

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GELATINA DE PIEL DE MERLUZA EXTRAÍDA DEL GOLFO SAN JORGE

OBTENTION AND CHARACTERIZATION OF GELATIN FROM HAKE SKIN EXTRACTED FROM THE SAN JORGE GULF

María Cecilia Tiedemann¹, Cecilia Crovetto² Adelaida Ávila¹, Marisa Martinelli³.

¹Departamento Química, Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Ruta 1 s/n, Km 4, CP 9000, Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina.

²Departamento Bioquímica, Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Ruta 1 s/n, Km 4, CP 9000, Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina.

³Laboratorio de Materiales Poliméricos (LaMaP). Dpto. de Química Orgánica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos y Química Aplicada (IPQA). CONICET. Córdoba, Argentina.

mc_tiede@yahoo.com.ar

Resumen

La utilización de subproductos de la pesca para la obtención de gelatina ha ganado interés como alternativa a la gelatina de mamíferos. El objetivo de este trabajo fue optimizar el método de extracción y caracterizar la gelatina obtenida a partir de piel de merluza común (*Merluccius hubbsi*) extraída del Golfo San Jorge. La metodología empleada para la obtención de la gelatina fue optimizada utilizando un diseño factorial replicado 2³ con un punto central empleando el programa Minitab19. Asimismo, se estudió el efecto de la concentración de hidróxido de sodio, temperatura y tiempo de extracción sobre la variable de respuesta (rendimiento). Los rendimientos encontrados en esta experiencia varían en el rango de 11 a 22 % demostrándose que las variables tiempo, temperatura y concentración de NaOH utilizadas afectan el rendimiento de gelatina obtenida. Una vez encontrada las condiciones óptimas para la obtención de la gelatina que son: pretratamiento químico con NaOH 0,1M y tratamiento térmico a 60°C durante 150 minutos, con un rendimiento máximo de 21,74 %, se procedió a caracterizarla mediante distintas metodologías: espectroscopia FTIR, dicroísmo circular, determinación de punto isoeléctrico, punto de fusión, composición de aminoácidos mediante HPLC y su distribución de masas molares por electroforesis en gel de poliacrilamida. La gelatina obtenida presenta un punto isoeléctrico de 4,6, un punto de fusión de 17,5±0,7°C y masa molar con bandas definidas (202 KDa, 154KDa y 98 KDa). Los tres aminoácidos predominantes son glicina, prolina e hidroxiprolina, y la estructura secundaria predominante a 45°C es la *random coil*.

Palabras clave: caracterización- diseño factorial-gelatina- merluza-piel.

Abstract

The use of fishery by-products to obtain gelatin has gained interest as an alternative to mammalian gelatin. The objective of this work was to optimize the extraction method and to characterize the gelatin obtained from common hake (*Merluccius hubbsi*) skin extracted from the San Jorge Gulf. The methodology used to obtain the gelatin was optimized using a replicated factorial design with a central point using the Minitab19 program. The effect of sodium hydroxide concentration, temperature and extraction time on the response variable (yield) was also studied. The yields found in this experience varied in the range of 11 to 22 %, demonstrating that the variables time, temperature and NaOH concentration used affect the gelatin yield obtained. Once the optimal conditions for obtaining gelatin were found, which are: chemical pretreatment with NaOH 0.1M and heat treatment at 60 ° for 150 minutes, with a maximum yield of 21,74%, it was characterized by means of different methodologies: FTIR spectroscopy, circular dichroism, determination of isoelectric point, melting point, amino acid composition by HPLC and its molar mass distribution by electrophoresis in polyacrylamide gel. The gelatin obtained has an isoelectric point of 4.6, a melting point of $17.5 \pm 0.7^\circ\text{C}$ and molar mass with defined bands (202 KDa, 154KDa and 98 KDa). The three predominant amino acids are glycine, proline and hydroxyproline, and the predominant secondary structure at 45°C is *random coil*.

Keywords: characterization- factorial design-gelatin- skin hake.

Introducción

La gelatina o colágeno hidrolizado, se obtiene de un pretratamiento químico con posterior tratamiento térmico del colágeno proveniente de subproductos de animales como piel de cerdo (46 %), pieles de bovinos (29 %), huesos (23 %) y otras fuentes (Mano *et al.*, 2014). En la actualidad, se buscan nuevas fuentes para la extracción de gelatina como la piel de pescado. Las fuentes alternativas de gelatina, presentan ciertas ventajas frente a las obtenidas de mamíferos, debido a que

no están asociadas con la transmisión de enfermedades como la encefalopatía esponjiforme bovina o la fiebre aftosa, así como también no posee restricciones culturales o religiosas (el judaísmo y el islam prohíben el consumo de productos provenientes del cerdo, mientras que los hindúes del ganado bovino). Por otro lado, el aprovechamiento de subproductos de la pesca que actualmente son descartados reduciría la contaminación ambiental, permitiendo aprovechar un recurso renovable rico en colágeno. Después de

fileteado, alrededor del 30 % del pescado correspondiente a huesos y piel que tienen un alto contenido en colágeno, son eliminados (Gómez-Guillen *et al.*, 2002). La piel de pescado representa entre el 4.5 y 10 % del peso corporal del pez, siendo un recurso cuantitativamente significativo (Souza *et al.*, 2004).

El proceso de extracción de la gelatina consiste en convertir el colágeno insoluble en gelatina soluble. El pretratamiento químico, rompe los enlaces no covalentes desorganizando la estructura, permitiendo así el hinchamiento y posterior solubilización del mismo (Stainsby, 1987). El posterior tratamiento térmico, modifica los enlaces covalentes y puentes de hidrógeno que desestabilizan la triple hélice, lo que origina el desenredo de la cadena (la hélice cambia a la forma espiral) y la disociación de las cadenas polipeptídicas en componentes más pequeños, produciendo la conversión del colágeno insoluble a gelatina soluble de forma irreversible (Gómez-Guillen *et al.*, 2002).

Existen diversas metodologías de extracción consecuencia de la diversidad de fuentes a partir de las cuales se puede obtener gelatina (Karim *et al.*, 2009). Dependiendo del pretratamiento empleado, se pueden obtener dos gelatinas comerciales: Gelatina tipo A (punto isoeléctrico 8-9, procedente de la piel de

cerdo) y gelatina tipo B (punto isoeléctrico 4-5, derivada de piel de bovino). La aplicación del tipo de pretratamiento químico dependerá del grado de reticulación del colágeno en la materia prima (Gómez Guillen *et al.*, 2011). Entre los factores que influyen sobre el rendimiento de extracción del colágeno se puede mencionar el tipo de especie empleada, el acondicionamiento previo a la extracción (concentración de ácido o álcali) y las condiciones de extracción empleadas (tiempo y temperaturas) (Karim *et al.*, 2009).

En el presente trabajo, se optimizó el método de extracción y se caracterizó la gelatina obtenida a partir de piel de merluza común (*Merluccius hubbsi*) extraída del Golfo San Jorge. Para optimizar el proceso de extracción, con el objetivo de alcanzar los mejores rendimientos en la obtención de gelatina a partir de piel de merluza, se propuso el empleo del diseño de experimentos (DOE). Esta metodología representa una herramienta que permite investigar los efectos de las variables de entrada (factores) sobre una variable de salida (respuesta) al mismo tiempo. Estos experimentos consisten en una serie de pruebas en las que se realizan cambios intencionales en las variables de entrada. El DOE se emplea para identificar las condiciones del proceso que afectan la

variable de salida, para posteriormente determinar la configuración de factores que optimiza el resultado (Gutiérrez Pulido *et al.*, 2008).

Materiales y métodos

Muestras: Para la obtención de gelatina se emplearon pieles de merluza común (*Merluccius hubbsi*) del Golfo San Jorge, obtenidas de pesqueras de la zona inmediatamente después del fileteado. Posteriormente se procedió a la limpieza (separación del tejido muscular) y descamación manual. Finalmente, las pieles fueron almacenadas a -18°C hasta su procesamiento.

Extracción de la gelatina: Las pieles (100 g) se lavaron con agua potable y se cortaron en cuadrados de 1cm² aproximadamente, se sometieron a un pretratamiento con NaOH 0,05, 0,1 o 0,15 M según el número de experimento, en una relación piel: solución 1:3 (p/v) a 10°C por 48 horas. Posteriormente, se lavaron con agua destilada y se neutralizaron con

HCl 0,05N. En la etapa de extracción, se colocó piel en agua destilada en una relación piel: solución 1:4 (p/v) y se agitó en forma constante a 50, 60 o 70 °C durante 60, 120 o 240 minutos según el número de experimento. Posteriormente, se filtró y la solución se congeló por 24 horas. El agua excedente se separó por descongelado a 20 °C y se filtró nuevamente. Las soluciones de gelatina fueron colocadas en placas de Petri y se secaron a 30 °C por 48 horas. (Miano *et al.*, 2014).

Las películas de gelatina secas fueron molidas con molinillo. La gelatina en partículas, fue pesada y conservada en frascos de vidrio y almacenada para su posterior análisis.

El rendimiento de la gelatina extraída, se determinó teniendo en cuenta la masa de gelatina en polvo obtenida por cada 100 g de piel húmeda, el resultado fue expresado en porcentaje de acuerdo a la siguiente fórmula (Binsi *et al.*, 2009):

$$\text{Rendimiento de gelatina (\%)} = \frac{\text{masa de gelatina en polvo (g)}}{\text{masa de piel húmeda (g)}} \times 100$$

Diseño experimental: Se estudió la influencia de la concentración de NaOH, el tiempo y la temperatura sobre la variable de respuesta (rendimiento), estableciéndose dos niveles para cada

factor. Se empleó un diseño factorial replicado 2³ con un punto central. En este tipo de diseño, el comportamiento de la respuesta Y puede describirse mediante el modelo de efectos dado por:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_{12} + \beta_{13} X_{13} + \beta_{23} X_{23} + \beta_{123} X_{123} + \varepsilon$$

Dónde ε es el error aleatorio; β_1 , β_2 y β_3 representan el coeficiente de los factores concentración de NaOH ([NaOH]), tiempo (t) y temperatura (T); β_{12} , β_{13} y β_{23} representan los coeficientes de las interacciones [NaOH]*T, [NaOH]*t y T*t; β_{123} es la interacción de los tres factores [NaOH]*t* T. Para realizar el DOE y analizar los resultados se utilizó el programa Minitab19.

Caracterización de la gelatina: La gelatina en polvo obtenida con el tratamiento que presentó mayor rendimiento (pretratamiento químico con NaOH 0,1M y tratamiento térmico a 60°C durante 150 minutos) fue caracterizada usando distintas metodologías:

Espectroscopia infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR): Se utilizó FTIR para caracterizar los grupos funcionales. Los espectros se registraron utilizando un Microscopio Infrarrojo Nicolet iN10 Thermo Scientific. Los interferogramas de Reflectancia Total Atenuada por Transformada de Fourier (ATR-FTIR) fueron adquiridos utilizando el accesorio multi bounce con cristal ZnSe empleando un equipo iZ10 acoplado al microscopio IR.

Determinación del punto isoelectrico (pI): Para la determinación del pI de la gelatina se prepararon 50 ml de una

solución acuosa 0,5% p/v y se le añadieron dos gotas de NaOH 0,5 M. Luego de agitar hasta su total disolución se midió el pH. Se completó una bureta de 25 ml con ácido acético 0,5 M y se midió el pH de la solución cada 0,1 ml de ácido agregado hasta la aparición de turbidez. Se graficó el pH en función del volumen de ácido acético añadido. La primera derivada del gráfico obtenido, corresponde al punto isoelectrico de la gelatina (mínimo o máximo).

Determinación del punto de fusión: El punto de fusión se determinó de acuerdo con la metodología descrita por Choi *et al.*, 2000. Se preparó una solución de gelatina con una concentración de 6,67% (p/v), y se transfirieron alícuotas de 5 ml a tubos de ensayo. Los tubos fueron calentados a baño María a 60°C por 15 minutos, seguidamente fueron enfriados en baño de hielo y madurados a 10 °C por 16 a 18 horas. Luego, se adicionaron cinco gotas de una mezcla de 75% de cloroformo y 25% del colorante violeta de metilo sobre el gel. Posteriormente, el gel fue colocado en baño termostático a 10 °C y calentado a 1°C por minuto. El punto de fusión se determinó en el momento en que las gotas coloreadas empezaron a moverse hacia el interior del gel.

Distribución de masas molares por electroforesis en gel de poliacrilamida:

El análisis de la distribución de masa molares, se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Se trabajó con la técnica de geles discontinuos, en la cual se usaron dos tipos de geles. El primero llamado de siembra, estaqueo o *stacking*, gel de baja concentración (4%) de poro grande, preparado en *buffer* Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, permitiendo que la muestra se concentre y llegue al segundo gel llamado separador, corrida o *running* preparado con *buffer* Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8.

El SDS-PAGE se realizó por el método de Schagger y Von Jagow, 1987, en un equipo Mini-Protean IV de Bio Rad. La concentración del monómero fue de 10% (p/v) en el gel de corrida. Se utilizó un marcador de peso molecular *Broad Range* de BioRad (5 µl). Se sembraron 20 µL de una solución de gelatina de concentración 0,1%. La electroforesis se realizó a 40 V hasta concentrar muestra, luego a 60 V por 10 min, y luego a 100 V hasta completar la corrida. Una vez concluida la electroforesis, se analizó el gel por coloración con *coomasie blue* y plata.

Dicroísmo circular: Los análisis por dicroísmo circular se realizaron a 45°C en una celda conectada a un baño de agua con control termostático y sometida a flujo de nitrógeno en un espectropolarímetro Jasco

J-810. Se registraron espectros en un intervalo de longitudes de onda entre 190-250 nm en una celda rectangular con paso óptico de 1 cm. Los espectros obtenidos fueron el promedio de tres *scanner* con un ancho de banda de 1 nm y fueron reportados en términos de elipticidad [q]. La concentración empleada para la gelatina B (GB) fue de 10 mg/l y la de gelatina de pescado (GP) de 7 mg/l.

Composición de aminoácidos por HPLC: Se realizó la determinación del contenido en aminoácidos presentes en la muestra por cromatografía líquida de alta performance con detección UV con arreglo de diodos (HPLC-PDA) previa hidrólisis y derivatización química de los aminoácidos (Marino *et al.*, 2017).

La identificación y cuantificación de cada aminoácido se realizó usando patrones puros y soluciones de origen comercial. Cisteína y triptófano no se determinaron por ser estos degradados en el proceso de hidrólisis.

Bajo las condiciones de ensayo, la resolución cromatografía de valina y metionina no es lo suficiente como para la determinación individual, por tal motivo se informan como la sumatoria de ambos aminoácidos.

Los resultados se informan como porcentaje de cada aminoácido sobre el total de aminoácidos determinados.

Resultados y discusión:

En el presente trabajo, se estudió la influencia de las variables tiempo, temperatura y concentración de NaOH empleadas en la extracción de la gelatina sobre la variable de respuesta (rendimiento). El análisis estadístico (ANOVA) del diseño experimental permite evaluar los efectos de los factores sobre la variable de respuesta. Los efectos son estadísticamente significativos cuando sus valores *p* en la tabla de coeficientes codificados son menores al nivel de significancia (α). Si se toma un nivel de confianza de 95%, por lo tanto, un nivel de significancia (α) predeterminado de 0,05, se observa que todos los efectos principales (concentración de NaOH, temperatura y tiempo) son significativos.

A partir de los valores de F (Tabla I), se observa que el efecto principal más significativo es la temperatura empleada en la extracción, seguido del tiempo. La combinación tiempo-temperatura es el efecto de interacción para dos factores más significativos, seguido de la interacción tiempo- concentración. En la Figura 1 se representa el diagrama de Pareto, empleado para evaluar el efecto de la concentración de NaOH, tiempo y temperatura utilizadas en la extracción sobre el rendimiento. Se observa que los efectos tiempo*temperatura, temperatura, tiempo*concentración de NaOH, tiempo y concentración de NaOH son significativos dado que se extienden más allá de la línea de referencia.

Tabla I: Análisis de Varianza.
Table I: Analysis of Variance.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	202,027	25,2533	24,06	0,000
Lineal	3	53,186	17,7286	16,89	0,000
t	1	16,322	16,3216	15,55	0,003
T	1	29,052	29,0521	27,68	0,001
C	1	7,812	7,8120	7,44	0,023
Interacciones de 2 términos	3	116,753	38,9176	37,08	0,000
t*T	1	83,631	83,6310	79,68	0,000
t*C	1	28,837	28,8369	27,47	0,001
T*C	1	4,285	4,2849	4,08	0,074
Interacciones de 3 términos	1	0,970	0,9702	0,92	0,361
t*T*C	1	0,970	0,9702	0,92	0,361
Curvatura	1	31,118	31,1178	29,65	0,000
Error	9	9,447	1,0496		
Total	17	211,473			

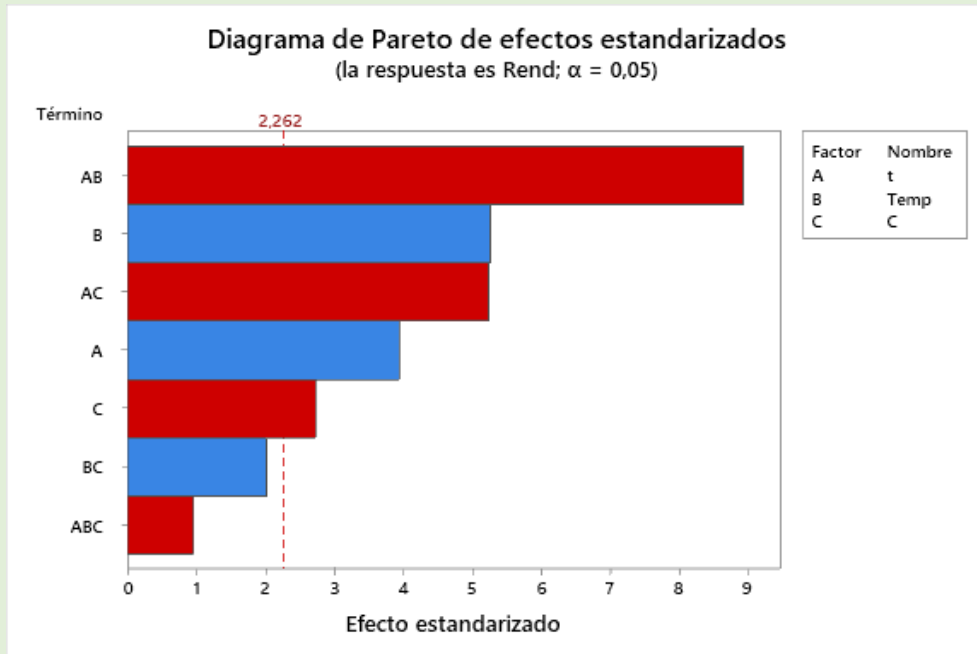


Figura 1: Diagrama de Pareto de efectos estandarizados.
Figure 1: Pareto diagram of standardized effects.

En las gráficas de interacción (Figura 2) se representa en el eje vertical la variable de respuesta y en el eje horizontal los factores con sus diferentes niveles. Cuando existe interacción las líneas obtenidas tienen una pendiente muy diferente, y si no existe interacción las líneas tienen pendientes similares, que son aproximadamente paralelas. Se observa, en dichas gráficas, el efecto importante en el rendimiento que

posee la interacción tiempo*temperatura, y tiempo*concentración de NaOH. El tratamiento con tiempos y temperaturas más altas de extracción, produce mayor desnaturalización de la proteína disminuyendo el rendimiento. Un comportamiento similar ocurre al emplear altas concentraciones de NaOH en el pretratamiento y utilizar tiempos de extracción más largos.

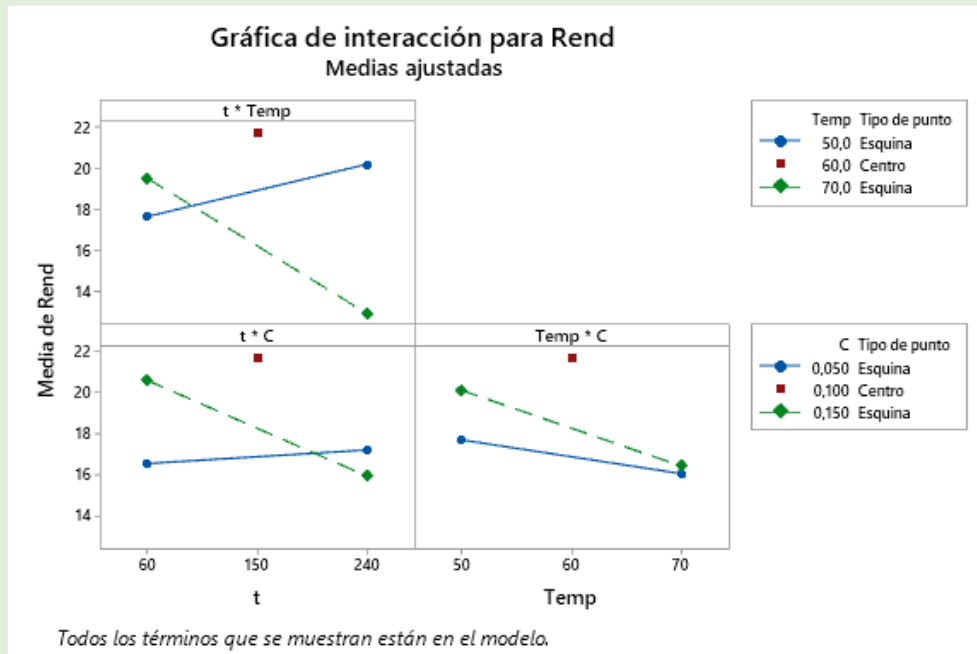


Figura 2: Gráfica de efectos de interacción para el rendimiento.
Figura 2: Graph of interaction effects for performance.

Los diseños factoriales 2^k con puntos centrales, permite detectar la presencia de curvatura en el comportamiento de la variable de respuesta y hacer un análisis más detallado de los factores, ya que al detectar la curvatura permite ajustar el error en la predicción de nuevas observaciones. Por otro lado, aporta grados de libertad para desarrollar un ANOVA con diseños no replicados. En las gráficas de efectos principales (Figura 3), se representa en el eje horizontal los niveles de cada factor y en el eje vertical

la media de la respuesta observada en los correspondientes niveles. Puede observarse, que el punto central se encuentra fuera de la recta, indicando una curvatura significativa. El comportamiento de la variable de respuesta deja de tener un comportamiento lineal, por lo que el componente cuadrático es significativo. Por lo tanto, debería usarse un diseño de composición central para ajustar el modelo (Gutiérrez Pulido *et al.*, 2008).

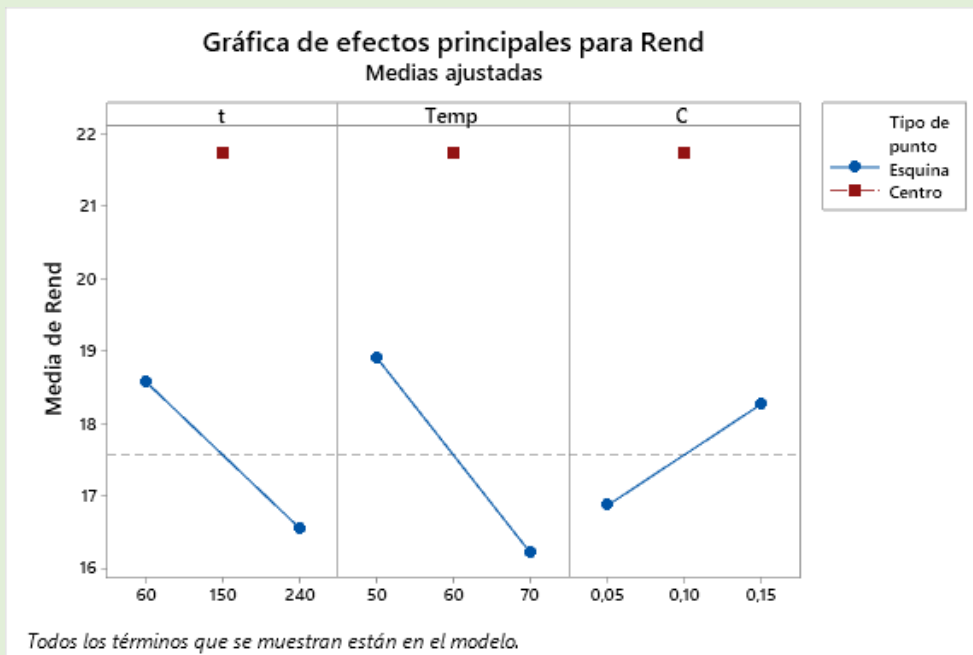


Figura 3: Gráfica de efectos principales para el rendimiento.

Figure 3: Main effects graph for performance.

Puede observarse en la gráfica de cubos (Figura 4) que el rendimiento promedio más alto (21,74 %) se obtuvo empleando las condiciones del punto central (pretratamiento químico con NaOH 0,1M y tratamiento térmico a 60°C durante 150 minutos). Se caracterizó la gelatina obtenida empleando dichas condiciones. Por el contrario, se aprecia en la misma

gráfica, que al emplear las condiciones extremas (pretratamiento químico con NaOH 0,15M y tratamiento térmico a 70°C durante 240 minutos) se obtiene el rendimiento más bajo, la mitad que el obtenido utilizando las condiciones del punto central. La disminución en el rendimiento, puede deberse a la menor estabilidad térmica de la gelatina de piel de merluza como consecuencia del menor contenido en prolina e hidroxiprolina.

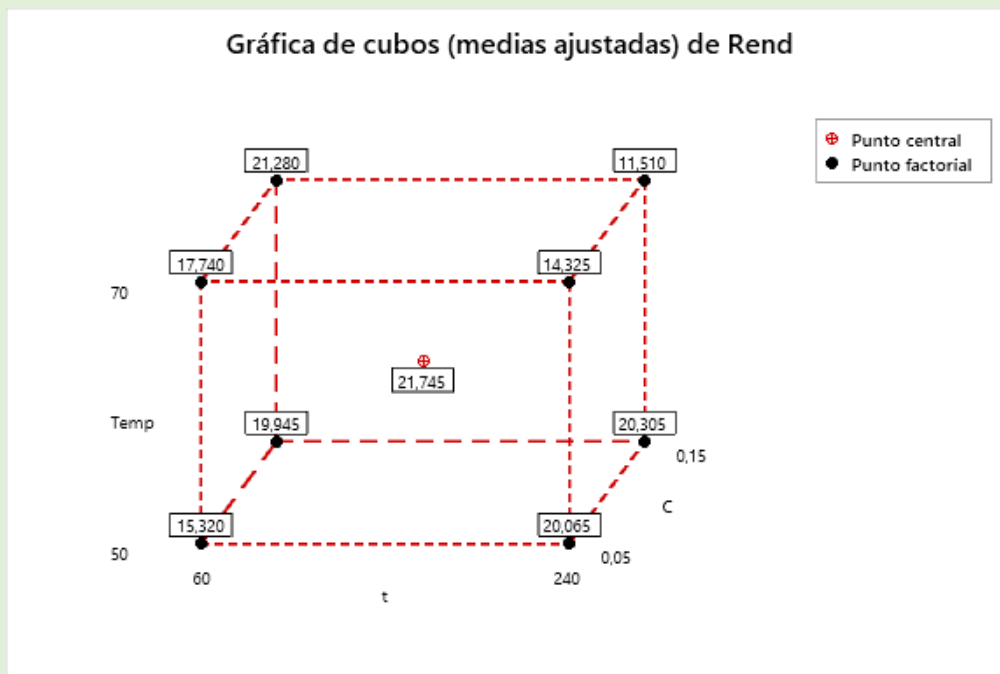


Figura 4: Gráfica de cubos para el rendimiento (medias ajustadas).

Figure 4: Cube plot for performance (adjusted means).

Los diferentes procedimientos ensayados en el proceso de optimización para la obtención de gelatina de pescado a partir de la piel de merluza, permitieron alcanzar rendimientos que oscilan entre 11 a 22 % demostrándose que las variables tiempo, temperatura y concentración de NaOH utilizadas afectan el rendimiento de gelatina obtenida. Gómez-Guillén *et al.*, 2011, obtuvieron menores rendimientos (6,5%) en la extracción de gelatina a partir de piel de merluza empleando ácido acético 0,05M en el pretratamiento químico y menores temperaturas (40°C) durante el tratamiento térmico. Esto demuestra, que la concentración y tipo de agente empleado en el pretratamiento químico, así como la temperatura utilizada en el tratamiento térmico, son variables

importantes que afectan el rendimiento en la extracción de la gelatina. Martínez *et al.*, 2011 y Irwandi *et al.*, 2009 reportaron rendimientos de gelatina que van de un mínimo de 5,51% a partir de trucha a un máximo de 68,47% a partir de kerapu. Es evidente que, el rendimiento en la obtención de gelatina no sólo depende del método de extracción utilizado y las condiciones específicas empleadas; sino también, de las propiedades intrínsecas de cada especie (Rahman *et al.*, 2009).

Las diferentes especies poseen un contenido en colágeno diferente en la composición de la piel (Gómez Guillen *et al.*, 2002). Takahashi & Yokoyama (1954) indicaron que, el colágeno derivado de peces de aguas frías posee menor contenido en hidroxiprolina y muestra menor estabilidad térmica que el colágeno

obtenido de especies que viven en ambientes cálidos. Esto se debe a que la hidroxiprolina forma enlaces puente hidrógeno intercatenarios estabilizando la estructura. Esto llevaría a un menor rendimiento en el proceso de extracción de gelatina a partir de piel de peces de agua fría como es la piel de merluza común del Golfo San Jorge. Este hecho se observa en las gráficas de interacción tiempo-temperatura (Figura 1) donde se observan como disminuye el rendimiento al aumentar la temperatura y tiempo de extracción. Lo contrario ocurre con la menor temperatura empleada (50 ° C) donde al aumentar el tiempo de extracción aumenta el rendimiento.

Estudios realizados en la optimización de la extracción de gelatina a partir de pieles de bacalao (Gudmundsson *et al.*, 1997) demostraron que los agentes usados para la extracción de gelatina afectan directamente el rendimiento y calidad de la gelatina obtenida. Los autores reportaron que, al utilizar concentraciones altas de ácidos y base (concentración de H₂SO₄ e NaOH > 0,2% p/v), obtenían gelatinas de baja calidad (menor viscosidad y fuerza de gel) y menores rendimientos. Esto se debe a que la capacidad de formación de gel de gelatina

es sensible a la hidrólisis ácida y alcalina, puesto que ambas afectan la reticulación del colágeno (Johnston-Banks, 1990). Esto explicaría los bajos rendimientos obtenidos cuando se utilizó la concentración 0,15 M de NaOH.

Los espectros IR de la gelatina de pescado y gelatina tipo B se muestran en la Figura 5. Puede apreciarse que el patrón de bandas de ambos espectros es semejante y coincide con el correspondiente a la gelatina (Muyonga *et al.*, 2004). En la figura se destacan las bandas características de la gelatina, las cuales corresponden a la de un polipéptido. De este modo, se observa la banda amida I aproximadamente a 1600 cm⁻¹, debida al estiramiento del grupo C=O; amida II alrededor de 1500 cm⁻¹, consecuencia del estiramiento C-N y vibración de deformación N-H; amida III alrededor de 1200 cm⁻¹ representando a los modos de vibración de deformación del grupo N-H y estiramiento del grupo C-N fuera del plano; y una banda ancha entre 3300-3600 cm⁻¹, correspondiente a la vibración del enlace N-H de los grupos amino, superpuesta con la vibración O-H de los grupos hidroxilo del agua, que interaccionan con los grupos amino de la gelatina (enlace hidrógeno).

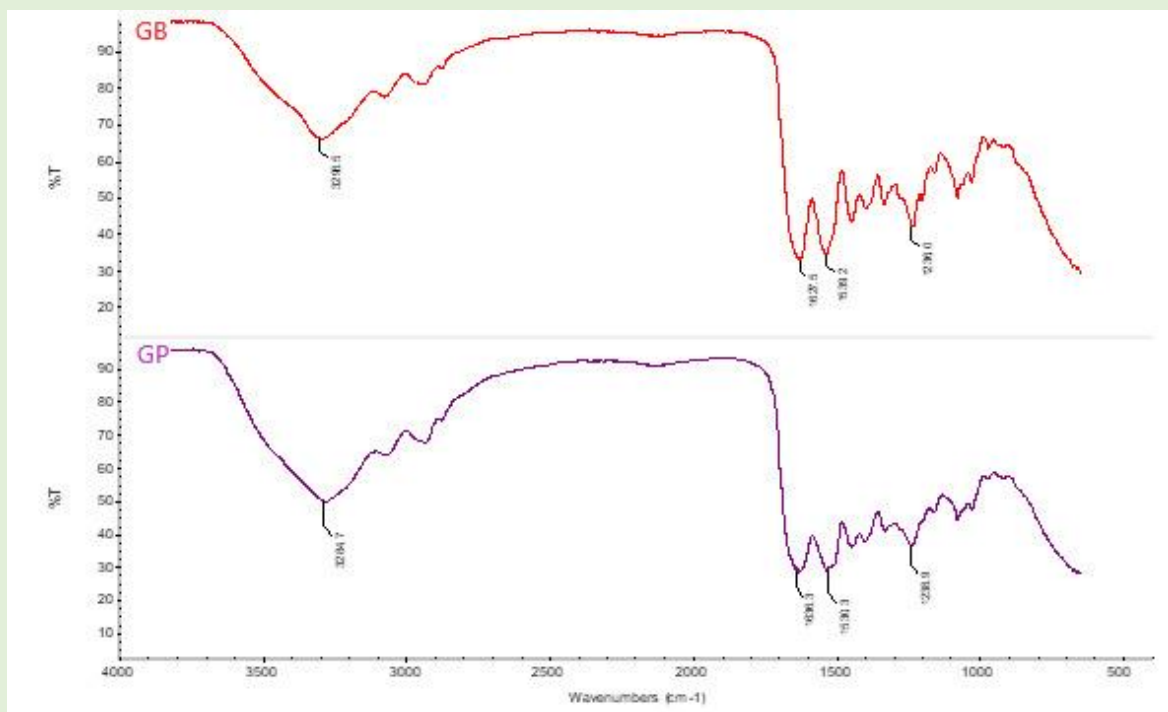


Figura 5: Espectro IR de la gelatina de pescado (GP) y la gelatina tipo B (GB).

Figure 5: IR spectra of fish gelatin (GP) and type B gelatin (GB).

La gelatina está compuesta de proteínas solubles obtenidas de un pretratamiento químico (Johnston-Banks, 1990) con posterior tratamiento térmico (Poppe, 1992) del colágeno proveniente de subproductos generados en el procesamiento de animales. Debido a la hidrólisis del colágeno, la gelatina se encuentra constituida por una mezcla de cadenas polipeptídicas de masas moleculares inferiores y de igual perfil de aminoácidos que el colágeno nativo (Gómez-Guillen *et al.*, 2002). Cadenas α (polímero de cadena simple), cadenas β (dos cadenas α enlazadas covalentemente) y cadenas γ (tres cadenas α enlazadas covalentemente) constituyen la gelatina,

además de mezclas de cadenas desplegadas simples y dobles de carácter hidrófilo (Papon *et al.*, 2007). Las masas molares de las cadenas varían de acuerdo a la especie y proceso de extracción empleado, siendo de 80 a 125 KDa, 160 a 250 KDa, 240 a 375 KDa para las cadenas α , β y γ respectivamente (Abby *et al.*, 2019). El análisis del gel (Figura 6) muestra que la gelatina de pescado presenta perfiles electroforéticos con las tres bandas características de la gelatina que correspondería a las cadenas α , β y γ . La banda 3 que correspondería a la cadena α presenta un peso molecular dentro del citado en la bibliografía, mientras que la banda 1 que correspondería a la cadena γ

presenta un peso molecular inferior al citado en la bibliografía. La banda 2 que correspondería a la cadena β posee un peso molecular dentro del rango informado en la bibliografía. Estas diferencias, pueden deberse al tipo de proceso de extracción y a la fuente del cual fueron extraídos (Karim *et al.*, 2009). Gómez-Guillen *et al.* (2002), señalaron que las masas

moleculares de las gelatinas varían entre 10 a 300 kDa, el cual depende de la especie y proceso de extracción. En la GB solo se observa una banda que correspondería a la cadena γ . Según Gómez Guillen *et al.* (2002) se pueden producir pérdidas parciales o daños de las cadenas durante el proceso de extracción.

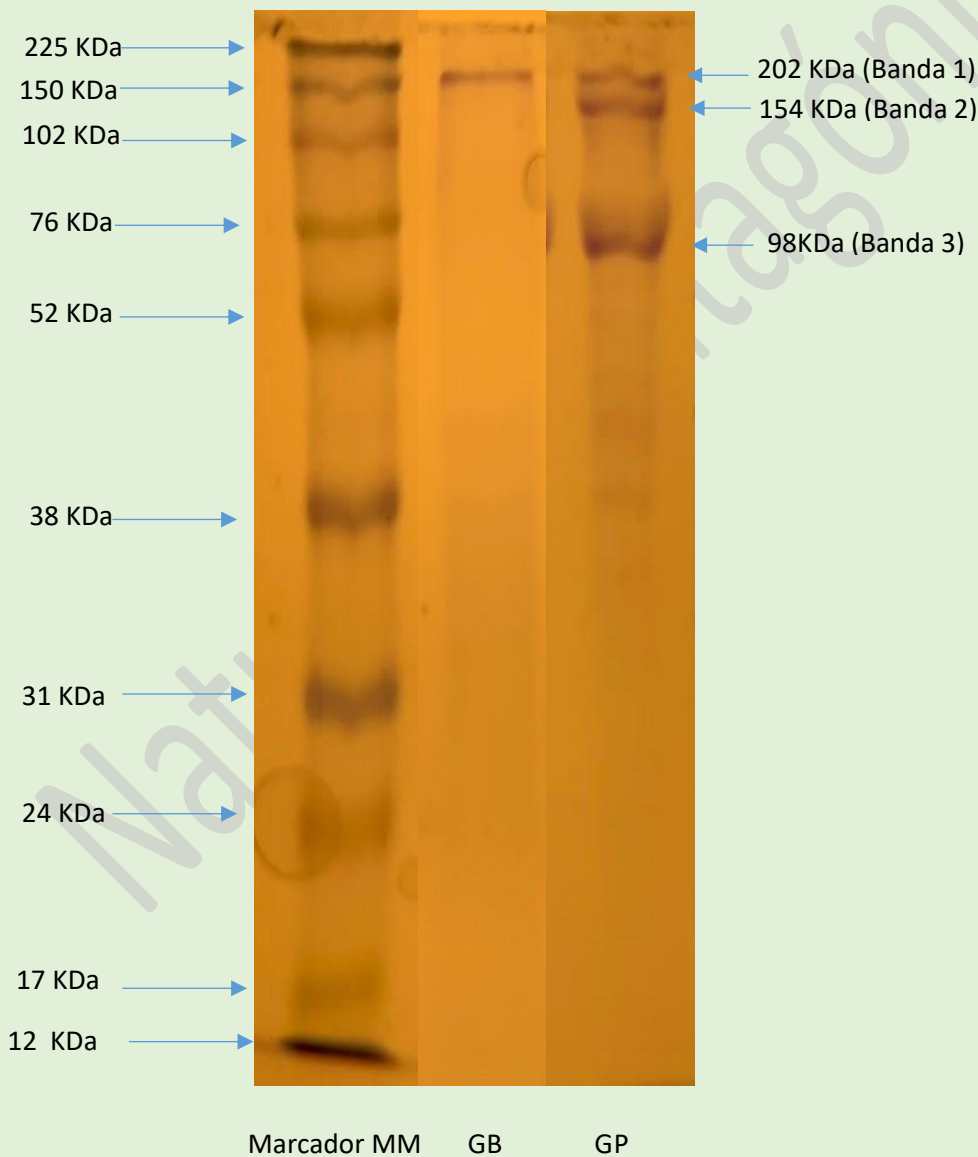


Figura 6: Electroforesis en gel de poliacrilamida (10%) de gelatina de tipo B (GB) y gelatina de pescado (GP)
Figure 6: Polyacrylamide gel electrophoresis (10%) of gelatin type B (GB) and fish gelatin (GP).

La composición de aminoácidos de GP y GB se observan en la Tabla II. Puede apreciarse, que en los dos tipos de gelatina los tres aminoácidos predominantes son glicina, prolina e hidroxiprolina. La estructura de triple hélice se debe a una repetición casi continua de la secuencia glicina-prolina-hidroxiprolina (Abby *et al.*, 2019). La gelatina con altos niveles de iminoácidos (prolina e hidroxiprolina) tiende a tener mayor fuerza de gel, propiedades viscoelásticas y punto de fusión (Rawdkuen *et al.*, 2013). El contenido de iminoácidos es de 30,24% y 22,06 en la GB y GP respectivamente. Se cree que la hidroxiprolina desempeña un papel en la estabilización de la triple hélice debido a su capacidad de formar puente hidrógeno a través de su grupo hidroxilo (Mizuno *et al.*, 2003). El punto de fusión de la gelatina de piel de merluza es $17,5 \pm 0,7$ °C. Este bajo punto de fusión, se

correlaciona con el menor contenido de hidroxiprolina respecto a GB. Las gelatinas de origen acuático presentan un amplio rango de temperaturas de fusión (16 a 28 °C), comparadas con las gelatinas de origen bovino y porcino cuyo punto de fusión está en el rango de 28 a 31 °C. La gran diversidad de especies de origen acuático de las cuales se obtienen la gelatina, hace que tenga un rango más amplio de temperaturas de fusión que la gelatina de mamíferos. Glisenan *et al.*, (2000) indicaron que el punto de fusión de las gelatinas se correlaciona con la proporción de aminoácidos, prolina e hidroxiprolina presentes en el colágeno nativo. Gómez-Guillen *et al.* (2011) reportaron bajas temperaturas de fusión (< 17°C) en peces de aguas frías, similares a los encontrados en la gelatina extraída de la piel de merluza.

Tabla II: Composición de aminoácidos (%) de la gelatina tipo B y gelatina de pescado.
Table II: Amino acid composition (%) of gelatin type B and fish gelatin.

%AA		
Aminoácidos	Gelatina tipo B	Gelatina de pescado
Ac. Glutámico	9,07	8,86
Ac. Aspártico	5,23	5,36
Alanina	0,08	0,08
Histidina	0,61	1,15
Arginina	6,67	7,02
Tirosina	16,11	18,99
Leucina	2,45	2,00
Fenilalanina	1,05	1,68
Isoleucina	0,99	1,07
Lisina	3,60	4,80
Serina	2,43	3,20
Treonina	0,92	2,12
Valina-Metionina	1,00	1,41
Prolina	16,91	13,96
Glicina	19,53	20,20
Hidroxiprolina	13,33	8,10

El proceso de extracción alcalina dió como resultado una gelatina cuyo punto isoeléctrico (pI) fue 4,6. Dicho valor, es similar al pI de la gelatina comercial de tipo B, ambas obtenidas por extracción alcalina.

El análisis por Dicroísmo Circular (DC), permite estimar el contenido de estructuras secundarias (α -hélice, lamina β paralela, al azar, entre otras), midiendo la capacidad de las moléculas de absorber

diferencialmente la luz polarizada circularmente a izquierda y a derecha. La rotación del plano y la diferente absorción de los componentes circularmente polarizados (dicroísmo circular) varían de acuerdo con la longitud de onda, pudiéndose obtener espectros, es decir gráficas de la rotación o elipticidad contra la longitud de onda. Los espectros de DC se obtienen generalmente en las regiones del ultravioleta cercano (250 a 350 nm) y

lejano (180 a 250 nm) de la radiación electromagnética. El resultado es que los diferentes elementos estructurales tienen espectros DC característicos. Por ejemplo, las proteínas alfa-helicoidal tienen picos negativos en 222 nm y 208 nm y un pico positivo a 193 nm. Las proteínas con láminas beta antiparalelas plegadas (β -hélices) tienen picos negativos en 218 nm y picos positivos a 195 nm, mientras que las proteínas desordenadas tienen muy baja elipticidad por encima de 210 nm y

picos negativos cerca de 195 nm (Greenfield, 2006). Los espectros de DC (Figura 7) obtenidos a 45 °C de GB y GP, son muy similares. Ambos muestran un amplio pico negativo alrededor de 200 nm. Este pico puede ser atribuido a la conformación de tipo *random coil*. Gómez-Estaca *et al.* (2017), obtuvieron espectros de DC a 45°C para la GB que mostraron solo un amplio pico negativo alrededor de 200 nm.

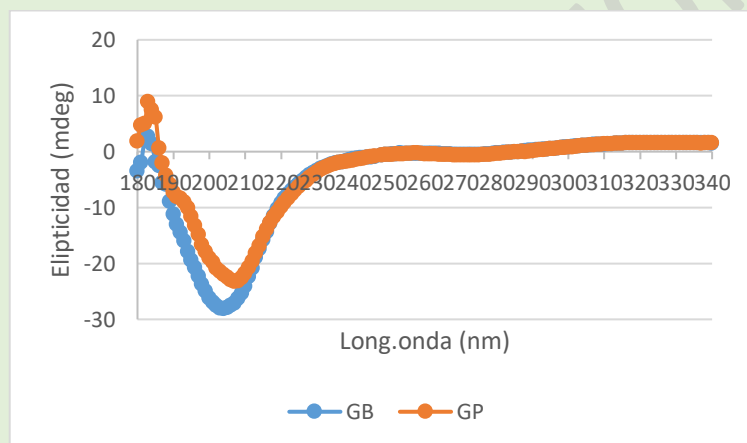


Figura 7: Espectro de dicroísmo circular para la gelatina tipo B y gelatina de pescado a 45°C.
Figure 7: Circular dichroism spectrum for gelatin type B and fish gelatin at 45 °C.

Conclusiones:

Se llevó a cabo la optimización del proceso de extracción de gelatina a partir de piel de merluza, donde se evaluó el efecto del tiempo, temperatura y concentración del álcali, buscando obtener los mejores rendimientos. Se determinó el impacto de cada una de las variables sobre el rendimiento, llevando a cabo un análisis de diseño de experimentos (DOE). La

gelatina obtenida con mejor rendimiento fue caracterizada y los resultados fueron comparados con los correspondientes a gelatina comercial tipo B. Se destacan los puntos más relevantes del trabajo realizado:

Los factores tiempo, temperatura y concentración de NaOH afectan la variable de respuesta (rendimiento) siendo la temperatura el efecto principal más

importante, seguido del tiempo de extracción.

Las condiciones de extracción tiempo*temperatura es el efecto de interacción más importante.

Las condiciones óptimas de extracción son: pretratamiento químico con NaOH 0,1M y tratamiento térmico a 60°C durante 150 minutos, obteniéndose un rendimiento máximo promedio fue de 21,74 %.

La gelatina extraída de piel de merluza posee un pI de 4,6, un punto de fusión de 17,5±0,7°C, menor contenido en iminoácidos que la gelatina comercial tipo B y perfiles electroforéticos con las tres bandas características de la gelatina que correspondería a las cadenas α , β y γ . El tipo de estructura secundaria que prevalece a 45°C es *random coil*.

Agradecimientos:

Se agradece a la Dra. Rosmarí López por sus contribuciones en la realización de este trabajo.

Bibliografía:

Abby Bravo, J.D., Rafael Vela, T. A., Alenguer, A. & Tello, F. 2019. Gelatina de piel de Doncella (*Pseudoplatystoma fasciatum*) y su uso como material encapsulante. *Tecnia*, **29**: 5-11.

Binsi, P.K., Shamasundar, B.A., Dileep, A.O., Badil, F. & Howell, N. K. 2009. Rheological and functional properties of gelatin from the skin of Bigeye snapper (*Priacanthus hamrur*) fish

influence of gel on the gel forming ability of fish mince. *Food Hydrocolloids*, **23**: 132 – 145.

Choi, S.S. & Regenstein, J.M. 2000. Physicochemical and sensory characteristics of fish gelatin. *Journal of Food Science*, **65**:194-199.

Duhoanimana, E., Karangwa, E., Lai, L., Xu, X., Yu, J., Xia, S., Zhang, X., Muhoza, B. & Habinshuti, I. 2016. Effect of sodium carboxymethyl cellulose on complex coacervates formation with gelatin: Coacervates characterization, stabilization and formation mechanism. *Food Hydrocolloids*, **69**:11-120.

Gilsenan, P.M. & Ross-Murphy, S.B. 2000. Rheological characterization of gelatins from mammalian and marine sources. *Food Hydrocolloids*, **14** :191-195.

Gómez-Guillén, M.C., Turnay, J., Fernández-Díaz, M.D., Ulmo, N., Lizarbe, M.A. & Montero, P.2002. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. *Food Hydrocolloids*, **16**: 25-34.

Gómez-Guillen, M.C., Giménez, B., López-caballero, M.E. & Montero, M.P. 2011. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, **25**:1813–1827.

Greenfield, N. J. 2006. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols*, **6**: 2876- 2890.

Gudmundsson, M. & Hafsteinsson, H. 1997. Gelatin from cod skins as affected by chemical treatments. *Journal of Food Science*, **62**:37–39

Gutiérrez Pulido, H. & De La Vara Salazar, R. Análisis y diseño de experimentos. McGraw-Hill/Interamericana, México D.F., 564 pp.

Irwandi, J., Faridayanti, S., Mohamed, E.S.M., Hamzah, M.S., Torla, H.H. & Che Man, Y.B. 2009. Extraction and characterization of gelatin

- from different marine fish species in Malaysia. *Food Research Journal*, **16**: 381–389.
- Johnston-Banks, F.A. 1990. Food Gels, P. Harris (Ed.). Elsevier Applied Food Science Series, London, 467 pp.
- Karim, A. A. & Bhat, R. 2009. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*, **23**:563-576.
- Marino, B., Casado, C., Villarroel, P. & Turco, M. 2017. Determinación de aminoácidos por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) con derivatización pre columna. IX Congreso Argentino de Química Analítica. Río Cuarto, Argentina.
- Martínez, G., Uresti, R., Ramírez, J. & Velazquez, G. 2011. Extracción y Caracterización de algunas propiedades fisicoquímicas de gelatina de piel de Trucha. *Revista Ciencia UAQ*, **4**: 26-34.
- Miano, A., Rojas, C. & Barraza, G. 2014. Influencia de la temperatura y tiempo de extracción en la fuerza de gel y rendimiento de gelatina obtenida a partir de piel de tollo (*Mustelus mento*). *Scientia Agropecuaria*, **5**: 140 -147.
- Mizuno, K., Hayashi, T., & Bächinger, H. P. 2003. Hydroxylation-induced stabilization of the collagen triple helix: Further characterization of peptides with 4 (R)-hydroxyproline in the Xaa position. *Journal of Biological Chemistry*, **278**: 373-379.
- Muyonga, J. H., Cole, C. G. B. & Duodu, K.G. 2004. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry*, **86**: 325–332
- Papon, P., Leblon, J. & Meijer, P.H.E. 2007. The physics of phase transitions. Berlin: Springer, pp. 22-2
- Poppe, J. 1992. Gelatin. Thickening and gelling agents for food, A. Imeson (Eds.), pp. 98-123.
- Rahman, M.S. & Al-Mahrouqi, A.L. 2009. Instrumental texture profile analysis of gelatin gel extracted from grouper skin and commercial (bovine and porcine) gelatin gels. *Int J Food Res J.*, **16**: 229-242.
- Rawdkuen, S., Thitipramote, N. & Benjakul, S. 2013. Preparation and functional characterisation of fish skin gelatin and comparison with commercial gelatin. *International Journal of Food Science and Technology*, **48**: 1093–1102
- Souza, M.L.R. 2004. Tecnología para procesamiento das peles de peixe. Eduem, Coleção Fundamentum. Maringá. 59 pp.
- Stainsby, G. 1987. Gelatin gels. In A. M. Pearson, T. R. Dutson, A. J. Bailey (Eds.), *Advances in meat research, collagen as a food*. **4**: 209- 222.
- Takahashi, T., & Yokoyama, W. (1954). Physico-chemical studies on the skin and leather of marine animals — XII. The content of hydroxyproline in the collagen of different fish skins. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, **20**: 525–529.