

EXTRACCIÓN DE COLÁGENO PROVENIENTE DE RESIDUOS DEL PROCESAMIENTO DE *Engraulis ringens* “ANCHOVETA”

Extraction of collagen from wastes processing *Engraulis ringens* “anchovy”

Armando Solari¹ Javier S. Córdova²

¹Dirección de Investigaciones Tecnológicas para la Transformación Pesquera (DGITTP) del Instituto Tecnológico de la Producción, ²Universidad Nacional Mayor de San Marcos

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue extraer el colágeno de los residuos producidos en el procesamiento de anchoveta (conservas y surimi). Para tal efecto, se solubilizaron las proteínas no colagénicas con una solución de hidróxido de sodio 0,1 N y se neutralizaron con lavados sucesivos con agua (pH cercano a neutro). Luego, los residuos fueron descalcificados con una solución de EDTA 0,5 M, desengrasados con butanol al 10% y finalmente se solubilizaron las proteínas colagénicas con ácido acético 0,5 M y se precipitaron con cloruro de sodio 2,6 M. El colágeno precipitado fue dializado y liofilizado. Se cuantificó el contenido hidroxiprolina (Hip) en los residuos y en el colágeno liofilizado, siendo los valores de 6,5 y 52,9 mg de hidroxiprolina/g de muestra, respectivamente. La solubilidad del colágeno liofilizado disminuyó alrededor de 40% a una concentración de 12% de NaCl. El gel de electroforesis mostró una banda intensa de peso molecular aproximado de 110 kDa que correspondería a las cadenas α 1 y α 3 de la molécula del colágeno tipo I.

Palabras clave: colágeno, anchoveta, solubilidad proteica, hidroxiprolina.

SUMMARY

The aim of this study was to extract collagen from the waste produced in the processing of anchovies (canned and surimi). To this end, non-collagenous proteins were solubilized with a solution of 0,1N sodium hydroxide and neutralized with successive washes with water (pH close to neutral). Then, the residues were decalcified with a EDTA 0,5M solution; degreased with butanol 10% and finally the collagen protein were solubilized with acetic acid 0,5M and precipitated with sodium chloride 2,6M. Collagen precipitated was dialyzed and lyophilized. The hydroxyproline content (Hip) were quantified in waste and lyophilized collagen, getting the values of 6,5 and 52,9 mg of hydroxyproline/g sample, respectively. The solubility of lyophilized collagen decreased about 40% at a concentration of 12% NaCl. Gel electrophoresis showed a strong band of approximately 110 kDa molecular weight that corresponds to the α 1 and α 3 chains of collagen type I.

Keywords: Collagen, anchovy, protein solubility, hydroxyproline.

INTRODUCCIÓN

En la industria pesquera, los residuos sólidos, constituyen entre el 50-70% de la materia prima inicial; dependiendo del proceso productivo consisten en una mezcla de cabezas, pieles, huesos y vísceras, principalmente. Aunque su valor nutricional es importante, se les destina a la elaboración de alimento balanceado o fertilizante, con bajo valor agregado ⁽¹⁾.

Por otro lado, estudios recientes que se vienen realizando en países tales como Japón, España, Francia, Tailandia y otros, en los que la actividad pesquera es preponderante en su economía, indican que la contaminación a causa del vertimiento de residuos provenientes de esta industria es alarmante y ocasionan serios problemas ambientales.

Investigaciones relacionadas a la composición y caracterización de los residuos de pescado y su utilización en la industria, han informado sobre la obtención de colágeno, gelatina y otras proteínas de alto valor biológico. Gómez-Guillén ⁽²⁾, menciona que el 30% de los residuos del procesamiento pesquero está conformado por piel y huesos, en los cuales el contenido de colágeno es elevado y cuyo aprovechamiento puede beneficiar a alimentos, cosméticos y elaboración de materiales biomédicos ⁽³⁾.

En el Perú, donde la actividad pesquera representa una fuente importante de divisas, estos problemas

de contaminación por residuos constituyen temas de desarrollo que hacen necesarios los estudios de aprovechamiento integral.

En este marco de ideas el presente estudio tiene como objetivo la obtención de colágeno y gelatina a partir de residuos del procesamiento de anchoveta (figura 1).

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de residuos

Se utilizaron los residuos (espinas, espinazos y escamas) de la línea de procesamiento de conservas de filete y surimi de anchoveta, procedente del Callao (figura 2).

Los restos de carne residual adherida a los descartes fueron removidos con agua y con la ayuda de un cepillo de cerdas finas, posteriormente estas muestras fueron cortadas en pedazos de 1-1,5 cm de longitud, empacadas en bolsas de polietileno y congeladas a -25°C hasta su uso.

Composición química proximal y contenido de hidroxiprolina (Hip)

La determinación de humedad, grasa, cenizas, y proteína (utilizando como factor 5,95) en los residuos y el colágeno obtenido se realizó de acuerdo a lo recomendado por FAO ⁽⁴⁾.

La cuantificación del colágeno fue realizada en base a la determinación de hidroxiprolina (Hip) siguiendo la

técnica colorimétrica desarrollada por Kolar *et al* ⁽⁵⁾.

Extracción de colágeno

Fue realizada de acuerdo al método propuesto por Nagai y Yamashita ⁽⁶⁾. Los descartes fueron tratados con hidróxido de sodio 0,1N durante 6 horas para la remoción de las proteínas no colagénicas y después lavados con agua corriente para eliminar la soda y alcanzar pH cercano a la neutralidad. Luego se descalcificó y desengrasó la muestra con EDTA 0,5M y butanol al 10%, respectivamente.

Para la extracción del colágeno se utilizó solución de ácido acético 0,5M durante 2 días y se precipitó con NaCl 2,6M. El precipitado fue llevado a pH neutro, dializado y liofilizado.

Todos los procedimientos de preparación se realizaron a 4°C y los reactivos utilizados en todos los análisis fueron de grado QP.

Solubilidad del colágeno

La solubilidad del colágeno fue evaluada de acuerdo al método propuesto por Montero *et al* ⁽⁷⁾. El colágeno fue disuelto en ácido acético 0,5M y agitado hasta que fue completamente solubilizado a 4°C y obtener una concentración de 6 mg/mL. Cinco mililitros de la solución de colágeno fueron mezclados con 5 mL de NaCl en ácido acético 0,5M en varias concentraciones porcentuales en peso/volumen (0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12%). Las mezclas fueron agitadas continuamente a 4°C durante 30 minutos, y centrifugadas a 10000 g a 4°C durante 30 minutos. La proteína del sobrenadante fue cuantificada por el método de Lowry *et al* ⁽⁸⁾, usando albúmina sérica bovina como estándar. Los resultados fueron expresados como solubilidad porcentual.

Gel de electroforesis

Para la determinación del peso molecular (PM) del colágeno extraído se preparó un gel de poli(acrilamida a una concentración de 15% (proporción metileno-bisacrilamida/acrilamida) de acuerdo a la metodología propuesta por Nagai *et al* ⁽³⁾.

RESULTADOS

Composición química proximal, contenido de Hip en los residuos y en el colágeno obtenido

En la tabla 1, se presentan los valores porcentuales de la composición proximal y de hidroxiprolina en los residuos y el colágeno obtenido, donde se observan las variaciones luego de los tratamientos de extracción así como el incremento de proteínas e hidroxiprolina.

Solubilidad del colágeno

En la figura 4, se observa la disminución porcentual de la solubilidad del colágeno con el incremento de la concentración de sal. También se observa que a concentraciones mayores al 8% disminuye su solubilidad casi en 40% del valor porcentual inicial.

Tabla 1. Análisis proximal y contenido de hidroxiprolina de residuos de anchoveta y del colágeno extraído.

Muestra	Composición proximal (%)				Hidroxiprolina (mg/g)
	Humedad	Grasa	Ceniza	Proteína	
Residuos (espinazos, espinas, escamas)	62,8 ± 4,9	7,3 ± 1,6	15,3 ± 2,1	10,8 ± 2,1	6,5 ± 1,6
Colágeno de los residuos	8,0 ± 2,8	0,3 ± 0,08	0,7 ± 0,02	87,6 ± 3,9	52,9 ± 2,9

Gel de electroforesis obtenido a partir del colágeno extraído de los residuos de anchoveta

En la figura 5, se puede observar el peso molecular aproximado del colágeno extraído a partir de residuos de pescado, que correspondería a las cadenas $\alpha 1$ y $\alpha 3$ de la molécula colagénica, siendo su PM aproximado de 110 kDa.

DISCUSIÓN

De la tabla 1 se observa que, en los residuos hay un elevado contenido de humedad (62,8%) y bajo valor de proteínas (10,8%). El alto contenido de cenizas puede ser explicado por la naturaleza del hueso y su composición, en gran parte debido al calcio que le suministra dureza. Por otro lado, el contenido de grasa fue 7%, valor que puede parecer elevado, sin embargo, considerando un estudio realizado por Kittiphattanabawon *et al* ⁽¹⁾, en el cual hallaron contenidos de grasa de 8,8% en el hueso de *Priacanthus tayenus* (inclusive mayor que el reportado para la piel de la misma especie) que podrían ser atribuidos a restos cárnicos, así como a sustancias y componentes de la médula ósea.

En relación al colágeno liofilizado extraído (figura 3), el contenido graso y de ceniza fueron comparativamente menores a los anteriores, indicando la eficacia de la remoción de la materia inorgánica y la grasa durante el proceso de extracción, según lo recomendado por Nagai y Suzuki ⁽³⁾. Finalmente, el contenido de humedad del colágeno extraído de los descartes es menor y el contenido de proteínas fue de 87,6%.

El valor de Hip en el colágeno extraído (52,9 mg/g) se incrementó casi en 10 veces respecto a su valor inicial en la materia prima, que fue de 6,5 mg/g. Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Kittiphattanabawon *et al* ⁽¹⁾, quien refiere valores de Hip en los residuos de 5,7 mg/g y 58,5 mg/g para el colágeno extraído de la especie *Priacanthus tayenus*. Ellos mencionan también que el incremento del contenido de hidroxiprolina está generalmente acompañado del incremento del contenido proteico.

Es necesario indicar que el rendimiento fue alrededor de 1% con respecto al peso inicial de los residuos, concordando con lo reportado por Kittiphattanabawon *et al* ⁽¹⁾ quien además señala que el rendimiento a partir de piel es notablemente mayor (10,9%).

De la figura 4, se observa la disminución de la solubilidad del colágeno, lo cual puede ser atribuido a las interacciones hidrofóbicas y agregación de proteínas debido a su competencia por el agua, causando precipitación proteica ⁽⁹⁾. Kittiphattanabawon *et al* ⁽¹⁾ señalan que el colágeno proveniente de huesos de pescado es más tolerante a mayores concentraciones de NaCl debido a que posee diferentes propiedades



Figura 1. La anchoveta peruana *Engraulis ringens*.



Figura 2. Residuos óseos obtenidos luego del procesamiento de filetes de anchoveta para la elaboración de surimi.



Figura 3. Colágeno liofilizado extraído de los residuos óseos de la anchoveta.

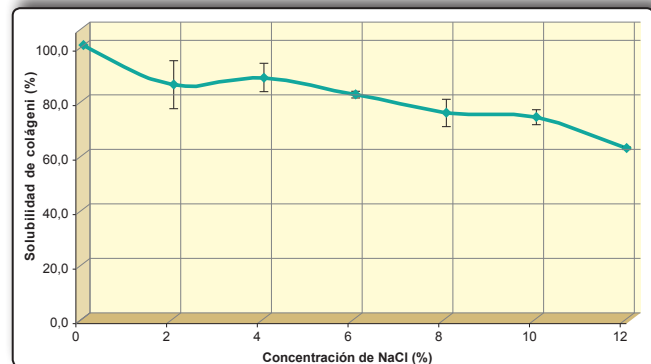


Figura 4. Gel SDS-PAGE al 15%, identificación del peso molecular del colágeno.

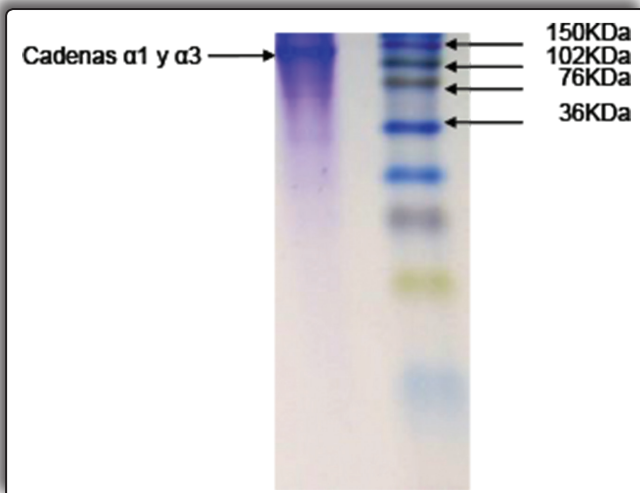


Figura 5. Gel SDS-PAGE al 15%, identificación del peso molecular del colágeno.

moleculares. Por otro lado, este mismo autor señala que, en medio ácido, la solubilidad del colágeno es

mayor que en rangos de pH alcalinos y disminuye ante el incremento de sales.

Es necesario mencionar que Montero *et al* ⁽¹⁰⁾ y Ramachandran ⁽¹¹⁾ refieren que el método de extracción de colágeno por liofilización puede causar pérdida de solubilidad de la proteína, debido a la remoción de agua del sistema, afectando a la estructura proteica y ocasionando consecuentemente pérdida de algunas propiedades funcionales.

En la figura 5, se observa la distribución de los pesos moleculares, ya que las cadenas comparten similar estructura molecular y residuos de aminoácidos. Por otro lado, los resultados demuestran que éste material correspondería a colágeno tipo I, tal como lo señala Nagai *et al* ⁽³⁾, quién identificó los mismos patrones de PM para la especie Japanese sea-bass (*Lateolabrax japonicus*).

CONCLUSIÓN

El alto contenido de grasa y cenizas encontrados en los residuos indican que podrían aprovecharse ciertos compuestos de interés comercial. La solubilidad del colágeno obtenido disminuyó con el incremento en la concentración de NaCl lo cual demostró su funcionalidad.

La obtención de colágeno a partir de residuos del procesamiento de pescado, es una alternativa que puede ser utilizada para diversificar su uso y generar valor agregado a estas fuentes. El gel de electroforesis demostró que el colágeno obtenido correspondió al tipo I.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Kittiphattanabawon P, Benjakul S, Visessanguan W, Nagai, Tanaka M. Characterization of acid-soluble collagen from skin and bone of big snapper (*Priacanthus tayenus*). Food Chemistry. 2005; 89: 363-72.
- Gómez-Guillén MC, Turnay J, Fernández-Díaz MD, Ulmo N, Lizarbe MA, Montero-García P. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. Food Hydrocolloids. 2002; 16: 25-34.
- Nagai T & Suzuki N. Isolation of collagen from fish waste material-skin, bone and fins. Food Chemistry. 2000; 68(15): 277-81.
- FAO. Food and Nutrition Paper 14/7. Manuals of food Quality Control. Food Analysis: General techniques, Additives, Contaminants and Composition. Prepared by FAO with support of the Swedish International Development Authority (SIDA). Roma; 1986.
- Kolar K. Colorimetric determination of hydroxyproline as measure of collagen content in meat and meat products: NMKL collaborative study. J Assoc Off Anal Chem. 1990; 73(1): 54-7.
- Nagai T & Yamashita E, Taniguchi K, Kanamori N, Suzuki N. Isolation and characterization of collagen from the outer skin waste material of cuttlefish (*Sepia lycidas*). Food Chemistry. 2001; 72(4): 425-9.
- Montero P y Borderías J. Propiedades funcionales del colágeno de pescado en la industria alimentaria. Inf Tec Inv Pesq. 1989; 151.
- Lowry O, Rosebrough N, Farr A & Randall R. Protein measurement with Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951; 193: 256-75.
- Vodjani F. Solubility. Methods of testing protein functionality. 1st ed. Great Britain: St. Edmundsbury Press; In G. M. Hall; 1996.
- Montero P, Alvarez C, Martí A, Borderías J. Plaice skin collagen extraction and functional properties. J Food Sci. 1995. 60(1): 1-3.
- Ramachandran G. Stereochemistry of collagen. J Pept Protein Res. 1988; 31(1): 1-16.

Manuscrito recibido el: 05/05/2015

Aceptado para su publicación el: 02/11/2015

Correspondencia

Nombre: Ing. Javier Saúl Córdova Ramos
 Dirección: Jr. Puno 10021002 - Lima 01 - Perú
 E-mail: javier.cordova.ramos@hotmail.com