

Temperatura de desnaturalización

Fue medida de acuerdo con cambios en la viscosidad de soluciones de colágeno con respecto a la temperatura. Para ello se siguió la metodología presentada a continuación.

1. Se realizaron diferentes soluciones de colágeno en ácido acético 0.1 mol/L, a concentraciones de 17.5 mg/mL, 22.5 mg/mL y 25.0 mg/mL.
2. Se programó el reómetro para realizar lecturas de viscosidad conforme a un aumento de la temperatura desde los 10.0°C hasta 50.0°C aproximadamente, en donde el cambio de temperatura se realizó a un 1.0°C por minuto. El plato utilizado para la contención de la muestra fue de cono-plato.
3. Se estabilizó el equipo a la temperatura inicial de lectura y se procedió a la colocación de la muestra de tal manera que cubriera la circunferencia del plato.
4. Se tabularon los datos de viscosidad contra tiempo, para su posterior análisis.

Electroforesis mediante geles SDS-PAGE

Buscando la identificación del peso molecular del colágeno mediante bandas particulares, y la caracterización de este, se procedió a realizar geles de electroforesis. La elaboración de los geles se realizó de acuerdo protocolos establecidos por el CENIBiot, en donde:

1. Se preparó un gel separador al 8% y un gel compactador al 4% para un tamaño de geles de 7,3mm x 8,2mm x 1mm, utilizando las composiciones que se presentan en el Anexo 4.
2. Se generaron muestras a partir de soluciones de colágeno nativo liofilizado en buffer Fosfato de Sodio Dibásico a pH 7.28 con 0,2% de SDS y 3.5 mol/L de Urea, en

concentraciones de 2.0 mg/mL y 1.5 mg/mL. Estas fueron filtradas con filtros de 0.22 μm .

3. Las muestras anteriores fueron mezcladas a su vez con buffer de carga, logrando concentraciones finales de 1 mg/mL y 0.5 mg/mL respectivamente. La preparación del buffer de muestra se presenta en el Anexo 5.
4. Las muestras diluidas se calentaron por 2 minutos en cubo térmico a 95°C, y se cargó en cada pozo del gel 10.0 uL. En los pozos disponibles para el marcador de peso molecular se cargaron 5.0 uL.
5. Una vez colocado el gel dentro del tanque de electroforesis con el buffer de corrida, se aplicó un voltaje constante de 75V, dejando correr la electroforesis el tiempo necesario hasta que la línea base se aproximara al final de las placas de vidrio. El tiempo necesario fue de aproximadamente 3 horas.
6. Al finalizar la electroforesis se retiró el gel de las placas de vidrio, y fue teñido con una solución de Azul de Commassie durante 24 horas con agitación leve.
7. Se procedió a desteñir el gel mediante lavados con agua tibia, hasta lograr una buena visualización de las bandas de peso molecular.

Temperatura de descomposición

Se realizó mediante la aplicación de una temperatura ascendente en un ambiente controlado, con la correspondiente cuantificación del cambio de masa de la muestra con respecto a su valor inicial. La prueba fue realizada por el Laboratorio Nacional de Nanotecnología (LANOTEC), en un analizador termogravimétrico TGA Q500 v20.13 Build 39, utilizando las condiciones que se presentan en el Cuadro 2.12

Cuadro 2.12 Condiciones para Análisis termogravimétrico de muestra colágena después de primer tratamiento enzimático.

Condición	Valor
Intervalo de temperatura	25°C-980°C
Gradiente de temperatura	10°C/min
Gas inerte 1	Nitrógeno
Flujo de Gas inerte 1	10 mL/min
Gas inerte 2	Nitrógeno
Flujo de Gas inerte 2	90 mL/min

Análisis Infrarrojo

Al igual que la prueba de análisis termogravimétrico, el espectro infrarrojo también fue realizado en el LANOTEC, con ayuda del equipo Nicolet 6700 FT-IR. Se realizó el espectro en una región entre los 4000 cm^{-1} y los 598 cm^{-1} . Para ello, se utilizó una muestra seca del colágeno nativo obtenido previamente.

2.3.5 Pruebas preliminares para segundo tratamiento enzimático

Una vez encontradas las condiciones más adecuadas para el primer tratamiento enzimático, se procedió a la búsqueda de condiciones de un segundo tratamiento que lograra la hidrólisis de la matriz colágena mediante el uso de enzimas. Para ello se realizaron pruebas preliminares de hidrólisis, independientes, con dos enzimas: Papaína y Bromelina.

Se determinaron ámbitos de trabajo para el pH, temperatura, tiempo de digestión, relación enzima:sustrato, y concentración de enzima en el medio, que permitieron un buen grado de hidrólisis, y cuyos valores sirvieron de base para la definición del diseño experimental.

Para el proceso de digestión en esta segunda etapa, se utilizó como materia prima la matriz colágena obtenida bajo las mejores condiciones encontradas en la primera etapa, formada a partir de colágeno en base húmeda con remanentes de algunas proteínas no colágenas, y otros componentes que no se pudieron eliminar durante el primer tratamiento. Para efectos de cálculo, se tomó en este caso como sustrato el contenido de proteína total, obtenido en la matriz después del primer tratamiento enzimático, ya que representó toda la proteína remanente en la muestra, a hidrolizar en la segunda etapa. Ese valor fue determinado mediante una prueba de Kjeldahl, realizada por el Laboratorio de Análisis Químicos (LASEQ), cuyo resultado se encuentra en el Anexo 8. Además, se tomaron diferentes niveles de las variables anteriormente mencionadas y se procedió de la siguiente manera:

1. Se tomó una determinada masa de matriz colágena para cada una de las pruebas, y se colocó en un matraz junto con el volumen de medio de digestión adecuado, cuya preparación se dio de acuerdo con lo presentado en el Anexo 9. El pH fue ajustado de

acuerdo con lo necesario para cada caso, y la solución se colocó en baño maría durante 10 minutos para adecuar la temperatura a las condiciones para cada prueba. Los datos de las condiciones y cantidades utilizadas se presentan en el Cuadro A.21.

2. Una vez adecuada la temperatura, se agregó la cantidad de enzima (papaína o bromelina según el caso) necesaria para cada prueba preliminar, cuyos valores también se presentan en el Cuadro A.21.
3. La digestión se llevó a cabo en baño maría, utilizando plantillas de calentamiento para mantener la temperatura adecuada en cada una de las pruebas.
4. Una vez terminado el proceso de digestión, se procedió a colocar el matraz en baño a temperatura aproximada de 80°C durante dos minutos, para desactivar la enzima. Además, se enfrió la mezcla y se filtró al vacío, para recuperar el colágeno hidrolizado solubilizado. Cualquier exceso de matriz colágena no hidrolizado fue descartado después de la filtración
5. Del líquido obtenido, se tomó una muestra de aproximadamente 1.5 ml, se filtró mediante filtros de 0.45 μm , y se almacenó en eppendorfs bajo condiciones de -80°C hasta su posterior cuantificación de grado de hidrólisis.
6. El resto del sobrenadante fue guardado para posteriores análisis.

2.3.6 Diseño experimental para segundo tratamiento enzimático

Los diseños de superficie de respuestas consisten en técnicas estadísticas que permiten la evaluación de múltiples variables experimentales sobre una variable respuesta, a partir de las cuales se busca encontrar las mejores condiciones en estudio.

Al igual que un diseño factorial, se “designa un nivel bajo y un nivel alto para cada factor continuo. Estos niveles definen el "cubo" alrededor del cual se crea el diseño” (Minitab® 18, 2017). En una superficie de respuesta con diseño central compuesto, además de los puntos centrales en el cubo se tienen puntos axiales y puntos centrales, que permiten obtener información adicional, y ayudan a la determinación de un modelo matemático más exacto que incluye información de las variables que afectan el proceso y sus interacciones.

En este caso se optó por la utilización de un diseño central compuesto, que representa el tipo de diseño de superficie de respuestas más utilizado. Éste presenta ventajas si se compara con respecto al diseño de superficie de respuesta por Box Behnken, ya que: el primero permite ampliar los puntos del diseño, mediante la adición de puntos axiales que brindan mayor robustez e información; a diferencia del segundo en donde además de los puntos de interés inicial solo hay combinaciones de los tratamientos en los puntos medios del diseño experimental; por lo que brindan menor información. Además, los diseños de Box Behnken presentan la desventaja de que, por su configuración, no permiten incluir corridas experimentales en donde todas las variables se encuentren en sus valores extremos, ya sea altos o bajos.

Se utilizaron las variables, y los niveles de estas, que se obtuvieron de las pruebas preliminares para el segundo tratamiento enzimático, tal y como se presenta en el Cuadro 2.13. Como variables fijas se tomaron el medio de hidrólisis, compuesto en este caso por un buffer fosfato, cisteína y ácido etilendiaminotetraacético utilizado típicamente cuando se trabaja con papaína; y la agitación durante la digestión.

Cuadro 2.13 Variables y niveles en diseño de superficie de respuestas, para determinación de grado de hidrólisis después de segundo tratamiento enzimático.

Variable	Nivel	
	Bajo	Alto
pH	5.8	6.5
T(°C)	40.0	50.0
t(h)	21.0	24.0
R _{s:e} (g/g)	3.5:1.0	8.5:1.0
C _e (mg/mL)	3.50	8.50

Mediante el uso del programa Minitab 16 ®, se creó un diseño experimental central compuesto medio para la determinación de grado de hidrólisis. Se tomaron 5 variables experimentales a dos niveles cada una, con tres réplicas de cada tratamiento. Los puntos del diseño se detallan en la Figura 2.5.

Diseño central compuesto

Factores:	5	Réplicas:	3
Corridas base:	32	Total de corridas:	96
Bloques base:	1	Total de bloques:	1

Factorial de dos niveles: Fracción de un medio

Puntos del cubo:	48
Puntos centrales en el cubo:	18
Puntos axiales:	30
Puntos centrales en axial:	0

Alfa: 2

Figura 2.5 Características del diseño de superficie de respuesta para determinación de grado de hidrólisis.

En el Anexo 7 se presenta la aleatoriedad de las corridas experimentales, propuestas por el programa.

2.3.7 Medición de grado de hidrólisis

Se utilizó la metodología para la medición de grado de hidrólisis mediante el uso de o-ftalaldehído (OPA) siguiendo las recomendaciones según Church, Swaisgood, Porter, & Catignani (1983). En ella se realizó una variación en cuanto al aminoácido utilizado como estándar. Debido a la falta de Leucil-glicina como reactivo se utilizó glicina, α -aminoácido presente en la estructura colágena que también reacciona con el reactivo de o-ftalaldehído. Los volúmenes de todos los reactivos fueron reducidos proporcionalmente para su medición en lector de microplacas.

Medición del estándar y blanco:

1. Se realizó una dilución de glicina en agua de ósmosis para ser utilizada como estándar, a una concentración de 0.30 mg/mL. El blanco fue tomado como agua de ósmosis.

2. Se colocó un alícuota de 195.0 μL del reactivo OPA en cada tubo de ensayo, cuya preparación se presenta en el Anexo 3.
3. Se adicionó a cada tubo una alícuota de 2.60 μL de la disolución de glicina y del blanco, respectivamente, y se agitaron en vórtex por 5 segundos.
4. Se colocó una alícuota de 62.0 μL por triplicado de ambas muestras en una placa de 96 pozos, cuya absorbancia fue medida en el lector de microplacas a 340 nm.

Medición de muestras hidrolizadas.

Para la determinación de grado de hidrólisis de las muestras hidrolizadas enzimáticamente, se procedió de igual manera que para el caso del estándar y del blanco. Sin embargo, se adicionó un factor de dilución para lograr que el valor de absorbancia de las muestras estuviera por debajo de 0.9, para el cumplimiento de la Ley de Beer.

1. Se tomó una alícuota de 10.00 μL de muestra hidrolizada y se mezcló con una alícuota de 22.50 μL de agua de ósmosis.
2. Se colocó un alícuota de 195.0 μL del reactivo OPA en tubo de ensayo.
3. Se tomó una alícuota de 2.60 μL de la muestra hidrolizada que fue diluida en el punto 1, y se adicionó al tubo de ensayo. La mezcla se agitó por 5 segundos en vórtex.
4. Se colocó una alícuota de 62.0 μL por triplicado de la muestra en una placa de 96 pozos, cuya absorbancia fue medida en el lector de microplacas a 340 nm.

De acuerdo con los resultados de grado de hidrólisis obtenidos, se determinaron las mejores condiciones de las variables experimentales. El colágeno hidrolizado y solubilizado bajo estas condiciones fue recuperado de la siguiente manera:

Recuperación de colágeno hidrolizado

1. Se ajustó el pH de la solución hasta un valor de 7, y se agregó NaCl, logrando una concentración de 2.0 mol/L. Se agitó la mezcla overnight en frío, para favorecer la formación de pequeños grumos.

2. La mezcla se centrifugó a 3500 rpm durante 45 minutos en frío, para recuperar el pellet formado, y se colocó en membrana de diálisis.
3. Se realizó diálisis contra agua de ósmosis, haciendo cambio de esta periódicamente hasta eliminar el exceso de sal presente.
4. La solución dializada fue recuperada de la membrana, congelada a -80°C y liofilizada hasta eliminar todo exceso de humedad.
5. El colágeno hidrolizado y liofilizado obtenido fue almacenado en un cuarto frío, hasta la realización de las pruebas de caracterización.

2.3.8 Pruebas de caracterización para segundo tratamiento enzimático.

Espectro UV-VIS

Como prueba de identificación preliminar, para la composición de la muestra hidrolizada recuperada, se realizó un barrido de espectro UV-Vis. También se determinó el barrido de espectro de una muestra de colágeno de piel de ternero, utilizada en este caso como punto de referencia.

Para la determinación del espectro se siguió la siguiente metodología:

1. Se colocó una muestra de 1.50 uL de ácido acético 0.10 mol/L en un espectrofotómetro-Nanodrop, y se determinó la longitud de onda máxima de absorbancia mediante un barrido de espectro en la región ultravioleta-visible. Este valor fue utilizado como blanco por el equipo para futuras mediciones.
2. Se colocó una muestra de 1.50 uL de colágeno tipo I de piel de ternero en ácido acético 0.1 mol/L, y se determinó la máxima absorbancia mediante un barrido de espectro.

3. Se disolvió una muestra de colágeno hidrolizado en ácido acético 0.10 mol/L, para obtener una concentración de 1.00 mg/mL, y al igual que las anteriores se obtuvo un barrido de espectro en UV-Vis.

De ambas muestras se obtuvo la gráfica del barrido, para una mejor representación de los datos.

Solubilidad

Habiéndose concluido el valor de longitud de onda de máxima absorbancia para el colágeno hidrolizado, este pudo ser utilizado para la determinación de la solubilidad de la muestra en un determinado soluto. Lo anterior se logró a partir de la siguiente metodología:

1. Se prepararon diferentes concentraciones de colágeno de piel de ternero en ácido acético 0.10 mol/L a partir de una solución madre. Los valores se encuentran en el Cuadro A.30, y fueron utilizados para la medición de la absorbancia, y como puntos para la construcción de curvas estándar. Las curvas fueron realizadas por triplicado, y cada muestra se leyó 3 veces en el Nanodrop.
2. Se pesaron diferentes masas de colágeno hidrolizado de piel de tilapia, y se diluyeron en volúmenes fijados previamente de ácido acético 0.1 mol/L. Cada concentración fue preparada por triplicado. Las muestras se dejaron en agitación constante durante 3 horas para asegurar la máxima solubilización posible, y se filtraron utilizando filtros de 0.45 μm , para evitar interferencia si se alcanzaba el punto de saturación.
3. Se midió la absorbancia de cada una de las muestras por triplicado, y se determinó la concentración práctica de cada punto de acuerdo con la ecuación dada por la curva estándar. Éstas fueron comparadas con las concentraciones teóricas.

Electroforesis mediante geles SDS-PAGE

En el caso del gel necesario para el análisis electroforético del colágeno hidrolizado, se varió la composición, ya que al esperarse bandas de menores pesos moleculares su revelado se

hace más visible en geles cuyo entrecruzamiento es mayor. La elaboración de los geles se realizó de acuerdo protocolos establecidos por el CENIBiot, en donde:

1. Se preparó un gel separador al 15% y un gel compactador al 4% para un tamaño de 7,3mm x 8,2mm x 1mm, utilizando las composiciones que se presentan en el Anexo 4.
2. Se generaron muestras a partir de soluciones de colágeno liofilizado en buffer Fosfato de Sodio Dibásico a pH 7.28 con 0,2% de SDS y 3.5 mol/L de Urea, en concentraciones de 2.50mg/mL y 1.25 mg/mL. Estas fueron filtradas con filtros de 0.22 μm .
3. Las muestras anteriores fueron mezcladas a su vez con buffer de carga, logrando concentraciones finales de 1.25 mg/mL y 0.625 mg/mL respectivamente.
4. Las muestras diluidas se calentaron por 2 minutos en cubo térmico a 95°C, y se cargó en cada pozo del gel 10.00 uL. En los pozos disponibles para el marcador de peso molecular se cargaron 5.00 uL.
5. Una vez colocado el gel dentro del tanque de electroforesis con el buffer de corrida, se aplicó un voltaje constante de 90V, dejando correr la electroforesis el tiempo necesario hasta que la línea base se aproximara al final de las placas de vidrio. El tiempo necesario fue de aproximadamente 2 horas
6. Al finalizar la electroforesis se retiró el gel de las placas de vidrio, y fue teñido con una solución de Azul de Commassie durante 24 horas con agitación leve.
7. Se procedió a desteñir el gel mediante lavados con agua tibia, hasta lograr una buena visualización de las bandas de peso molecular.

Análisis infrarrojo y caracterización térmica

Para las pruebas de análisis infrarrojo y caracterización térmica del colágeno hidrolizado se utilizó la misma metodología que para el caso del colágeno en su estado nativo realizadas previamente.

Capítulo 3. Análisis de resultados experimentales.

3.1 Caracterización inicial de la piel de tilapia

El propósito fue la caracterización de la piel de tilapia de la variedad *Oreochromis Niloticus*, o tilapia nilótica, considerada en su mayoría como desecho en la industria acuícola. Se escogieron muestras para la realización de un análisis proximal, en donde se determinó el contenido de humedad, proteína, grasa, y ceniza, cuyos valores detallados se presentan en los anexos. Las pruebas fueron realizadas por duplicado y se basaron en la metodología propuesta por la Association of Analytical Communities (AOAC), con algunas variaciones para el sustrato en cuestión.

Los resultados obtenidos se encuentran en el Cuadro 3.1, donde se observa como las pieles estuvieron conformadas en su mayoría por agua y proteína, y en menor grado por lípidos y minerales.

Cuadro 3.1 Análisis proximal experimental de la piel de tilapia *Oreochromis niloticus*, en base húmeda.

Análisis proximal	Composición (%)
Contenido de ceniza	0.26 ±0.08
Contenido de humedad	62.73 ±0.11
Contenido de grasa	1.49 ±0.02
Contenido de proteína	33.10 ±1.00

Según la teoría, las pieles de animales en general están compuestas por un 60%-65% de humedad, 2%-10% de grasa, aproximadamente 30% de proteínas y el restante corresponde a residuos de componentes inorgánicos (Schmid, Hammelehle, & Schmidt-Dannert, 2016). Si se realiza una comparación con los valores presentados en el Cuadro 3.1, se observan diferencias para la composición, mayormente en grasas y proteínas; sin embargo, se ubican

cerca de los ámbitos mencionados anteriormente. Variaciones en cuanto a la composición pueden presentarse de acuerdo con el ambiente en donde se hayan desarrollado las especies, y el tipo de alimentación que siguieron.

En este caso el mayor interés se dio en el contenido de proteína; ya que representó, inicialmente, un valor teórico e ideal de la cantidad máxima de colágeno que podría estar presente en la piel de tilapia, si la totalidad correspondiera a material colágeno. En este punto fue necesario realizar una determinación del contenido real del mismo, cuya información se pudo relacionar con la proteína total para establecer la presencia de otras proteínas no colágenas.

Se realizaron pruebas de determinación de contenido de hidroxiprolina; aminoácido presente en el colágeno, y utilizado para su cuantificación en diferentes materiales. Para ello, fue necesario la obtención de una curva estándar, y la hidrólisis ácida de muestras de piel de tilapia para liberar el aminoácido de interés al medio de hidrólisis. Inicialmente, se siguió el protocolo de la AOAC, para la generación de la reacción colorimétrica necesaria para la medición; sin embargo, los reactivos según su metodología no resultaron convenientes ya que no generaron el cambio de color esperado, y en su lugar formaron precipitados en los tubos de ensayo sin ningún cambio en la tonalidad, por lo que la lectura de absorbancia en el lector de microplacas no se pudo realizar. Alternativamente se siguió parte de la metodología presentada por Neuman & Logan (1950), con la que se hizo uso de otros reactivos para generar el cambio de color.

El objetivo de la hidrólisis fue el rompimiento de los enlaces dentro de la muestra de piel de tilapia, y la liberación de la hidroxiprolina que reaccionaría posteriormente para generar un cambio de color. Al ser el material de trabajo diferente al utilizado en la metodología original, se realizaron diferentes hidrólisis ácidas, variando la concentración de ácido y el tiempo de reacción, para determinar cuáles serían las mejores condiciones ácidas. A todas las muestras hidrolizadas se les midió la cantidad de hidroxiprolina por gramo de muestra, y se procedió a la construcción de una curva de hidrólisis para las diferentes condiciones, tal y como se

muestra en la Figura 3.1, cuyos datos se obtuvieron del Cuadro B.6. Los valores gráficos correspondieron al promedio de la concentración para cada una de las pruebas, que fueron realizadas por triplicado.

Se dejó en evidencia que el tiempo recomendado originalmente, por el protocolo de cuantificación de hidroxiprolina/colágeno de la AOAC, de 16 horas, no era el adecuado; mientras que la concentración de H_2SO_4 si se mantuvo de acuerdo con la original. Las condiciones con una mayor cantidad de analito se presentaron con una concentración de ácido de 3.5 mol/L, y un tiempo de hidrólisis de 24 horas, por lo que fueron las utilizadas posteriormente para la hidrólisis de las muestras una vez se realizaran las digestiones enzimáticas.

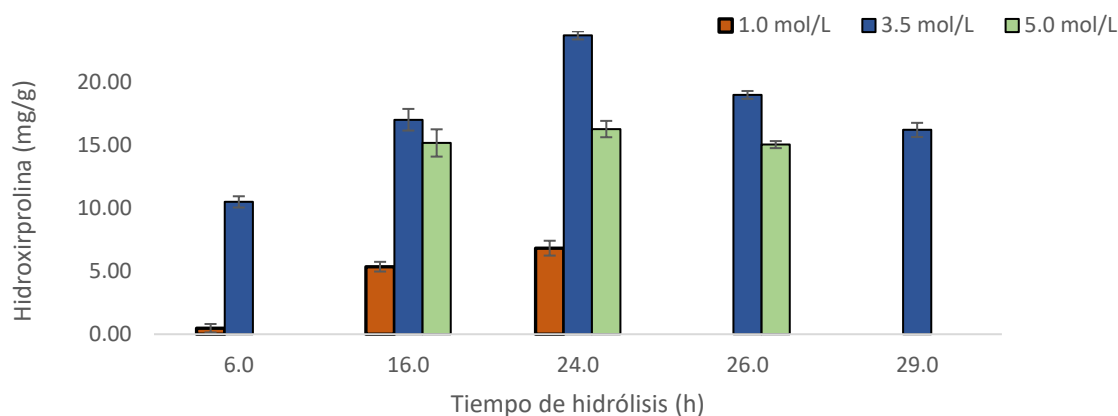


Figura 3.1. Curva de hidrólisis para cuantificación de hidroxiprolina en piel de tilapia, utilizando diferentes tiempos de hidrólisis y concentraciones de H_2SO_4 .

La concentración de ácido sulfúrico 3.5 mol/L, a diferentes tiempos de hidrólisis fue la primera en ser estudiada. Las condiciones a concentraciones 1.0 mol/L y 5.0 mol/L no arrojaron indicios de mejoría en cuanto a la cantidad de hidroxiprolina, por lo que se decidió no realizar la totalidad de tiempos de hidrólisis al igual que en el caso de las condiciones a 3.5 mol/L, sino solamente las necesarias para determinar un patrón; esto con el objetivo de no generar muchos desechos ácidos y no desperdiciar reactivos.

Al variar la concentración de ácido sulfúrico se observa como en las condiciones de 1.0 mol/L y 5.0 mol/L se presentaron cantidades de hidroxiprolina menores a las de 3.5 mol/L, recomendada por el protocolo. En las condiciones de 1.0 mol/L se dieron los resultados más bajos a lo largo de toda la curva; lo que podría haber sido un indicativo de que en este punto no se logró la hidrólisis completa de las muestras; mientras que con la concentración de ácido 5.0 mol/L se pudo estar generando una degradación parcial del aminoácido de interés, y no solamente su liberación; por lo tanto, por ello se dió una menor lectura que en las condiciones de 3.5 mol/L.

La destrucción de aminoácidos por uso de condiciones acidas fuertes se ha reportado en la literatura. Estudios, tales como los reportados por Wierbicki (1954), soportan lo expuesto anteriormente sobre la menor cuantificación de la Hidroxiprolina por concentraciones altas de ácido que llevan a la descomposición del aminoácido.

El tiempo de hidrólisis cambió, y pasó de ser de 16 horas recomendadas en el protocolo original a 24 horas, dándose en este punto la mayor concentración de hidroxiprolina con un valor de 23.70 mg por gramo de muestra, lo que equivalió a un 18.96% de colágeno para la piel de tilapia, calculado a partir de las ecuaciones de las muestras de cálculo C.7, C.8 y C.9. Comparando la concentración de hidroxiprolina, de las muestras tratadas en este procedimiento, con los valores teóricos del Cuadro 1.2, se observa como en este caso se tuvo una mayor cantidad del aminoácido con respecto a otras especies de tilapia; sin embargo, presenta una composición similar a otras especies acuáticas.

Del contenido de proteína presentado en el Cuadro 3.1 se infiere, por lo tanto, que la piel de tilapia utilizada en estas pruebas contiene tanto colágeno como otras proteínas.

3.2 Pruebas preliminares para primer tratamiento enzimático

Mediante un primer tratamiento enzimático se esperaba por un lado la remoción de todos aquellos componentes no colágenos presentes en la piel de tilapia, y por otro la obtención de una matriz colágena más limpia que sería utilizada posteriormente en un segundo tratamiento

enzimático. Para ello, se utilizó una enzima proteasa capaz de trabajar tanto sobre componentes no colágenos y colágenos, dependiendo de las condiciones en las que fuera utilizada.

En este caso, se hizo uso de información encontrada en la literatura y de pruebas preliminares, para hallar una serie de condiciones con las cuales trabajar posteriormente un diseño experimental, que permitiera tratar de manera adecuada la piel de tilapia, logrando una remoción de partículas no colágenas, afectando lo menos posible al colágeno.

Para las pruebas preliminares se escogieron diferentes condiciones de las principales variables que, según la teoría, afectan a las enzimas. Como variable fija se definió la enzima a utilizar; en este caso papaína, proteasa grado industrial con un bajo costo por unidad de peso, y con facilidad para ser obtenida en el mercado nacional. Se fijaron la agitación del medio durante la digestión, y el medio de tratamiento. Como variables experimentales se estudiaron el pH, temperatura, relación en masa entre el sustrato y la enzima, concentración de enzima en el medio de digestión, y tiempo de reacción enzimática; por lo tanto, para las pruebas preliminares se escogieron diferentes niveles de estas, según revisiones bibliográficas, para utilizar en la digestión de muestras de piel de tilapia.

Una vez realizado cada uno de los tratamientos, se procedió a obtener por gravimetría o pesaje, la masa total de la matriz recuperada en *base húmeda* todavía en su estructura cuaternaria. También se determinó la cantidad de colágeno en ella después de la digestión, mediante la cuantificación de hidroxiprolina. Gracias a estos dos valores se pudo obtener:

- 1) La que se definió como la variable respuesta, es decir el porcentaje de extracción. Brindó información sobre la cantidad de colágeno recuperado en la matriz después del tratamiento, con respecto al colágeno total disponible en la piel de tilapia antes de realizar la digestión, tal y como se describió en la ecuación 2.1. Ya que se deseaba minimizar la acción de la papaína sobre el colágeno, esto se vería traducido en altos porcentajes de extracción.

2) Un parámetro auxiliar para evidenciar el mejor efecto de la enzima sobre los componentes no colágenos que sí se deseaban eliminar, el porcentaje colágeno. Correspondió a la relación entre el colágeno obtenido en la matriz después del primer tratamiento enzimático, con respecto a la *totalidad* de masa de la matriz obtenida después de la digestión, que se encontró en base húmeda, y que permitió dar una idea de que tantas impurezas se encontraron en el material después del tratamiento, tal y como se presentó en la ecuación 2.2. En este caso, se buscaba que el tratamiento con la papaína lograra una remoción de la mayor cantidad de componentes no colágenos como ciertas proteínas, grasas y minerales, y obtener una matriz como la que se muestra en la Figura 3.2.

De acuerdo con los valores del Cuadro 3.1, si la enzima hubiera sido totalmente efectiva se habrían dado cambios en la composición de la matriz, de manera que generaría un aumento del porcentaje colágeno original de un 18.96% a valores cercanos al 23.20 %, en base húmeda.



Figura 3. 2 Matriz de colágeno después de primer tratamiento enzimático con papaína.

De acuerdo con Amri & Mamboya (2012), el pH óptimo para la papaína varía de acuerdo con el sustrato, entre valores de pH 4 y pH 8. Tomando como referencia este intervalo, se realizaron digestiones con pH ácido, básico y cercano a la neutralidad para abarcar diversos puntos y estudiar su afectación sobre la piel de tilapia.

La temperatura óptima de la papaína es alta, alrededor de los 60°C; sin embargo, este valor no fue utilizado para definir su acción sobre la piel de tilapia, ya que existen reportes de la

fuerte degradación de la estructura colágena en ese punto, lo que no era de interés en la primera etapa. En su lugar, se utilizaron temperaturas menores de 40°C y 50°C para evitar una pérdida grande de colágeno.

El efecto de la papaína es mejor sobre proteínas no colágenas que colágenas cuando los tiempos de digestión son cortos, ya que un tiempo de contacto alto hace que inevitablemente la enzima degrade el colágeno. Por lo tanto, se trabajaron tiempos menores a las 2 horas durante las pruebas preliminares.

Las condiciones de relación sustrato:enzima, y concentración de enzima en el medio fueron escogidas arbitrariamente, ya que estas varían mucho de acuerdo al tipo de sustrato sobre el que se esté trabajando.

Las combinaciones de todas las variables experimentales para los tratamientos preliminares se presentan en el Cuadro A.9 de la sección de datos experimentales. Los datos del porcentaje de extracción promedio y porcentaje de colágeno promedio (obtenido a partir de la cuantificación de hidroxiprolina) para cada uno los tratamientos estudiados en las pruebas preliminares se presentan en el Cuadro 3.2.

Las primeras tres pruebas se realizaron a tiempos de digestión de dos horas con pH ácido, básico, y cercano a la neutralidad; en donde tanto el porcentaje de recuperación como el de colágeno fueron bajos. La extracción se mantuvo entre 21.74% y 32.34%, indicando mucha pérdida del compuesto de interés durante el tratamiento, lo que pudo haber sido afectado por tiempos de digestión largos; además, el porcentaje de colágeno se encontró muy por debajo del 18.96% existente en la muestra original, lo que fue indicativo de que la matriz recuperada contó con una relación másica mayor de componentes indeseados, con respecto a la que existía en la piel de tilapia inicialmente; o que la enzima tuvo un mayor efecto sobre la digestión de colágeno que sobre componentes no colágenos. Entre más extremas las condiciones en pH se eliminó más grasa, observable a simple vista, y uno de los objetivos esperados de la digestión con papaína; sin embargo, también se presentó la mayor pérdida de

colágeno, por lo que estas condiciones no fueron las idóneas ya que el porcentaje de extracción fue bajo. Para reducir la pérdida de colágeno las siguientes pruebas preliminares se utilizaron con tiempos de digestión menores.

En condiciones con tiempos de digestión de una hora (muestras 4 y 5 respectivamente), aumentó el porcentaje de extracción, con respecto a las que se realizaron en condiciones más largas. En el caso de la prueba a pH 8.00, es decir muestra 4, el porcentaje colágeno indicó que existió una mayor hidrólisis de proteínas colágenas en relación a todos los demás componentes; por ende, su composición en la matriz recuperada fue menor; mientras que en el caso de un pH de 6.00 (muestra 5), al aumentar con base al 18.96% original en la piel de tilapia sin tratar, existió una mayor hidrólisis de proteínas no colágenas y otros componentes dentro de la matriz.

Se realizaron además pruebas a un pH intermedio de 6.50, para determinar mejores condiciones en cuanto al porcentaje de extracción y el porcentaje de colágeno (muestras 6 a 11), mediante la variación de la relación entre sustrato y enzima. Se observa como lo esperado con respecto al porcentaje de extracción no se logró, ya que existió una disminución en la recuperación. En cuanto al porcentaje colágeno, sí se dió un leve aumento, al acrecentar la relación sustrato:enzima de 20.0:1.0 a 25.0:1.0, y posteriormente se da una disminución de la cantidad colágena en relaciones sustrato:enzima de 27.0:1.0 en adelante, es decir cuando la cantidad de enzima es menor.

La papaína, dependiendo de sus condiciones de trabajo, tiende a atacar primero las proteínas no colágenas. Esto, aunado a lo expuesto en la teoría sobre el requisito de que exista una saturación del sustrato hacia la enzima para una buena actividad enzimática, podría explicar el comportamiento decreciente en la cantidad de colágeno al modificar la relación sustrato:enzima. En este caso a partir de la relación 27.0:1.0 para esas condiciones de pH, temperatura, y tiempo de digestión, se podría haber alcanzado la saturación entre sustrato y enzima, haciendo que aumente la actividad enzimática de la papaína a valores que permitieran no solamente el ataque de la enzima a proteínas no colágenas, sino también al colágeno.

En las condiciones de pH 6.00 y 8.00 la pérdida de colágeno pudo deberse propiamente al efecto de hidrólisis generado por las condiciones más ácidas o básicas, esto sumado al efecto de la enzima hizo que se perdieran tanto proteínas no colágenas como colágenas. Mientras que a pH de mayor neutralidad se pudo estar generando un menor efecto sobre las fibras colágenas, y prestaron las condiciones adecuadas para que la papaína trabajara mayoritariamente sobre las proteínas no colágenas.

Cuadro 3.2 Pruebas preliminares para obtención de matriz de colágeno a partir de piel de tilapia mediante primer tratamiento enzimático.

Muestra	pH	t(h)	T (°C)	Rs:E (g/g)	C _e (mg/ml)	Extracción (%)	Colágeno (%)
1	5.20	2.0	40.0	20.0:1.0	3.00	21.74 ± 1.19	5.87 ± 0.33
2	8.00	2.0	40.0	20.0:1.0	3.00	32.34 ± 1.80	17.04 ± 1.12
3	6.00	2.0	40.0	20.0:1.0	3.00	25.42 ± 1.00	14.94 ± 0.70
4	8.00	1.0	40.0	20.0:1.0	3.00	50.14 ± 2.48	10.79 ± 0.49
5	6.00	1.0	40.0	20.0:1.0	3.00	87.75 ± 2.72	19.57 ± 0.57
6	6.50	1.0	50.0	20.0:1.0	3.00	17.68 ± 0.35	22.36 ± 0.52
7	6.50	1.0	50.0	25.0:1.0	3.00	53.66 ± 1.03	23.05 ± 0.42
8	6.50	1.0	50.0	27.0:1.0	3.00	26.18 ± 1.28	21.02 ± 0.97
9	6.50	1.0	50.0	30.0:1.0	3.00	33.61 ± 0.88	17.26 ± 0.45
10	6.50	1.0	50.0	33.0:1.0	3.00	25.67 ± 2.19	13.35 ± 1.15
11	6.50	1.0	50.0	36.0:1.0	3.00	10.34 ± 0.62	12.38 ± 0.68

De acuerdo con los datos obtenidos de las pruebas preliminares realizadas, se observa que condiciones cercanas a las realizadas en el tratamiento 5 y 7 generan los porcentajes de extracción y colágeno más altos. En un pH de 6.00 se logró la mayor extracción de colágeno,

mientras que en pH de 6.50 se obtuvo el mejor porcentaje de colágeno. Además, con tiempos de digestión de aproximadamente una hora, relaciones de sustrato:enzima entre 25.0:1.0 y 20.0:1.0, y concentraciones de enzima con respecto a buffer cercanas a los 3 mg/ml se obtuvieron los mejores porcentajes de extracción de 87.75% y 53.66% y porcentajes colágenos de 19.57% y 23.05%, por lo que se escogieron como condiciones alrededor de las cuales trabajar durante el diseño experimental, y así poder determinar el efecto de la digestión con la papaína en las diferentes combinaciones de las variables en los niveles escogidos.

En el caso de la temperatura, en las pruebas preliminares se trabajaron valores de 40°C y 50°C, sin embargo, para el diseño experimental se decidió bajar el nivel inferior a uno de 37°C debido a la posibilidad de tener efectos de desnaturalización de parte del colágeno en temperaturas cercanas a ese valor. Se buscó trabajar con niveles por debajo y por encima de las temperaturas reportadas en la literatura para algunas especies acuáticas para determinar su efecto en el colágeno trabajado.

3.3 Primer tratamiento enzimático

Según el diseño experimental con tres réplicas, propuesto en la metodología, se obtuvieron las masas de las matrices recuperadas después de tratada la piel de tilapia, bajo las condiciones correspondientes. De cada una de ellas se tomó una muestra, para realizar la determinación de contenido de hidroxiprolina, para determinar la cantidad de colágeno presente. Tales valores se encuentran en el Cuadro A.15 de los apéndices.

Se presentan en el Cuadro 3.3 los promedios de los porcentajes de extracción y de colágeno de cada una de las corridas experimentales, de acuerdo con las definiciones de las ecuaciones 3 y 4 presentadas anteriormente. El porcentaje de extracción fue utilizado para el análisis del diseño factorial como variable de respuesta; sin embargo, al igual que en las pruebas preliminares, también se utilizó el porcentaje colágeno como parámetro de qué tan efectiva fue la enzima sobre la eliminación de otros componentes en la piel de tilapia.

En estos tratamientos experimentales se buscó al igual que en las pruebas preliminares el mayor porcentaje de extracción, ya que determinó en qué casos se presentó la máxima recuperación de colágeno después del tratamiento; también se buscó el porcentaje colágeno más cercano al 23.20%.

Se observa de los resultados que existieron tratamientos en donde se obtuvo una baja recuperación o extracción de colágeno, pero el porcentaje de colágeno se encontró por encima del 18.96% original. Esto fue indicativo de una alta digestión tanto de componentes colágenos como no colágenos; sin embargo, hubo una tendencia a digerir mayoritariamente componentes no deseados, por lo que la matriz obtenida fue poca pero más limpia que con respecto a la piel de tilapia inicial.

Se presentaron casos en donde el porcentaje de extracción fue relativamente alto; sin embargo, igualmente se dio pérdida de material de interés, además el porcentaje colágeno estuvo por debajo del 18.96%. Estos mostraron una digestión de ambos tipos de compuestos con una tendencia a digerir en este caso más el colágeno, por lo que al final la matriz obtenida cuenta con una relación de impurezas mayor a la que presentaba originalmente la piel de tilapia.

Se buscó entonces un alto porcentaje de recuperación y un alto porcentaje de colágeno. El mejor caso corresponde al de las condiciones presentadas en el Cuadro 3.3 en la fila 11, ya que en ellos se logró mantener la mayor cantidad de colágeno intacto en la matriz, y a su vez se observa que se logró remoción de partículas no colágenas. Las condiciones de este tratamiento correspondieron a pH 6.50, tiempos de digestión de 35 minutos, temperaturas de 37°C, relaciones entre sustrato: enzima de 20.0:1.0, y concentraciones de enzima en medio de 3 mg/mL.

Se determinó mediante Minitab 16® el cumplimiento de los supuestos de normalidad, varianza constante, e independencia de los datos obtenidos; además de la significancia de las variables experimentales sobre la variable respuesta, en este caso la extracción.

Cuadro 3.3 Porcentaje de extracción y porcentaje de colágeno promedio después del primer tratamiento enzimático con papaína, para condiciones de diseño factorial fraccionado.

#	pH	T(°C)	R _{s:e} (g/g)	Ce (mg/ml)	t(min)	Extracción promedio(%)	Colágeno promedio(%)
1	6.00	37.0	20.0:1.0	3.00	60.0	87.20 ± 10.79	19.30 ± 2.42
2	6.00	50.0	25.0:1.0	3.00	60.0	28.97 ± 1.81	20.52 ± 1.27
3	6.00	37.0	25.0:1.0	3.00	35.0	92.42 ± 5.43	19.96 ± 1.46
4	6.00	37.0	25.0:1.0	5.00	60.0	73.56 ± 5.14	16.18 ± 1.14
5	6.50	50.0	20.0:1.0	5.00	35.0	58.04 ± 5.42	19.84 ± 0.70
6	6.50	50.0	20.0:1.0	3.00	60.0	29.28 ± 1.32	20.14 ± 0.49
7	6.50	37.0	20.0:1.0	5.00	60.0	94.84 ± 5.72	21.70 ± 1.18
8	6.50	50.0	25.0:1.0	5.00	60.0	40.40 ± 3.00	19.95 ± 1.70
9	6.00	37.0	20.0:1.0	5.00	35.0	92.77 ± 3.42	20.03 ± 1.27
10	6.50	37.0	25.0:1.0	5.00	35.0	80.17 ± 6.02	17.77 ± 1.47
11	6.50	37.0	20.0:1.0	3.00	35.0	98.75 ± 2.30	21.52 ± 0.36
12	6.00	50.0	20.0:1.0	3.00	35.0	55.33 ± 1.68	19.97 ± 0.38
13	6.00	50.0	25.0:1.0	5.00	35.0	39.27 ± 3.92	20.29 ± 1.26
14	6.50	50.0	25.0:1.0	3.00	35.0	56.70 ± 2.21	21.01 ± 0.36
15	6.50	37.0	25.0:1.0	3.00	60.0	94.56 ± 2.26	21.98 ± 0.43
16	6.00	50.0	20.0:1.0	5.00	60.0	35.01 ± 4.66	22.35 ± 2.20

Para comprobar la normalidad de los datos se tomaron en cuenta las siguientes hipótesis:

H_0 : Los residuos siguen una distribución normal.

H_1 : Los residuos no siguen una distribución normal.

En donde se rechaza H_0 si p es menor 0.05 y se acepta H_0 si P es mayor o igual a 0.05.

Para el caso de los datos en estudio se obtuvo un valor p de 0.553, utilizando el modelo de Anderson Darling brindado por el programa, tal y como se muestra en la Figura 3.3; por lo

tanto, no se tiene la suficiente evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula, y se concluye que los datos provienen de una distribución normal con un 95% de confianza.

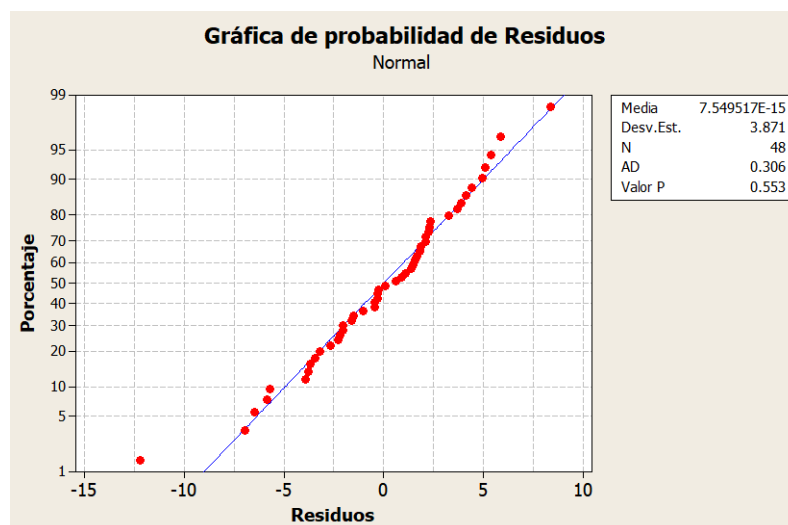


Figura 3.3. Gráficas de probabilidad normal de los residuos para diseño factorial fraccionado de extracción de una matriz de colágeno a partir de un primer tratamiento enzimático con papaína.

Para el supuesto de varianza constante se hizo uso de los valores arrojados por las pruebas de Barlett y Levene. Se realizaron estas pruebas ya que como se mencionó anteriormente, los datos provienen de una distribución normal.

Tal y como en el caso anterior, se tuvieron las siguientes hipótesis para el supuesto de varianza constante:

H_0 : Los datos tienen una varianza constante.

H_1 : Los datos no tienen una varianza constante.

De la Figura 3.4 se obtiene un valor de P de 0.376 para Bartlett, y uno de 0.907 para la prueba de Levene; al ser estos mayores a 0.05 no se tuvo evidencia estadística que permitiera rechazar la hipótesis nula; por lo tanto, se pudo aceptar una varianza constante de los datos, y se cumplió con el supuesto.

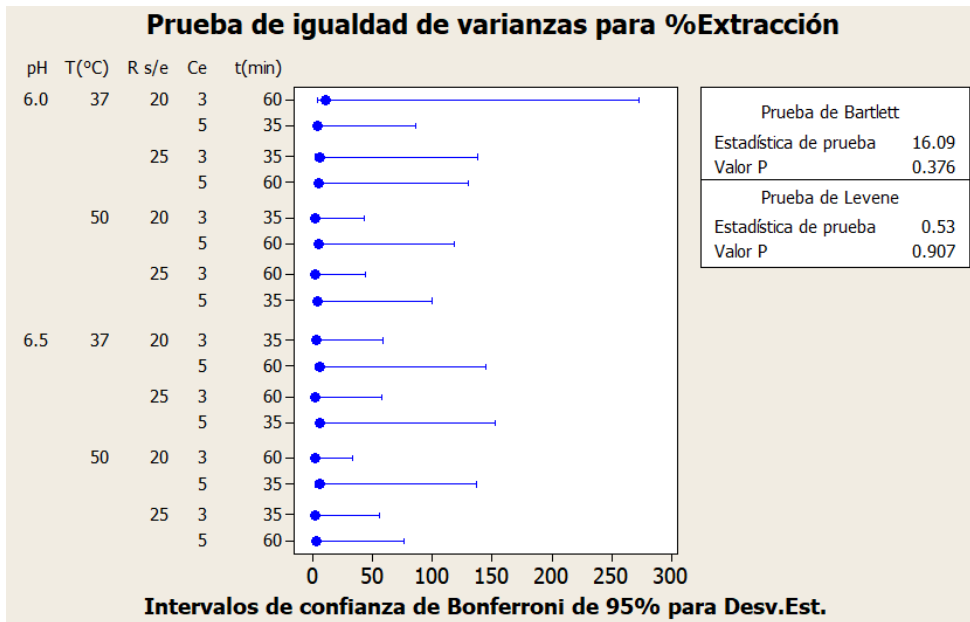


Figura 3.4 Prueba de igualdad de varianzas para diseño factorial fraccionado de extracción de una matriz de colágeno a partir de un tratamiento enzimático con papaína.

Para asegurarse la aleatoriedad de los valores obtenidos, se graficó el orden de obtención de los datos contra los residuos alcanzados, tal y como se muestra en la Figura 3.5. Al no encontrarse un patrón definido en los puntos, se cumplió el supuesto de independencia de los datos.

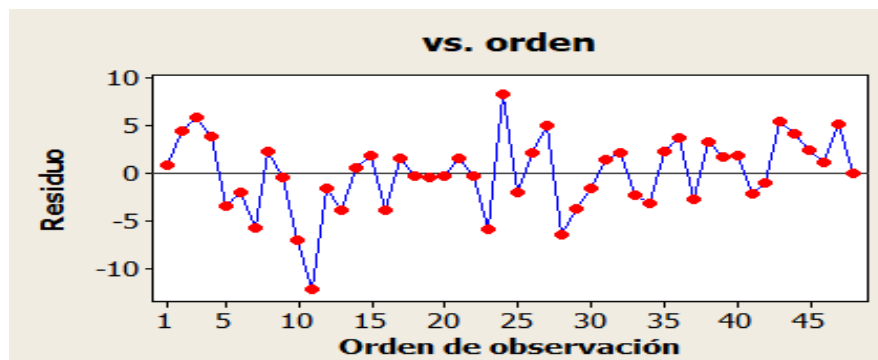


Figura 3.5 Residuos contra orden de corrida, para diseño factorial fraccionado de extracción de una matriz de colágeno a partir de un tratamiento enzimático con papaína.

De acuerdo con los datos de porcentaje de extracción para las corridas experimentales, según la combinación de tratamientos del Anexo 6, cuyos valores promedio y ordenados se presentaron en el Cuadro 3.3, se realizó el análisis de varianza para el diseño factorial,

obteniéndose así información sobre la significancia de las variables sobre la extracción del colágeno después de realizado el primer tratamiento enzimático con papaína.

En la Figura 3.6 se exhiben los datos del ANOVA para el diseño experimental del primer tratamiento enzimático, de donde se observa la presencia de múltiples variables cuyos valores afectan la extracción de colágeno, y la existencia de interacciones significativas entre las mismas.

Fuente	P
Efectos principales	0.000
pH	0.000
T(°C)	0.000
R s/e	0.000
Ce	0.011
t(min)	0.000
2-Interacciones de (No.) factores	0.000
pH*T(°C)	0.742
pH*R s/e	0.017
pH*Ce	0.117
pH*t(min)	0.068
T(°C)*R s/e	0.069
T(°C)*Ce	0.004
T(°C)*t(min)	0.000
R s/e*Ce	0.000
R s/e*t(min)	0.016
Ce*t(min)	0.002
Error residual	
Error puro	
Total	

Figura 3.6 ANOVA para diseño experimental de primer tratamiento enzimático.

Lo anterior puede ser observado más fácilmente también en la Figura 3.7 a). Al ser más importantes las interacciones entre variables experimentales sobre la respuesta, que el efecto de cada variable individualmente, fueron estas las que se tomaron en cuenta para el análisis.

En la Figura 3.7 b) pudieron ser identificados en orden de importancia las interacciones entre las variables utilizadas en el diseño experimental sobre la variable respuesta. Se obtuvo un mayor efecto sobre el porcentaje de extracción de la interacción entre la temperatura y el tiempo de digestión, seguida por la interacción entre relación sustrato:enzima y concentración de enzima en medio, la interacción entre concentración de enzima en medio y el tiempo, interacción entre temperatura y concentración de enzima, interacción entre relación sustrato:enzima y tiempo de digestión, e interacción entre pH y relación sustrato:enzima.

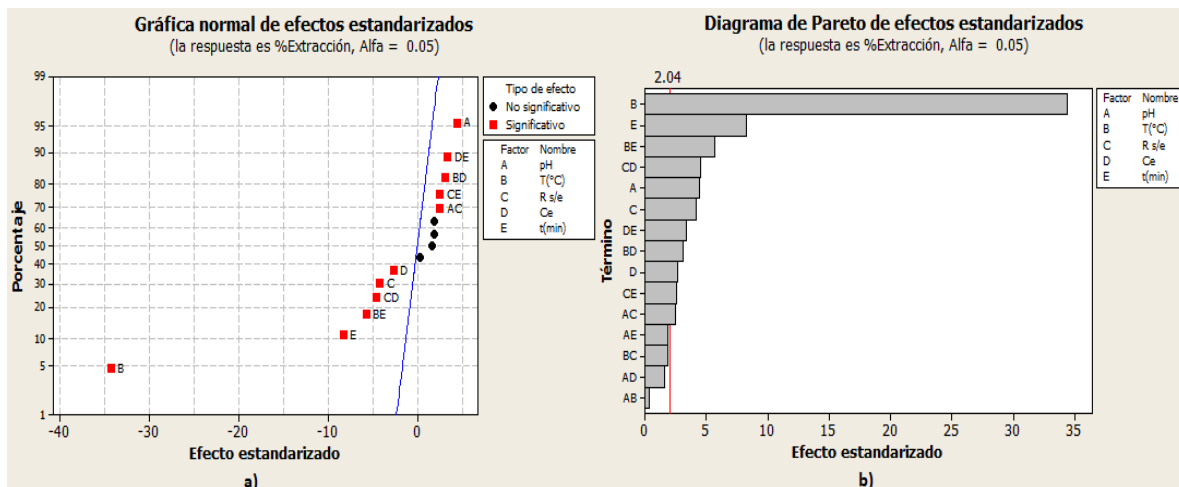


Figura 3.7 a) Efectos estandarizados. b) diagrama de Pareto, para significancia de variables en diseño factorial fraccionado de extracción de matriz colágena, a partir de primer tratamiento enzimático con papaína.

Para el caso de la interacción entre la temperatura de digestión y el tiempo, se observa de la Figura 3.8, como se obtiene un mayor porcentaje de recuperación o extracción después de la digestión, cuando se utiliza la temperatura mínima de 37°C. El tiempo tiene menor efecto cuando se mantienen estas condiciones de temperatura, ya que la media del porcentaje de extracción se conserva prácticamente constante. Para el caso de temperaturas de 50°C se obtiene menor extracción, alcanzando una disminución notable entre mayor sea el tiempo de digestión.

Las mayores pérdidas de proteínas colágenas, en condiciones de 50°C, pudieron deberse a que en esta temperatura ya se obtuvo una mayor hidrólisis de las proteínas, hasta alcanzar su

estructura primaria, debido a la existencia de mayores energías para el rompimiento de enlaces, con lo que parte de estas proteínas fueron liberadas al medio líquido. Además; para esa temperatura, y en condiciones de tiempos de digestión altos se presentó una mayor oportunidad de contacto entre el sustrato y la enzima, por lo que hubo más acción por parte de la papaína hacia todos los componentes no colágenos de la piel de tilapia y posteriormente hacia el colágeno.

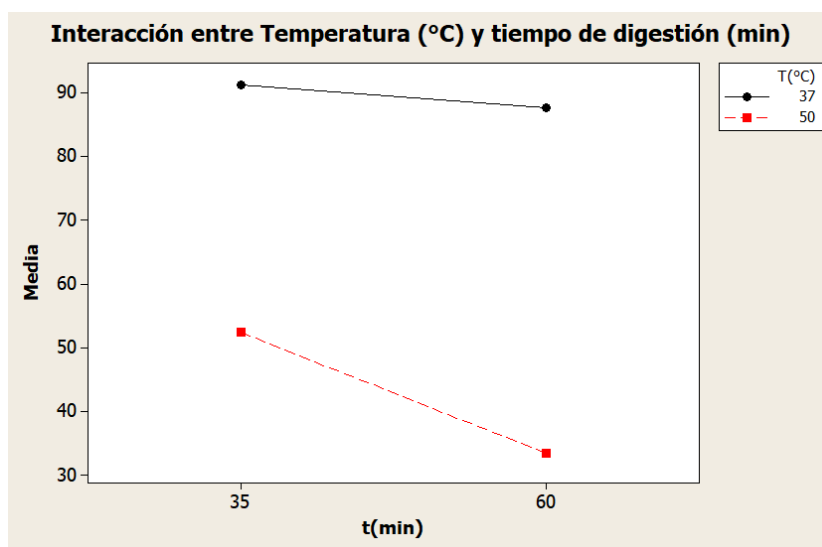


Figura 3. 8 Efecto de la interacción entre temperatura y tiempo de digestión sobre la extracción de una matriz colágena, a partir de primer tratamiento enzimático con papaína en piel de tilapia, gracias a diseño factorial fraccionado.

Para las interacciones entre la relación sustrato:enzima y concentración de enzima en buffer se tuvo, según la Figura 3.9, que en condiciones de concentración de enzima de 3.00 mg/mL el porcentaje de extracción es prácticamente el mismo sin importar la relación entre sustrato y enzima; sin embargo, al aumentarse la concentración de enzima en el medio se dieron cambios en la recuperación. Se presentó una mayor afectación sobre la extracción de una matriz colágena por parte de relaciones sustrato:enzima de 25.0:1.0 cuando la concentración de enzima fue mayor.

Debe de recordarse que, uno de los requisitos en cuanto a la relación sustrato:enzima para un máximo rendimiento de la enzima es que esta se encuentre saturada con sustrato. En las

condiciones propuestas, una relación 25.0:1.0 indica una mayor cantidad de sustrato por masa de enzima; es decir, presenta una mayor saturación de sustrato que una relación 20.0:1.0. Se espera entonces, que la enzima tenga una mayor efectividad de funcionamiento sobre las proteínas en las relaciones 25.0:1.0; por lo tanto, no solamente se dió una digestión de proteínas no colágenas, como se deseaba, sino también una digestión de proteínas colágenas, esto explicaría la disminución en el porcentaje de extracción. Entre mayor fue la cantidad de sustrato, mayores fueron las colisiones entre este y los sitios activos de las enzimas, con lo que se dió un aumento en la probabilidad de formación de complejos enzima-sustrato.

Tal y como se mostró en la Figura 1.5, se tiene que a mayores cantidades de sustrato la velocidad de reacción es mayor, esto está acorde con el fenómeno presentado en la Figura 3.9. Al existir más sustrato en las relaciones 25.0:1.0 utilizadas, se pudo haber presentado mayor velocidad de reacción, que permitió no solamente la digestión de proteínas no colágenas sino también de colágenas, y por lo tanto una pérdida de material.

La disminución en el porcentaje de extracción entre mayor fue la concentración de enzima en el medio, para mayores relaciones de sustrato, pudo deberse a que se dió un aumento en las probabilidades de colisionar con el sustrato en sus sitios activos, logrando una mayor digestión de todas las proteínas.

Para relaciones entre sustrato:enzima de 20.0:1.0 se tuvo menor cantidad de piel de tilapia, y por lo tanto menor cantidad de proteínas iniciales; aunque se dió en algunos tratamientos un aumento en la concentración de enzima, al no haber alcanzado todavía su saturación en comparación con las relaciones 25.0:1.0, no se dió una maximización de la enzima. Las condiciones permitieron que su efecto pudiera ser menor sobre las proteínas colágenas y por lo tanto la extracción o recuperación de una matriz colágena intacta fue mayor. Es decir, en este caso la enzima tuvo las condiciones suficientes para no afectar la estructura colágena, sino interactuar más sobre otro tipo de componentes, y por lo tanto la pérdida de material al medio fue menor, y la extracción mayor.

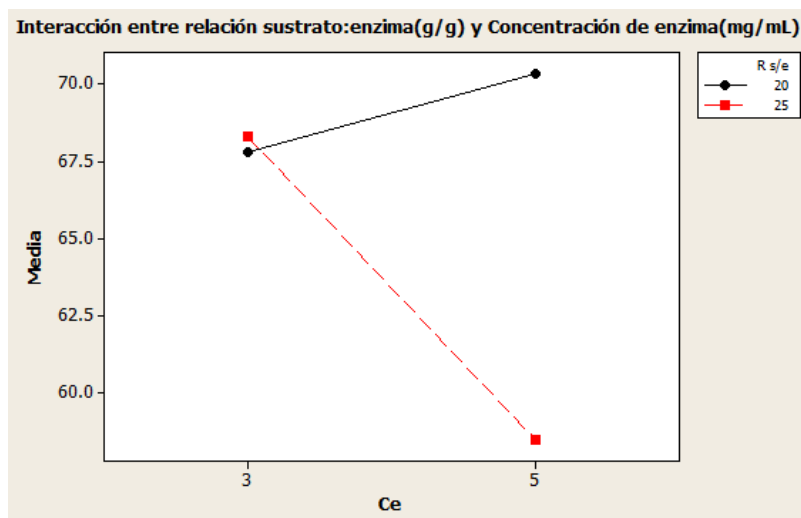


Figura 3.9 Efecto de la interacción entre relación sustrato:enzima y la concentración de enzima en el buffer sobre la extracción de una matriz colágena, a partir de primer tratamiento enzimático con papaína en piel de tilapia, gracias a diseño factorial fraccionado.

Para la interacción entre la concentración de enzima utilizada y el tiempo de digestión, se presentan mayores porcentajes de extracción de una matriz colágena entre menor sean ambas, según se observa en la Figura 3.10.

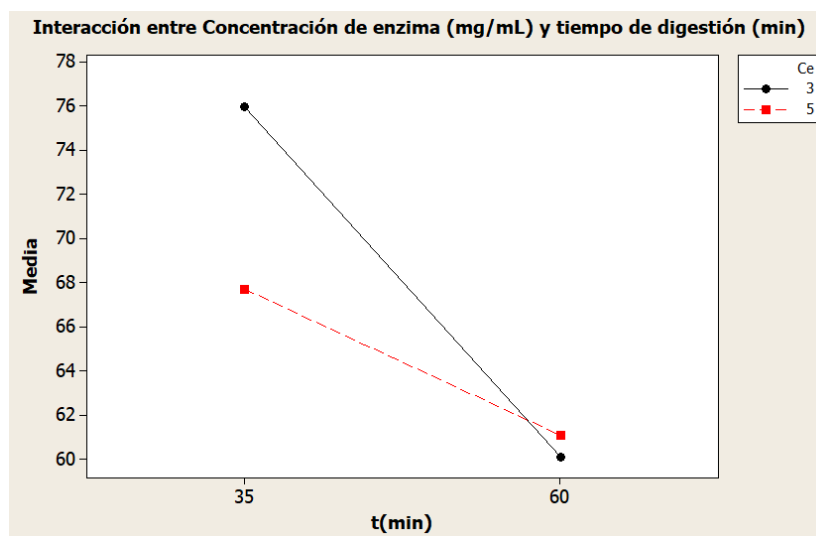


Figura 3.10 Efecto de la interacción entre la concentración de enzima y el tiempo de digestión sobre la extracción de una matriz colágena, a partir de primer tratamiento enzimático con papaína en piel de tilapia, gracias a diseño factorial fraccionado.

Se dió una disminución en la masa colágena debido al aumento en el tiempo de contacto con la enzima, lo que permitió más interacciones con el sustrato y más capacidad de acción sobre el rompimiento de enlaces como es de esperarse. Al aumentar la concentración de enzima se presentó una mayor pérdida de colágeno, ya que la mayor cantidad de enzima sobrepasó el efecto que podía realizar selectivamente sobre algunos componentes en la piel de tilapia.

Entre la temperatura y la concentración de enzima en el buffer también existió una significancia durante la digestión de colágeno en la piel de tilapia, cuyo comportamiento se presenta en la Figura 3.11. En condiciones de 37°C se obtuvieron porcentajes de extracción mayores que a 50°C; sin embargo, a las temperaturas más altas la variación en la masa recuperada utilizando diferentes concentraciones de enzima no representó mucho cambio, de ahí que en la Figura 3.11 se presente una línea casi constante.

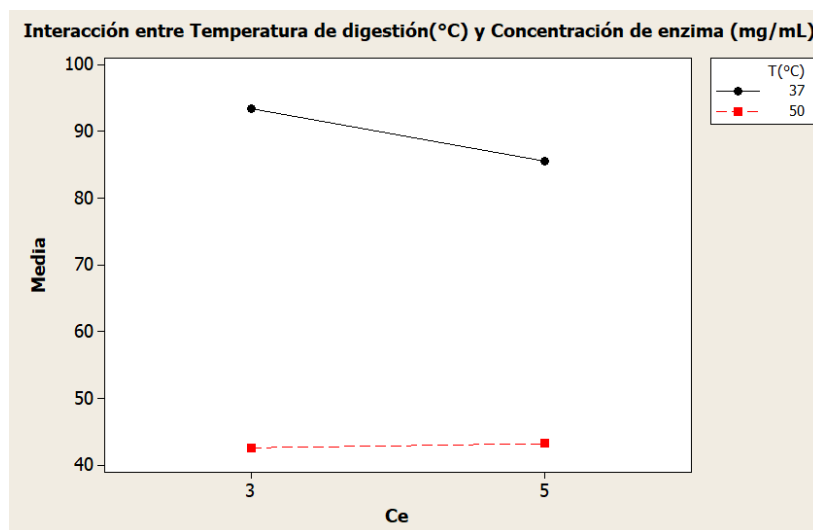


Figura 3.11 Efecto de la interacción entre temperatura(°C) y concentración de enzima en buffer (mg/ml) sobre la extracción de una matriz colágena, a partir de primer tratamiento enzimático con papaína en piel de tilapia, gracias a diseño factorial fraccionado.

A 50°C se presentaron porcentajes de extracción menores, esto pudo deberse a que en este punto se alcanzó una mayor actividad enzimática por temperatura, lo que hizo que la digestión de la enzima se diera no solamente sobre componentes no colágenos sino sobre el colágeno, y por lo tanto hubo una pérdida de este en el medio. En el caso de 37°C, la enzima no alcanzó el máximo de actividad, por lo que tuvo un efecto más moderado sobre el colágeno;

por lo tanto, este no se hidrolizó ni se liberó al medio y existió una mayor recuperación en la matriz.

Entre mayor fue la concentración de la enzima en el medio, se dió mayor oportunidad de unión con sitios activos de la misma, no solamente con proteínas no colágenas sino también con las colágenas, por lo que se presentó una mayor pérdida del material de interés y una menor extracción.

La interacción del tiempo de digestión y relación entre sustrato:enzima tuvo el efecto esperado sobre la extracción, después del tratamiento enzimático como se observa en la Figura 3.12. Entre mayor fue el tiempo de reacción menor fue la recuperación, ya que la enzima tuvo más oportunidad para digerir no solamente componentes no colágenos sino colágenos

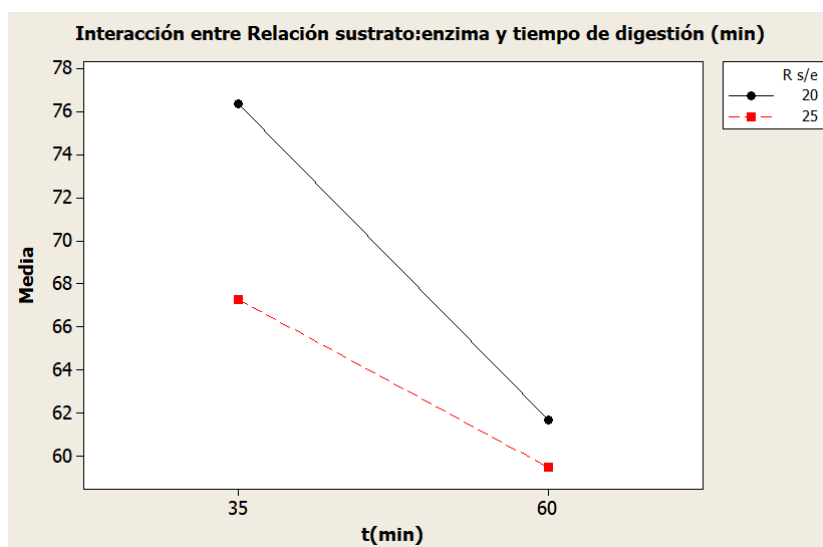


Figura 3.12 Efecto de la interacción entre relación sustrato:enzima (g/g) y tiempo de digestión (min) sobre la extracción de una matriz colágena, a partir de primer tratamiento enzimático con papaína en piel de tilapia, gracias a diseño factorial fraccionado.

Como se mencionó anteriormente, relaciones de 25.0:1.0 utilizaron mayor cantidad de sustrato que las relaciones 20.0:1.0. En el primer caso se dió una saturación más rápida de sustrato en los sitios activos de la enzima, lo cual fue un requisito para que la enzima actuara

adecuadamente sobre todas las proteínas, incluyendo las colágenas; por lo tanto, al haber digestiones para ambos componentes estos se perdieron en el medio, y la extracción de la matriz con la mayoría de las proteínas colágenas fue menor.

El promedio de extracción de colágeno en las matrices, después del tratamiento enzimático, cambió debido a una interacción entre el pH del medio durante la digestión y la relación entre sustrato:enzima, tal y como se observa en la Figura 3.13. A pH de 6.5 se obtuvo una mayor cantidad colágena, con cierta variación al utilizar diferentes relaciones entre sustrato:enzima; sin embargo, a un pH menor la masa decayó más abruptamente entre mayor fue la relación sustrato:enzima.

Al igual que en los casos anteriores, mayor relación de sustrato y enzima pudo haber generado las condiciones necesarias para saturar los sitios activos de la enzima, esto aunado a una reducción en el pH en donde la enzima pudo presentar mayor actividad, generó una digestión de manera que se perdió tanto componentes de interés como colágeno.

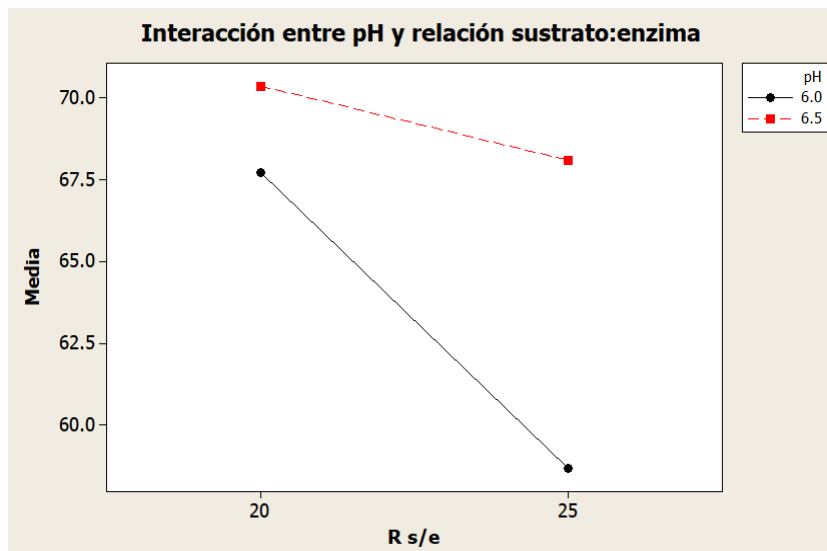


Figura 3.13. Efecto de la interacción entre pH y relación sustrato:enzima sobre la extracción de una matriz colágena, a partir de primer tratamiento enzimático con papaína en piel de tilapia, gracias a diseño factorial fraccionado.

No se contaron con datos de porcentajes de extracción ni porcentajes colágenos de comparación, en estudios en donde se realizó la remoción de componentes no colágenos

mediante tratamientos ácidos o básicos, solamente existen algunas referencias sobre el porcentaje de extracción de *proteína total*. A la matriz recuperada bajo las mejores condiciones enzimáticas determinadas anteriormente, identificadas en el tratamiento 11 del Cuadro 3.3, también se le realizó una cuantificación de la proteína total por método de Kjeldahl. Los resultados de dicho análisis se presentan en el Anexo 8, ya que se realizaron en un laboratorio externo al CENIBiot.

La proteína total para la matriz recuperada en este trabajo fue de 29.56%, es decir existió una pérdida del 3.54% con respecto a su composición original; esto es consistente con la pérdida de proteína total para tratamientos con hidróxido de sodio 0.1 mol/L durante dos días a temperatura ambiente realizados en otros estudios (Mora, 2007). Se puede concluir que el tratamiento enzimático realizó cambios en la composición de la piel de tilapia de manera comparable a los realizados en tratamientos básicos en cuanto a la composición de proteína total; los generó en tiempos más cortos y en condiciones de pH más cercanos a la neutralidad; sin embargo, fueron necesarias temperaturas levemente mayores.

3.4 Pruebas de caracterización después de primer tratamiento enzimático

Debido a la necesidad de mejorar la solubilidad de la muestra recuperada, para realizar las pruebas de caracterización, se efectuó una hidrólisis parcial ácida con ácido acético. Además, se recuperó nuevamente el colágeno por precipitación con sales, pero esta vez en su estructura terciaria fibrilar, conocido a partir de este momento como *colágeno nativo*. Bajo estas condiciones físicas, la muestra pudo ser re-solubilizada en los medios respectivos necesarios para obtener información sobre su composición, estructura y estabilidad.

En la Figura 3.14 se muestra un diagrama más detallado de la recuperación del colágeno en su estado nativo, después de la hidrólisis ácida. La hidrólisis consistió en la formación de una disolución en ácido acético 0.5 mol/L durante 24 horas a 4°C, en donde se obtuvo una mezcla altamente viscosa; seguida de un proceso de neutralización con NaOH hasta un pH de 7.15 en donde se encontró el punto isoelectrico de la disolución, y una precipitación con sales.

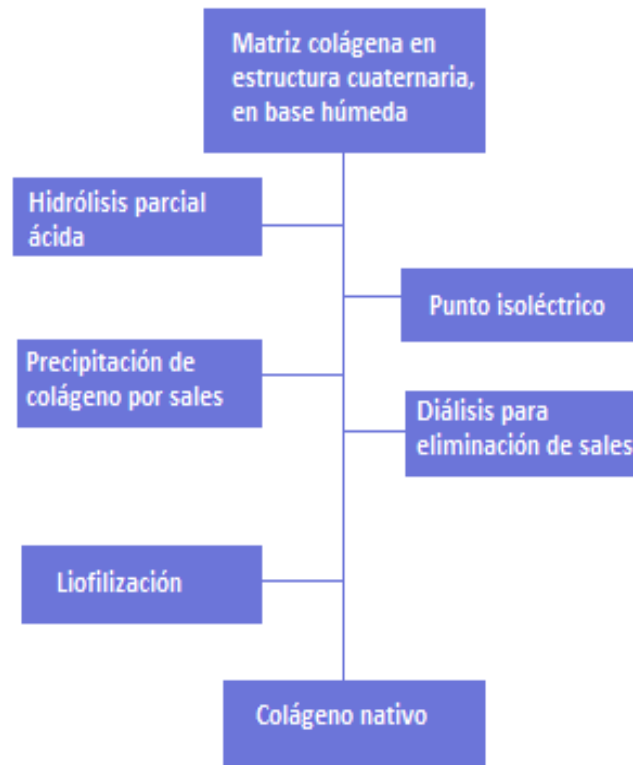


Figura 3.14 Diagrama de etapas de tratamiento para muestras sometidas a electroforesis y temperatura de desnaturalización.

Las pruebas de caracterización alcanzadas en este punto intermedio se compararon con las obtenidas más adelante para el colágeno hidrolizado enzimáticamente. Esto permitió observar las diferencias en la estructura de la proteína en su estado nativo vrs su estado hidrolizado mediante enzimas.

3.4.1 Análisis infrarrojo

Con el propósito de ayudar a elucidar la estructura del compuesto, se recurrió al análisis infrarrojo. Este permitió buscar las principales señales de determinados grupos funcionales presentes en la muestra, y fue posible su comparación con bandas de absorción teóricas, como las mencionadas en el Cuadro 1.4.

Se observa en la Figura 1.15 la presencia de una banda de $3\,287.96\text{ cm}^{-1}$, esta es particular de las amidas tipo A, en donde se da un estiramiento de los enlaces N-H de los péptidos. Según Nagai, Suzuki, & Nagashima (2008), si los grupos N-H están libres estos presentan picos cercanos a los $3\,400\text{ cm}^{-1}$, sin embargo la señal se puede presentar a frecuencias menores si los grupo N-H presentan enlaces de hidrógeno, como se da en este caso.

Se presenta una banda atribuida a amidas tipo B en $2\,929.79\text{ cm}^{-1}$ y $2\,850.66\text{ cm}^{-1}$ que corresponde a estiramientos de los enlaces entre carbono e hidrógeno de los grupos CH_2 .

Las bandas características para el colágeno se presentan en la zona de huella dactilar; alrededor de $1\,630.35\text{ cm}^{-1}$ se tuvo una banda propia para las amidas tipo I, en donde se generan estiramientos vibracionales de los enlaces C=O, mientras que en $1\,530.37\text{ cm}^{-1}$ se tuvo una banda para la amida II que surge de un doblamiento de los enlaces N-H. Las amidas I y II son las principales bandas de absorción de los péptidos que se presentan en la estructura colágena (Silva Júnior et al., 2015).

Las bandas características para la amida III, correspondientes a estiramientos de C-N, se presentaron cerca a los $1\,234.78\text{ cm}^{-1}$, $1\,081.33\text{ cm}^{-1}$, $1\,023.20\text{ cm}^{-1}$ y menores a 800 cm^{-1} . Además, los picos que se dieron a $1\,441.90\text{ cm}^{-1}$ y $1\,334.79\text{ cm}^{-1}$ corresponden típicamente a la estereoquímica de los anillos de pirrolidina, provenientes de la prolina e hidroxiprolina dentro de la cadena aminoácida.

Según Silva Júnior et al. (2015), una relación de la absorbancia de 1, entre las bandas de amida III en $1\,234\text{ cm}^{-1}$ y de la pirrolidina en $1\,441\text{ cm}^{-1}$, demuestran presencia de integridad estructural en la cadena de colágeno, y valores cercanos a 0.5 revelan alguna variación en la triple hélice. En este caso, marcado por una línea verde en el espectro, se observa como ambos picos presentaron prácticamente la misma intensidad, por lo que su valor fue cercano a 1. Lo anterior es correspondiente con lo esperado, ya que las condiciones de la hidrólisis ácida fueron escogidas para dañar lo menos posible la integridad de la triple hélice, con lo que en este caso solo se buscaba comprobar que efectivamente lo que se obtuvo fue colágeno.

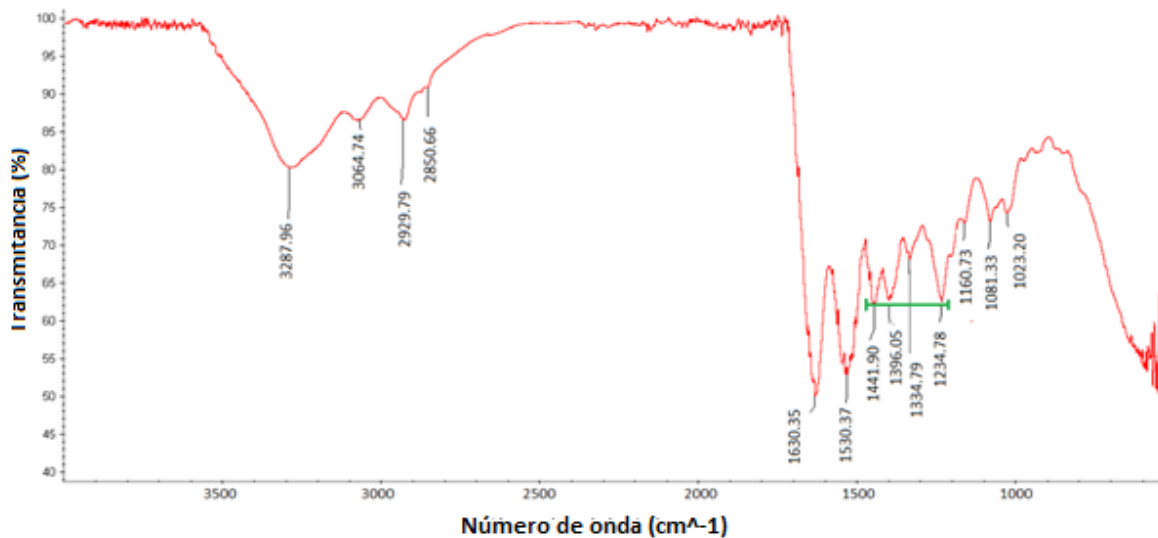


Figura 3.15 Espectro infrarrojo para colágeno nativo obtenido de la matriz colágena después de primer tratamiento enzimático e hidrólisis parcial ácida.

3.4.2 Análisis electroforético

Mediante electroforesis se logró la separación de proteínas de acuerdo con su peso molecular, gracias a la aplicación de una corriente eléctrica que permitió que migraran debido a su carga. En este caso se utilizó la técnica de SDS PAGE, o electroforesis en geles de Poliacrilamida con Dodecilsulfato Sódico, cuyo principal objetivo fue, al igual que en el caso del análisis infrarrojo, confirmar la presencia de colágeno e identificar patrones que determinaran la integridad de la estructura; además, ayudar a la identificación de la variedad de colágeno presente. El resultado obtenido se presenta en la Figura 3.16.

Parte de la muestra liofilizada previamente fue disuelta en buffer de fosfato de sodio dibásico, trabajada en dos concentraciones de 2.00 mg/mL y 1.50 mg/mL, y filtradas. Estas a su vez fueron mezcladas en una relación 1:1 con un “buffer de carga”, necesario para igualar las cargas de las muestras antes de realizar la corrida de electroforesis, por lo que la concentración final de ambas muestras fue de 1.00 mg/mL y 0.75 mg/mL respectivamente. Se utilizaron dos concentraciones diferentes para probar si la diferencia de masa podía generar un barrido por sobrecarga de proteínas en los pozos.

El carril A1 correspondió a una muestra de albúmina de suero bovino, utilizada como control de que la aplicación de la carga en la electroforesis se estuviera realizando de manera correcta. El carril M contuvo el marcador de peso molecular, mientras que los carriles A y B correspondieron a las muestras de colágeno nativo de piel de tilapia de interés, en una concentración de 1.00 mg/mL y 0.75 mg/mL respectivamente, corridas por duplicado en el gel. En el carril C se tuvo una muestra de colágeno de piel de tilapia con el que se contaba previamente en el centro de investigación, obtenido mediante un tratamiento *básico* para eliminación de componentes no colágenos y una extracción ácida, en donde las condiciones de tiempo y temperatura utilizadas fueron adecuadas para obtener fibras lo más intactas posibles, este fue incluido a modo de comparación, ya que no se contaba con un estándar de colágeno de piel de tilapia.

Del patrón de SDS PAGE para los carriles A y B obtenidos, se observa la presencia de bandas claramente definidas entre los 150 kDa y 100 kDa, esto corresponde con características de cadenas colágenas conocidas como α_1 y α_2 respectivamente, que difieren entre sí en la disposición de sus aminoácidos, tal y como se presentó en la Figura 1.16. Las cadenas alfa tienen diferente afinidad por el SDS, siendo α_2 la que presenta mayor movilidad; esto queda evidenciado en el gel en donde se presenta un poco más abajo. También se observa como α_1 presentó casi el doble de tamaño de α_2 , lo que coincide típicamente con características del colágeno “tipo I”, en donde la triple hélice es formada a partir de dos cadenas α_1 idénticas y una cadena α_2 (Hay, 2012), por lo que su configuración se describe como $[\alpha_1(1)]_2\alpha_2$. El peso molecular de las bandas y su distribución en el gel, hacen inferir que efectivamente se tiene colágeno nativo tipo I, en donde la estructura helicoidal todavía se mantuvo intacta.

En el carril C del colágeno de comparación, las bandas presentaron una coloración más tenue debido a la dificultad de diluir la muestra en el buffer fosfato, lo que generó que después de la filtración se perdiera gran parte del colágeno, y la consecuente carga de una muestra más diluida que las otras en el pozo. A pesar de lo anterior, se observan las mismas bandas alfa que en las muestras A y B, con una leve variación en el peso molecular. Las diferencias en los métodos de obtención del colágeno pudieron haber generado afectaciones en la hidrólisis

de las cadenas de la triple hélice, con su consecuente variación en los pesos moleculares de las bandas.

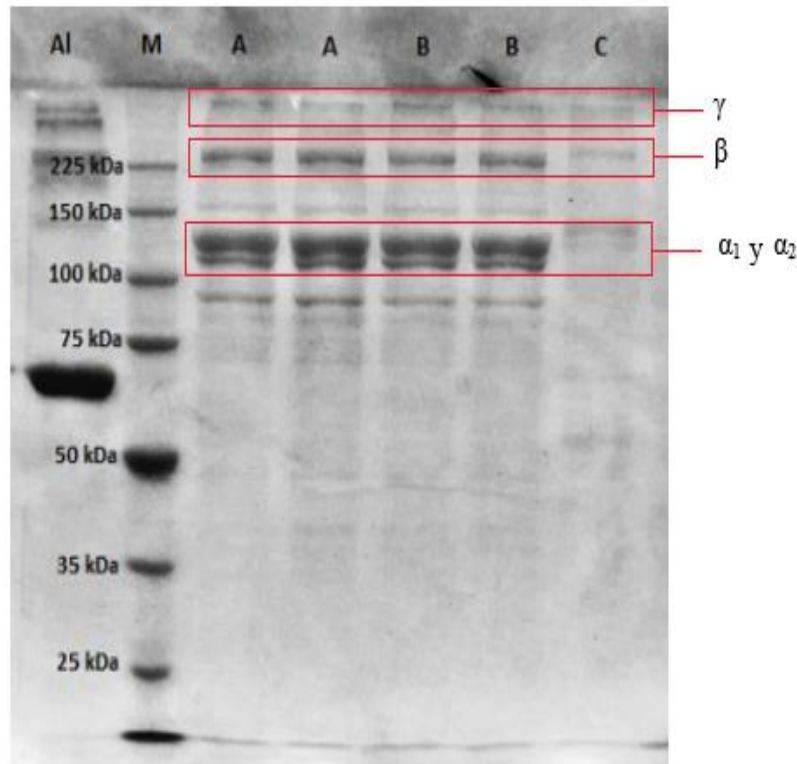


Figura 3.16 Patrón de SDS-PAGE para fibras de colágeno nativo obtenido de la matriz colágena después de primer tratamiento enzimático e hidrólisis parcial ácida. Carril A1: Albúmina de suero bovino, carril M: Marcador de peso molecular, carril A: colágeno de piel de tilapia *Oreochromis Niloticus* en estudio (1 mg/mL), carril B: Colágeno de piel de tilapia *Oreochromis Niloticus* en estudio (0.75 mg/mL), carril C: colágeno de piel de tilapia *Oreochromis Niloticus* sp, obtenido previamente mediante pretratamiento básico y extracción ácida, utilizado como comparación.

En los carriles A, B y C también se confirmó la presencia de cadenas γ y β , correspondientes a trímeros y dímeros de cadenas alfa, y que típicamente se encuentran en los patrones electroforéticos de colágeno. Estos se encontraron con pesos moleculares mayores a los 225 kDa. La densidad de estas bandas fue menor a la de las cadenas alfa, lo que indica una menor cantidad de enlaces reticulados.

Un menor contenido de enlaces reticulados, por acción de la papaína, además de un peso molecular levemente menor de las cadenas α_1 y α_2 , como se presentó en los carriles A y B,

podieron estar relacionados con la mejor solubilidad del colágeno nativo en donde el primer tratamiento fue enzimático.

3.4.3 Caracterización térmica

Mediante el análisis termogravimétrico es posible determinar la estabilidad térmica de un material a temperaturas altas. Gracias a este, se puede establecer el comportamiento que tiene una muestra cuando le es aplicado calor, ya que se obtiene información del cambio en la masa del material en función de la temperatura que aumenta progresivamente.

Se realizó un análisis termogravimétrico (TGA) para el colágeno nativo liofilizado de piel de tilapia, obtenido después del primer tratamiento enzimático y la hidrólisis parcial ácida. La prueba se ejecutó en un ambiente inerte con nitrógeno, en donde fue necesario llevar el equipo hasta la temperatura inicial de estabilización de 25°C antes de empezar el ensayo, generando una pequeña pérdida de masa antes de iniciar, por lo que como se puede observar en la Figura 3.17 el porcentaje de peso no se inicia en un 100%.

En el termograma se observan dos curvas: la curva color verde, con características decrecientes, correspondió a la pérdida de masa con respecto a la temperatura, mientras que la curva color azul representó la derivada de la masa con respecto a la temperatura. Del mismo se desprenden los datos que se encuentran en el Cuadro 3.4, en donde las temperaturas iniciales y finales correspondieron al inicio y finalización de cada evento térmico, y se obtuvieron de la curva decreciente de pérdida de masa; la temperatura máxima correspondió al punto donde se dió la velocidad máxima de destrucción del material, y se obtuvo de la curva creciente de derivada.

Los tres eventos térmicos importantes están acordes con lo presentado en la teoría por otros estudios de colágeno. En donde cada uno de los cambios pudo ser descrito de la siguiente manera:

Cuadro 3.4 Temperaturas de eventos térmicos y pérdida de masa para fibras de colágeno nativo obtenido de la matriz colágena después de primer tratamiento enzimático e hidrólisis parcial ácida.

Evento térmico	T _i (°C)	T _{max} (°C)	T _f (°C)	Pérdida de masa (%)
1	25.16	43.34	168.66	4.03
2	168.66	320.29	468.59	55.76
3	468.67	690.76	902.85	25.20

- a) El primer evento no representó un cambio importante en la masa, y pudo deberse a la presencia de partículas de agua en la muestra. Aunque el material fue liofilizado, el tiempo de exposición al medio ambiente entre el momento de la manipulación de la muestra para el pesaje, y su colocación en el equipo antes de empezar, pudieron hacer que la misma almacenara nuevamente cierta cantidad de humedad, ya que el colágeno nativo tiene características higroscópicas. El cambio en la masa también pudo deberse al rompimiento de enlaces de hidrógeno, encargados de unir las cadenas de la triple hélice de las fibras dentro de la matriz, según lo descrito por Tegza, Andreyeva, & Maistrenko (2012). La pérdida de masa fue de aproximadamente 4.03%, que representó un cambio pequeño en comparación con los otros eventos.
- b) El segundo evento mostró una pérdida de masa mayor, en donde el porcentaje pasó de un 86.35% a un 30.60%, es decir hubo una pérdida del 55.76%. Este evento pudo deberse a la formación de compuestos gaseosos durante el proceso de fusión de la muestra, gracias a la destrucción de grupos carbonilo con la consecuente liberación de CO₂ y CO, y otras moléculas pequeñas como NH₃, además de otros compuestos (Tegza, Andreyeva, & Maistrenko, 2012).
- c) El tercer evento se dió entre los 468.67°C y los 902.85°C, para una pérdida en el porcentaje másico de un 25.20%. Esto correspondió al proceso de destrucción completa de carbonos remanentes en la muestra.

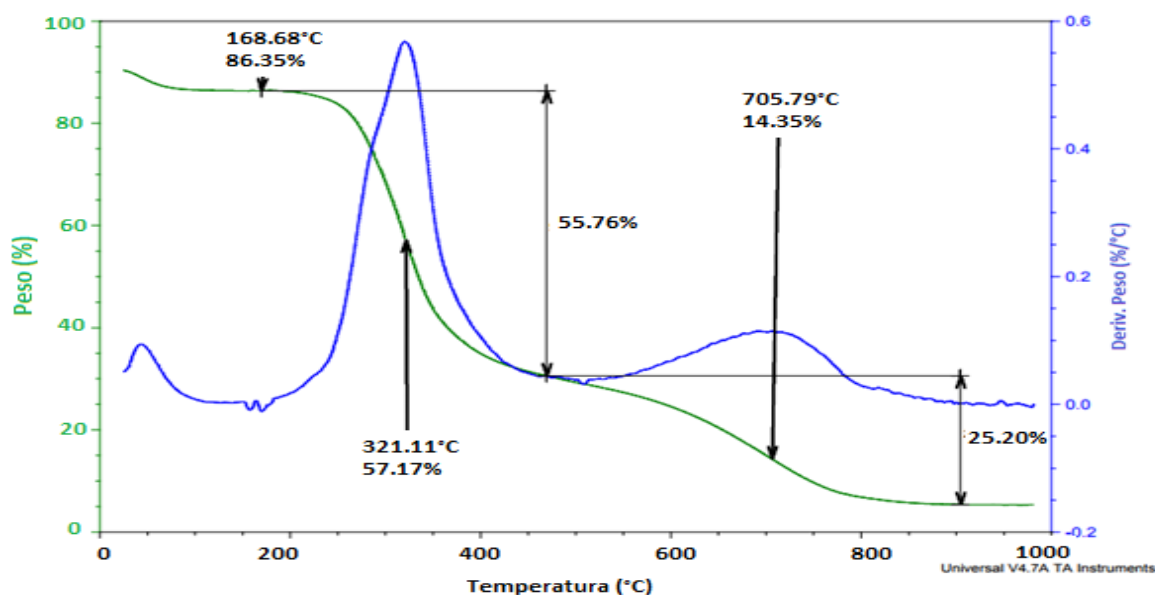


Figura 3.17. Termograma para fibras de colágeno nativo obtenido de la matriz colágena después de primer tratamiento enzimático e hidrólisis parcial ácida, con barrido de 25°C a 980°C con rapidez de 10°C/min.

3.4.4 Temperatura de desnaturalización en solución

El proceso de desnaturalización de una proteína está relacionado con la pérdida de propiedades estructurales que caracterizan al compuesto. En el caso de la temperatura de desnaturalización del colágeno en solución, establece el punto límite de temperatura después del cual se presentan cambios en la conformación estructural, debido al rompimiento de enlaces, que lleva a la pérdida de la estructura de triple hélice (Bozec & Odlyha, 2011).

La temperatura de desnaturalización se obtiene a partir de los datos de viscosidad relacionados a una temperatura específica para la muestra en estudio. A partir de estos se puede adquirir el cambio fraccional, que es una relación de las viscosidades iniciales y finales de la muestra. El punto en donde el cambio fraccional es la mitad del total se define como temperatura de desnaturalización.

En la Figura 3.18 se presenta la curva de cambio fraccional en relación con la temperatura, para diferentes disoluciones del colágeno nativo en ácido acético. Las concentraciones utilizadas fueron escogidas de tal manera que se formaran soluciones lo suficientemente viscosas para realizar las mediciones en un reómetro.

Para la determinación de la temperatura más exacta, y no solo de manera gráfica, se tomaron los datos de cambios de viscosidad fraccional por debajo y encima de 0.5 que se obtuvieron del Cuadro B.12 y se realizó una interpolación.

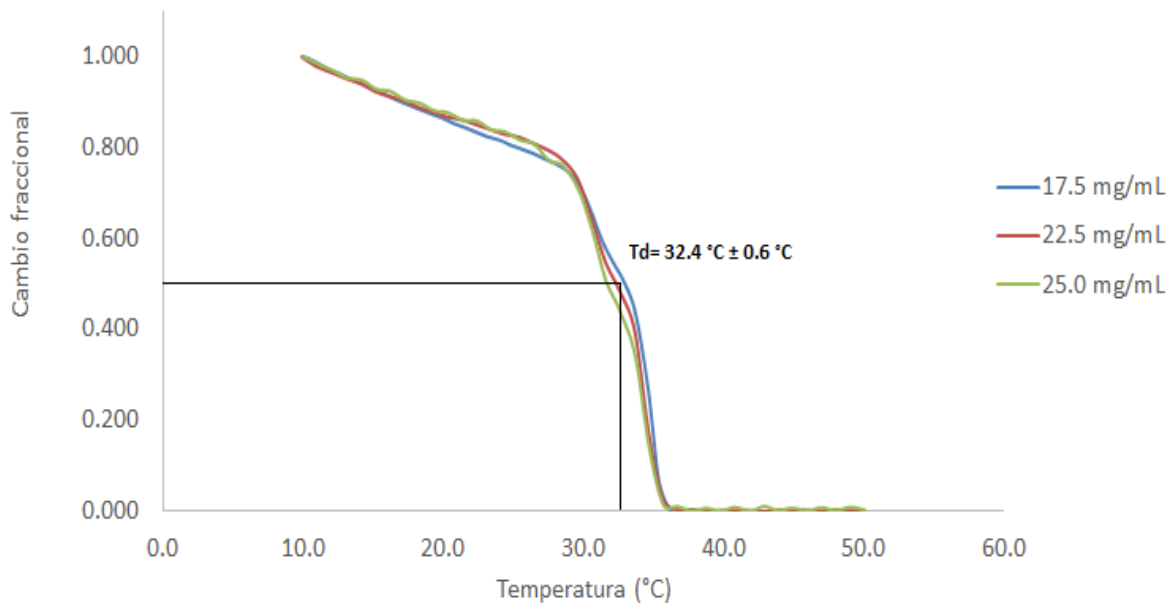


Figura 3.18 Curva de desnaturalización para fibras de colágeno nativo obtenido de la matriz colágena después de primer tratamiento enzimático e hidrólisis parcial ácida

La temperatura de desnaturalización para la muestra de colágeno de piel de tilapia nativo tratado en este caso correspondió a $32.4^{\circ}\text{C} \pm 0.6^{\circ}\text{C}$. Como se puede observar del Cuadro 1.3, esta es menor que la temperatura de desnaturalización para el colágeno porcino cuyo valor es de 37°C ; esto es correspondiente a lo esperado, ya que el colágeno terrestre tiene una mejor estabilidad debido a la presencia de mayores cantidades de hidroxiprolina, y por lo tanto un mayor valor.

En el Cuadro 1.3 también se presentaron datos de temperatura de desnaturalización para piel de tilapia de dos fuentes bibliográficas, cuyos valores difieren entre sí, demostrando que inclusive en la misma especie se puede presentar características estructurales diferentes. Aspectos como diferencias en el ambiente en el que fueron desarrollados los animales, así como factores alimenticios, y temperaturas corporales pudieron afectar los valores obtenidos.

La temperatura de desnaturalización para colágeno en solución es menor que para el caso del colágeno en base seca, esto debido a que la estructura fibrosa presenta interacciones entre sus moléculas con una energía de cristalización asociada que debe ser superada (Paul & Bailey, 2003).

3.5 Pruebas preliminares para segundo tratamiento enzimático.

Una vez obtenidas las condiciones de trabajo para el primer tratamiento, se buscaron las variables y niveles de un segundo método enzimático, que permitieran en este caso hidrolizar la *matriz colágena* en base húmeda obtenida en la primera parte, para generar péptidos de colágeno de menor tamaño. Para ello se estudiaron dos enzimas: la Papaína que fue utilizada anteriormente; y la Bromelina, enzima proteasa obtenida de la cáscara de piña cuya producción también es nacional.

Se realizaron diferentes tratamientos enzimáticos en pruebas preliminares, con el objetivo de dilucidar la enzima que permitiera obtener la mayor cantidad de hidrolizado en los enlaces de los péptidos. También se realizaron pruebas modificando las condiciones de las principales variables que se sabe afectan la hidrólisis enzimática como: pH, temperatura, concentración de la enzima en el medio, relación entre sustrato y enzima, y tiempo de digestión; cuyos resultados sirvieron para definir las condiciones del diseño experimental para determinación de grado de hidrólisis.

Los niveles escogidos para las pruebas preliminares se presentan en el Cuadro A.21; estos fueron seleccionados gracias a revisiones bibliográficas, y criterios obtenidos a partir del

análisis de los resultados del primer tratamiento enzimático. Los resultados promedio para la variable respuesta se resumen en la Figura 3.19. Estos valores se calcularon a partir del grado de hidrólisis por triplicado de cada una de las combinaciones de los tratamientos en el Cuadro B.14.

De las pruebas preliminares se observa que, para muchos de los tratamientos escogidos la Bromelina presentó menor hidrolizado en los enlaces, que para los casos donde se utilizó la Papaína; excepto en los tratamientos 1, 6, 11, 12 y 13, en donde por traslape de las desviaciones para cada uno de ellos, no se pudo asegurar cuál presentó una mejor respuesta.

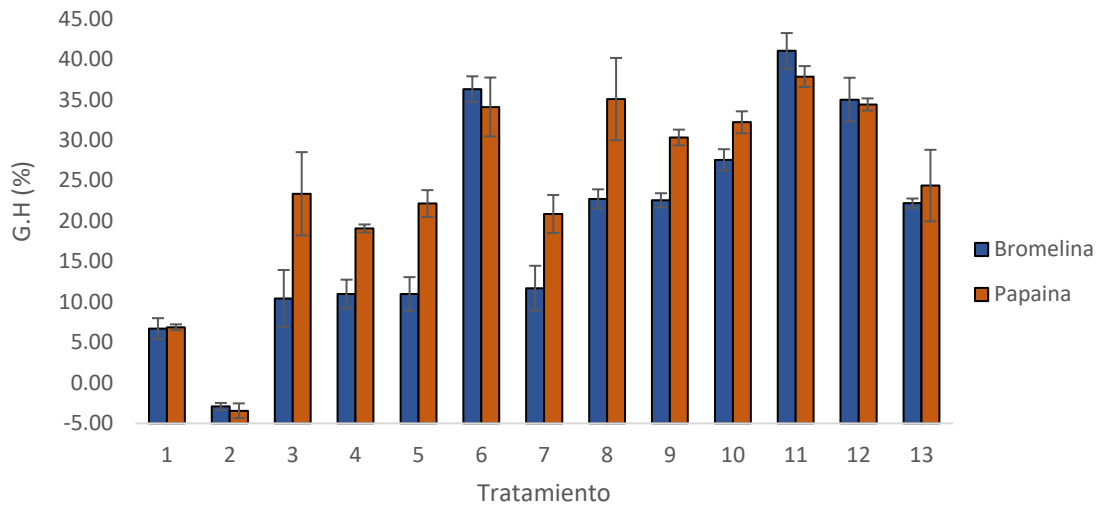


Figura 3.19. Grado de hidrólisis promedio, obtenido después de segundo tratamiento enzimático en matriz colágena de piel de tilapia, para diferentes condiciones experimentales en pruebas preliminares.

La escogencia de papaína entonces se basó también en otros dos criterios:

1. La recuperación del colágeno hidrolizado se realizó mediante precipitación con sales, después de llevar la solución hasta su punto isoeléctrico. En el caso de los hidrolizados por Papaína, la cantidad de colágeno recuperado fue mayor, aún en los tratamientos en donde el porcentaje de hidrólisis fue similar al de la Bromelina. Los valores no fueron cuantificados, solamente apreciados visualmente, ya que la

determinación de la masa del recuperado no se definió como objetivo del proyecto. Se presenta la Figura 3.20 a manera de ejemplificación.

Las recuperaciones para los hidrolizados realizados con Bromelina pudieron ser afectados por ciertas impurezas presentes en la misma, que fueron señaladas por el fabricante previamente.



Figura 3.20 Recuperación de colágeno hidrolizado de pruebas preliminares después de segundo tratamiento enzimático utilizando bromelina o papaína.

2. El costo de la Papaína fue notablemente menor al de la Bromelina, por lo que, desde un punto de vista económico, la proteasa extraída del látex de papaya presentó una ventaja adicional.

Los primeros tratamientos en condiciones de temperatura más baja (30.0°C) y tiempos de digestión más altos (45.0h) mostraron grados de hidrólisis bajos. Por ello, en los siguientes tratamientos se trabajó a temperaturas más altas ($40.0\text{-}50.0^{\circ}\text{C}$) y tiempos de digestión menores (21.5h-24.0h), logrando un aumento en el rompimiento de las moléculas. De acuerdo con los resultados obtenidos, se podría concluir preliminarmente que la temperatura presentó mayor significancia que el tiempo sobre el grado de hidrólisis.

Un menor grado de hidrólisis con temperaturas bajas es consistente con la información encontrada anteriormente en las pruebas de caracterización para temperatura de

desnaturalización en colágeno nativo, cuyo valor fue de 32.0°C y es el punto a partir del cual se inicia el desdoblamiento de la estructura helicoidal de la molécula de colágeno. Temperaturas por debajo de esta, como la trabajada en las primeras dos pruebas preliminares presentaron mayor dificultad para lograr el cambio en la estructura y la ruptura de la cadena.

De las otras variables: presentaron un mejor grado de hidrólisis las correspondientes a pH ácido; en pH básico (alrededor de 8) no se logró siquiera la solubilización de la matriz en el medio, por lo que la cuantificación de grado de hidrólisis presentó problemas y valores negativos. Las relaciones sustrato:enzima se trabajaron en una serie de combinaciones entre 3.0:1.0 g sustrato:g enzima y 9.0:1.0 g sustrato:g enzima (tomando como sustrato la cantidad de proteína remanente en la matriz, en base húmeda, después del primer tratamiento enzimático), y las concentraciones de enzima en medio se realizaron en combinaciones entre 3.00 mg/mL y 9.00 mg/L.

De acuerdo con los resultados obtenidos para los tratamientos de las pruebas preliminares, el mayor grado de hidrólisis fue de 37.85%, según se muestra en la Figura 3.19 y en el tratamiento 11.3 y 11.4 del Cuadro B.14. Buscando obtener información sobre la posibilidad de un grado de hidrólisis más alto, se escogió trabajar un diseño experimental central compuesto de superficie de respuesta, que permitiera estudiar una serie de combinaciones en puntos centrales (dentro del cubo) de las variables discutidas anteriormente con los mejores resultados, además de combinaciones en puntos axiales fuera del cubo y de las que no se tuvo información sobre el grado de hidrólisis en las pruebas preliminares. Tales niveles y variables se presentaron, de manera resumida anteriormente, en el Cuadro 2.13 de la sección de metodología experimental.

3.6 Segundo tratamiento enzimático.

En el Cuadro 3.5 se muestran los grados de hidrólisis promedio obtenidos para los tratamientos experimentales del diseño central compuesto, agrupados según sus condiciones.

Cuadro 3.5 Grados de hidrólisis promedio para tratamientos de diseño de superficie de respuestas para segundo tratamiento enzimático.

#	pH	T(°C)	t(h)	R _{s:e} (g/g)	Ce (mg/mL)	G.H promedio (%)
1	6.15	45.0	22.5	6.0:1.0	6.00	37.30 ± 3.67
2	6.15	45.0	22.5	1.0:1.0	6.00	79.60 ± 0.92
3	6.15	55.0	22.5	6.0:1.0	6.00	38.29 ± 3.38
4	6.50	50.0	21.0	3.5:1.0	8.50	35.65 ± 1.94
5	6.50	40.0	21.0	3.5:1.0	3.50	51.24 ± 5.56
6	5.80	40.0	21.0	8.5:1.0	3.50	38.47 ± 1.62
7	6.50	50.0	21.0	8.5:1.0	3.50	41.87 ± 6.15
8	6.15	45.0	22.5	6.0:1.0	11.00	32.03 ± 0.86
9	5.80	40.0	21.0	3.5:1.0	8.50	37.61 ± 4.05
10	6.15	45.0	25.5	6.0:1.0	6.00	34.86 ± 1.09
11	6.50	40.0	24.0	3.5:1.0	8.50	32.62 ± 3.22
12	5.80	50.0	24.0	8.5:1.0	3.50	32.55 ± 1.30
13	5.80	50.0	21.0	8.5:1.0	8.50	27.30 ± 2.24
14	5.45	45.0	22.5	6.0:1.0	6.00	36.81 ± 3.82
15	6.15	45.0	22.5	11.0:1.0	6.00	25.60 ± 0.52
16	6.50	40.0	24.0	8.5:1.0	3.50	31.65 ± 2.48
17	5.80	50.0	24.0	3.5:1.0	8.50	43.07 ± 5.75
18	6.15	45.0	19.5	6.0:1.0	6.00	37.64 ± 2.36
19	5.80	40.0	24.0	3.5:1.0	3.50	55.05 ± 2.11
20	6.15	45.0	22.5	6.0:1.0	1.00	71.71 ± 0.59
21	6.85	45.0	22.5	6.0:1.0	6.00	26.69 ± 3.14
22	5.80	40.0	24.0	8.5:1.0	8.50	27.09 ± 1.44
23	5.80	50.0	21.0	3.5:1.0	3.50	63.95 ± 2.02
24	6.50	50.0	24.0	3.5:1.0	3.50	62.56 ± 5.40
25	6.15	35.0	22.5	6.0:1.0	6.00	17.42 ± 0.81
26	6.50	50.0	24.0	8.5:1.0	8.50	25.83 ± 3.48
27	6.50	40.0	21.0	8.5:1.0	8.50	21.42 ± 3.70

El mayor grado de hidrólisis obtenido del diseño experimental fue de 79.60% ± 0.92%, en condiciones de pH levemente ácidas, temperaturas de 45.0°C, tiempos de digestión de 22.5 horas, relaciones entre sustrato y enzima de 1.0:1.0 (g/g) y concentraciones de enzima en buffer de 6.00 mg/mL. Sin embargo, mediante análisis estadístico, a partir de los datos obtenidos, se generó un modelo matemático mediante el cual se evaluó la posibilidad de obtener condiciones experimentales teóricas con un mayor grado de hidrólisis.

El análisis estadístico se generó con la ayuda del programa JMP® 8. Del mismo se desprendió información sobre los supuestos a cumplir, y sobre el ajuste del modelo.

El análisis de varianza del diseño central compuesto permitió determinar la significancia de las variables trabajadas, tal y como se presenta en la Figura 3.21. Las hipótesis definidas para este caso fueron las siguientes:

H_0 : No hay dependencia entre la variable y la respuesta.

H_1 : Hay dependencia entre la variable y la respuesta.

Analysis of Variance				
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	23	18349.847	797.819	73.4783
Error	72	781.768	10.858	Prob > F
C. Total	95	19131.615		<.0001*

Effect Tests				
Source	Sum of Squares	F Ratio	Prob > F	
pH	24.4689	2.2536	0.1377	
T(°C)	46.7976	4.3100	0.0415	
t(h)	20.0028	1.8422	0.1789	
Rs:e (g/g)	1109.4880	102.1826	<.0001	
Ce (mg/mL)	1264.0146	116.4144	<.0001	
pH*pH	239.3051	22.0397	<.0001	
pH*T(°C)	77.4954	7.1372	0.0093	
T(°C)*T(°C)	605.5528	55.7707	<.0001	
pH*t(h)	27.2858	2.5130	0.1173	
t(h)*t(h)	24.1676	2.2258	0.1401	
pH*Rs:e (g/g)	31.4766	2.8990	0.0930	
T(°C)*Rs:e (g/g)	73.3838	6.7586	0.0113	
t(h)*Rs:e (g/g)	52.7312	4.8565	0.0307	
Rs:e (g/g)*Rs:e (g/g)	1117.9603	102.9629	<.0001	
pH*Ce (mg/mL)	53.2355	4.9029	0.0300	
T(°C)*Ce (mg/mL)	24.4388	2.2508	0.1379	
t(h)*Ce (mg/mL)	77.3938	7.1279	0.0094	
Rs:e (g/g)*Ce (mg/mL)	314.7264	28.9860	<.0001	
Ce (mg/mL)*Ce (mg/mL)	1006.6546	92.7118	<.0001*	
pH*pH*pH	20.8468	1.9200	0.1701	
T(°C)*T(°C)*T(°C)	131.4653	12.1078	0.0009*	
Rs:e (g/g)*Rs:e (g/g)*Rs:e (g/g)	403.9095	37.1996	<.0001*	
Ce (mg/mL)*Ce (mg/mL)*Ce (mg/mL)	63.7735	5.8735	0.0179*	

Figura 3.21 ANOVA de diseño central compuesto a partir de la determinación de grado de hidrólisis después de segundo tratamiento enzimático mediante programa JMP®.

Siendo $P < 0.05$ se rechaza H_0 , por lo que existiría una dependencia entre el factor estudiado y la variable respuesta. Tal fue el caso del efecto individual de la temperatura, la relación sustrato:enzima, y la concentración de enzima en el medio. También existió una significancia del efecto cuadrático del pH, la temperatura, la relación sustrato:enzima y la concentración de enzima en el medio, significancia del efecto triple de la relación sustrato:enzima,

concentración de enzima en medio y de la temperatura; además de interacciones dobles entre las variables.

Se procedió a realizar una prueba de normalidad a los residuos de la variable respuesta. Las hipótesis planteadas para esta prueba fueron las siguientes:

H_0 : Los residuos siguen una distribución normal.

H_1 : Los residuos no siguen una distribución normal.

Los resultados se muestran en la Figura 3.22, de donde se observa un p-valor mayor a 0.05 para la prueba de Shapiro-Wilk; por lo tanto, no hubo evidencia estadística que permitiera rechazar la hipótesis nula, y se aceptó que los residuos tuvieron una distribución normal.

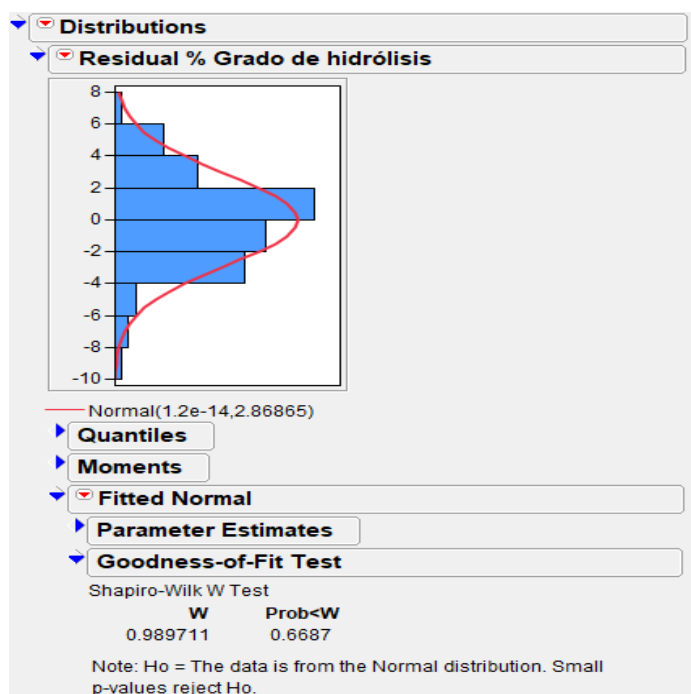


Figura 3.22. Prueba de probabilidad normal de residuos de diseño central compuesto a partir de la determinación de grado de hidrólisis después de segundo tratamiento enzimático mediante programa JMP®.

Para asegurar la igualdad de varianzas o principio de homocedasticidad se aplicó la prueba de igualdad de varianzas en el programa Minitab 16®, ya que presentó una mayor facilidad

de obtención que en el programa JMP®. Se realizaron las pruebas de Bartlett y de Levene, ambas de manera simultánea. El resultado se presenta en la Figura 3.23.

Las hipótesis definidas para la homocedasticidad fueron las siguientes:

H_0 : Los datos tienen una varianza constante.

H_1 : Los datos no tienen una varianza constante.

Los p-valores obtenidos fueron mayores a 0.05, por lo que no existió evidencia estadística que permitiera rechazar la hipótesis nula y se aceptó que los datos siguieron una varianza constante.

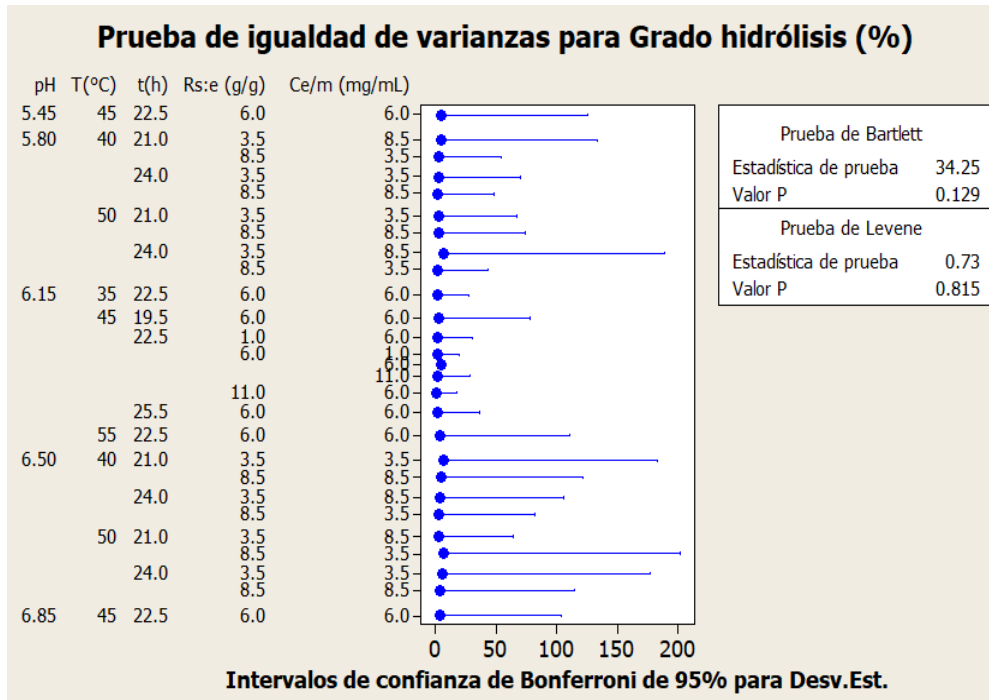


Figura 3.23 Prueba de igualdad de varianzas para diseño central compuesto a partir de la determinación de grado de hidrólisis después de segundo tratamiento enzimático mediante programa JMP®.

La independencia de los errores de la variable respuesta pudo ser corroborada a partir de lo obtenido en la Figura 3.24. Esta estuvo representada por una relación entre los residuos del porcentaje de grado de hidrólisis, y el orden de cada corrida experimental. No se observó

ningún tipo de patrón en el orden de los datos, por lo que se aceptó que no existió una correlación claramente definida, y el supuesto de independencia de los datos se cumplió.

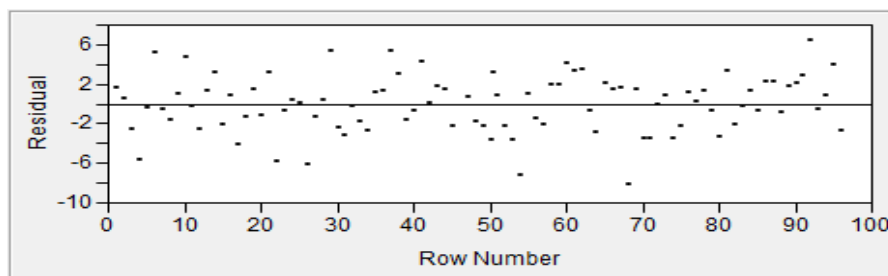


Figura 3.24 Residuos contra orden de corrida para diseño central compuesto a partir de la determinación de grado de hidrólisis después de segundo tratamiento enzimático mediante programa JMP®.

Una vez realizada la comprobación de los supuestos para el diseño central compuesto, se procedió al análisis de ajuste del modelo, que tomó en cuenta los valores de R^2 y de falta de ajuste que brindó el programa. Se debió tomar en cuenta la significancia de las variables estudiadas anteriormente, según la cual se sugirió que el modelo siguió un ajuste de tercer orden, representado por la ecuación (P. Seshu Babu, A.V.Dattatreya Rao, & G.V.S.R. Anjaneyulu, 2015):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j}^k \sum_{j=1}^k \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^k \beta_{iii} x_i^3 + \sum_{i \neq j}^k \sum_{i < j}^k \beta_{ijj} x_i x_j^2 + \sum_{i < j < z}^k \sum_{j < z}^k \sum_{z=1}^k \beta_{ijk} x_i x_j x_z + \varepsilon \quad (3.1)$$

Donde:

- Y: Variable dependiente o respuesta.
- β : Coeficiente de regresión para el modelo.
- X: variable independiente del diseño.
- ε : error en la variable respuesta.

Para la selección de un modelo adecuado para el diseño experimental se pueden utilizar diferentes técnicas. El método “paso a paso”, escogido en este caso, permitió mediante un

proceso de regresión hacia adelante o hacia atrás la adición o sustracción de términos al modelo, hasta que se obtuvieron todos aquellos que presentaron significancia. Los valores de los parámetros para el modelo descrito en la ecuación anterior se presentan en la Figura 3.25.

Response % Grado de hidrólisis	
Sorted Parameter Estimates	
Term	Estimate
Ce (mg/mL)	-2.902889
(Rs/e-6)*(Rs/e-6)	0.5702848
Rs/e	-2.719667
(Ce (mg/mL)-6)*(Ce (mg/mL)-6)	0.5411515
(T(°C)-45)*(T(°C)-45)	-0.104929
(Rs/e-6)*(Rs/e-6)*(Rs/e-6)	-0.107187
(Rs/e-6)*(Ce (mg/mL)-6)	0.4097
(pH-6.15)*(pH-6.15)	-13.46166
(T(°C)-45)*(T(°C)-45)*(T(°C)-45)	0.0076439
(pH-6.15)*(T(°C)-45)	0.7260714
(t(h)-22.5)*(Ce (mg/mL)-6)	0.3386111
(T(°C)-45)*(Rs/e-6)	-0.098917
(Ce (mg/mL)-6)*(Ce (mg/mL)-6)*(Ce (mg/mL)-6)	-0.042591
(pH-6.15)*(Ce (mg/mL)-6)	-1.203571
(t(h)-22.5)*(Rs/e-6)	-0.2795
T(°C)	0.2792778
(pH-6.15)*(Rs/e-6)	0.9254762
(pH-6.15)*(t(h)-22.5)	1.4361111
pH	-2.884921
(T(°C)-45)*(Ce (mg/mL)-6)	-0.057083
(t(h)-22.5)*(t(h)-22.5)	-0.232912
(pH-6.15)*(pH-6.15)*(pH-6.15)	-8.874312
t(h)	-0.351389

Figura 3. 25. Parámetros estimados para modelo de grado de hidrólisis de diseño central compuesto a partir de la determinación de grado de hidrólisis después de segundo tratamiento enzimático mediante programa JMP®.

El modelo obtenido presentó las siguientes características:

Falta de ajuste

Se tuvo como hipótesis para la prueba de falta de ajuste que:

H_0 : El modelo de tercer orden presenta buen ajuste entre la variable respuesta y los predictores.

H_1 : El modelo de tercer orden no presenta buen ajuste entre la variable respuesta y los predictores.

En este caso la prueba de falta de ajuste presentó un p-valor de 0.3970, tal y como se mostró en la Figura 3.26; por lo tanto, no se tuvo la suficiente evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula, lo que indicó que el modelo no tuvo falta de ajuste.

Se obtuvo también el R^2 , que ofreció una estimación de la capacidad que tuvo el modelo para la predicción de la variable respuesta. En este caso se obtuvo un valor de R^2 de 0.9591, mientras se presentó un dato de R^2 ajustado de 0.9461; la diferencia recomendada entre ambos no debe ser mayor a 0.2, lo que se cumplió en este caso.

Response % Grado de hidrólisis				
Summary of Fit				
RSquare			0.959137	
RSquare Adj			0.946084	
Root Mean Square Error			3.295132	
Mean of Response			39.12583	
Observations (or Sum Wgts)			96	
Lack Of Fit				
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Lack Of Fit	3	32.65887	10.8863	Prob > F
Pure Error	69	749.10944	10.8567	0.3970
Total Error	72	781.76831		Max RSq
				0.9608

Figura 3.26 Valor de prueba de falta de ajuste y R^2 para diseño central compuesto a partir de la determinación de grado de hidrólisis después de segundo tratamiento enzimático mediante programa JMP®.

Una vez obtenido el *modelo ajustado teórico* para el grado de hidrólisis, se procedió a escoger diferentes condiciones de las variables experimentales, para verificar mediante corridas la variable respuesta, y comparar su valor contra el predicho por el modelo.

En el Cuadro 3.6 se tienen las condiciones escogidas y grados de hidrólisis obtenidos para la confirmación del modelo. Se tomaron tratamientos buscando grados de hidrólisis por debajo del valor máximo dado por el diseño experimental de 79.60%, tal y como se observa en las primeras 4 corridas de confirmación, que se ajustan a lo predicho. También se buscó determinar si era posible obtener un mayor grado de hidrólisis al del diseño experimental, y soportado de manera práctica; para ello se probaron condiciones cuyo valor de predicción estuviera por encima del obtenido originalmente; sin embargo, el máximo grado de hidrólisis

que se ajustó a las condiciones prácticas y teóricas del modelo fue de 81.58%, no muy diferente al obtenido durante la realización del diseño. Lo anterior podría indicar que el máximo local del diseño experimental y el máximo global para la variable respuesta estuvieron muy cerca.

Hidrólisis mayores si fueron predichas por el modelo, pero no estuvieron acorde a lo obtenido de una manera práctica. Al ser señalados valores de hidrólisis más altos, se pudo estar aplicando una combinación de variables experimentales que, aunque posibles desde el punto de vista operacional, pudieron causar una destrucción de los aminoácidos, y por lo tanto generarse una cuantificación menor de la hidrólisis.

Cuadro 3.6 Grados de hidrólisis experimentales de confirmación y grados de hidrólisis predichos por modelo de superficie de respuestas.

#	pH	T(°C)	t(h)	R _{s:e} (g/g)	C _e (mg/mL)	G.H _{experimental} (%)	G.H _{predicho} (%)
1	6.85	45.0	19.50	3.0:1.0	2.20	70.03 ± 1.65	66.43 ± 8.39
2	6.50	50.0	19.50	6.0:1.0	1.50	68.84 ± 2.64	68.57 ± 6.65
3	6.50	35.0	24.00	5.8:1.0	1.00	47.30 ± 5.97	41.58 ± 7.33
4	6.85	50.0	19.50	6.0:1.0	2.20	52.08 ± 3.82	53.39 ± 7.89
5	6.15	45.0	22.50	1.0:1.0	5.70	81.58 ± 4.34	80.30 ± 3.67

Hasta este punto, se tomó entonces como mejores condiciones de trabajo para el grado de hidrólisis, las utilizadas en el último tratamiento del Cuadro 3.6. A partir de la muestra solubilizada e hidrolizada bajo este escenario, se procedió a realizar la recuperación del colágeno en su forma liofilizada, para realizar las pruebas de caracterización.

La recuperación consistió en llevar la solución hasta el punto isoeléctrico del colágeno en pH neutro, con lo que se igualaron las cargas de las moléculas, esto permitió iniciar el proceso de precipitación del colágeno hidrolizado. Se siguió además una adición de NaCl hasta obtener una concentración de 2.0 mol/L con respecto al volumen de hidrolizado, cuya función fue la de deshidratación de las moléculas para su mejor recuperación. Se dejó la solución en agitación constante durante 24.0 horas a 4°C para estabilizar la mezcla. La disolución fue centrifugada en frío a 3500 rpm para concentrar el colágeno precipitado, y el pellet fue

dializado en membranas de diálisis durante 4 días, realizando cambios constantes del agua del medio para evitar la saturación de sal, y hasta que se eliminara todo el NaCl en exceso. Una vez terminada la diálisis, la solución con el colágeno hidrolizado fue congelada a -80°C durante más de 12.0 horas y liofilizada hasta obtener un producto seco color claro con una consistencia ligera y poco densa.

Se estudió la capacidad de solubilización del producto obtenido, realizando la prueba en ácido acético 0.1 mol/L y en agua; sin embargo, la proteína tuvo poca disolución en ambas, aun encontrándose en bajas concentraciones.

El colágeno hidrolizado presenta teóricamente una solubilidad mayor a la del colágeno nativo, debido a su conformación a partir de cadenas peptídicas más cortas, por lo que una poca capacidad de disolución no se consideró una característica adecuada. Buscando mejorar las cualidades del producto obtenido, se analizaron las posibles causas que perjudicaron a la proteína hidrolizada, siendo una posibilidad la afectación de alguno de los componentes del medio de hidrólisis durante el segundo tratamiento enzimático, que fue sido tomado como variable fija en el diseño experimental realizado.

El medio consistió en un buffer de fosfato de sodio (Na_2HPO_4) en una concentración de 0.05 mol/L para mantener las condiciones de pH deseadas, junto con cisteína 0.01 mol/L y ácido etilendiaminotetraacético 0.01 mol/L. Estos últimos utilizados como activadores y estabilizantes, típicamente trabajados junto con la papaína, ya que permiten maximizar la actividad de la enzima, y evitan que otras sustancias interfieran con ella.

Se realizaron pruebas preliminares, utilizando las condiciones de las variables experimentales estudiadas anteriormente que presentaron mejores resultados, pero variando la composición del medio de hidrólisis, donde se eliminaron uno a uno los componentes de la mezcla. Por un lado, la exclusión de la cisteína no presentó ningún cambio en las propiedades del colágeno, mientras que la supresión del ácido etilendiaminotetraacético

(EDTA) mejoró notablemente la solubilidad del producto obtenido; por lo tanto, se le atribuyó a este la afectación sobre la estructura colágena.

La composición química del ácido le permite actuar como donador de electrones que típicamente forma complejos con metales pesados; sin embargo, en este caso se pudieron haber generado las condiciones necesarias que permitieron la formación de un complejo poco soluble, entre los grupos aminos protonados del colágeno hidrolizado y el compuesto.

La eliminación del ácido etilendiaminotetraacético tuvo como desventaja una reducción en el porcentaje de hidrólisis de la proteína, obteniéndose un valor cercano al 64.38%, tal y como se muestra en el Cuadro 3.7. Esto fue consistente con lo expuesto en la teoría sobre la necesidad de utilizar el compuesto junto con la papaína para maximizar su actividad enzimática.

En este punto se debió escoger entre la utilización del producto obtenido con mejores condiciones de hidrólisis, pero con menor solubilidad, o el colágeno con menos grado de hidrólisis y mayor solubilidad. Dado que el producto a un 64.38% todavía representó un buen porcentaje de hidrólisis, y que tuvo mejores propiedades físicas que el obtenido originalmente, se tomó la decisión de cambiar la composición del medio, eliminando el ácido etilendiaminotetracético.

Cuadro 3.7 Grado de hidrólisis para muestra por triplicado, según mejores condiciones de hidrólisis de diseño de superficie de respuestas, con medio de hidrólisis modificado sin EDTA.

#	pH	T (°C)	t(h)	R _{s:e} (g/g)	C _e (mg/mL)	G.H (%)	G.H promedio (%)
1	6.15	45	22.5	1.0:1.0	5.70	67.84	
2	6.15	45	22.5	1.0:1.0	5.70	60.60	64.38 ± 3.63
3	6.15	45	22.5	1.0:1.0	5.70	64.70	

Al hidrolizado obtenido gracias a la digestión enzimática con Papaína, bajo temperaturas de 45°C, pH de 6.15, relaciones sustrato:enzima de 1.0:1.0, concentraciones de enzima en medio buffer de 5.70 mg/mL y tiempos de hidrólisis de 22.5 horas, con agitación constante de aproximadamente 125 rpm, y medio de hidrólisis formado a partir de buffer Fosfato y Cisteína; se le realizó pruebas para la definición de características estructurales. Algunos resultados pudieron ser comparados con aquellos de las pruebas de caracterización del colágeno nativo con una estructura más intacta, que se obtuvo antes de la hidrólisis enzimática.

3.7 Pruebas de caracterización después de segundo tratamiento enzimático.

3.7.1 Espectro UV-Vis

Un primer parámetro de la naturaleza de un compuesto, y de la posible presencia de componentes indeseados está dado por la longitud de onda a la que absorbe la sustancia de interés. Según la teoría, el colágeno tipo I absorbe a una longitud de onda aproximada entre los 220 nm y 230 nm, y picos cercanos a los 280 nm podría indicar en este caso la presencia de aminoácidos no relacionados con esa proteína.

El colágeno liofilizado obtenido después de la hidrólisis enzimática fue sometido a un barrido de espectro UV-Vis, para determinar el punto en el que se presentó su mayor absorbancia. Para ello se disolvió la muestra en una solución de ácido acético 0.1 mol/L. También fue utilizado como referencia: colágeno de piel de ternero en una solución de ácido acético 0.1 mol/L de la marca Sigma Aldrich.

Los resultados se presentan en la Figura 3.27, de donde se puede observar efectivamente una banda de absorción en los 220 nm para ambas muestras, lo que concuerda con el patrón de espectro UV-Vis de colágeno ácido presentado en la Figura 1.17. Además, se dió la ausencia de picos importantes cercanos a los 280 nm, cuya señal está relacionada a la presencia de aminoácidos con anillos aromáticos como triptofano y fenilalanina, que se encuentran poco en la estructura de colágeno, lo que apunta a una buena remoción de proteínas no colágenas

(Vijayan et al., 2018), tanto gracias al primer tratamiento enzimático como a la efectiva precipitación de colágeno en su punto isoeléctrico.

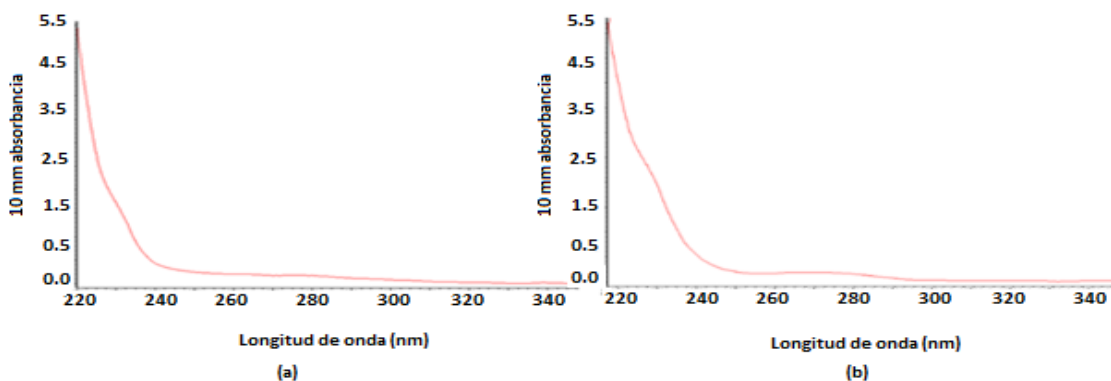


Figura 3.27 Espectro UV-Vis para muestras de (a) Colágeno de piel de ternero y (b) Colágeno hidrolizado de piel de tilapia, disueltas en ácido acético 0.1 mol/L.

3.7.2 Análisis Infrarrojo

Se observó en la Figura 3.28 la presencia de una banda de $3\ 275\ \text{cm}^{-1}$ de las amidas tipo A, en donde se dieron estiramientos de los enlaces N-H de los péptidos. Además, existieron picos atribuidos a amidas tipo B cercanos a los $2\ 960\ \text{cm}^{-1}$ y $2\ 880\ \text{cm}^{-1}$ que correspondieron a estiramientos de los enlaces entre carbono e hidrógeno de los grupos CH_2 .

Alrededor de $1\ 628\ \text{cm}^{-1}$ se tuvo la banda de mayor absorbancia, propia para las amidas tipo I, en donde se presentaron estiramientos vibracionales de los enlaces $\text{C}=\text{O}$, mientras que en $1\ 539\ \text{cm}^{-1}$ se tuvo una banda para la amida II que surgió de un doblamiento de los enlaces N-H. Las bandas características para la amida III se dieron en $1\ 238\ \text{cm}^{-1}$, $1\ 080\ \text{cm}^{-1}$, y $529\ \text{cm}^{-1}$, y representaron estiramientos en los enlaces entre C-N y N-H.

Los picos que surgieron en $1\ 451\ \text{cm}^{-1}$ y $1\ 336\ \text{cm}^{-1}$ correspondieron, al igual que en el espectro del colágeno nativo de la Figura 3.15, a la estereoquímica de los anillos de pirrolidina de la prolina e hidroxiprolina, dentro de la cadena aminoácida.

Se debe recordar que una relación igual a 1, entre la absorbancia correspondiente a la amida III y la señal de la pirrolidina en $1\ 451\ \text{cm}^{-1}$, es un primer indicativo de la integridad estructural

de la hélice de la proteína, que fue el caso del colágeno nativo. Para el colágeno hidrolizado enzimáticamente, la relación de estas bandas fue menor a 1, tal y como se indica en el Cuadro 3.8 y se puede observar de las señales del espectro de FTIR marcadas en verde de la Figura 3.28. Lo anterior fue un indicio del cambio en la estructura del colágeno tipo I, habiendo una variación o pérdida de la triple hélice; lo cual fue de esperarse en el caso de un hidrolizado de colágeno, debido a la obtención de péptidos de menor tamaño.

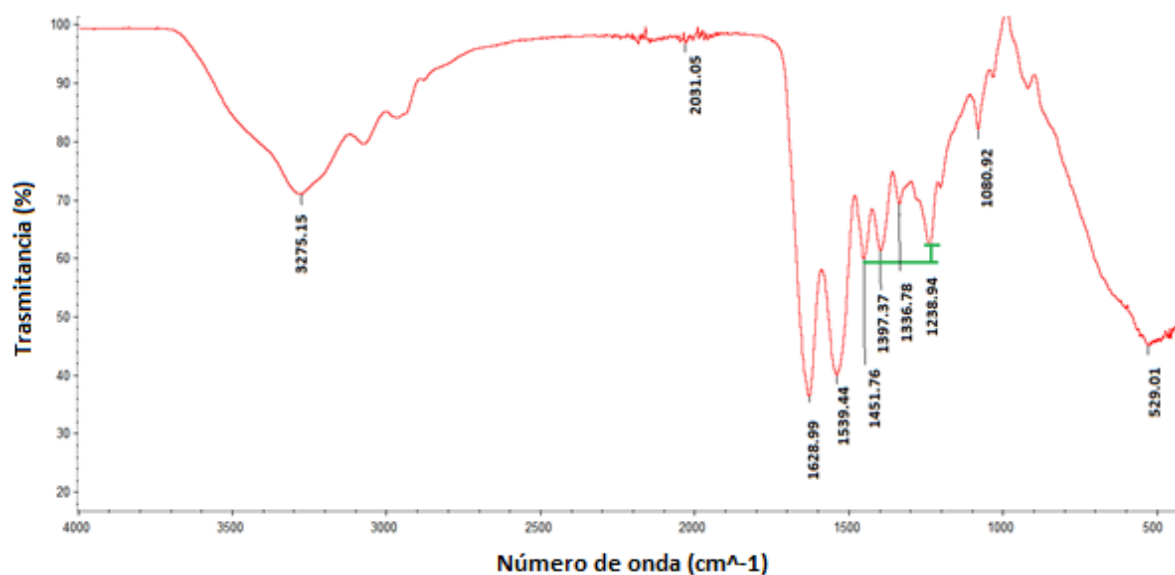


Figura 3. 28 Espectro infrarrojo para colágeno hidrolizado enzimáticamente de piel de tilapia *Oreochromis Niloticus*.

Cuadro 3.8 Absorbancias para Amida III y anillo de Pirrolidina en colágeno nativo y colágeno hidrolizado, obtenidos de FTIR.

Pico	Colágeno nativo		Colágeno hidrolizado	
	N° de onda (cm ⁻¹)	Abs	N° de onda (cm ⁻¹)	Abs
Amida III	1 234.78	0.208	1 238.94	0.201
Anillos de pirrolidina	1 441.90	0.208	1 451.76	0.229
Amida III/Pirrolidina	1.000		0.876	

Si se realizan más comparaciones entre los espectros del colágeno en su estructura original (nativa) de la Figura 3.15, y del colágeno hidrolizado obtenido después de los tratamientos enzimáticos de la Figura 3.28, se pueden observar movimientos de algunas de las bandas

características del colágeno hacia otros números de onda. Tales variaciones se presentan en el Cuadro 3.9. Se observó una disminución en el número de onda de la amida I, que generalmente “es indicativo de un reacomodo de la proteína, o la expresión de un nuevo conjunto de proteínas con características estructurales diferentes” según Vidal & Mello (2011), lo que está en concordancia con lo descrito anteriormente.

Visualmente se determinó que el colágeno hidrolizado presentó características más higroscópicas que el colágeno nativo, que lo hicieron susceptible a la atracción de humedad. Tal propiedad pudo ser explicada a través del espectro infrarrojo, al darse un leve aumento en el ancho del pico relativo a la amida I, relacionada con vibraciones de estiramiento de los enlaces C=O que forman puentes de hidrógeno con moléculas de agua, según lo expuesto por Lazarev, Grishkovsky, & Khromova (1985).

Cuadro 3.9 Números de onda de los picos de absorción en FTIR del colágeno nativo y colágeno hidrolizado enzimáticamente.

Pico	Colágeno nativo (cm ⁻¹)	Colágeno hidrolizado (cm ⁻¹)
Amida A	3 287.96	3 275.15
Amida B	2 929.79	2 960.00
Amida B	2 850.66	2 880.00
Amida I	1 630.35	1 628.99
Amida II	1 530.37	1 539.44
Amida III	1 234.78	1 238.94
Anillo de pirrolidina	1 441.90	1 451.76

3.7.3 Análisis electroforético

En la Figura 3.16 se mostró el patrón electroforético como prueba de caracterización intermedia para el colágeno nativo, después del primer tratamiento enzimático. La obtención de las fibras colágenas en su forma nativa se realizó con el objetivo de dilucidar el tipo de colágeno presente, mediante la aparición o no de ciertas bandas particulares. Como se mencionó, se atribuyeron las obtenidas en el gel SDS PAGE inicial a cadenas alfa 1 y 2, así como cadenas beta y gamma, cuyos pesos moleculares y distribución se asocian con colágeno tipo I.

La electroforesis del colágeno obtenido después del segundo tratamiento enzimático, en donde según otras pruebas de caracterización se presentó un cambio en la estructura helicoidal, contó con el objetivo de ofrecer más evidencia de que efectivamente la hidrólisis se logró; esto se vio reflejado en el movimiento de las bandas a pesos moleculares de menor tamaño, como se observa en la Figura 3.29. La desaparición de las bandas gamma, beta y Alpha 1 y 2, de pesos moleculares mayores a los 100 kDa, como se presentaban en la Figura 3.16, indicó precisamente la hidrólisis de la triple hélice de colágeno para la obtención de péptidos pequeños.

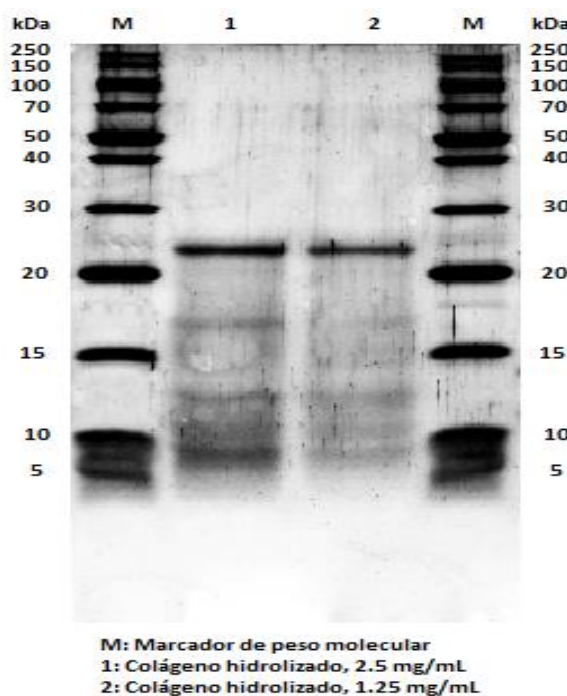


Figura 3. 29 Patrón de SDS-PAGE para colágeno hidrolizado enzimáticamente de piel de tilapia *Oreochromis Niloticus*, obtenida de un gel al 15%.

Gracias a la determinación del tamaño de péptidos, se confirmó que el producto obtenido fue lo que se conoce como “colágeno hidrolizado” y no aquello identificado como “gelatina”, en donde se habría dado solamente una hidrólisis parcial de las fibras de colágeno con pesos moleculares entre los 90 kDa y 50 kDa. En los carriles 1 y 2 se tuvo el colágeno hidrolizado enzimáticamente en dos concentraciones diferentes. Ambos mostraron que la mayor cantidad

del colágeno hidrolizado presentó péptidos con pesos moleculares cercanos a los 25 kDa, ya que fue la banda con la mayor tonalidad; sin embargo, también se obtuvieron péptidos con pesos moleculares entre los 18 kDa y los 5 kDa aproximadamente.

3.7.4 Caracterización térmica

Una vez realizada la hidrólisis enzimática del colágeno, se procedió a obtener un análisis termogravimétrico (TGA). Al igual que en el caso anterior para el colágeno nativo, se presentaron diversos eventos térmicos asociados a la estructura de la proteína. Estos valores se muestran detalladamente en el Cuadro 3.10 y en la Figura 3.30.

El primer evento estuvo relacionado con la pérdida de los compuestos más volátiles de la muestra, en este caso correspondientes a moléculas de agua que pudieron quedar atrapadas en el colágeno hidrolizado. Como se mencionó anteriormente, la hidrólisis parcial o total de una proteína genera péptidos protonados, con una consecuente exposición en muchos casos de más grupos hidrofílicos; esta característica hace que durante la manipulación de la muestra se absorba humedad del ambiente. Una mayor pérdida de agua en el TGA del colágeno hidrolizado enzimáticamente, en comparación con la del colágeno nativo en el TGA del Cuadro 3.4, pudo ser explicada entonces por una mayor cantidad de enlaces hidrolizados, que le confirieron características más higroscópicas.

El segundo evento térmico correspondió a la generación de compuestos gaseosos durante el proceso de fusión de la muestra, debido a la destrucción de grupos carboxilo residuales en los péptidos de cadena corta. Mientras que el tercer evento estuvo relacionado con la total destrucción del resto de materia orgánica de la muestra, es decir los átomos de carbono de los péptidos.

Cuadro 3.10 Temperaturas de eventos térmicos y pérdida de masa para colágeno hidrolizado enzimáticamente.

Evento térmico	T _i (°C)	T _{max} (°C)	T _f (°C)	Pérdida de masa (%)
1	20.62	34.76	108.52	6.83
2	128.81	297.32	438.04	47.61
3	504.16	618.31	767.83	27.26

Mediante el análisis termogravimétrico se demostró la hidrólisis debido al cambio en las temperaturas de cada uno de los eventos térmicos con respecto al colágeno intacto; el primero de ellos tuvo una disminución en la temperatura de 43.34 °C a 34.76 °C, el segundo de 320.29 °C a 297.32 °C y el último de 690.76 °C a 618.31 °C. Una reducción en el tamaño de los péptidos hizo que se requiriera menores energías para el rompimiento de las cadenas y enlaces inter e intramoleculares que quedaron después de la hidrólisis. En contraste, la presencia de mayor cantidad de fuerzas manteniendo unidos los aminoácidos en la estructura de colágeno nativo hicieron que se requiriera mayor temperatura para su destrucción.

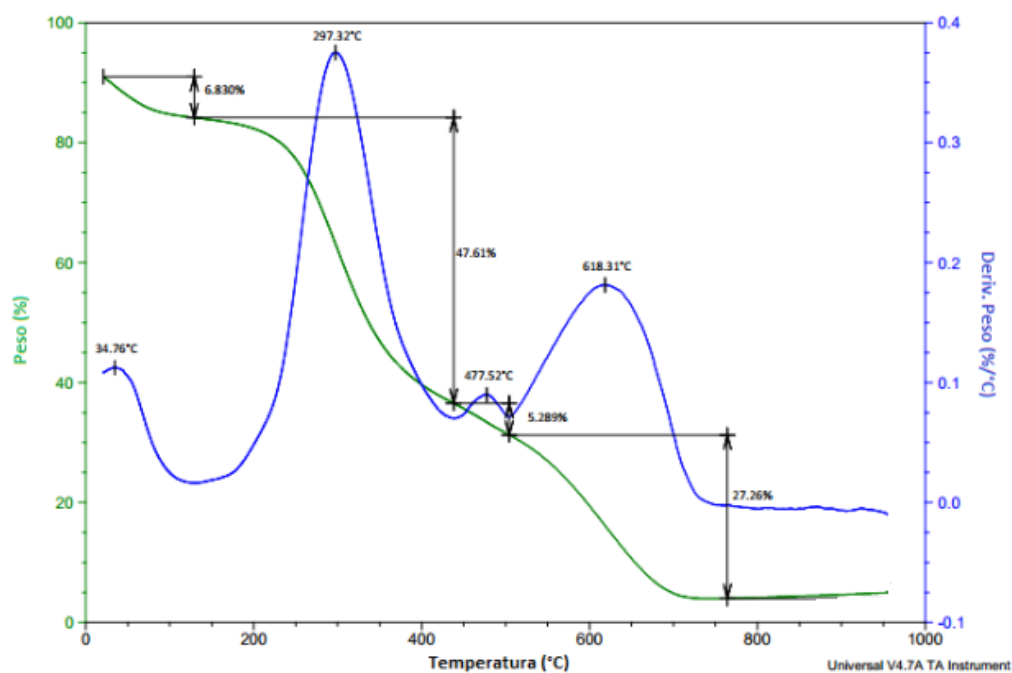


Figura 3. 30 Termograma para colágeno hidrolizado enzimáticamente de piel de tilapia, con barrido de 20°C a 1000°C, con rapidez de 10°C/min.

3.7.5 Solubilidad

Para la preparación de los puntos de la curva de solubilidad de colágeno hidrolizado, se disolvieron diferentes masas pesadas previamente del colágeno hidrolizado en volúmenes determinados de ácido, y se procedió a la agitación constante por un periodo de tres horas para asegurar su máxima solubilización. Una vez obtenidas las muestras, se filtraron a través

de filtros de $0,45\ \mu\text{m}$, para eliminar la posible interferencia de proteína sobresaturada en la medición de la absorbancia. Se procedió a realizar una dilución de estas, para obtener valores de absorbancia entre 0.000 y 0.900 que se ajustaran a la Ley de Beer.

Por otro lado, se generó una curva estándar a partir de una solución de colágeno tipo I de piel de ternero en ácido acético 0.1 mol/L, presentada en la Figura B.3, de la cual se determinó la ecuación de mejor ajuste

Con las absorbancias medidas de cada una de las soluciones de colágeno hidrolizado preparadas y su substitución en la ecuación de mejor ajuste obtenida, se procedió a calcular las *concentraciones experimentales* de las muestras de colágeno hidrolizado. Cada punto se graficó contra los valores teóricos de concentración, obtenidos a partir de la relación entre masa pesada y ácido acético utilizada.

En el caso en donde las muestras no alcanzaron la saturación, se esperaba que el comportamiento brindado fuera lineal, ya que la concentración experimental y teórica debían ser prácticamente las mismas, lo cual se demostró en la primera etapa de la Figura 3.31. Para el momento en que se obtuvo la máxima solubilidad de la muestra se observó un decaimiento de la curva con un comportamiento más constante, debido a que, a partir de ese punto, el exceso de proteína sobresaturada no se vería detectado en la absorbancia, al ser eliminado por la filtración.

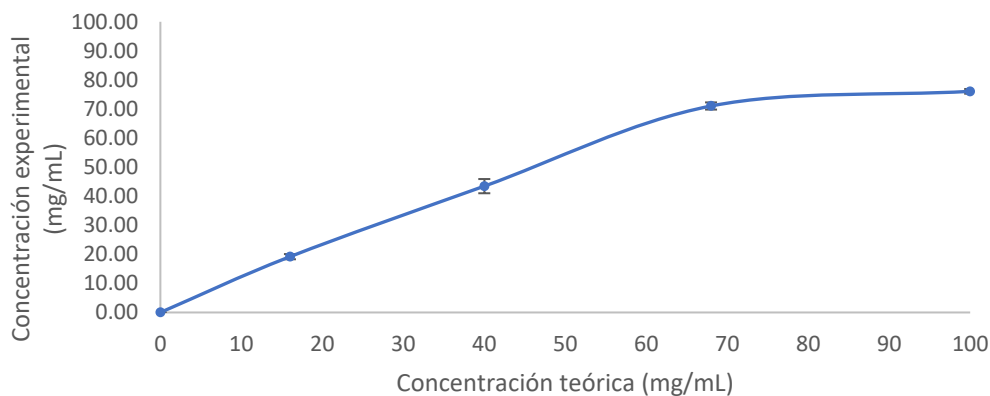


Figura 3. 31 Curva de solubilidad de colágeno hidrolizado enzimáticamente en ácido acético 0.1 mol/L.

El punto en donde se logró la máxima solubilidad del colágeno se presentó alrededor de los 71.02 mg/mL \pm 1.20 mg/mL.

3.7.6 Temperatura de desnaturalización en solución

El colágeno nativo presenta teóricamente entre sus características una viscosidad alta, asociada con la presencia de integridad estructural de la triple hélice; es por lo que variaciones drásticas en esa propiedad están relacionadas con cambios en la conformación de la estructura original.

En el caso del colágeno fibrilar obtenido después del primer tratamiento enzimático, la viscosidad en ácido acético fue favorable para medir progresivamente su cambio a medida que se realizaron variaciones en la temperatura, que pudieron romper la unión entre las cadenas polipéptidas. Por lo tanto, fue posible cuantificar la temperatura de desnaturalización.

Para el colágeno hidrolizado enzimáticamente, la viscosidad asociada fue dramáticamente menor. Al encontrarse ésta por debajo del límite detectable del equipo, necesario para realizar la curva en relación con cambios de temperatura, no fue posible medir las perturbaciones. Expuesto de otra manera, debido a que la estructura helicoidal durante la hidrólisis se perdió totalmente, y se obtuvieron péptidos sueltos de poco tamaño, por lo cuál ya se sobrepasó el punto de desnaturalización.

No haber contado con las condiciones necesarias para realizar la prueba, debido a las particularidades del colágeno, en este caso fue una comprobación más, sumada a la evidencia obtenida de las otras pruebas de caracterización, de que el producto se ajustó a lo esperado teóricamente en cuanto a sus características.

3.7.7 Protocolo para obtención de colágeno hidrolizado mediante procesos enzimáticos

Mediante los resultados obtenidos para ambos procesos enzimáticos, y a la información derivada de la caracterización del producto, se estableció un protocolo para la obtención de colágeno hidrolizado a partir de desechos de piel de tilapia con las mejores condiciones encontradas.

a) Obtención de matriz colágena pretratada

1. Cortar la piel de tilapia en trozos pequeños, de aproximadamente 3 cm x 3 cm. Por cada gramo de materia prima a tratar, pesar 16.6 mg de papaína, y utilizar 5.52 mL de buffer cisteína-verseno preparado a pH 6.5 (ver Anexo 2).
2. Colocar el matraz junto con el medio buffer en baño maría, adecuado a 37°C, durante 10 minutos para permitir la estabilización de la temperatura.
3. Agregar la materia prima pesada junto con la enzima, y realizar la digestión durante 35 minutos a 37°C, a una agitación constante de 125 rpm, cuidando el pH del medio.
4. Una vez terminado el proceso de digestión colocar el matraz en baño a una temperatura aproximada de 80°C durante dos minutos, para desactivar la enzima.
5. Enfriar la mezcla en baño de hielo, y centrifugar a 2900 rpm durante 10 minutos para recuperar la matriz que no fue digerida por la enzima.
6. Realizar lavados con agua de ósmosis a la matriz recuperada para remover cualquier excedente de papaína que pueda quedar adherido a las muestras. Repetir tres veces.
7. Secar la matriz obtenida rápidamente para eliminar el exceso de humedad de su superficie.
8. Almacenar hasta su uso en congelamiento a -80°C.

b) Hidrólisis de colágeno

1. Por cada gramo de la matriz colágena a hidrolizar, recuperada del primer tratamiento enzimático, pesar 296 mg de papaína, y utilizar 51.93 mL de medio Fosfato cisteína preparado a pH 6.15 (ver Anexo 11).
2. Colocar el matraz junto con el medio buffer en baño térmico, adecuado a 45°C, durante 10 minutos para permitir la estabilización de la temperatura.
3. Agregar la matriz colágena pesada junto con la enzima, y realizar la digestión durante 22.5 horas a 45°C, a una agitación constante de 125 rpm.
4. Una vez terminado el proceso de digestión colocar el matraz en baño a temperatura aproximada de 80°C durante dos minutos, para desactivar la enzima.
5. Enfriar la solución en baño de hielo. Decantar y filtrar para remover cualquier material que no se haya digerido.
6. Llevar el pH de la solución hasta el punto isoeléctrico (entre pH 7.00 y 7.15) en agitación en frío.
7. Agregar NaCl lentamente, logrando una concentración 2.0 mol/L. Luego agitar suavemente por 12 horas en frío (overnight).
8. Centrifugar la mezcla a 3500 rpm durante 45 minutos en frío, recuperar el pellet formado, y colocar en membrana de diálisis.
9. Dializar contra agua de ósmosis, realizando cambio de esta periódicamente hasta eliminar el exceso de sal presente.
10. Recuperar solución dializada de la membrana, congelar a -80°C, y liofilizar hasta eliminar todo exceso de humedad.

Capítulo 4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

a) La piel de tilapia *Oreochromis Niloticus* trabajada, cuenta en su estructura con una presencia significativa de colágeno, con un valor promedio de $18.96\% \pm 0.26\%$; sin embargo, también está conformada por componentes no colágenos indeseados como grasa, proteínas no colágenas, minerales y humedad, según lo determinado en el análisis proximal.

b) Mediante la determinación de las variables y las condiciones que permitieron la remoción de componentes no colágenos de la piel de tilapia, con poca pérdida de proteína colágena, mediante un primer tratamiento enzimático con papaína, se logró la extracción del 98.75% de colágeno en una matriz más limpia. Estas condiciones correspondieron a un pH de 6.50, tiempos de digestión de 35.0 minutos, temperaturas de 37.0°C, relaciones entre sustrato: enzima de 20.0:1.0 (g/g) y concentraciones de enzima en medio de 3.00 mg/mL; con una agitación de 125 rpm y medio de digestión de buffer fosfato, cisteína y ácido etilendiaminotetraacético.

c) El primer tratamiento enzimático realizó cambios en la composición química y física de la piel de tilapia, de manera comparable a los realizados en tratamientos básicos en cuanto a la composición de proteína total, ya que redujo la presencia de proteínas no colágenas y varió la dureza de la matriz obtenida con respecto a la de la piel de tilapia original. Los cambios los generó en tiempos más cortos y en condiciones de pH más cercanos a la neutralidad; sin embargo, son necesarias temperaturas levemente mayores de 37.0°C, con respecto a la temperatura ambiente utilizada en otros tratamientos.

d) Por medio de la presencia de bandas de absorción en el análisis infrarrojo, y pesos moleculares específicos de las cadenas polipeptidas en el análisis electroforético del colágeno nativo, se identificaron características que explicaron su estabilidad estructural, y fue posible su tipificación como colágeno tipo I.

e) Mediante el análisis termogravimétrico y el establecimiento de la temperatura de desnaturalización, se determinaron las condiciones de estabilidad térmica del colágeno tipo I nativo de piel de tilapia. Se presentaron diversos eventos que generaron descomposición en la estructura en base seca a temperaturas de: 43.34°C, 320.29°C y 690.76°C, mientras que existió una desnaturalización de la proteína en solución de 32.5°C.

f) A través de la determinación experimental de las variables y las condiciones de un segundo tratamiento enzimático con papaína, sobre la matriz colágena derivada del primer tratamiento, se logró la obtención de péptidos de colágeno, con un grado de hidrólisis de 64.38% ± 3.63 %. Las condiciones utilizadas correspondieron a un pH de 6.15, temperatura de 45.0°C, relaciones de sustrato:enzima de 1.0:1.0 (g/g), concentración de enzima de 5.70 mg/mL, y tiempos de digestión de 22.5 horas, con agitación de 125 rpm y un medio de hidrólisis formado a partir de buffer fosfato y cisteína.

g) Para el producto obtenido después del segundo tratamiento enzimático, se dió el movimiento relativo de los picos de absorción del análisis infrarrojo, correspondientes a la amida I, a una menor longitud de onda; hubo un aumento en el ancho de esa misma banda, y cambios en la absorbancia del pico alrededor de 1441 cm⁻¹ correspondiente a la presencia de anillos de pirrolidina; cambios que se presentaron con respecto al del colágeno nativo y que indican la hidrólisis del colágeno. Además, se dió la obtención de bandas con pesos moleculares por debajo de los 25 kDa en el análisis electroforético, con lo cual también se confirmó la presencia de “colágeno hidrolizado” y no de “gelatina”.

h) El colágeno hidrolizado enzimáticamente es térmicamente menos estable que el colágeno nativo, ya que presenta disminución en las temperaturas de descomposición de su estructura.

i) Se estableció un protocolo para la obtención de colágeno hidrolizado a partir de desechos de la industria acuícola, específicamente piel de tilapia *Oreochromis Niloticus*; mediante dos tratamientos enzimáticos. La primera digestión promovió la remoción de componentes no

colágenos sin afectar considerablemente el colágeno, mientras que la segunda digestión enzimática permitió la hidrólisis de la proteína.

4.2 Recomendaciones

a) Determinar cuantitativamente de manera más exacta la pureza del colágeno hidrolizado, por comparación contra un estándar por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) o cromatografía líquida rápida en proteínas (FPLC).

b) Estudiar el efecto de la variación de Ácido Etilendiaminotetraacético en el medio de hidrólisis, sobre el tamaño de los péptidos de colágeno obtenidos. Esto para determinar si existe un límite de concentración, que permita obtener un grado de hidrólisis mayor al logrado bajo las condiciones experimentales, definidas según el modelo de predicción y las pruebas de confirmación.

c) Buscar técnicas alternativas a la diálisis para la eliminación de las sales en exceso después del proceso de precipitación del colágeno hidrolizado, que permitan reducir: los tiempos de operación, el gasto de agua, y la pérdida de los hidrolizados con pesos moleculares menores al límite de retención de la membrana de diálisis.

d) Se recomienda estudiar la solubilidad del colágeno hidrolizado a diferentes condiciones de pH y temperatura, para determinar cómo afectan esas variables la formación de disoluciones de colágeno.

Capítulo 5. Bibliografía

- AAFCO. (2014). Crude Fat Methods – Considerations. AAFCO Lab Methods & Services Committee Crude Fat Best Practices Working Group. Recuperado de http://www.aafco.org/Portals/0/SiteContent/Laboratory/Fat_Best_Practices_Working_Group/Crude_Fat_Methods_Considerations.pdf
- AES Application focus. (s. f.). Gel electrophoresis of proteins. Recuperado de http://www.aesociety.org/areas/pdfs/Garfin_1DE_WebArticle9-07.pdf
- Alfaro, A. D. T., Fonseca, G. G., Balbinot, E., Machado, A., & Prentice, C. (2013). Physical and chemical properties of wami tilapia skin gelatin. *Food Science and Technology*, 33(3), 592-595. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612013005000069>
- Alves, A. L., Marques, A. L. P., Martins, E., Silva, T. H., & Reis, R. L. (2017). Cosmetic Potential of Marine Fish Skin Collagen. *Cosmetics*, 4(4), 39. <https://doi.org/10.3390/cosmetics4040039>
- Amid, A. (2015). *Recombinant Enzymes - From Basic Science to Commercialization*. Springer.
- Amri, E., & Mamboya, F. (2012). Papain, a plant enzyme of biological importance: A review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 8(2), 99-104. <https://doi.org/10.3844/ajbbbsp.2012.99.104>
- Antranikian, G. (2005). *Marine Biotechnology I*. Springer Science & Business Media.

AOAC International. (2009). AOAC official Method 990.26 Hydroxyproline in Meat and Meat Products: Colorimetric method.

Balart Gimeno, R., López Martínez, J., & García Sanoguera, D. (2004). *Técnicas experimentales de análisis térmico de polímeros*. Valencia, ES: Editorial de la Universidad Politécnica de Valencia. Recuperado de <http://site.ebrary.com/lib/sibdilibrosp/docDetail.action?docID=10047860>

Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins, *1767*, 1073-1101. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2007.06.004>

Bekhit, A. E.-D. A. (2017). *Advances in Meat Processing Technology*. CRC Press.

Beltrán, E. D. (2006). *Aprovechamiento de los productos pesqueros*. UABC.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). The Michaelis-Menten Model Accounts for the Kinetic Properties of Many Enzymes. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22430/>

Bozec, L., & Odlyha, M. (2011). Thermal Denaturation Studies of Collagen by Microthermal Analysis and Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal*, *101*(1), 228-236. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.04.033>

Cabrera, N. R. (2007). *Fundamentos de química analítica básica. Análisis cuantitativo*. Universidad de Caldas.

- Chacón, E., & Santamaría, J. (2007). Agrocadena de la Tilapia. Ministerio de Agricultura y ganadería. Recuperado de <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/a00081.pdf>
- Chang, R. (2000). *Physical Chemistry for the Chemical and Biological Sciences*. University Science Books.
- Davidson, R. ., & Cooper, D. . (1968). Intermolecular relationship between neutral-salt soluble and acid-soluble collagen, *217*, 168-169. <https://doi.org/10.1038/217168a0>
- Devlin, T. M. (2004). *Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas*. Reverte.
- Downard, K. (2007). *Mass Spectrometry of Protein Interactions*. John Wiley & Sons.
- Ebnesajjad, S. (2013). *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics: Properties, Processing and Applications*. William Andrew.
- Experimentos de Química Orgánica*. (s. f.). ELIZCOM S.A.S.
- FAO. (2016). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016: Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos*. (p. 224). Roma. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-i5555s.pdf>
- Friess, W. (1997). Collagen – biomaterial for drug delivery. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, *45*(2), 113-136. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(98\)00017-4](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(98)00017-4)

Gaharwar, A. K., Sant, S., Hancock, M. J., & Hacking, S. A. (s. f.). 14.1.1 Collagen. En *Nanomaterials in Tissue Engineering - Fabrication and Applications*. Woodhead Publishing. Recuperado de <http://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00C56MT2/nanomaterials-in-tissue/collagen>

Gaona, J. C. S. (2011). *Estandarización de un proceso de extracción de colágeno a partir de los residuos de fileteado de tilapia (*Oreochromis sp*) y cachama (*Piaractus brachyomus*)*. Universidad Nacional de Colombia, Colombia. Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/4880/1/jenifercarolinaserranogaona.2011.pdf>

General Principles of Catalysis. (2014, octubre 28). Recuperado 6 de mayo de 2017, de https://chem.libretexts.org/LibreTexts/University_of_California_Davis/UCD_Chem_107B%3A_Physical_Chemistry_for_Life_Scientists/Chapters/3%3A_Enzyme_Kinetics/3.1%3A_General_Principles_of_Catalysis

Gorgieva, S., & Kokol, V. (2011). Collagen- vs. Gelatine-Based Biomaterials and Their Biocompatibility: Review and Perspectives. *Biomaterials Applications for Nanomedicine*. <https://doi.org/10.5772/24118>

Grumezescu, A. M. (s. f.). 7.4.1 Fibrillar Collagen Family. En *Nanobiomaterials in Soft Tissue Engineering - Applications of Nanobiomaterials*. Elsevier. Recuperado de <http://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt010W2FC8/nanobiomaterials-in-soft/fibrillar-collagen-family>

- Hay, E. D. (2012). *Cell Biology of Extracellular Matrix*. Springer Science & Business Media.
- Hilbig, C. C., Fockink, D. H., Maluf, M. L. F., Boscolo, W. R., & Feiden, A. (2013). Resistência do couro de tilápia e composição centesimal da pele nas operações de ribeira e curtimento. *Scientia Agraria Paranaensis*, 12(4), 258-266.
- Hofman, K., Hall, B., Cleaver, H., & Marshall, S. (2011). High-throughput quantification of hydroxiprolin for determination of collagen. *Elsevier*, 417, 289-291. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.06.019>
- Jamilah, B., Tan, K. W., Umi Hartina, M. R., & Azizah, A. (2011). Gelatins from three cultured freshwater fish skins obtained by liming process. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1256-1260. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.11.023>
- Junqueira, L. C., Bignolas, G., Mourão, P. A., & Bonetti, S. S. (1980). Quantitation of collagen - proteoglycan interaction in tissue sections. *Connective Tissue Research*, 7(2), 91-96.
- Kim, S.-K. (2011). *Marine Cosmeceuticals: Trends and Prospects*. CRC Press.
- Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000). Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1), 43-81. <https://doi.org/10.1080/10408690091189266>

- K.S Silvipriya, K. Krishna Kumar, A.R Bhat, B. Dinesh Kumar, Anish John, & Panayappan Iakshmanan. (2015). Collagen: Animal sources and biomedical application. *Journal of applied pharmaceutical Science*, 5, 123-127.
<https://doi.org/10.7324/JAPS.2015.50322>
- Kumeresa, R., Sujithra, S., Kiruthiga, N., & JPrabhu, M. (2013). Isolation and determination of type I collagen from Tilapia (*Oreochromis niloticus* waste). *International Journal of Engineering and Technology*, 5(3), 2181-2815.
- Lazarev, Y. A., Grishkovsky, B. A., & Khromova, T. B. (1985). Amide I band of IR spectrum and structure of collagen and related polypeptides. *Biopolymers*, 24(8), 1449-1478.
<https://doi.org/10.1002/bip.360240804>
- Lodish, H. (2005). *Biología celular y molecular*. Ed. Médica Panamericana.
- López Fandiño, R. (2014). *Las proteínas de los alimentos*. España: Editorial CSIC Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Recuperado de <http://site.ebrary.com/lib/sibdilibrosp/docDetail.action?docID=10995312>
- Miksík, I. (2009). Collagen: HPLC and capillary electromigration. En *Encyclopedia of chromatography* (Tercera edición). Taylor & Francis.
- Minitab 18. (2017). Todos los estadísticos para Crear diseño de superficie de respuesta (central compuesto). Recuperado de

surface/create-response-surface-design/create-central-composite-design/examine-the-design/all-statistics/

- Mora, M. V. Z. (2007). *Diseño de biomaterial a partir de colágeno de pieles de Tilapia (Oreochromis s.p) y de quitosano de camarón (Heterocarpus vicarius) como soporte para aplicaciones en Ingeniería de Tejidos*. Universidad Nacional.
- Muralidharan, N., Jeya Shakila, R., Sukumar, D., & Jeyasekaran, G. (2013). Skin, bone and muscle collagen extraction from the trash fish, leather jacket (*Odonus niger*) and their characterization. *Journal of Food Science and Technology*, 50(6), 1106-1113. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0440-y>
- Nagai, T., & Suzuki, N. (1999). Isolation of collagen from fish waste material-skin, bone and fins. *Food Chemistry*, 277-281.
- Nagai, T., Suzuki, N., & Nagashima, T. (2008). Collagen from common minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*) unesu. *Food Chemistry*, 111(2), 296-301. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.087>
- Nielsen, P. M., Petersen, D., & Dambmann, C. (2006). Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. *Journal of Food Science*, 66(5), 642-646. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb04614.x>
- Nielsen, S. (2014). *Food Analysis*. Springer Science & Business Media.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (s. f.). El Pescado Fresco: Su Calidad y Cambios de su Calidad. FAO Documento Técnico de pesca 348. Recuperado 21 de mayo de 2016, de <http://www.fao.org/docrep/v7180s/v7180s05.htm#4>. composicion quimica

Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura. (s.f). Visión general del sector acuícola nacional. Costa Rica. Recuperado de http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_costarica/es#tcN70070

Owusu-Apenten, R. (2004). *Introduction to Food Chemistry*. CRC Press.

P. Seshu Babu, A.V.Dattatreya Rao, & G.V.S.R. Anjaneyulu. (2015). Cubic response surface designs using bibd in four dimensions. *Applied Mathematics and Sciences: An International Journal (MathSJ)*, 2, 17-25.

Pacheco, D. (2004). *Bioquímica médica*. DO NOT USE.

Pasupuleti, V. K., & Demain, A. L. (2010). *Protein Hydrolysates in Biotechnology*. Springer Science & Business Media.

Paul, R. G., & Bailey, A. J. (2003). Chemical stabilisation of collagen as a biomimetic. *TheScientificWorldJournal*, 3, 138-155. <https://doi.org/10.1100/tsw.2003.13>

- Pelegrine, D. H. G., & Gasparetto, C. A. (2005). Whey proteins solubility as function of temperature and pH. *LWT - Food Science and Technology*, 38(1), 77-80. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.03.013>
- Pratt, C. W., & Kathleen, C. (2012). *Bioquímica*. Editorial El Manual Moderno.
- Pubchem. (2004). trans-4-Hydroxy-L-proline | C₅H₉NO₃ - PubChem. Recuperado 8 de marzo de 2017, de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/L-Hydroxyproline>
- Rabotyagova, O. S., Cebe, P., & Kaplan, D. L. (2008). Collagen Structural Hierarchy and Susceptibility to Degradation by Ultraviolet Radiation. [https://doi.org/Rabotyagova, O. S., Cebe, P., & Kaplan, D. L. \(2008\). Collagen structural hierarchy and susceptibility to degradation by ultraviolet radiation. Materials Science and Engineering: C, 28\(8\), 1420–1429. doi:10.1016/j.msec.2008.03.012](https://doi.org/Rabotyagova,O.S.,Cebe,P.,&Kaplan,D.L.(2008).Collagenstructuralhierarchyandsusceptibilitytodegradationbyultravioletradiation.MaterialsScienceandEngineering:C,28(8),1420-1429.doi:10.1016/j.msec.2008.03.012)
- Ramírez Guerra HE, R. S. J. (2013). Propiedades biológicas de péptidos derivados del colágeno de organismos marinos. *Revista de Ciencias biológicas y de la salud*, XV(3), 34-45.
- Schmid, R. D., Hammelehle, R., & Schmidt-Dannert, C. (2016). *Biotechnology: An Illustrated Primer*. John Wiley & Sons.
- Self, R. (2005). 1.6.1 Introduction. En *Extraction of Organic Analytes from Foods - A Manual of Methods*. Royal Society of Chemistry. Recuperado de

<http://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt007MEIW1/extraction-organic-analytes/proximate-analysis-introduction>

Shanmugam, V., Ramasamy, P., Subhadrappa, N., & Sudharsan, S. (2012). Extraction, structural and physical characterization of type I collagen from the outer skin of *Sepiella inermis* (Orbigny, 1848). *African Journal of Biotechnology*, *11*(78). <https://doi.org/10.5897/AJB12.444>

Shoulders, M. D., & Raines, R. T. (2009). COLLAGEN STRUCTURE AND STABILITY. *Annual review of biochemistry*, *78*, 929-958. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833>

Silva Júnior, Z. S., Botta, S. B., Ana, P. A., França, C. M., Fernandes, K. P. S., Mesquita-Ferrari, R. A., ... Bussadori, S. K. (2015). Effect of papain-based gel on type I collagen--spectroscopy applied for microstructural analysis. *Scientific Reports*, *5*, 11448. <https://doi.org/10.1038/srep11448>

Song, J. J. (2010). *An in vitro investigation of the spatial control involved in collagen mineralization*. University of Toronto, Toronto. Recuperado de <https://tspace.library.utoronto.ca/handle/1807/32133>

Spellman, D., McEvoy, E., O'Cuinn, G., & FitzGerald, R. J. (2003). Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat

methods for quantification of degree of hydrolysis. *International Dairy Journal*, 13(6), 447-453. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00053-0](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00053-0)

Tegza, M., Andreyeva, O., & Maistrenko, L. (2012). THERMAL ANALYSIS OF COLLAGEN PREPARATIONS. *Chemical Technology*, 59(1), 40-45. <https://doi.org/10.5755/j01.ct.59.1.1528>

Thomas, S., Rouxel, D., & Ponnamma, D. (s. f.). 5.2 Introduction to IR Spectroscopy. En *Spectroscopy of Polymer Nanocomposites*. Elsevier. Recuperado de <http://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt010V3YY6/spectroscopy-polymer/introduction-ir-spectroscopy>

Tucker, G. A., & Woods, L. F. J. (1995). *Enzymes in Food Processing*. Springer Science & Business Media.

Universidad de Maine. (2014). Cysteine Proteases. Recuperado 3 de mayo de 2017, de <http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Peptidase10.html>

Vijayan, D. K., Pr, S., Cs, T., Kk, A., S, M., Cn, R., & R, A. (2018). Extraction and characterization of acid soluble collagen (ASC) from airbladder of striped cat fish (*Pangasius hypophthalmus*). *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 6(4), 310-318.

Vincent Everts, Jean-Marie Delaisse, Wolf Korper, & Wouter Beertsen. (1998). Cysteine proteinases and matrix metalloproteinases play distinct roles in the subosteoclastic

resorption zone. *Journal of bone and mineral research*, 13(9), 1420-1430.

<https://doi.org/10.1359/jbmr.1998.13.9.1420>

Voet, D., & Voet, J. G. (2006). *Bioquímica*. Ed. Médica Panamericana.

Walsh, G. (2002). *Proteins: Biochemistry and Biotechnology*. John Wiley & Sons.

Whitehurst, R. J., & Oort, M. V. (2009). *Enzymes in Food Technology*. John Wiley & Sons.

Wierbicki, E. (1954). Meat Assay, Hydroxyproline as an Index of Connective Tissue in Muscle - *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (ACS Publications).

Recuperado 18 de diciembre de 2018, de

<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf60037a006?journalCode=jafcau>

World Bank. (2013). *Fish to 2030. Prospects for fisheries and aquaculture*. (No. 83177-

GLB). Washington DC: World bank. Recuperado de

<http://www.fao.org/docrep/019/i3640e/i3640e.pdf>

Worthington Biochemical corporation. (s. f.). Papain: Neural Cell

Isolation/Immunochemistry. Recuperado de [http://www.worthington-](http://www.worthington-biochem.com/pap/PAP.pdf)

[biochem.com/pap/PAP.pdf](http://www.worthington-biochem.com/pap/PAP.pdf)

Yan, M., Li, B., Zhao, X., Ren, G., Zhuang, Y., Hou, H., ... Fan, Y. (2008). Characterization of acid-soluble collagen from the skin of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*).

Food Chemistry, 107(4), 1581-1586.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.027>

Yang, H., & Shu, Z. (2014). The extraction of collagen protein from pigskin. *Journal of Chemical and pharmaceutical research*, 6(2), 683-687.

Zeng, S., Zhang, C., Lin, H., Yang, P., Hong, P., & Jiang, Z. (2009). Isolation and characterisation of acid-solubilised collagen from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Food Chemistry*. Recuperado de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301638827>

Apéndices

A. Datos experimentales

Cuadro A.1. Mediciones de cambios de masa en piel de tilapia, para determinación de contenido mineral en pruebas de análisis proximal.

Medición	1	2
Crisol (g)	29.3869	29.6155
Muestra inicial (g)	4.0469	4.0349
Crisol y muestra inicial (g)	33.4338	33.6504
Crisol y muestra húmeda (g)	29.4089	29.6296
Crisol y muestra húmeda (g)	29.3992	29.6286
Crisol y muestra húmeda (g)	29.3953	29.6283
Crisol y muestra seca (g)	29.3951	29.6283

Cuadro A.2 Mediciones de cambios de masa en piel de tilapia, para determinación de contenido de humedad en pruebas de análisis proximal.

Medición	1	2
Crisol (g)	34.3900	32.4591
Muestra inicial (g)	4.0648	4.0879
Crisol y muestra inicial (g)	38.4548	36.5470
Crisol y muestra húmeda (g)	35.9967	34.1795
Crisol y muestra húmeda (g)	35.9412	34.0934
Crisol y muestra húmeda (g)	35.9083	33.9796
Crisol y muestra seca (g)	35.9081	33.9793

Cuadro A.3 Mediciones de cambios de masa en piel de tilapia, para determinación de contenido de humedad en pruebas de análisis proximal.

Medición	1	2
Crisol (g)	32.6924	34.1551
Muestra inicial (g)	7.3741	7.3292
Crisol y muestra inicial	40.0665	41.5543
Crisol y muestra húmeda (g)	36.2652	38.1428
Crisol y muestra húmeda (g)	35.5619	37.0314
Crisol y muestra seca (g)	35.5412	37.0134

Cuadro A.4 Mediciones de cambio de masas de extracto graso en piel de tilapia, para determinación de contenido de grasa en pruebas de análisis proximal.

Medición	1	2
Balón vacío (g)	105.5663	107.0723
Muestra inicial húmeda antes de extracción (g)	7.3741	7.3292
Muestra inicial seca para extracción (g)	2.5634	2.5356
Masa de dedal (g)	4.7101	4.8693
Balón y Extracto húmedo (g)	105.7069	107.2406
Balón y Extracto húmedo(g)	105.6791	107.2142
Balón y Extracto húmedo (g)	105.6869	107.2019
Balón y Extracto seco (g)	105.6769	107.1806

Cuadro A.5 Preparación de soluciones madre, para curvas estándar de hidroxiprolina, para determinación de contenido de colágeno en pruebas de caracterización inicial de piel de tilapia.

Número (#)	Hidroxiprolina (g)	Volumen de aforo (mL)
1	0.0150	50.00
2	0.0151	50.00
3	0.0150	50.00
4	0.0150	50.00

Cuadro A.6 Alícuotas para preparación de puntos de curva estándar de hidroxiprolina, a partir de solución madre de 300 ug/mL, aforadas hasta 10 mL, para cuantificación de hidroxiprolina en pruebas de caracterización iniciales y pruebas preliminares de primer tratamiento enzimático.

Curva	Volumen de alícuota de solución madre (mL)			
	0 µg/mL	15 µg/mL	45 µg/mL	90 µg/mL
1	0.00	0.50	1.50	3.00
2	0.00	0.50	1.49	2.98
3	0.00	0.50	1.50	3.00
4	0.00	0.50	1.50	3.00

Cuadro A.7 Absorbancias medidas a 558 nm para puntos de curva estándar, utilizados en cuantificación de hidroxiprolina para determinación de mejores condiciones de hidrólisis ácida, y para pruebas preliminares de primer tratamiento enzimático.

h (µg/mL)	Abs			
	1	2	3	4
0.0	0.044	0.041	0.040	0.041
15.0	0.087	0.085	0.087	0.089
45.0	0.144	0.141	0.137	0.147
90.0	0.215	0.217	0.226	0.228

Cuadro A.8. Condiciones de hidrólisis en H₂SO₄, y absorbancias medidas a 558 nm a hidrolizados de piel de tilapia para determinación de hidroxiprolina, en pruebas de caracterización inicial.

t (h)	Concentración (mol/L)	T(°C)	Curva	Abs				m _h (g)	Volumen H ₂ SO ₄ (mL)
				1	2	3	Promedio		
6.0	1.0	80.0	1	0.052	0.054	0.052	0.053	5.0600	30.00
			2	0.054	0.053	0.050	0.052	5.0383	30.00
			3	0.057	0.059	0.056	0.057	5.0640	30.00
16.0	1.0	80.0	1	0.093	0.089	0.094	0.092	5.0250	30.00
			2	0.090	0.089	0.088	0.089	5.0234	30.00
			3	0.094	0.093	0.097	0.095	5.0130	30.00
24.0	1.0	80.0	1	0.102	0.101	0.098	0.100	5.1981	30.00
			2	0.110	0.106	0.110	0.109	5.1930	30.00
			3	0.109	0.105	0.106	0.107	5.1940	30.00
6.0	3.5	80.0	1	0.129	0.128	0.130	0.129	5.0306	30.00
			2	0.131	0.132	0.134	0.132	5.0380	30.00
			3	0.134	0.138	0.137	0.136	5.0350	30.00
16.0	3.5	80.0	1	0.183	0.180	0.181	0.181	5.0120	30.00
			2	0.188	0.192	0.191	0.190	5.0100	30.00
			3	0.177	0.176	0.178	0.177	5.0110	30.00
24.0	3.5	80.0	1	0.237	0.239	0.237	0.238	5.1734	30.00
			2	0.244	0.242	0.246	0.244	5.1690	30.00
			3	0.240	0.242	0.240	0.241	5.1715	30.00
26.0	3.5	80.0	1	0.198	0.195	0.194	0.196	5.0204	30.00
			2	0.200	0.204	0.202	0.202	5.0601	30.00
			3	0.197	0.199	0.200	0.199	5.0520	30.00
29.0	3.5	80.0	1	0.178	0.179	0.182	0.180	5.0880	30.00
			2	0.185	0.183	0.179	0.182	5.1004	30.00
			3	0.178	0.174	0.176	0.176	5.2000	30.00
16.0	5.0	80.0	1	0.167	0.166	0.170	0.168	5.0090	30.00
			2	0.175	0.176	0.179	0.177	5.0150	30.00
			3	0.160	0.158	0.163	0.160	5.0087	30.00
24.0	5.0	80.0	1	0.184	0.183	0.188	0.185	5.0992	30.00
			2	0.176	0.175	0.171	0.174	5.0404	30.00
			3	0.178	0.177	0.174	0.176	5.0600	30.00
26.0	5.0	80.0	1	0.170	0.169	0.173	0.171	5.1290	30.00
			2	0.165	0.167	0.163	0.165	5.0181	30.00
			3	0.167	0.169	0.170	0.169	5.0150	30.00

Cuadro A.9. Condiciones de variables experimentales y masas en pruebas preliminares de primer tratamiento enzimático.

#	pH	t(h)	T (°C)	R _{S:E} (g/g)	C _e (mg/ml)	Piel de tilapia antes de digestión (g)			Papaína (g)			Medio de digestión (mL)		
						1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	5.20	2.0	40.0	20.0:1.0	3.000	6.5377	6.5286	6.5214	0.1076	0.1075	0.1079	35.87	35.83	35.98
2	8.00	2.0	40.0	20.0:1.0	3.000	6.5034	6.5028	6.503	0.1076	0.1077	0.1077	35.87	35.90	35.90
3	6.00	2.0	40.0	20.0:1.0	3.000	6.5221	6.5215	6.5234	0.1076	0.1079	0.1077	35.87	35.98	35.90
4	8.00	1.0	40.0	20.0:1.0	3.000	6.5037	6.5018	6.5065	0.1076	0.1076	0.1077	35.87	35.87	35.89
5	6.00	1.0	40.0	20.0:1.0	3.000	6.5028	6.5010	6.5025	0.1076	0.1075	0.1076	35.87	35.83	35.87
6	6.50	1.0	50.0	20.0:1.0	3.000	6.5043	6.5035	6.5017	0.1076	0.1076	0.1076	35.87	35.88	35.87
7	6.50	1.0	50.0	25.0:1.0	3.000	3.5016	3.5020	3.5038	0.0466	0.0464	0.0464	15.53	15.46	15.46
8	6.50	1.0	50.0	27.0:1.0	3.000	9.0652	9.0641	9.0638	0.1111	0.1112	0.1111	37.03	37.07	37.04
9	6.50	1.0	50.0	30.0:1.0	3.000	9.0653	9.0610	9.0622	0.1000	0.1003	0.1001	33.33	33.43	33.37
10	6.50	1.0	50.0	33.0:1.0	3.000	9.0650	9.0676	9.0653	0.0909	0.0910	0.0910	30.30	30.33	30.33
11	6.50	1.0	50.0	36.0:1.0	3.000	9.0650	9.0612	9.0647	0.0833	0.0834	0.0833	27.78	27.80	27.77

Cuadro A.10 Absorbancias medidas a 558nm para cuantificación de hidroxiprolina en matrices colágenas recuperadas después de primer tratamiento enzimático, para pruebas preliminares.

Número (#)	Repetición en microplaca	Abs		
		1	2	3
1	1	0.109	0.110	0.106
	2	0.106	0.113	0.105
	3	0.108	0.111	0.105
2	1	0.140	0.134	0.131
	2	0.139	0.133	0.130
	3	0.139	0.135	0.130
3	1	0.120	0.118	0.115
	2	0.120	0.118	0.114
	3	0.119	0.117	0.115
4	1	0.173	0.184	0.180
	2	0.172	0.185	0.181
	3	0.173	0.186	0.180
5	1	0.280	0.273	0.268
	2	0.281	0.275	0.267
	3	0.282	0.272	0.267
6	1	0.097	0.097	0.096
	2	0.097	0.099	0.096
	3	0.096	0.098	0.103
7	1	0.127	0.125	0.125
	2	0.128	0.125	0.126
	3	0.127	0.124	0.125
8	1	0.147	0.149	0.140
	2	0.146	0.148	0.140
	3	0.146	0.149	0.140
9	1	0.169	0.175	0.169
	2	0.168	0.173	0.170
	3	0.168	0.175	0.172
10	1	0.151	0.136	0.142
	2	0.152	0.135	0.143
	3	0.150	0.136	0.144
11	1	0.092	0.089	0.088
	2	0.092	0.090	0.086
	3	0.091	0.089	0.088

Cuadro A.11. Combinación de variables experimentales utilizadas para diseño factorial fraccionado del primer tratamiento enzimático.

Número (#)	pH	T(°C)	R _{s:e} (g/g)	Ce (mg/ml)	t(min)
1	6.00	37.0	20.0:1.0	3.000	60.0
2	6.00	50.0	25.0:1.0	3.000	60.0
3	6.00	37.0	25.0:1.0	3.000	35.0
4	6.00	37.0	25.0:1.0	5.000	60.0
5	6.50	50.0	20.0:1.0	5.000	35.0
6	6.50	50.0	20.0:1.0	3.000	60.0
7	6.50	37.0	20.0:1.0	5.000	60.0
8	6.50	50.0	25.0:1.0	5.000	60.0
9	6.00	37.0	20.0:1.0	5.000	35.0
10	6.50	37.0	25.0:1.0	5.000	35.0
11	6.50	37.0	20.0:1.0	3.000	35.0
12	6.00	50.0	20.0:1.0	3.000	35.0
13	6.00	50.0	25.0:1.0	5.000	35.0
14	6.50	50.0	25.0:1.0	3.000	35.0
15	6.50	37.0	25.0:1.0	3.000	60.0
16	6.00	50.0	20.0:1.0	5.000	60.0

Cuadro A.12 Preparación de solución madre de hidroxiprolina para curvas estándar, para cuantificación de hidroxiprolina en matrices recuperadas después de primera digestión enzimática en diseño factorial fraccionado.

Número (#)	Hidroxiprolina (g)	Volumen de aforo (mL)
1	0.0149	50.00
2	0.0150	50.00
3	0.0151	50.00
4	0.0150	50.00

Cuadro A.13. Alícuotas para preparación de puntos de curva estándar de hidroxiprolina, a partir de solución madre de 300 ug/mL, aforadas hasta 10 mL, para cuantificación de hidroxiprolina en corridas de diseño factorial de primer tratamiento enzimático.

Número (#)	Volumen de alícuota de solución madre (mL)			
	0 (ug/mL)	15 (ug/mL)	45 (ug/mL)	90 (ug/mL)
1	0.00	0.50	1.51	3.02
2	0.00	0.50	1.50	3.00
3	0.00	0.50	1.49	2.98
4	0.00	0.50	1.50	3.00

Cuadro A.14. Absorbancias medidas a 558 nm para puntos de curva estándar, utilizados en cuantificación de hidroxiprolina y contenido de colágeno, en matrices recuperadas después de primer tratamiento enzimático de diseño factorial fraccionado.

h (µg/mL)	Abs			
	1	2	3	4
0.0	0.048	0.046	0.048	0.049
15.0	0.076	0.077	0.072	0.076
45.0	0.115	0.120	0.112	0.128
90.0	0.178	0.175	0.173	0.180

Cuadro A.15 Masa de muestras iniciales, masa de enzima y volumen de medio utilizado durante la digestión, masa total recuperada después de digestión y masa utilizada para cuantificación de hidroxiprolina para diseño factorial de primer tratamiento enzimático.

#	Masa piel de tilapia (g)			Papaína (g)			Medio (mL)			Masa después de digestión (g)			Masa para cuantificación de hidroxiprolina (g)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	15.0000	15.0001	15.0003	0.2483	0.2483	0.2483	82.75	82.75	82.75	12.0402	12.7474	13.6947	4.0002	4.0002	4.0007
2	15.0001	15.0001	15.0000	0.1986	0.1986	0.1986	66.20	66.20	66.20	4.0009	4.0050	4.0017	4.0009	2.4198	1.5731
3	15.0003	15.0002	15.0002	0.1986	0.1986	0.1986	66.20	66.20	66.20	12.2693	13.1253	14.0820	4.0001	4.0002	4.0000
4	15.0000	15.0001	15.0001	0.1986	0.1986	0.1986	39.72	39.72	39.72	12.8987	13.2894	12.4808	4.0009	4.0004	4.0006
5	15.0001	15.0003	15.0001	0.2483	0.2483	0.2483	49.65	49.65	49.65	7.7829	8.1410	8.9415	4.0000	4.0006	4.0001
6	15.0001	15.0001	15.0001	0.2483	0.2483	0.2483	82.75	82.75	82.75	4.1698	4.3070	3.8926	4.0001	4.0001	3.8926
7	15.0001	15.0001	15.0002	0.2483	0.2483	0.2483	49.65	49.65	49.65	12.3663	12.2622	12.5363	4.0007	4.0005	4.0006
8	15.0000	15.3000	15.0001	0.1986	0.1986	0.1986	39.72	39.72	39.72	5.7291	6.1739	5.4616	4.0001	4.0007	4.0002
9	15.0002	15.0001	15.0000	0.2483	0.2483	0.2483	49.65	49.65	49.65	12.8502	13.5500	13.0277	4.0000	4.0003	4.0002
10	15.0000	15.0003	15.0001	0.1986	0.1986	0.1986	39.72	39.72	39.72	12.9027	12.6314	12.8468	4.0001	4.0002	4.0003
11	15.0001	15.0001	15.0004	0.2483	0.2483	0.2483	82.75	82.75	82.75	13.2633	12.4312	13.3445	4.0002	4.0006	4.0001
12	15.0001	15.0000	15.0003	0.2483	0.2483	0.2483	82.75	82.75	82.75	7.7052	7.8100	8.0468	4.0006	4.0006	4.0007
13	15.0002	15.0001	15.0002	0.1986	0.1986	0.1986	39.72	39.72	39.72	5.1317	5.3272	6.0045	4.0002	4.0007	4.0003
14	15.0001	15.0000	15.0000	0.1986	0.1986	0.1986	66.20	66.20	66.20	7.4792	7.4964	7.9839	4.0003	4.0009	4.0004
15	15.0001	15.0002	15.0000	0.1986	0.1986	0.1986	66.20	66.20	66.20	12.0999	12.5558	11.9465	4.0006	4.0008	4.0004
16	15.0001	15.0002	15.0003	0.2483	0.2483	0.2483	49.65	49.65	49.65	4.3471	4.3407	4.6030	2.9850	4.0005	2.3015

Cuadro A.16. Absorbancias medidas a 558nm para cuantificación de hidroxiprolina en matrices colágenas recuperadas después de primer tratamiento enzimático, según diseño factorial fraccionado.

#	Repetición en placa	Abs			#	Repetición en placa	Abs		
		1	2	3			1	2	3
1	1	0.173	0.147	0.163	9	1	0.171	0.158	0.168
	2	0.173	0.146	0.163		2	0.168	0.156	0.169
	3	0.170	0.143	0.162		3	0.169	0.154	0.164
2	1	0.160	0.126	0.097	10	1	0.141	0.158	0.156
	2	0.158	0.127	0.097		2	0.143	0.156	0.156
	3	0.163	0.125	0.096		3	0.142	0.158	0.153
3	1	0.173	0.158	0.163	11	1	0.172	0.175	0.171
	2	0.172	0.157	0.162		2	0.174	0.176	0.170
	3	0.173	0.155	0.160		3	0.170	0.173	0.171
4	1	0.150	0.138	0.141	12	1	0.166	0.161	0.166
	2	0.148	0.137	0.140		2	0.166	0.160	0.165
	3	0.151	0.137	0.141		3	0.164	0.163	0.163
5	1	0.159	0.164	0.164	13	1	0.172	0.158	0.165
	2	0.157	0.168	0.165		2	0.173	0.159	0.167
	3	0.160	0.167	0.163		3	0.171	0.157	0.168
6	1	0.16	0.165	0.165	14	1	0.170	0.169	0.168
	2	0.162	0.166	0.163		2	0.172	0.169	0.169
	3	0.163	0.165	0.164		3	0.173	0.165	0.171
7	1	0.178	0.167	0.174	15	1	0.174	0.174	0.179
	2	0.181	0.167	0.175		2	0.172	0.175	0.177
	3	0.179	0.165	0.175		3	0.173	0.174	0.177
8	1	0.155	0.165	0.175	16	1	0.138	0.171	0.134
	2	0.154	0.164	0.173		2	0.139	0.172	0.129
	3	0.154	0.161	0.172		3	0.139	0.173	0.133

Cuadro A.17 Preparación de disoluciones de colágeno nativo en ácido acético 0.1 mol/L para determinación de temperatura de desnaturalización.

Número (#)	Masa muestra (g)	Ácido acético (mL)	Concentración (mg/mL)
1	0.0263	1.50	17.5
2	0.0339	1.51	22.5
3	0.0422	1.69	25.0

Cuadro A.18 Temperatura y viscosidad dinámica de soluciones de colágeno nativo en ácido acético 0.1 mol/L para determinación de temperatura de desnaturalización.

1		2		3	
T(°C)	μ (Pa*s)	T(°C)	μ (Pa*s)	T(°C)	μ (Pa*s)
10.0	1.000	10.0	2.830	10.0	6.490
10.8	0.990	11.0	2.770	11.0	6.390
11.7	0.974	12.1	2.730	12.1	6.290
12.5	0.964	13.2	2.690	13.2	6.180
13.3	0.952	14.2	2.660	14.2	6.150
14.1	0.941	15.2	2.610	15.2	6.020
15.0	0.930	16.2	2.580	16.2	5.990
15.8	0.918	17.3	2.550	17.3	5.860
16.6	0.906	18.3	2.510	18.3	5.820
17.4	0.896	19.3	2.480	19.3	5.710
18.2	0.886	20.3	2.450	20.3	5.680
19.1	0.875	21.4	2.430	21.4	5.570
19.9	0.866	22.4	2.400	22.4	5.560
20.7	0.854	23.4	2.370	23.4	5.430
21.5	0.845	24.4	2.340	24.4	5.400
22.3	0.835	25.5	2.320	25.5	5.280
23.1	0.825	26.5	2.280	26.5	5.220
24.0	0.817	27.5	2.240	27.5	4.990
24.8	0.806	28.5	2.180	28.5	4.910
25.6	0.797	29.6	2.060	29.6	4.580
26.4	0.788	30.6	1.810	30.6	3.990
27.2	0.776	31.6	1.530	31.6	3.240
28.0	0.765	32.6	1.350	32.6	2.800
28.9	0.748	33.7	1.090	33.7	2.140
29.7	0.718	34.7	0.440	34.7	0.799
30.5	0.664	35.7	0.022	35.7	-0.016
31.3	0.598	36.7	-0.040	36.7	-0.042
32.1	0.549	37.8	-0.040	37.8	-0.106
32.9	0.505	38.8	-0.053	38.8	-0.066

(Cont) **Cuadro A.18.** Temperatura y viscosidad dinámica de soluciones de colágeno nativo en ácido acético 0.1 mol/L para determinación de temperatura de desnaturalización.

1		2		3	
T(°C)	μ (Pa*s)	T(°C)	μ (Pa*s)	T(°C)	μ (Pa*s)
33.7	0.438	39.8	-0.047	39.8	-0.112
34.6	0.274	40.8	-0.045	40.8	-0.051
35.4	0.065	41.9	-0.049	41.9	-0.110
36.2	0.003	42.9	-0.054	42.9	-0.038
37.0	-0.006	43.9	-0.044	43.9	-0.103
37.8	-0.007	44.9	-0.040	44.9	-0.063
38.6	-0.006	46.0	-0.046	46.0	-0.105
39.5	-0.003	47.0	-0.052	47.0	-0.057
40.3	-0.003	48.0	-0.042	48.0	-0.100
41.1	-0.004	49.1	-0.045	49.1	-0.051
41.9	-0.004	50.1	-0.050	50.1	-0.095
42.7	-0.003	-	-	-	-
43.5	-0.003	-	-	-	-
44.4	-0.003	-	-	-	-
45.2	-0.003	-	-	-	-
46.0	-0.003	-	-	-	-
46.8	-0.002	-	-	-	-
47.6	-0.001	-	-	-	-
48.4	0.001	-	-	-	-
49.3	0.000	-	-	-	-
50.1	0.001	-	-	-	-

Cuadro A.19 Parámetros de solución estándar de glicina utilizados para la determinación de grado de hidrólisis de colágeno después de segundo tratamiento enzimático

Parámetro	Valor
Estándar de glicina (mg/mL)	0.50
Peso molecular glicina (g/mol)	75.07
Estándar de Glicina (Eq/L)	6.66

Cuadro A.20 Absorbancias medidas a 340 nm de solución blanco y solución estándar de glicina por duplicado, utilizadas para la determinación del grado de hidrólisis de colágeno después de segundo tratamiento enzimático.

Disolución	1			2			Abs _{promedio}
	Abs ₁	Abs ₂	Abs ₃	Abs ₁	Abs ₂	Abs ₃	
Blanco	0.232	0.231	0.231	0.235	0.229	0.232	0.232
Estándar de Glicina (0.50 mg/mL)	0.288	0.286	0.289	0.295	0.296	0.298	0.292

Cuadro A.21 Masa de muestras de matriz colágena pretratada, masa de enzima, volumen de medio utilizado, y condiciones de hidrólisis para pruebas preliminares de segundo tratamiento enzimático.

Número (#)	Enzima	RS:E (g/g)	C e (mg/mL)	pH	T(°C)	t(h)	Masa de muestra (g)	Volumen de medio (mL)	Enzima (g)	
1	1.1	Bromelina	3.0:1.0	9.00	5.80	30.0	45.0	1.0020	11.11	0.0989
	1.2	Bromelina	3.0:1.0	9.00	5.80	30.0	45.0	1.0019	11.13	0.0989
	1.3	Papaína	3.0:1.0	9.00	5.80	30.0	45.0	1.0008	11.12	0.0987
	1.4	Papaína	3.0:1.0	9.00	5.80	30.0	45.0	1.0006	11.12	0.0987
2	2.1	Bromelina	3.0:1.0	9.00	8.00	30.0	45.0	1.0022	11.14	0.0989
	2.2	Bromelina	3.0:1.0	9.00	8.00	30.0	45.0	1.0012	11.14	0.0988
	2.3	Papaína	3.0:1.0	9.00	8.00	30.0	45.0	1.0062	11.02	0.0993
	2.4	Papaína	3.0:1.0	9.00	8.00	30.0	45.0	1.0096	11.06	0.0996
3	3.1	Bromelina	9.0:1.0	3.00	6.50	40.0	21.5	1.0008	11.12	0.0334
	3.2	Bromelina	9.0:1.0	3.00	6.50	40.0	21.5	0.4999	5.55	0.0167
	3.3	Papaína	9.0:1.0	3.00	6.50	40.0	21.5	1.0014	11.13	0.0334
	3.4	Papaína	9.0:1.0	3.00	6.50	40.0	21.5	0.4980	5.53	0.0166
4	4.1	Bromelina	3.0:1.0	9.00	6.50	40.0	24.0	1.0015	11.13	0.1002
	4.2	Bromelina	3.0:1.0	9.00	6.50	40.0	24.0	0.4982	5.54	0.0498
	4.3	Papaína	3.0:1.0	9.00	6.50	40.0	24.0	1.0024	11.14	0.1002
	4.4	Papaína	3.0:1.0	9.00	6.50	40.0	24.0	0.4975	5.53	0.0498
5	5.1	Bromelina	3.0:1.0	9.00	6.50	40.0	21.5	1.0011	11.12	0.1001
	5.2	Bromelina	3.0:1.0	9.00	6.50	40.0	21.5	0.4990	5.54	0.0499
	5.3	Papaína	3.0:1.0	9.00	6.50	40.0	21.5	1.0018	11.13	0.1002
	5.4	Papaína	3.0:1.0	9.00	6.50	40.0	21.5	0.4989	5.54	0.0499
6	6.1	Bromelina	3.0:1.0	9.00	5.80	40.0	21.5	1.0018	11.13	0.1002
	6.2	Bromelina	3.0:1.0	9.00	5.80	40.0	21.5	1.0015	11.13	0.1002
	6.3	Papaína	3.0:1.0	9.00	5.80	40.0	21.5	1.0019	11.13	0.1002
	6.4	Papaína	3.0:1.0	9.00	5.80	40.0	21.5	0.4983	5.54	0.0498

(Cont) Cuadro A.21 Masa de muestras de matriz colágena pretratada, masa de enzima, volumen de medio utilizado, y condiciones de hidrólisis para pruebas preliminares de segundo tratamiento enzimático.

Número (#)	Enzima	R _{S:E} (g/g)	Ce (mg/mL)	pH	T(°C)	t(h)	Masa de muestra (g)	Volumen de medio (mL)	Enzima (g)	
7	7.1	Bromelina	9.0:1.0	3.00	6.50	40.0	24.0	1.0012	11.12	0.0334
	7.2	Bromelina	9.0:1.0	3.00	6.50	40.0	24.0	0.4978	5.53	0.0166
	7.3	Papaína	9.0:1.0	3.00	6.50	40.0	24.0	1.0006	11.12	0.0334
	7.4	Papaína	9.0:1.0	3.00	6.50	40.0	24.0	0.4991	5.55	0.0166
8	8.1	Bromelina	9.0:1.0	3.00	5.80	40.0	24.0	1.0005	11.12	0.0334
	8.2	Bromelina	9.0:1.0	3.00	5.80	40.0	24.0	0.4986	5.54	0.0166
	8.3	Papaína	9.0:1.0	3.00	5.80	40.0	24.0	1.0010	11.12	0.0334
	8.4	Papaína	9.0:1.0	3.00	5.80	40.0	24.0	0.4997	5.55	0.0167
9	9.1	Bromelina	9.0:1.0	3.00	5.80	40.0	21.5	1.0010	11.12	0.0334
	9.2	Bromelina	9.0:1.0	3.00	5.80	40.0	21.5	0.4988	5.54	0.0166
	9.3	Papaína	9.0:1.0	3.00	5.80	40.0	21.5	1.0016	11.13	0.0334
	9.4	Papaína	9.0:1.0	3.00	5.80	40.0	21.5	0.4979	5.53	0.0166
10	10.1	Bromelina	3.0:1.0	9.00	5.80	40.0	24.0	1.0012	11.12	0.1001
	10.2	Bromelina	3.0:1.0	9.00	5.80	40.0	24.0	0.4987	5.54	0.0499
	10.3	Papaína	3.0:1.0	9.00	5.80	40.0	24.0	1.0004	11.12	0.1000
	10.4	Papaína	3.0:1.0	9.00	5.80	40.0	24.0	0.4982	5.54	0.0498
11	11.1	Bromelina	3.0:1.0	9.00	5.80	45.0	24.0	1.0017	11.14	0.1002
	11.2	Bromelina	3.0:1.0	9.00	5.80	45.0	24.0	1.0024	11.14	0.1002
	11.3	Papaína	3.0:1.0	9.00	5.80	45.0	24.3	1.0030	11.14	0.1003
	11.4	Papaína	3.0:1.0	9.00	5.80	45.0	24.0	0.3025	3.36	0.0303
12	12.1	Bromelina	3.0:1.0	9.00	5.80	50.0	24.0	0.3034	3.37	0.0303
	12.2	Bromelina	3.0:1.0	9.00	5.80	50.0	24.0	0.3036	3.37	0.0304
	12.3	Papaína	3.0:1.0	9.00	5.80	50.0	24.0	0.3029	3.37	0.0303
	12.4	Papaína	3.0:1.0	9.00	5.80	50.0	24.0	0.3027	3.36	0.0303
13	13.1	Bromelina	3.0:1.0	9.00	6.50	50.0	24.0	0.3020	3.36	0.0302
	13.2	Bromelina	3.0:1.0	9.00	6.50	50.0	24.0	0.3036	3.37	0.0304
	13.3	Papaína	3.0:1.0	9.00	6.50	50.0	24.0	0.3018	3.35	0.0302
	13.4	Papaína	3.0:1.0	9.00	6.50	50.0	24.0	0.3014	3.35	0.0301

Cuadro A.22 Absorbancias medidas a 340 nm para cuantificación de grado de hidrólisis después de segundo tratamiento enzimático, según pruebas preliminares.

Número (#)	Repeticiones en placa		
	Abs 1	Abs 2	Abs 3
1.1	0.436	0.452	0.459
1.2	0.487	0.489	0.483
1.3	0.481	0.458	0.457
1.4	0.474	0.478	0.476
2.1	0.288	0.274	0.260
2.2	0.269	0.259	0.256
2.3	0.272	0.269	0.271
2.4	0.246	0.243	0.242
3.1	0.489	0.499	0.492
3.2	0.584	0.607	0.599
3.3	0.733	0.745	0.734
3.4	0.858	0.879	0.930
4.1	0.596	0.592	0.558
4.2	0.531	0.532	0.526
4.3	0.736	0.732	0.726
4.4	0.702	0.696	0.752
5.1	0.487	0.491	0.599
5.2	0.582	0.567	0.612
5.3	0.780	0.764	0.747
5.4	0.791	0.831	0.816
6.1	0.498	0.503	0.500
6.2	0.476	0.516	0.466
6.3	0.444	0.474	0.470
6.4	0.495	0.514	0.477
7.1	0.539	0.530	0.522
7.2	0.618	0.618	0.599
7.3	0.767	0.779	0.841
7.4	0.691	0.741	0.747
8.1	0.779	0.817	0.752
8.2	0.797	0.786	0.869
8.3	0.459	0.479	0.449
8.4	0.505	0.495	0.525
9.1	0.793	0.841	0.794
9.2	0.793	0.796	0.763
9.3	0.466	0.451	0.461
9.4	0.439	0.449	0.464
10.1	0.441	0.446	0.443
10.2	0.432	0.430	0.432
10.3	0.468	0.491	0.460
10.4	0.458	0.448	0.476
11.1	0.520	0.547	0.532
11.2	0.507	0.519	0.514
11.3	0.510	0.504	0.513
11.4	0.492	0.495	0.505
12.1	0.469	0.471	0.478
12.2	0.504	0.495	0.493

(Cont) Cuadro A.22 Absorbancias medidas a 340 nm para cuantificación de grado de hidrólisis después de segundo tratamiento enzimático, según pruebas preliminares.

Número (#)	Repeticiones en placa		
	Abs ₁	Abs ₂	Abs ₃
12.3	0.481	0.473	0.478
12.4	0.479	0.486	0.489
13.1	0.782	0.771	0.786
13.2	0.774	0.804	0.816
13.1	0.900	0.904	0.895
13.4	0.758	0.788	0.761

Cuadro A.23 Combinación de variables experimentales utilizadas para diseño central compuesto de superficie de respuestas para determinación de grado de hidrólisis después de segundo tratamiento enzimático.

Número (#)	pH	T(°C)	t(h)	Rs:e (g/g)	Ce (mg/mL)
1	6.15	45.0	22.50	6.0:1.0	6.00
2	6.15	45.0	22.50	1.0:1.0	6.00
3	6.15	55.0	22.50	6.0:1.0	6.00
4	6.50	50.0	21.00	3.5:1.0	8.50
5	6.50	40.0	21.00	3.5:1.0	3.50
6	5.80	40.0	21.00	8.5:1.0	3.50
7	6.50	50.0	21.00	8.5:1.0	3.50
8	6.15	45.0	22.50	6.0:1.0	11.00
9	5.80	40.0	21.00	3.5:1.0	8.50
10	6.15	45.0	25.50	6.0:1.0	6.00
11	6.50	40.0	24.00	3.5:1.0	8.50
12	5.80	50.0	24.00	8.5:1.0	3.50
13	5.80	50.0	21.00	8.5:1.0	8.50
14	5.45	45.0	22.50	6.0:1.0	6.00
15	6.15	45.0	22.50	11.0:1.0	6.00
16	6.50	40.0	24.00	8.5:1.0	3.50
17	5.80	50.0	24.00	3.5:1.0	8.50
18	6.15	45.0	19.50	6.0:1.0	6.00
19	5.80	40.0	24.00	3.5:1.0	3.50
20	6.15	45.0	22.50	6.0:1.0	1.00
21	6.85	45.0	22.50	6.0:1.0	6.00
22	5.80	40.0	24.00	8.5:1.0	8.50
23	5.80	50.0	21.00	3.5:1.0	3.50
24	6.50	50.0	24.00	3.5:1.0	3.50
25	6.15	35.0	22.50	6.0:1.0	6.00
26	6.50	50.0	24.00	8.5:1.0	8.50
27	6.50	40.0	21.00	8.5:1.0	8.50

Cuadro A.24 Masa de muestras de matriz colágena pretratada, masa de enzima y volumen de medio utilizado las hidrólisis del diseño central compuesto de superficie de respuestas para grado de hidrólisis después de segundo tratamiento enzimático.

Número (#)	Masa muestra (g)			Papaína (g)			Volumen de medio (mL)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	1.5001	1.5002	1.5001	0.0740	0.0740	0.0740	12.33	12.33	12.33
	1.5000	1.5003	1.5004	0.0740	0.0740	0.0740	12.33	12.34	12.34
	1.5002	1.5004	1.5005	0.0740	0.0740	0.0740	12.33	12.34	12.34
	1.5004	1.5006	1.5002	0.0740	0.0740	0.0740	12.34	12.34	12.33
	1.5002	1.5001	1.5008	0.0740	0.0740	0.0740	12.33	12.33	12.34
	1.5005	1.5007	1.5005	0.0740	0.0740	0.0740	12.34	12.34	12.34
2	1.5004	1.5000	1.5001	0.4441	0.4440	0.4440	74.02	74.00	74.00
3	1.5001	1.5004	1.5001	0.0740	0.0740	0.0740	12.33	12.34	12.33
4	1.5004	1.5009	1.5001	0.1269	0.1269	0.1269	14.93	14.93	14.93
5	1.5000	1.5001	1.5006	0.1269	0.1269	0.1269	36.24	36.25	36.26
6	1.5001	1.5007	1.5005	0.0522	0.0523	0.0523	14.93	14.93	14.93
7	1.5005	1.5005	1.5001	0.0523	0.0523	0.0522	14.93	14.93	14.93
8	1.5002	1.5001	1.5000	0.0740	0.0740	0.0740	6.73	6.73	6.73
9	1.5005	1.5004	1.5009	0.1269	0.1269	0.1269	14.93	14.93	14.93
10	1.5001	1.5003	1.5004	0.0740	0.0740	0.0740	12.33	12.34	12.34
11	1.5001	1.5002	1.5008	0.1269	0.1269	0.1269	14.93	14.93	14.93
12	1.5001	1.5002	1.5004	0.0522	0.0522	0.0522	14.93	14.93	14.93
13	1.5005	1.5008	1.5006	0.0523	0.0523	0.0523	6.15	6.15	6.15
14	1.5005	1.5002	1.5005	0.0740	0.0740	0.0740	12.34	12.33	12.34
15	1.5008	1.5000	1.5003	0.0404	0.0404	0.0404	6.73	6.73	6.73
16	1.5000	1.5000	1.5001	0.0522	0.0522	0.0522	14.92	14.92	14.93
17	1.5008	1.5004	1.5003	0.1269	0.1269	0.1269	14.93	14.93	14.93
18	1.5002	1.5006	1.5005	0.0740	0.0740	0.0740	12.33	12.34	12.34
19	1.5005	1.5009	1.5001	0.1269	0.1269	0.1269	36.26	36.27	36.25
20	1.5005	1.5004	1.5004	0.0740	0.0740	0.0740	74.02	74.02	74.02
21	1.5004	1.5002	1.5005	0.0740	0.0740	0.0740	12.34	12.33	12.34
22	1.5002	1.5002	1.5003	0.0522	0.0522	0.0522	6.15	6.15	6.15
23	1.5003	1.5005	1.5006	0.1269	0.1269	0.1269	36.25	36.26	36.26
24	1.5008	1.5000	1.5002	0.1269	0.1269	0.1269	36.26	36.24	36.25
25	1.5001	1.5005	1.5005	0.0740	0.0740	0.0740	12.33	12.34	12.34
26	1.5008	1.5001	1.5002	0.0523	0.0522	0.0522	6.15	6.15	6.15
27	1.5000	1.5003	1.5002	0.0522	0.0522	0.0522	6.15	6.15	6.15

Cuadro A.25 Absorbancias medidas a 340 nm a hidrolizados de colágeno para determinación de grado de hidrólisis después de segundo tratamiento enzimático, según diseño central compuesto de superficie de respuesta.

Número (#)	Abs		
	1	2	3
	0.608	0.545	0.590
	0.590	0.575	0.559
1	0.597	0.639	0.573
	0.578	0.586	0.629
	0.524	0.605	0.587
	0.609	0.612	0.650
2	0.352	0.352	0.354
3	0.572	0.630	0.601
4	0.518	0.504	0.532
5	0.412	0.393	0.380
6	0.550	0.537	0.527
7	0.599	0.514	0.574
8	0.794	0.819	0.815
9	0.519	0.512	0.565
10	0.578	0.561	0.574
11	0.521	0.475	0.493
12	0.505	0.487	0.496
13	0.768	0.753	0.826
14	0.608	0.550	0.606
15	0.701	0.717	0.706
16	0.491	0.471	0.506
17	0.531	0.612	0.569
18	0.573	0.614	0.598
19	0.406	0.413	0.400
20	0.342	0.341	0.340
21	0.520	0.513	0.470
22	0.754	0.803	0.779
23	0.431	0.439	0.427
24	0.419	0.447	0.419
25	0.424	0.427	0.414
26	0.740	0.707	0.824
27	0.753	0.633	0.657

Cuadro A.26 Condiciones de tratamiento, masas de matriz colágena pretratada, masas de enzima y volúmenes de medio utilizado para tratamientos de confirmación de modelo de predicción, a partir de diseño central compuesto de superficie de respuestas, para grado de hidrólisis después de segundo tratamiento enzimático

#	pH	T(°C)	t(h)	R _{s:e} (g/g)	C _{e/m} (mg/mL)	Masa de muestra (g)		Papaína (g)		Volumen de medio (mL)	
						1	2	1	2	1	2
1	6.85	45.00	19.50	3.00	2.20	0.5018	0.2511	0.0495	0.0248	22.50	11.26
2	6.50	50.00	19.50	6.00	1.50	0.5051	0.2505	0.0249	0.0124	16.61	8.24
3	6.50	35.00	24.00	5.80	1.00	0.5068	0.2508	0.0259	0.0128	25.86	12.80
4	6.85	50.00	19.50	6.00	2.20	0.5047	0.2502	0.0249	0.0123	11.32	5.61
5	6.15	45.00	22.50	1.00	5.70	0.2004	0.2004	0.0593	0.0593	10.41	10.41

Cuadro A.27 Absorbancias medidas a 340 nm para tratamientos de confirmación de modelo de predicción, por duplicado, a partir de diseño central compuesto superficie de respuestas, para grado de hidrólisis después de segundo tratamiento enzimático.

Número (#)	Repetición en placa	Abs	
		1	2
1	1	0.359	0.347
	2	0.348	0.348
	3	0.347	0.348
2	1	0.391	0.386
	2	0.394	0.386
	3	0.396	0.385
3	1	0.298	0.298
	2	0.313	0.291
	3	0.318	0.305
4	1	0.409	0.420
	2	0.407	0.418
	3	0.390	0.419
5	1	0.351	0.344
	2	0.354	0.345
	3	0.355	0.346

Cuadro A.28 Absorbancias medidas a 340 nm para hidrólisis por triplicado según mejores condiciones de diseño de superficie de respuestas con medio de hidrólisis modificado sin EDTA.

Número (#)	Repetición en placa		
	Abs ₁	Abs ₂	Abs ₃
1	0.334	0.336	0.337
2	0.324	0.327	0.325
3	0.331	0.332	0.331

Cuadro A.29 Transmitancias para Amida III y anillo de Pirrolidina en colágeno nativo y colágeno hidrolizado, obtenidos de FTIR.

Pico	Colágeno nativo (cm ⁻¹)	T (%)	Colágeno hidrolizado (cm ⁻¹)	T (%)
Amida III	1234.78	62.0	1238.94	63.0
Anillo de pirrolidina	1441.90	62.0	1451.76	59.0

Cuadro A.30 Absorbancias medidas a 220 nm de solución blanco y soluciones de colágeno de piel de ternero en ácido acético, utilizadas como puntos para la determinación de curva estándar de colágeno tipo I, para prueba de solubilidad.

Concentración teórica (mg/mL)	Repetición	Abs		
		1	2	3
0	1	0.010	0.063	0.019
	2	0.050	-0.001	0.019
	3	0.002	0.035	0.036
0.10	1	0.564	0.588	0.571
	2	0.523	0.572	0.597
	3	0.572	0.594	0.607
0.30	1	0.556	0.543	0.578
	2	0.54	0.562	0.578
	3	0.537	0.593	0.599
0.50	1	0.556	0.553	0.534
	2	0.552	0.57	0.586
	3	0.522	0.544	0.595
0.70	1	0.553	0.588	0.588
	2	0.546	0.557	0.579
	3	0.552	0.527	0.587
0.90	1	0.554	0.587	0.602
	2	0.528	0.572	0.587
	3	0.533	0.561	0.603

Cuadro A.31 Absorbancias medidas a 220 nm para diferentes concentraciones de colágeno hidrolizado de piel de tilapia en solución de ácido acético 0.1 mol/L, para prueba de solubilidad.

Número (#)	Concentración teórica (mg/mL)	Repetición	Abs		F _D
			1	2	
1	0.00	1	0.011	0.009	1
		2	0.009	0.005	
		3	0.015	0.007	
2	16.00	1	0.703	0.644	152
		2	0.697	0.680	
		3	0.710	0.670	
3	40.00	1	0.620	0.658	367
		2	0.611	0.690	
		3	0.619	0.663	
4	68.00	1	0.587	0.557	663
		2	0.614	0.597	
		3	0.591	0.576	
5	100.00	1	0.451	0.426	917
		2	0.449	0.459	
		3	0.448	0.481	

B. Resultados intermedios

Cuadro B.1 Mediciones de cambios de masa, y composición de ceniza en piel de tilapia, para determinación de contenido mineral en pruebas de análisis proximal.

Medición	1	2
Muestra inicial (g)	4.0469	4.0349
Muestra degradada(g)	0.0220	0.0141
Muestra degradada(g)	0.0123	0.0131
Muestra degradada(g)	0.0084	0.0128
Muestra final degradada (g)	0.0082	0.0128
Ceniza (%)	0.20	0.32

Cuadro B.2. Mediciones de cambios de masa, y composición de humedad en piel de tilapia, para determinación de contenido de humedad en pruebas de análisis proximal.

Medición	1	2
Muestra inicial (g)	4.0648	4.0879
Muestra seca (g)	1.6067	1.7204
Muestra seca (g)	1.5512	1.6343
Muestra seca (g)	1.5183	1.5205
Muestra final seca (g)	1.5181	1.5202
Humedad (%)	62.65	62.81

Cuadro B.3 Mediciones de cambios de masa, y composición de humedad en piel de tilapia, para determinación de contenido de grasa en pruebas de análisis proximal.

Medición	1	2
Muestra inicial (g)	7.3741	7.3292
Muestra húmeda (g)	3.5728	3.9877
Muestra húmeda (g)	2.8695	2.8763
Muestra seca (g)	2.8488	2.8583
Humedad (%)	61.37	61.00

Cuadro B.4 Medición de cambio de masa en extracto graso, después de extracción con solvente y evaporación, y composición de grasa, para determinación de contenido graso en pruebas de análisis proximal.

Medición	1	2
Extracto húmedo (g)	0.1406	0.1683
Extracto húmedo (g)	0.1128	0.1419
Extracto húmedo (g)	0.1206	0.1296
Extracto final seco(g)	0.1106	0.1083
Grasa en base seca (%)	4.31	4.27
Grasa en base húmeda (%)	1.50	1.48

Cuadro B.5 Absorbancias promedio y corregidas a 558 nm de puntos de curva estándar, para cuantificación de hidroxiprolina en la determinación de mejores condiciones de hidrólisis ácida, y preliminares de primer tratamiento enzimático.

h (µg/mL)	Abs promedio	Abs promedio corregida
0	0.042	0.000
15	0.087	0.045
45	0.142	0.101
90	0.222	0.180

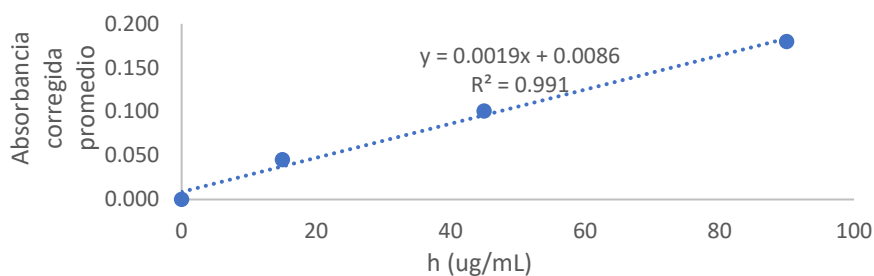


Figura B.1. Curva estándar para cuantificación de hidroxiprolina en pruebas de caracterización iniciales y pruebas preliminares para primer tratamiento enzimático.

Cuadro B.6 Condiciones de hidrolisis en H₂SO₄ y concentraciones de hidroxiprolina en hidrolizados de piel de tilapia, para pruebas de caracterización inicial.

T (h)	H ₂ SO ₄ (mol/L)	T (°C)	Curva	Abspromedio corregida	h (ug/mL)	Fd _a	Fd ₂	H (mg/g)	H _{promedio} (mg/g)
6.0	1.00	80.0	1	0.011	1.408	3.33	12.50	0.348	0.475 ± 0.336
			2	0.010	0.893	3.33	12.50	0.222	
			3	0.015	3.468	3.33	12.50	0.856	
16.0	1.00	80.0	1	0.050	21.493	3.33	12.50	5.346	5.356 ± 0.384
			2	0.047	19.999	3.33	12.50	4.976	
			3	0.053	23.037	3.33	12.50	5.744	
24.0	1.00	80.0	1	0.058	25.612	3.33	12.50	6.159	6.824 ± 0.589
			2	0.067	30.247	3.33	12.50	7.281	
			3	0.065	29.217	3.33	12.50	7.032	
6.0	3.50	80.0	1	0.087	40.547	3.33	12.50	10.075	10.493 ± 0.445
			2	0.090	42.092	3.33	12.50	10.444	
			3	0.094	44.152	3.33	12.50	10.961	
16.0	3.50	80.0	1	0.139	67.326	3.33	12.50	16.791	17.009 ± 0.858
			2	0.148	71.961	3.33	12.50	17.954	
			3	0.135	65.266	3.33	12.50	16.281	
24.0	3.50	80.0	1	0.196	96.681	3.33	12.50	23.360	23.702 ± 0.323
			2	0.201	99.255	3.33	12.00	24.003	
			3	0.199	98.225	3.33	12.50	23.742	
26.0	3.50	80.0	1	0.154	75.051	3.33	12.50	18.687	18.981 ± 0.309
			2	0.160	78.141	3.33	12.50	19.303	
			3	0.157	76.596	3.33	12.50	18.952	
29.0	3.50	80.0	1	0.138	66.811	3.33	12.50	16.414	16.202 ± 0.561
			2	0.140	67.841	3.33	12.50	16.626	
			3	0.134	64.751	3.33	12.50	15.565	
16.0	5.00	80.0	1	0.126	60.631	3.33	12.50	15.131	15.167 ± 1.083
			2	0.135	65.266	3.33	12.50	16.268	
			3	0.118	56.512	3.33	12.50	14.103	
24.0	5.00	80.0	1	0.143	69.386	3.33	12.50	17.009	16.269 ± 0.648
			2	0.132	63.721	3.33	12.50	15.803	
			3	0.134	64.751	3.33	12.50	15.996	
26.0	5.00	80.0	1	0.129	62.176	3.33	12.50	15.153	15.037 ± 0.280
			2	0.123	59.087	3.33	12.50	14.718	
			3	0.127	61.146	3.33	12.50	15.241	

Cuadro B.7 Absorbancias promedio y concentración de hidroxiprolina en matrices recuperadas después de primera digestión enzimática con papaína, para pruebas preliminares.

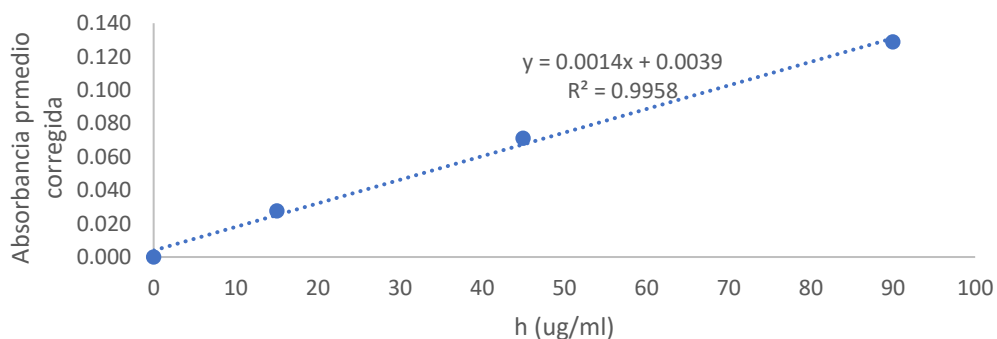
#	Masa recuperada después de digestión (g)			Abs _{promedio}			Abs promedio corregida			h (ug/mL)			H (mg/g)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	4.5849	4.5823	4.5856	0.108	0.111	0.105	0.064	0.067	0.061	26.699	28.497	25.556	7.28	7.77	6.97
2	2.3183	2.3423	2.3654	0.139	0.134	0.130	0.095	0.090	0.086	42.222	39.608	37.810	22.77	21.14	19.98
3	2.0912	2.1015	2.1234	0.120	0.118	0.115	0.076	0.074	0.071	32.582	31.601	30.131	19.48	18.80	17.74
4	5.7165	5.7699	5.6985	0.173	0.185	0.180	0.129	0.141	0.136	58.562	64.608	62.320	12.81	14.00	13.67
5	5.5400	5.5234	5.5172	0.281	0.273	0.267	0.237	0.229	0.223	111.677	107.908	104.967	25.20	24.42	23.78
6	0.9789	0.9710	0.9745	0.097	0.098	0.098	0.053	0.054	0.054	21.307	21.961	22.124	27.21	28.27	28.38
7	1.5491	1.5491	1.5389	0.127	0.125	0.125	0.083	0.081	0.081	36.394	35.087	35.414	29.37	28.31	28.77
8	2.1486	2.141	2.1315	0.146	0.149	0.140	0.102	0.105	0.096	45.654	46.797	42.549	26.56	27.32	24.95
9	3.3392	3.3415	3.3564	0.168	0.174	0.170	0.124	0.130	0.126	56.438	59.379	57.418	21.13	22.21	21.38
10	3.3054	3.3109	3.2987	0.151	0.136	0.143	0.107	0.092	0.099	47.941	40.425	44.020	18.13	15.26	16.68
11	1.4437	1.4315	1.4297	0.092	0.089	0.087	0.048	0.045	0.043	18.856	17.712	16.732	16.33	15.47	14.63

Cuadro B.8 Porcentajes de extracción y de composición colágena obtenidos después de primer tratamiento enzimático con papaína, para pruebas preliminares.

#	% Extracción			% Colágeno		
	1	2	3	1	2	3
1	21.54	23.02	20.67	5.82	6.22	5.57
2	34.24	32.12	30.67	18.21	16.91	15.98
3	26.35	25.56	24.36	15.58	15.04	14.19
4	47.49	52.41	50.52	10.24	11.20	10.94
5	90.57	87.55	85.14	20.16	19.54	19.03
6	17.28	17.81	17.95	21.77	22.62	22.70
7	54.82	52.84	53.31	23.49	22.65	23.01
8	26.56	27.23	24.76	21.25	21.86	19.96
9	32.84	34.56	33.42	16.90	17.77	17.11
10	27.89	23.51	25.61	14.50	12.21	13.34
11	10.97	10.31	9.74	13.06	12.37	11.70

Cuadro B.9 Absorbancias promedio y corregidas a 558 nm de puntos de curva estándar, para cuantificación de hidroxiprolina en la determinación de contenido de colágeno en matrices recuperadas después de primer tratamiento enzimático de diseño factorial fraccionado.

h (ug/mL)	Abs promedio	Abs promedio corregida
0.0	0.048	0.000
15.0	0.075	0.028
45.0	0.119	0.071
90.0	0.177	0.129

**Figura B. 2** Curva estándar de hidroxiprolina para determinación de colágeno en matrices recuperadas después de primer tratamiento enzimático, de diseño factorial fraccionado.

Cuadro B.10 Absorbancia medidas y absorbancias corregidas, concentración de hidroxiprolina en matrices colágenas recuperadas de primer tratamiento enzimático, según diseño factorial fraccionado.

#	Abs promedio			Abs _{promedio} corregida			h (ug/mL)			Fd ₁	Fd ₂	H (mg/g muestra)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3			1	2	3
1	0.172	0.145	0.163	0.124	0.097	0.115	85.786	66.738	79.119	3.33	12.5	26.804	20.853	24.718
2	0.160	0.126	0.097	0.112	0.078	0.049	77.452	52.929	31.976	3.33	12.5	24.196	27.339	25.406
3	0.173	0.157	0.162	0.125	0.109	0.114	86.262	74.833	78.405	3.33	12.5	26.953	23.382	24.499
4	0.150	0.137	0.141	0.102	0.089	0.093	69.833	61.024	63.405	3.33	12.5	21.816	19.066	19.809
5	0.159	0.166	0.164	0.111	0.118	0.116	76.262	81.738	80.071	3.33	12.5	23.829	25.537	25.019
6	0.162	0.165	0.164	0.114	0.117	0.116	78.405	81.024	80.071	3.33	12.5	24.498	25.317	25.710
7	0.179	0.166	0.175	0.131	0.118	0.127	91.024	81.738	87.690	3.33	12.5	28.437	25.537	27.396
8	0.154	0.163	0.173	0.106	0.115	0.125	73.167	79.595	86.738	3.33	12.5	22.862	24.867	27.102
9	0.169	0.156	0.167	0.121	0.108	0.119	83.881	74.357	82.214	3.33	12.5	26.210	23.233	25.688
10	0.142	0.157	0.155	0.094	0.109	0.107	64.357	75.310	73.643	3.33	12.5	20.109	23.531	23.009
11	0.172	0.175	0.171	0.124	0.127	0.123	85.786	87.690	84.833	3.33	12.5	26.804	27.396	26.507
12	0.165	0.161	0.165	0.117	0.113	0.117	81.024	78.167	80.548	3.33	12.5	25.314	24.421	25.164
13	0.172	0.158	0.167	0.124	0.110	0.119	85.786	75.786	81.976	3.33	12.5	26.804	23.677	25.613
14	0.172	0.168	0.169	0.124	0.120	0.121	85.548	82.690	83.881	3.33	12.5	26.729	25.832	26.208
15	0.173	0.174	0.178	0.125	0.126	0.130	86.500	87.452	89.833	3.33	12.5	27.024	27.321	28.067
16	0.139	0.172	0.132	0.091	0.124	0.084	61.976	85.786	57.214	3.33	12.5	25.951	26.802	31.071

Cuadro B.11 Porcentajes de extracción y composición obtenidos después de primer tratamiento enzimático con papaína en piel de tilapia, para tratamientos de diseño factorial fraccionado.

#	Extracción (%)			Colágeno (%)		
	1	2	3	1	2	3
1	91.07	75.01	95.52	21.44	16.68	19.77
2	27.32	30.90	28.69	19.36	21.87	20.32
3	93.32	86.60	97.35	21.56	18.71	19.60
4	79.41	71.50	69.77	17.45	15.25	15.85
5	52.33	58.66	63.13	19.06	20.43	20.02
6	28.83	30.77	28.24	19.60	20.25	20.57
7	99.23	88.36	96.92	22.75	20.43	21.92
8	36.96	42.47	41.77	18.29	19.89	21.68
9	95.04	88.83	94.44	20.97	18.59	20.55
10	73.22	83.87	83.41	16.09	18.82	18.41
11	100.32	96.10	99.81	21.44	21.92	21.21
12	55.04	53.82	57.14	20.25	19.54	20.13
13	38.81	35.59	43.40	21.44	18.94	20.49
14	56.41	54.65	59.04	21.38	20.67	20.97
15	92.27	96.80	94.62	21.62	21.86	22.45
16	31.83	32.83	40.36	20.76	21.44	24.86

Cuadro B.12 Temperaturas y cambios fraccionales de viscosidad de soluciones de colágeno nativo en ácido acético 0.1 mol/L, para determinación de temperatura de desnaturalización.

1		2		3	
T(°C)	Cambio Fraccional	T(°C)	Cambio Fraccional	T(°C)	Cambio Fraccional
10.0	1.000	10.0	1.000	10.0	1.000
10.8	0.990	11.0	0.979	11.0	0.985
11.7	0.974	12.1	0.965	12.1	0.970
12.5	0.964	13.2	0.951	13.2	0.953
13.3	0.952	14.2	0.941	14.2	0.948
14.1	0.941	15.2	0.924	15.2	0.929
15.0	0.930	16.2	0.913	16.2	0.924
15.8	0.918	17.3	0.903	17.3	0.904
16.6	0.906	18.3	0.889	18.3	0.898
17.4	0.896	19.3	0.878	19.3	0.882
18.2	0.886	20.3	0.868	20.3	0.877
19.1	0.875	21.4	0.861	21.4	0.860

(Cont)Cuadro B.12 Temperaturas y cambios fraccionales de viscosidad de soluciones de colágeno nativo en ácido acético 0.1 mol/L, para determinación de temperatura de desnaturalización.

1		2		3	
T(°C)	Cambio Fraccional	T(°C)	Cambio Fraccional	T(°C)	Cambio Fraccional
19.9	0.866	22.4	0.851	22.4	0.859
20.7	0.854	23.4	0.840	23.4	0.839
21.5	0.845	24.4	0.830	24.4	0.834
22.3	0.835	25.5	0.823	25.5	0.816
23.1	0.825	26.5	0.809	26.5	0.807
24.0	0.817	27.5	0.795	27.5	0.772
24.8	0.806	28.5	0.774	28.5	0.760
25.6	0.797	29.6	0.733	29.6	0.710
26.4	0.788	30.6	0.646	30.6	0.620
27.2	0.776	31.6	0.549	31.6	0.506
28.0	0.765	32.6	0.486	32.6	0.440
28.9	0.748	33.7	0.396	33.7	0.339
29.7	0.718	34.7	0.170	34.7	0.136
30.5	0.664	35.7	0.025	35.7	0.012
31.3	0.598	36.7	0.004	36.7	0.008
32.1	0.549	37.8	0.003	37.8	-0.002
32.9	0.505	38.8	-0.001	38.8	0.004
33.7	0.438	39.8	0.001	39.8	-0.003
34.6	0.274	40.8	0.002	40.8	0.007
35.4	0.064	41.9	0.001	41.9	-0.002
36.2	0.003	42.9	-0.001	42.9	0.009
37.0	-0.007	43.9	0.002	43.9	-0.001
37.8	-0.008	44.9	0.003	44.9	0.005
38.6	-0.007	46.0	0.002	46.0	-0.002
39.5	-0.003	47.0	-0.001	47.0	0.006
40.3	-0.004	48.0	0.003	48.0	-0.001
41.1	-0.004	49.1	0.002	49.1	0.007
41.9	-0.004	50.1	0.000	50.1	0.000
42.7	-0.004	-	-	-	-
43.5	-0.004	-	-	-	-
44.4	-0.004	-	-	-	-
45.2	-0.004	-	-	-	-
46.0	-0.003	-	-	-	-
46.8	-0.002	-	-	-	-
47.6	-0.002	-	-	-	-
48.4	0.000	-	-	-	-
49.3	-0.001	-	-	-	-
50.1	0.000	-	-	-	-

Cuadro B.13 Temperaturas y cambios fraccionales de viscosidad utilizados para determinación de temperatura de desnaturalización mediante interpolación

#	T ₁ (°C)	Cambio Fraccional	T ₂ (°C)	Cambio Fraccional	T _d (°C)	T _d promedio (°C)
1	32.9	0.505	33.7	0.438	33.0	
2	31.6	0.549	32.6	0.486	32.4	32.4 ± 0.6
3	31.6	0.506	32.6	0.440	31.7	

Cuadro B.14 Grado de hidrólisis para hidrolizados de colágeno obtenidos después de segundo tratamiento enzimático según condiciones de pruebas preliminares.

#	Abs _{promedio}	F _d	J	Glicina NH ₂	h*	G.H (%)	G.H _{promedio} (%)
1.1	0.449	1.000	3.602	0.899	0.499	5.80	
1.2	0.486	1.000	4.221	1.055	0.655	7.62	6.71 ± 1.29
1.3	0.465	1.000	3.873	0.968	0.568	6.61	
1.4	0.476	1.000	4.050	1.013	0.613	7.12	6.87 ± 0.37
2.1	0.274	1.000	0.702	0.175	-0.225	-2.61	
2.2	0.261	1.000	0.492	0.123	-0.277	-3.22	-2.92 ± 0.43
2.3	0.271	1.000	0.646	0.159	-0.241	-2.80	
2.4	0.244	1.000	0.199	0.049	-0.351	-4.08	-3.44 ± 0.91
3.1	0.493	1.000	4.337	1.084	0.684	7.96	
3.2	0.597	1.000	6.050	1.511	1.111	12.92	10.44 ± 3,51
3.3	0.737	1.000	8.381	2.096	1.696	19.72	
3.4	0.889	1.000	10.895	2.722	2.322	27.00	23.36 ± 5.15
4.1	0.582	1.000	5.807	1.452	1.052	12.23	
4.2	0.530	1.000	4.939	1.236	0.836	9.72	10.98 ± 1.78
4.3	0.731	1.000	8.282	2.071	1.671	19.43	
4.4	0.717	1.000	8.039	2.011	1.611	18.73	19.08 ± 0.50
5.1	0.526	1.000	4.873	1.218	0.818	9.51	
5.2	0.587	1.000	5.890	1.471	1.071	12.46	10.98 ± 2.08
5.3	0.764	1.000	8.818	2.204	1.804	20.98	
5.4	0.813	1.000	9.630	2.406	2.006	23.33	22.15 ± 1.66
6.1	0.500	3.250	14.472	3.618	3.218	37.42	
6.2	0.486	3.250	13.700	3.426	3.026	35.19	36.30 ± 1.58
6.3	0.463	3.250	12.443	3.110	2.710	31.52	
6.4	0.495	3.250	14.203	3.553	3.153	36.66	34.09 ± 3.64
7.1	0.530	1.000	4.950	1.237	0.837	9.73	
7.2	0.612	1.000	6.298	1.574	1.174	13.66	11.69 ± 2.77
7.3	0.796	1.000	9.348	2.338	1.938	22.53	
7.4	0.726	1.000	8.199	2.052	1.652	19.20	20.87 ± 2.35
8.1	0.783	1.000	9.133	2.284	1.884	21.91	
8.2	0.817	1.000	9.707	2.427	2.027	23.57	22.74 ± 1.18
8.3	0.462	3.250	12.425	3.106	2.706	31.46	
8.4	0.508	3.250	14.903	3.725	3.325	38.66	35.06 ± 5.09

(Cont) Cuadro B.14 Grado de hidrólisis para hidrolizados de colágeno obtenidos después de segundo tratamiento enzimático según condiciones de pruebas preliminares.

#	AbSpromedio	F _d	J	Glicina NH ₂	h*	G.H (%)	G.Hpromedio (%)
9.1	0.809	1.000	9.575	2.393	1.993	23.18	22.57 ± 0.87
9.2	0.784	1.000	9.155	2.288	1.888	21.95	
9.3	0.459	3.250	12.264	3.066	2.666	31.01	
9.4	0.451	3.250	11.797	2.948	2.548	29.63	30.32 ± 0.97
10.1	0.443	3.250	11.402	2.850	2.450	28.48	27.55 ± 1.32
10.2	0.431	3.250	10.756	2.689	2.289	26.61	
10.3	0.473	3.250	13.000	3.252	2.852	33.16	
10.4	0.461	3.250	12.336	3.087	2.687	31.24	
11.1	0.533	3.250	16.232	4.062	3.662	42.58	41.02 ± 2.20
11.2	0.513	3.250	15.173	3.794	3.394	39.47	
11.3	0.509	3.250	14.939	3.734	3.334	38.76	37.85 ± 1.29
11.4	0.497	3.250	14.311	3.577	3.177	36.94	
12.1	0.473	3.250	12.982	3.245	2.845	33.08	34.99 ± 2.71
12.2	0.497	3.250	14.311	3.574	3.174	36.91	
12.3	0.477	3.250	13.233	3.313	2.913	33.87	
12.4	0.485	3.250	13.628	3.404	3.004	34.93	
13.1	0.780	1.000	9.083	2.274	1.874	21.79	22.20 ± 0.58
13.2	0.798	1.000	9.387	2.345	1.945	22.61	
13.3	0.900	1.000	11.072	2.765	2.365	27.50	24.38 ± 4.42
13.4	0.769	1.000	8.906	2.227	1.827	21.25	

Cuadro B.15 Grado de hidrólisis para diferentes condiciones de variables experimentales en segundo tratamiento enzimático, para diseño de superficie de respuestas.

#	F _d	J			GlicinaNH ₂			h*			G.H (%)			G.H promedio (%)
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
1	3.25	20.38	16.97	19.36	3.77	3.14	3.58	3.37	2.74	3.18	39.20	31.86	37.01	37.30 ± 3.67
		19.36	18.60	17.69	3.58	3.44	3.27	3.18	3.04	2.87	37.01	35.36	33.42	
		19.75	22.06	18.49	3.65	4.08	3.42	3.25	3.68	3.02	37.84	42.82	35.12	
		18.74	19.18	21.52	3.47	3.55	3.98	3.07	3.15	3.58	35.67	36.60	41.65	
		15.83	20.20	19.23	2.93	3.74	3.56	2.53	3.34	3.16	29.41	38.81	36.72	
		20.44	20.57	22.62	3.78	3.80	4.19	3.38	3.40	3.79	39.32	39.59	44.02	
2	3.25	6.50	6.47	6.61	7.22	7.19	7.34	6.82	6.79	6.94	79.25	78.90	80.65	79.60 ± 0.92
3	3.25	18.39	21.53	19.96	3.40	3.98	3.69	3.00	3.58	3.29	34.91	41.67	38.29	38.29 ± 3.38
4	3.25	15.49	14.73	16.22	3.47	3.30	3.63	3.07	2.90	3.23	35.68	33.70	37.58	35.65 ± 1.94
5	3.25	9.77	8.74	8.02	5.31	4.75	4.36	4.91	4.35	3.96	57.10	50.60	46.03	51.24 ± 5.56
6	3.25	17.20	16.54	15.95	3.85	3.70	3.57	3.45	3.30	3.17	40.12	38.40	36.88	38.47 ± 1.62
7	3.25	19.85	15.26	18.50	4.44	3.42	4.14	4.04	3.02	3.74	47.03	35.07	43.50	41.87 ± 6.15
8	3.25	30.42	31.77	31.60	3.07	3.21	3.19	2.67	2.81	2.79	31.05	32.63	32.43	32.03 ± 0.86
9	3.25	15.52	15.17	18.02	3.47	3.40	4.03	3.07	3.00	3.63	35.75	34.83	42.26	37.61 ± 4.05
10	3.25	18.76	17.79	18.54	3.47	3.29	3.43	3.07	2.89	3.03	35.71	33.63	35.24	34.86 ± 1.09
11	3.25	15.64	13.18	14.14	3.50	2.95	3.17	3.10	2.55	2.77	36.05	29.66	32.15	32.62 ± 3.22
12	3.25	14.79	13.79	14.30	3.31	3.09	3.20	2.91	2.69	2.80	33.84	31.24	32.58	32.55 ± 1.30
13	3.25	29.05	28.20	32.18	2.68	2.60	2.97	2.28	2.20	2.57	26.49	25.58	29.84	27.30 ± 2.24
14	3.25	20.37	17.23	20.23	3.77	3.19	3.74	3.37	2.79	3.34	39.16	32.41	38.87	36.81 ± 3.82
15	3.25	25.40	26.27	25.68	2.56	2.65	2.59	2.16	2.25	2.19	25.16	26.18	25.48	25.60 ± 0.52
16	3.25	14.05	12.95	14.84	3.14	2.90	3.32	2.74	2.50	2.92	31.92	29.05	33.99	31.65 ± 2.48
17	3.25	16.17	20.58	18.24	3.62	4.61	4.08	3.22	4.21	3.68	37.44	48.93	42.82	43.07 ± 5.75
18	3.25	18.49	20.66	19.83	3.42	3.82	3.67	3.02	3.42	3.27	35.12	39.80	38.00	37.64 ± 2.36
19	3.25	9.43	9.79	9.12	5.12	5.32	4.96	4.72	4.92	4.56	54.94	57.22	53.00	55.05 ± 2.11
20	3.25	5.96	5.92	5.87	6.61	6.57	6.51	6.21	6.17	6.11	72.26	71.79	71.09	71.71 ± 0.59
21	3.25	15.57	15.24	12.89	2.88	2.82	2.39	2.48	2.42	1.99	28.85	28.13	23.08	26.69 ± 3.14
22	3.25	28.26	30.95	29.63	2.60	2.85	2.73	2.20	2.45	2.33	25.64	28.52	27.11	27.09 ± 1.44
23	3.25	10.80	11.19	10.56	5.87	6.09	5.74	5.47	5.69	5.34	63.61	66.12	62.13	63.95 ± 2.02
24	3.25	10.13	11.62	10.15	5.51	6.32	5.52	5.11	5.92	5.12	59.39	68.81	59.50	62.56 ± 5.40
25	3.25	10.37	10.56	9.84	1.92	1.95	1.82	1.52	1.55	1.42	17.66	18.07	16.52	17.42 ± 0.81
26	3.25	27.52	25.75	32.05	2.54	2.37	2.95	2.14	1.97	2.55	24.84	22.95	29.70	25.83 ± 3.48
27	3.25	28.24	21.72	23.00	2.60	2.00	2.12	2.20	1.60	1.72	25.62	18.63	20.01	21.42 ± 3.70

Cuadro B.16 Grados de hidrólisis para tratamientos de confirmación de modelo de predicción a partir de superficie de respuestas de grado de hidrólisis después de segundo tratamiento enzimático.

#	Abs promedio		F _d	J		Glicina NH ₂		h*		G.H experimental (%)	
	1	2		1	2	1	2	1	2	1	2
1	0.351	0.348	3.25	6.464	6.265	6.523	6.323	6.123	5.923	71.20	68.87
2	0.394	0.386	3.25	8.757	8.324	6.481	6.160	6.081	5.760	70.70	66.98
3	0.310	0.298	3.25	4.207	3.575	4.831	4.105	4.431	3.705	51.52	43.09
4	0.402	0.419	3.25	9.208	10.129	4.646	5.111	4.246	4.711	49.38	54.78
5	0.353	0.345	3.25	6.572	6.121	7.680	7.152	7.280	6.752	84.65	78.51

Cuadro B.17 Grado de hidrólisis para muestra por triplicado, según mejores condiciones de hidrólisis de diseño de superficie de respuestas, con medio de hidrólisis modificado sin EDTA.

#	Abs promedio	F _d	J	Glicina NH ₂	h*	G.H (%)	G.H _{promedio} (%)
1	0.336	3.25	5.615	6.234	5.83	67.84	
2	0.325	3.25	5.056	5.612	5.21	60.60	64.38± 3.63
3	0.331	3.25	5.363	5.964	5.56	64.70	

Cuadro B.18 Absorbancia promedio diluidas, factores de dilución y absorbancia promedio concentradas de soluciones a 220 nm de colágeno de piel de ternero en ácido acético, para determinación de curva estándar, para prueba de solubilidad.

#	Concentración teórica diluida (mg/mL)	Abs promedio diluida	F _d	Concentración teórica original (mg/mL)	Abs promedio concentrada
Blanco	0.0	0.026	1.00	0.0	0.026
1	0.1	0.576	1.00	0.1	0.576
2	0.1	0.565	2.99	0.3	1.692
3	0.1	0.557	5.00	0.5	2.784
4	0.1	0.564	7.04	0.7	3.973
5	0.1	0.570	8.93	0.9	5.086

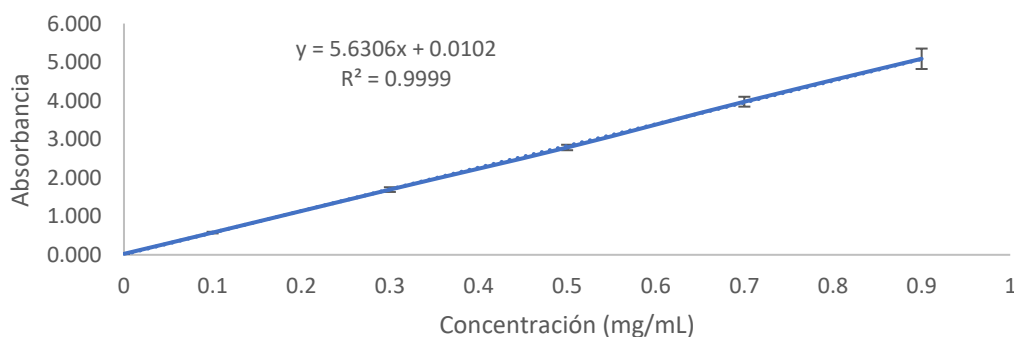


Figura B.3 Curva estándar de colágeno I de piel de ternero para determinación de solubilidad

Cuadro B.19 Absorbancias promedio medidas a 220 nm para diferentes soluciones de colágeno hidrolizado de piel de tilapia en ácido acético 0.1 mol/L, para determinación de solubilidad.

Número (#)	Concentración teórica (mg/mL)	Abs promedio		F _d
		1	2	
1	0.00	0.012	0.007	1
2	16.00	0.703	0.665	152
3	40.00	0.617	0.670	367
4	68.00	0.597	0.577	663
5	100.00	0.449	0.455	917

Cuadro B.20 Concentraciones teóricas y prácticas para diferentes soluciones de colágeno hidrolizado en ácido acético 0.1 mol/L, para determinación de solubilidad.

Concentración teórica (mg/mL)	Concentración práctica concentrada (mg/mL)		Concentración práctica concentrada promedio (mg/mL)
	1	2	
0.00	0.00	0.00	0.00 ± 0.00
16.00	18.98	17.94	18.46 ± 0.74
40.00	40.19	43.69	41.94 ± 2.47
68.00	70.33	67.90	69.12 ± 1.72
100.00	73.18	74.15	73.67 ± 0.69

C. Muestra de cálculo

C. 1. Contenido de ceniza

Utilizando como ejemplo el contenido de ceniza del Cuadro B.1, columna 2, fila 6. Se utilizan la masa final de muestra degradada del mismo cuadro, columna 2, fila 2; y la masa de la muestra inicial columna 2, fila 1.

$$\text{Ceniza (\%)} = \frac{\text{Masa muestra final degradada (g)}}{\text{Masa muestra inicial (g)}} * 100$$

$$\text{Ceniza (\%)} = \frac{0.0082 \text{ g}}{4.0469 \text{ g}} * 100$$

$$\text{Ceniza (\%)} = 0.20 \%$$

C. 2. Contenido de humedad

Para la humedad del Cuadro B.2 columna 2, fila 6 se utiliza la masa inicial de muestra del mismo cuadro columna 2, fila 1, y la masa final de muestra de la columna 2, fila 5.

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{\text{Masa inicial de muestra (g)} - \text{Masa final de muestra (g)}}{\text{Masa inicial de muestra (g)}} * 100$$

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{4.0648 \text{ g} - 1.5182 \text{ g}}{4.0648 \text{ g}} * 100$$

$$\text{Humedad (\%)} = 62.65 \%$$

C. 3. Contenido de grasa en base seca

Utilizando la masa final de extracto del Cuadro B.4 fila 4, columna 2, y la masa inicial de muestra en base seca del Cuadro A.4 fila 3 columna 2.

$$\text{Grasa base seca (\%)} = \frac{\text{Masa de extracto final (g)}}{\text{Masa de muestra inicial seca (g)}} * 100$$

$$\text{Grasa base seca (\%)} = \frac{0.1106 \text{ g}}{2.5634 \text{ g}} * 100$$

$$\text{Grasa base seca (\%)} = 4.31 \%$$

C. 4. Contenido de grasa en base húmeda.

Utilizando la masa final de extracto del Cuadro B.4 fila 4, columna 2, y la masa inicial de muestra en base húmeda del Cuadro A.4 fila 2 columna 2.

$$\text{Grasa base húmeda (\%)} = \frac{\text{Masa de extracto final (g)}}{\text{Masa de muestra inicial húmeda (g)}} * 100$$

$$\text{Grasa base húmeda (\%)} = \frac{0.1106 \text{ g}}{7,3741 \text{ g}} * 100$$

$$\text{Grasa base húmeda (\%)} = 1.50 \%$$

C.5. Volumen de alícuota de disolución madre de hidroxiprolina para preparación de puntos de la curva estándar.

$$\text{Volumen de alícuota (mL)} = \frac{\text{Concentración final } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}\right) * \text{Volumen final (mL)}}{\text{Concentración de solución madre } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}\right)}$$

Para la preparación de 10 mL de cada punto de la curva, y sustituyendo los datos del Cuadro A.6, fila 1, columna 2 se tiene que:

$$\text{Volumen de alícuota (mL)} = \frac{15 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} * 10 \text{ mL}}{300 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}}$$

$$\text{Volumen de alícuota (mL)} = 0.5 \text{ mL}$$

C. 6 Absorbancia corregida

$$Abs_{\text{corregida}} = Abs_{\text{muestra}} - Abs_{\text{blanco}}$$

Tomando como ejemplo los datos del Cuadro B.5; columna 1 y filas 2 y 1 respectivamente, se tiene que:

$$Abs_{\text{corregida}} = 0.087 - 0.042$$

$$Abs_{\text{corregida}} = 0.045$$

C. 7 Concentración de hidroxiprolina ($\mu\text{g/mL}$)

$$h \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Abs}_{\text{correctada}} - \text{pendiente}}{\text{intercepto}}$$

Para el cálculo de concentración de hidroxiprolina del Cuadro B.10 se tiene que, tomando la absorbancia de la columna 4, fila 1, y los datos de ecuación de recta de la Figura B.2.

$$h \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = \frac{0.124 - 0.0039}{0.0014}$$

$$h \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = 85.786 \mu\text{g/mL}$$

C. 8 Concentración de hidroxiprolina (mg/g muestra)

$$H \left(\frac{\text{mg}}{\text{g muestra}} \right) = \frac{\text{Hidroxiprolina} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) * V_{\text{H}_2\text{SO}_4}(\text{mL}) * Fd_1 * Fd_2}{\text{Masa hidrolizada} * 1000}$$

Tomando los datos del Cuadro B.10, de la fila 1, columnas 7, 10 y 1, y la masa de muestra para cuantificación de hidroxiprolina del Cuadro A.15. fila 1, columna 13.

$$H \left(\frac{\text{mg}}{\text{g muestra}} \right) = \frac{85.786 * 30 * 3.333 * 12.500}{4.0002 * 1000}$$

$$H \left(\frac{\text{mg}}{\text{g muestra}} \right) = 26.804$$

C. 9 Composición colágena (%)

$$\text{Colágeno (\%)} = \frac{H \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right)}{1000} * 8 * 100$$

Para el porcentaje colágeno del Cuadro B.11, fila 1, columna 1 se utiliza la concentración de hidroxiprolina del Cuadro B.10, fila 1, columna 12.

$$\text{Colágeno (\%)} = \frac{26.804}{1000} * 8 * 100$$

$$\text{Colágeno (\%)} = 21.44\%$$

C. 10 Extracción de matriz colágena (%)

Para los datos recuperación del Cuadro B.11 se tiene que:

$$\text{Extracción (\%)} = \frac{\text{Masa matriz colágena (g)} * \text{Colágeno despues de digestión(\%)}}{\text{Masa antes de digestión(g)} * \text{Colágeno en piel de tilapia original(\%)}}$$

Para el valor de la fila 1, columna 4; se utilizaron los datos del Cuadro A.15, la fila 1 y columna 10; y fila 1, de la fila 4 y columna 1 del Cuadro B.11, respectivamente; además de la masa total inicial del Cuadro A.15 fila 1, columna 1.

$$\text{Extracción (\%)} = \frac{12.0402g * 21.44\%}{15.000g * 18.90\%} * 100$$

$$\text{Extracción (\%)} = 91.07\%$$

C.11 Cambio fraccional de viscosidad:

Para el cambio fraccional de viscosidad se tiene que:

$$\text{Viscosidad fraccional} = \frac{(\varepsilon_2 - \varepsilon_3)}{(\varepsilon_1 - \varepsilon_3)}$$

Donde:

ε_3 : Viscosidad a la temperatura máxima

ε_2 : Viscosidad a la temperatura medida

ε_1 : Viscosidad a la temperatura mínima

Para el cambio fraccional de viscosidad del Cuadro B.12 fila 1, columna 2 se tiene que, utilizando los valores del Cuadro A.18 fila 1, columna 2: y fila 33 columna 2

$$\text{Viscosidad fraccional} = \frac{(1.000 - 0.026)}{(1.000 - 0.026)}$$

$$\text{Viscosidad fraccional} = 1.000$$

C.12 Relación de absorbancias para determinación de grado de hidrólisis (J)

La relación de absorbancias para determinación de grado de hidrolisis se calcula de acuerdo con:

$$J = \frac{Abs_{muestra} - Abs_{blanco}}{Abs_{estandar} - Abs_{promedio}} * F_d$$

En donde:

Abs: Absorbancia para cada elemento.

Para la relación de absorbancias del cuadro Cuadro B.14 columna 4, fila 1, se tiene la absorbancia promedio de la muestra en el Cuadro B.14 columna 2, fila 1; la absorbancia promedio del blanco en el Cuadro A.19 columna 7, fila 1; de la absorbancia del estándar del Cuadro A.19 columna 7, fila 2; y el factor de dilución del Cuadro B.14 columna 3, fila 1.

$$J = \frac{0.449 - 0.232}{0.292 - 0.232} * 1$$

$$J = 3.602$$

C.13 Concentración de estándar (meqv/L)

Para un estándar de glicina se tiene que:

$$\frac{meqv}{L} = \frac{masa_{estandar}(mg)}{Volumen (mL) * PM_{estandar} * 1000}$$

En donde, para una concentración del estándar de 0.5 mg/mL se tiene que

$$\frac{meqv}{L} = \frac{50 mg}{100 mL * \frac{75,07 g}{mol}} * 1000$$

$$\frac{meqv}{L} = 6.66$$

C.13 Glicina-NH₂

$$Glicina_{-NH_2} = \frac{J * \frac{meqv}{L} * Volumen_{medio}(L)}{masa (g) * Proteina (\%)} * 100$$

Tomando como ejemplo la columna 4, fila 1 del Cuadro B.14 para los valores del glicina-NH₂, se tienen del Cuadro B.14 columna 3, fila 1 los valores de J, mientras que los demás datos se toman de columna 2, fila 3; Cuadro A.21 columna 8, fila 1 y columna 7, fila 1. Mientras que el valor de proteína corresponde al obtenido del Anexo 8.

$$Glicina_{-NH_2} = \frac{3.602 * 6.66 \frac{meqv}{L} * \frac{11.11mL}{1000}}{1.0020 g * 29.56\%} * 100$$

$$Glicina_{-NH_2} = 0.899 \frac{meqv}{g proteina}$$

C.14 Determinación de h para grado de hidrólisis

Siendo

$$h = \frac{Glicina_{-NH_2} - \beta}{\alpha}$$

Donde α tiene un valor de 1, y β un valor de 0.4 para fuentes derivadas de pescado (P. M. Nielsen et al., 2006), se tiene que para la columna 5, fila 1 del Cuadro B.14. Los meqv/g proteína se calcularon anteriormente y:

$$h = \frac{0.899 \frac{meqv}{g proteina} - 0.4}{1}$$

$$h = 0.499$$

C.15 Grado de hidrólisis (%)

$$G.H(\%) = \frac{h}{h_{tot}} * 100$$

Donde h_{tot} corresponde al número promedio de enlaces peptídicos por equivalente de proteína, y para proteínas de origen de pescado su valor es de a 8.6. Se tiene que para la columna 6, fila 1 del Cuadro B.14 su valor está dado por el valor de la fila 1 columna 5 y:

$$G.H (\%) = \frac{0.499}{8.6} * 100$$

$$G.H (\%) = 5.80 \%$$

C.16 Concentración práctica concentrada de colágeno hidrolizado en solución de ácido acético 0.1 mol/L

$$\text{Concentración} \left(\frac{mg}{mL} \right) = \frac{Abs * F_d - 0.0102}{5.6306}$$

Para la concentración de colágeno hidrolizado en solución del Cuadro B.20 columna 2, fila 2, se tiene que; utilizando los datos de la columna 2 fila 2 y columna 4, fila 2 del Cuadro B.19:

$$\text{Concentración} \left(\frac{mg}{mL} \right) = \frac{0.703 * 152 - 0.0102}{5.6306}$$

$$\text{Concentración} \left(\frac{mg}{mL} \right) = 18.98$$

C.17 Absorbancias obtenidas a partir de los porcentajes de transmitancia, para los picos característicos de colágeno nativo y colágeno hidrolizado enzimáticamente del FTIR.

$$A = 2 - \log_{10}(\% T)$$

Donde:

%T: Transmitancia, %

Como ejemplo, para el valor de absorbancia del Cuadro 3.8 columna 2, fila 1 se utiliza la transmitancia del Cuadro A.29 columna 2, fila 1, por lo que:

$$A = 2 - \log_{10}(62\%)$$

$$A = 0.208$$

Nomenclatura

Simbología	Descripción	Unidades
Abs	Absorbancia	Adimensional
C	Contenido de colágeno	g/100 g
C _e	Concentración de enzima en medio	mg/mL
F _d	Factor de dilución	Adimensional
G.H	Grado de hidrólisis	%
H	Concentración de hidroxiprolina	mg/g
h	Concentración de hidroxiprolina	ug/mL
h _{tot}	Número de enlaces totales por equivalente de proteína	Adimensional
h*	Número de enlaces hidrolizados	Adimensional
J	Relación de absorbancias para determinación de grado de hidrólisis	Adimensional
P	Contenido de proteína	%
R _{s:e}	Relación másica entre sustrato y enzima	g/g
T	Temperatura	°C
T _d	Temperatura de desnaturalización	°C
t	tiempo	min u horas
V _{fh}	Volumen de filtrado hidrolizado	mL
V _{mh}	Volumen de muestra hidrolizada	L
m _h	Masa de muestra hidrolizada	g
α	Constante	Adimensional
β	Constante	Adimensional
μ	Viscosidad dinámica	Pa*s
Subíndice	Descripción	Unidades
i	inicial	-
f	final	-
max	máxima	-

Anexos

Anexo 1. Cuantificación de proteína total para piel de tilapia.



Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Campus Ciudad Rodrigo
LASEQ-UNA
Escuela de Química
"Al servicio del Sector Productivo y la Comunidad Nacional"



Laboratorio de Análisis y
Servicios Químicos

INFORME DE ANÁLISIS

Solicitud: LASEQ-8688-16
Solicitante: FUNCENAT
Atención: Sra. Melissa Chaves Phillips.

LSEQ-MC-FI3-02
Fecha recepción: 2016-07-19
Fecha entrega: 2016-07-27
FUNDAUNA: 115167

Pág.1

Resultado del análisis realizado a dos muestras, a las cuales se les determinó el contenido de proteína. Las muestras fueron identificadas de la siguiente manera:

Cuadro N° 1. Identificación

Código LASEQ	Descripción (código y/o nombre)
15014	Piel de Tilapia
15015	Escama de tilapia

Cuadro N° 2. Resultados

Código LASEQ	% Proteína*
15014	33,1 ± 1,0
15015	54,3 ± 5,7

* Base húmeda

Notas:

- Las muestras fueron tomadas por la parte interesada y llevadas al Laboratorio por el personal de FUNCENAT.
- Metodología usada: Official Methods of Analysis, AOAC, 18th. Edition, 2005.
- Este informe no podrá ser modificado en forma parcial o total sin la aprobación del LASEQ.
- Los resultados de los análisis de este informe se refieren solamente a las muestras descritas en el mismo.
- Para cualquier consulta refiérase al número de solicitud.
- Dirección cliente: Edificio Dr. Franklin Chang Díaz, 1.3 km. Norte de la Embajada de EE.UU. Pavas, San José, Costa Rica.
- La incertidumbre expandida reportada se calculó con un nivel de confianza cercano al 95% utilizando un factor de cobertura k=2.



Lic. Orlando Sánchez Gutiérrez
Director de Calidad / Laboratorio de Análisis y Servicios Químicos, LASEQ
Informe revisado por /



Universidad Nacional
Escuela de Química y Servicios Químicos, LASEQ
Informe aprobado por /



MSc. Efraín Solís Montiel
Coordinador Laboratorio de Análisis y Servicios Químicos, LASEQ
S.L. 678

Preseño Sanitario del Ministerio de Salud de C. R. N.° CN-ARS-46-232-2013. Vigente hasta el 12 de febrero del 2018.
 Certificado Voluntario de Oposición, CAV-069897-03, SINASA, Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAGI).
 Avenidas 86-3000, Heredia, Costa Rica. • Teléfono: (506) 2273-3356. Telefax: (506) 2273-3323 • Correo electrónico: lasq.una@ignad.una.cr y lasq@una.cr
 2016-2020

Anexo 2. Preparación de medio Fosfato-cisteína-verseno 0.05 mol/L, para primer tratamiento enzimático. (Song, 2010)

Para el medio de digestión para el primer tratamiento enzimático se utiliza Fosfato de Sodio (Na_2HPO_4) a una concentración 20 mmol/L, Ácido Etilendiaminotetraacético 0.5 mmol/L y Cisteína a concentración 5 mmol/L, por lo que para 500 mL se utilizan:

- a) 1.4196 g Fosfato de sodio
- b) 0.07306 g EDTA
- c) 0.3029 g L-cisteína

Estos son diluidos en 450 mL, y se ajusta hasta el pH necesario con ácido acético, además es aforado a 500 mL.

Anexo 3. Preparación de reactivo OPA para determinación de grado de hidrólisis.

Para 50 mL de reactivo se preparan:

- a) 25 mL de Tetraborato de sodio 100 mmol/L
- b) 2.5 mL de SDS al 10%
- c) 1 mL de solución de o-ftalaldehido en metanol al 4%

Se afora la solución hasta 50 mL con agua de ósmosis

Anexo 4. Composición de gel de compactación a 4% y gel de separación al 8% y al 15% para electroforesis por SDS-PAGE.

Tipo Entrecruzamiento Reactivo	Gel de compactación		Gel de separación	
	4%	8%	15%	
Acrilamida/ Bis acrilamida (mL)	5.36	26.67	50.00	
Buffer (mL)	10.00	25.00	25.00	
H2O (mL)	24.00	46.53	23.20	
SDS 10% (mL)	0.40	1.00	1.00	
APS 10% (mL)	0.20	0.75	0.75	
TEMED (mL)	0.04	0.05	0.05	

Anexo 5. Preparación de buffer para dilución de muestra para gel de electroforesis por SDS-PAGE.

Para la dilución de la muestra se utiliza una solución a partir de:

- a) Buffer fosfato de sodio 0.02 mol/L ajustado a pH 7.2.
- b) SDS al 2%.

c) Urea a concentración de 3.5 mol/L.

Anexo 6. Aleatoriedad de corridas experimentales para diseño factorial fraccionado de primer tratamiento enzimático.

#	pH	T(°C)	R _{s:e} (g/g)	Ce (mg/mL)	t(min)	#	pH	T(°C)	R _{s:e} (g/g)	Ce(mg/mL)	t(min)
1	6.00	37.00	25.0:1.0	3.00	35.0	25	6.50	50.00	25.0:1.0	3.00	35.0
2	6.50	37.00	20.0:1.0	5.00	60.0	26	6.50	50.00	25.0:1.0	5.00	60.0
3	6.00	37.00	25.0:1.0	5.00	60.0	27	6.00	37.00	25.0:1.0	3.00	35.0
4	6.00	37.00	20.0:1.0	3.00	60.0	28	6.50	37.00	20.0:1.0	5.00	60.0
5	6.50	50.00	25.0:1.0	5.00	60.0	29	6.00	50.00	25.0:1.0	5.00	35.0
6	6.00	37.00	25.0:1.0	5.00	60.0	30	6.00	50.00	20.0:1.0	3.00	35.0
7	6.50	50.00	20.0:1.0	5.00	35.0	31	6.50	50.00	25.0:1.0	5.00	60.0
8	6.00	37.00	20.0:1.0	5.00	35.0	32	6.50	37.00	20.0:1.0	5.00	60.0
9	6.50	50.00	20.0:1.0	3.00	60.0	33	6.50	37.00	25.0:1.0	3.00	60.0
10	6.50	37.00	25.0:1.0	5.00	35.0	34	6.00	50.00	20.0:1.0	5.00	60.0
11	6.00	37.00	20.0:1.0	3.00	60.0	35	6.50	37.00	25.0:1.0	3.00	60.0
12	6.00	50.00	25.0:1.0	3.00	60.0	36	6.50	37.00	25.0:1.0	5.00	35.0
13	6.00	37.00	20.0:1.0	5.00	35.0	37	6.50	37.00	20.0:1.0	3.00	35.0
14	6.50	50.00	20.0:1.0	5.00	35.0	38	6.50	37.00	25.0:1.0	5.00	35.0
15	6.00	50.00	25.0:1.0	3.00	60.0	39	6.00	37.00	20.0:1.0	5.00	35.0
16	6.00	37.00	25.0:1.0	5.00	60.0	40	6.00	50.00	20.0:1.0	3.00	35.0
17	6.50	37.00	20.0:1.0	3.00	35.0	41	6.00	50.00	20.0:1.0	5.00	60.0
18	6.00	50.00	20.0:1.0	3.00	35.0	42	6.50	50.00	20.0:1.0	3.00	60.0
19	6.00	50.00	25.0:1.0	5.00	35.0	43	6.00	50.00	20.0:1.0	5.00	60.0
20	6.50	50.00	25.0:1.0	3.00	35.0	44	6.00	50.00	25.0:1.0	5.00	35.0
21	6.50	50.00	20.0:1.0	3.00	60.0	45	6.50	50.00	25.0:1.0	3.00	35.0
22	6.00	50.00	25.0:1.0	3.00	60.0	46	6.50	37.00	20.0:1.0	3.00	35.0
23	6.00	37.00	25.0:1.0	3.00	35.0	47	6.50	50.00	20.0:1.0	5.00	35.0
24	6.00	37.00	20.0:1.0	3.00	60.0	48	6.50	37.00	25.0:1.0	3.00	60.0

Anexo 7. Aleatoriedad de corridas experimentales para diseño central compuesto de superficie de respuesta para determinación de grado de hidrólisis después de segundo tratamiento enzimático.

#	pH	T(°C)	t(h)	R _{s:e} (g/g)	Ce (mg/mL)	#	pH	T(°C)	t(h)	R _{s:e} (g/g)	Ce (mg/mL)
1	6.15	45.0	22.5	6.0:1.0	6.00	25	6.50	40.0	24.0	8.5:1.0	3.50
2	6.15	45.0	22.5	1.0:1.0	6.00	26	5.80	50.0	24.0	3.5:1.0	8.50
3	6.15	55.0	22.5	6.0:1.0	6.00	27	6.15	45.0	19.5	6.0:1.0	6.00
4	6.15	45.0	22.5	6.0:1.0	6.00	28	6.15	45.0	22.5	6.0:1.0	6.00
5	6.50	50.0	21.0	3.5:1.0	8.50	29	6.15	45.0	22.5	6.0:1.0	6.00
6	6.50	40.0	21.0	3.5:1.0	3.50	30	6.15	45.0	22.5	6.0:1.0	6.00
7	6.15	45.0	22.5	6.0:1.0	6.00	31	6.50	40.0	24.0	3.5:1.0	8.50
8	6.15	45.0	22.5	6.0:1.0	6.00	32	5.80	40.0	24.0	3.5:1.0	3.50
9	5.80	40.0	21.0	8.5:1.0	3.50	33	6.15	45.0	22.5	6.0:1.0	6.00
10	6.50	50.0	21.0	8.5:1.0	3.50	34	6.50	40.0	24.0	8.5:1.0	3.50
11	6.15	45.0	22.5	6.0:1.0	11.00	35	6.15	45.0	22.5	6.0:1.0	11.00
12	5.80	40.0	21.0	3.5:1.0	8.50	36	6.15	45.0	22.5	6.0:1.0	1.00
13	6.15	45.0	25.5	6.0:1.0	6.00	37	5.80	50.0	24.0	3.5:1.0	8.50
14	6.50	40.0	24.0	3.5:1.0	8.50	38	6.85	45.0	22.5	6.0:1.0	6.00
15	6.15	45.0	22.5	6.0:1.0	6.00	39	5.80	40.0	24.0	8.5:1.0	8.50
16	5.80	50.0	24.0	8.5:1.0	3.50	40	5.80	50.0	21.0	3.5:1.0	3.50
17	6.15	45.0	22.5	6.0:1.0	6.00	41	6.15	55.0	22.5	6.0:1.0	6.00
18	6.50	40.0	21.0	3.5:1.0	3.50	42	6.15	45.0	22.5	1.0:1.0	6.00
19	6.15	45.0	22.5	6.0:1.0	11.00	43	5.80	50.0	21.0	3.5:1.0	3.50
20	5.80	50.0	21.0	8.5:1.0	8.50	44	6.15	45.0	22.5	11.0:1.0	6.00
21	5.45	45.0	22.5	6.0:1.0	6.00	45	5.80	40.0	21.0	8.5:1.0	3.50
22	6.50	40.0	21.0	3.5:1.0	3.50	46	6.15	45.0	22.5	6.0:1.0	6.00
23	5.80	40.0	21.0	8.5:1.0	3.50	47	6.15	45.0	22.5	11.0:1.0	6.00
24	6.15	45.0	22.5	11.0:1.0	6.00	48	5.80	50.0	24.0	8.5:1.0	3.50

(Cont) Anexo 7. Aleatoriedad de corridas experimentales para diseño central compuesto de superficie de respuesta para determinación de grado de hidrólisis después de segundo tratamiento enzimático.

#	pH	T(°C)	t(h)	R _{s:e} (g/g)	Ce (mg/mL)	#	pH	T(°C)	t(h)	R _{s:e} (g/g)	Ce (mg/mL)
49	6.50	50.0	21.0	3.5:1.0	8.50	73	6.15	55.0	22.5	6.0:1.0	6.00
50	5.45	45.0	22.5	6.0:1.0	6.00	74	5.80	40.0	21.0	3.5:1.0	8.50
51	6.15	45.0	22.5	6.0:1.0	1.00	75	5.80	40.0	24.0	3.5:1.0	3.50
52	5.80	50.0	21.0	3.5:1.0	3.50	76	5.80	40.0	24.0	8.5:1.0	8.50
53	6.50	50.0	24.0	3.5:1.0	3.50	77	6.15	45.0	22.5	6.0:1.0	1.00
54	6.50	50.0	21.0	8.5:1.0	3.50	78	6.15	45.0	22.5	6.0:1.0	6.00
55	6.15	35.0	22.5	6.0:1.0	6.00	79	6.50	40.0	24.0	3.5:1.0	8.50
56	6.50	50.0	24.0	8.5:1.0	8.50	80	6.50	50.0	24.0	8.5:1.0	8.50
57	5.80	50.0	21.0	8.5:1.0	8.50	81	6.50	50.0	24.0	8.5:1.0	8.50
58	5.80	40.0	24.0	3.5:1.0	3.50	82	6.50	40.0	21.0	8.5:1.0	8.50
59	6.15	45.0	22.5	1.0:1.0	6.00	83	5.80	40.0	24.0	8.5:1.0	8.50
60	6.15	45.0	22.5	6.0:1.0	6.00	84	6.50	50.0	21.0	8.5:1.0	3.50
61	6.15	45.0	19.5	6.0:1.0	6.00	85	5.80	50.0	24.0	3.5:1.0	8.50
62	6.50	40.0	21.0	8.5:1.0	8.50	86	5.80	50.0	21.0	8.5:1.0	8.50
63	6.15	45.0	25.5	6.0:1.0	6.00	87	6.85	45.0	22.5	6.0:1.0	6.00
64	6.50	50.0	24.0	3.5:1.0	3.50	88	6.15	45.0	22.5	6.0:1.0	6.00
65	6.50	40.0	24.0	8.5:1.0	3.50	89	6.15	45.0	22.5	6.0:1.0	6.00
66	6.15	45.0	19.5	6.0:1.0	6.00	90	6.15	45.0	22.5	6.0:1.0	6.00
67	6.50	50.0	21.0	3.5:1.0	8.50	91	5.45	45.0	22.5	6.0:1.0	6.00
68	6.15	45.0	22.5	6.0:1.0	6.00	92	6.15	45.0	22.5	6.0:1.0	6.00
69	6.15	35.0	22.5	6.0:1.0	6.00	93	5.80	50.0	24.0	8.5:1.0	3.50
70	6.50	50.0	24.0	3.5:1.0	3.50	94	6.15	45.0	25.5	6.0:1.0	6.00
71	6.50	40.0	21.0	8.5:1.0	8.50	95	5.80	40.0	21.0	3.5:1.0	8.50
72	6.15	35.0	22.5	6.0:1.0	6.00	96	6.85	45.0	22.5	6.0:1.0	6.00

Anexo 9. Preparación de medio de digestión Fosfato-cisteína-verseno original para hidrólisis enzimáticas realizadas en diseño central compuesto durante segundo tratamiento enzimático.

Para el medio de digestión del segundo tratamiento enzimático se utiliza Fosfato de Sodio (Na_2HPO_4) a una concentración 50 mmol/L, Ácido Etilendiaminotetraacético 10 mmol/L y Cisteína a concentración 10 mmol/L, por lo que para 500 mL se utilizan:

- a) 3.5490 g Fosfato de sodio
- b) 1.4612 g EDTA
- c) 0.6058 g L-cisteína

Estos son diluidos en 450 mL, y se ajusta hasta el pH necesario con ácido acético, además es aforado a 500 mL.

Anexo 10. Aleatoriedad de corridas experimentales para diseño de superficie de respuestas de grado de hidrólisis para segundo tratamiento enzimático.

#	pH	T(°C)	t(h)	R _{sse} (g/g)	Ce(mg/mL)	#	pH	T(°C)	t(h)	R _{sse} (g/g)	Ce (mg/mL)
1	6.15	45.00	22.50	6.00	6.00	25	6.50	40.00	24.00	8.50	3.50
2	6.15	45.00	22.50	1.00	6.00	26	5.80	50.00	24.00	3.50	8.50
3	6.15	55.00	22.50	6.00	6.00	27	6.15	45.00	19.50	6.00	6.00
4	6.15	45.00	22.50	6.00	6.00	28	6.15	45.00	22.50	6.00	6.00
5	6.50	50.00	21.00	3.50	8.50	29	6.15	45.00	22.50	6.00	6.00
6	6.50	40.00	21.00	3.50	3.50	30	6.15	45.00	22.50	6.00	6.00
7	6.15	45.00	22.50	6.00	6.00	31	6.50	40.00	24.00	3.50	8.50
8	6.15	45.00	22.50	6.00	6.00	32	5.80	40.00	24.00	3.50	3.50
9	5.80	40.00	21.00	8.50	3.50	33	6.15	45.00	22.50	6.00	6.00
10	6.50	50.00	21.00	8.50	3.50	34	6.50	40.00	24.00	8.50	3.50
11	6.15	45.00	22.50	6.00	11.00	35	6.15	45.00	22.50	6.00	11.00
12	5.80	40.00	21.00	3.50	8.50	36	6.15	45.00	22.50	6.00	1.00
13	6.15	45.00	25.50	6.00	6.00	37	5.80	50.00	24.00	3.50	8.50
14	6.50	40.00	24.00	3.50	8.50	38	6.85	45.00	22.50	6.00	6.00
15	6.15	45.00	22.50	6.00	6.00	39	5.80	40.00	24.00	8.50	8.50
16	5.80	50.00	24.00	8.50	3.50	40	5.80	50.00	21.00	3.50	3.50
17	6.15	45.00	22.50	6.00	6.00	41	6.15	55.00	22.50	6.00	6.00
18	6.50	40.00	21.00	3.50	3.50	42	6.15	45.00	22.50	1.00	6.00
19	6.15	45.00	22.50	6.00	11.00	43	5.80	50.00	21.00	3.50	3.50
20	5.80	50.00	21.00	8.50	8.50	44	6.15	45.00	22.50	11.00	6.00
21	5.45	45.00	22.50	6.00	6.00	45	5.80	40.00	21.00	8.50	3.50
22	6.50	40.00	21.00	3.50	3.50	46	6.15	45.00	22.50	6.00	6.00
23	5.80	40.00	21.00	8.50	3.50	47	6.15	45.00	22.50	11.00	6.00
24	6.15	45.00	22.50	11.00	6.00	48	5.80	50.00	24.00	8.50	3.50

(Cont) Anexo 10. Aleatoriedad de corridas experimentales para diseño de superficie de respuestas de grado de hidrólisis para segundo tratamiento enzimático.

#	pH	T(°C)	t(h)	Rs:e (g/g)	Ce/m (mg/mL)	#	pH	T(°C)	t(h)	Rs:e (g/g)	Ce/m (mg/mL)
49	6.50	50.00	21.00	3.50	8.50	73	6.15	55.00	22.50	6.00	6.00
50	5.45	45.00	22.50	6.00	6.00	74	5.80	40.00	21.00	3.50	8.50
51	6.15	45.00	22.50	6.00	1.00	75	5.80	40.00	24.00	3.50	3.50
52	5.80	50.00	21.00	3.50	3.50	76	5.80	40.00	24.00	8.50	8.50
53	6.50	50.00	24.00	3.50	3.50	77	6.15	45.00	22.50	6.00	1.00
54	6.50	50.00	21.00	8.50	3.50	78	6.15	45.00	22.50	6.00	6.00
55	6.15	35.00	22.50	6.00	6.00	79	6.50	40.00	24.00	3.50	8.50
56	6.50	50.00	24.00	8.50	8.50	80	6.50	50.00	24.00	8.50	8.50
57	5.80	50.00	21.00	8.50	8.50	81	6.50	50.00	24.00	8.50	8.50
58	5.80	40.00	24.00	3.50	3.50	82	6.50	40.00	21.00	8.50	8.50
59	6.15	45.00	22.50	1.00	6.00	83	5.80	40.00	24.00	8.50	8.50
60	6.15	45.00	22.50	6.00	6.00	84	6.50	50.00	21.00	8.50	3.50
61	6.15	45.00	19.50	6.00	6.00	85	5.80	50.00	24.00	3.50	8.50
62	6.50	40.00	21.00	8.50	8.50	86	5.80	50.00	21.00	8.50	8.50
63	6.15	45.00	25.50	6.00	6.00	87	6.85	45.00	22.50	6.00	6.00
64	6.50	50.00	24.00	3.50	3.50	88	6.15	45.00	22.50	6.00	6.00
65	6.50	40.00	24.00	8.50	3.50	89	6.15	45.00	22.50	6.00	6.00
66	6.15	45.00	19.50	6.00	6.00	90	6.15	45.00	22.50	6.00	6.00
67	6.50	50.00	21.00	3.50	8.50	91	5.45	45.00	22.50	6.00	6.00
68	6.15	45.00	22.50	6.00	6.00	92	6.15	45.00	22.50	6.00	6.00
69	6.15	35.00	22.50	6.00	6.00	93	5.80	50.00	24.00	8.50	3.50
70	6.50	50.00	24.00	3.50	3.50	94	6.15	45.00	25.50	6.00	6.00
71	6.50	40.00	21.00	8.50	8.50	95	5.80	40.00	21.00	3.50	8.50
72	6.15	35.00	22.50	6.00	6.00	96	6.85	45.00	22.50	6.00	6.00

Anexo 11 Preparación de medio Fosfato-cisteína para hidrólisis de matriz colágena.

El medio consiste en un buffer de Fosfato de Sodio en una concentración de 50 mmol/L para mantener las condiciones de pH deseadas, junto con Cisteína 10 mol/L, sin la presencia de EDTA. Para 500 mL se adiciona:

- a) 3.5490 g Fosfato de sodio
- b) 0.6058 g L-cisteína

Estos son diluidos en 450 mL, y se ajusta hasta el pH necesario con ácido acético, además es aforado a 500 mL.