



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS PECUARIAS

**“OBTENCIÓN DE COLAGENO DE LAS PATAS DE POLLO CON LA
APLICACIÓN DE NIVELES DE 2, 4, 6% DE PEPSINA”**

TRABAJO DE TITULACIÓN

TIPO: TRABAJOS EXPERIMENTALES

Previa la obtención del título de:

INGENIERO EN INDUSTRIAS PECUARIAS

AUTOR

MYRIAM PILAR TENELEMA BUÑAY

Riobamba – Ecuador

2017

Este trabajo de titulación fue aprobado por el siguiente Tribunal

Ing. M.C. Alexandra Santillán.
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

BQF. Mg. Edwin Fernando Basantes Basantes.
DIRECTOR DE TRABAJO TITULACIÓN

Ing. M.C. Manuel Enrique Almeida Guzmán.
ASESOR DE TRABAJO TITULACIÓN

Riobamba, 15 de Agosto de 2017.

DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD

Yo, **Myriam Pilar Tenelema Buñay** con **C. I. 060457744-5**, declaro que el presente trabajo de titulación **“OBTENCIÓN DE COLAGENO DE LAS PATAS DE POLLO CON LA APLICACIÓN DE NIVELES DE 2, 4, 6% DE PEPSINA”**. Es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que proviene de otra fuente, están debidamente citados y referenciados.

Como autor, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo e titulación

Myriam Tenelema

060457744-5

Riobamba, 15 de Agosto de 2017.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por derramar bendiciones en mi ser, por darme acierto para empezar mi camino, dirección para progresar y perfección para alcanzar mis ideales.

A mis padres, María Antonia y Lorenzo, porque gracias a su cariño, guía y apoyo he llegado a realizar uno de los anhelos de la vida, fruto del inmenso apoyo, amor y confianza que en mí depositaron y con los cuales he logrado terminar mis estudios profesionales que constituyen el legado más grande que pudiera recibir y por lo cual les viviré eternamente agradecida.

A mis queridos hermanos que siempre han estado ahí para mí, brindándome su apoyo incondicional.

A mis amigos y compañeros por compartir tiempo, experiencia, detalles, penas y especialmente alegrías de nuestras vidas y en particular por brindarme su amistad franca.

A mis profesores, gracias por su tiempo, por su apoyo así como por la sabiduría que me transmitieron en el desarrollo de mi formación profesional.

Gracias a todos.

Myriam Tenelema

DEDICATORIA

A Dios

Porque gracias a las pruebas me ha hecho fuerte.

Las penas me ha hecho más humano.

Los fracasos me ha enseñado ser humilde.

Y en todo momento aunque creas que no

Dios siempre se mantiene a mi lado.

A mi papá y mamá

Sabiendo que jamás existirá una forma de agradecer
en esta vida de lucha y superación constante,
deseo expresarles que mis ideales, esfuerzos y
logros han sido también suyos y constituye el herencial
más grande que pudiera recibir.

Myriam Tenelema

CONTENIDO

	Pág.
Resumen	V
Abstract	VI
Lista de Cuadros	VII
Lista de Gráficos	VIII
Lista de Anexos	IX
I. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
A. SUBPRODUCTOS	3
1. <u>Definición</u>	3
2. <u>Subproductos de origen animal</u>	3
3. <u>Uso tradicional vs. Uso actual de subproductos alimenticios</u>	3
4. <u>Subproductos avícolas</u>	4
5. <u>Tipos de sub productos avícolas</u>	5
6. <u>Estructura Anatómica De La Pata De Pollo</u>	6
B. AMINOÁCIDOS	7
1. <u>Clasificación y consideraciones individuales de los aminoácidos</u>	8
2. <u>Enlace peptídico</u>	9
3. <u>Propiedades ácido-base y punto isoelectrico</u>	9
4. <u>Propiedades de los Aminoácidos</u>	10
C. PROTEÍNAS	11
2. <u>Estructura primaria</u>	13
3. <u>Estructura secundaria</u>	13
4. <u>Desnaturalización de la proteína</u>	16
5. <u>Estructura terciaria</u>	17
6. <u>Tipos de estructura terciaria</u>	17
D. EL COLÁGENO	17
1. <u>Estructura</u>	18
2. <u>Tipos de colágeno</u>	20
3 <u>Propiedades del colágeno</u>	22
a. Capacidad amortiguadora	22

b. Solubilidad	22
c. Desnaturalización	23
d. Especificidad	23
4. <u>Usos y aplicaciones del colágeno</u>	24
5. <u>Métodos de extracción</u>	24
6. <u>Beneficios del colágeno</u>	25
E. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA	26
1. <u>Hidrólisis Enzimática de Proteínas</u>	28
2. <u>Sustratos</u>	28
3. <u>Proteasas Comerciales</u>	29
4. <u>Propiedades Tecno-Funcionales</u>	30
F. ENZIMAS	32
1. <u>Estructura de los enzimas</u>	32
2. <u>Categorías de enzimas</u>	34
3. <u>Inhibición enzimática</u>	35
4. <u>Factores que afectan a la actividad enzimática</u>	36
5. <u>La pepsina</u>	38
6. <u>Función</u>	39
III. MATERIALES Y MÉTODOS	42
A. LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN DEL EXPERIMENTO	42
B. UNIDADES EXPERIMENTALES	42
C. MATERIALES, EQUIPOS E INSTALACIONES	42
1. <u>Instalaciones</u>	42
2. <u>Equipos</u>	43
3. <u>Materiales de Laboratorio</u>	43
4. <u>Materia prima e insumos</u>	43
D. TRATAMIENTO Y DISEÑO EXPERIMENTAL	44
E. MEDICIONES EXPERIMENTALES	45
F. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS Y PRUEBAS DE SIGNIFICANCIA	45
G. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	46
1. <u>Extracción de colágeno de patas de pollo</u>	46
H. METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN	48
1. <u>Determinación de Nitrógeno y Proteína Total, %</u>	48

2. <u>Determinación de la Densidad</u>	49
3. <u>Determinación del PH</u>	49
4. <u>Determinación de la Conductividad</u>	49
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
A. VALORACIÓN FÍSICO QUÍMICA	50
1. <u>Nitrógeno Total, %</u>	50
2. <u>Proteína Total, %</u>	51
3. <u>pH de colágeno</u>	52
4. <u>Densidad (g/mL)</u>	53
5. <u>Conductividad</u>	54
B. VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA	55
1. <u>Aerobios totales (UFC/mL)</u>	55
C. DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO	56
D. ANÁLISIS ECONÓMICO	56
1. <u>Costos de producción, dólares/ g</u>	56
2. <u>Beneficio/costo</u>	57
V. CONCLUSIONES	59
VI. RECOMENDACIONES	60
VII. LITERATURA CITADA	61

RESUMEN

En la Facultad de Ciencia Pecuarias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, se obtuvo colágeno de las patas de pollo con la aplicación de 2, 4 y 6% de pepsina, con tres repeticiones cada uno, distribuidos bajo un diseño completamente al azar, los resultados fueron analizados mediante análisis de varianza y la separación de medias según Tukey. Estableciendo que el empleo de pepsina afectó estadísticamente las características físico – químicos y microbiológicos del colágeno de las patas de pollo. Mostrándose que al aplicar el 6 % de pepsina, reportaron las mejores respuestas en nitrógeno total (13 %), mayor porcentaje de proteína (78%), densidad (0,37g/mL), una conductividad (20,48ms/cm) y menor cantidad de aerobios (42 UFC/g). En cuanto a la variable pH (5,28) del colágeno existió diferencias estadísticas pero esta disminuyó a medida que se incrementó los niveles de pepsina. Por lo que se recomienda utilizar el 6% de pepsina en la obtención de colágeno de las patas de pollo; ya que presentó las mejores características físico– químicos y microbiológicos.

Palabras claves:

Extracción, pepsina, colágeno, conductividad.

ABSTRACT

At the faculty of livestock Sciences from the Higher Polytechnic School of Chimborazo, collagen was obtained from the chicken legs with an application of 2%, 4% and 6% of Pepsin, with 3 repetitions each one, distributed under a completely random design. Analysis of variance and the division of means according to Tukey considered the results. Stating that the use of pepsin affects statistically the physical-chemical and microbiological characteristic of collagen from the chicken legs. It is shown that when applying 6% of pepsin, the best responses were reported in total nitrogen (13%), higher percentage of protein (78%), density (0.37g/mL), conductivity (20.48mS/cm), and less amount of aerobic (42 UFC/g). As for the variable pH (5.28) of collagen, there are statistical differences, but this decreased as the pepsin levels increased. Therefore it is recommended to use 6% of the pepsin in obtaining collagen from the chicken legs, since the best physical-chemical and microbiological characteristic were presented.

Keywords:

Extraction, Pepsin, Collagen, Conductivity.

LISTA DE CUADROS

Nº		Pág.
1	VARIACIÓN DE LA TEMPERATURA DE DESNATURALIZACIÓN (TD) CON EL TIEMPO DE CALENTAMIENTO.	16
2	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL DE LAS ENZIMAS.	27
3	ESQUEMA DEL EXPERIMENTO.	44
4	MATERIA PRIMA PARA LA EXTRACCIÓN DE COLÁGENO DE PATAS DE POLLO.	46
5	ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO Y MICROBIOLÓGICO DE COLÁGENO DE PATAS DE POLLO OBTENIDOS CON DISTINTOS NIVELES DE PEPSINA.	50
6	RENDIMIENTO DE COLÁGENO AL APLICARSE LOS DISTINTOS NIVELES DE PEPSINA.	56
7	ANÁLISIS ECONÓMICO DE LA OBTENCIÓN DE COLÁGENO DE PATAS DE POLLO APLICANDO NIVELES 2, 4 Y 6 % DE PEPSINA.	58

LISTA DE GRÁFICOS

Nº		Pág.
1	Anatomía de las extremidades inferiores de pollo.	6
2	Estructura de los aminoácidos.	7
3	Punto isoeléctrico de un aminoácido.	10
4	Estructura del colágeno.	19
5	Estructura triple hélice del colágeno del colágeno tipo I.	21
6	Estructura de las enzimas.	33
7	Estructura de las enzimas de acuerdo el efecto del Ph.	37
8	Estructura de las enzimas de acuerdo al efecto de la temperatura.	38
9	Comportamiento del contenido de nitrógeno total (%) del colágeno obtenido de las patas de pollo distintos niveles de pepsina.	51
10	Comportamiento del contenido de proteína (%) del colágeno obtenido de las patas de pollo distintos niveles de pepsina.	52
	Comportamiento del Potencial de Hidrogeno del colágeno	53
11	obtenido de las patas de pollo distintos niveles de pepsina.	
12	Comportamiento del contenido de densidad (g/mL) del colágeno obtenido de las patas de pollo distintos niveles de pepsina.	54
13	Comportamiento del contenido de conductividad (ms/cm) del colágeno obtenido de las patas de pollo distintos niveles de pepsina.	55

LISTA DE ANEXOS

Nº

- 1 Determinación del Nitrógeno Total, %
- 2 Determinación De Proteína Total, %
- 3 Análisis de datos del pH
- 4 Determinación de Densidad, (g/ml)
- 5 Determinación de conductividad, (ms/cm)

I. INTRODUCCIÓN

Los mataderos avícolas generan efluentes líquidos compuestos de grasas, proteínas y restos de animales. También generan los desechos sólidos, tales como: los huesos, las entrañas, patas, cabezas, piel y otros restos de carcasas. Comúnmente, gran parte de estos desechos no son utilizadas por estas empresas, a menudo son descartadas en los vertederos (Almeida, P. et al. 2012).

Según (Falla, L. 2006), los residuos y desechos de la industria de la carne, hacen referencia en especial, a todos aquellos órganos y tejidos o, partes de estos, que se obtienen en los centros de sacrificio y faenado de los animales destinados al consumo humano y en las salas de transformación de las carnes y, que, dadas sus características organolépticas o sanitarias, no son aptas para el consumo humano directo, Igualmente, con esta denominación se hace referencia a las aguas residuales producidas por estas mismas industrias.

La producción de carne de pollo, genera una gran cantidad de subproductos los cuales se utilizan para producir alimentos concentrados, principalmente. Sin embargo, estos subproductos son una fuente alta de proteína.

De acuerdo a Castro, D. (2016), se puede extraer entre el 1 y 1.6% de colágeno tipo I a partir de las crestas. También se pueden utilizar los miembros inferiores de estas aves (Figuerola, C. et al. 2016).

El colágeno es una proteína fibrosa que tiene numerosas aplicaciones principalmente en la industria farmacéutica y alimenticia. Esto es debido a sus propiedades físico-químicas y tienen la habilidad de formar geles térmicamente reversibles esto como lo reporta También puede ser usado como agente emulsificante, estabilizante, o para mejorar algunas características como textura y capacidad de retención de agua (Correa, M. et al. 2013).

Los estudios sobre fuentes alternativas y nuevas funcionalidades de colágeno ha experimentado un gran auge, en parte debido al creciente interés en la valoración económica de los subproductos industriales (desde la industria de la carne y el

pescado), y la búsqueda de las condiciones de procesamiento innovadoras, así como aplicaciones novedosas potenciales (Gomez, M. et al. 2011). Debido a esto, hoy en día también se obtiene colágeno a partir de patas de pollo siendo éste un sustituto de colágeno procedente de mamíferos tal como lo menciona Pronoto, Y. et al. (2007).

Los tejidos ricos en colágeno son importantes para estabilizar las emulsiones y proporcionar propiedades de textura en las hamburguesas, salchichas, salchichas y mortadelas. La molécula de colágeno es de 60% hidrófobo y durante el procesamiento de carne a temperaturas de 60 a 65 ° C, las fibras colágenas comienzan a reducir el tamaño, distorsionar y gelatinizar, convirtiéndose capaz de encapsular la grasa. Por ejemplo, para la obtención de hidrolizados con propiedades gelificantes y emulsificantes se suelen emplear colágeno por su capacidad para formar geles transparentes (Basurto, C. y Grijalva, E. 2015).

Con la extracción selectiva de este tipo de proteínas consideramos que es posible generar valor agregado a la cadena productiva avícola (Castro, D. 2016). Además del factor económico está el factor ambiental al reducir o eliminar los residuos que en otro caso recibiría el entorno (Pacheco, C. y Dominguez, M. 2010).

Por lo tanto en la presente investigación se plantea los siguientes objetivos:

- Evaluar el porcentaje de proteína colagénica obtenida de las patas de pollo
- Determinar las propiedades físico químicas del colágeno como pH, densidad, y conductividad
- Cuantificar los aerobios totales UFC/g presentes en el colágeno extraído de las patas de pollo
- Establecer su rentabilidad a través del análisis del indicador beneficio/costo

II. REVISIÓN DE LITERATURA

A. SUBPRODUCTOS

1. Definición

Un subproducto es un producto secundario o incidental, generalmente útil y comercializable, derivado de un proceso de manufactura o reacción Química, que no es el producto primario o el servicio que se produce.

Se llama también subproducto, al desecho de un proceso que se le puede sacar una segunda utilidad. No es un desecho Porque no se elimina, y se usa para otro proceso distinto (Pacheco, C. y Dominguez, M. 2010).

2. Subproductos de origen animal

La cadena de producción y distribución de alimentos y productos de origen de animal genera, a lo largo de los procesos (desde la cría de animales a la comercialización de carnes o pescados, pasando por el sacrificio y despiece de las canales), toda una serie de subproductos que han sido tradicionalmente utilizados para una infinidad de usos (Pacheco, C. y Dominguez, M. 2010).

3. Uso tradicional vs. Uso actual de subproductos alimenticios

Los procedimientos tradicionales y comunes del empleo de subproductos de la industria alimentaria son la alimentación del ganado, como fertilizantes, o como sustratos agrícolas. Sin embargo, estos usos no aportan el valor que la empresa alimentaria necesita para reforzar su competitividad, y menos teniendo en cuenta que los subproductos son una fuente corroborada de compuestos de alto valor, como la fibra, los ácidos grasos esenciales, los minerales, etc.

Existe una gran diferencia entre considerar estos productos como residuos, en cuyo caso acabarán en una zona controlada, a gestionarlos como subproductos, donde se puede obtener un beneficio económico derivado de esta gestión. Por lo

tanto, los subproductos pueden utilizarse para:

- La extracción de sustancias de alto valor añadido, como esencias.
- Alimentación animal
- La obtención de compost
- El aprovechamiento energético
- Elaboración de nuevos alimentos y obtención de materias primas.

4. Subproductos avícolas

Los residuos sólidos provenientes de los mataderos se desperdician diariamente. Los cuales están estrechamente ligada a diversos factores técnicos y socioeconómicos inherentes a la región en la que se encuentre localizado el centro de sacrificio y a las condiciones técnicas, propias de cada matadero. También se resalta el hecho de que en el país no existen políticas definidas sobre el manejo de los desechos del faenado, ni entidad oficial o privada que normalice sobre ellos. Situaciones similares han podido ser observadas por algunos organismos internacionales como la FAO, en otros países de América Latina (Falla, L. 2006).

Las patas de pollo representan el 4% del peso original del ave. Dentro de su composición contiene 20% de colágeno el cual puede ser utilizado en diferentes aplicaciones industriales. Es interesante conocer esta alternativa de aprovechamiento para la utilización de las patas de pollo. Esta proteína es soluble en agua se obtiene mediante la hidrólisis del colágeno que es la proteína que se encuentra en el tejido conectivo de la piel, tendones, huesos y cartílagos.

El rendimiento de la producción de colágeno y su calidad depende de la edad del animal. De la fuente de materia prima y del proceso empleado en su fabricación. La calidad está influenciada por el tiempo, temperatura, pH, grado de molienda, carga bacteriana, presencia de impurezas y aditivos que sean empleados en el proceso de extracción del colágeno. Los huesos y en especial las patas de pollo como materia prima para este fin deben seguir el mismo cuidado higiénico-

sanitario que se da las canales.

Una de las principales propiedades del colágeno es su habilidad de formar geles, expresándose como poder gelificante en grados o valor Bloom; mientras más elevado sea más sólido es el gel que se producen en condiciones normalizadas o meno es la cantidad de colágeno que ha de utilizarse para producir un gel normalizado (Laboratorio de Alimentos de Origen Animal, Fundacion CIEPE, 2001).

5. Tipos de sub productos avícolas

Dentro de las posibilidades de reciclamiento de los subproductos avícolas los diferentes residuos pueden ser aprovechados separadamente. Así, se realizan por un lado extracciones de lípidos, vísceras, cabezas y patas las cuales proveen grasa y proteína (que será convertida en harina) con un mercado atractivo. Por otro lado se aprovecha la sangre para producir harina y las "mortalidades" (aves muertas) que pueden ser también procesadas. La única limitante para el procesamiento de las mortalidades es la pluma, por lo cual se requiere aumentar demasiado la temperatura en detrimento del aprovechamiento del resto del animal (Mendoza, R. 2010).

a. Plumas

La pluma es una estructura epidérmica, lo que quiere decir que se deriva de la piel. Se ha mencionado que el antecesor inmediato de las plumas son las escamas de los reptiles, pues crecen de la misma manera y están formadas de la misma sustancia, la queratina, que es la proteína que forma las uñas, el pelo y las escamas en otros grupos de vertebrados. El hecho de que las plumas estén compuestas de este material les permite tener características ventajosas, como mayor duración y resistencia a los efectos del medio (Instituto Latinoamericano de la Comunicación Educativa, ILCE. 2009)

b. Gallinaza

Es un residuo, pero también es considerado como un producto valioso por sus

posibles aplicaciones. Con la transformación de la gallinaza por medio de los diferentes tratamientos se generan una alternativa para darle valor agregado a un residuo orgánico abundante y mitigar el impacto ambiental negativo que este puede ocasionar cuando no se procesa, debido a una mala utilización o disposición (Mullo, I. 2012).

c. Vísceras

Los despojos que se encuentren en las cavidades torácicas, abdominales y pélvicas, incluyendo la tráquea y el esófago.

6. Estructura Anatómica De La Pata De Pollo

Como se observa en el Gráfico 1.

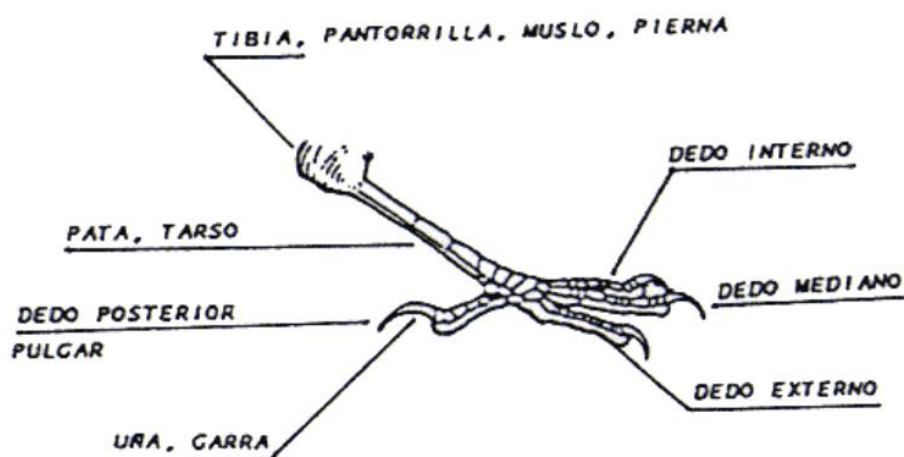


Grafico 1. Anatomía de las extremidades inferiores de pollo.

Miembros inferiores:

Formados por tres núcleos de osificación:

- Fémur: hueso del muslo. Presenta una cámara de aire en su interior y está dirigido oblicuamente de atrás hacia delante.
- Rótula: formada por el seno de los tendones de la pata, situada en la parte anterior de la rodilla.
- Tibia y peroné: la tibia es el hueso de la pierna, es vigoroso y resistente. El

peroné es un hueso fino, rudimentario y parcialmente soldado, que se adosa a la cara externa de la tibia (Pareja, M. 2008).

B. AMINOÁCIDOS

Según Castelblanque, E. (2015), los aminoácidos son denominados como la unidad estructural de las proteínas. Están formados por un grupo carboxilo libre (-COOH), un grupo amino (-NH₂) y un radical (R) que identifica a los diferentes aminoácidos (Gráfico 2).

En la naturaleza existen más de 300 aminoácidos diferentes, pero solo 20 de ellos se encuentran codificados en el DNA y por tanto son los constituyentes de las proteínas en donde se encuentran contenidos en distintas proporciones (Rodríguez, L. 2011).

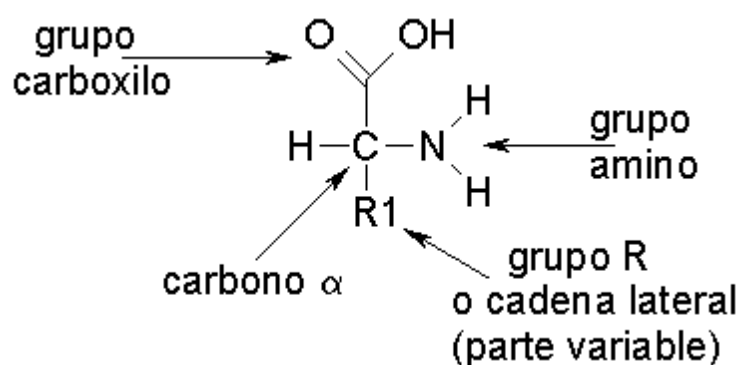


Gráfico 2: Estructura de los aminoácidos

Todos los 20 aminoácidos encontrados en las proteínas son α-aminoácidos, es decir poseen un grupo amino y un grupo carboxilo unidos a un mismo carbono, que por convención se denomina carbono α, siendo este entonces, el carbono contiguo al grupo carboxilo. Al carbono alfa se unen otros dos sustituyentes, uno de ellos es un átomo de hidrógeno y el otro es el denominado grupo R, el cual es diferente en cada uno de los aminoácidos y es el responsable de otorgarle las propiedades características a cada uno de ellos. En resumen, cualquier aminoácido se encuentra formado por un carbono al cual se unen 4 sustituyentes: un grupo amino, un grupo carboxilo, un hidrógeno y un grupo R (Rodríguez, F. 2011).

Las propiedades de los aminoácidos dependen de sus funciones carboxílicas y aminas, así como de la característica de la cadena presente en el radical. Existen algunos aminoácidos que forma parte de algunos de proteínas como fibrosas como hidroxiprolina que se encuentra únicamente en el colágeno

1. Clasificación y consideraciones individuales de los aminoácidos

Los 20 aminoácidos pueden clasificarse de muy diversas formas, sin embargo dos de las más utilizadas son la clasificación en base a su obtención por el organismo y la clasificación en base a las propiedades de sus grupos R. De acuerdo a su obtención por el organismo Se clasifican en esenciales y no esenciales. Se denominan esenciales a aquellos aminoácidos que no pueden ser sintetizados de nuevo por un organismo vivo; en el caso de los seres humanos se trata de 10 aminoácidos, de los cuales algunos solo son realmente esenciales en determinadas condiciones como la lactancia, los periodos de crecimiento celular y la enfermedad (Rodríguez, F. 2011), por lo que de acuerdo a su obtencion por el organismo se tienen:

- Esenciales: Valina, Leucina, Treonina, Lisina, Triptófano, Histidina , Fenilalanina, Isoleusina, Arginina y Metionina
- No Esenciales: Alanina, Prolina, Glisina, Serina, Cisteína, Asparagina, Glutamina, Tirosina , Aspartato y Glutamato

Rodríguez, L. (2011), señala que los grupos R son los responsables de las características particulares de cada aminoácido. Esta clasificación se fundamenta básicamente en la polaridad de los grupos R y clasifica a los 20 aminoácidos en 5 grupos:

- Apolares o alifáticos
- Aromáticos
- Polares sin carga
- Polares con carga positiva

- Polares con carga negativa

2. Enlace peptídico

Los aminoácidos se encuentran unidos linealmente por medio de uniones peptídicas. Estas uniones se forman por la reacción de síntesis (vía deshidratación), entre el grupo carboxilo del primer aminoácido con el grupo amino del segundo aminoácido. La formación del enlace peptídico entre dos aminoácidos es un ejemplo de una reacción de condensación. Dos moléculas se unen mediante un enlace de tipo covalente CO-NH con la pérdida de una molécula de agua y el producto de esta unión es un dipéptido. El grupo carboxilo libre del dipéptido reacciona de modo similar con el grupo amino de un tercer aminoácido, y así sucesivamente hasta formar una larga cadena. Podemos seguir añadiendo aminoácidos al péptido, porque siempre hay un extremo NH₂ terminal y un COOH terminal (Rodríguez, L. 2012).

3. Propiedades ácido-base y punto isoeléctrico

Los grupos amino y carboxilo, así como los grupos R de los aminoácidos son grupos ionizables que actúan como ácidos o bases débiles. El pKa del grupo carboxilo de los aminoácidos es de aproximadamente 2 y el pKa del grupo amino de aproximadamente 10; debe recordarse que el pKa de un ácido es el valor de pH en el cual existe igual concentración de la especie dadora de electrones como de la especie aceptora de electrones o dicho de otra forma, igual concentración de la forma protonada y desprotonada; por consiguiente, por debajo del valor de pKa predominará la forma protonada y por encima de este la forma desprotonada.

Debido a lo anterior a un valor de pH fisiológico el grupo carboxilo habrá perdido un protón (COO⁻), mientras que el grupo amino se encontrará aun protonado (NH₃⁺); si se considera la glicina cuyos únicos grupos ionizables son el grupo carboxilo y el grupo amino a pH neutro la glicina se encontrará en solución en forma de zwitterion, definido como el ión dipolar de un aminoácido que se forma al disolverse en agua.

Un aminoácido puede actuar como ácido (el grupo amino puede donar un protón) y como base (el grupo carboxilo puede aceptar un protón); por tanto los aminoácidos son sustancias anfóteras (sustancias que pueden reaccionar como ácidos o como bases), más a menudo denominadas anfóteros (anfóteros que son sustancias iónicas). Un concepto de vital importancia al considerar las propiedades eléctricas de los aminoácidos es el de punto isoeléctrico (pI); el cual puede ser definido como el valor de pH al cual un aminoácido tiene carga neta 0. (Gráfico 3)

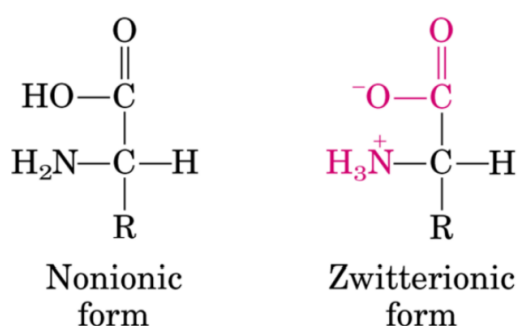


Gráfico 3. Punto isoeléctrico de un aminoácido

El punto isoeléctrico pI de un aminoácido coincide con la forma zwitterionica de este, por consiguiente puede afirmarse que un aminoácido tiene carga positiva a un pH por debajo de su pI y tiene carga negativa a un pH por encima de su pI debido a que por debajo del pI predomina la especie protonada (cargada positivamente) y por encima predomina la especie desprotonada (cargada negativamente). Todos los aminoácidos poseen una forma zwitterionica, sin embargo en el caso de los aminoácidos con un grupo R ionizable, el establecimiento de la forma zwitterionica se verá influenciado por las características de cada grupo R en particular (Rodríguez, L. 2012).

4. Propiedades de los Aminoácidos

Son sustancias incoloras, posee el punto de fusión elevado. Las propiedades de los aminoácidos influyen directamente en las propiedades que presentan las proteínas. Los aminoácidos pueden presentarse como ácido o como base dependiendo del PH que posee el medio en el que se encuentra (Castelblanque, E. 2015).

C. PROTEÍNAS

Las proteínas son las biomoléculas más complejas, de todas las moléculas a nivel celular, además son las más abundantes y se encuentran en todas las células. Todas las proteínas están compuestas por hidrogeno, carbono, oxígeno y nitrógeno. Algunas presenta azufre y dependiendo de su constitución también pueden contener fosforo, hierro, zinc y molibdeno. La mayor parte de las proteínas son solubles en agua o soluciones salinas y son muy poco solubles en disolventes orgánicos (Castelblanque, E. 2015).

Todas las proteínas poseen una misma estructura química central, que consiste en una cadena lineal de aminoácidos. Lo que hace distinta a una proteína de otra es la secuencia de aminoácidos de que está hecha, a tal secuencia se conoce como estructura primaria de la proteína. La estructura primaria de una proteína es determinante en la función que cumplirá después, así las proteínas estructurales (como aquellas que forman los tendones y cartílagos) poseen mayor cantidad de aminoácidos rígidos y que establezcan enlaces químicos fuertes unos con otros para dar dureza a la estructura que forman.

Sin embargo, la secuencia lineal de aminoácidos puede adoptar múltiples conformaciones en el espacio que se forma mediante el plegamiento del polímero lineal. Tal plegamiento se desarrolla en parte espontáneamente, por la repulsión de los aminoácidos hidrófobos por el agua, la atracción de aminoácidos cargados y la formación de puentes disulfuro y también en parte es ayudado por otras proteínas.

Así, la estructura primaria viene determinada por la secuencia de aminoácidos en la cadena proteica, es decir, el número de aminoácidos presentes y el orden en que están enlazados y la forma en que se pliega la cadena se analiza en términos de estructura secundaria. Además, las proteínas adoptan distintas posiciones en el espacio, por lo que se describe una tercera estructura. La estructura terciaria, por tanto, es el modo en que la cadena polipeptídica se pliega en el espacio, es decir, cómo se enrolla una determinada proteína. Así mismo, las proteínas no se

componen, en su mayoría, de una única cadena de aminoácidos, sino que se suelen agrupar varias cadenas poli peptídicas (o monómeros). A esto se llama estructura cuaternaria de las proteínas, a la agrupación de varias cadenas de aminoácidos (o polipéptidos) en complejos macromoleculares mayores (Castelblanque, E. 2015).

Por tanto, podemos distinguir cuatro niveles de estructuración en las proteínas:

- Estructura primaria
- Estructura secundaria
- Estructura terciaria
- Estructura cuaternaria

Los enlaces que determinan la estructura primaria son covalentes (enlace amida o enlace peptídico), mientras que la mayoría de los enlaces que determinan la conformación (estructuras secundaria y terciaria) y la asociación (estructura cuaternaria y quinaria) son de tipo no covalente.

De Acuerdo a Guillén, V. (2010), las proteínas se clasifican en:

- a. Proteínas simples: Albúminas, Glutelinas, Prolaminas, Histonas, Protaminas.
- b. Proteínas compuestas: Nucleoproteínas, Glucoproteínas, Fosfoproteínas, Cromoproteínas, Lipoproteínas.

a) Por su conformación

Es la orientación que adoptan los grupos característicos que forman las proteínas en el espacio.

- Fibrosas

Son cadenas polipeptídicas paralelas que se enrollan sobre un mismo eje formando una "microfibra". Las proteínas fibrosas son los componentes

principales del tejido conjuntivo en los seres vivos.

- Colágeno
- Elastina
- Queratinas

2. Estructura primaria

La estructura primaria viene determinada por la secuencia de aminoácidos en la cadena proteica, es decir, el número de aminoácidos presentes y el orden en que están enlazados. Las posibilidades de estructuración a nivel primario son prácticamente ilimitadas. Como en casi todas las proteínas existen 20 aminoácidos diferentes, el número de estructuras posibles viene dado por las variaciones con repetición de 20 elementos tomados de n en n , siendo n el número de aminoácidos que componen la molécula proteica.

Como consecuencia del establecimiento de enlaces peptídicos entre los distintos aminoácidos que forman la proteína se origina una cadena principal o "esqueleto" a partir del cual emergen las cadenas laterales de los aminoácidos. Los átomos que componen la cadena principal de la proteína son el N del grupo amino (condensado con el aminoácido precedente), el C α (a partir del cual emerge la cadena lateral) y el C del grupo carboxilo que se condensa con el aminoácido siguiente. Por lo tanto, la unidad repetitiva básica que aparece en la cadena principal, de una proteína es: $-\text{NH}-\text{C}\alpha-\text{CO}-$ (Guillén, V. 2010).

3. Estructura secundaria

La estructura secundaria de las proteínas es el plegamiento que la cadena polipeptídica adopta gracias a la formación de puentes de hidrógeno entre los átomos que forman el enlace peptídico. Los puentes de hidrógeno se establecen entre los grupos $-\text{CO}-$ y $-\text{NH}-$ del enlace peptídico (el primero como aceptor de H, y el segundo como donador de H). De esta forma, la cadena polipeptídica es capaz de adoptar conformaciones de menor energía libre, y por tanto, más estables (Castelblanque, E. 2015).

a. Hélice alfa

En esta estructura la cadena. Esta estructura se mantiene gracias a los enlaces de hidrógeno intracatenarios formados entre el grupo -NH de un enlace peptídico y el grupo -C=O del cuarto aminoácido que le sigue.

Cuando la cadena polipeptídica se enrolla en espiral sobre sí misma debido a los giros producidos en torno al carbono alfa de cada aminoácido se adopta una conformación denominada hélice. Esta estructura es periódica y en ella cada enlace peptídico puede establecer dos puentes de hidrógeno, un puente de hidrógeno se forma entre el grupo -NH- del enlace peptídico del aminoácido en posición n y el grupo -CO- del enlace peptídico del aminoácido situado en posición $n-4$. El otro puente de hidrógeno se forma entre el grupo -CO- del enlace peptídico del AA en posición n y el grupo -NH- del enlace peptídico del AA situado en posición $n+4$. Cada vuelta de la hélice tiene un paso de rosca de 0,54 nm. Las cadenas laterales de los aminoácidos se sitúan en la parte externa del helicoide, lo que evita problemas de impedimentos estéricos.

En consecuencia, esta estructura puede albergar a cualquier aminoácido, a excepción de la prolina, no tiene libertad de giro, por estar integrado en un heterociclo. Por este motivo, la prolina suele determinar una interrupción en la conformación en hélice. Los aminoácidos muy polares (Lys, Glu) también desestabilizan la hélice a porque los enlaces de hidrógeno pierden importancia frente a las interacciones electrostáticas de atracción o repulsión. Por este motivo, la estructura en hélice es la que predomina a valores de pH en los que los grupos ionizables no están cargados (Castelblanque, E. 2015).

b. Hoja beta

Cuando la cadena principal de un polipéptido se estira al máximo que permiten sus enlaces covalentes se adopta una configuración espacial denominada estructura, que suele representarse como una flecha. En esta estructura las cadenas laterales de los aminoácidos se sitúan de forma alternante a la derecha y a la izquierda del esqueleto de la cadena polipeptídica. Las estructuras β de

distintas cadenas polipeptídicas o bien las estructuras β de distintas zonas de una misma cadena polipeptídica pueden interactuar entre sí mediante puentes de hidrógeno, dando lugar a estructuras laminares llamadas por su forma hojas plegadas u hojas β (Guillén, V. 2010).

c. Giros beta

Secuencias de la cadena polipeptídica con estructura alfa o beta, a menudo están conectadas entre sí por medio de los llamados giros beta. Son secuencias cortas, con una conformación característica que impone un brusco giro de 180 grados a la cadena principal de un polipéptido

Aminoácidos como Asn, Gly y Pro (que se acomodan mal en estructuras de tipo α o β aparecen con frecuencia en este tipo de estructura. La conformación de los giros β está estabilizada generalmente por medio de un puente de hidrógeno entre los residuos 1 y 4 del giro β (Guillén, V. 2010).

d. Hélice de colágeno

Es una variedad particular de la estructura secundaria, característica del colágeno. El colágeno es una importante proteína fibrosa presente en tendones y tejido conectivo con función estructural ya que es particularmente rígida. Presenta una secuencia típica compuesta por la repetición periódica de grupos de tres aminoácidos. El primer aminoácido de cada grupo es Gly, y los otros dos son Pro (o hidroxiprolina) y un aminoácido cualquiera: $-(G-P-X)$.

La frecuencia periódica de la Prolina condiciona el enrollamiento peculiar del colágeno en forma de hélice levógira. La glicina, sin cadena lateral, permite la aproximación entre distintas hélices, de forma que tres hélices levógiras se asocian para formar un helicoide dextrógiro (Guillén, V. 2010).

e. Láminas beta o láminas plegadas

Son regiones de proteínas que adoptan una estructura en zigzag y se asocian

entre sí estableciendo uniones mediante enlaces de hidrógeno intercatenarios. Todos los enlaces peptídicos participan en estos enlaces cruzados, confiriendo así gran estabilidad a la estructura. La forma en beta es una conformación simple formada por dos o más cadenas polipeptídicas paralelas (que corren en el mismo sentido) o antiparalelas (que corren en direcciones opuestas) y se adosan estrechamente por medio de puentes de hidrógeno y diversos arreglos entre los radicales libres de los aminoácidos. Esta conformación tiene una estructura laminar y plegada, a la manera de un acordeón (Castelblanque, E. 2015).

4. Desnaturalización de la proteína

Para caracterizar de una forma completa el proceso de desnaturalización de una proteína es necesario conocer algunos parámetros característicos, como son temperatura, entalpia y entropía de desnaturalización. Si se tiene en cuenta que la temperatura de desnaturalización de una proteína se define como aquella temperatura a la que se ha desnaturalizado el 50 % de las moléculas lo que corresponde a un 50 % de variación de la viscosidad reducida, es posible calcular la temperatura de desnaturalización del colágeno representando el porcentaje de disminución de la viscosidad reducida frente a la temperatura y determinando, en la gráfica así obtenida, la temperatura a la que se ha producido el 50 % de disminución como se muestra en el cuadro 1.

Donde muestran la gran dependencia entre el valor de la temperatura de desnaturalización y el tiempo de calentamiento, observándose que al aumentar éste disminuye la temperatura de desnaturalización. Se hace, pues, necesario, al hablar de una temperatura de desnaturalización, especificar la temperatura de calentamiento a la que ha sido obtenida (Bonmatí, L. y León, A. 2009).

Cuadro 1. VARIACIÓN DE LA TEMPERATURA DE DESNATURALIZACIÓN (TD) CON EL TIEMPO DE CALENTAMIENTO

t(min)	5	10	15	20	30	45	60	90
T(°C)	37,63	37,21	36,95	36,75	36,42	36,13	36,98	35,95

Fuente: Bonmatí, L. y León, A. (2009).

5. Estructura terciaria

Se llama estructura terciaria a la disposición tridimensional de todos los átomos que componen la proteína, concepto equiparable al de conformación absoluta en otras moléculas. La estructura terciaria de una proteína es la responsable directa de sus propiedades biológicas, ya que la disposición espacial de los distintos grupos funcionales determina su interacción con los diversos ligandos. Para las proteínas que constan de una sola cadena polipeptídica (carecen de estructura cuaternaria), la estructura terciaria es la máxima información estructural que se puede obtener (Castelblanque, E. 2015).

6. Tipos de estructura terciaria

Se distinguen dos tipos de estructura terciaria:

a. Proteínas Con estructura terciaria de tipo fibroso

En las que una de las dimensiones es mucho mayor que las otras dos. Son ejemplos el colágeno, la queratina del cabello o la fibroína de la seda, En este caso, los elementos de estructura secundaria (hélices a u hojas b) pueden mantener su ordenamiento sin recurrir a grandes modificaciones, tan sólo introduciendo ligeras torsiones longitudinales, como en las hebras de una cuerda.

b. Proteínas con estructura terciaria de tipo globular

Son más frecuentes, en las que no existe una dimensión que predomine sobre las demás, y su forma es aproximadamente esférica. (Guillén, V. 2010)

D. EL COLÁGENO

Los colágenos son las proteínas más abundantes en los mamíferos, y llegan a constituir hasta una tercera parte del contenido proteico de un animal. Los colágenos son moléculas, homo y heterotriméricas, compuestas por tres cadenas polipeptídicas denominadas cadenas α . El término genérico "colágeno" engloba a una super familia de proteínas que, en vertebrados, está constituida por una

veintena de moléculas diferentes o más de una treintena de cadenas polipeptídicas genéticamente distintas (Peralta, C. et al. 2012).

Este es el caso del colágeno de tipo I, que constituye el 90 % del colágeno corporal. Su estructura, una triple hélice rígida que se asocia formando fibras que pueden ser visualizadas por microscopía electrónica, ha sido durante años el modelo de esta molécula. Los tejidos que requieren soportar fuerzas mecánicas, como la piel, el tendón y el hueso, son ricos en colágenos fibrilares y colágenos asociados a fibras (Peralta, C. et al. 2012).

El colágeno de tipo I, que proporciona elasticidad a la piel, es también crucial para la interacción con los cristales de hidroxapatito en la formación de la matriz ósea. Sin embargo, las propiedades lubricantes del cartílago se deben a las fibras de colágeno de tipo II, que forman un soporte básico al cual se anclan los proteoglicanos (Lizarbe, A. 2008).

La Gelatina es un producto sólido de naturaleza proteica que se extrae por hidrólisis parcial del colágeno contenido en la piel, tejido conjuntivo y de la oseína contenida en los huesos de los animales (Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN. 2014).

1. Estructura

El colágeno es una proteína estructural, organizada en redes fibrosas, que refuerza, sostiene y da forma y resistencia a todos los tejidos y órganos. Su estructura está constituida por tres cadenas alfa de polipéptidos con un conjunto de enlaces de hidrógeno entre las cadenas individuales. Estas tres cadenas polipeptídicas de aproximadamente unos 1000 aminoácidos cada una, aparecen entrelazadas formando una triple hélice muy compacta de 300 nm de longitud y 1,5 nm de diámetro (López, M. et al. 2008).

El 30% de los residuos de aminoácidos que constituyen la triple hélice son de glicina y se ubican en posición axial. En cambio, los de hidroxiprolina y de hidroxilisina (25%) se ubican en el exterior. La importancia de los residuos de

glicina consiste en que su grupo R, un átomo de hidrógeno, ocupa muy poco espacio y por ello permite que las tres cadenas polipeptídicas se aproximen (López, M. et al. 2008).

La unidad básica estructural del colágeno es el tropocolágeno (Gráfico 4), constituido por tres cadenas polipeptídicas del mismo tamaño y de composición idéntica o no, según el tipo de colágeno. Las tres cadenas alfa tienen sus extremos alineados y, aunque la forma helicoidal se extiende a lo largo de la mayoría de la molécula, hay regiones en los extremos amino y carboxilo terminales, que implican a unos 15-20 aminoácidos, que no son helicoidales perdiéndose por tanto la estructura de triple hélice (López, M. et al. 2008).

Estas regiones, conocidas como telopéptidos, son susceptibles de proteólisis, mientras que la triple hélice resiste al ataque de la mayoría de enzimas proteolíticas y en la forma nativa sólo es digerida por colagenasas específicas.

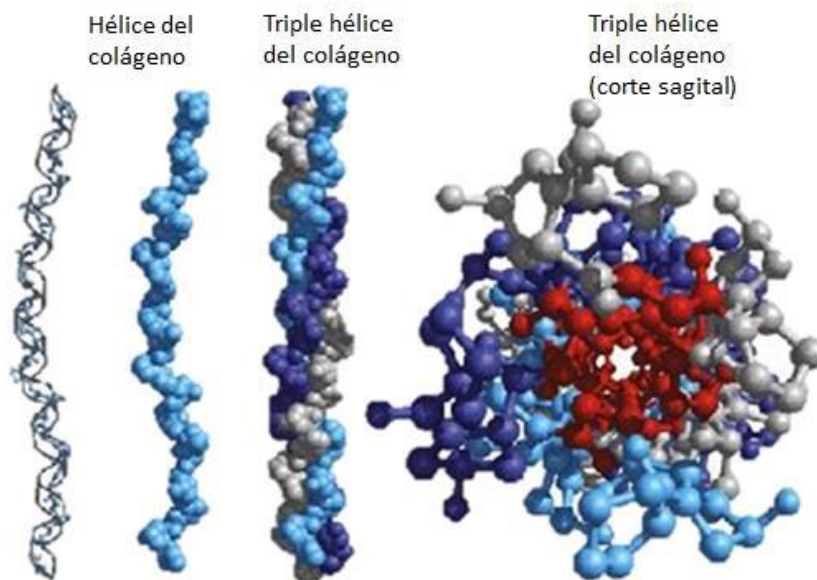


Gráfico 4. Estructura del colágeno,

Las cadenas de polipéptidos son muy largas (aproximadamente unos 1000 aminoácidos) y el peso molecular es de más de 100.000 Da. Las hélices de colágeno se disponen en grupos pequeños denominados fibrillas. Cada fibrilla de

colágeno se dispone paralelamente y está constituida por miles de moléculas de tropocolágeno. Estas fibras de colágeno tienden a agruparse en conjuntos más grandes llamados haces. Los haces de fibras de colágeno miden habitualmente entre 15 y 30 micras, aunque los hay también más finos y más gruesos. Las fibras de colágeno se estabilizan por enlaces covalentes cruzados (Castelblanque, E. 2015).

2. Tipos de colágeno

Existen 28 tipos diferentes de colágeno, diferenciados por su tamaño, localización y función. Dentro de estos 28, 1 no se encuentra en los seres humanos y muchos otros son verdaderamente escasos. El más común abundante en cuerpo humano se define como colágeno tipo I. En la industria, los más utilizados son el colágeno tipo I y el tipo II. El colágeno tipo I normalmente sirve para ofrecer soporte a la dermis y por esto es ampliamente usado en productos cosméticos. El tipo II, es uno de los principales componentes de los cartílagos, y actualmente se utiliza en dietas para tratar enfermedades relacionadas con las articulaciones, como la osteoartritis (Shoulders, M. y Raines, R. 2009).

a. El colágeno tipo I

Se encuentra principalmente en la dermis, y es extraído de la piel del ganado bovino y porcino. Entre los diversos tipos, el más abundante es el colágeno tipo I. Este colágeno se caracteriza porque la triple hélice está constituida por dos cadenas $\alpha 1$ idénticas y una segunda cadena denominada $\alpha 2$, que tiene una secuencia de aminoácidos distinta. Cada una de las tres cadenas alfa que componen el monómero de colágeno (tropocolágeno) tiene una secuencia de aminoácidos, la cual es un triplete que se repite (Shoulders, M. y Raines, R. 2009).

Esta estructura particular es una secuencia de Gly-X-Y, donde Gly es la glicina, frecuentemente la posición "X" está ocupada por la prolina, y la posición "Y" por la hidroxiprolina. Lo que caracteriza al colágeno es esa secuencia repetitiva y la gran proporción que tiene de glicina, prolina e hidroxiprolina. La estabilidad térmica del

colágeno, así como las propiedades físicas de la gelatina dependen del contenido de los aminoácidos prolina e hidroxiprolina, que son cruciales para la estabilización de la estructura de triple hélice, y con la distribución del peso molecular, que se debe principalmente a las condiciones de procesamiento.

El contenido de estos aminoácidos determina la temperatura de transición de la estructura helicoidal y está vinculada a la ruptura de los enlaces de hidrógeno inter e intramoleculares (Gráfico 5). Sin embargo, aunque la prolina es importante, la hidroxiprolina se cree que juega un papel singular en la estabilización de la hélice de triple del colágeno debido a su capacidad de formar enlaces de hidrógeno a través de su grupo OH. Por otra parte, también se ha observado que la secuencia total de Gly-X-Y es uno de los factores que afectan a la estabilidad térmica del colágeno (Castelblanque, E. 2015).

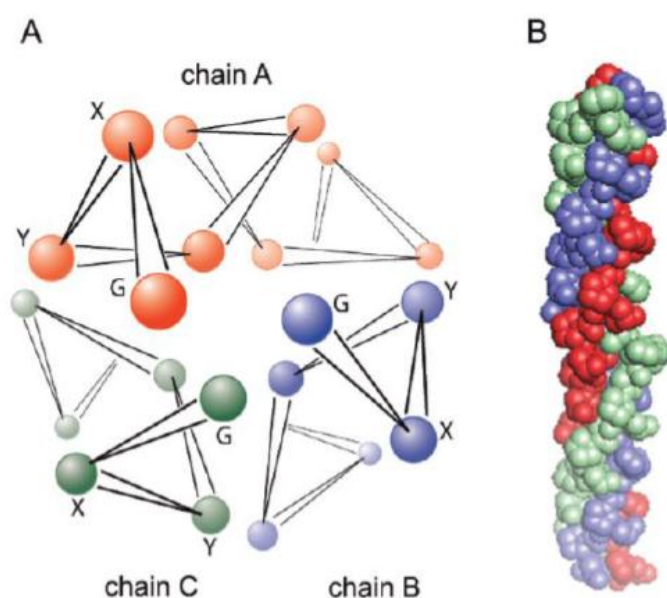


Grafico 5. Estructura triple hélice del colágeno del colágeno tipo I

Estructura triple hélice del colágeno (A) Vista a lo largo del eje molecular que muestra las trayectorias de las cadenas polipeptídicas individuales y las ubicaciones de los residuos en el triplete de aminoácidos que se repiten frecuentemente en el colágeno donde G es glicina, normalmente X es prolina e Y hidroxiprolina, (B) Tres cadenas de aminoácidos se enrollan entre ellas formando esta molécula con estructura cuaternaria denominada tropocolágeno.

La composición de los aminoácidos que puede ser determinada en el colágeno es la siguiente: ácido aspártico, treonina, serina, ácido glutámico, glicina, alanina, cisteína, valina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina, hidroxilisina, lisina, histidina, arginina, hidroxiprolina y prolina (Castelblanque, E. 2015).

b. El colágeno tipo II

Al ser uno de los principales componentes del cartílago, se extrae de cartílagos de pollo y tiburón. Los otros tipos de colágeno se obtienen de diferentes partes de los animales, pero esencialmente de los animales ya antes mencionados (Castelblanque, E. 2015).

3 Propiedades del colágeno

a. Capacidad amortiguadora

Las proteínas tienen un comportamiento anfótero y esto las hace capaces de neutralizar las variaciones de pH del medio, ya que pueden comportarse como un ácido o una base y por tanto liberar o retirar protones (H⁺) del medio donde se encuentran (Serrano, J. 2011).

b. Solubilidad

Las proteínas son solubles en agua cuando adoptan una conformación globular. La solubilidad es debida a los radicales (-R) libres de los aminoácidos que, al ionizarse, establecen enlaces débiles (puentes de hidrógeno) con las moléculas de agua. Así, cuando una proteína se solubiliza queda recubierta de una capa de moléculas de agua (capa de solvatación) que impide que se pueda unir a otras proteínas lo cual provocaría su precipitación (insolubilización). Esta propiedad es la que hace posible la hidratación de los tejidos de los seres vivos (Serrano, J. 2011).

c. Desnaturalización

La desnaturalización de una proteína se refiere a la ruptura de los enlaces que mantenían sus estructuras cuaternaria, terciaria y secundaria, conservándose solamente la primaria. En estos casos las proteínas se transforman en filamentos lineales y delgados que se entrelazan hasta formar compuestos fibrosos e insolubles en agua.

Los agentes que pueden desnaturalizar a una proteína pueden ser: calor excesivo; sustancias que modifican el pH; alteraciones en la concentración; alta salinidad; agitación molecular; etc. El efecto más visible de éste fenómeno es que las proteínas se hacen menos solubles o insolubles y que pierden su actividad biológica (Serrano, J. 2011).

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

La temperatura de desnaturalización (Td) de los colágenos es importante tenerla en consideración para conocer su influencia en la estructura y en las aplicaciones biomédicas. La misma permite conocer la estabilidad del colágeno con el incremento de la temperatura y se puede medir por el análisis óptico rotacional. El análisis óptico rotacional se mide en un polarímetro con un incremento paso a paso de la temperatura, la cual se mantiene por 5 min., en cada paso (1 °C).

La temperatura donde el cambio en rotación fue la mitad del máximo valor es tomada como la Td (Serrano, J. 2011).

d. Especificidad

Es una de las propiedades más características y se refiere a que cada una de las especies de seres vivos es capaz de fabricar sus propias proteínas (diferentes de las de otras especies) y, aún, dentro de una misma especie hay diferencias

proteicas entre los distintos individuos. Esto no ocurre con los glúcidos y lípidos, que son comunes a todos los seres vivos.

La enorme diversidad proteica inter-específica e intra específica es la consecuencia de las múltiples combinaciones entre los aminoácidos, lo cual está determinado por el ADN de cada individuo (Serrano, J. 2011).

4. Usos y aplicaciones del colágeno

El colágeno posee propiedades únicas que le permite ser utilizado en diferentes aplicaciones industriales, como materiales biomédicos, la industria farmacéutica, cosmética y en alimentos.

Un biomaterial es una sustancia farmacológicamente inerte diseñada para ser implantada o incorporada dentro del sistema vivo. Los biomateriales más usados son las aleaciones metálicas, polímeros, ceramios y sustancias biológicas. Entre las sustancias biológicas. El colágeno ha sido uno de los más empleados y más comerciales.

La principal aplicación del colágeno en la industria farmacéutica y cosmética es en el tratamiento de arrugas, desaparición de manchas de la piel y el encapsulamiento de medicamentos lo que facilita la administración y dosificación del mismo. De igual manera se ha utilizado en la fabricación de productos cosméticos para el fortalecimiento del cabello y la reducción de horquilla (Castro, D. 2016).

5. Métodos de extracción

Los métodos de extracción de acuerdo a Aragón, M. (2011), menciona que pueden variar dependiendo del tipo de colágeno que se busque y de la fuente que se haya escogido. Pero en general se pueden clasificar en:

a. Extracción acida.

Es el método más usado, pero solamente funciona con colágeno soluble en ácido.

Este método conlleva el peligro de que las proteínas se desnaturalicen.

b. Extracción enzimática.

Este método está siendo actualmente investigado y desarrollado. En el proceso se utilizan enzimas como las proteasas, y las endopeptidasas.

c. Extracción microbiana.

Un método también en proceso de investigación, en el cual se utilizan microorganismos que dejen libres las fibras de colágeno.

d. Extracción alcalina.

Es el método más lento, se utiliza en materiales con alto grado de entrecruzamiento (como la piel de bovino). Independientemente del método principal de extracción que se utilice, el proceso tiene partes en común. Antes del método principal, la fuente debe de ser dividida en partes pequeñas (ya sea cortándola, machacándola, etc.).

Esto con el fin de que se tenga una mayor área de contacto. Después del proceso, se debe de filtrar el colágeno y descontaminar (Aragón, M. 2011).

6. Beneficios del colágeno

- Dota de capacidad de resistencia, elasticidad e integridad a las diferentes partes del cuerpo donde se ubica.
- Contribuye a sostener los órganos, la piel, los cartílagos y los tendones.
- Ayuda a mantener a las células de determinadas partes del cuerpo ancladas a ellas.
- Contribuye a transmitir la luz a través de la córnea.
- Tiene un papel esencial en la transmisión de fuerza de los músculos.
- En partes como las articulaciones, ayuda a paliar el dolor y la inflamación.

Pero además de estas propiedades estructurales, el colágeno es capaz de provocar los siguientes efectos en el cuerpo, si se encuentra en una cantidad adecuada:

- Una persona con un nivel óptimo de colágeno sufrirá menos dolores musculares y de articulaciones.
- La abundancia de esta proteína garantizará el tener unos huesos fuertes y con menos riesgo de quebrarse.
- El colágeno hará que las uñas y el pelo crezcan más fuertes y sanos.
- Esta proteína también ayuda al organismo a recuperarse después del ejercicio. Su presencia abundante en los músculos hará que adquieran de una mejor forma tono muscular y sean menos susceptibles de sufrir daños.
- Su refuerzo de las estructuras de la piel es fundamental para cicatrizar heridas y reparar los daños en los tejidos.

Como proteína vertebradora de las diferentes estructuras del cuerpo, ayuda a mantener firme la piel, también actúa de nutriente, por lo que consigue que adquiera un buen estado.

La comunidad científica está de acuerdo en un punto, como es en que a partir de los 25 años el cuerpo humano pierde aproximadamente un 1,5 % de colágeno anualmente. De ahí que, sobre todo a partir de cierta edad, sea interesante seguir una dieta rica en productos que estimulen la producción de esta proteína. Eso nos hará estar más sanos y, desde luego, más fuertes. Esto último, en todos los sentidos (SMedical, 2009).

E. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

La hidrólisis es un proceso químico en el cual, una molécula se rompe en dos partes como consecuencia de la adición de una molécula de agua. La reacción se produce cuando uno de los fragmentos de la molécula original gana un ion hidrógeno (H+) de la molécula de agua, mientras que el otro fragmento recoge el grupo hidroxilo restante (OH-). Las enzimas son moléculas, en su mayoría de naturaleza proteica, que catalizan las reacciones químicas en los sistemas

biológicos. Tienen un gran poder catalítico y poseen un alto grado de especificidad respecto a sus sustratos.

Para su nomenclatura, se adoptó un sistema de identificación en el que a cada enzima se le asigna una serie de cuatro dígitos, al que se ha llamado número de la EC (Enzyme Commission). La clasificación internacional se presenta en el Cuadro 3.

Cuadro 2. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL DE LAS ENZIMAS

Grupo	Clase	Tipo de reacción catalizada
EC1	Oxidoreductasas	Reacciones de óxido reducción o redox
EC2	Transferrerasas	Reacciones de transferencia de grupos activos
EC3	Hidrolasas	Reacciones de hidrolisis
EC4	Liasas	Adicción de grupos dentro a dobles enlaces eliminación de grupos
EC5	Isomerasas	Transferencia de grupos dentro de moléculas
EC6	Ligasas	Formación de enlaces C-O, C-C, C-S, o C-N mediante reacción de condensación acopladas a la rotura de ATP

Fuente: Mosquera, M. (2014).

El primer dígito está relacionado con la reacción química que cataliza la enzima. El segundo dígito de la nomenclatura corresponde a la subclase de enzima; el tercer dígito es una subdivisión y ofrece más información con respecto al sustrato que utiliza la enzima; y finalmente el cuarto dígito indica el número serial de la enzima en el grupo correspondiente.

Las enzimas tienen la capacidad de catalizar reacciones químicas de manera muy específica; es decir, su intervalo de acción se limita a un determinado tipo de compuesto que debe reunir ciertas características estructurales para que pueda ser utilizado como sustrato (Cuadro 2).

La reacción de hidrólisis catalizada por una hidrolasa es lo que se conoce como hidrólisis enzimática. Las hidrolasas se dividen en 13 grupos dependiendo del tipo de enlace sobre el que actúan. En la hidrólisis de proteínas se produce la ruptura del enlace peptídico (Mosquera, M. 2014).

1. Hidrólisis Enzimática de Proteínas

La hidrólisis proteica se realiza normalmente en un reactor, con control de agitación, pH, temperatura y tiempo del proceso. El sustrato se disuelve o re suspende en agua hasta que el pH y la temperatura se estabilizan; a continuación se agrega la proteasa dando inicio a la hidrólisis. A medida que ésta progresa se produce una disminución del pH debido a la rotura de los enlaces peptídicos. En los casos de hidrólisis enzimática el pH debe ser mantenido en el óptimo de la enzima mediante la adición de base diluida. Para finalizar la hidrólisis proteica la enzima puede ser inactivada con calor, mediante una disminución del pH o con una combinación de ambos. O también puede ser retirada del medio mediante filtración y la proteína finalmente precipitada (Benítez, R. et al. 2010).

2. Sustratos

El material de partida utilizado para la obtención de los hidrolizados proteicos puede ser de origen animal, vegetal o bacteriano. Entre los vegetales, los más usados son las proteínas de soja, trigo y arroz, principalmente en países desarrollados. De los sustratos de origen animal se emplea el pescado, principalmente en países orientales, como Japón o Corea. También se han aprovechado las proteínas de residuos cárnicos como tendones o huesos y de microorganismos, como algas.

Para la elección de una fuente proteínica adecuada debe tenerse en cuenta el uso que vaya a tener el hidrolizado, así como el valor agregado del producto final con respecto al sustrato inicial. Por ejemplo, para la obtención de hidrolizados con propiedades gelificantes y emulsificantes se suelen emplear colágeno y gelatina por su capacidad para formar geles transparentes. También se ha extendido el

uso para este fin de proteínas de huevo, de carne, de sangre, de vísceras e incluso de cereales. Como fuente de fermentación para el crecimiento de microorganismos, se emplean los hidrolizados de levaduras o caseína: éstas también son las fuentes cuando los hidrolizados se usan en cosmética. Cuando la finalidad del hidrolizado es su uso como fuente de nitrógeno, se usan proteínas de pescado y proteínas microbianas en alimentación animal, y proteínas de soja y lácteas en alimentación humana, siendo estas últimas, especialmente las proteínas del lactosuero, la materia prima ideal para la preparación de alimentos infantiles y dietas enterales. Ya en la reacción propiamente dicha, la secuencia de aminoácidos y la estructura tridimensional de la proteína afectan su sensibilidad hacia el ataque proteolítico y el tipo de péptidos formados durante la hidrólisis.

Las caseínas son proteínas algo más flexibles y son además, fácilmente hidrolizadas. Las proteínas del suero por el contrario, son proteínas globulares, difíciles de acceder para las enzimas proteolíticas. Esta digestibilidad puede ser mejorada por una desnaturalización por calentamiento previo. Otra diferencia importante entre proteínas es su estructura primaria. En proteínas de suero los aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos están aleatoriamente distribuidos sobre la proteína, mientras las caseínas contienen dominios hidrofílicos e hidrofóbicos distintos.

La hidrólisis de las proteínas con diferente distribución de aminoácidos hidrofóbicos y grupos cargados producirá péptidos que difieren en la distribución de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos. En un estudio de hidrolizados de β -lactoglobulina y β -caseína se demostró que los péptidos obtenidos de hidrólisis de la β -lactoglobulina mostraron distribuciones similares de cargas y grupos hidrofóbicos, careciendo de áreas distintas de hidrofóbicos o hidrofílicos. Por el contrario, la caseína produjo péptidos que difieren en la distribución de la carga y de los aminoácidos hidrofóbicos en su secuencia (Benítez, R. et al. 2010).

3. Proteasas Comerciales

Benítez, R. et al. (2010), indican que se encuentran disponibles comercialmente muchas proteasas grado-alimenticio. Estas proteasas pueden ser clasificadas, por

su origen, (animal, vegetal, bacteriano o fúngico), por su modo de acción catalítica (endo- o exo-actividad) o con base en su sitio catalítico. Las endoproteasas hidrolizan enlaces amídicos dentro de la cadena de la proteína. Las exoproteasas, por el contrario, eliminan aminoácidos terminales de las proteínas o péptidos (Benítez, R. et al. 2010).

La naturaleza del centro catalítico de las proteasas difiere de acuerdo con los aminoácidos y otros ligandos que intervienen en la formación del complejo enzima-sustrato. El centro activo contiene aminoácidos o bien cationes metálicos que promueven la catálisis, denominándose serinproteasas, cisteinproteasas, aspartato proteasas, según intervengan los aminoácidos serina, cisteína o ácido aspártico.

En las metalo-proteasas la actividad está promovida por un catión metálico, siendo el más frecuente el zinc. Todas las serinproteasas tienen actividad endo. Contrariamente, las metalo-proteasas son sobre todo exo-proteasas.

Las primeras enzimas proteolíticas utilizadas en la industria alimentaria fueron proteasas pancreáticas de origen animal, si bien cada vez están adquiriendo mayor importancia las de origen bacteriano o fúngico. En cuadro 4 se presentan algunas de las proteasas comerciales de grado alimentario disponibles en el mercado y se indica la especificidad de parte de ellas. Los preparados enzimáticos suelen ser mezclas de estas enzimas y normalmente se venden en estado líquido o como polvos (Benítez, R. et al. 2010).

4. Propiedades Tecno-Funcionales

Los cambios de las características moleculares que ocurren durante la hidrólisis de la proteína pueden dar lugar al comportamiento tecno-funcional modificado del hidrolizado cuando se lo compara con la proteína intacta, por ejemplo solubilidad alterada, viscosidad, características sensoriales, emulsión y características de la espuma (Benítez, R. et al. 2010).

a. Solubilidad

En el punto isoeléctrico (pI) de la proteína, la solubilidad generalmente aumenta con la hidrólisis, ya que es principalmente el resultado de la reducción en peso molecular y del aumento en el número de grupos polares. El efecto de la hidrólisis sobre la solubilidad a otros valores de pH depende de la proteína estudiada.

Los caseinatos por ejemplo, son muy solubles en los valores de pH sobre y debajo del pI (pH 4-5). Para la proteína del suero, que es algo menos soluble que la caseína, excepto en el pI, se ha observado un aumento de solubilidad con hidrólisis en la gama entera de pH (Benítez, R. et al. 2010).

b. Sabor Amargo

Un efecto secundario negativo importante de la hidrólisis de la proteína es la liberación de los péptidos generalmente con sabor más amargo que la proteína nativa. Se ha demostrado que el sabor amargo de los péptidos puros, a pesar de depender de la fuente de proteína y de la especificidad de la enzima, está relacionado con la presencia y posición de aminoácidos hidrofóbicos en los péptidos del hidrolizado. Se han propuesto varios métodos analíticos para predecir el sabor amargo de los hidrolizados. Adler-Nissen postula el aislamiento de péptidos hidrofóbicos extraídos con butanol en los que a través de la determinación de la hidrofobicidad y del peso molecular medio de estos péptidos, podría predecirse el grado de sabor amargo.

También se han utilizado parámetros químicos a través de la espectroscopía infrarroja podría predecirse el grado de amargor (Benítez, R. et al. 2010).

c. Emulsiones Y Espuma

Las características de la emulsión y de formación de espuma de la proteína y de los hidrolizados de la proteína dependen del pH del sistema y de la enzima empleada para la hidrólisis. La formación y estabilización de la espuma y las emulsiones deben ser medidas por separado. Dentro de las técnicas, se determinan el índice de actividad de la emulsión (EAI) que mide la turbiedad de las emulsiones con cierta fracción de aceite, mientras que la capacidad de

emulsionar (EC) determina la cantidad de aceite que se puede dispersar por cierta cantidad de proteína o de hidrolizado. Aunque ambos métodos se utilizan para cuantificar la capacidad de formación de emulsión y formación de espuma de los hidrolizados, no miden realmente las mismas características (Benítez, R. et al. 2010).

F. ENZIMAS

Los enzimas son biomoléculas especializadas en la catálisis de las reacciones químicas que tienen lugar en la célula. Son muy eficaces como catalizadores ya que son capaces de aumentar la velocidad de las reacciones químicas mucho más que cualquier catalizador artificial conocido, y además son altamente específicos ya que cada uno de ellos induce la transformación de un sólo tipo de sustancia y no de otras que se puedan encontrar en el medio de reacción (Ecuare, 2014).

1. Estructura de los enzimas

Los enzimas, en cuanto que proteínas, presentan todos los rasgos estructurales y propiedades químicas que caracterizan a esta notable clase de biomoléculas. En efecto, se ha podido comprobar que los enzimas pierden su actividad catalítica cuando sufren desnaturalización por efecto de los mismos agentes que afectan a las demás proteínas; la conformación tridimensional nativa intacta de la proteína enzimática resulta indispensable para que ésta desempeñe su función. Además, los enzimas, al igual que otras muchas clases de proteínas, presentan un centro activo a través del cual interactúan con las moléculas de ligando (Grafico 6), que en este caso reciben el nombre de sustratos, mediante un acoplamiento espacial (las superficies moleculares de ambos tienen formas complementarias) y químico (grupos funcionales complementarios del enzima y los sustratos establecen diferentes tipos de interacciones débiles entre sí).

Tanto la actividad catalítica como el elevado grado de especificidad química que presentan los enzimas residen en esta interacción específica entre el enzima y su sustrato. El centro activo es una cavidad existente en la superficie del enzima que

está forrada interiormente por una serie de restos de aminoácidos.

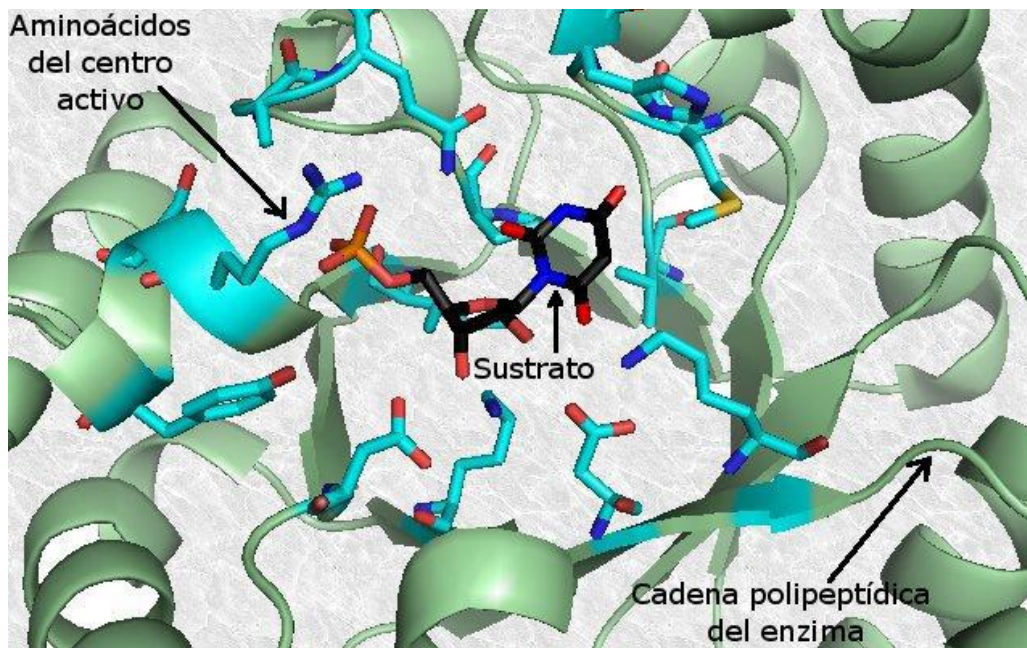


Grafico 6: Estructura de las enzimas.

Por regla general los aminoácidos que forman parte del centro activo no se encuentran contiguos en la cadena polipeptídica, sino ocupando posiciones a veces muy alejadas en la misma.

El hecho de que estos aminoácidos coincidan próximos entre sí sobre el centro activo no es más que una consecuencia del plegamiento característico de la cadena polipeptídica, es decir, de la conformación tridimensional nativa de la proteína enzimática (Rodríguez, L. 2012). Puede resultar útil, aunque no siempre posible, distinguir entre los aminoácidos que forman parte del centro activo dos categorías:

- **Aminoácidos catalíticos.**- Son uno o más aminoácidos cuyas cadenas laterales R poseen unas peculiaridades químicas tales que los facultan para desarrollar una función catalítica. Constituyen el verdadero centro catalítico del enzima.
- **Aminoácidos de unión.** - Son una serie de aminoácidos cuyas cadenas laterales R poseen grupos funcionales que pueden establecer interacciones

débiles (puentes de hidrógeno, interacciones iónicas, etc.) con grupos funcionales complementarios de la molécula de sustrato. Su función consiste en fijar la molécula de sustrato al centro activo en la posición adecuada para que los aminoácidos catalíticos puedan actuar.

En cuanto al resto de los aminoácidos de la cadena polipeptídica del enzima, los que no forman parte del centro activo, podría pensarse en principio que no desempeñan ninguna función, pero esto no es cierto; tienen la importante misión de mantener la conformación tridimensional catalíticamente activa del enzima; sin ella no existiría centro activo y el enzima no podría interactuar con su sustrato (Rodríguez, L. 2012).

2. Categorías de enzimas

a. Oxidorreductasas

Las oxidorreductasas catalizan reacciones redox en las cuales cambia el estado de oxidación de uno o de más átomos en una molécula. La oxidación-reducción en sistemas biológicos implica una o dos reacciones de transferencia de electrones acompañadas del cambio compensatorio de la cantidad de hidrógeno y de oxígeno en la molécula. Son ejemplos notables las reacciones redox facilitadas por las deshidrogenasas y por las reductasas. Así, la deshidrogenasa alcohólica cataliza la oxidación de etanol y de otros alcoholes, y la reductasa de ribonucleótido cataliza la reducción de ribonucleótidos para formar desoxirribonucleótidos. Las oxigenasas, las oxidasas y las peroxidasas se encuentran entre las enzimas que utilizan O_2 como aceptor de electrones (Ecuare, 2014).

b. Transferasas

Las transferasas transfieren grupos moleculares de una molécula donadora a una aceptora. Entre tales grupos están el amino, el carboxilo, el carbonilo, el metilo, el fosforilo y el acilo ($RC = O$). Los nombres triviales comunes de las transferasas a menudo incluyen el prefijo trans: son ejemplos las transcarboxilasas, las

transmetilasas y las transaminasas (EcuareD, 2014).

c. **Hidrolasas**

Las hidrolasas catalizan reacciones en las que se produce la rotura de enlaces como C-O, C-N y O-P por la adición de agua. Entre las hidrolasas están las estererasas, las fosfatasas y las peptidasas (EcuareD, 2014).

d. **Liasas**

Las liasas catalizan reacciones en las que se eliminan grupos (p. ej., H₂O, CO₂ y NH₃) para formar un doble enlace o se añaden a un doble enlace. Son ejemplos de liasas las descarboxilasas, las hidratatas, las deshidratatas, las desaminasas y las sintetatas (EcuareD, 2014).

e. **Isomerasas**

Se trata de un grupo heterogéneo de enzimas. Las isomerasas catalizan varios tipos de reordenamientos intramoleculares. Las epimerasas catalizan la inversión de átomos de carbono asimétricos y las mutatas catalizan la transferencia intramolecular de grupos funcionales (EcuareD, 2014).

f. **Ligasas**

Las ligasas catalizan la formación de enlaces entre dos moléculas de sustrato. Por ejemplo, la ligasa de DNA une entre sí fragmentos de cadenas de DNA. Los nombres de muchas ligasas incluyen el término sintetasa. Varias otras ligasas se denominan carboxilasas (EcuareD, 2014).

3. Inhibición enzimática

La actividad de las enzimas puede inhibirse. Las moléculas que reducen la actividad de una enzima, denominadas inhibidores, incluyen muchos fármacos, antibióticos, conservadores alimentarios y venenos. Las investigaciones de la

inhibición enzimática y de los inhibidores llevadas a cabo por los bioquímicos son importantes por varias razones. En primer lugar, siendo la razón más importante, en los seres vivos la inhibición enzimática es un medio importante para regular las vías metabólicas. Para modular las velocidades de las reacciones enzimáticas específicas se emplean de forma habitual pequeñas biomoléculas para satisfacer las necesidades del organismo (Rodríguez, L. 2012).

En segundo lugar, numerosos tratamientos clínicos se fundamentan en la inhibición enzimática. Por ejemplo, muchos antibióticos y otros fármacos reducen o eliminan la actividad de enzimas específicas. El tratamiento más eficaz contra el SIDA utiliza varios fármacos que incluyen inhibidores de proteasas, moléculas que incapacitan a una enzima vírica que se requiere para formar virus nuevos. Por último, las investigaciones de la inhibición enzimática han permitido a los bioquímicos diseñar técnicas que se utilizan para analizar las arquitecturas física y química y las propiedades funcionales de las enzimas. La inhibición enzimática puede ser reversible o irreversible.

La inhibición reversible ocurre cuando el efecto inhibitorio de un compuesto puede contrarrestarse incrementando la concentración del sustrato o retirando el compuesto inhibidor mientras la enzima permanece intacta. La inhibición reversible será competitiva si el inhibidor se une a la enzima libre y compite con el sustrato por la ocupación del sitio activo, no competitiva si el inhibidor se une tanto a la enzima libre como al complejo enzima-sustrato y a competitiva si el inhibidor se une sólo al complejo enzima-sustrato.

La inhibición irreversible ocurre cuando la unión al inhibidor altera de manera permanente la enzima, por lo común a través de una reacción covalente que la modifica de forma permanente (Rodríguez, L. 2012).

4. Factores que afectan a la actividad enzimática.

Rodríguez, L. (2012), menciona que existen diferentes factores ambientales pueden afectar a la actividad enzimática. Destacaremos dos: el pH y la temperatura.

a. Efecto del pH.

La mayoría de los enzimas presentan un pH óptimo para el cual su actividad es máxima; por encima o por debajo de ese pH la actividad disminuye bruscamente. Este efecto se debe a que, al ser los enzimas de naturaleza proteica, al igual que otras proteínas, se desnaturalizan y pierden su actividad si el pH varía más allá de unos límites estrechos.

En la mayor parte de los casos el pH óptimo está próximo a la neutralidad, en consonancia con el pH intracelular, pero existen enzimas con pH óptimo muy diverso según sea el pH del medio en el que habitualmente actúan (los enzimas proteolíticos del jugo gástrico tienen pHs óptimos próximos a 2 ya que este es el pH de dicho jugo). Por último existen algunos enzimas a los que el pH no afecta en absoluto (Gráfico 7).

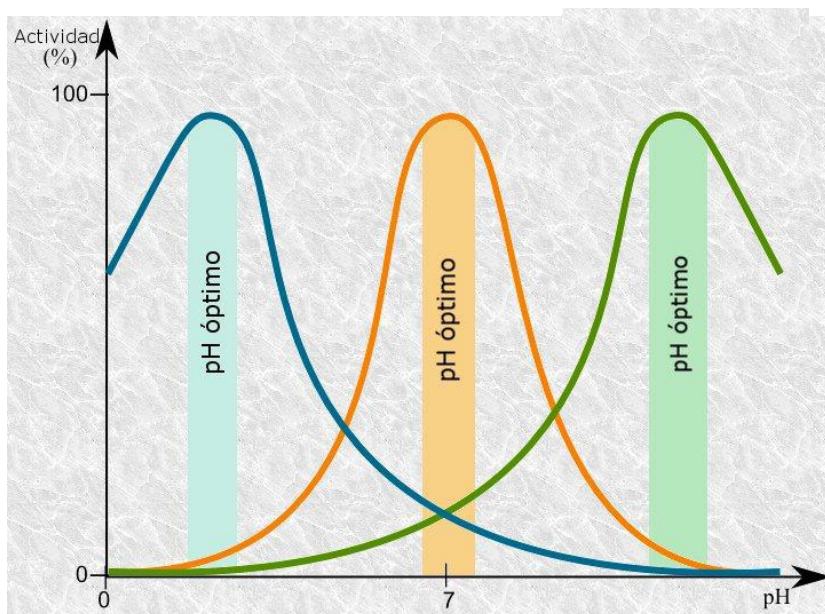


Gráfico 7.: Estructura de las enzimas de acuerdo al efecto del Ph

b. Efecto de la temperatura.

Al igual que ocurre con la mayoría de las reacciones químicas, la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas se incrementa con la temperatura. La variación de la actividad enzimática con la temperatura es diferente de unos

enzimas a otros en función de la barrera de energía de activación de la reacción catalizada. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en otras reacciones químicas, en las reacciones catalizadas por enzimas se produce un brusco descenso de la actividad cuando se alcanza una temperatura crítica.

Este efecto no es más que un reflejo de la desnaturalización térmica del enzima cuando se alcanza dicha temperatura. Si representamos gráficamente la variación de la actividad de los enzimas en función de la temperatura da la impresión de que existe una temperatura "óptima" análoga al pH óptimo estudiado anteriormente; hay que resaltar que esa aparente temperatura óptima no es más que el resultado de dos procesos contrapuestos (Gráfico 8): 1) el incremento habitual de la velocidad de reacción con la temperatura y 2) la desnaturalización térmica del enzima (Rodríguez, L. 2012).

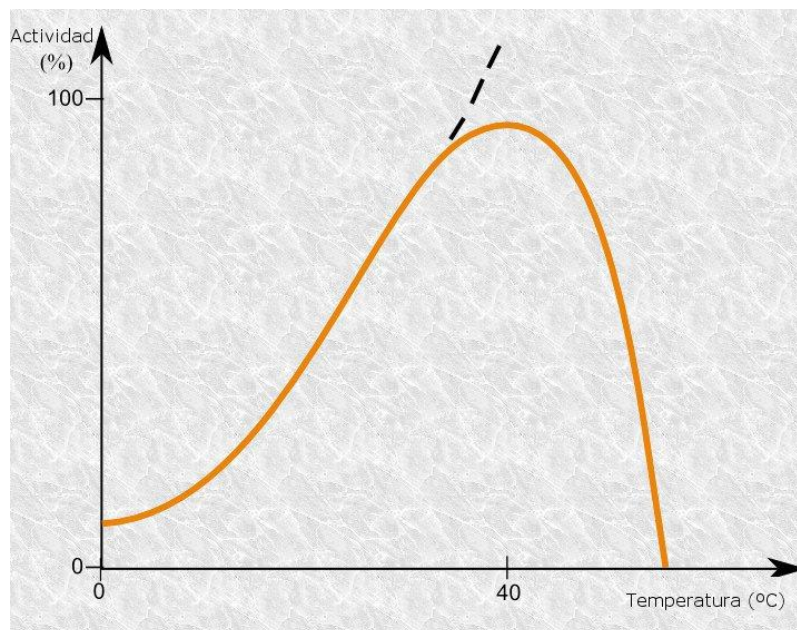


Gráfico 8.: Estructura de las enzimas de acuerdo al efecto de la temperatura

5. La pepsina

La pepsina es un enzima presente de forma natural en el organismo, y de forma particular en el jugo gástrico. La pepsina ayuda en la digestión de los alimentos degradando las proteínas que llegan al estómago. Es producida y secretada por la mucosa gástrica en el momento de la digestión. La pepsina también puede ser

comercializada. En este caso proviene del estómago del cerdo. La pepsina forma parte de la composición de numerosos quesos y de ciertas sodas (Figuroa, C. et al. 2016).

Actúa principalmente sobre enlaces peptídicos de naturaleza hidrófoba, preferentemente aromáticos. La pepsina es más activa con un pH de entre 2 y 3. Se desactiva permanentemente con un pH superior a 6. Es segregada por las células de las paredes del estómago. Se libera en forma de pepsinógeno. Digestión de los telopéptidos. La digestión de los telopéptidos se hace con pepsina. Al eliminar los telopéptidos, el colágeno resulta menos antígeno, más puro y con mejores posibilidades para ser utilizado como biomaterial (Figuroa, C. et al. 2016).

6. Función

Al pepsinógeno exponerse al ácido clorhídrico en el estómago, se despliega y se descompone en la pepsina. La pepsina descompone las proteínas en porciones más reducidas (polipéptidos) y aminoácidos, sin degradarla por completo, función que realizan otras enzimas en el intestino. La pepsina es segregada por las células de la mucosa gástrica. Requiere de un bajo pH o pH ácido para funcionar; el pH adecuada oscila entre 1,5 y 2,5. Los aminoácidos que se liberan gracias a la pepsina son la fenilalanina, el triptófano y la tirosina principalmente (Figuroa, C. et al. 2016).

La función del ácido clorhídrico es desnaturalizar a las proteínas; activar el cambio de pepsinógeno a pepsina y así comenzar la hidrólisis de las proteínas. El pepsinógeno es la forma inactiva de la pepsina.

La pepsina hidroliza preferentemente los enlaces peptídicos, que su grupo amino pertenece a aminoácidos aromáticos, aunque realiza este proceso de forma lenta en otros enlaces (Ecuare, 2014).

Se produce cuando uno de los fragmentos de la molécula original gana un ion hidrógeno (H⁺) de la molécula de agua, mientras que el otro fragmento recoge el

grupo hidroxilo restante (OH⁻). Las enzimas son moléculas, en su mayoría de naturaleza proteica, que catalizan las reacciones químicas en los sistemas biológicos. Tienen un gran poder catalítico y poseen un alto grado de especificidad respecto a sus sustratos. Para su nomenclatura, se adoptó un sistema de identificación en el que a cada enzima se le asigna una serie de cuatro dígitos, al que se ha llamado número de la EC (Enzyme Commission) (Mosquera, M. 2014).

El primer dígito está relacionado con la reacción química que cataliza la enzima. El segundo dígito de la nomenclatura corresponde a la subclase de enzima; el tercer dígito es una subdivisión y ofrece más información con respecto al sustrato que utiliza la enzima; y finalmente el cuarto dígito indica el número serial de la enzima en el grupo correspondiente.

Las enzimas tienen la capacidad de catalizar reacciones químicas de manera muy específica; es decir, su intervalo de acción se limita a un determinado tipo de compuesto que debe reunir ciertas características estructurales para que pueda ser utilizado como sustrato. Como resultado de la hidrólisis enzimática de proteínas se obtienen péptidos y aminoácidos; su composición final dependerá de la fuente proteica, del tipo de enzima o enzimas utilizadas, de las condiciones de hidrólisis y del grado de hidrólisis alcanzado en la reacción. Sin embargo al hidrolizar las proteínas no sólo ocurre un cambio a nivel molecular, también se alteran sus propiedades funcionales, tales como la solubilidad y estabilidad térmica, que se incrementan al hidrolizar la proteína, así como sus propiedades emulsificantes ; siempre y cuando no se alcance un grado de hidrólisis muy elevado (Figuroa C., et al. 2016).

Además de alterarse sus propiedades reológicas, disminuyendo la viscosidad, se incrementa considerablemente la osmolaridad en los hidrolizados y se modifican sus propiedades organolépticas. Ciertos estudios han demostrado que al reducirse el tamaño molecular de proteínas a péptidos y aminoácidos se reduce la alergenicidad de las proteínas y se incrementa su digestibilidad (Figuroa, C. et al. 2016).

Cada una de estas propiedades es aprovechada en el campo de la alimentación o de la medicina en diferentes áreas, tales como suplementos alimenticios para pacientes con desórdenes digestivos, alergias alimentarias, personas de avanzada edad, deportistas. También se emplean como saborizantes, aditivos para modificar la textura de ciertos alimentos, para la fabricación de suplementos dietéticos para el control de peso, fabricación de piensos para nutrición animal, entre otros usos. Sin embargo los hidrolizados proteicos son mucho más que una fuente de nitrógeno para la dieta. Sirven para el incremento de la producción de anticuerpos monoclonales, además de incrementar la productividad de varios fármacos terapéuticos producidos por células animales y microorganismos recombinantes (Mosquera, M. 2014).

También son utilizados en la fabricación de vacunas y como coadyuvantes en las mismas, en la fabricación de probióticos, cultivos iniciadores (fermentos), en fermentaciones industriales como fuente de compuestos nitrogenados, como ingrediente en la fabricación de medios para el cultivo de microorganismos, para regular el crecimiento de plantas e incrementar su resistencia a plagas, y también han sido utilizados en biorremediación impulsando el crecimiento de ciertos microorganismos.

En los últimos años se han descrito hidrolizados peptídicos y péptidos con diversas actividades biológicas, aunque en muchas ocasiones la actividad mostrada no es la mejor opción entre las moléculas existentes otras veces las actividades mostradas son francamente competitivas con las utilizadas más habitualmente (Mosquera, M. 2014).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN DEL EXPERIMENTO

El presente trabajo experimental se llevó a cabo en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias Pecuarias, en el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, laboratorio de Bromatología y Nutrición animal y el laboratorio de Instrumental de la Facultad de Ciencias ubicada en la Panamericana Sur kilómetro 1 1/2.

La investigación tuvo una duración de 120 días, de los cuales, durante los 90 días se realizó el trabajo experimental, y en los 30 días restantes se realizó los respectivos análisis del producto extraído.

B. UNIDADES EXPERIMENTALES

En la presente investigación se utilizó 10.000 g de patas de pollo y niveles de 2, 4 y 6 % de pepsina y un tratamiento control, con 500 g de materia prima para cada tratamiento y 5 repeticiones por tratamiento.

C. MATERIALES, EQUIPOS E INSTALACIONES

Para la realización de la presente Investigación se utilizó los materiales, equipos e instalaciones descritos a continuación:

1. Instalaciones

- Laboratorio Bromatología y Nutrición Animal
- Laboratorio de Microbiología de los Alimentos
- Laboratorio de Instrumental
- Oficina

2. Equipos

- Refrigerador marca Kelvinator
- Estufa marca Precision
- Cámara de flujo laminar marca Indelab
- Hemocitómetro marca Darkfield
- Autoclave marca Phoenix Luterco
- Agitador magnético marca Termo Scientific
- Balanza normal marca Ohaus Camry
- Balanza analítica marca Ohaus Pioneer
- Vórtrex marca Genie
- Liofilizador marca Freezer Dryer
- Centrifuga marca Ohaus Camry
- Conductímetro marca 4510 ConductivityMeter
- Aparato de kejeldahl
- Potenciómetro marca Oakton

3. Materiales de Laboratorio.

- Placas Petri film.
- Vasos de precipitación
- Matraces
- Probetas
- Pipetas
- Tubos de ensayo
- Botellas termoresistentes
- Papel absorbente
- Papel aluminio

4. Materia prima e insumos

- Alcohol antiséptico

- Alcohol industrial
- Pepsina
- Patas de pollo
- Etanol al 20%
- Ácido acético 0.5 M
- NaOH al 0.2 N, 1N
- NaCl al 0.9 M

D. TRATAMIENTO Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Se evaluó distintos niveles de pepsina para la extracción de colágeno, con niveles de 2, 4, y 6% de pepsina. Estos tratamientos fueron distribuidos en un Diseño Completamente a Azar (DCA), con cuatro tratamientos (incluido el control) y 5 repeticiones por tratamientos, teniendo así un total de 20 unidades experimentales (Cuadro 3).

Codificación de los tratamientos:

- **T0:** 0% de pepsina (Control)
- **T1:** 2% de pepsina
- **T2:** 4% de pepsina
- **T3:** 6% de pepsina

Cuadro 3. ESQUEMA DEL EXPERIMENTO.

Niveles de pepsina	Código	T.U.E	Repeticiones	Tratamiento
0 %	T0	500g	5	2500g
2 %	T1	500g	5	2500g
4 %	T2	500g	5	2500g
6 %	T3	500g	5	2500g
TOTAL				10,000g

T. U. E. = Tamaño de la Unidad Experimental.

E. MEDICIONES EXPERIMENTALES.

Las variables experimentales que se evaluarán serán las siguientes:

a. Análisis Físicos – Químicos

- Densidad, g/mL
- Conductividad ms/cm
- pH
- Nitrógeno, %
- Proteína total, %

b. Microbiológicos

- Aerobios totales, UFC/g

c. Económico

- Costos de producción
- Beneficio costo

F. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS Y PRUEBAS DE SIGNIFICANCIA

Los resultados experimentales fueron procesados en el software estadístico Infostat versión 2016. La información obtenida se analizó lo siguiente:

Análisis de varianza (ADEVA), para las diferencias en las variables del análisis físico químico y microbiológico.

Separación de medias de acuerdo a la prueba de Tukey, al nivel de significancia de $P < 0.05$

Análisis de la regresión estableciendo una tendencia cuadrática significativa.

G. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Como materia prima para la obtención de colágeno se utilizó patas de pollos frescas obtenidas en el mercado La Condamine de la ciudad de Riobamba.

1. Extracción de colágeno de patas de pollo.

En la extracción de colágeno de patas de pollo se utilizaron las formulaciones que se reportan en el Cuadro 4.

Cuadro 4. MATERIA PRIMA PARA LA EXTRACCIÓN DE COLÁGENO DE PATAS DE POLLO

		Niveles de Pepsina			
		0%	2%	4%	6%
Ingredientes	Unidad	Cantidad	Cantidad	Cantidad	Cantidad
NaOH	g	60	60	60	60
Ácido Acético	mL	150	150	150	150
NaCl	g	130,5	130,5	130,5	130,5
Agua destilada	mL	1985	1985	1985	1985
Patas de pollo	g	2500	2500	2500	2500
Pepsina	g	0	50	100	150

La extracción de colágeno se hizo en base al siguiente procedimiento:

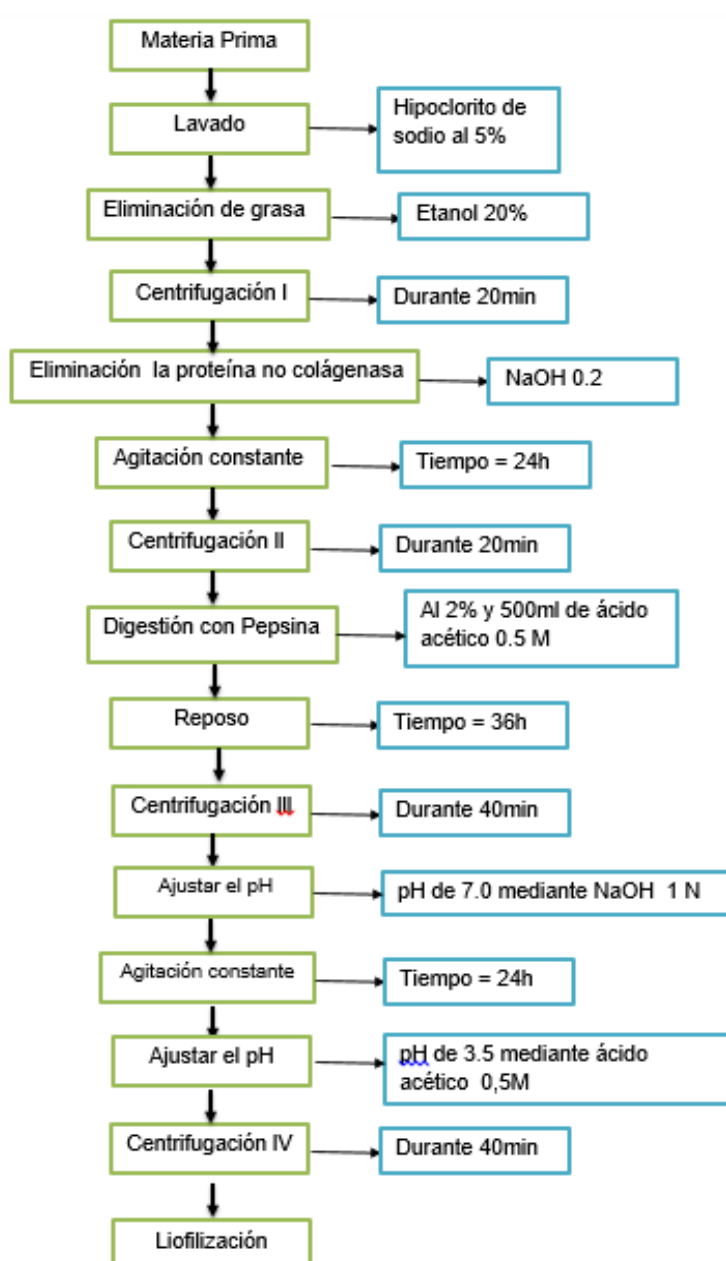
Las patas se lavaron en agua potable, se adicionó una solución de hipoclorito de sodio a 5 % durante una hora y se enjuagó con agua destilada. La piel y los tendones se separaron de los huesos con ayuda de un bisturí, luego se realizó la eliminación de las grasas y pigmentos mediante una agitación constante en etanol al 20% durante 24 horas. Se centrifugó la muestra de 500mL cada muestra por 20 minutos y se desechó el sobrenadante, en el cual se encontraba todas las grasas presentes en el tejido tratado.

Se eliminó la proteína no colágenas mediante agitación constante con NaOH 0.2 N por un tiempo de 24 h, para luego centrifugar nuevamente por 20 minutos y después se desechó el sobrenadante. A continuación se agregó la pepsina (sigma- Aldrich) al 2% y 500mL de ácido acético 0.5 M al precipitado. La mezcla

se sometió a un reposo de 36 horas para luego centrifugar por 40 minutos.

El sobrenadante se ajustó a un pH de 7.0 mediante NaOH 1 N y se mantuvo en agitación durante 24 h, se ajustó nuevamente el pH a 3.5 con ácido acético 0.5 M. luego se añadió NaCl al 0,9M lentamente para precipitar la proteína, esta mezcla se centrifugó durante 40 minutos, el precipitado resultante se disolvió en ácido acético 0.5 M. Como último se realizó la liofilización en un liofilizador Marca Freeze Dryer a una temperatura de -54°C durante 48 horas.

1. DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA OBTENCIÓN DE COLÁGENO



H. METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN

1. Determinación de Nitrógeno y Proteína Total, %

Se determinó el nitrógeno total mediante el método de kjeldahl según AOAC, 2001.11. Este análisis se realizó en el laboratorio de Bromatología y Nutrición Animal, la concentración de nitrógeno se multiplicó por el factor de proteína (6,25) para obtener el porcentaje de proteína presente en la muestra.

Para lo cual se pesó la 1g muestra en una balanza analítica y se colocó en un balón de kjeldahl, se agregó 10g de catalizador (mezcla de sulfato de cobre y sulfato de sodio) y 25 mL de ácido sulfúrico. Luego se colocó en el digestor y se esperó hasta que se elimine todo el humo, hasta que la disolución se aclare y se continuó la ebullición durante al menos otros 30 min. Se enfrió el balón y se colocó 200mL de agua, 100 ml de NaOH al 50% y unos gránulos de zinc para estabilizar la reacción. Luego se colocó en el área de destilación. En un Erlenmeyer se puso 100ml de Ácido Bórico (H_3BO_3) al 2.5% y se colocó debajo del área mencionada. Introduciendo la punta del tubo del destilado en el Erlenmeyer. Enseguida se colocó el balón en el área de destilación. Se esperó hasta en el Erlenmeyer la solución llegue a 300ml de destilado. Se Retirar del equipo y se colocó el indicador Verde Rojo de Bromo cresol lo que hizo cambiar de coloración a verde menta. Luego se tituló con ácido clorhídrico al 0.1 N. Se tomaron datos para luego ser transformado a través de un factor en proteína utilizando las siguientes ecuaciones.

$$\% N = \frac{14 \times N \times V \times 100}{m \times 1000}$$

$$\% P = \frac{14 N \times V \times 100 \times \text{factor}}{m \times 1000}$$

Donde:

- V: titulación leída de HCl 0,1N
- m: masa de la muestra, en gramos
- N: 0.1N HCl

- Factor: 6.25

2. Determinación de la Densidad

Se determinó mediante el método gravimétrico tomado de Farmacopea, ISO 787/11, ASTM B527. Donde se midió la densidad del colágeno en polvo. Se determinó la temperatura y la humedad relativa del laboratorio. Encontrando una temperatura de 18°C y una humedad relativa de 45%. Primero se pesó la probeta vacía, después se pesó la probeta más el colágeno y por último se pesó la probeta más agua, con los datos obtenidos se procedió a aplicar la siguiente ecuación para hallar la densidad de la muestra.

$$\text{Densidad} = \frac{(\text{Peso de probeta} + \text{colágeno}) - \text{peso de probeta vacía}}{(\text{Peso de probeta} + \text{agua}) - \text{peso de probeta vacía}}$$

3. Determinación del PH

Se determinó el potencial de Hidrógeno (pH) de las muestras de colágeno mediante el método potenciómetro NTE INEN 1519 - 1987. Se utilizó un pHmetro marca Termo el cual se calibró con dos soluciones Buffer con pH 7 y 4 se realizó la verificación con el Buffer de pH 7, luego se disolvió 10g de muestra en 50 mL de agua destilada mediante agitación 30 min y se colocó en un vaso de precipitación de 100mL se dejó decantar durante 30 min, se sumergió el electrodo en la muestra hasta que se estabilice el equipo, y se procedió a tomar la lectura.

4. Determinación de la Conductividad

Se determinó la capacidad de conducir la corriente eléctrica mediante el método conductímetro ASTM TIPO V D1193 2011 (American Society for Testing and Materials), para realizar este análisis se estandarizó el equipo con un estándar 1.413 mS/cm y se verificó con un estándar de 10 mS/cm. Luego se disolvió 10g de muestra en 50 mL de agua destilada mediante agitación durante 30 min y se colocó en un vaso de precipitación de 100mL se dejó decantar durante de 3 min, se sumergió el electrodo del conductímetro en la muestra y se procedió a tomar lectura. Dichos valores se presentaron en mS/cm.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. VALORACIÓN FÍSICO QUÍMICA

Los resultados de la valoración físico química del colágeno obtenido con los diferentes niveles de pepsina, se reporta en el Cuadro 5, donde se aprecia que existe variación por el efecto de la pepsina.

Cuadro 5. ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO Y MICROBIOLÓGICO DE COLÁGENO DE PATAS DE POLLO OBTENIDOS CON DISTINTOS NIVELES DE PEPSINA

Variables	Niveles de Pepsina, %				E.E.	Prob.
	0	2	4	6		
Nitrógeno, %	10 b	11 ab	13 a	13 a	0,01	0,01
Proteína, %	62 b	67 ab	78 a	78 a	0,03	0,01
Ph	6,10 a	5,99 ab	5,75 bc	5,28 c	0,06	2,14E-07
Densidad, g/mL	0,26 c	0,33 b	0,35 ab	0,37 a	0,01	2,3E-07
Conductividad, ms/cm	16,55 d	17,36 c	18,45 b	20,48 a	0,10	0,00
Aerobios Totales, UFC/g	22,00 a	40,00 a	42,00 a	42,00 a	35,75	9,73E-01

E.E.: Error estándar

Prob.>0,05: No existen diferencias estadísticas

Prob.<0,05: Existen diferencias estadísticas

Medidas con letras distintas en una fila difieren estadísticamente según la prueba Tukey.

1. Nitrógeno Total, %

Los contenidos de nitrógeno total del colágeno presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$), por el efecto de los niveles de pepsina adicionadas, por cuanto los mayores contenidos se encontraron al adicionar 4 y 6% de pepsina que presentaron 13% de nitrógeno total, en cambio al utilizar el 2% de pepsina y el grupo control redujeron su contenido de nitrógeno al 10 y 11%.

Por lo que mediante el análisis de la regresión se estableció una tendencia cuadrática significativa (Grafico 9), que indica que el porcentaje de nitrógeno total aumenta pero no de forma proporcional a medida que se incrementa los niveles de pepsina. Siendo similar con lo que reporta Almeida, P. et al. (2013), quienes afirman que se obtuvo el 13,5 % de nitrógeno total, valor que es similar al valor encontrado en este estudio.

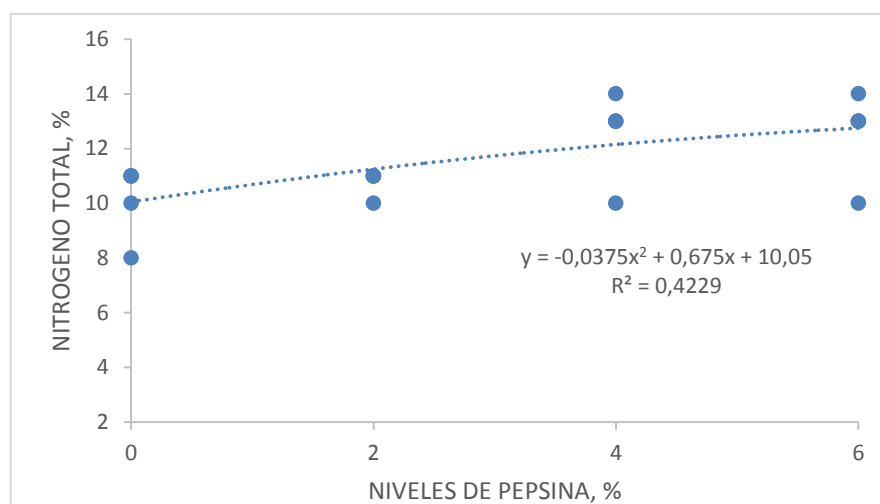


Grafico 9. Comportamiento del contenido de nitrógeno total (%) del colágeno obtenido de las patas de pollo distintos niveles de pepsina.

2. Proteína Total, %

Los contenidos de proteína del colágeno presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$), por el efecto de los niveles de pepsina aplicadas, por cuanto los mayores contenidos se encontraron al aplicar 4 y 6% de pepsina que presentaron el 78% de proteína, mientras que al utilizar los niveles de 2% y el grupo control redujeron su contenido proteico a 67 y 62%, respectivamente, por lo que mediante el análisis de la regresión se estableció una tendencia cuadrática significativa (Gráfico 10), que determina que el contenido proteico del colágeno aumenta pero no de forma proporcional y que puede deberse a lo que reporta Pal, G. et al. (2015) quienes mencionan que al aplicarse pepsina divide las regiones telopéptidas exponiendo el resto de la hélice al medio ácido sin dañar la integridad de la triple hélice y extrayendo mayor cantidad de colágeno.

Los valores encontrados presentan ser similares con relación a lo que reportan Almeida, P. et al. (2012), quienes afirman que el colágeno obtenido de patas de pollo, aplicando una solución ácida de 4% de acetilo reportó un contenido de 78,5% proteína colagénica lo que es similar al registrado en este estudio, Además en otro estudio realizado por Peralta, C. et al. (2012), quienes mencionan que al aplicarse NaOH al 5% se obtuvo el 79,8% de proteína colagénica de los cascotes de bovinos, ya que los cascotes de bovinos tienen una mayor porcentaje de colágeno debido a su conformación, pero que es casi similar a lo que se obtuvo en el estudio realizado.

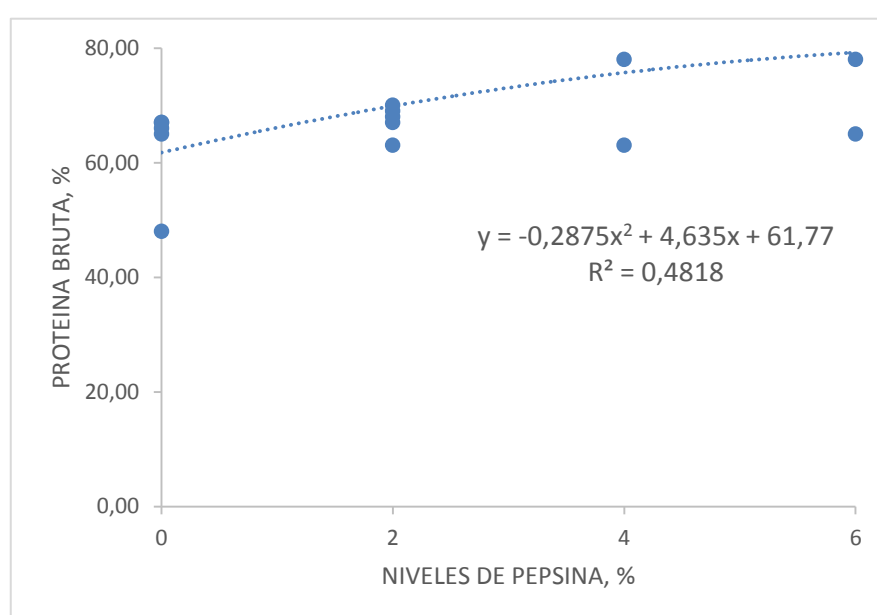


Gráfico 10. Comportamiento del contenido de proteína (%) del colágeno obtenido de las patas de pollo distintos niveles de pepsina.

3. pH de colágeno

Al aplicarse los distintos niveles de pepsina en la extracción de colágeno se determinó que hubo diferencias significativas ($P < 0.05$), ya que presentaron valores de 6.10, al aplicar 6%, 5.99, con el 4% de pepsina, 5.75 con 2% y 5.28 en el tratamiento control, por lo que mediante el análisis de la regresión se estableció una tendencia cuadrática significativa (Gráfico 11), que establece que a medida que se incrementa los niveles de pepsina tiende a disminuir el pH. Esto con relación a lo que indica Gómez, k. et al. (2011), quienes manifiesta que al aplicar una mayor concentración de pepsina disminuye el pH del colágeno ayudando a

hidrolizar la proteína del colágeno del tendón bovino y mejorando la compatibilidad del biomaterial. Por lo que en base a las cantidades encontradas es necesario tener en cuenta lo que señala Certad, M. y Pérez, B. (2007), quienes indican que el pH colágeno debe estar entre 3,7 y 7,5 por razones de conservación y propiedades físicas del colágeno.

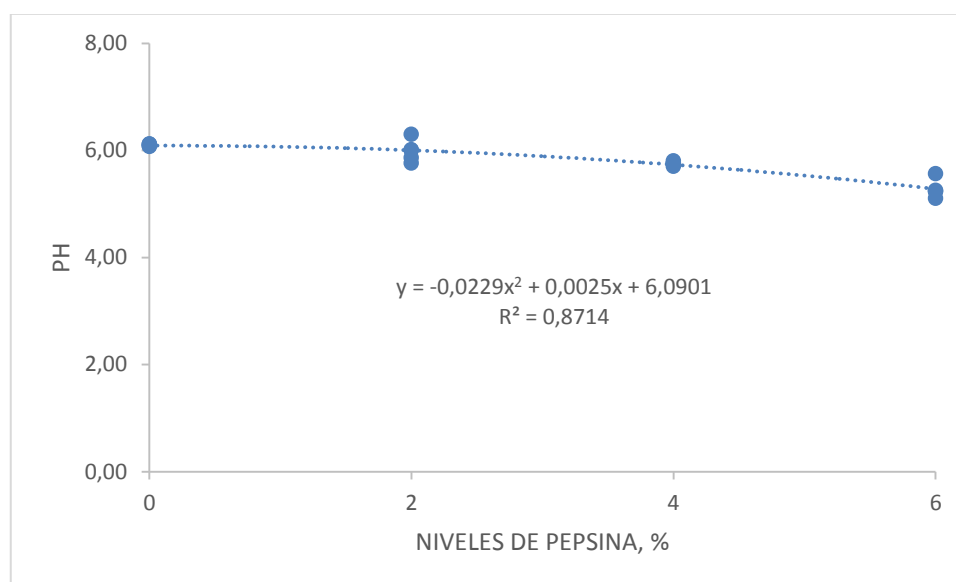


Gráfico 11. Comportamiento del potencial de hidrogeno, ph del colágeno obtenido de las patas de pollo distintos niveles de pepsina.

4. Densidad (g/mL)

La densidad frente a los distintos niveles de pepsina mostraron diferencias estadísticas ($P < 0,05$), ya que al aplicar 4 y 6% de pepsina la densidad del colágeno fue de 0,35 y 0,37g/ml en su orden, mientras que con el tratamiento control y 2 % de pepsina se encontraron valores inferiores y que fueron de 0.26 y 0.33 g/mL (en su orden); por lo que mediante el análisis de la regresión se estableció una tendencia cuadrática significativa (Gráfico 12), que determina que a medida que se incrementa los niveles de pepsina la densidad tiende a incrementarse pero no de una forma proporcional, esto posiblemente se deba a que el porcentaje de pepsina añadida no era suficiente para desdoblar la proteína de colágeno haciendo que sea más densa con relación al tratamiento control. Lo que puede deberse a lo que indica Castelblanque, E. (2015), quienes mencionan que la densidad del colágeno en gel es de 0,906 g/mL, lo que quiere decir que es soluble en agua. Comparando con un colágeno comercial (Colnatur) tiene una

densidad de 0.30 g/mL que es similar con al obtenido con el 6% de pepsina lo que quiere decir que es soluble en cualquier líquido.

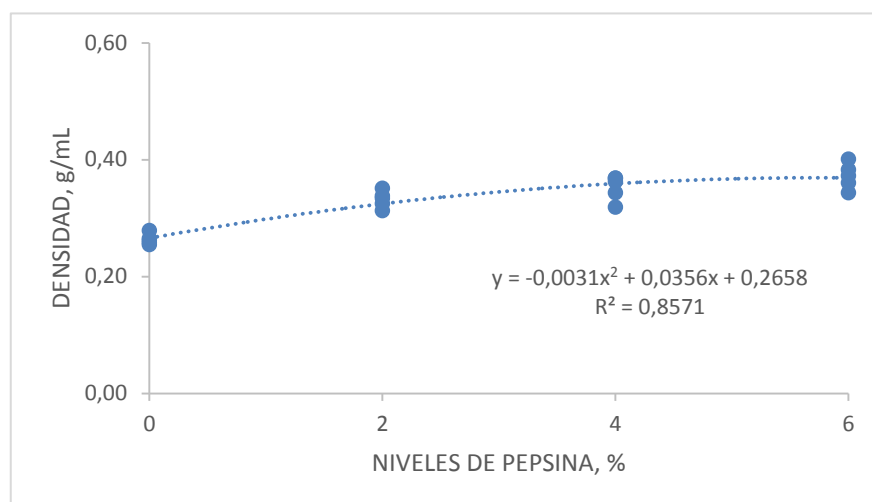


Gráfico 12. Comportamiento del contenido de densidad (g/mL) del colágeno obtenido de las patas de pollo distintos niveles de pepsina.

5. Conductividad

La conductividad frente a los distintos niveles de pepsina presentó valores con diferencias significativas ($P < 0.05$) por cuanto los mayores contenidos se encontraron al aplicar el 6% de pepsina que reportó un valor de 20,48 mS/cm, mientras que al aplicar el grupo control presentó una conductividad menor de 16,55 mS/cm,; por lo que, el análisis de la regresión estableció una tendencia cuadrática significativa (Gráfico 13), que indica que a medida que se incrementa los niveles de pepsina la conductividad aumenta gracias a la acción de la pepsina que degrada los enlaces peptídicos y permite la presencia de sólidos totales disueltos en el colágeno

Los contenidos encontrados de conductividad son superiores a los que observó Navarro, C. y Sánchez, J. (2008), quienes mencionan que la conductividad en solución al 1 % en peso no debe ser superior a 500 μ S/cm. ratificando con lo que dice Torres, J. (2012). que las patas de pollo poseen pequeñas cantidades de minerales y sales, lo que quiere decir que la conductividad del colágeno extraído es alto debido a la presencia de sales y minerales en las patas de pollo, ya que es

una sustancia orgánica deficiente en conducir electricidad por naturaleza.

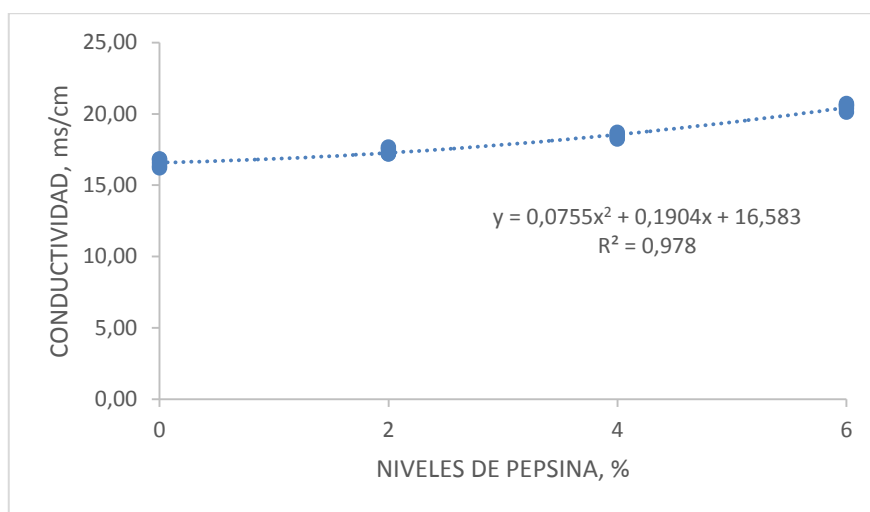


Gráfico 13. Comportamiento de la conductividad (mS/cm) del colágeno obtenido de las patas de pollo distintos niveles de pepsina.

B. VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA

1. Aerobios totales (UFC/mL)

En el colágeno de patas de pollo la presencia de aerobios totales (UFC/g) fue de 22 ± 43 UFC/g en el obtenido con el grupo control, 40 ± 89 UFC/g con el 2% de pepsina y 42 ± 88 UFC/g al emplearse los niveles 4 y 6% (Anexo 5), notándose que a mayores cantidades de pepsina existe una mayor presencia de aerobios totales; aunque la presencia de estos microorganismos se deba a la contaminación ambiental, por cuanto para la obtención de este colágeno se utilizó el proceso de liofilización a una temperatura de -54°C en el cual debería haberse eliminado todos los microorganismos.

De acuerdo a otros reportes bibliográficos como por ejemplo Certad, M. y Pérez, B. (2007), presenciaron un recuento de aerobios totales 5×10^3 UFC/g, que es superior a lo que se obtuvo en este estudio. De acuerdo a la norma con la norma Venezolana COVENIN, B-902-87 el límite máximo permitido es de 1×10^2 UFC/g, lo que quiere decir que el valor obtenido al aplicar el 4 y 6% de pepsina está dentro de los parámetros establecidos por esta norma internacional.

Debido a su crecimiento lento y su baja competitividad los aerobios totales se manifiestan en condiciones no favorables, por consiguiente, debido a su baja presencia en el colágeno obtenido es apto para el consumo e industrialización sin afectar la salud de los consumidores.

C. DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO

Para obtener colágeno de patas de pollo con niveles 2, 4 y 6% de pepsina se utilizó 500g en cada tratamiento, después de obtener el colágeno se liofilizó y se obtuvo el rendimiento aplicando la siguiente ecuación y como se observa en el Cuadro 6:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Gramos de producto}}{\text{Gramos de materia prima}} \times 100$$

Cuadro 6. RENDIMIENTO DE COLÁGENO AL APLICARSE LOS DISTINTOS NIVELES DE PEPSINA

Niveles de pepsina, %	Cantidad, g	%
0%	156	31,2
2%	123	24,6
4%	246	49,2
6%	310	62

Obteniendo como el mejor tratamiento en rendimiento con el 6% de pepsina en la extracción de colágeno en las patas de pollo, donde se obtuvo un rendimiento del 62% equivalente a 310g de colágeno en relación a los 500g de masa de piel y endones de patas de pollo.

D. ANÁLISIS ECONÓMICO

1. Costos de producción, dólares/ g

Para determinar los costos de producción de la obtención de colágeno de patas de pollo con la aplicación de 2, 4 y 6% de pepsina, que se reporta en el Cuadro 9

y teniendo como particularidad que el precio de la pepsina es elevado respecto al costo de las patas de pollo, se estableció, que el costo de la producción se eleva a medida que se incrementan los niveles de pepsina utilizados, por cuanto, de 0.15 dólares de colágeno del grupo control, se eleva a 0,28 dólares con el empleo del 2% de pepsina, mientras que con el 4% y 6% hubo una reducción a 0,19 dólares. Debido a que se utilizó mayor porcentaje de pepsina en estos tratamientos, ya que este tiene mayor valor en comparación con otros ingredientes, pero que, gracias a esto, se obtiene un colágeno con excelente calidad físico y química para su posterior consumo o aplicación en la industria cárnica o farmacéutica.

Al realizar el análisis económico tomando en consideración los gastos efectuados, se estableció que los costos de producción tienden a reducirse cuando se utiliza los diferentes niveles de rennina, ya que al producir 123 g de colágeno el costo fue de 0.28 USD es decir que en un kilogramo de colágeno el costo de producción será de 2.27 dólares para el nivel del 2 % y un menor costo de producción para el tratamiento del 4 % que fue de 0,77 dólares por kilogramo y aun menor costo cuando se aplica el 6% de pepsina con 0,61 USD por kilogramo de colágeno. Económicamente representa un ahorro de 1,66 dólares por cada Kg de colágeno producido entre el 2 % frente al empleo del nivel 6 % de pepsina.

2. Beneficio/costo

Al realizar el análisis económico tomando en consideración los egresos registrados, relacionándolos con los ingresos percibidos (cuadro 7), se establece que a medida que se incrementó los niveles de pepsina el beneficio/costo (B/C), se incrementa, pues de un B/C de 1.42 con el empleo del 2% de pepsina, se incrementa a 2.13 con el uso del 4% de pepsina y a 2.15 con el 6% de pepsina, es decir se tienen rentabilidades de 42, 113 y 115% respectivamente, por lo que con el tratamiento 6% de pepsina tiene un mayor B/C, que representan altas rentabilidades debido a que se están utilizando productos que son considerados desperdicios y que mediante este proceso puede ser utilizado como un biomaterial en la industria de la farmacéutica y cosmetología.

También y en la industria alimentaria como un producto ligante, gelificante o espesante en salchichas y mortadelas. También Considerase como una actividad altamente rentable.

Cuadro 7. ANÁLISIS ECONÓMICO DEL DE LA OBTENCIÓN DE COLÁGENO DE PATAS DE POLLO APLICANDO NIVELES 2, 4 Y 6 % DE PEPSINA

Ingredientes	Costo/g	Niveles de pepsina, %		
		2%	4%	6%
Patas de pollo	0,0075	18,75	18,75	18,75
Pepsina	0,23	11,50	23,00	34,50
NaOH	0,06	3,60	3,60	3,60
Ácido Acético	0,0012	0,18	0,18	0,18
NaCl	0,0005	0,07	0,07	0,07
Agua destilada	0,0003	0,60	0,60	0,60
Producto obtenido		123,00	246,00	310,00
Egresos totales		34,69	46,19	57,69
Costos de producción por g		0,28	0,19	0,19
Precio de venta por g		0,40	0,40	0,40
Ingresos totales		49,20	98,40	124,00
Beneficio/costo		1,42	2,13	2,15

V. CONCLUSIONES

1. Los niveles de Pepsina en la extracción de colágeno afectaron estadísticamente su composición físico –química.
2. Al utilizarse el 6% de pepsina, el colágeno presentó mejores respuestas en nitrógeno (13), proteína (78%), densidad (0.37g/mL) y conductividad (20.48 $\mu\text{s/cm}$)
3. Los resultados microbiológicos demostraron que a mayor cantidad de pepsina más alta es la presencia de aerobios totales, por cuanto en el colágeno del grupo control fue de 22 ± 43 UFC/g y se elevó 42 ± 88 UFC/g con la utilización del 6% de pepsina.
4. Con el empleo de 6% de pepsina en la extracción de colágeno en las patas de pollo, se obtuvo los mejores rendimientos (62 %), el menor costo de producción (0,19 dólares/g) y la mayor rentabilidad económica (B/C de 2.15).

VI. RECOMENDACIONES

1. Aplicar el 6% de pepsina para la obtención de colágeno, se obtuvieron los mejores resultados físico- químicas y microbiológicos, obteniendo además menores costos de producción y altas rentabilidades.
2. Emplear el colágeno extraído en la industria alimentaria en la elaboración de embutidos, ya que se puede utilizar como ligante, espesante o gelificante para mejorar la textura
3. Utilizar la enzima pepsina en la extracción de colágeno en otras materias primas como pieles y escamas de pescado como también patas y pieles de bovinos y porcinos.
4. Realizar la caracterización del colágeno extraído para determinar por porcentaje de Hidróxiprolina que es el componente principal del colágeno y otros minerales que se puedan encontrarse en la proteína total y dar su aplicación más eficiente de acuerdo a su contenido.

VII. LITERATURA CITADA

ALMEIDA, P. ALVES, W., FARIAS, T. & CURVELO, J. 2012. Elaboración y Clasificación Sensorial de Gelatinas de Patas de Pollos. Correlación usando Redes Neuronales Artificiales. 130 - 134. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/262462953_Elaboracion_y_Clasificacion_Sensorial_de_Gelatinas_de_Patas_de_Pollos_Correlacion_usando_Red_Neuronales_Artificiales.

ALMEIDA, P. SILVA, J. LANNES, C. & FARIAS, T. 2013. Quality assurance and economical feasibility of an innovative product obtained from a byproduct of the meat industry in Brazil. Business Management, págs. 2745-2756. Disponible en: <http://www.academicjournals.org/journal/AJBM/article-full-text-pdf/85954E139414>.

ARAGÓN, M. 2011. Biomateriales. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/64642318/Fuentes-del-colageno-y-sus-metodos-de-extraccion>

BASURTO, C. & GRIJALVA, E. 2015. Escuela Politecnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López- Tesis- Incidencia De Colágeno De Pollo Y Temperatura Del Proceso En La Calidad Proteica De Salchicha Escaldada. Calceta- Manabi. Disponible en: <http://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/442/1/TAI97.pdf>.

BENÍTEZ, R. IBARZ, A. & PAGAN, J. 2010. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. Popayán – Colombia.: Grupo de Química de Productos Naturales, Departamento de Química, Universidad del Cauca. Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/pdf/abcl/v42n2/v42n2a08.pdf>.

BONMATÍ, L. & LEÓN, A. 2009. Estudio del proceso de transformación del colágeno en gelatina. Disponible en: [file:///C:/Users/usuario/Downloads/100971-404731-1-PB%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/usuario/Downloads/100971-404731-1-PB%20(1).pdf)

- CASTELBLANQUE, E. (2015). Desarrollo del diagrama de estado del Gel-Colágeno para impresión de alimentos en 3D . Valencia. Obtenido de Disponible en: https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/54286/TFGEvaCastelblanque_14363445500244268693290021222438.pdf?sequence=6&isAllowed=y.
- CASTRO, D. 2016. Obtención de Colágeno de Crestas de Pollo. Obtenido de Proyecto de Grado. Disponible en: <http://repositorio.uis.edu.co/jspui/bitstream/123456789/478/2/145358.pdf>
- CERTAD, M. & PÉREZ, B. 2007. Características de la Gelatina de Patas de Pollo Obtenida por un Proceso Ácido. 322-328.
- CORREA, M. & LOPES, C. 2013. Gelation property and water holding capacity of heat-treated collagen at different temperature and pH values . Food Research, 213-223. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996912004279?via%3Dihub>
- COVENIN. 1987. Comisión Venesolana de Normas Industriales. Alimentos. Metodo para el recuento de colonias bacterias aerobias en placa petri. (Categoria B-902-87). Venezuela: Caracas. Disponible en : <http://www.sencamer.gob.ve/sencamer/normas/902-87.pdf>.
- ECUARED. 2014. Enzimas Digestivas . Disponible en: <http://www.ecured.cu/Pepsina>
- FALLA, L. 2006. Manual de reciclaje de residuos y desechos de las industrias cárnicas y lácteas en America Latina. Quito, Ecuador: sn.
- FIGUEROA, C. GOMEZ, R. PROHIAS, J, & PASCUAL, L. 2016. Andamios de colágeno para la restauración del tejido del miocardio. Biomateriales , 15-24. Disponible en:

<https://www.researchgate.net/publication/315761592> Obtencion de andamios de colageno para la restauracion del tejido del miocardio

GÓMEZ, L. PIÑA, B. & RODRÍGUEZ, F. 2011. Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México. Obtención y caracterización de colágena tipo I a partir de tendón bovino. México. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/sv/v24n4/v24n4a6.pdf>

GOMEZ, M. GIMENEZ, B. LOPEZ, M. & MONTERO, P. 2011. Functional and bioactive properties collagen from alternative sources. Food Hydrocolloids, 1813-1827. Disponible en: http://digital.csic.es/bitstream/10261/63157/4/Gomez-Guillen-collagenreview_CSIC.pdf.

GUILLÉN, V. (2010). Proteínas. Obtenido de Estructura y Clasificación de las Proteínas : http://www.uv.es/tunon/pdf_doc/proteinas_09.pdf

ILCE. 2009. Pluma y plumajes . Disponible en :http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/138/htm/sec_8.htm

INEN. 2014. Gelatina pura comestible. Requisitos . Quito. Obtenido de: http://www.normalizacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2014/02/n-te_inen_1521.pdf

LABORATORIO DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL, FUNDACION CIEPE. 2001. Características de la gelatina de las patas de pollo obtenida por un proceso adico . FCV-LUZ, 56.

LIZARBE, A. 2008. El colageno ¿Un elemento biologico que mantiene la arquitectura y plasticidad tisular? Disponible en: <http://www.rac.es/ficheros/doc/00370.pdf>

- LÓPEZ, M. AMARAL, R. & KALIL, S. 2008. Proteólisis enzimática del colágeno dentinario . consicientiae Saúde, 477-486. Disponible en: <http://www.scielo.edu.uy/pdf/ode/v12n14/v12n14a04.pdf>.
- MENDOZA, R. AGUILERA, C. & MONTEMAYOR, J. 2010. Utilización de Subproductos Avícolas en las Dietas para organismos acuicolas . Mexico. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rori/v18n2/v18n2a02.pdf>
- MOSQUERA, M. 2014. Nanoencapsulación de hidrolizados peptídicos con actividades biológicas procedentes de subproductos de la pesca. Obtenido de Tesis Doctoral. Disponible en: <http://eprints.ucm.es/25118/1/T35312.pdf>
- MULLO, I. 2012. Manejo y Procesamiento de la Gallinaza. Obtenido de Tesis traabajo de Titulación. Disponible en : <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/2114/1/17T1106.pdf>
- NAVARRO, C. & SÁNCHEZ, J. 2008. 'Hidrolizado enzimático de colágeno y procedimiento de obtención'. EE.UU. Disponible en: <https://www.google.com/patents/WO2008049942A1?cl=es>.
- PACHECO, C. & DOMINGUEZ, M. 2010. Subproductos y su utilización como concentrados. Aguachica. Disponible en: <http://agroelectiva.blogspot.com/>
- PAL, G. NIDHEESH, T. & SURESH, P. 2015. Comparative study on characteristics and in vitro fibril formation ability of acid and pepsin soluble collagen from the skin of catla (Catla catla) and rohu (Labeo rohita). Food Research International , 804-812. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/280083423_Comparative_study_o_n_characteristics_and_in_vitro_fibril_formation_ability_of_acid_and_pepsin_soluble_collagen_from_the_skin_of_catla_Catla_catla_and_rohu_Labeo_r_ohita.
- PAREJA, M. 2008. Anatomía y Fisiología Aviar. Lima. Disponible en: http://aprendeonlinea.udea.edu.co/lms/moodle/pluginfile.php/247268/mod_r

esource/content/0/ANATOMIA Y FISILOGIA AVIAR documento 2011.pdf.

PERALTA, C. RIVERA, N. & GUALDRÓN, L. 2012. Extracción de colágeno en medio ácido-básico a partir de los cascos de bovinos. Epsilon , 59-69. Disponible en: <https://revistas.lasalle.edu.co/index.php/ep/article/view/2203/2027>

PRONOTO, Y. LEE, C. & PARK, H. 2007. Characterizations of fish gelatin films added with gellan and k-carrageenan. LWT-Food Science and Technology, 766-774. Disponible en: <http://pack.korea.ac.kr/non/76.pdf>

RODRÍGUEZ, F. 2011. Estructura Y Propiedades De Aminoácidos Y Péptidos. Disponible en: http://sevuprimero.weebly.com/uploads/9/8/6/3/9863937/estructura_y_propiedades_de_pptidos_y_aminocidos_fabin_rodriguez.pdf

RODRIGUEZ, L. 2012. El Lechero . Disponible en: <http://www.progressivedairy.com/el-lechero/52-past-articles/3419-0907-el-espanol-anatomia-del-casco-de-la-vaca>

SERRANO, J. 2011. Estandarización de un proceso de extracción de colágeno a partir de los residuos de fileteo de tilapia (*Oreochromis sp*) y cachama (*Piaractus brachypomus*). Bogota. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/4880/1/jenifercarolinaserranogaona.2011.pdf>

SHOULDERS, M. & RAINSES, R. 2009. Collagen structure and stability. Annu.Rev.Biochem, 929-958. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19344236>

SMEDICAL. (2009). SMedical. Disponible en : <http://www.elcolageno.com/tratamiento-con-colageno>

TORRES, J. MOREIRAS, G. MORENO, E. & CALLE, S. 2012. Guia Nutricional de la Carne. Federacion Española de Nutricion. España. Disponible en: <https://fcsalud.ua.es/es/portal-de-investigacion/documentos/enlaces-de-interes/libro-blanco-de-la-nutricion-en-espana.pdf>.

ANEXOS

Anexo 1. Determinación del Nitrógeno Total

A. Determinación de Nitrógeno Total en los tratamientos

Pepsina	Repeticiones				
	I	II	III	IV	V
0%	0,08	0,11	0,11	0,10	0,11
2%	0,10	0,11	0,11	0,11	0,11
4%	0,13	0,10	0,14	0,13	0,13
6%	0,14	0,10	0,13	0,13	0,13

B. Análisis de ADEVA.

F. Var	gl	S. Cuad	C. Medio	Fisher	P. Fisher
Total	19	0,00			
% Pepsina	3	0,00	0,00	5,98	0,01
Lineal	1	0,00	0,00	16,16	0,00
Cuadrático	1	0,00	0,00	0,45	0,51
Cúbico	1	0,00	0,00	1,34	0,26
Error	16	0,00	0,00		
CV (%)			10,25		
Media			0,11		

C. Separación de media según Tukey ($P < 0,05$)

% Pepsina	Media	Rango
0%	0,10	b
2%	0,11	ab
4%	0,13	a
6%	0,13	a

Anexo 2. Determinación de Proteína Total

A. Determinación de Proteína Total en los tratamientos

% Pepsina	Repeticiones				
	I	II	III	IV	V
0%	0,48	0,67	0,66	0,65	0,67
2%	0,63	0,67	0,70	0,69	0,68
4%	0,82	0,63	0,86	0,78	0,82
6%	0,85	0,65	0,83	0,78	0,81

B. Análisis de ADEVA

F. Var	gl	S. Cuad	C. Medio	Fisher	P. Fisher
Total	19	0,18			
% Pepsina	3	0,10	0,03	5,98	0,01
Lineal	1	0,09	0,09	16,16	0,00
Cuadrático	1	0,00	0,00	0,45	0,51
Cúbico	1	0,01	0,01	1,34	0,26
Error	16	0,09	0,01		
CV (%)			10,25		
Media			0,72		

C. Separación de media según Tukey ($P < 0,05$)

% Pepsina	Media	Rango
0%	0,62	b
2%	0,67	ab
4%	0,78	a
6%	0,78	a

Anexo 1: Análisis de datos del Ph

A. Determinación de pH en los tratamientos

% Pepsina	Repeticiones				
	I	II	III	IV	V
0%	6,11	6,12	6,07	6,08	6,10
2%	6,01	5,86	6,00	5,76	6,30
4%	5,76	5,70	5,74	5,80	5,76
6%	5,56	5,23	5,25	5,10	5,24

B. Análisis de ADEVA

F. Var	gl	S. Cuad	C. Medio	Fisher	P. Fisher
Total	19	2,27			
% Pepsina	3	1,99	0,66	36,63	0,00
Lineal	1	1,81	1,81	100,44	0,00
Cuadrático	1	0,17	0,17	9,27	0,01
Cúbico	1	0,00	0,00	0,19	0,67
Error	16	0,29	0,02		
CV (%)			2,33		
Media			5,78		

C. Separación de media según Tukey (P<0,05)

% Pepsina	Media	Rango
0%	6,10	a
2%	5,99	ab
4%	5,75	bc
6%	5,28	c

Anexo 3. Determinación de Densidad, (g/ml)

A. Determinación de Densidad en los tratamientos

% Pepsina	Repeticiones				
	I	II	III	IV	V
0%	0,26	0,26	0,26	0,28	0,25
2%	0,35	0,33	0,31	0,32	0,34
4%	0,37	0,37	0,34	0,32	0,36
6%	0,34	0,38	0,37	0,36	0,40

B. Análisis de ADEVA

F. Var	Gl	S. Cuad	C. Medio	Fisher	P. Fisher
Total	19	0,04			
% Pepsina	3	0,03	0,01	36,29	0,00
Lineal	1	0,03	0,03	97,30	0,00
Cuadrático	1	0,00	0,00	9,74	0,01
Cúbico	1	0,00	0,00	1,84	0,19
Error	16	0,00	0,00		
CV (%)			5,30		
Media			0,33		

C. Separación de media según Tukey (P<0,05)

% Pepsina	Media	Rango
0%	0,26	C
2%	0,33	B
4%	0,35	Ab
6%	0,37	C

Anexo 4. Determinación de conductividad, (ms/cm)

A. Determinación de Conductividad en los tratamientos

% Pepsina	Repeticiones				
	I	II	III	IV	V
0%	16,20	16,56	16,34	16,85	16,80
2%	17,18	17,22	17,52	17,67	17,23
4%	18,44	18,56	18,23	18,34	18,70
6%	20,56	20,38	20,60	20,12	20,72

B. Análisis de ADEVA

F. Var	gl	S. Cuad	C. Medio	Fisher	P. Fisher
Total	19	44,19			
% Pepsina	3	43,33	14,44	267,84	6,99E-14
Lineal	1	41,40	41,40	767,70	5,9818145E-15
Cuadrático	1	1,82	1,82	33,83	2,6276694E-05
Cúbico	1	0,11	0,11	2,00	0,18
Error	16	0,86	0,05		
CV (%)			1,28		
Media			18,21		

C. Separación de media según Tukey (P<0,05)

% Pepsina	Media	Rango
0%	16,55	d
2%	17,36	c
4%	18,45	b
6%	20,48	a

Anexo 5. Determinación de Aerobios Totales, (UFC/mL)

	%PEPSINA			
	0	0,02	0,04	0,06
Media	22	40	42	42
Error típico	19,5959179	40	39,5474399	39,5474399
Desviación estándar	43,8178046	89,4427191	88,4307639	88,4307639
Varianza de la muestra	1920	8000	7820	7820
Curtosis	4,79654948	5	4,95094224	4,95094224
Coefficiente de asimetría	2,1835207	2,236067977	2,22290164	2,22290164
Suma	110	200	210	210
Cuenta	5	5	5	5