

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas

"Obtención de Colágeno a partir de escamas de tilapia mediante
hidrólisis enzimática"

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Ingeniero Químico

Presentado por:

Katherin Chabeli Cordero Zambrano

Gonzalo Hiran Garcés Barcia

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2018

DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a Dios por haberme dado la vida y permitirme haber llegado a este momento tan importante de mi formación profesional.

A mis padres que con su apoyo incondicional, amor y confianza permitieron que mi carrera universitaria culminara.

De manera especial a mis tíos-padrinos a quien quiero como mis padres, por compartir momentos importantes conmigo y por siempre estar dispuestos a escucharme y apoyarme en cada momento.

A mi novio, compañero inseparable en cada etapa en mi vida, por estar apoyándome a pesar de los momentos difíciles llenándome de alegría y tranquilidad en todo momento.

Al Msc. Raúl Serrano Carlín, quien con su experiencia, motivación y consejos, estuvo presto para ayudarnos no solo en la elaboración de nuestro tema, sino a lo largo de mi carrera universitaria.

A la Dra. Yris González Triana, por habernos colaborado en el proyecto emprendido, dándonos consejos y mejoras que le dieron un mayor realce a la elaboración de este tema.

A mi compañero de tesis Gonzalo Garcés Barcia por su comprensión, consejos y ayuda en el proceso de elaboración del proyecto de materia integradora.

A todos mis amigos por siempre estar a mi lado brindándome su ayuda cada vez que la necesitaba, además de haber hecho agradable mi paso por la universidad.

Katherin Cordero Zambrano

Este trabajo está dedicado a Dios, por la vida que me da y permitirme culminar una etapa más de estudios previo la obtención del título como profesional en la carrera de Ingeniería Química.

A mis padres Arturo y Cecilia a quienes amo con mi vida, por ese esfuerzo incondicional a lo largo de todo el periodo de estudios. Sin ese apoyo arduo y absoluto no hubiese podido culminar mis estudios universitarios.

Papá mamá este triunfo es vuestro, no ha sido fácil este camino que he recorrido, pero con vuestro amor y apoyo he logrado conseguir el título deseado. A mis hermanos por estar siempre pendiente y a mis tiernos sobrinos que han sido mi inspiración.

A mi amiga y gran compañera de tesis Katherin Cordero Zambrano con quien hicimos un excelente dúo en esta difícil pero satisfactoria jornada de trabajo en el desarrollo de la tesis de grado.

Al Msc. Raúl Serrano Carlín, por brindarme su valiosa colaboración, orientación, asesoría y apoyo en el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Yris González Triana, por su ayuda, enseñanza y compartir sus conocimientos con nosotros.

A mis amigos quienes sin esperar nada a cambio compartieron sus conocimientos, alegrías y tristezas y que durante estos cinco años estuvieron a mi lado apoyándome y lograron que este sueño se haga realidad.

Gonzalo Garcés Barcia

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas a las que les debo un sincero agradecimiento por su apoyo y aporte durante esta etapa de formación profesional.

Antes que nada, quiero agradecer a Dios por darme la vida, fuerza y sabiduría para lograr culminar esta meta que me propuse años atrás.

Se merecen un reconocimiento especial mis amados padres, Ángel e Isabel, que con esfuerzo y dedicación me ayudaron durante todo el proceso de mi vida universitaria.

A mis queridos tíos- padrinos Elías y Rosita por siempre estar a mi lado brindándome su confianza y apoyo incondicional

A mis abuelitas Rosita y Carmen por siempre estar preocupas y pendientes de mí, apoyándome en todo lo que emprendía.

A mis queridos tíos, primos y demás familiares que siempre estuvieron dándome ánimo y fuerza para continuar con mi propósito de finalizar mis estudios universitarios.

A mi novio Abel Franco por estar presente en cada etapa de mi vida, apoyándome y motivándome para llegar a la meta propuesta.

Sobre todo agradezco al Msc. Raúl Serrano Carlín quien con su experiencia, conocimiento y dedicación nos orientó en cada paso de este proyecto integrador.

A la Dra. Yris González Triana por su ayuda y aporte en el proyecto emprendido, además de estar siempre dispuesta a escucharnos y aconsejarnos.

A la Msc. Inés Chiriboga Pinos Gerente de Calidad de la empresa que nos colaboró con parte de los materiales y nos dio acogida en su empresa para desarrollar esta investigación.

Al Ing. Camilo Ramírez por estar presto para ayudarnos en todo momento durante la elaboración de este tema, dándonos una extensa acogida en el Laboratorio de Operaciones Unitarias.

A mis amigos por apoyarme en todo momento y siempre extender su mano cuando lo necesitaba, pero sobre les agradezco por los momentos compartidos a lo largo de esta importante etapa en mi vida.

Katherin Cordero Zambrano

Son muchas las personas que merecen mi agradecimiento eterno al culminar este trabajo.

A mis maestros quienes han sido participe de mi formación que hoy se ve reflejado en la culminación de mi paso por la universidad.

A mi hermana Cecilia Garcés por estar conmigo en toda mi carrera y siempre brindarme todo su cariño y apoyo sin esperar nada a cambio

A mi mejor amiga Ximena quien con sus palabras de aliento no me dejaba decaer para que siguiera adelante y siempre sea perseverante y cumpla con mis ideales.

A mi tutor académico Ing. Raúl Serrano Carlín por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico, así como también guiarme durante todo el desarrollo de este proyecto.

A la Ing. Yris González Triana por brindarme su apoyo, orientación y colaboración durante la realización de este trabajo.

Al Ing. Camilo Ramírez por estar presto para ayudarnos en todo momento durante la elaboración de este tema, dándonos una extensa acogida en el Laboratorio de Operaciones Unitarias.

Al Ing. Luis Plaza por sus consejos y permitirme el acceso al Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Facultad de Mecánica,

A todos los docentes que con su sabiduría, conocimiento y apoyo tanto en el desarrollo de este tema como a lo largo de mi carrera universitaria me motivaron a crecer como persona y futura profesional.

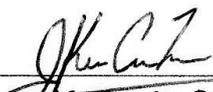
Mi agradecimiento también va dirigido al Gerente de Calidad la Ing. Inés Chiriboga Pinos por haber colaborado con parte de los materiales de mi proyecto realizado.

Concluyo manifestando una gratitud enorme a mis compañeros de clases quienes durante todos los niveles en las aulas Universitarias demostraron compañerismo y amistad sincera con quienes compartimos conocimientos, alegrías, triunfos y tristezas. Amistad que perdurara en el tiempo y espacio.

Gonzalo Garcés Barcia

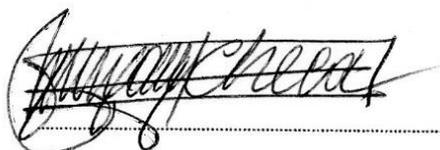
DECLARACIÓN EXPRESA

"Los derechos de titularidad y explotación, nos corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; Katherin Chabeli Cordero Zambrano y Gonzalo Hiran Garcés Barcia damos nuestro consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual"


Katherin Chabeli
Cordero Zambrano

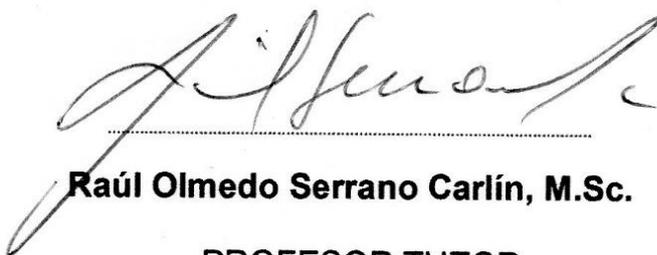

Gonzalo Hiran Garcés
Barcia

EVALUADORES



Mirian Maricela Checa Artos, Dra.

PROFESOR DE LA MATERIA



Raúl Olmedo Serrano Carlín, M.Sc.

PROFESOR TUTOR



Yris Kenelma González Triana, Dra.

PROFESOR CO-TUTOR

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo es la obtención de colágeno en polvo por hidrólisis enzimática usando proteasa *Bacillus subtilis* para el aprovechamiento de escamas de tilapia, con características semejantes al importado. La metodología de la investigación se basó en criterios que permitan lograr un porcentaje de rendimiento del 70%, realizando 12 pruebas usando diferentes concentraciones de enzima a diferentes tiempos de hidrólisis con la cual se logró resultados similares a los propuestos, tanto en rendimiento como en propiedades físico-químicas.

El rendimiento obtenido en base seca fue de 41,54% con una concentración de enzima 3% y tiempo de hidrólisis 5 horas utilizando el secador por atomización; debido a las fallas de este equipo se realizó el secado en un horno, donde se logró obtener un rendimiento del 71,20%. El producto obtenido en este de rendimiento, presentó características similares al colágeno comercial importado, por lo tanto se afirma que las condiciones de este producto serán las óptimas para el proceso de obtención de colágeno en polvo.

El proceso de obtención de colágeno a partir de las escamas de tilapia, consistió en las etapas de lavado, desinfección en hipoclorito de sodio, hidrólisis enzimática en proteasa al 3% (p), tiempo de hidrólisis de 5 horas, una etapa de evaporación y por último del secado final del producto.

En síntesis se podrá elaborar un colágeno para consumo humano en la industria ecuatoriana con una calidad semejante al importado, aprovechando las escamas que actualmente son exportadas como materia prima a diferentes partes del mundo, generando ingresos al país.

Palabras Clave: Escamas, Desinfección, Hidrólisis, Proteasa, Evaporación, Secado, Colágeno, Rendimiento, Calidad.

ABSTRACT

The main objective of this work is to obtain collagen powder by enzymatic hydrolysis using Bacillus Subtilis protease for the use of tilapia scales as a raw material and to obtain collagen powder with characteristics similar to those imported. The research methodology was based on criteria to achieve a 70% yield percentage, performing 12 tests using different concentrations of enzyme at different times of hydrolysis with which we will obtain results similar to those proposed, both in performance and in physical properties. -chemical.

The yield obtained in dry base was 41.54% with a concentration of enzyme 3% and hydrolysis time 5 hours using the spray dryer; Due to the failures of this equipment, drying was carried out in an oven, where a yield of 71.20% was achieved. The product obtained in this yield, presented characteristics similar to imported commercial collagen, therefore it is affirmed that the conditions presented by this sample will be optimal for the process of obtaining collagen powder.

The process of obtaining collagen from the tilapia scales consisted of the steps of washing, disinfection in sodium hypochlorite, enzymatic hydrolysis in 3% protease (p), hydrolysis time of 5 hours, a stage of evaporation and finally the final drying of the product.

In summary, a collagen for human consumption in the Ecuadorian industry can be made with a similar quality to the imported, taking advantage of the scales that are currently exported as raw material to different parts of the world, generating income to the country.

Keywords: Scales, Disinfection, Hydrolysis, Protease, Evaporation, Drying, Collagen, Yield, Quality.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	VIII
<i>ABSTRACT</i>	IX
ÍNDICE GENERAL	X
ABREVIATURAS.....	XIII
SIMBOLOGÍA.....	XIV
ÍNDICE DE FIGURAS	XV
ÍNDICE DE TABLAS.....	XVI
CAPÍTULO 1	1
1. Introducción	1
1.1 Descripción del problema	3
1.2 Justificación del problema	4
1.3 Objetivos	5
1.3.1 Objetivo General	5
1.3.2 Objetivos Específicos.....	6
1.4 Marco teórico.....	6
1.4.1 Producción y comercialización de especies piscícolas.....	6
1.4.2 Tilapia	7
1.4.3 Escamas de tilapia	11
1.4.4 Colágeno	12
1.4.5 Usos y aplicación del colágeno	16
1.4.6 Hidrólisis Enzimática	19
1.4.7 Enzimas	20
1.4.8 Secado por atomización.....	21
CAPÍTULO 2	23

2.	Metodología	23
2.1	Materiales y métodos para la obtención de colágeno en polvo	23
2.1.1	Materiales	23
2.1.2	Equipos para la extracción de colágeno.....	23
2.1.3	Equipos para la evaluación de colágeno	23
2.1.4	Métodos de análisis	24
2.2	Proceso para la obtención de colágeno.....	28
2.2.1	Toma de muestra	29
2.2.2	Blanqueamiento y desinfección de escamas.....	29
2.2.3	Hidrólisis enzimática para la extracción del colágeno.....	30
2.2.4	Secado por atomización.....	31
2.2.5	Evaluación final del colágeno en polvo.....	31
	CAPÍTULO 3	32
3.	RESULTADOS Y ANÁLISIS	32
3.1	Resultados	32
3.1.1	Obtención de colágeno	32
3.1.2	Rendimientos de las muestras	34
3.1.3	Caracterización del colágeno obtenido.....	37
3.1.4	Caracterización del colágeno comercial	40
3.1.5	Comparación de las características físico-químicas del colágeno con el más alto rendimiento y el colágeno comercial	41
3.1.6	Diagrama del proceso y Balance de materia y energía	42
3.2	Análisis de resultados.....	44
3.2.1	Rendimientos de colágeno obtenido	44
3.2.2	Caracterización del colágeno obtenido.....	45

3.2.3 Comparación entre el colágeno con mayor rendimiento y colágeno comercial46

CAPÍTULO 4	47
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	47
4.1 Conclusiones	47
4.2 Recomendaciones	48
BIBLIOGRAFÍA	49
ANEXOS	51

ABREVIATURAS

HPLC	High Performance Liquid Chromatography
FOB	Free on board
SINAGAP	Sistema de información Nacional de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y pesca
PFD	Process Flow Diagram

SIMBOLOGÍA

pH	Potencial de Hidrógeno
ml	Mililitro
g	Gramos
kg	Kilogramos
m	Metros
%	Porcentaje
p	Peso
V	Volumen
cp	Centipoise
h	Horas
°C	Grados centígrados
NaClO	Hipoclorito de Sodio
H ₂ O	Agua
R-01	Reactor 1
TK-01	Tanque 1
R-02	Reactor 2
TK-02	Tanque 2
F-01	Filtro 1
EV-01	Evaporador 1
S-01	Secador 1

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Estructuras de colágeno (Aranda, 2017).....	2
Figura 1.2 Imagen de tilapia azul (Ramírez, n.d.)	8
Figura 1.3 Imagen de tilapia roja(Dreamstime, 2015)	10
Figura 1.4 Secador por atomización SD-Basic (LabPlant, n.d.).....	22
Figura 2.1 Comparación de características de colágeno obtenido experimentalmente y comercial	24
Figura 2.2 Proceso para la obtención del colágeno (Huey-Jine Chai & Chwen-Herng Wu, 2005).....	28
Figura 3.1 Gráfico de rendimientos en relación a tiempo de hidrólisis y concentración de enzima.....	35
Figura 3.2 Gráfico de rendimiento en base seca con relación a tiempo de hidrólisis y concentración de enzima.....	36
Figura 3.3 Propiedades físico-químicas de colágeno obtenido y comercial	42
Figura 3.4 Diagrama de bloques del proceso obtención de colágeno en polvo.....	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Cuadro de superficies sembradas de tilapia	7
Tabla 1.2 Cuadro Comparativo Nutricional	10
Tabla 1.3 Porcentajes de exportación de escamas de tilapia por países	12
Tabla 1.4 Distribución de tipos de colágeno	14
Tabla 1.5 Puentes de Hidrógeno presentes en el colágeno.....	15
Tabla 1.6 Concentración de aminoácidos de colágeno Tipo I de pescado y piel humana	18
Tabla 3.1 Pruebas con concentración de enzima al 1% a distintos tiempos de hidrólisis	32
Tabla 3.2 Pruebas con concentración de enzima al 2% a distintos tiempos de hidrólisis	33
Tabla 3.3 Pruebas con concentración de enzima al 3% a distintos tiempos de hidrólisis	33
Tabla 3.4 Rendimiento en base a las escamas usadas dependiendo de la concentración de enzima y tiempo	34
Tabla 3.5 Rendimiento en base seca que depende de la concentración de enzima y tiempo	35
Tabla 3.6 Rendimiento en base seca obtenido haciendo uso de la estufa.....	36
Tabla 3.7 Propiedades físico-químicas de colágeno en polvo al 1% de concentración de enzima y diferentes tiempos de hidrólisis.....	37
Tabla 3.8 Propiedades físico-químicas de colágeno en polvo al 2% de concentración de enzima y diferentes tiempos de hidrólisis.....	37
Tabla 3.9 Propiedades físico-químicas de colágeno en polvo al 3% de concentración de enzima y diferentes tiempos de hidrólisis.....	38
Tabla 3.10 Viscosidad de colágeno en tres Pruebas seleccionadas	38
Tabla 3.11 Turbidez de colágeno líquido en 5 Pruebas seleccionadas.....	38
Tabla 3.12 Cantidad de proteínas en la prueba de alto rendimiento	39
Tabla 3.13 Contenido de aminoácidos en la muestra de la prueba de alto rendimiento	39
Tabla 3.14 Contenido de aminoácidos del colágeno comercial	41

Tabla 3.15 Comparación de propiedades fisico-químicas.....	41
Tabla 3.16 Balance de materia del proceso.....	43
Tabla 3.17 Balance de energía del proceso	44

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

En el mundo se consumen elevadas cantidades de diferentes especies de peces, generando importantes cantidades de desperdicios, lo que constituye entre el 50 a 70% del peso inicial del pez. Estos desperdicios están constituidos por un 30% de huesos, piel y escamas, donde el 5% corresponden a las escamas del pescado. Las escamas son ricas en proteínas como el colágeno, por tal motivo el uso de estos pueden ser materia prima para nuevos productos con alto valor agregado.

La tilapia (*Oreochromis niloticus*) es el segundo pez más cultivado del mundo y muy rentable; debido a su resistencia a enfermedades, puede ser criado en agua salada como dulce con una alta tasa de reproducción y crecimiento.

El Ecuador exporta 579 ton/año de tilapia a Estados Unidos (siendo este uno de los países con mayor importación), generando un ingreso de \$2'889.596 en el año 2017. (Ramirez, Delgado, & Andrade, 2016)

Se registró que en el año 2017, Ecuador importó un promedio anual de 270,60 toneladas métricas de colágeno con un valor FOB \$2'336.070. En este contexto, se podría considerar el aumento en la demanda del colágeno, por tal motivo, el estudio de nuevos métodos de extracción de colágeno a partir de escamas abarcaría cierta cantidad del mercado nacional.

Las escamas de tilapia son consideradas como materias primas sustitutas en la producción de colágeno tipo I, debido a que otros países la obtienen de diversos orígenes como porcinos y bovinos. El colágeno adquirido de este pez tiene muchas ventajas comerciales, ya que se encuentra libre de enfermedades como las provenientes de especies bovinas.

Las escamas contienen una alta cantidad de proteína con una concentración de 41 a 84%, la cual depende del tipo de pez que se quiere evaluar, teniendo en cuenta el lugar de cultivo y el tipo de alimentación que tuvieron durante su crecimiento.

La demanda del colágeno se encuentra en aumento en varios sectores del país. En Ecuador el colágeno es importado de empresas europeas que obtienen este producto a partir de especies bovinas; sin embargo, también se está importando colágeno elaborado de las escamas de tilapia como materia prima.

Se sabe que el colágeno es una de las proteínas más importantes en los seres vivos debido a su abundancia en la matriz extracelular. Es la proteína de origen animal más abundante, constituyendo el 25 a 30% de proteínas en los organismos animales; por tal motivo, es un componente necesario en los tejidos conectivos, sin embargo, se concentran mayormente en tejidos que estén relacionados con la piel y huesos; también lo encontramos en tejidos intersticiales de todos los órganos portando estabilidad a estos tejidos y manteniendo su estructura.

Esta proteína tiene una estructura muy particular ya que tiene una triple hélice Fig 1.1, demostrando su elevada resistencia y retención a la humedad. La función principal del colágeno es aumentar la fuerza, sostener la estructura, flexibilidad y resistencia de los tejidos. Al momento de crecer, se va perdiendo esta proteína tanto su calidad como cantidad; esto se ve reflejado en el cuerpo humano, donde se presenta la disminución en la elasticidad de la piel y cabello, fragilidad en las uñas, rigidez de tejidos y válvulas cardiacas, manchas en brazos y manos, desgaste en meniscos y fragilidad en discos intervertebrales.

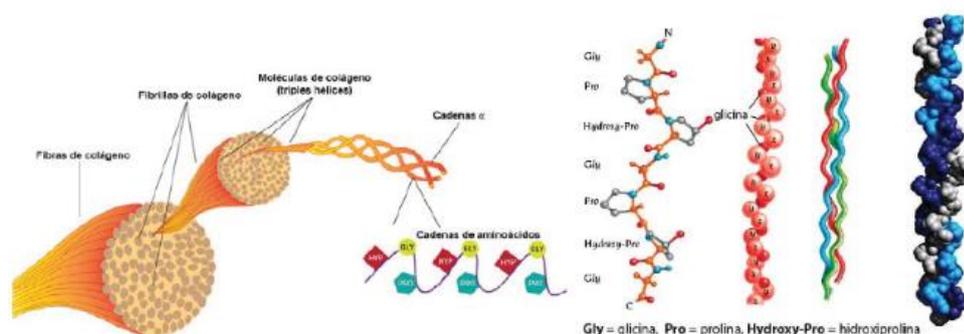


Figura 1.1 Estructuras de colágeno (Aranda, 2017)

Las diversas características que presenta el colágeno, lo hacen muy útil en los diversos campos de biomateriales, materiales biomédicos, industrias cosméticas y farmacéuticas; resaltando de este modo su aplicabilidad en la ingeniería de tejidos mediante la proliferación de células y la adhesión celular. (Beltran, 2011)

El colágeno obtenido en este trabajo será mediante hidrólisis enzimática, dentro del cual se obtendrá un producto líquido con elevado contenido de proteínas y bajo en grasas. La enzima a usar extraerá toda proteína colágena, separando el colágeno de otras proteínas que no lo son, haciendo más puro nuestro producto. (Sampedro, 1977)

El presente trabajo se basa en la obtención de colágeno a partir de las escamas de tilapia las cuales provienen de los residuos que se generan en el proceso de fileteo, con la final de conseguir un producto terminado con características similares o mejores al exportado actualmente. Para el proceso se necesitarán 10 kg de escamas provenientes de la empresa Tropack; estas escamas pasarán por un proceso de desinfección para luego ser hidrolizadas por una enzima (*Bacillus subtilis*) la cual extraerá todo el colágeno proveniente de las escamas. Terminado este proceso, el colágeno líquido será llevado al equipo de secado por atomización para obtener colágeno en polvo y a su vez, será caracterizado para poder comparar las propiedades que presenta con el colágeno de origen diferente.

1.1 Descripción del problema

La tilapia es un recurso de alta exportación en Ecuador, dando un total de 579.000 toneladas métricas de tilapia exportada a Estados Unidos (uno de los países con mayor participación) generando un ingreso de \$2'889.596 en el año 2017. Sin embargo, las escamas de tilapia no se están aprovechando en su totalidad ya que son exportadas a países como Chile con una participación del 3.61% Estados Unidos 71,62%, Reino Unido 3,40 %, Brasil 6,52%, China 6,98%, Perú 2,54% y 5,33% a otros países, dando un total de 12.269,52 toneladas métricas de escamas exportadas en el año 2017 y un valor FOB de \$7'440.100. (SINAGAP, 2017)

El producto más importante que se obtiene a partir de las escamas es el colágeno debido a la calidad que este presenta en comparación al colágeno obtenido en mamíferos ya que este contiene una menor cantidad de grasas; es decir, más puro, por tal motivo se registró que en el año 2017 Ecuador importó un promedio anual de 270,00 toneladas métricas de colágeno con un valor FOB de \$2'336.000. (SINAGAP, 2017)

Tropack es una de las empresas acuícolas con mayor producción de fileteo de tilapia del país; dentro de este proceso se obtienen residuos provenientes del fileteo como cabezas de pescado, piel con porciones de carne, huesos y escamas, las cuales son usadas en la obtención de subproductos o exportadas a otros países. De los subproductos se logra obtener balanceado, nuggets de pescado y colágeno el cual es extraído a partir de las escamas de tilapia que actualmente son exportadas a Shanghai.

El porcentaje de escamas que la empresa obtiene del proceso es de 2,7 a 3% de escamas húmedas por cada tilapia procesada; las cuales son secadas a una temperatura de 80°C para ser empacadas en sacos de 10 kg, llegando a llenar un contenedor con 1.300 sacos de escamas de tilapia al mes, que equivale a 13.000 kg de escamas por contenedor; esto permitiría construir el proyecto para las propias empresas y de otras elaboradas a la misma labor, obteniendo un mayor beneficio económico y aumentar la rentabilidad de esta industria.

1.2 Justificación del problema

Una de las alternativas para aumentar el ingreso de dinero a Ecuador requiere del aprovechamiento de los recursos que tenemos a nuestro alcance con el fin de elaborar productos nacionales con igual o mejor calidad que aquellos que importamos de otros países y exportar el producto que se obtiene. Este cambio permitirá generar riqueza, no sólo a partir de la exportación de recursos naturales sino en la utilización del conocimiento y capacidades de los ciudadanos. Por tal motivo, el aprovechamiento de las escamas de tilapia generaría más ingreso a la empresa y trabajos ayudando así a la economía del país.

Las industrias comercializan cada día nuevos productos y el colágeno es uno de los más desarrollados y de mayor consumo tanto a nivel estético como de salud en presentación de pastillas, crema y polvo.

En Ecuador según la investigación realizada acerca de este tema, el producto de mayor demanda es el colágeno en polvo y es uno de los productos que más se importa, específicamente el colágeno bovino en polvo proveniente de suiza de nombre Vitagel.

Esta investigación se realizó para desarrollar un proceso bioquímico que permitirá aprovechar las escamas de la tilapia y obtener colágeno en polvo, propio de nuestro país con unas características semejantes y de mejor calidad que el importado, puesto que el colágeno presenta un aminograma que se parece más al humano. Esto ayuda a que su absorción sea más eficaz, combatiendo el deterioro de tendones, huesos, piel y cartílagos de los seres humanos.

La obtención de colágeno se lo puede realizar por tres métodos: hidrólisis ácida, hidrólisis básica e hidrólisis enzimática. Para el proyecto se escogió la hidrólisis enzimática debido a que este método es más eficiente y específico, ya que no cambia la estructura química de la molécula, logrando que los aminoácidos no sean destruidos; considerando que en el mercado actual se emplea este tipo de hidrólisis para obtener colágeno.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Obtener colágeno en polvo por hidrólisis enzimática usando proteasa *Bacillus subtilis* para aprovechamiento de escamas de tilapia como materia prima.

1.3.2 Objetivos Específicos

1. Obtener colágeno hidrolizado empleando como enzima Proteasa del *Bacillus subtilis*
2. Determinar la concentración ideal del agente enzimático.
3. Determinar el tiempo óptimo para la hidrólisis con la concentración seleccionada.
4. Cuantificar el rendimiento de colágeno en las condiciones óptimas del proceso.
5. Caracterizar el colágeno obtenido, determinando la cantidad de turbidez, densidad, viscosidad cinemática y pH.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Producción y comercialización de especies piscícolas

El Ecuador tiene muy alta desarrollada la actividad acuícola con cultivos de camarón y tilapia en cautiverio. Esto permite la exportación de estas especies a países extranjeros, siendo estados Unidos el principal importador de la tilapia considerándolo como el segundo provisor de filete de esta especie en el mercado.

El producto comercializado se entrega a empresas de alimentos que se encargan de la distribución del producto a diversas cadenas de hoteles, restaurantes y supermercados que utilizan y comercializan los filetes congelados de tilapia.

En Ecuador, el cultivo de tilapia se ha convertido en una gran fuente de ingresos en las industrias pesqueras; por tal motivo se han realizado investigaciones que determinan las zonas más apropiadas para el crecimiento de esta especie, las cuales estarían ubicadas en Chongón, Samborondón, Taura, Daule y el Triunfo pertenecientes a la provincia del Guayas; de igual manera, se extiende a las provincias de Esmeraldas,

Manabí y partes del Oriente del Ecuador. Actualmente en el país se encuentran 2000 hectáreas de espejos de aguas usadas exclusivamente en el cultivo de la tilapia roja, dando un valor aproximado de 37.470 toneladas de producción anual de tilapia con posibilidades de crecimiento.

Las principales industrias de tilapia en Ecuador son AQUAMAR, Empacadora Nacional (ENACA), El Rosario, El Garzal, AQUACHILE y EMPAGRAM siendo lideradas por la Industria Pesquera Santa Priscila la cual tiene una empresa en conjunto llamada Tropical Packing Ecuador S., encargada del procesamiento y empaquetamiento del filete de tilapia y los subproductos. (Rosario, 2013)

Tabla 1.1 Cuadro de superficies sembradas de tilapia

Sistema Extensivo	Sistema Semi-intensivo	Sistema Intensivo
Bajas densidades de siembra (0,5 a 3 peces/m ²)	Densidades medias de siembra (3,0 a 50 peces/m ²)	Altas densidades de siembra (50 a 300 peces/m ³)
Se utilizan estanques de tierra, lagos y embalses	Se utilizan estanques de tierra	Se utilizan jaulas, tanques y estanques

Fuente: (Meneses, 2013)

1.4.2 Tilapia

El nombre tilapia proviene de un grupo de peces de origen africano, constituido por diversas especies, la mayoría con beneficio económico. La tilapia pertenece al género *Oreochromis*, criados en piscifactorías de varios países; en su estado natural se encuentran en regiones tropicales, donde su medio favorece su rápido crecimiento y reproducción. Las especies más conocidas de tilapia son la Azul (*Oreochromis aureus*), del Nilo (*Oreochromis niloticus*) y Roja (*Oreochromis sp*).

La tilapia puede vivir en medios de agua salada y dulce, incluso pueden adaptarse a medios que contengan poca cantidad de oxígeno. Esta especie está distribuida por el Sur del Caribe, Sureste Asiático, América Central y

Sur de Norteamérica. Tuvo un bajo interés comercial años atrás, sin embargo, una vez visto todas las características que esta especie nos puede brindar, su precio, consumo y perspectivas se elevaron significativamente.

Lo interesante de esta especie de pez, son las magníficas cualidades que posee, tales como:

- Adecuación a la alimentación y crianza en cautiverio
- Resistencia a enfermedades
- Carne de calidad
- Rápido crecimiento

Actualmente, se están realizando estudios acerca del colágeno presentes en las escamas de este pez, debido a la poca cantidad de grasa que este posee y su utilización en prácticas médicas como terapia de regeneración de huesos.

1.4.2.1 Tilapia azul

Esta especie físicamente presenta una boca ancha con labios hinchados, cuerpo comprimido, dientes cónicos y aletas dorsales largas. Su cuerpo presenta una coloración azul verde metálico Fig 1.2, aleta dorsal, caudal de coloración roja en su parte terminal y la coloración de su vientre es claro. Este tipo de tilapia puede llegar a tener una longitud estándar de 35 cm con un peso alrededor de 3 kg. (Meneses, 2013)



Figura 1.2 Imagen de tilapia azul (Ramírez, n.d.)

1.4.2.2 Tilapia Roja

En el mercado encontramos varias especies de tilapia las más conocidas y comercializadas es la tilapia roja Fig 1.3, la cual proviene 4 especies de tilapia tales como la *O niloticus*, *O. urollepis homorum*, *O. aureus* y *O. mossambicus*. El cruce de estas especies, genera nuevas con características mejores de sus descendientes, tales como resistencia a enfermedades, mayor capacidad de crecimiento, resistencia a temperaturas, adaptabilidad a diversos medios tanto salado como dulces, mayor porcentaje de lomo y color más profundo.

Esta especie, a pesar de sus diversas características, también cuenta con una gran cantidad de proteínas, enzimas, aminoácidos, péptidos bioactivos, colágeno y vitaminas como E y D favorables en la piel, vitamina B que influye en el sistema nervioso, calcio y fosforo vital en los huesos fortaleciéndolos y ácido fólico indicado en I etapa de embarazo. Cabe recalcar que el contenido de proteínas dependerá de la especie del pez y de la crianza que le fue dada, desde su tipo de hazienda hasta el tipo de alimentación que recibía.

La tilapia roja contiene antioxidantes en su carne, y al ser consumidas, se provee de protección a células de envejecimiento evitando así ciertos problemas cardiacos. Lo interesante del consumo de este pez, es que su carne contiene grasas muy particulares debido a que son cardio protectoras y que no están presentes en otras carnes. Este es el motivo por el cual la crianza de tilapia roja es considerada de mayor categoría en la producción y en el mercado.



Figura 1.3 Imagen de tilapia roja(Dreamstime, 2015)

Debido al rápido crecimiento de esta especie, se generaran menos gastos en la operación de producción y aumentará el ingreso de bienes a la empresa. Como la tilapia presenta rápido crecimiento, puede llegar alcanzar un peso de 1 a 2 lb dentro de un tiempo de 6 a 10 meses de acuerdo al método empleado en el cultivo.

El tipo de alimentación de esta especie es a base de balanceados, y debido a la resistencia a enfermedades que presenta, el periodo de vida es mucho mayor y por ende la rentabilidad va hacer mayor al no invertir en gastos médicos.

A continuación se presenta la diferencia nutricional de la tilapia en comparación con otros productos. Tabla 1.2

Tabla 1.2 Cuadro Comparativo Nutricional

Alimentos	Tilapia Roja	Aves	Carnes Rojas
Vitamina A	6.1	17	0.3
Fósforo	265	28.5	200
Calcio mg	32	10.2	5
Grasas	1.3	14	18.1
Proteínas	19.2	200	17.5
Calorías	94	0.5	238

Fuente: (Meneses, 2013)

Debido a la demanda de producción tilapia Roja, se ha buscado otro producto sustituto con igual sabor y calidad, el cual es la tilapia Gris que también es comercializado y consumido en varias partes del país. (Meneses, 2013)

1.4.3 Escamas de tilapia

Las industrias pesqueras aprovechan la mayor cantidad de carne que está presente en el pescado. En el caso de Tropack, de la tilapia procesada se aprovecha un 85% de su carne la cual es tratada para su destino, sea este para exportación o para consumo nacional. El otro 15% son subproductos obtenidos del procesamiento los cuales incluyen piel, vísceras, huesos y escamas. El 3% de los subproductos corresponden a escamas que son llevadas a un tratamiento de secado para ser exportadas teniendo un rendimiento del 35%.

Es de gran utilidad aprovechar todos los residuos que se obtienen en el procesamiento de pescado, ya que esto generará una diversidad de productos de valor agregado usados mayormente en la industria alimenticia, biomédica, cosmética y como balanceado para animales.

Las escamas cuentan con grandes cantidades de proteínas llegando a tener un promedio de 41% al 84%. (Trabajo cuantificación de proteína total) Ecuador aprovecha la Tilapia exportando su carne y residuos como las escamas que cuales son exportadas a diversos países generando un ingreso al nuestro. Tabla 1.3

La importancia de las escamas son los productos que podemos obtener de estas ya que, según las investigaciones realizadas, se encontró que las escamas de tilapia tienen un mayor contenido de colágeno Tipo I.

Tabla 1.3 Porcentajes de exportación de escamas de tilapia por países

Países	% de Participación
CHILE	3,61
COLOMBIA	0,87
ESTADOS UNIDOS	71,62
PORTUGAL	1,16
REINO UNIDO	3,40
AUSTRALIA	1,93
BRASIL	6,52
CHINA	6,98
ESPAÑA	0,58
PERU	2,54
CANADÁ	0,07
IRLANDA (EIRE)	0,71

Fuente:(SINAGAP, 2017)

El colágeno obtenido de las escamas contiene una estructura de proteínas compleja, que al ser consumidos por los seres humanos proporcionan fuerza y flexibilidad a la piel, ligamentos, huesos, músculos, vasos sanguíneos, tendones, ojos y cabello. . Por tal motivo el uso del colágeno es de suma importancia en los campos de industrias farmacéuticas, cosméticas, biomateriales y materiales biomédicos. (Beltran, 2011)

1.4.4 Colágeno

Los animales contienen diversas proteínas, la más abundante es el colágeno, el cual constituye alrededor del 25 – 30% de todas estas, ya que es un componente de suma importancia en tejidos conectivos que están en el cuerpo (piel, huesos, músculos y dientes. Sin embargo, están más concentrados en tejidos asociados a huesos y piel, en tejidos intersticiales de órganos para contribuir a la estabilidad de estos y estabilizar su estructura.

El colágeno está conformado por 3 cadenas de aminoácidos enlazadas, brindándoles una resistencia física y retención a la humedad. Como se

mencionó anteriormente, la principal función del colágeno es mejorar la fuerza, mantener la estructura de tejidos, flexibilidad y resistencia de los mismos. Al disminuir la cantidad de proteínas en el organismo, este se ve afectado de diversas formas como fragilidad en uñas, disminución de elasticidad y aparición de manchas en la piel, desgaste de meniscos y endurecimiento de válvulas cardíacas.

1.4.4.1 Tipos de Colágeno

Existen varias clases de colágeno desde el tipo I al tipo XIX, estos varían de acuerdo a su complejidad y la diferencia en su estructura. Estos están repartidos en diferentes partes del cuerpo con características propias.

El colágeno fibrilar es el más abundante con un contenido del 90% del colágeno total, el cual abarca el colágeno tipo I, II, III, V y XI.

Uno de los más estudiados es el colágeno tipo I, conformando el 90% en los huesos, tendones, piel, tejidos conectivos y córnea. El aporte que provee es rigidez en tendones, órganos y huesos ya que esto, define sus características biomecánicas de carga, resistencia a la tracción y rigidez torsional. El colágeno tipo II está presente en cartílagos, núcleo pulposo y cuerpo vítreo, definiendo las características biomecánicas de igual manera que el colágeno tipo I. El colágeno que se encuentra en fibras reticulares de tejidos intersticiales de pulmones, dermis, bazo y hígado es el tipo III. Los colágenos tipo V y XI forman parte de la subfamilia del colágeno fibrilar ya que son combinaciones de los otros tipos de colágeno mencionados en la sección anterior.

Al unirse el colágeno tipo V con el tipo I y III forman parte de la matriz de los huesos, músculos, placenta, hígado, córnea y

pulmones. Los tipos II y XI forman parte de del cartílago articular dándoles estabilidad y fuerza en sus tejidos.(Beltran, 2011)

La familia de colágenos de los tipos IX, XII, XIV, XX, XXI, VI, IV y VII se encuentran distribuidos como la tabla 1.4 presenta.

Tabla 1.4 Distribución de tipos de colágeno

Tipo de Colágeno	Distribución
IX	Humo vítreo, córnea y cartílago
XII	Tendones y ligamentos
XIV	Pared del vaso, dermis, hígado, pulmones y placenta
XX	Piel embrionaria, tendón, epitelio de la córnea y cartílago esternal
XXI	Pared de los vasos sanguíneos
VI	Dermis, placenta, cartílago, pulmones, pared del vaso
IV	Membranas basales
VII	Piel, cuello uterino, mucosa oral y las uniones dermo-epidérmica

Fuente: (Beltran, 2011)

1.4.4.2 Molécula Colágena

La molécula de interés, es el colágeno tipo I. Este tipo de colágeno se encuentra formado por 3 cadenas polipeptídicas, de las cuales se denominan cadenas α , 2 cadenas α iguales llamadas como α_1 (I) y una cadena α diferente α_2 (I) envuelta sobre sí misma creando una superhélice. La estructura de esta molécula está dividida en 2 segmentos donde se encuentran la parte central (helicoidal) y la parte no central (no helicoidal). (Gomez-Lizarraga, Piña-Barba, & Rodriguez-Fuentes, 2011)

La estabilidad de la molécula depende de los entrecruzamientos intermoleculares, debido a que las soluciones que se obtienen están formadas por una mezcla de oligómeros. Las respuestas inmunogénicas son producidas por los telopéptidos, ya que estos presentan un biomaterial de naturaleza colágena; para evitar este

problema, se usan enzimas proteolíticas, una de ellas es la pepsina que remueve los telopéptidos. (Gomez-Lizarraga et al., 2011)

El cambio que se origina en las cadenas α_1 y α_2 , puede llevar a producir diversas enfermedades como Osteoporosis, Osteogénesis imperfecta y Síndrome de Ehlers-Danlos tipo I, II, VIIA y VIIB.

La estabilidad de la molécula en su triple hélice depende de los puentes de hidrógeno que ocurre entre la Glicina de una cadena α y la Prolina de otra cadena α . Los puentes de hidrogeno mencionados puede ser creados con otros aminoácidos de cadenas α de la proteína como se aprecia en la Tabla 1.5 (González, 2007)

Tabla 1.5 Puentes de Hidrógeno presentes en el colágeno.

Tipos de puente de Hidrogeno	Enlaces	Distancia entre átomos (nm)
Idroxilo-Idroxilo	$\text{-O-H} \cdots \text{O-}$ H	0.28
Idroxilo-Carbonilo	$\text{-O-H} \cdots \text{O=C=}$	0.28
Amida-Carbonilo	$\text{=N-H} \cdots \text{O=C=}$	0.29
Amida-Idroxilo	$\text{=N-H} \cdots \text{O-}$ H	0.30

Fuente: (Gomez-Lizarraga et al., 2011)

El proceso de extracción de colágeno mediante un tejido es controlado debido a la variación de concentración en la molécula, que se encuentra relacionada con las propiedades mecánicas y fisicoquímicas del biomaterial así mismo con el rendimiento del producto final. (Gomez-Lizarraga et al., 2011)

Para desnaturalizar el colágeno, se puede aumentar la temperatura, debido a que las cadenas α que forman la triple hélice

se encuentran juntas por enlaces frágiles no covalentes; este aumento de temperatura provoca el rompimiento de enlaces covalentes incitando la degradación del biopolímero. El aumento de temperatura provoca que los enlaces se rompan excepto los enlaces covalentes de la cadena α , estos permanecen intactos, es decir, las 3 cadenas α colapsan en ovillos al azar y están separadas una de otras. (González, 2007)

1.4.5 Usos y aplicación del colágeno

El colágeno presenta diferentes características y es usado en diversas áreas de la industria de las cuales se encuentra farmacéutica, cosmética, biomédicos y alimentos.

En el campo de biomateriales y materiales biomédicos son muy utilizados en aleaciones de polímeros. El biomaterial proviene de la mezcla de polímeros dando como resultado un producto sintético o natural. Este producto puede ser usado en el reemplazo parcial o definitivo de ciertas partes del cuerpo humano para adaptarse cumplir las funciones específicas del fragmento removido. Las aleaciones metálicas, cerámicos, sustancias biológicas y polímeros son los biomateriales más usados. Dentro de las sustancias biológicas se encuentra el colágeno considerándolo uno de los productos más empleados y comerciales.

Dentro de la ingeniería de tejidos, los biomateriales son muy usados debido a las diferentes funciones que tienen. El colágeno es un biomaterial usado en este campo por su aplicación, como en tejidos cardiovasculares combinando scaffolds (andamios) de colágeno, células y moléculas activas con la finalidad de crear tejidos funcionales. Se elaboran esponjas de colágeno como biomaterial biodegradable, empleadas como implantes de tejido conectivo de huesos, vendas para heridas y prótesis para regenerar los nervios. Son aplicados en ingeniería de tejido óseo y tejido cartilagosos.

A medida que crecemos se van perdiendo ciertas proteínas en nuestro organismo una de ellas es el colágeno, lo que indica un deterioro en los tejidos dando inicio a la vejez. Por tal motivo el consumo de colágeno funciona como método para detener en cierta medida o retrasar este tipo de pérdidas.

Se conoce que el colágeno tiene aplicaciones en industrias de biomateriales y farmacéuticas como se mencionado anteriormente, sin embargo, este producto ha sido introducido en el mercado de complementos nutricionales de uso oral; teniendo una gran ventaja en lociones y cremas debido al suplemento alimenticio que se asimila en las capas más profundas de los tejidos. Los aminoácidos que se encuentran en el colágeno son utilizados en la regeneración de tejido conjuntivo. El uso de colágeno marino es uno de los más usados debido al contraste con el colágeno habitual.

Se han desarrollado productos compuestos por colágeno en gasas y parches, que presentan grandes beneficios en la cicatrización. Estudios revelan que la fuerza tensil de cicatrices aumento alrededor del 40% y acelera las funciones de:

- Capacidad de reducción de carga bacteriana
- Incentiva la formación de tejido conectivo
- Reparación tisular
- Disminución de respuesta inflamatoria local

A continuación, se presenta en la Tabla 1.6 un perfil de aminoácidos de colágeno encontrados en la piel humana y piel de peces tales como la tilapia con porcentaje total.

Tabla 1.6 Concentración de aminoácidos de colágeno Tipo I de pescado y piel humana

Aminoácido	% aminoácido en colágeno Tipo I (pescado)	% aminoácido en colágeno Tipo I (humana)
Alanina	11,9	11
Arginina	5,8	5
Asparagina	4,2	5
Glutamina	6,9	7
Glicina	35,6	33
Histidina	0,6	0,5
Isoleucina	0,8	1
Leucina	2,0	2
Lisina	2,0	2
Metionina	0,5	0,6
Fenilalanina	1,3	1
Prolina	12,8	13
Serina	3,2	4
Treonina	2,2	2
Triptófano	0	2
Tirosina	0,3	0,3
Valina	1,7	2
4-Hidroxiprolina	8,2	8,6
Total	100	100

Fuente: (Serrano Gaona, 2011)

El colágeno proveniente de las escamas de tilapia presenta un aminograma similar al de los seres humanos, por lo cual se lo puede emplear en la producción de implantes y productos cosméticos para humanos sin que se produzcan alteraciones o efectos secundarios en el paciente.

1.4.5.1 Obtención

Una de las principales fuentes de obtención de colágeno es mediante el procesamiento de residuos animales de especies bovinas usando sus huesos, piel y cartílagos. El uso de colágeno proveniente de estas fuentes puede presentar problemas referentes a grupos étnicos y religiosos debido a restricciones

socio-culturales. Ciertas religiones como el judaísmo y el islam, prohíbe el consumo de productos provenientes de cerdos, y otras etnias como el hindú que prohíbe el consumo de vacas; también se encuentran restringidas por salud, ya que el consumo de estos productos, puede conllevar a contraer ciertas enfermedades como fiebre aftosa y encefalopatía espongiforme bovina. La obtención de colágeno de origen bovino es afectada por el gran valor saliente de este tipo de animales y de su baja productividad.

Este tipo de inconvenientes mencionados anteriormente es de suma importancia, por tal motivo, se ha buscado otras alternativas de obtener este producto usando una materia prima diferente, de tal manera, se investigó que el uso de colágeno proveniente de especies marino es el más adecuado usando como materia prima los huesos, piel y escamas de peces.

Se realizaron investigaciones provenientes del colágeno de origen de pescado, se analizaron pieles, huesos y escamas de pescado de ambiente de agua salada y dulce tales como: (Serrano Gaona, 2011)

- Perca
- Bacalao
- Tiburón bambú
- Carpa plateada y gris
- Tilapia niótica

1.4.6 Hidrólisis Enzimática

Existen varios métodos de hidrólisis para extraer el colágeno de las escamas, uno de ellos es mediante hidrólisis enzimática que permite la disminución del tamaño de péptidos con la finalidad de variar las características de la proteína mejorando su calidad.

Los hidrolizados van a depender de su fuente proteica (proteasa) y de las condiciones a las que será llevada para alcanzar el grado de hidrólisis en la reacción. Son usados abundantemente en el área alimentaria por las propiedades funcionales y nutricionales que posee.

Tienen características específicas tales como baja viscosidad, gran capacidad de agitación, alta solubilidad y dispersión. Uno de sus usos es como fuente de nitrógeno usado en dietas enterales para niños y adultos enfermos. Para este uso, los hidrolizados deben de presentar un alto valor nutritivo, no producir desequilibrios osmóticos y que el sabor sea aceptable.

Normalmente la hidrólisis proteica es generada en un reactor que mantiene un control de agitación, temperatura, pH y tiempo del proceso. Se disuelve el sustrato en agua hasta estabilizar la temperatura y el pH para poder agregar la proteasa y comenzar la hidrólisis. El pH va a disminuir a medida que la hidrólisis avanza dado la rotura de los enlaces peptídicos. Al finalizar la hidrólisis la enzima se inactiva con calor, al presentar un pH bajo o ambos casos a la vez. (Benítez, Ibarz, & Pagan, 2008)

El método de hidrólisis enzimática permite obtener un colágeno de alta calidad, en comparación con otros obtenidos de otras fuentes; esto se debe al procesamiento de la materia prima ya que está, no es sometida a la acción de ácidos, bases, disolventes orgánicos y temperaturas energéticas que puedan alterar el valor nutricional o generar reacciones secundarias. (Sampedro, 1977)

1.4.7 Enzimas

Las proteasas colágenas son enzimas que tienen la capacidad de hidrolizar las conexiones peptídicas de varios tipos de colágeno. Es la proteína más abundante en los mamíferos y utilizada en la medicina y en aplicaciones terapéuticas como se ha mencionado anteriormente.

Las proteasas se utilizan en:

- La degradación de tejido necrosado
- Eliminación de cicatrices hipertrofias
- Terapias de quemados
- Composición de pomadas cicatrizantes
- Prevención del tratamiento de lesiones y en estudios preclínicos terapéuticos en el retraso de cirrosis hepática

Las proteasas presentan un gran potencial económico, ya que además de las diversas aplicaciones en la industria farmacéutica, pueden ser usadas en el sector alimenticio, industria cosmética, de cuero y en el sector agrícola para el biocontrol de nematodos. Ciertos microorganismos son recolectados de suelo o aguas como el *Bacillus alvei* y el *Bacillus subtilis*, los cuales son seguros para la producción de colágeno.

Aproximadamente, el 60% de las enzimas disponibles comercialmente son producidas por especies de *Bacillus*. Las cepas de *Bacillus* tienen la capacidad de producir y secretar grandes cantidades de enzimas extracelulares y entre ellas las proteasas son las más presentes, estando entre las más importantes productoras de enzimas industriales. (Lorena Azevedo Lima; Raimundo Felipe Cruz Filho; Januário Gama dos Santos; Wilson Castro Silva, 2014)

1.4.8 Secado por atomización

Para la obtención de colágeno en polvo se usó como equipo el secador por atomización para convertir el colágeno líquido en polvo.

Dicho equipo se basa en una operación unitaria, la cual es la transformación de una disolución o de una suspensión en un material seco particulado, por un medio caliente y seco.

Se usa para diferentes industrias como químicas, farmacéuticas, cerámico, alimentario, cada proceso usado en estas industrias y uso de este polvo obtenido requiere de determinadas propiedades en cada caso. (Mondragón, Julia, Barba, & Jarque, 2013)



Figura 1.4 Secador por atomización SD-Basic (LabPlant, n.d.)

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

2.1 Materiales y métodos para la obtención de colágeno en polvo

2.1.1 Materiales

3 vasos de precipitación de 1000ml

1 vaso de precipitación de 200ml

Agitador de vidrio

Hipoclorito de sodio (NaClO) 0.5%

Agua destilada

Filtro de vidrio

Papel filtro

Enzima Proteasa de Bacillus Subtilis

Escamas de tilapia

2.1.2 Equipos para la extracción de colágeno

Balanza

Plancha de calentamiento con agitador magnético. (55-100)°C

Secador por atomización (90-120)°C

Horno

2.1.3 Equipos para la evaluación de colágeno

Turbidímetro

Viscosímetro

Refractómetro

pH metro

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC)

2.1.4 Métodos de análisis

Para la comparación entre la calidad del colágeno en polvo obtenido en la experimentación y el colágeno que se comercializa se realizó diferentes métodos de análisis, como se puede observar en la Fig. 2.1, las cuales son detalladas a continuación.

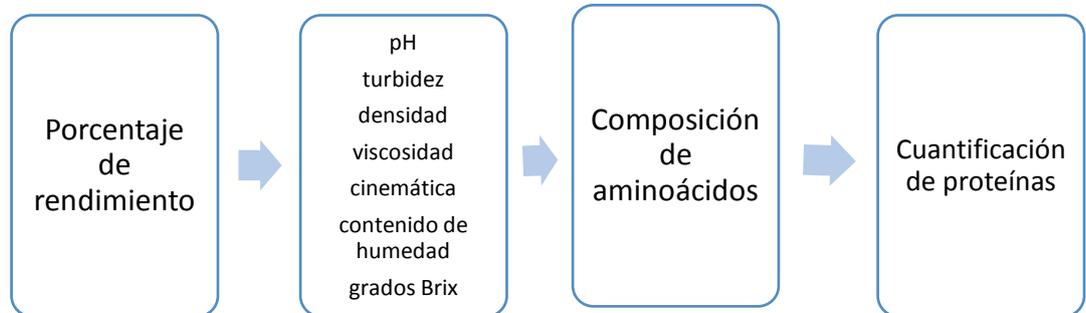


Figura 2.1 Comparación de características de colágeno obtenido experimentalmente y comercial

2.1.4.1 Porcentaje de rendimiento

A partir del colágeno en polvo obtenido en la experimentación, se calculó el porcentaje de rendimiento tomando en cuenta que para la obtención de colágeno se toma como muestra en cada una de las corridas 100g de escamas por medio de las ecuaciones presentadas en esta sección, en la cual se calcula el rendimiento en base a escamas y en base a masa seca. (Shon et al., 2011)

$$\text{Rendimiento en base a escamas} = \frac{\text{peso del colágeno en polvo}}{\text{peso de escamas que se uso}} \times 100 \quad \text{ec. (2.1)}$$

$$\text{Rendimiento en base seca} = \frac{\text{peso del colágeno en polvo seco}}{\text{peso de escamas secas}} \times 100 \quad \text{ec. (2.2)}$$

2.1.4.2 pH

La medida del pH es una de las pruebas más importantes y frecuentes utilizadas en el análisis químico para conocer si una solución está en medio alcalino, ácido o neutro. En la cual, la neutralización ácido-base, suavizado, precipitación, coagulación, desinfección y control de la corrosión dependen del pH.

Por lo cual se procedió a medir el pH al colágeno líquido para constatar que sea igual al del agua, es decir un pH 7 que nos indica que es una solución neutra, debido a que esta es una de las características principales del colágeno. (APHA; AWWA; WPCF, 1992)

2.1.4.3 Turbidez

La turbidez es la reducción de la transparencia en un líquido que es causada por la presencia de partículas no disueltas de un material diferente al del propio líquido.

El valor de turbidez reflejó la concentración de lípidos residuales y otros materiales coloidales que estaban presentes en el colágeno, además dichos valores de turbidez dependen en gran medida de la eficacia del proceso de filtración. Mientras menor turbidez contenga el colágeno tendrá una mayor dispersibilidad y solubilidad. (Acebo & Hernández, 2013)

Para medir la turbidez del colágeno se utilizó un turbidímetro en el cual se coloca un blanco en la celda, este blanco es agua destilada o agua tipo 3, luego se procede a colocar la muestra de colágeno diluida al 10% (w/v) en una nueva celda para ponerlo en el turbidímetro a 600nm, para así obtener un resultado y compararlo

con la turbidez del colágeno comercial. (Shon, Eun, Eo, & Hwang, 2011)

2.1.4.4 Densidad

La densidad del líquido se mide entre la masa del mismo, dividida por el volumen que este ocupa. Esta relación se la puede medir directamente utilizando un instrumento llamado densímetro, se introduce dicho instrumento en el líquido y está dada por el número del densímetro que alcanza la superficie del líquido. (Constantino de LLano, 1994)

2.1.4.5 Viscosidad cinemática

Se define como la viscosidad absoluta sobre la densidad del fluido, en la cual se puede conocer la tendencia de un fluido a fluir fácilmente o con dificultad. La viscosidad es una de las propiedades físicas que contiene el colágeno por lo cual podemos compararlo con el colágeno que se encuentra en el mercado, el de mayor demanda como es el Vitagel. (Bourne, 2002)

Para ello se utiliza un viscosímetro proporcionado por el Laboratorio de Hidrocarburos de ESPOL, en el cuál primero se procedió a diluir el colágeno en polvo al 10% (w/v), la solución se calienta a 60°C y 60 rpm para luego empezar a tomar por medio de un cronometro el tiempo que demora la viscosidad en pasar desde la primera raya a la segunda, para así calcular la viscosidad con respecto al tiempo y expresarlo en unidades de centipoises (cp). (Shon et al., 2011)

2.1.4.6 Contenido de humedad

Para calcular el porcentaje en agua por pérdida de peso debido a la eliminación por calentamiento bajo condiciones normales, se puede hacer uso de secadores en especial la estufa la cual es la más usada para esta medición.

El contenido de humedad se calculó mediante los pesos y se expresa en porcentaje de humedad (g de H₂O/100 g de muestra). (García Martínez & Fernández Segovia, n.d.)

$$\text{contenido de humedad} = \frac{\text{Peso de muestra} - \text{Peso de muestra seca}}{\text{Peso de muestra}} \times 100 \quad (2.3)$$

2.1.4.7 Grados Brix

Proporcionan una medida de concentración de azúcar disueltos en un producto, este se realiza mediante un refractómetro.

Para el uso del refractómetro se tomó una pequeña muestra del colágeno diluido al 10%(p/v), la cual es colocada en el prisma de refracción y se cierra el prisma de iluminación, de esta forma se prende la luz y se procede a su lectura. (Rolle, 2007)

2.1.4.8 Composición de aminoácidos

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), es un método utilizado para la separación de componentes de una mezcla, en donde las interacciones químicas determinan la separación de compuestos orgánicos semivolátiles como lo son: hidrocarburos poliaromáticos, vitaminas, entre otros. (Lough, 1996)

Este proceso se usó para la separación de los aminoácidos y poder obtener el aminograma tanto del colágeno obtenido en la

experimentación como también para el colágeno comercial, y así poder comparar sus calidades.

Ya que el colágeno comercial es de origen bovino y el obtenido por experimentación es de escamas de tilapia, deberá contener más aminoácidos que el que se encuentra comercializándose. Se usaron 250 g de colágeno polvo para sí poder tener una lectura de los aminoácidos presentes en la muestra. (Torres-Arreola, W.; Pacheco-Aguilar, R.; Sotelo-Mundo, R .R.; Rouzaud-Sández, O.; Ezquerra-Brauer, 2008)

2.1.4.9 Cuantificación de proteínas

El contenido de proteínas puede determinarse de distintos métodos. El método Kjeldahl nombrado así por su investigador Johann Kjeldahl, es un método que se encuentra básicamente dividido en tres etapas: digestión, destilación y valoración; y se puede cuantificar por medio del contenido de nitrógeno en la muestra. (García Martínez, Eva y Fernández Segovia, n.d.)

2.2 Proceso para la obtención de colágeno

En la figura 2.2 se procede a describir cada etapa del proceso para la obtención de colágeno en polvo a partir de escamas de tilapia.

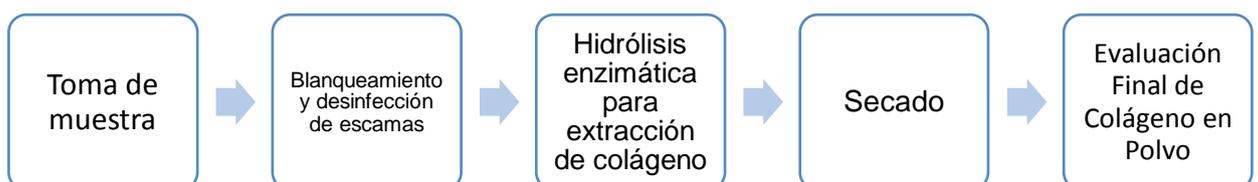


Figura 2.2 Proceso para la obtención del colágeno (Huey-Jine Chai & Chwen-Herng Wu, 2005)

2.2.1 Toma de muestra

Como muestra se escogió un lote de 10 kg de escamas de tilapia de la empresa Tropical Packing Ecuador S.A, para realizar todas las pruebas a partir de este lote, se decidió esta cantidad para tener diferentes muestras de un mismo lote y que de esa forma no se reflejen errores ni diferencias en la calidad, dichas muestras se realizan en triplicado.

2.2.2 Blanqueamiento y desinfección de escamas

El hipoclorito de sodio es un compuesto químico el cual es un fuerte oxidante, también se lo conoce como cloro. Su fórmula química es NaClO.

Las características químicas de este compuesto hacen que el hipoclorito de sodio sea un agente eficaz en la eliminación de ciertos virus, bacterias y microorganismos. El hipoclorito de sodio al entrar en contacto con el aire se descompone lentamente, es inestable y corrosivo. (Quiminet, 2011)

Se usó este compuesto químico para blanquear y desinfectar las muestra de escamas de tilapia de 100g por cada corrida, las cuales tienen un color grisáceo, estas serán llevadas a una decoloración dentro de la cual se utilizará hipoclorito de sodio al 0.525% (p/v) como agente blanqueador durante 30 minutos a una temperatura de 25°C en relación 1:3 p/v.

El proceso de blanqueamiento, se realiza para que el colágeno no obtenga un color gris debido al color característico de las escamas, por lo tanto después de terminado dicho proceso se realizaran 3 lavados con agua destilada para deshacernos del hipoclorito de sodio que se encuentra en las escamas y que este no afecte en el proceso de extracción.

Se utiliza hipoclorito de sodio debido al efecto desinfectante que este posee, con el fin de eliminar toda materia orgánica que se encuentre presente en las escamas como las pequeñas partes de piel que suelen

quedar pegadas, sangre que suelen quedarse después del fileteo y para eliminar la salinidad, para que esto no pueda causar algún tipo de error en el proceso. (Guadalupe, Cristina, & Amezcua-vega, 2015)

2.2.3 Hidrólisis enzimática para la extracción del colágeno

En la obtención de colágeno, se usa hidrólisis enzimática ya que esta da lugar a un producto soluble de muy buena calidad, en comparación a las otras hidrólisis como lo son la ácida y básica.

La hidrólisis enzimática es la más específica y no hace variar el pH, por lo tanto los aminoácidos no son afectados y con ayuda de la enzima se puede obtener un colágeno más puro. (Sampedro, 1977)

En este caso para la hidrólisis enzimática se escogió una muestra de 100 g de escamas de tilapia para cada corrida y como enzima la proteasa de *Bacillus subtilis* (Quality Corp, 2018), debido a que es más comercial, más fácil de conseguirla y más económica. A esta enzima se la hidrolizará a diferentes tiempos y a diferentes concentraciones en intervalos de 2, 3, 4 y 5 horas con concentraciones de 1, 2 y 3% (p).

Luego de la hidrólisis se agregó agua a la muestra en una relación 1/8 (p/v) para luego ser calentada junto con la enzima a una temperatura de 55°C, una vez que la muestra llega a esta temperatura, la enzima se activa y comienza a desprender el colágeno puro. Una vez terminado el pre-calentamiento se elevó la temperatura a 100°C para evaporar la mayor cantidad de agua posible y desactivar la enzima después de ya haberla dejado actuar. Terminado el proceso, se filtró para obtener el colágeno líquido. (Huey-Jine Chai & Chwen-Herng Wu, 2005)

2.2.4 Secado por atomización

En Ecuador el colágeno en polvo es el que tiene mayor demanda, por lo cual el colágeno obtenido en esta experimentación se la realiza en esa presentación.

Para lograr obtener colágeno en polvo se hace uso de un secador por atomización el cual se encuentra en Laboratorio de Alimentos de ESPOL, se usa este tipo de secado debido a que puede definirse como un secador de transporte neumático de corriente paralela que contacta directamente el producto con el medio de secado que podría ser aire, gas inerte, vapor o alguna combinación de los mismos. Este tipo de secador es capaz de atomizar y secar líquidos dando como resultado un sólido discreto y seco en una sola pasada. (Walter E. Farr and Andrew Proctor, 2013)

Por lo que después de realizada la hidrólisis enzimática, el colágeno ya está extraído de forma líquida y para poder tener una presentación en polvo es llevado al secador por atomización a condiciones de alimentación mínima de 500ml sin residuos y un ciclo de operación de 90-120°C de temperatura. De esta forma se obtiene el colágeno en polvo la cual será nuestra presentación final. (Huey-Jine Chai & Chwen-Herng Wu, 2005)

2.2.5 Evaluación final del colágeno en polvo

En la última etapa del proceso de obtención de colágeno en polvo, se procede a evaluar la calidad del producto obtenido experimentalmente mediante rendimiento, pH, turbidez, densidad, viscosidad cinemática, grados Brix, composición de aminoácidos y cuantificación de proteínas. (Torres-Arreola, W.; Pacheco-Aguilar, R.; Sotelo-Mundo, R .R.; Rouzaud-Sández, O.; Ezquerra-Brauer, 2008)

Estos métodos de análisis también se realizan en el colágeno que actualmente se encuentra en el mercado para lograr una comparación de la calidad de cada uno de ellos.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Resultados

3.1.1 Obtención de colágeno

Se realizó una hidrólisis enzimática a 12 muestras por triplicado. Las concentraciones de enzima usada son 1%, 2% y 3% a distintos tiempos de hidrólisis 2h, 3h, 4h y 5h. En la Tabla 3.1, Tabla 3.2 y Tabla 3.3 se detalla respectivamente las cantidades obtenidas en cada prueba.

Tabla 3.1 Pruebas con concentración de enzima al 1% a distintos tiempos de hidrólisis

	Prueba 1 (2h)			Prueba 1 (3h)			Prueba 1 (4h)			Prueba 1 (5h)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
M escamas (gr)	100,5	100	100	100	100	100	100,5	100	100	100	100	100
V hipoclorito (ml)	400	400	400	300	300	300	300	300	300	300	300	300
M escamas + agua (g)	700	800	841	850	840	840	956	915,5	923,5	934	920	947
V agua (ml)	600	600	600	600	600	600	800	800	800	800	800	800
Concentración enzima (%)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T1 (°C)	57	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55
Tiempo de hidrólisis (h)	2	2	2	3	3	3	4	4	4	5	5	5
T2 (°C)	98	100	98	100	98	100	100	100	100	100	100	100
M colágeno líquido + Agua (g)	228	215	225	320	315	326	216	200	243	395	400	405
V colágeno líquido + Agua (ml)	223	230	227	340	330	346	215	215	230	425	430	445
M total colágeno líquido + Agua	668			961			659			1200		
V total (ml)	680			1016			660			1300		
M colágeno polvo (g)	28,5			36			50			90,5		

Tabla 3.2 Pruebas con concentración de enzima al 2% a distintos tiempos de hidrólisis

	Prueba 2 (2h)			Prueba 2 (3h)			Prueba 2 (4h)			Prueba 2 (5h)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
M escamas (g)	100,5	100	100,5	100,5	100	100	100	100	100	100	100	100
V hipoclorito (ml)	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
M escamas + agua (g)	1014	925	1045	976	1321	1303,5	1197,5	1300	1317,5	1198	1320,5	1317,5
V agua (ml)	800	800	800	800	800	800	800	800	800	800	800	800
Concentración enzima (%)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
T1 (°C)	55	55	56	55	55	55	55	55	55	55	55	55
tiempo de hidrólisis (h)	2	2	2	3	3	3	4	4	4	5	5	5
T2 (°C)	100	98	100	100	98	100	100	100	100	100	100	100
M colágeno líquido + Agua (g)	517	504	470	295	317	304	250	327	300	348	365	350
V colágeno líquido + Agua (ml)	530	504	482	298	300	320	315	300	285	360	373	367
M total colágeno líquido + Agua	1491			916			877			1063		
V total (ml)	1516			918			900			1100		
M colágeno polvo (g)	81,6			86,4			90,67			113		

Tabla 3.3 Pruebas con concentración de enzima al 3% a distintos tiempos de hidrólisis

	Prueba 3 (2h)			Prueba 3 (3h)			Prueba 3 (4h)			Prueba 3 (5h)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
M escamas (g)	100	100	100	100,5	100	100,5	100	100	100	100	100	100
V hipoclorito (ml)	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
M escamas + agua (g)	1006	997,5	1294,5	1110	1313,5	1300	1264,5	1247,5	1275,5	1197,5	1303,5	1317,5
V agua (ml)	800	800	800	800	800	800	800	800	800	800	800	800
Concentración enzima (%)	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
T1 (°C)	55	56	60	55	55	55	55	55	55	55	55	55
tiempo de hidrólisis (h)	2	2	2	3	3	3	4	4	4	5	5	5
T2 (°C)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
M colágeno líquido + Agua (g)	391	397	393,5	400	424	388	430	460	452	456	500	455
V colágeno líquido + Agua (ml)	393	403	400	435	450	432	453,33	453,33	453,33	500	500	500
M total colágeno líquido + Agua	1181,5			1212			1342			1411		
V total (ml)	1196			1317			1360			1500		
M colágeno polvo (g)	92,5			98			100,5			116,5		

3.1.2 Rendimientos de las muestras

3.1.2.1 Rendimiento en base a escamas de tilapia usadas

Se hace uso de la ecuación 2.1 antes descrita para poder obtener un rendimiento en base a las escamas que fueron utilizadas en el proceso de obtención de colágeno, los cuales se reflejan en la Tabla 3.4 y en la Fig. 3.1

Tabla 3.4 Rendimiento en base a las escamas usadas dependiendo de la concentración de enzima y tiempo

Concentración de enzima (%)	Tiempo (h)	Peso (g)	Rendimiento $\left(\frac{\text{peso del colágeno en polvo}}{\text{peso de escamas que se uso}} \times 100\right)$
1	2	18,5	9,50%
	3	36	12,00%
	4	50	16,67%
	5	90,5	30,17%
2	2	81,6	27,20%
	3	86,4	28,80%
	4	90,67	30,22%
	5	113	37,67%
3	2	92,5	30,83%
	3	98	32,67%
	4	100,5	33,50%
	5	116,5	38,83%

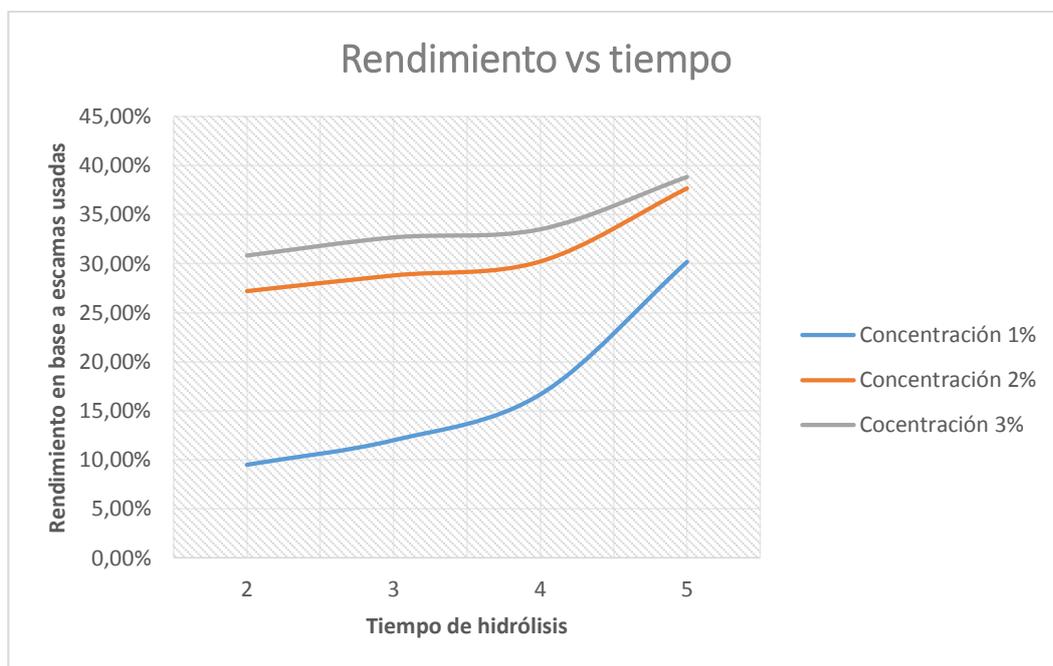


Figura 3.1 Gráfico de rendimientos en relación a tiempo de hidrólisis y concentración de enzima

3.1.2.2 Rendimiento en base a escamas secas

Se hace uso de la ecuación 2.2 antes descrita para poder obtener un rendimiento en base a las escamas secas que fueron utilizadas en el proceso de obtención de colágeno, el cual se presenta a continuación en la tabla 3.5 y Fig. 3.2

Tabla 3.5 Rendimiento en base seca que depende de la concentración de enzima y tiempo

Concentración de enzima (%)	Tiempo (h)	Peso base seca (g)	Rendimiento en base seca $\left(\frac{\text{peso del colágeno en polvo seco}}{\text{peso de escamas secas}} \times 100\right)$
1	2	18,2	9,73%
	3	34,34	12,44%
	4	49,2	17,83%
	5	89,06	32,27%
2	2	80,3	29,09%
	3	84,74	30,70%
	4	89,01	32,25%
	5	111,2	40,29%

3	2	90,84	32,91%
	3	96,44	34,94%
	4	98,9	35,83%
	5	114,64	41,54%

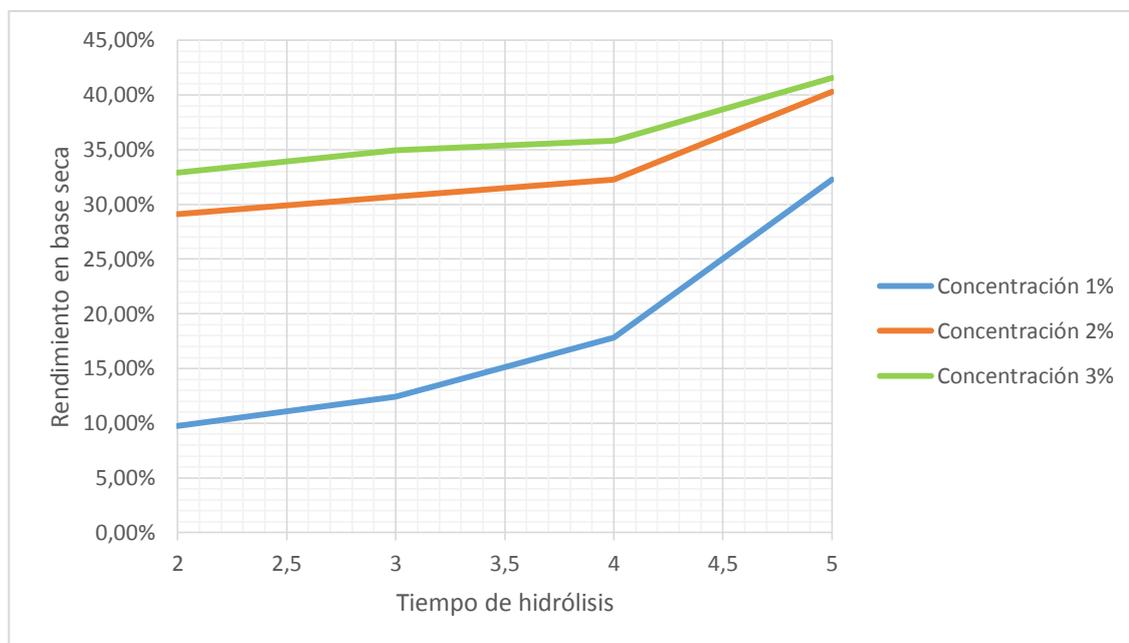


Figura 3.2 Gráfico de rendimiento en base seca con relación a tiempo de hidrólisis y concentración de enzima

3.1.2.3 Rendimiento obtenido en el secador en Horno

Se procedió a repetir la prueba con mayor rendimiento con la finalidad de obtener una muestra con mayor contenido de colágeno en polvo, para ser comparado con el colágeno obtenido por medio del secador por atomización.

El resultado obtenido se refleja en tabla 3.6 presentada a continuación

Tabla 3.6 Rendimiento en base seca obtenido haciendo uso de la estufa

Prueba en Estufa			
Prueba 3% 5h	1	2	3
Masa colágeno en base seca	65	65,5	66
Rendimiento en base seca	71,20%		

3.1.3 Caracterización del colágeno obtenido

Se realizaron varias pruebas físico- químicas descritas en el capítulo anterior en el cual nos reflejó los resultados que se presenta en la tabla 3.6 descrita a continuación:

Tabla 3.7 Propiedades físico-químicas de colágeno en polvo al 1% de concentración de enzima y diferentes tiempos de hidrólisis.

Prueba 1% 2h			
pH	Densidad	Grados Brix	Contenido de humedad
6,47	0,98	3 °Brix	1,62
Prueba 1% 3h			
pH	Densidad	Grados Brix	Contenido de humedad
6,44	0,94	2 °Brix	1,6
Prueba 1% 4h			
pH	Densidad	Grados Brix	Contenido de humedad
6,56	0,99	7,8 °Brix	1,6
Prueba 1% 5h			
pH	Densidad	Grados Brix	Contenido de humedad
6,89	0,92	14 °Brix	1,59

Tabla 3.8 Propiedades físico-químicas de colágeno en polvo al 2% de concentración de enzima y diferentes tiempos de hidrólisis.

Prueba 2% 2h			
pH	Densidad	Grados Brix	Contenido de humedad
6,49	0,98	12,6 °Brix	1,59
Prueba 2% 3h			
pH	Densidad	Grados Brix	Contenido de humedad
6,63	0,99	7,4 °Brix	1,58
Prueba 2% 4h			
pH	Densidad	Grados Brix	Contenido de humedad
6,68	0,97	11,5 °Brix	1,59

Prueba 2% 5h			
pH	Densidad	Grados Brix	Contenido de humedad
6,83	0,96	17,5 °Brix	1,59

Tabla 3.9 Propiedades físico-químicas de colágeno en polvo al 3% de concentración de enzima y diferentes tiempos de hidrólisis.

Prueba 3% 2h			
pH	Densidad	Grados Brix	Contenido de humedad
6,62	0,98	10° Brix	1,6
Prueba 3% 3h			
pH	Densidad	Grados Brix	Contenido de humedad
6,47	0,97	15 °Brix	1,59
Prueba 3% 4h			
pH	Densidad	Grados Brix	Contenido de humedad
6,66	0,98	16 °Brix	1,59
Prueba 3% 5h			
pH	Densidad	Grados Brix	Contenido de humedad
6,49	0,94	18 °Brix	1,58

Tabla 3.10 Viscosidad de colágeno en tres Pruebas seleccionadas

Prueba	Viscosidad (cp)
1% 2h	10
2% 5h	13,7
3% 5h	14

Tabla 3.11 Turbidez de colágeno líquido en 5 Pruebas seleccionadas

Prueba	Turbidez (NTU)
1% 2h	16
1% 3h	16
2% 3h	16
2% 4h	17
3% 5h	15

3.1.3.1 Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas se envió a un laboratorio certificado para obtener los resultados que se presentan en la tabla 3.9 dando el resultado descrito a continuación:

Tabla 3.12 Cantidad de proteínas en la prueba de alto rendimiento

Prueba de alto rendimiento	Contenido de proteínas (%)
3% 5h	93,65

3.1.3.2 Contenido de aminoácidos

El contenido de aminoácidos es realizado mediante HPLC, la muestra de alto rendimiento se envió a un laboratorio certificado donde se realizó una lectura de aminoácidos dando como resultado la información descrita en la tabla 3.10 presentada a continuación:

Tabla 3.13 Contenido de aminoácidos en la muestra de la prueba de alto rendimiento

3% 5h	
Aminoácidos	Cantidad
Alanina	7,63
Arginina	7,67
Ac.Aspartico	5,91
Cistina	0,08
Ac.Glutamico	10,42
Glicina	18,98
Histidina	0,35
Isoleucina	3,54
Leucina	5,05
Lisina	5,30
Metionina	0,36
Fenilalanina	3,98
Prolina	12,35
Serina	4,90
Treonina	0,96

3.1.4 Caracterización del colágeno comercial

Se realizaron diversas pruebas físico-químicas donde se realizó una comparación de calidad entre el colágeno obtenido y el colágeno comercial se realizaron las mismas pruebas que se reflejaron en el capítulo 2 y los resultados obtenidos se reflejan en la tabla 3.9 descritos a continuación:

Tabla 3.9 Propiedades físico-química del colágeno comercial

Prueba de Colágeno Comercial					
pH	Densidad	Grados Brix	Contenido de humedad	Turbidez	Viscosidad
6,45	0,95	17° Brix	1,51	14	14,5

3.1.4.1 Cuantificación de proteínas

Para poder realizar la comparación con el colágeno obtenido en el laboratorio se procedió a analizar el colágeno comercial, efectuando los mismos ensayos físico-químicos; para este caso se tomó la información contenida en la etiqueta del colágeno importado que especifica la cantidad de proteínas descrita en la tabla 3.10.

Tabla 3.10 Contenido de proteínas del colágeno comercial

Colágeno	Contenido de proteínas (%)
Comercial	95

3.1.4.2 Contenido de aminoácidos

El envase del colágeno comercial presenta la cantidad de aminoácidos que contiene este tipo de colágeno las cuales son descritas en la tabla 3.11 presentadas a continuación

Tabla 3.14 Contenido de aminoácidos del colágeno comercial

Colágeno comercial	
Aminoácidos	Cantidad (100 g)
Alanina	7,8
Arginina	8,3
Ac.Aspartico	5,4
Cisteina	0,0
Ac.Glutamico	10,9
Glicina	18,9
Histidina	1,2
Isoleucina	1,6
Leucina	3,0
Lisina	3,3
Metionina	0,5
Fenilalanina	2,1
Prolina	1,26
Serina	2,8
Treonina	1,9

3.1.5 Comparación de las características físico-químicas del colágeno con el más alto rendimiento y el colágeno comercial

Tabla 3.15 Comparación de propiedades fisico-químicas

Prueba 3% 5h						
pH	Densidad	Grados Brix	Contenido de humedad	Turbidez	Viscosidad	Cantidad de proteínas
6,49	0,94	18° Brix	1,58	15	14	93,65%
Prueba de colágeno comercial						
pH	Densidad	Grados Brix	Contenido de humedad	Turbidez	Viscosidad	Cantidad de proteínas
6,49	0,95	17 °Brix	1,51	14	14,5	95%

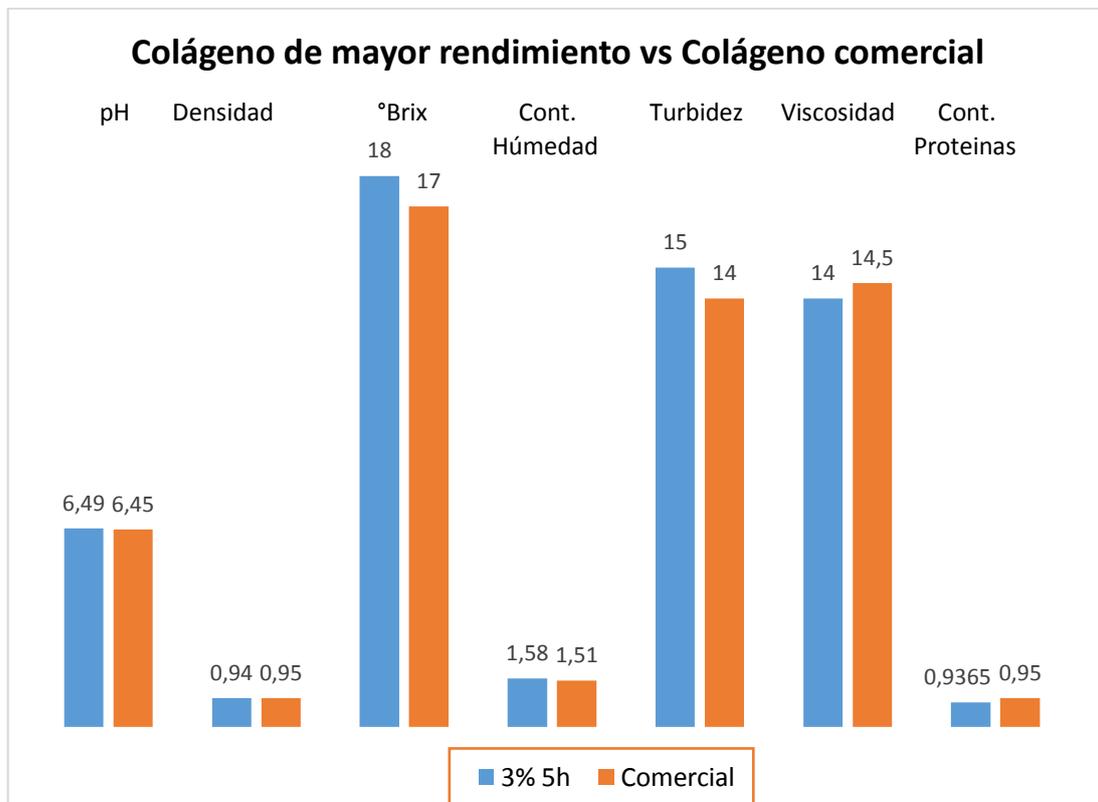


Figura 3.3 Propiedades físico-químicas de colágeno obtenido y comercial

3.1.6 Diagrama del proceso y Balance de materia y energía

Se realizó un diagrama de bloque del proceso como se aprecia en la figura 3.4 en el cual se puede observar el desarrollo para la obtención del colágeno, donde se efectuó un balance de materia y energía como se indica en las tablas 3.16 y tabla 3.17 respectivamente.

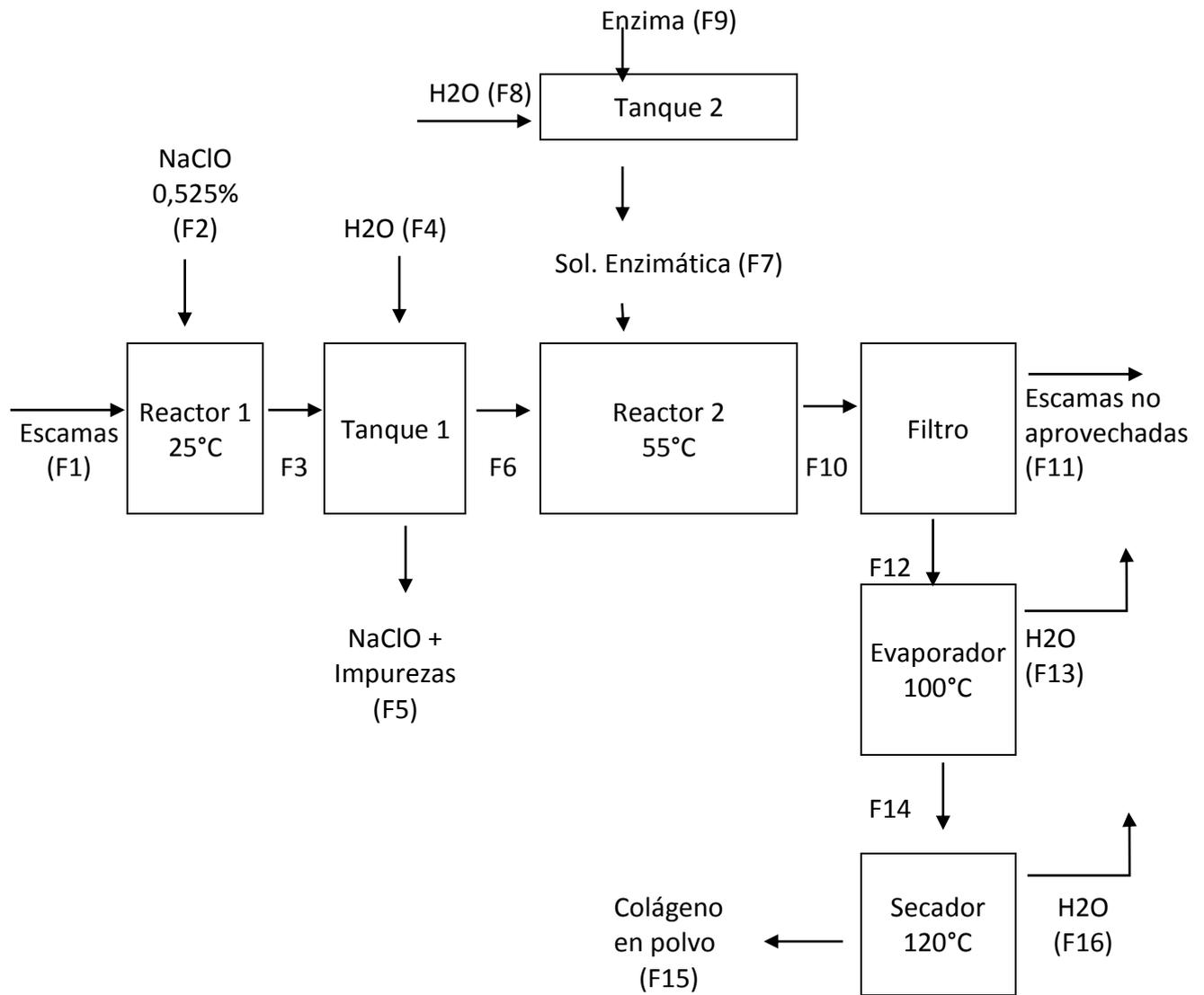


Figura 3.4 Diagrama de bloques del proceso obtención de colágeno en polvo

Tabla 3.16 Balance de materia del proceso

Balance General: $F1 + F2 = F3 + F4$							
R-01		TK-01		R-02		TK-02	
$F1 + F2 = F3$		$F3 + F4 = F5 + F6$		$F6 + F7 = F10$		$F8 + F9 = F7$	
F1 (g)	300	F4 (g)	3000	F6 (g)	490	F8 (g)	3000
F2 (g)	90	F5 (g)	2900	F7 (g)	3009	F9 (g)	9
F3 (g)	390	F6 (g)	490	F10 (g)	3499	F7 (g)	3009
F-01		EV-01		S-01			
$F10 = F11 + F12$		$F14 = F12 + F13$		$F15 = F16 + F14$			
F10 (g)	3499	F14 (g)	1411	F14 (g)	1411		
F11 (g)	86,4	F12 (g)	3412,6	F16 (g)	1197,4		
F12 (g)	3412,6	F13 (g)	2001,6	F15 (g)	213,6		

Tabla 3.17 Balance de energía del proceso

Plancha de calentamiento Hidrólisis enzimática	$1000 \frac{w}{h} \times 5h = 5kw (3,499L)$
Plancha de calentamiento Evaporización	$1000 \frac{w}{h} \times 1h = 1kw (3,4126 L)$
Secador por atomización Colágeno en polvo	$3 \frac{w}{h} \times 5h = 3kw (213,6 g)$

3.2 Análisis de resultados

3.2.1 Rendimientos de colágeno obtenido

Se realizaron 12 muestras cada uno por triplicado descritas en la tabla 3,1, tabla 3,2 y tabla 3,3, pero debido a que el secador por atomización opera a altas cargas, se vio la necesidad de mezclar los triplicados para poder obtener el colágeno en polvo; por esta razón se presentan solo 12 rendimientos.

Se estimaron los rendimientos de acuerdo a los 300 gramos usados en cada una de las pruebas como se muestra en la tabla 3,4, debido a que cada prueba contenía 100 gramos de escamas donde se obtuvo como mayor porcentaje de rendimiento 38,83% que corresponden a la concentración de enzima 3% y 5 horas de hidrólisis .

Para obtener el rendimiento en base seca se procedió a secar las escamas obteniendo 276 g como lo indica la tabla 3,5, de igual manera se procedió a realizar este procedimiento con los productos obtenidos de colágeno en polvo, el cual aumento un 2,72% con respecto al rendimiento de escamas usadas en el proceso obteniendo un 41,54%.

Mediante la gráfica 3,1 y gráfica 3,2 se puede observar como el rendimiento va aumentando en relación al tiempo de hidrólisis y a la concentración de la enzima; es decir, que a medida que la concentración de enzima y el tiempo de hidrólisis aumentan el rendimiento obtenido será mayor. Sin embargo en dichas gráficas podemos notar que no hay necesidad de seguir aumentando la concentración de enzima debido a que en 5h de hidrólisis la diferencia es de 1,25% de rendimiento entre 2% y 3% de concentración de enzima.

Las primeras pruebas de rendimiento realizadas demostraron cierta irregularidad al momento de verificar por medio de gráficas debido a que estos rendimientos presentaron variaciones descendentes y ascendentes; por tal motivo se procedió a repetir ciertos ensayos con la finalidad de probar que las variaciones son por consecuencia del equipo como se muestra en el anexo E. Las nuevas pruebas presentaron un rendimiento del 71,2%, mayor al de secador por atomización mostrados en la Tabla 3.1, Tabla 3.2 y Tabla 3.3 lo que afirma que los fallos fueron por defectos de este equipo de secado.

Los resultados obtenidos usando el secador por atomización demuestran que la operación del equipo tiene un efecto adverso, debido al bajo porcentaje de rendimiento obtenido, como se muestra en la tabla 3,4 y tabla 3,5; por esta razón se procedió a realizar el secado de una nueva muestra del proceso 3% 5h en un horno, en la cual se obtuvo un 71,2% como se puede observar en la tabla 3,6; con estos resultados se pudo constatar las pérdidas producidas del secador por atomización usado en la prueba anterior.

3.2.2 Caracterización del colágeno obtenido

Se realizaron análisis pruebas físico-químicas a las 12 muestras descritas en la tabla 3,7, tabla 3,8 y tabla 3,9 en las cuales se evaluó pH, densidad, grados brix, contenido de humedad para luego ser comparadas con las

características del colágeno comercial. Los valores de las propiedades y los rangos obtenidos de estas muestras fueron similares entre ellas, demostrando que la muestra con más similitud a la comercial fue la de concentración de enzima 3% y 5h de tiempo de hidrólisis.

Para poder tener una mejor comparación con el colágeno comercial se decidió realizar la cuantificación de proteínas y una lectura de contenido de aminoácidos. Estos ensayos se realizaron únicamente a la muestra con más alto rendimiento, obteniendo 93,65% de proteína y entre los principales aminoácidos se obtuvo alanina 7,63 g, arginina 7,67 g, ac. Glutámico 10,42 g y glicina 18,98 g. (Tabla 3.13)

3.2.3 Comparación entre el colágeno con mayor rendimiento y colágeno comercial

Los resultados obtenidos en la lectura de aminoácidos muestran similitud en comparación con el colágeno comercial. El estudio fue realizado a una sola muestra debido a las limitaciones que presenta el proyecto en los análisis.

La muestra con concentración de enzima al 3% y un tiempo de hidrólisis de 5 horas reflejó mayor similitud con las propiedades físico-químicas del colágeno comercial como se presenta en la tabla 3,15, siendo esta muestra la de mayor rendimiento en comparación al resto de pruebas. Estos resultados se observan en la figura 3,3 donde se demuestran que estas son las condiciones necesarias para el proceso de elaboración de colágeno en la industria Ecuatoriana con la misma calidad al importado.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

Para el aprovechamiento de escamas de tilapia se investigó diversos procesos para la obtención del colágeno en polvo mediante hidrólisis enzimática, de los cuales se seleccionó la enzima proteasa *Bacillus subtilis* logrando obtener los resultados propuestos.

Se determinó que la concentración óptima de enzima proteasa *Bacillus subtilis* para el proceso de obtención de colágeno mediante hidrólisis enzimática es del 3% (p).

El mejor tiempo de hidrólisis es de 5 horas, en consideración a la concentración de enzima al 3%.

Mediante el proceso de secado por atomización, el rendimiento que se obtuvo del colágeno fue de 41,54%. Dado que este tipo de secado no fue tan eficiente, se utilizó otro método de secado empleando un horno donde se logró un rendimiento del 71,2%

Se demostró que las propiedades físico-químicas analizadas en el colágeno obtenido, fueron similares al colágeno comercial.

El producto comercial tiene un contenido de proteína del 95%, con un contenido de aminoácido que presenta alanina 7,8 g, arginina 8,3 g, ac. Glutámico 10,9 g y glicina 18,9 g, y el producto que se obtuvo en la presente investigación tiene un contenido de proteína de 93,65%, con una cantidad de aminoácido que presenta alanina 7,63 g, arginina 7,67 g, ac. Glutámico 10,42 g y glicina 18,98 g

Técnicamente es factible desarrollar el proceso de obtención para la empresa Tropack en la obtención del colágeno utilizando su propio producto.

4.2 Recomendaciones

En base a los resultados de la presente investigación, se recomienda evaluar el proceso a escala piloto para el diseño de una planta de obtención de colágeno.

Evaluar el proceso de secado del colágeno obtenido, evaluando diferentes métodos de secado, con la finalidad de medir el rendimiento del proceso y seleccionar el más apto en la obtención del colágeno en polvo.

Realizar trabajos de investigación complementarios, empleando diferentes enzimas como peptina y peptosa

Estudiar procesos que permitan el aprovechamiento de la mayor cantidad de residuos obtenidos del fileteo de la tilapia, como la piel, espinazo y espinas para la obtención de colágeno.

Difundir los resultados de este proyecto entre la comunidad acuícola e industrial del país y particularmente con la empresa Tropack, así como en la comunidad universitaria.

BIBLIOGRAFÍA

- Aranda, L. V. C. A. R. (2017). *Propuesta para extracción de colágeno soluble en ácido (CSA) de escamas de tilapia del Nilo.*
- Beltran, J. (2011). Valoración de la innovación tecnológica del proceso de obtención de colágeno a partir de piel de tilapia (*oreochromis sp*) para su aplicación en el mercado cosmético Valoración de la innovación tecnológica del proceso de obtención de colágeno a partir de, 171.
- Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones Resumen. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 42(2), 227–237. <https://doi.org/1851-6114>
- Constantino de LLano. (1994). *Física. Editorial Progreso.*
- Quality Corporation S.A. (2018). *Enzymes Powder Protease.*
- Dreamstime. (2015). Tilapia roja aislada. Retrieved from <https://es.dreamstime.com/fotografía-de-archivo-libre-de-regalías-tilapia-roja-aislada-image17351427>
- García Martínez, Eva y Fernández Segovia, I. (n.d.). Determinación de proteínas de un alimento por el método Kjeldahl. *Universitat Politècnica de València*. Retrieved from [https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/16338/Determinación de proteínas.pdf?sequence=1](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/16338/Determinación%20de%20proteinas.pdf?sequence=1)
- García Martínez, E. y, & Fernández Segovia, I. (n.d.). Determinación de la humedad de un alimento por un método gravimétrico indirecto por desecación. Retrieved from [https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/16339/Determinación de humedad.pdf](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/16339/Determinación%20de%20humedad.pdf)
- Gomez-Lizarraga, K., Piña-Barba, C., & Rodriguez-Fuentes, N. (2011). Obtención y caracterización de colágena tipo I a partir de tendón bovino. *Superficies y Vacío*, 24(4), 137–140.
- González, R. (2007). Colágeno-Hidroxiapatita Y De Una Muestra Compuesta Pead-Colágeno Colágeno-Hidroxiapatita Y De Una Muestra Compuesta Pead-Colágeno, 83.
- Guadalupe, M., Cristina, A., & Amezcua-vega, J. G. (2015). Extracción de colágeno a partir de pieles de tilapia. *Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias*, 2(4), 631–639.
- Huey-Jine Chai, & Chwen-Herng Wu. (2005). Collagen of fish scale and method of making thereof. *Fisheries Research Institute*, 1(19).
- LabPlant. (n.d.). SD Basic Spray Dryer. Retrieved from <https://www.labplant.co.uk/spray-dryer-sd-basic.html>

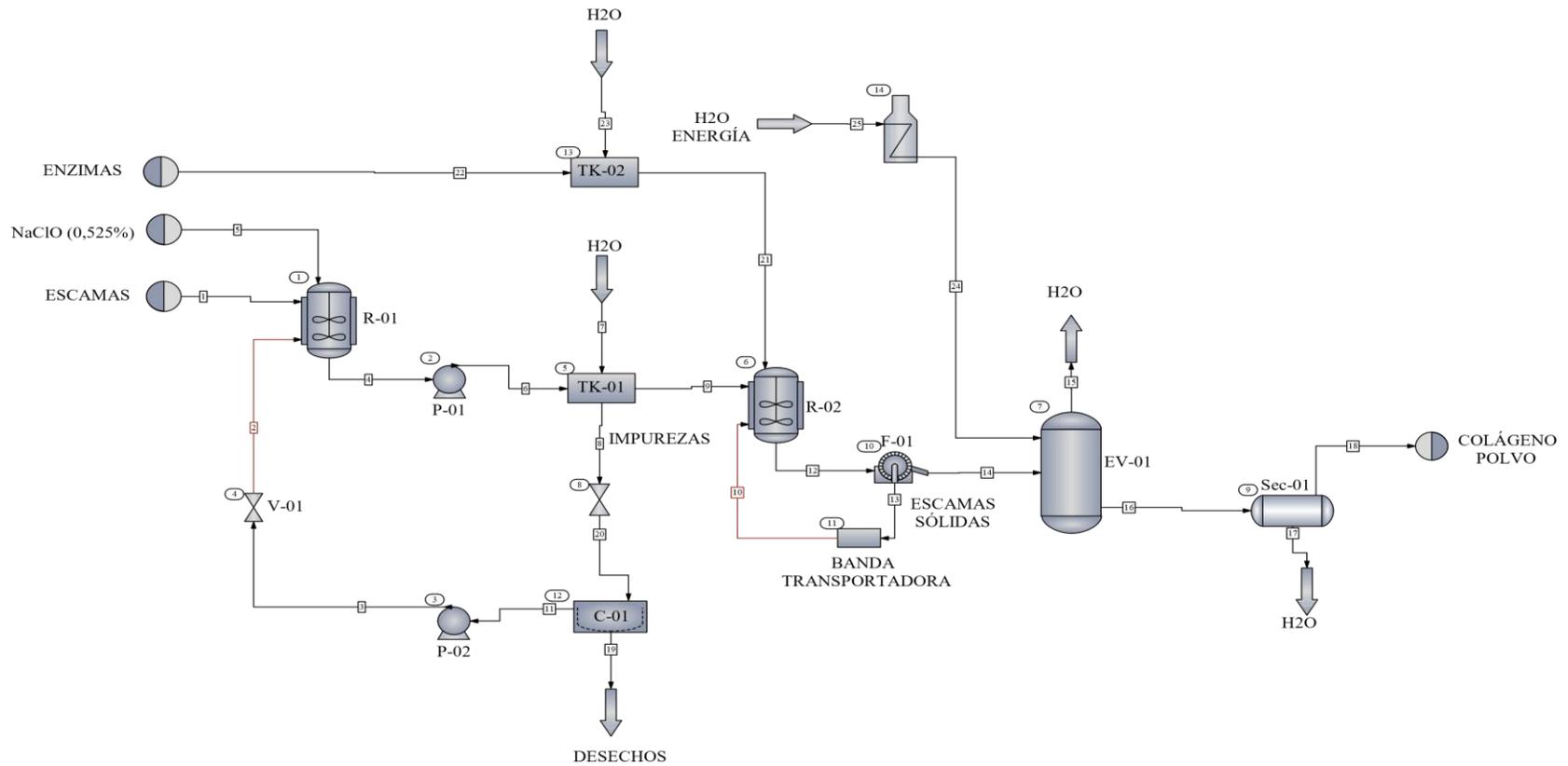
- Lorena Azevedo Lima; Raimundo Felipe Cruz Filho; Januário Gama dos Santos; Wilson Castro Silva. (2014). Production of collagenolytic protease by *Bacillus stearothermophilus* from an Amazonian soil. *Scielo Analytics*. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/1809-4392201305074>
- Meneses, F. (2013). Proyecto de inversion de tilapia, estudio realizado en la provincia de pastaza ecuador.
- Mondragón, R., Julia, J. E., Barba, A., & Jarque, J. C. (2013). Cerámica y Vidrio El proceso de secado por atomización : formación de gránulos y cinética de secado de gotas, 52, 159–168. <https://doi.org/10.3989/cyv.212013>
- Quiminet. (2011). Usos y aplicaciones del Hipoclorito de sodio. Retrieved from <https://www.quiminet.com/articulos/usos-y-aplicaciones-del-hipoclorito-de-sodio-2555821.htm>
- Ramirez, C. A., Delgado, E., & Andrade, A. (2016). sal de fenol C uantificación de proteína total en escamas de t ilapia y p argo mediante sal de fenol, (October).
- Ramírez, R. M. (n.d.). Peces: Características, tipos de pez, especies y mucho más. Retrieved from <http://hablemosdepeces.com/>
- Rolle, R. (2007). Buenas prácticas para la producción en pequeña escala de agua de coco embotellada. *Recursos y Materiales de Capacitación En Tecnología Agrícola y Alimentaria*.
- Sampedro, G. (1977). Fabricación de hidrolizados de proteína de pescado.
- Serrano Gaona, J. C. (2011). Estandarización de un proceso de extracción de colágeno a partir de los residuos de fileteo de tilapia (*Oreochromis* sp) y cachama (*Piaractus brachypomus*) / Standardization of a process for extracting collagen from filleting waste from tilapia (*Oreochromis*, 85. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/4880/>
- SINAGAP. (2017). Información estadística agroecuatoriana. Retrieved from <http://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/importaciones-y-exportaciones-bce>
- Torres-Arreola, W.; Pacheco-Aguilar, R.; Sotelo-Mundo, R .R.; Rouzaud-Sández, O.; Ezquerria-Brauer, J. M. (2008). Caracterización parcial del colágeno extraído a partir del manto, aleta y tentáculos de calamar gigante. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 6.
- Walter E. Farr and Andrew Proctor. (2013). *Green Vegetable Oil Processing* (Vol. First Edit).

ANEXOS

ANEXO A

Diagrama PFD del proceso para la obtención de colágeno en polvo

R-01 Reactor	TK-01 Tanque	C-01 Centrífuga	F-01 Filtro Prensa	Ev-01 Evaporador	Sec-01 Secador	P-01 Bomba	V-01 Válvula
-----------------	-----------------	--------------------	--------------------------	---------------------	-------------------	---------------	-----------------



ANEXO B

Especificaciones del secador por atomización

Scale Spray Dryer

A simple and effective laboratory scale spray dryer product research and development.

The SD-Basic spray dryer is designed to enable initial product trials and evaluation to be carried out quickly and efficiently. self-contained unit is supplied complete with glassware and accessories required for operation.



Two Fluid Nozzle

The stainless steel spray assembly consists of an inner tube for the liquid sample leading to a small diameter jet. An outer tube directs the supply of compressed air to the nozzle and close tolerance gap between the nozzle and the jet ensures a fine vaporized spray. The SD-Basic is supplied as standard 0.5mm jet, other sizes are available as accessories. The assembly incorporates a manual de-blocking device that the jet nozzle from becoming blocked



Controls and Functionality

The unit is designed so that all functions are simple to adjust, this ensures you quickly achieve the optimum for spray drying. A simple digital controller allows selection the inlet temperature and a rotary knob controls the pump speed. Another digital display shows the outlet temperature.



Construction

The chemically resistant powder coated housing includes blower, heater and the controls for inlet temperature and pump speed. The drying air volume is fixed at 70m³/hr. requires but is not supplied with an external compressor* çlamps and fittings are designed to allow assembly and of the glass components in only a matter of of the cabinet includes an inlet filter ensuring that does not include contaminants.



Applications

Spray drying can be used in a wide range of applications the production of a free-flowing powder sample is required. This technique has successfully processed materials in the following areas:

- Beverages • Flavours & Colourings
- Milk & Egg Products • Plant & Vegetable Extracts
- Pharmaceuticals • Heat Sensitive Materials
- Plastics • Polymers and Resins • Perfumes
- Ceramics & Advanced Materials
- Soaps & Detergents • Blood • Dyestuffs
- Foodstuffs • Adhesives • Oxides • Textiles
- Bones, Teeth & Tooth Amalgam and many others



Technique

A self-priming peristaltic pump delivers the liquid sample from a container through a small diameter jet into the main. At the same time compressed air* enters the outer tube of the jet which causes the liquid to merge as a fine atomised spray into the drying chamber. Heated air is blown through the main chamber evaporating the liquid content of the atomised spray.

The solid particles of the material, which are normally in a free flowing state, are then separated from the exhaust air flow by a cyclone and collected in the sample collection bottle. The exhaust airflow is directed through a flexible 50mm diameter hose direct to atmosphere or to an existing extraction system.

Specification

Suitability	Aqueous only
Type	2 Channel spray nozzle
Drying capacity	Maximum approximately 1000ml/h
Temperature range accuracy	40°C ~ 200°C (Temperature at inlet) ±1
Dried air volume range	0.2 ~ 0.65m ³ /min
Spray air pressure range	0.2 -2Bar
Feed pump volume range	60 ~ 2000ml/h
Heater	3kW
Feed pump	Variable speed peristaltic pump
Blower	Fixed @ 70m ³ /hr.
Maximum air pressure	70mbar
De-blocking interval timer	Manual
Noise (dB) @ 0.5m & 1m away	0.5m = 60.5 dB 1.0m = 58.7 dB
Overall dimensions	1200x 500 x 500mm
Weight	60Kg
Power requirement	AC 220/240V 50/60Hz 13A



Our new purpose built, office, workshop and warehouse facility in Hunmanby, North Yorkshire.

For further information, quotations or advice please contact us at:

Labplant UK, Unit 1b, Hunmanby Industrial Estate, Hunmanby, Nr Filey, North Yorkshire YO14 0PH
Tel: +44(0)1723 892262 Fax: +44(0)1723 890872 Email: sales@labplantuk.com www.labplantuk.com
Email: sales@laboratoryspraydryers.co.uk www.laboratoryspraydryers.co.uk



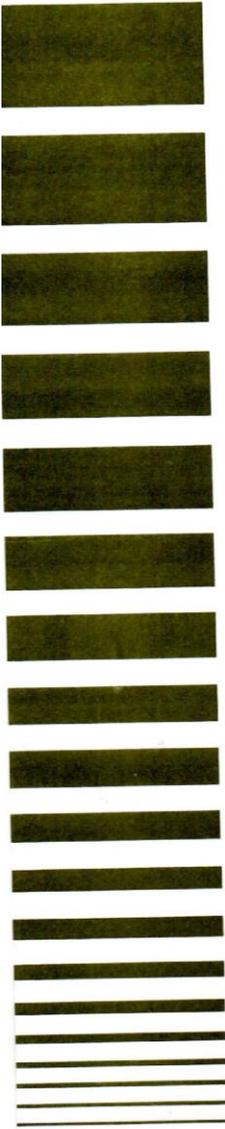
ANEXO C

Secador por atomización usado en el proceso de obtención de colágeno en polvo



ANEXO D

Ficha técnica de la enzima Proteasa Bacillus Subtilis



ENZYMES- POWDER

Genzyme Industrial Protease – P

DESCRIPTION

Genzyme Industrial Protease- P is a stabilized enzyme. The enzyme is derived from the fermentation of specially chosen strain of Bacillus subtilis. This product is characterized by its ability to hydrolyze peptide bonds at the C-terminal side of the hydrophobic L-amino acid. Typical applications include treatment of emulsion waste streams, silk degumming and general protein hydrolysis.

PROPERTIES

Form.....	Powder
Solubility.....	Appraciable
Odor.....	No gragance
Activity.....	2.5 Anson units per/gram

CHARACTERISTIC

Temperature	pH
Range: 20 C- 75 C	Range: 6.0 – 9.0
Optimumt 50C	Optimumt 6.5 – 8.0

Cdla. Cogra Km 3½ Carlos Julio Arosemena Galpón N° 2 • Telf.: 4622291 - 4622273 - 4622477
Cel.: 0998150779 • e-mail: ventas01@qualityec.com Guayaquil - Ecuador

ANEXO E

Pruebas preliminares realizadas para la obtención de rendimiento del colágeno

Rendimientos	Prueba 1% (2h)			Prueba 1% (3h)			Prueba 1% (4h)			Prueba 1% (5h)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	6,17%			4,17%			16,67%			30,17%		
	Prueba 2% (2h)			Prueba 2% (3h)			Prueba 2% (4h)			Prueba 2% (5h)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	27,20%			15,77%			24,63%			37,67%		
	Prueba 3% (2h)			Prueba 3% (3h)			Prueba 3%(4h)			Prueba 3% (5h)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	21,67%			32,67%			33,50%			38,83%		

Rendimientos en Base Seca	Prueba 1% (2h)			Prueba 1% (3h)			Prueba 1% (4h)			Prueba 1% (5h)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	6,59%			4,46%			17,83%			32,27%		
	Prueba 2% (2h)			Prueba 2% (3h)			Prueba 2% (4h)			Prueba 2% (5h)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	29,09%			16,87%			26,34%			40,29%		
	Prueba 3% (2h)			Prueba 3% (3h)			Prueba 3%(4h)			Prueba 3% (5h)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	23,17%			34,94%			35,83%			41,54%		

ANEXO F

Contenido de proteínas y aminoácidos del colágeno comercial

Información Nutricional (Frasco 310g)		
Tamaño de la porción	1 cucharada (10g)	
Porciones por envase	31	
Calorías por porción	38 Cal	
Proteína por porción	9.5g	
% valor diario		
Grasa total 0g	0%	
Grasa saturada 0g	0%	
Colesterol 0mg	0%	
Sodio 0mg	0%	
Carbohidratos totales 0g	0%	
Fibra dietética 0g	0%	
Azúcares 0g	0%	
Proteína* 9.5g	95.00%	
Aminoácidos constituyentes	Porción	100g
Alanina	0.78	7.8
Arginina*	0.83	8.3
Asparagina	0.54	5.4
Cisteína	0.00	0.0
Acido Glutámico	1.09	10.9
Glicina	1.89	18.9
Histidina*	0.12	1.2
Hidroxilisina	0.06	0.6
Hydroxiprolina	1.14	11.4
Isoleucina*	0.16	1.6
Leucina*	0.30	3.0
Lisina*	0.33	3.3
Metionina*	0.05	0.5
Fenilalanina*	0.21	2.1
Prolina	1.26	12.6
Serina	0.28	2.8
Treonina*	0.19	1.9
Tirosina	0.05	0.5
Triptofano*	0.00	0.0
Valina*	0.22	2.2

Los porcentajes de valores diarios están basados en una dieta de 2000 calorías.
*Una porción de VITAGEL aporta el 13 % de Proteínas para una Dieta de 2000 calorías.

ANEXO G

Contenido de proteínas del colágeno con concentración de enzima 3% y tiempo de hidrólisis 5 horas obtenido por estufa.



INFORME DE ENSAYOS

Fecha de Informe:	22/08/2018	Orden:	4970	Informe:	4517-18	Página:	1/2
INFORMACION DEL CLIENTE:							
Nombre:	GARCES BARCIA GONZALO HIRAN						
Dirección:	GARGOTA 2 MZ 137						
Teléfono:	0980991517	Fax:	--	E. Mail:	--		
DATOS DE LA MUESTRA:							
Tipo de Muestra:	Gelatinas y Preparaciones						
Nombre:	COLAGENO EN POLVO						
Descripción:	Colageno						
Lote:	--	Fecha de Elab.:	--	Fecha de Exp.:	--		
Contenido Declarado:	--	Cantidad Recibida:	2 (300g, 150g)	Condición:	Normales, envase de vidrio		
Fecha de Recepción:	14/08/2018	Cód. de Laboratorio:	GP-C-121-14-08-18	Forma de conservación:	Ambiente		
				Muestreo:	Realizado por el cliente		
RESULTADOS ANALISIS QUIMICOS							
Fecha de Análisis	15/08/2018 16/08/2018		Página R 38-5.10:	19066 / HPLC-1453			
Condiciones ambientales:			Temperatura	20°C - 30°C	Humedad Relativa: 45% - 65%		
Parámetros	Unidad	Resultados		Requisitos	Método de Referencia		
Proteínas (N x 6,25)	g/100g	91,86		--	AOAC 20TH 936.09 D		
Perfil de Aminoácidos^{aa}							
Acido Aspártico	g/100g	5,91		--	MMQ-HPLC-12		
Serina	g/100g	4,90		--	MMQ-HPLC-12		
Acido Glutámico	g/100g	10,42		--	MMQ-HPLC-12		
Histadina	g/100g	0,35		--	MMQ-HPLC-12		
Glicina	g/100g	18,98		--	MMQ-HPLC-12		
Arginina	g/100g	7,67		--	MMQ-HPLC-12		
Treonina	g/100g	0,96		--	MMQ-HPLC-12		
Alanina	g/100g	7,63		--	MMQ-HPLC-12		
Prolina	g/100g	12,35		--	MMQ-HPLC-12		
Cistina	g/100g	0,08		--	MMQ-HPLC-12		

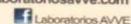
R02-5.10 Rev.02 29/06/18

Datos de Contacto:
 Dirección Laboratorio Matriz: Parque Industrial California 1, Calle Arg. Modesto Luque Rivadeneira,
 Edificio Comercial 3 Local 4 A Km. 11 1/2 vía a Daule,
 PBX. Matriz: (5934) 2103206 - Teléfonos Parque California 1: 2103017 / 2103026 ext. 235 Cel.: 0998078516

Dirección Laboratorio de Microbiología: Parque Industrial California 2, Bodega D44
 Km. 11 1/2 vía a Daule
 Teléfono: (5934) 2 103365 ext. 101, Teléfonos Parque California 2: 2 103199 ext. 443

E-mail: margot.aviles@laboratoriosavve.com
 cotizaciones.compras@laboratoriosavve.com
 paola.aviles@laboratoriosavve.com
 lorena.aviles@laboratoriosavve.com

www.laboratoriosavve.com



REV 08/09-11

INFORME DE ENSAYOS

Fecha de Informe:	22/08/2018	Orden:	4970	Informe:	4517-18	Página:	2/2
-------------------	------------	--------	------	----------	---------	---------	-----

Perfil de Aminoácidos**				
Tirosina	g/100g	0,08	--	MMQ-HPLC-12
Valina	g/100g	4,30	--	MMQ-HPLC-12
Metionina	g/100g	0,36	--	MMQ-HPLC-12
Lisina	g/100g	5,30	--	MMQ-HPLC-12
Isoleucina	g/100g	3,54	--	MMQ-HPLC-12
Leucina	g/100g	5,05	--	MMQ-HPLC-12
Fenilalanina	g/100g	3,98	--	MMQ-HPLC-12
		91,86		

OBSERVACIONES

Se podrán realizar modificaciones a este documento, hasta 6 meses después de su emisión, las mismas que deberán ser respaldadas, por un requerimiento de las autoridades de salud o por un sustento técnico válido, de acuerdo al criterio del laboratorio.

Estos resultados corresponden exclusivamente a la muestra analizada.

La contra muestra se almacena en el laboratorio por 1 mes

Prohibida su reproducción total o parcial, sin previa autorización de LABORATORIOS AVVE S.A.

Las observaciones y opiniones no se encuentran dentro del Alcance de Acreditación

Los registros generados por el análisis de la(s) muestra(s) son mantenidas en los archivos del laboratorio por 5 años

Válido solo el Informe Original

Dra. Margot Vélez de Avilés
Gerente Técnico & Calidad

REV 08/09-11

Datos de Contacto:
Dirección Laboratorio Matriz: Parque Industrial California 1, Calle Arq. Modesto Luque Rivadeneira, Edificio Comercial 3 Local 4 A Km.11 1/2 vía a Daule.
PBX Matriz: (5934) 2103206 . Teléfonos Parque California 1: 2103017/2103026 ext. 235 Cel.: 0998078518

Dirección Laboratorio de Microbiología: Parque Industrial California 2, Bodega D44 Km.11 1/2 vía a Daule.
Teléfono: (5934) 2 103365 ext. 101. Teléfonos Parque California 2: 2 103199 ext. 443

R02-5.10 Rev.02 29/06/18

E-mail: margot.aviles@laboratoriosavve.com
cotizaciones.compras@laboratoriosavve.com
paola.aviles@laboratoriosavve.com
lorena.aviles@laboratoriosavve.com

www.laboratoriosavve.com

Laboratorios AVE

ANEXO H

Contenido de proteínas y lectura de aminoácidos del colágeno con concentración de enzima 3% y tiempo de hidrólisis 5 horas obtenido mediante secador por atomización.



Escuela Superior Politécnica del Litoral
Laboratorio PROTAL - ESPOL



Informe: 18-08/0063-M001

GCR -4.1-01-00-03

Datos del cliente

Nombre: CORDERO ZAMBRANO KATHERINE CHABELI	Teléfono: 0992828208
Dirección: KM 1.7 VIA SAMBORONDON	

Identificación de la muestra / etiqueta

Nombre: COLÁGENO	Código muestra: 18-08/0063-M001
Marca comercial: S/M	Lote: N/A
Referencia: VARIOS	Fecha elaboración: 08/08/2018
Envase: VIDRIO CON TAPA ROSCA NEGRA	Fecha expiración: N/A
Conservación de la muestra: Refrigeración 0°C - 4 °C	Fecha recepción: 09/08/2018
Fecha análisis: 09/08/2018	Vida útil: N/A
Contenido neto declarado: N/A	
Contenido neto encontrado: N/A	
Presentaciones: N/A	
Condiciones climáticas del ensayo: Temperatura 22.5 °C ± 2.5 °C Y Humedad Relativa 55% ± 15%	

Análisis Físico - Químicos

Ensayos realizados	Unidad	Resultado	Requisitos	Métodos/Ref.
Proteínas *	%	93.65	---	AOAC 20TH 920.87 (API-5.8-04-01-00B20) *

Los resultados emitidos corresponden exclusivamente a la muestra proporcionada por el cliente.

Las opiniones / interpretaciones / etc. que se indican a continuación, están FUERA del alcance de acreditación del SAE.

* Observaciones:

Se analizó el parámetro solicitado por el cliente.

Los resultados bromatológicos se encuentran registrados en el Cuaderno Interno de Trabajo de Varios N° 23 página 2335.

Los ensayos marcados con (*) NO están incluidos en el alcance de la acreditación del SAE.

^ Representa el Exponente

* Subcontratado

En microbiología los valores expresados como < 1.8, < 2, < 3, y < 10 se estiman ausencia

Guayaquil, 22 de Agosto del 2018.


Dra. Gloria Bujaña de Pacheco
Directora General y Gerente Técnico

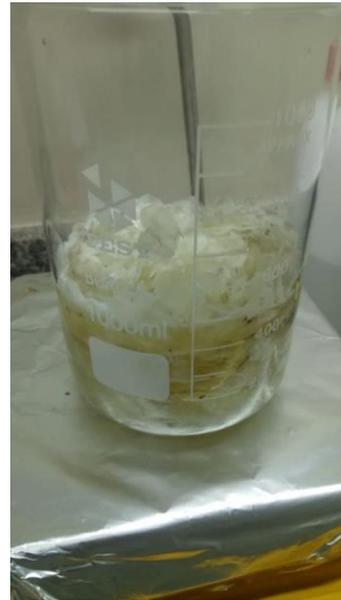

Ing. María Feresá Amador
Gerente de Calidad

ANEXO I

Imágenes del proceso de obtención del colágeno en polvo



Muestras de escamas



Desinfección



Hidrólisis enzimática



Evaporación



Colágeno líquido



Secador por atomización



Colágeno en polvo



Colágeno en polvo de 12 muestras



1. Colágeno obtenido
2. Colágeno comercial