

Extracción de colágeno a partir de pieles de tilapia

VELARDE-RODRÍGUEZ, María Guadalupe*†, BELTRÁN-ACOSTA, Ana Cristina, PICHARDO-VELARDE, Jorge Gerardo y AMEZCUA-VEGA, Claudia

Recibido 3 de Julio, 2015; Aceptado 25 de Septiembre, 2015

Resumen

Colágeno, proteína constituyente de los tejidos conjuntivos, es la más abundante en los organismos heterótrofos, tiene como función principal mantener la estructura de los tejidos, su resistencia y flexibilidad, resultando de alto valor comercial en industrias cosméticas, farmacéuticas, biomédicas y de materiales, por lo cual es conveniente buscar alternativas de obtención en diferentes organismos, abaratando los costos de producción sin dejar la calidad del colágeno. En Sinaloa existen más de 36 piscicultores inscritos al padrón estatal, cada uno produce una gran cantidad de desperdicios, originando contaminación después de extraer el producto de interés (músculo); por lo cual en el presente trabajo se buscó implementar un método de extracción de colágeno a partir de la piel de tilapia, estandarizando el método para su posible implementación en diferentes especies, además de corroborar que el producto obtenido del proceso es colágeno mediante el uso de marcadores moleculares comerciales de colágeno de rata y cerdo en electroforesis SDS-PAGE.

Colágeno, Tilapia, desechos, piel, electroforesis SDS-PAGE

Abstract

The collagen, a constituent protein from the connective tissue is the most abundant protein in heterotrophic organisms, whose main function is to maintain the structure of tissues, strength and flexibility, resulting in a high - commercial value into cosmetic, pharmaceutical, biomedical and materials industries, so it is wise to seek alternatives to obtain it from different organisms, lowering production's costs while the quality of collagen is the same as traditional extraction. In Sinaloa, there are more than 36 fish farmers enrolled in the state register, each of them produce a big waste causing pollution after removing their interest's product (muscle), which in this paper seeks to implement a method for extracting collagen from the skin of "tilapia", standardizing the method for possible implementation in different species, in addition to corroborate the product obtained in the process, using collagen markers from commercial rat and pig collagen in SDS-PAGE.

Collagen, Tilapia, waste, skin, SDS-PAGE electrophoresis

Citación: VELARDE-RODRÍGUEZ, María Guadalupe, BELTRÁN-ACOSTA, Ana Cristina, PICHARDO-VELARDE, Jorge Gerardo y AMEZCUA-VEGA, Claudia. Extracción de colágeno a partir de pieles de tilapia. Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias 2015, 2-4: 631-639

* Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: mvelarde@upsin.edu.mx)

† Investigador contribuyendo como primer autor.

Introducción

El colágeno es una proteína constituyente de los tejidos conjuntivos, como la piel, los tendones y huesos, siendo así la proteína más abundante de los organismos heterótrofos; está compuesto por un conjunto de tres cadenas polipeptídicas (1000 aminoácidos por cadena) agrupadas en una estructura helicoidal, siendo esta la responsable de la rigidez y la resistencia de las fibras. (Prockop y Guzmán, 2002)

La principal función del colágeno es mantener la estructura de los tejidos y mejorar la fuerza, resistencia y flexibilidad de los tejidos. Gracias a estas características, el colágeno es de gran importancia en el campo de los materiales biomédicos y biomateriales, así como en la industria farmacéutica y cosmética. (Serrano, 2011)

Inicialmente, el colágeno se ha obtenido principalmente de origen porcino y bovino, sin embargo se buscan nuevas fuentes de extracción de la proteína debido al rechazo generado por las enfermedades bovinas que pueden pasar a los humanos y las creencias de carácter religioso. Una fuente que actualmente se estudia es la piel de pescado, subproducto del proceso de fileteo, considerado como desecho o residuo. (Lizarbe, 2001)

Los beneficios del colágeno de pescado son aprovechados por el potencial de ser más fácilmente absorbido por la piel humana que el de cualquier otro animal. Debido a la variedad de temperaturas y presiones acuáticas en las cuales viven los peces, el colágeno de pescado es resistente al daño físico y químico. (Kelly, 2010)

Los piscicultores del país, entre ellos los de Sinaloa presentan las pieles de pescado como desecho y debido al desarrollo de aplicaciones del colágeno, este se ha convertido en un producto de alta demanda en diferentes sectores productivos del país.

La presente investigación se diseñó con la finalidad de brindar un valor agregado a los desechos de la acuicultura, beneficiando a este mismo sector y a empresas del giro cosmetológico y biomédico, además de colaborar con la reducción de la contaminación creada por granjas acuícolas.

Metodología a desarrollar

Se realizó una extracción de colágeno proveniente de piel de tilapia, la cual cumplió con los estándares de calidad establecidos (Apariencia brillante, no decolorada, textura firme y elástica, así como olor característico a pescado fresco); las tilapias aceptadas fueron limpiadas y evisceradas. Posteriormente se realizó la reducción de tamaño de manera manual de la piel, la cual se lleva a cabo en cuadros de aproximadamente 1cm x 1cm, esto con el fin de facilitar el proceso de extracción, es importante manejarlo con este tipo de corte, ya que si se tritura, no se obtienen los resultados de la misma manera en cuanto al rendimiento.

Terminado la reducción de tamaño se procede a una decoloración de las pieles, utilizando como agente blanqueador hipoclorito de sodio al 0.525% (p/v) con un tiempo estimado para el proceso de 30 minutos a temperatura ambiente en relación 1:10 p/v con la muestra de piel. El resultado es piel sin su color característico grisáceo y sin microorganismos gracias al efecto desinfectante del hipoclorito de sodio, siendo así atractivo para las industrias de cosméticos y biomateriales por su color y su inocuidad.

Posterior al blanqueamiento se realizan tres lavados con agua destilada a la piel decolorada, con el fin de eliminar en su totalidad el hipoclorito de sodio y su posible interferencia en futuros pasos de extracción.

Continuando con la extracción, se realizó una hidrólisis enzimática, cuya función de esta etapa fue eliminar proteínas distintas al colágeno presente en la piel de pescado, las cuales se hidrolizan gracias a la acción de las proteasas de *Bacillus subtilis*, utilizando el reactivo comercial de SIGMA P3111-50mL al 3% utilizando buffer Tris-HCl en pH 8.6 con el fin de brindar estabilidad a las proteasas a lo largo del proceso. El volumen utilizado de proteasa es calculado en proporción 1:10 p/v.

La hidrólisis enzimática se realizó por un tiempo de 2:20 horas a temperatura de 35°C con oscilación mínima para maximizar el efecto de las proteasas. Al término de las 2:20 horas se realizaron tres lavados con agua destilada a la piel decolorada e hidrolizada, con la intención de eliminar las proteasas y el producto de estas en el medio.

Posterior a la hidrólisis se realizó la solubilización de colágeno en medio ácido, donde el colágeno presente en la matriz de la piel se separa completamente de esta. Los reportes indican al ácido acético como el agente utilizado para solubilizar el colágeno en concentraciones cercanas a 0.5M, por lo tanto se realizó bajo esa concentración durante 300 minutos, a una temperatura de 35°C y en proporción 1:10 p/v (Nagai and Suzuki 1999; Wang, et al. 2008; Duan, et al. 2009).

Para realizar una separación entre lo solubilizado y el residuo, se utilizó una filtración con papel filtro de poro mediano y con ayuda de filtros de plástico, además de eliminar los restos de piel del colágeno en estado líquido.

Al tener el colágeno en estado líquido se recomienda una precipitación con una solución de cloruro de sodio, gracias a las cargas iónicas que ésta sal proporciona a la proteína. La precipitación se realizó con NaCl al 12%, durante 7 horas, a temperatura ambiente y oscilación suave para evitar que el precipitado sufriera algún daño, además de eliminar cualquier interferencia de proteínas en el colágeno sólido.

Para recuperar íntegramente el colágeno en estado sólido se utilizó una filtración con papel filtro de poro mediano y filtros de plástico, el sólido que se obtuvo como retención del filtro fue colágeno sólido. Al término de este proceso el colágeno fue lavado tres veces con agua destilada con la finalidad de eliminar cualquier resto de ácido acético y de sales presentes en el líquido al pasar por el filtro.

El colágeno fue guardado en refrigeración a 4°C en frascos de cristal estériles, evitando contaminación de cualquier tipo.

Estandarización del método de extracción

Se realizaron dos corridas experimentales de extracción de colágeno donde se modificaron diferentes factores, los cuales fueron temperatura (28, 35 y 40°C), pH (7, 8.6 y 9), tiempo de blanqueamiento (15, 30 y 60 minutos), hidrólisis enzimática (2, 2:20 y 3 horas; 3%, 6% y 9% enzima), y por último precipitación salina (15 minutos, 7 y 12 horas). Las modificaciones a la técnica se encuentran descritas en el reporte de estadía de Beltrán, 2013.

Cuantificación de proteínas

Se realizó una cuantificación de proteínas totales con base al método de Bradford (Bradford, 1976) realizando una curva estándar con Seroalbúmina bovina (BSA) donde la muestra problema fue colágeno sólido, el cual se disolvió en ácido acético 0.5M y se cuantificó a 595nm.

El resultado de la cuantificación de proteínas sirve como indicador para cuantificación de rendimientos, así como para revisar el límite de detección en electroforesis SDS-PAGE con tinción de azul de commassie Blue R-250.

Análisis microbiológico

Se realizó con base a la Norma Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009, Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba. La cual explica cómo preparar y diluir las muestras para su análisis microbiológico, para obtener una distribución lo más uniforme posible de los microorganismos presentes en la porción de muestra, así como la preparación de los medios de cultivo para cuantificar bacterias coliformes en base a la técnica del número más probable.

Siguiendo con los procedimientos para verificar la inocuidad del colágeno se realizó el análisis de histamina, es decir, el grado de descomposición del colágeno proveniente del pescado, resultando negativo, aun cuando la muestra fue almacenada durante tres meses en refrigeración, por lo cual, puede ser utilizada en cualquier industria garantizando su conservación por un periodo igual o menor a éste.

Verificación de la extracción

Siendo la electroforesis una técnica de separación de moléculas cargadas por migración en un campo eléctrico según su peso molecular, se llevó a cabo la técnica conocida como SDS- PAGE en condiciones desnaturizantes y reductoras según Carrillo, 2013 donde SDS (Dodecilsulfato sódico) es el detergente aniónico a utilizar y PAGE (Electroforesis en gel de poliacrilamida) es el medio donde se realizó, a un valor del 7% (gel de retención) y 12% (gel de separación).

Se utilizaron dos marcadores de colágeno comercial los cuales fueron referencia para verificar que en la técnica de extracción se obtuvo realmente colágeno, los cuales son colágeno a partir de piel de cerdo de SIGMA® (#C9791-10MG) y colágeno a partir de cola de rata, marca SIGMA® (#C7661-5MG).

Resultados**a) Extracción de colágeno**

Después de realizar el protocolo de extracción se obtuvo una mezcla proteica de color blanco perla, de textura gelatinosa, espesa y húmeda, con olor débil a ácido acético, esto es debido a que el olor queda impregnado en la muestra tras varios intentos de lavado, este olor débil no representa un daño a su composición, por lo tanto la aplicación industrial es segura.

b) Estandarización del método de extracción.

Se detectó que siguiendo la metodología anteriormente descrita en la presente investigación se lleva a cabo la mejor extracción, con resultados puros y blancos. El análisis de dicha detección se realiza a continuación.

En el factor “temperatura” oscilando entre 28, 35 y 40°C, la proteasa es inactivada al entrar a los 40°C por lo cual no se registró ningún resultado al término de las dos corridas experimentales, mientras que la temperatura de 28°C al no estar en condiciones óptimas se registró un resultado de colágeno inferior a la mitad obtenido a los 35°C.

Por otro lado, en el factor “tiempo de blanqueamiento” se registró que pasados los 30 minutos se obtiene el mismo degradado de piel que en 60 minutos, sin embargo, el degradado a los 15 minutos es mínimo a comparación con el tiempo de 30 minutos.

En el factor “tiempo” para hidrólisis enzimática se ha encontrado una comparación mínima entre los tiempos 2:20 y 3 horas, resultando en un incremento de 10% de proteína total en el tiempo de 3 horas, mientras que en el tiempo de 2 horas la cantidad de proteínas totales es de 89% a comparación con 2:20 horas. Mientras que en el factor “% de enzima” 3, 6 y 9%, el resultado óptimo es el de 6% enzima, sin embargo, utilizando 3% de enzima se obtiene el 80% del resultado de 6% por lo cual, se optó por seguir utilizando esta cantidad por cuestiones de costo.

Siguiendo con la precipitación salina con el factor “tiempo”, 15 minutos, 7 y 12 horas, se encontró que el resultado a las 7 horas es óptimo a comparación con el de 15 minutos, ya que en el tiempo de 15 minutos se cuenta con el 59% del total, mientras que en el de 12 horas es igual al resultado obtenido a las 7 horas.

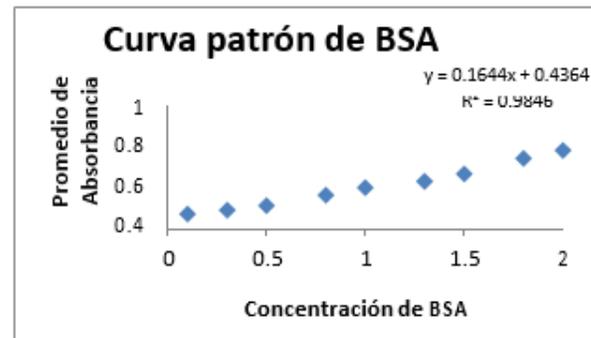
c) Cuantificación de proteína

Después de estandarizar el método de extracción se procedió a la cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford, obteniendo la curva patrón con Seroalbúmina bovina.

Determinación (µg/mL)	Promedio ABS 595nm
0.1	0.470
0.3	0.489
0.5	0.511
0.8	0.563
1.0	0.600
1.3	0.630
1.5	0.667
1.8	0.744
2.0	0.783

Fuente: Elaboración propia

Tabla 1 Resultados de la cuantificación de proteínas para la curva patrón por método de Bradford.



Fuente: Elaboración propia

Figura 1 Curva patrón de Seroalbúmina

Con base a la curva patrón se utilizó la ecuación de la recta para llegar a la concentración de las muestras, esto es modificando la ecuación de tal forma que

$$x = ((Y \text{ Absorbancia promedio}) - 0.4364) / 0.1644$$

La R² que se obtuvo en la curva patrón fue de 0.9846 siendo un resultado confiable a partir de 0.9800.

Por otra parte, la cantidad de proteína resultante en la muestra de colágeno fue de 0.495mg/mL (tabla 2), siendo una cantidad baja comparada con otros estudios, los cuales reportan una cantidad de proteína de 0.7mg/mL (Serrano, 2011; Gómez, 2011; Torres, 2008).

Lo cual se puede atribuir al hecho de que no se trabaja con la misma especie animal; además que el colágeno presente en las estructuras animales puede variar según sea la especie o bien el género del animal.

Muestra	Fecha	[Colágeno sólido]	PromAbs	[mg/mL]
Colágeno	4/02/14	0.25g/1mL	0.484	0.288
		0.50g/1mL	0.488	0.315
		1g/1mL	0.518	0.495
	28/04/14	0.25g/1mL	0.465	0.170
		0.50g/1mL	0.502	0.400
		1g/1mL	0.489	0.319
	5/05/14	0.25g/1mL	0.512	0.461
		0.50g/1mL	0.478	0.250
		1g/1mL	0.463	0.158
Marcador de Rata	0.3µg/ 75µL	0.490	0.325	
Marcador de Cerdo	0.5µg/ 100µL	0.498	0.374	

Tabla 2 Cuantificación de proteínas a muestras de colágeno en solución ácida. Concentraciones marcadas son detectables en electroforesis.

Por otro lado, la cuantificación de rendimiento se realizó de la siguiente manera con una muestra realizada el 7 Agosto de 2014.

Muestra	ABS 1	ABS 2	ABS 3	Promedio	Concentración
Colágeno	0.520	0.522	0.535	0.5257	0.5421

Tabla 3 Cuantificación proteínas totales.

La concentración anterior es en base a µg/mL, por lo que siguiendo con el análisis de la muestra:

0.5421 µg en 10µL, por lo tanto en 5mL se tienen 271.05 µg.

2.71mg en 5mL de muestra.

Tomando en cuenta que por cada 5g de piel de tilapia se obtienen 2.83g de colágeno hidrolizado, el producto final será de 76.69mg.

a) Análisis microbiológico.

Al terminar la incubación se procedió a la lectura de los medios de cultivo, donde cada muestra y cada dilución se realizan por triplicado, los resultados del análisis se muestran a continuación considerando los índices del Número Más Probable y límites de confianza al 95% establecidos en la norma NOM-242-SSA1-2009.

Caldo	[caldo]	Muestra sólida	
		Combinación	Índice del NMP por g
Lactosado	[1.5]	0-0-1	0.3
	[Sencilla]	0-1-0	0.3
Lauril-Sulfato-Triptosa	[1.5]	0-1-1	-
	[Sencilla]	2-1-0	1.5
Lactosa Verde Brillante		0-0-0	<0.3

Tabla 4 Resultados microbiológicos

En cambio en la muestra sólida el NMP es de 0.48 coliformes por gramo de muestra, y los límites de confianza en el 95% de los casos varía de 0.05 a 4.4 coliformes por gramo de producto.

Ambas cantidades se consideran como aceptables con base a la norma, y no se consideran como riesgo para la salud del consumidor.

a) Prueba de histamina a muestras de colágeno.

Con base a la prueba de histamina realizada en el "Laboratorio Químico Portillo" ubicado en la ciudad de Mazatlán, Sinaloa, con domicilio en Zaragoza #1206, depto. 102, colonia centro; se encontró que la muestra de colágeno líquido no contiene histamina detectable, ya que está por debajo de los 0.5 mg/kg y se puede observar en la Tabla 5.

Informe de prueba:

Parámetro	Unid	Resultado	Método de prueba	Análisis
HISTAMINA	Mg/kg	<0,5 (no detectable)	Espectrofotometría	AT 14.08.08

Tabla 5 Resultados de Histamina

b) Verificación de la extracción.

Al término de la corrida electroforética se pueden observar tres bandas por carril en las muestras y en los marcadores comerciales de colágeno a partir de rata y de cerdo, de alto peso molecular (Figura 1).

Los carriles correspondientes a “Rata Comercial” y “Cerdo Comercial” muestran los marcadores comerciales de colágeno obtenido de cerdo y rata mostrando las mismas bandas por carril entre ambas muestras comerciales.

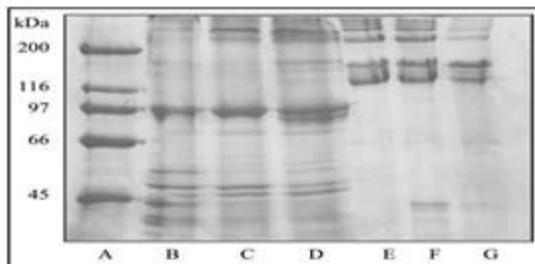


Figura 2. Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes del colágeno extraído de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). Carril A: marcador de peso molecular; B: colágeno soluble en sal extraído de manto; C: colágeno soluble en sal extraído de aleta; D: colágeno soluble en sal extraído de tentáculos; E: colágeno soluble en pepsina extraído de manto; F: colágeno soluble en pepsina extraído de aleta; G: colágeno soluble en pepsina extraído de tentáculos.

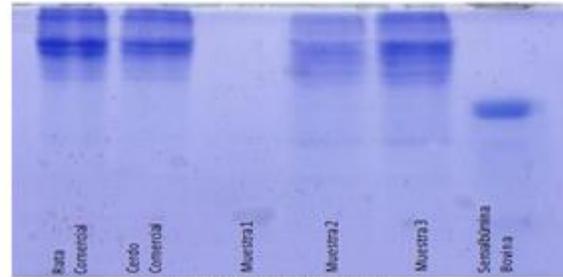
Fuente: Torres et al., (2008)

Figura 2 Electroforesis en gel de SDS

Los carriles correspondientes a las muestras 1, 2 y 3 fueron muestras extraídas en diferentes días, por el protocolo establecido en la presente investigación, las cuales presentan similitudes en las bandas de ambas muestras con las de las muestras de colágeno comercial rata y cerdo.

El carril correspondiente a la Seroalbúmina bovina se trata de una concentración conocida para corroborar que la técnica se realizó de la manera correcta.

Con ayuda del análisis bibliográfico se hizo una comparación entre bandas y geles de poliácridamida correspondientes a colágeno.



Fuente: Elaboración propia

Figura 3 Electroforesis SDS-PAGE con colágeno comercial y muestras de colágeno

En el protocolo de extracción de colágeno de Torres, et al., (2008) reporta como resultado en su gel de poliácridamida, dos bandas α de alto peso molecular en las bandas B,C,D,E,F Y G señaladas en la Figura 2, las cuales son características del colágeno; esta información concuerda también con la información del estudio de Serrano (2011).

Anexos



Figura 4 Piel de Tilapia disminuido el tamaño con cortes de 1x1 aprox.

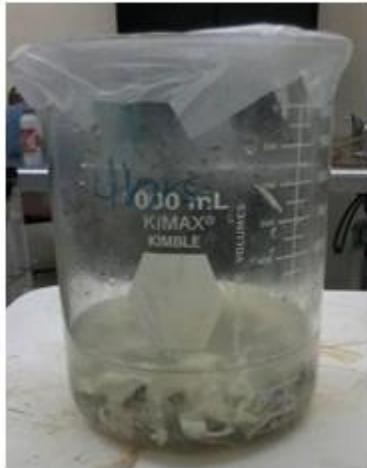


Figura 5 Desnaturalización con *Bacillus* sp.



Figura 6 Precipitación salina y filtración.



Figura 5 Producto extraído.

Agradecimiento

El presente proyecto fue realizado con el financiamiento y apoyo de la Universidad Politécnica de Sinaloa.

Agradecemos el apoyo brindado por el Rector Dr. Leonardo Germán Gandarilla y el Secretario Académico MC. José Isidro Osuna López.

Conclusiones

Se logró realizar la extracción de colágeno a partir de pieles de tilapia de acuerdo al protocolo de extracción establecido.

Se purificó el extracto obtenido del protocolo de colágeno, pasando de estado líquido al sólido por precipitación y filtración.

Se logró la estandarización del método de extracción en base a la metodología de extracción establecida.

Se cuantificó la proteína obtenida de las muestras de extracción de diferentes días, las cuales presentan una cantidad de proteína baja en comparación con otros estudios en diferentes especies, sin embargo, es un método de transformación no utilizado para el ingreso al mercado de un subproducto de la acuicultura que puede ser rentable.

Se realizó un análisis microbiológico en base a la norma NOM-242-SSA1-2009, en el cual se controlan las especificaciones sanitarias y métodos de prueba de subproductos del pescado donde se consideró en base a los resultados como un producto no riesgoso para la salud.

Se corroboró mediante electroforesis la extracción de colágeno utilizando marcadores comerciales de colágeno de rata y cerdo, donde presentan tres bandas que en bibliografía y en técnica se pueden apreciar de las muestras de la extracción.

Referencias

- Prockop, DJ. Guzmán, NA. 2002. Tiempos médicos. Capítulo 4 “El colágeno”. España.
- Serrano, GJC. 2011. Estandarización de un proceso de extracción de colágeno a partir de los residuos de fileteo de tilapia (*Oreochromis*) y cachama (*Piaractusbrachypomus*). Universidad Nacional de Colombia. Colombia.
- Lizarbe, M. 1997. El colágeno, ¿un cemento biológico que mantiene la arquitectura y plasticidad tisular?. Real academia de ciencias. España.
- Kelly, J. 2010. Beneficios del Colágeno de pescado. Universidad de California. EUA.
- Nagai, T. Suzuki, T. 1999. Extracción de colágeno proveniente de desechos de pescado (piel, hueso y vísceras). *Química de Alimentos*. 430-442.
- Wang, L. An, X. 2008. Extracción y caracterización de colágenos provenientes de la piel, escama y hueso de peces rojos de aguas profundas (*Sebastes mentella*). *Química de Alimentos*. 616-623.
- Duan, RZJ. 2009. Propiedades del colágeno extraído de piel, escama y hueso de la carpa (*Cyprinus carpio*). *Química de Alimentos*. 702-706.
- Giraldo, GGA, et al. Capítulo 5: cuantificación de proteínas (método de Bradford). Laboratorio de Bioquímica: una visión práctica. Universidad del Quindío.
- Beltrán, AAC. 2013. Extracción de colágeno a partir de piel de tilapia. *UPSIN*. México. 5-15.
- Carrillo, SJG. 2013. Evaluación de Procedimientos de Tinción para el análisis de proteínas por electroforesis (SDS-PAGE). Universidad de Sonora.
- Gómez, L. 2011. Obtención y caracterización de colágena tipo 1 a partir de tendón bovino. Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Torres, A. 2008. Caracterización parcial del colágeno extraído a partir del manto, aleta y tentáculos de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). En: *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, vol. 6, núm. 2. 101-108. Sociedad Mexicana de Nutrición y Tecnología de Alimentos. México.