



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

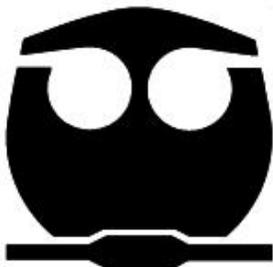
OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN  
DE PROTEÍNA DE LA PIEL DE CAZÓN (*Galeorhinus galeus*)  
PARA EL DESARROLLO DE PELÍCULAS COMO ENVASE  
ALIMENTARIO

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

**CARLA MAYTE RIZO TELLO**



MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

PRESIDENTE:        Profesor: Ma. De los Ángeles Valdivia López

VOCAL:              Profesor: Hermilo Leal Lara

SECRETARIO:        Profesor: Alberto Tecante Coronel

1er. SUPLENTE:     Profesor: Mariana Ramírez Gilly

2do. SUPLENTE:     Profesor: Alejandro Zavala Rivapalacios

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Laboratorio 322-323, Conjunto "E", Edificio de Biotecnología y Alimentos, Facultad de Química, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

---

M. en C. Ma. De los Ángeles Valdivia López

SUSTENTANTE:

---

Carla Mayte Rizo Tello

## ÍNDICE

Introducción	1
Trabajos Anteriores	3
Justificación	4
Objetivos	5
Objetivo general	5
Objetivo particulares	5
CAPITULO I. ANTECEDENTES	
Pez Cazón	6
Hábitat y Pesca	6
Producción Nacional	7
Consumo Nacional	8
Usos de los desperdicios pesqueros	8
Colágeno	9
El Colágeno de Pescadería	12
Gelatina	12
Estructura molecular	13
Propiedades de formación de películas	15
Aplicaciones de las películas en la industria alimentaria	15
Seguridad de la gelatina como ingrediente alimenticio	16

Precipitación por el Método Salting out	17
Precipitación por el método con solventes	19
Precipitación por variación de pH	20
CAPITULO II. MATERIALES Y MÉTODOS	
Diagrama General de Trabajo	22
Obtención de la Piel de Cazón	23
Caracterización de la Piel	23
Extracción de Proteína Soluble. Método Alcalino	23
Método Isoeléctrico	24
<b>Método "Salting Out" con <math>(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4</math></b>	25
Método Solventes (Etanol 96% G.L.)	26
Electroforesis SDS-PAGE	26
Evaluación del gel de electroforesis	29
Formación de Películas	30
Evaluación de las Propiedades Mecánicas y de Barrera	
Acondicionamiento	33
Medición del espesor	34
Propiedades Mecánicas	34
Fuerza de fractura en la extensión	38
Fuerza de fractura en la punción	38

Propiedades de Barrera	39
Permeabilidad al Vapor de Agua	39
Permeabilidad al Oxígeno	41
CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
Análisis Proximal de la Piel.	44
Variación en los Métodos de Precipitación	46
Variación en la Temperatura de Extracción	55
Variación de pH a la Temperatura Óptima en la Extracción	58
Caracterización del Extracto Proteínico	65
Pesos Moleculares. Electroforesis SDS-PAGE	68
Evaluación de Películas	74
Pruebas Mecánicas	75
Extensión	75
Punción	80
Pruebas de Barrera	83
Permeabilidad al vapor de agua	83
Permeabilidad al Oxígeno	85
Conclusiones	89
Bibliografía	92
Anexo 1.	97

## **INTRODUCCIÓN**

La habilidad de diversas proteínas para formar películas ha sido utilizada en diversas aplicaciones industriales desde mucho tiempo atrás. La industria alimentaria reconoce las propiedades que presentan las proteínas para formar películas y que pueden ser usadas para el desarrollo de películas comestibles y revestimientos protectores de alimentos manteniendo siempre la comestibilidad de estas en cada paso de su elaboración (Krochta et al., 1994).

Las películas y recubrimientos basadas en proteínas tienen mucho potencial para incrementar la calidad de los alimentos y la reducción de envasado de alimentos (Damodaran y Paraf, 1997).

Estas películas pueden ser utilizadas con diversos fines en los alimentos empacados: retardar la migración de humedad, lípidos, solutos, gases y sabores; actuar como protección primaria contra el abuso mecánico, como matriz para el acarreo de aditivos funcionales como antimicrobianos, fungicidas, antioxidantes y saborizantes, además de generar encapsulados de compuestos activos como suplementos alimenticios.

El interés de los consumidores en la salud, la calidad y sanidad de los alimentos, y el impacto ambiental continua incrementándose, por lo que los procesadores de alimentos presentan nuevos retos en los que las películas basadas en proteínas ofrecen posibles soluciones (Krochta et al., 1994).

Las películas basadas en proteínas tal vez puedan ayudar con la reducción de los residuos de envases a través de la reducción de fuentes. Si las características de barrera de una película permiten la conversión de un empaque plástico con multicapas a un envase de un solo componente el reciclaje de empaques podría ser mejorado (Damodaran y Paraf, 1997).

El desperdicio de pesquerías a veces es utilizado para producir comida para animales o harinas pero en su mayoría se desecha e incluso los comerciantes en la Ciudad de México deben pagar para desechar estos desperdicios (Castañeda, 2011).

El cazón se encuentra posicionado en el décimo lugar (por su volumen) de producción pesquera en México con 23,866 ton (CONAPESCA, 2011) y en el noveno lugar por su valor. Es ampliamente producido y capturado en todas las zonas costeras de México a lo largo de todo el año, sin veda temporal o permanente.

La piel de cazón constituye alrededor de un 10% de su peso (Granados y Martínez, 2010), lo que implica alrededor de 2,000 ton de piel al año de materia prima disponible para la elaboración de películas basadas en proteínas de piel de cazón. El 80% del pescado es comestible, el resto es desperdicio; sin embargo, el uso de la piel como materia prima contribuye a la disminución de residuos en productos pesqueros aprovechando al máximo el producto.

La habilidad del colágeno de formar películas ha sido utilizada tradicionalmente en la industria de la carne para realizar tripas comestibles de embutidos. El colágeno es una proteína fibrosa que se

aísala de cueros, tendones, cartílago, hueso y tejido conectivo, es una de las proteínas más prevalentes y extensamente distribuidas en el reino animal. Puede ser solubilizado y aislado de sus fuentes naturales mediante una extracción con ácido diluido, álcali diluido y soluciones salinas neutras. Estudios de precipitación del colágeno soluble han revelado dos componentes denominados  $\alpha$  (sedimentación lenta) y  $\beta$  (sedimentación rápida) Krochta et al., 1994.

## **Trabajos Anteriores**

En trabajos anteriores se han realizado diversas investigaciones sobre el desarrollo de películas a partir de un concentrado proteínico de pieles de pesquerías, por ejemplo Granados y Martínez (2010) reportan la formación de películas a partir de proteínas de piel de Mero extraídas mediante el método isoeléctrico, utilizando 5% de proteína y 75% de Sorbitol. Para la extracción de proteínas solubles reportó un rendimiento promedio de 42.3% (g Proteína/100 g Piel B.S.), sin embargo, solo logró precipitar entre el 22 y 29% de las proteínas solubles presentes lo que implica el 6.9% del rendimiento total (g Proteína/100 g Piel B.S.).

Por otro lado Castañeda (2011) logró extraer la proteína de Cazón y Raya en medio básico. El rendimiento de extracción fue mayor en caso de la piel de Raya 39.72 g a 25.78 g de Cazón (expresado como g Proteína/100 g Piel); sin embargo, menciona que en ambos casos una cantidad importante de proteína permanece en el sobrenadante (6.77 g de proteína para Cazón y 17.16 g de proteína de Raya por cada 100 g de piel). De esta forma, sólo se probó la capacidad de formación de películas de la fracción precipitada mientras que la proteína soluble en el

sobrenadante fue considerada como residuo a pesar de la alta cantidad presente, sobre todo en el caso de la raya. Lo anterior nos lleva a buscar otras opciones, ya sea para aumentar el rendimiento de la extracción o para aprovechar toda la proteína extraída.

Las pieles y huesos de muchas especies de peces se han investigado como materia prima para la producción de gelatina, varios informes describen el procesamiento y las propiedades funcionales de la gelatina de pescado. En la última década, la extracción de la gelatina de pescado se ha informado de muchas especies: tiburón azul (Yoshimura, et al, 2000b), gallo (Montero & Gómez-Guillén, 2000), tilapia roja y negra (Jamilah y Harvinder, 2002), atún aleta amarilla (Cho, et al., 2005), abadejo de Alaska (Zhou y Regenstein, 2004, 2006), patín (Cho, et al., 2006), pez gato (Yang, et al., 2007; Liu, et al., 2008), perca del Nilo (Muyonga et al., 2004), carpa (Kasankala et al., 2007), pargo patudo y pargo rojo (Jongjareonrak, et al., 2006).

Los principales inconvenientes de las gelatinas de pescado son los geles que tienden a ser menos estables y tienen propiedades reológicas inferiores que las gelatinas de mamíferos.

## **Justificación**

El problema que se ha presentado en investigaciones anteriores es el bajo rendimiento de extracción de las proteínas solubles, como consecuencia en este estudio se plantea evaluar el efecto de los factores como la fuerza iónica, la temperatura y el pH con la finalidad de definir las condiciones en las que se obtenga el mayor rendimiento posible.

De igual manera se plantea evaluar diferentes métodos de precipitación de proteínas solubles para conocer los rendimientos obtenidos, las

diferencias en las proteínas extraídas y en las películas que se realicen a partir de estas.

## **OBJETIVOS**

### **General**

Conocer la influencia de diversos factores extrínsecos combinados (temperatura, fuerza iónica y pH) sobre el proceso de extracción con la finalidad de incrementar el rendimiento, así como conocer la funcionalidad de proteínas solubles de la piel de *Galeorhinus galeus* (Cazón).

### **Particulares**

- Conocer la influencia de los factores de extracción de proteína y compararlos para establecer las condiciones óptimas.
- Conocer la influencia de diferentes métodos de precipitación de proteínas sobre el rendimiento para determinar el método con mayor rendimiento.
- Desarrollar películas a partir del concentrado proteínico obtenido en cada método de precipitación para evaluar la capacidad de formación de películas.
- Conocer y establecer las propiedades mecánicas y de barrera de las películas obtenidas y comparar con otras películas ya existentes para determinar su calidad como envase alimenticio.

## CAPITULO I. ANTECEDENTES

### **Pez Cazón (*Galeorhinus galeus*)**

El cazón (*Galeorhinus galeus*) pertenece a la familia Triakidae. Se trata de un tiburón de talla media, con el cuerpo moderadamente alargado. Tiene un hocico largo y puntiagudo, boca



grande y pequeños dientes como cuchillas, cinco aberturas branquiales, las dos últimas encima de las aletas pectorales. Ojos ovalados situados a los lados de la cabeza. Primera aleta dorsal situada entre las bases de las pectorales y de las pelvianas, mucho más grande que la segunda. Aleta caudal con un lóbulo inferior muy desarrollado. El color de la espalda oscila del gris oscuro al marrón gris, y con el vientre más claro. La talla máxima alcanzada es 2 m, siendo la más común entre 20 y 80 cm. El peso y la edad máximos publicados son de 44.7 kg y 55 años. Tiene un tiempo de gestación de 10 meses. Se alimenta especialmente de pescados y crustáceos menudos.

### **Hábitat y Pesca**

Su hábitat es generalmente en aguas templadas. Su distribución Mundial abarca: Atlántico occidental (el sur de Brasil a Argentina), Atlántico oriental (Islandia a Sudáfrica, incluyendo el Mediterráneo), Océano Índico Occidental (Sudáfrica), Pacífico Occidental (Australia y



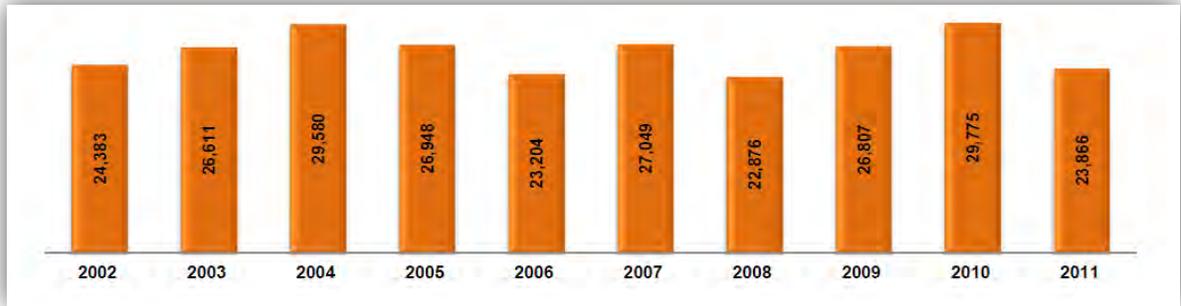


Fig. 3 Serie histórica de la producción de tiburón y Cazón 2002-2011 (Peso vivo en toneladas).  
(CONAPESCA, 2011).

### Consumo Nacional

El cazón es una especie consumida frecuentemente en México ya que según el estudio de mercado realizado por la CONAPESCA, se encuentra en el séptimo lugar de consumo de pescados y mariscos de la dieta de los mexicanos (como se muestra en la Fig. 4), solo por debajo de los más comerciales (CONAPESCA, 2008).

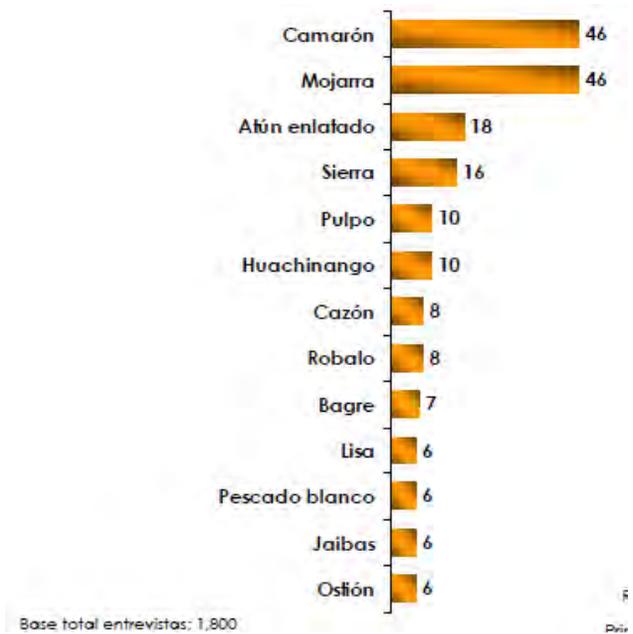


Fig. 4. Cantidad porcentual de pescados o mariscos consumidos más frecuentemente

### Usos de los desperdicios pesqueros

El procesamiento de pescado conduce a enormes cantidades de residuos. Se estima que los residuos de procesamiento de pescado después del fileteado representa aproximadamente el 75% del peso total de pescado y 30% de los residuos está en la forma de huesos y

pieles (Gómez Guillén et al., 2002). Aproximadamente el 30% del peso total de pescado permanece como residuo en forma de pieles y huesos durante la preparación de filetes de pescado (Shahidi, 1994). Este residuo es una excelente materia prima para la preparación de productos de alto valor, incluyendo alimentos ricos en proteínas. La utilización de desechos de pescado ayuda a eliminar nocivos aspectos ambientales y mejorar la calidad en el procesamiento de pescado.

Con la finalidad de utilizar estos residuos, se han hecho esfuerzos para desarrollar métodos para la conversión en productos para el consumo humano, nutrientes de origen animal y productos de importancia comercial. Entre los usos actuales más importantes para los desechos de pescado son la producción de harina de pescado, la extracción de colágeno y antioxidantes, el aislamiento de los cosméticos, biogás / biodiesel, la producción de quitina y quitosano, envasado de alimentos (gelatina, quitosano) y el aislamiento de enzimas (proteasas).

## **Colágeno**

El colágeno es la principal proteína estructural que se encuentra en la piel y los huesos de los animales, comprende aproximadamente el 30% del total de proteína animal, juega un papel importante en la creación de la resistencia mecánica, la integridad y propiedades reológicas de los músculos y los filetes.

El colágeno está compuesto por moléculas de tropocolágeno que constituyen su unidad fundamental, tiene una masa molecular de 285.000 daltons, con forma de fibra de 3.000 Å de longitud y 15 Å de

diámetro. La molécula de tropocolágeno está formada por tres cadenas polipeptídicas de igual tamaño, cada una de las cuales es una hélice levógira ( $\alpha$ ), y las tres entrelazadas formando una triple hélice dextrógira, estas adoptan una estructura 3D que proporciona una geometría ideal para el enlace de hidrógeno entre cadenas. Cada cadena en la hélice gira en sentido antihorario como lo muestra la Fig 5. La triple hélice es de aproximadamente 300 nm de longitud, y la cadena tiene un peso molecular de aproximadamente 105 kDa (Teijón, 2001)

La molécula de colágeno se estabiliza por puentes de hidrógeno entre las cadenas y por las interacciones de los residuos de aminoácidos que se extienden radialmente con moléculas de agua. Cada cadena de colágeno se agrega en fibrillas. Hay por lo menos 19 variantes de colágeno, denominadas tipo I-XIX.

Los tipos I, II, III y V son los colágenos fibrosos. Colágeno tipo I se encuentra en todos los tejidos conectivos, incluidos los huesos y pieles. Este es un heteropolímero de dos cadenas de  $\alpha$ -1 y una cadena  $\alpha$ -2, Se compone de un tercio de glicina, no contiene triptófano o cisteína y es muy baja en tirosina e histidina. Las triples hélices son estabilizadas por enlaces de hidrógeno entre las cadenas. Hay veinte aminoácidos diferentes en cada cadena  $\alpha$  y se encuentran en un patrón específico repetido: Glicina (que representa un tercio del contenido de aminoácidos) se encuentra en una secuencia repetida con otros dos aminoácidos (Glicina-X-Y). **Es muy común que "X" sea prolina y "Y" sea un residuo de hidroxiprolina** (Teijón, 2001).

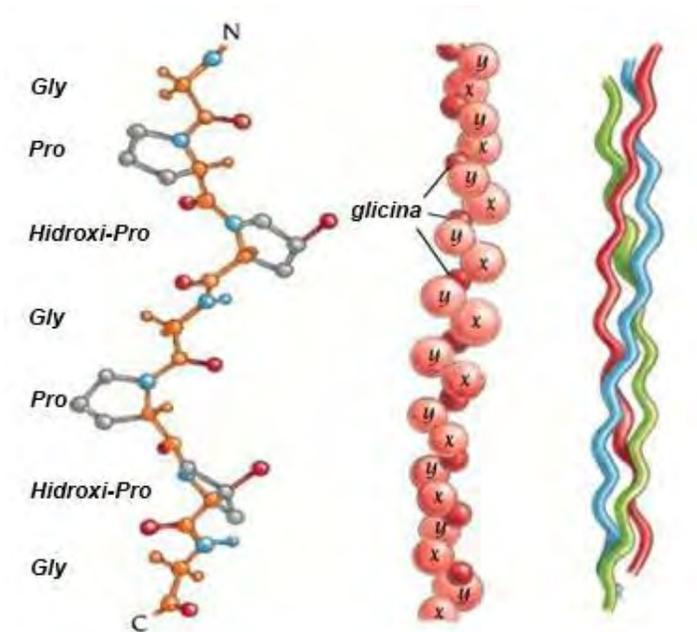


Fig. 5 Representación de la estructura de triple hélice del colágeno

La función del colágeno es fundamentalmente mecánica. La dureza del colágeno se debe a sus enlaces covalentes cruzados tanto intramoleculares como intermoleculares, en los que participan residuos de lisina e hidroxiprolina, bien como tales residuos aldehídicos (al-lisina y al-hidroxilisina). Entre estos enlaces cruzados están:

- Enlace cruzado aldólico, en el que participan dos residuos de al-lisina, que sufren una condensación aldólica
- Enlace cruzado de hidroxipiridino o piridinolina, formados por la unión de tres residuos, una al-lisina, una al-hidroxilisina.

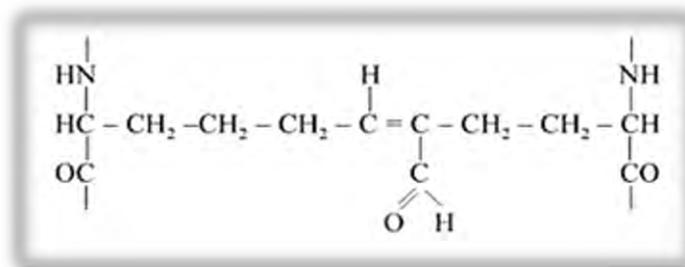


Fig. 6 Enlace cruzado aldólico (Teijón, 2001)

## **El Colágeno de Pescadería**

En la mayoría del colágeno de pescado se ha encontrado dos variantes de la cadena A, que normalmente son designados como  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -2. Estas variantes de la cadena A, a pesar de tener aproximadamente el mismo peso molecular (95 Da), pueden ser separados por SDS-PAGE, debido a su diferente afinidad por SDS.  $\alpha$ -2 tiene una mayor afinidad por SDS y por consiguiente presenta una movilidad mayor que  $\alpha$ -1.

Además de las diferencias en las especies moleculares del colágeno de pescado se ha demostrado que varía ampliamente en su composición de aminoácidos. En particular, los niveles de aminoácidos (prolina e hidroxiprolina) varían significativamente entre especies de peces. La cantidad de aminoácidos, especialmente hidroxiprolina, depende de la temperatura ambiental en la que el pescado viva y afecta a la estabilidad térmica del colágeno. Los peces que viven en entornos fríos tienen un menor contenido de hidroxiprolina y presentan una menor estabilidad térmica que las de los peces que viven en entornos cálidos. También se ha reportado que los peces de agua fría también contienen niveles más altos de aminoácidos con grupo hidroxilo: serina y treonina.

## **Gelatina**

La gelatina es una proteína purificada considerada como ingrediente alimenticio, obtenido por la desnaturalización térmica del colágeno, que es la base estructural y proteína más común en el reino animal.

De acuerdo a la NMX-F-043-1970 (Alimentos para humanos. Calidad para grenetina pura comestible) se entiende por grenetina pura comestible (La grenetina en el mercado internacional es conocida con el nombre de Gelatina) al producto industrial alimenticio, obtenido por hidrólisis ácida o alcalina de material colágeno (huesos, pieles y cartílagos).

Generalmente, la gelatina se produce a partir de colágeno de la piel y el hueso por tratamiento ácido o álcali para dar Tipo A y Tipo B gelatinas, respectivamente. El Tipo A, con punto isoeléctrico de 7 a 9, se deriva del colágeno con el pre-tratamiento exclusivamente ácido. El Tipo B, con punto isoeléctrico de 4,8 a 5,2, es el resultado de un tratamiento previo alcalino del colágeno.

Los procedimientos para obtener este polipéptido soluble involucran el rompimiento de reticulaciones, entre las cadenas polipeptídicas del colágeno y entre las uniones de la cadena de polipéptidos.

Cuando los tejidos que contienen colágeno son sometidos a procesos degradativos suaves, es decir, el tratamiento con álcali o ácido seguido o acompañado por calentamiento en presencia de agua, la estructura fibrosa sistemática de colágeno se rompe irreversiblemente y se forma la gelatina (Ninan, 2009).

### **Estructura molecular**

La gelatina es una mezcla heterogénea de uno o varios hilos de polipéptidos, cada uno con hélices conformadas de prolina y contiene entre 300 - 4000 aminoácidos. Además de las mezclas de estos

filamentos (triple hélice de colágeno tipo I, dos cadenas  $\alpha$ -1 y de una cadena  $\alpha$ -2) contiene oligómeros y otros polipéptidos producto de la degradación.

La gelatina contiene glicina (casi 1 de cada 3 residuos, dispuestos cada tercer residuo), residuos de prolina y de 4-hidroxiprolina como lo muestra la Fig. 7. Una estructura típica es-Ala-GlyPro-Arg-Gly-Glu-Gly-4Hyp-Pro-

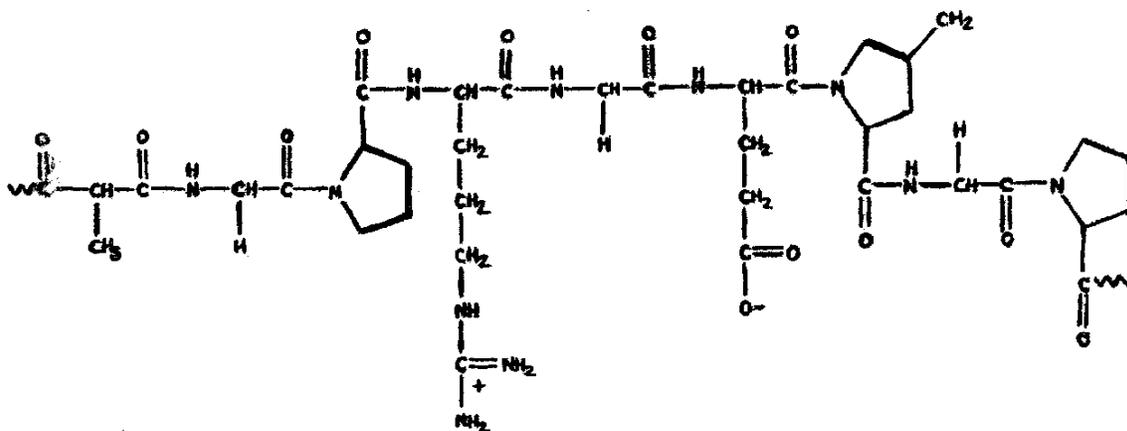


Fig. 7 Estructura típica de la gelatina

La gelatina es una proteína anfótera con punto isoeléctrico entre 5 y 9 dependiendo de la materia prima y el método de fabricación. Al igual que su proteína de origen, el colágeno III, que es el único en que contiene 14% de hidroxiprolina, 16% de prolina y 26% de glicina.

El colágeno existe en muchas formas diferentes pero la gelatina sólo se deriva de fuentes ricas en colágeno de tipo I que no contiene cistina, sin embargo, el cuero o piel contiene algo de colágeno de tipo III que pueden ser la fuente de cistina.

Nutricionalmente, la gelatina no es una proteína alimenticia completa porque el aminoácido esencial triptófano se pierde y la metionina está presente en un nivel bajo (Ninan, 2009).

### **Propiedades de formación de películas**

Entre todas las proteínas, la gelatina ha acaparado la atención para el desarrollo de películas comestibles debido a su abundancia y biodegradabilidad.

El uso de gelatina en la preparación de películas o recubrimientos comestibles ha sido muy estudiado y ha generado numerosas patentes, en particular en el campo de los productos farmacéuticos.

Es generalmente reconocido que los aminoácidos como prolina e hidroxiprolina son importantes en la re-naturalización de las subunidades de gelatina durante la gelificación.

Las películas de gelatina que contienen más de una triple hélice, absorben menos agua y son consiguientemente mucho más fuertes (Ninan, 2009).

### **Aplicaciones en la industria alimentaria**

El colágeno es usado para hacer la película comestible basada en proteínas de mayor éxito comercial. Las tripas de colágeno han sustituido en gran medida las tripas naturales para embutidos

Otra potencial aplicación es la aplicación de recubrimientos que contribuyen a la reducción de la respiración de frutas y vegetales frescos que son expuestos a bajos niveles de humedad relativa durante el almacenamiento y el transporte (Ninan, 2009).

## **Seguridad de la gelatina como ingrediente alimenticio**

La gelatina es considerada como un ingrediente alimenticio en vez de un aditivo y es generalmente reconocido como seguro (GRAS). En 1993, la FDA reiteró el estado de GRAS de gelatina y declaró que no había ninguna objeción al uso de gelatina de cualquier fuente y cualquier país siempre que la piel de los animales que presenten signos de enfermedad neurológica y las materias primas fueran excluidas del proceso de fabricación.

Hoy en día, la gelatina mantiene su status GRAS. Además, la Comisión Mixta de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) no puso límite en el uso de la gelatina. La gelatina es un excelente medio de crecimiento para los microorganismos; por lo tanto requiere de mantener Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), el uso de programas de HACCP y sistemas de gestión ISO 9000 de calidad durante la fabricación, para evitar la contaminación.

## **Precipitación por el método Salting out**

Uno de los métodos de separación de proteína por precipitación es mediante las altas concentraciones de sal.

En la precipitación por insolubilización se emplean sales disociables. Diferentes tipos de sales neutras o ligeramente ácidas han sido utilizadas para la solubilización, precipitación o fraccionamiento de proteínas: estas incluyen el NaCl (5.33 M, 20 °C), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1.88 M, 20 °C), NH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (4M, 0-20 °C); así como MgSO<sub>4</sub>, KCl y CaCl<sub>2</sub> a diferentes concentraciones y combinaciones de pH (Prado, 1999).

Se pueden utilizar diversas sales, pero no hay mejor que el sulfato de amonio, debido a que tiene las ventajas de su alta solubilidad a bajas temperaturas, baja densidad de solución que no interfiere con la sedimentación por centrifugación de la mayoría de las proteínas precipitadas, bajo costo, ausencia de efectos desnaturalizantes y en soluciones concentradas previene o limita el desarrollo bacteriano.

El principio de la precipitación a altas concentraciones de sal (Salting out) es que la presencia de sales disminuye en gran medida el poder de solvatación del agua. Tradicionalmente las concentraciones de sulfato de amonio son expresadas como porcentajes de saturación. La saturación del sulfato de amonio a 20 °C es cercana a 4.0 M. Por lo tanto, el 60% de sulfato de amonio saturado es 2.4 M. No son 60 g disueltos en 100 mL, de hecho para obtener de cero a 60%, se debe adicionar 39 g por cada 100 ml de solución. Típicamente se añade 600 g/L (alrededor de un 85% de saturación, ver anexo I) para precipitar todas las proteínas presentes.

Las moléculas de agua son removidas de la superficie de las proteínas debido a localización superficial de residuos como leucina, valina, fenilalanina, etc. los cuales son expuestos. Estas interactúan entre sí causando la precipitación de las proteínas presentes. En una mezcla de proteínas, los agregados pueden contener diversas proteínas interactuando unas con otras, pero unas proteínas precipitan más rápido que otras debido a su gran número de residuos hidrofóbicos superficiales. Como resultado algunas proteínas precipitan a relativas bajas concentraciones de sal, mientras que otras requieren de concentraciones más altas de sal para precipitar. Así este método resulta en una separación: precipitan primero las proteínas más hidrofóbicas y las menos hidrofóbicas precipitan al final. En cierta medida existe un factor adicional, el tamaño de las proteínas, precipitando primero las proteínas más pequeñas.

El método Salting out es el primer paso en el protocolo de purificación de proteínas. La calidad del material de inicio no es importante, puede ser turbia y tener una variedad de sales y buffers sin generar gran afectación al proceso. Se debe lograr un factor de purificación entre 3 y 5 con un porcentaje de recuperación de al menos 70% de la proteína a purificar. Alternativamente puede ser usado para concentrar fracciones de proteína, normalmente se utilizaría un 80% de saturación (600 g/L) para precipitar todas las proteínas presentes (Scopes, 1988).

## Precipitación por el método con solventes

Este método ha sido empleado desde los inicios de la purificación de las proteínas. Ha sido especialmente importante a escala industrial, en particular en el fraccionamiento de las proteínas del plasma. Sin embargo a escala de laboratorio, la purificación ha sido menos extensa.

El efecto principal que conduce a la precipitación de las proteínas es la reducción de la actividad de agua. La hidrofilia de las moléculas disminuye mientras la concentración de solvente orgánico aumenta, esto puede ser descrito en términos de la reducción de la constante dieléctrica del solvente. El ordenamiento de las moléculas de agua alrededor de las áreas hidrofóbicas de la superficie de las proteínas es desplazado por las moléculas del solvente orgánico, lo que conduce al efecto neto de la precipitación de las proteínas.

La Fig. 8 es una representación esquemática del proceso de precipitación por solventes orgánicos, en donde el solvente interactúa con las zonas hidrofóbicas expuestas permitiendo la interacción proteína-proteína.

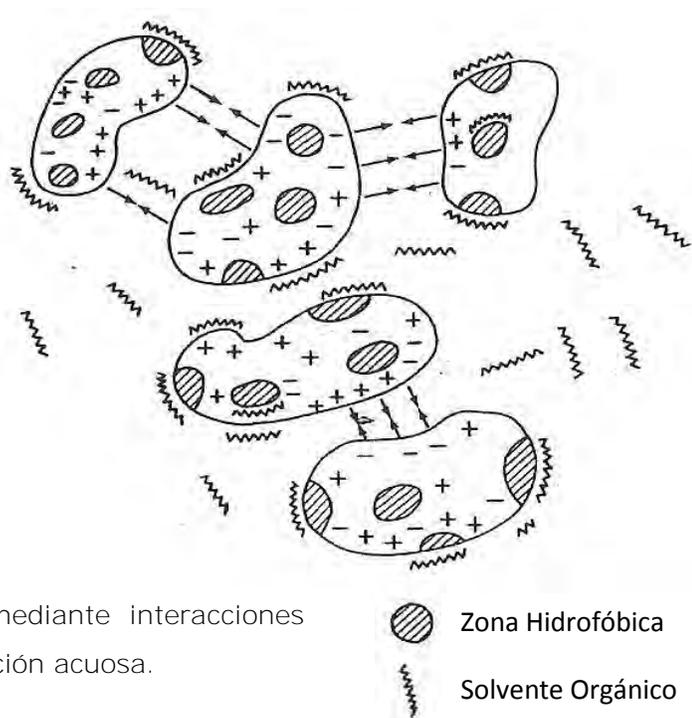


Fig. 8 Agregación de las proteínas mediante interacciones entre el solvente orgánico y la solución acuosa.

Otro factor que afecta la precipitación es el tamaño de las moléculas de proteína. En igualdad de condiciones, mientras más grande es el tamaño de molécula menor es el porcentaje de solvente orgánico requerido para precipitar. Si se compara un intervalo de proteínas con diferente tamaño pero similar hidrofobicidad y puntos isoeléctricos, el orden de precipitación será al inverso del tamaño de la molécula. En la práctica, las diferentes composiciones y cargas netas de las xproteínas en la solución generan una regla: moléculas grandes precipitan antes porque tienen mayor oportunidad de poseer un área superficial cargada que coincide con otras proteínas (Scopes, 1988).

Los solventes tienden a desnaturalizar la proteína, especialmente a temperaturas mayores a 0 °C. Generalmente una solución de proteína soluble con pH alejado del punto isoeléctrico, requiere de una mayor concentración de solvente para ser precipitada (Prado, 1999).

## **Precipitación por variación de pH**

La precipitación por pH ocurre tanto por la formación de regiones con cargas iguales que tienden a repelerse sobre la superficie de la proteína, como por el rompimiento de las fuerzas de atracción que le dan la conformación a la proteína.

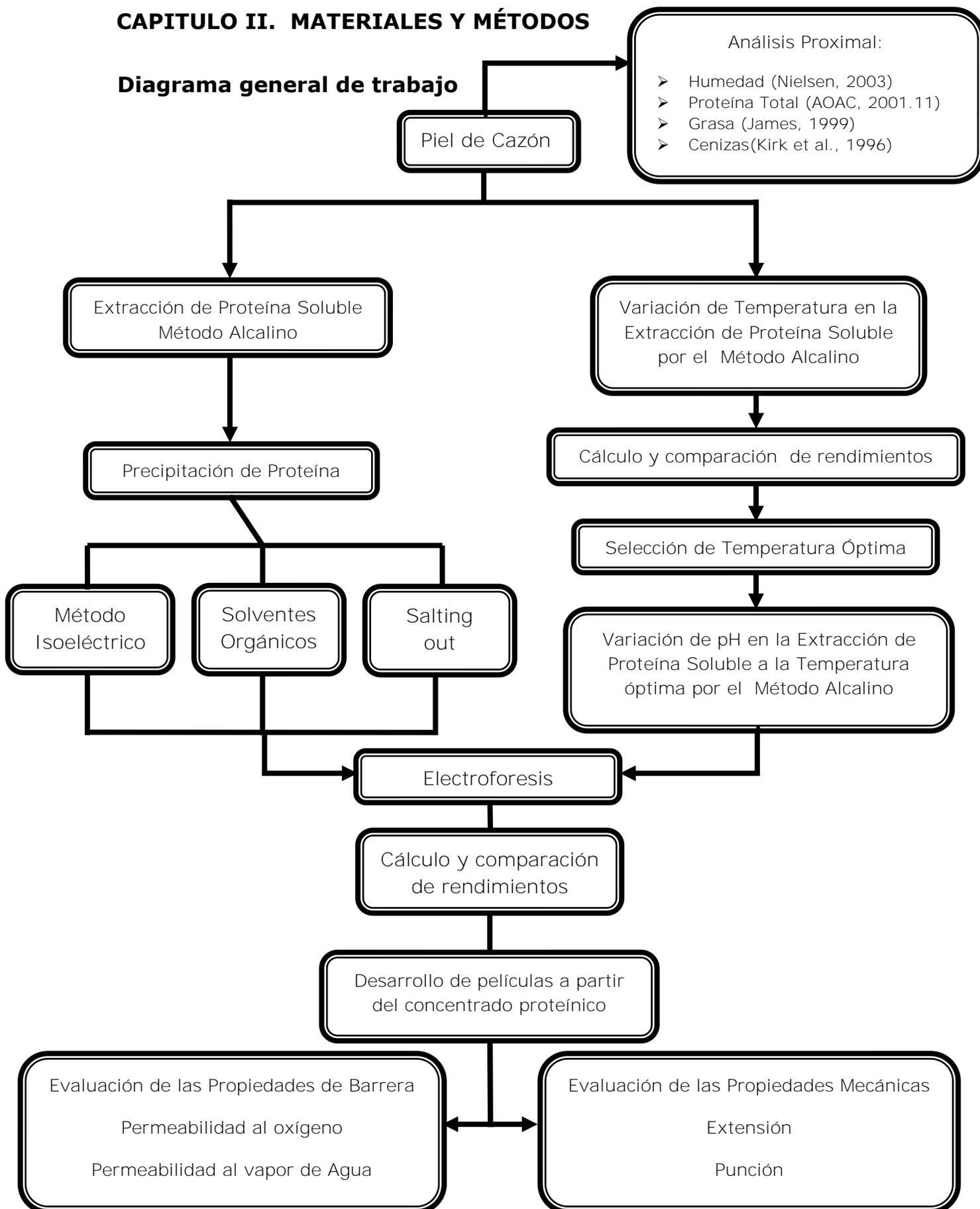
En este caso también será necesario determinar la estabilidad a pH de la proteína deseada (Prado, 1999).

Los polímeros que se han agregado o polimerizado pueden formar redes tridimensionales desordenadas: coágulos o estructuras muy organizadas

(geles). Muchas suspensiones de proteínas llegan a gelificar cuando se calientan durante un determinado tiempo por encima de una temperatura crítica; el mecanismo tradicionalmente aceptado para explicar este fenómeno establece que se efectúa en dos etapas; primeramente se produce desdoblamiento y desnaturalización, seguidos de una segunda reacción de asociación ordenada de las moléculas que hace que las proteínas globulares se vuelvan más lineales y que se enlacen por uniones de hidrógeno, hidrófobas y salinas. El resultado es la producción de una red tridimensional organizada, o gel, capaz de retener una elevada cantidad de agua mediante puentes de hidrógeno. Debido a que la primera fase se acelera a altas temperaturas y la segunda a bajas, las características de los geles así formados se explica ya que, por un lado, la temperatura elevada provoca la desnaturalización y la agregación, mientras que el frío incrementa la interacción proteína-proteína y la hidratación de éstas por el establecimiento de puentes de hidrógeno (Badui, 2006).

## CAPITULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

### Diagrama general de trabajo



## **Obtención de la Piel de Pescado Cazón**

La piel de Pescado Cazón (*Galeorhinus galeus*) se obtuvo en la Central de Pescados y Mariscos "La Nueva Viga" ubicado en el eje 6 sur Trabajadores Sociales, Distrito Federal. Se recolectó en diversos locales de fileteo en bolsas de polietileno, se transportó al laboratorio y se almacenó hasta su uso en congelación a -15 °C.

## **Caracterización de la piel**

Para determinar el rendimiento de extracción se realizó el análisis composicional de la piel. Cada determinación se realizó a dos lotes diferentes de piel de cazón pieles y por triplicado. Se emplearon los siguientes métodos:

- Humedad. Método Gravimétrico por Horno al Vacío (Nielsen, 2003)
- Proteína Total. Método Kjeldahl (AOAC, 2001.11)
- Grasa. Método Soxhlet (James, 1999)
- Cenizas Totales. Método Calcinación (Kirk et al., 1996)

## **Extracción Alcalina (Condiciones estándar)**

La extracción se realizó sumergiendo la piel cortada en NaOH 0.1N (pH=12, 1:10 p/v) por una hora con agitación a la temperatura de 45 °C, se licuó en una licuadora industria (Osterizer de Luxe) y se continuó

con la extracción por una hora más. Se filtró con manta de cielo y posteriormente con papel filtro (poro no. 4) al vacío. Al filtrado final (denominado  $F_{STD}$ ) se le determinó la cantidad de proteína soluble por el método de Lowry (Lowry, et al. 1951) y por el método de Kjeldahl (AOAC, 2001.11).

## **Método Isoeléctrico**

Para precipitar la proteína soluble se adicionó la solución de polifosfatos [ $Na_6(PO_2)_6$  al 10%] 1:50 (vol. polifosfatos /vol. filtrado) y se disminuyó el pH a 2.5 con HCl 2M. Se refrigeró hasta la precipitación (4°C) y fue centrifugado a 6000 rpm (Centrifuga Beckman J2 MC) por 15 min. Se recuperó el concentrado de proteína que para cada caso los cuales se identificaron de la siguiente manera:

C.P. <sub>40</sub> → Precipitado proteínico del extracto obtenido a 40 °C

C.P. <sub>45</sub> → Precipitado proteínico del extracto obtenido a 45 °C

C.P. <sub>50</sub> → Precipitado proteínico del extracto obtenido a 50 °C

Se determinó la cantidad de proteína en cada C.P. por el método de Kjeldahl y la humedad por horno al vacío, de igual manera, al sobrenadante residual (S.R.) se le determinó la cantidad de proteína por el método de Lowry y Kjeldahl para determinar el rendimiento en cada caso.

Una vez calculados los rendimientos se seleccionó la temperatura óptima del intervalo estudiado (40 °C, 45 °C, 50 °C) en la cual se obtiene mayor cantidad de proteína soluble.

## **Método de Salting out con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$**

La proteína de la piel de cazón se extrajo con el método alcalino. Para comenzar la precipitación de la proteína soluble se añadió la sal (de acuerdo al Anexo I) poco a poco (evitando formar grumos) hasta un 25% de saturación (134 g/L) manteniendo agitación constante, posteriormente se centrifugó a 7500 rpm por 20 min y se recuperó el residuo sólido denominado C.P.<sub>25</sub>. Se prosiguió a la siguiente fase de precipitación y se continuó adicionando el sulfato de amonio hasta el 50% de saturación (146 g/L), se centrifugó a 7500 rpm por 20 min y se recuperó el residuo sólido denominado C.P.<sub>50</sub>. Finalmente se prosiguió a la última fase de precipitación, se precipitó el sobrenadante al 75% de saturación y se centrifugó a 7500 rpm por 20 min, se recuperó el residuo sólido denominado C.P.<sub>75</sub>.

Los residuos sólidos o concentrados de proteína de cada fracción se sometieron a un proceso de diálisis ya que esta técnica permite eliminar el sulfato de amonio.

La diálisis retiene las proteínas grandes dentro del tubo de membrana, mientras que permite que la concentración de los demás solutos en el concentrado de proteínas se modifique hasta llegar al equilibrio con la solución del exterior de la membrana (Nelson et al., 2001).

El precipitado de proteína se colocó en un tubo de membrana semipermeable y se suspendió en un volumen de 2 L aprox. de agua fría (4 °C) manteniendo el sistema en agitación constante y se refrigeró (4 °C) durante las noches, el agua se cambió constantemente (2-3 h) por un periodo de 72 h. Posteriormente se determinó la cantidad de proteína en el concentrado por el método de Kjeldahl.

## **Método de Precipitación con Solventes (Etanol 96 °GL)**

La proteína de la piel de cazón se extrajo por el método alcalino. La precipitación se realizó a bajas temperaturas (entre 0 °C y 4 °C), la proteína soluble se colocó en un baño de hielo con sal para disminuir la temperatura hasta 0°C, de igual manera el etanol (50% del volumen respecto del sobrenadante) se colocó en el baño para disminuir la temperatura bajo 0°C. Una vez lograda estas temperaturas se comenzó a adicionar poco a poco el etanol al sobrenadante con agitación leve asegurándose de mantener la temperatura en 0°C. Al terminar la adición del etanol se mantuvo la solución en el baño de hielo 15 min para estabilizarlo y se procedió a la centrifugación (7500 rpm/20 min). Se recuperó el concentrado de proteína y se determinó la cantidad de proteína por el método de Kjeldahl, al sobrenadante se le determinó la cantidad de proteína por el método de Lowry.

## **Electroforesis de SDS-PAGE**

El método SDS-PAGE se llevó a cabo con el propósito de conocer la influencia de los factores de temperatura, pH y método de precipitación en los perfiles de las proteínas extraídas; el equipo de electroforesis empleado fue el mini Protean System de Bio Rad. Los reactivos empleados se mencionan a continuación.

- ✓ Solución de Acrilamida/Bis-Acrilamida → 29.2% acrilamida + 0.8% bis-acrilamida, se aforó con agua destilada en un matraz Erlenmeyer cubierto con papel aluminio. Nota: Usar guantes, cubre boca y bata.

- ✓ Tris-HCl (1.5 M pH = 8.8) → 18.15 g de Tris-HCl se aforaron a 100 mL con agua destilada, se ajustó a pH = 8.8 con HCl y se almacenó a 4 °C.
- ✓ Tris-HCl 0.5 M pH = 6.8 → 6 g de Tris-HCl se aforaron a 100 mL con agua destilada, se ajustó a pH = 8.8 con HCl y se almacenó a 4 °C.
- ✓ SDS 10% → 10 g de SDS en 90 mL de agua destilada, disolver con agitación suave. No se refrigera.
- ✓ APS 10% → 100 mg de persulfato de amonio anhidro en 900 µL en agua destilada y desionizada.
- ✓ Regulador de Tanque o electrodo 10X pH = 8.3 → 30.3 g Tris Base, 144.0 g Glicina y 10.0 g SDS se disolvieron y se llevaron a 1L con agua destilada. No se ajustó el pH. Se refrigeró a 4°C.
- ✓ Regulador de Tanque o electrodo 1X pH = 8.3 → Se diluyó la solución de stock 10X (50 mL) con 450 mL de agua destilada y se refrigeró.
- ✓ Solución Teñidora → Se solubilizó 1 g de Azul de Coomassie R-250 en 300 mL de Metanol, 100 mL de Ácido Acético y 650 mL de Agua destilada.
- ✓ Solución desteñidora → 300 mL Metanol, 100 mL de Ácido Acético y 600 mL de Agua destilada.

Las concentraciones de gel utilizadas fueron 10% Gel Separador (inferior) y 5% Gel Concentrador (arriba) y en la Tabla 1 se muestran las cantidades utilizadas de cada reactivo.

Tabla 1. Cantidades utilizadas de cada componente para la formación de 2 geles de placas de 1.5 mm

Componente	Gel Concentrador 5%	Gel Separador 10%
Agua desionizada	3.62 mL	7.32 mL
SDS 10%	50 $\mu\text{L}$	170 $\mu\text{L}$
Tris 1.5M (pH = 8.8)	---	3.83 mL
Tris 0.5M (pH = 6.8)	500 $\mu\text{L}$	---
Acilamida/Bis acilamida	830 $\mu\text{L}$	5.66 mL
TEMED Tetrametiletilendiamina	3.5 $\mu\text{L}$	8.61 $\mu\text{L}$
APS Persulfato de amonio	35 $\mu\text{L}$	86.1 $\mu\text{L}$

Las muestras de concentrado proteínico se disolvieron en agua destilada (pH = 12). Se preparó 50  $\mu\text{L}$  de muestra + 35  $\mu\text{L}$  buffer de carga y se calentaron por 5 min en baño de agua en ebullición.

Para preparar los geles se instalaron los short plates limpios y se corroboró con agua destilada que no tuviera fugas. Se preparó el gel separador agregando al final el APS y el TEMED, se homogenizó y se colocó en las placas rápidamente. Posteriormente se agregó 1 mL de Isopropanol y se dejó polimerizar.

Mientras estuvo polimerizado se preparó el gel concentrador sin agregar el APS y el TEMED. Una vez polimerizado el gel separador, se escurrió el isopropanol y se enjuagó con agua destilada hasta eliminar el aroma.

Se adicionó el APS y el TEMED a la formulación del gel concentrador y se colocó rápidamente en las placas junto con el peine. Una vez polimerizado, se desmontaron las placas y se colocaron en la cámara de

electroforesis (Nota: se pueden almacenar los geles hasta por 24 h para su posterior uso en contenedores con agua destilada a 4 °C).

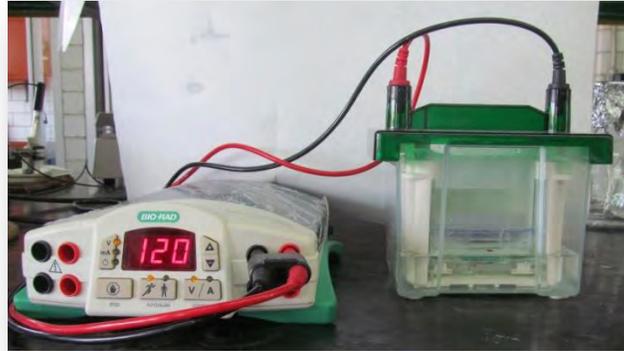


Fig. 9. Equipo de electroforesis horizontal corriendo dos geles de acrilamida SDS-PAGE sumergidos

Después de que se colocaron las placas en la cámara de electroforesis, se cargaron las muestras en el pocillo correspondiente y se adicionó el buffer de carga 1X entre las placas hasta cubrirlas y dentro de la cámara. Se cerró y se ajustó el voltaje hasta 80 volts, se mantuvo así hasta que las muestras pasaran el gel concentrador (15 min aprox.), y se aumentó el voltaje hasta 120 volts hasta que las muestras salieran del gel separador como lo muestra la figura 9. Se detuvo el paso de corriente y se desmontaron las placas, los geles fueron sumergidos en la solución teñidora por 15 min y se lavaron con la solución desteñidora hasta observar las bandas claras.

### **Evaluación del Gel de Electroforesis**

Para el análisis de las proteínas se empleó un marcador de amplio intervalo como lo muestra la Fig. 10 y se establecieron los pesos moleculares por comparación.

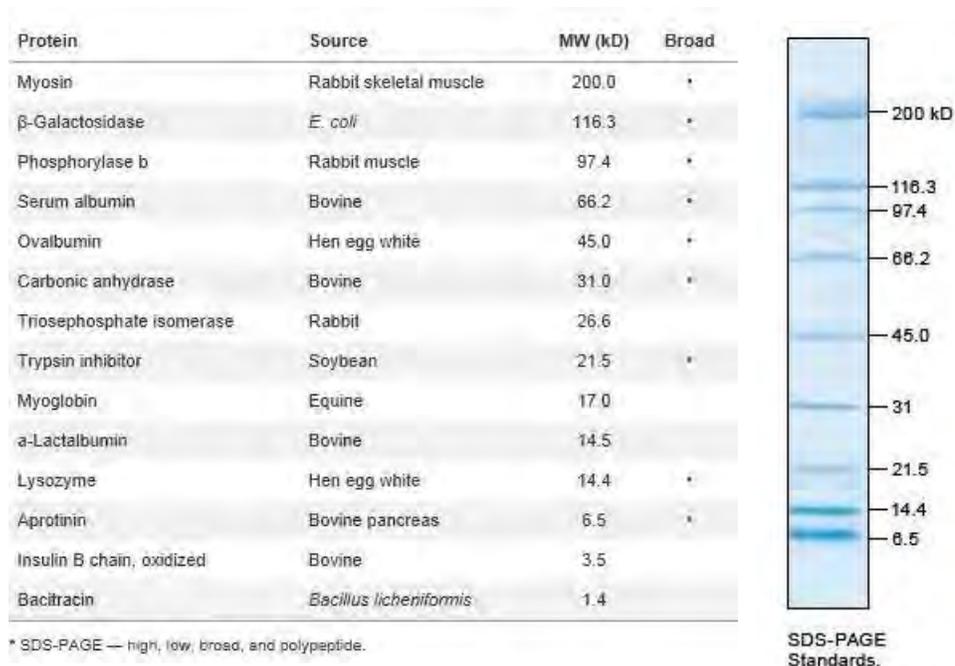


Fig 10. Marcador de amplio intervalo Bio-rad

Cada gel se escaneó, observándose el número y movilidad de cada componente proteínico o banda presente.

La movilidad se determinó midiendo con una escala milimetrada y comparando con la ayuda del marcador de amplio rango BIORAD hasta el lugar donde migró y donde se fijaron las bandas.

## Formación de Películas

La formulación de la película basada en proteínas es de: 5% (w/v) proteína (B.S.) con base en el volumen final de formulación y 75% (w/v) plastificante (sorbitol) con base en el contenido de proteína en base seca. Para conocer la cantidad de proteína (en base seca) a adicionar a los 55 mL de formulación necesarios para una película, se realizó la relación como se muestra a continuación:

$$55 \text{ ml formulaci3n } \left( \frac{5 \text{ g prote3na B.S.}}{100 \text{ ml formulaci3n}} \right) = 2.75 \text{ g prote3na B.S.}$$

Para determinar la cantidad de concentrado prote3nico (C.P.) en base h3meda necesario para cubrir los 2.75 g de prote3na en base seca se realiz3 la siguiente relaci3n:

$$2.75 \text{ g prote3na B.S. } \left( \frac{100 \text{ g prote3na B.H. del C.P.}}{\text{g prote3na en B.S. del C.P.}} \right) = \text{g Prote3na B.H. de C.P.}$$

$$\text{g prote3na en B.S. del C.P.} = 100 - \text{Humedad del CP (\%)}$$

Y finalmente para determinar la cantidad de plastificante que se adicion3 a la formulaci3n se realiz3 la siguiente formulaci3n:

$$2.75 \text{ g prote3na B.S. } \left( \frac{75 \text{ g Sorbitol}}{100 \text{ g prote3na B.S.}} \right) = 2.06 \text{ g Sorbitol}$$

Una vez conocida la cantidad de CP a pesar, se disolvi3 el concentrado prote3nico en la menor cantidad de agua destilada posible (20 mL aprox.) con un calentamiento leve y agitaci3n constante en una parrilla con agitaci3n magn3tica como la mostrada en la figura 11.



Fig. 11 Disoluci3n del concentrado prote3nico para el desarrollo de pel3culas

Después de disuelto, se ajustó el pH a  $11.5 \pm 0.01$  con NaOH 0.1N y se aforó con agua destilada a 55 mL con probeta. La formulación se calentó en baño con agua a 70 °C por 10 min (Fig. 12A), se filtró al vacío evitando formar espuma (solo en caso de percibir partículas no disueltas, de lo contrario se omitió este paso), se calentó nuevamente en el baño (70 °C /10 min) y se llevó al sonicador a desgasificar la formulación por 15 min (Fig 12B).



Fig 12. A) Baño de agua y B) Sonicador para el desarrollo de películas

Finalmente se vertió en una superficie limpia, plana y con antiadherente (sartén con teflón de 14 cm de diámetro, Fig 13). La formulación se dejó secar a temperatura ambiente (entre 19 y 25 °C) ya que de esta forma se evita que la película se deshidrate demasiado y se torne quebradiza con sin moverlo hasta que la película se despegó fácilmente por alrededor de 2 días.



Fig. 13 Formulación de la película en proceso de secado

## **Evaluación de las propiedades mecánicas y de barrera**

### **Acondicionamiento**

Previo a las pruebas de permeabilidad y de barrera las películas obtenidas se acondicionaron por un periodo de 48 h para mantenerlas a condiciones estándar de humedad relativa y temperatura ( $62 \pm 3\%$  HR y  $20 \pm 3$  °C), estas se colocaron en un desecador con una solución saturada de  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  como lo muestra la Fig. 14; midiendo la temperatura y humedad relativa con un termohigrómetro (Oakton, Japón).



Fig. 14 Proceso de acondicionamiento de películas

### **Medición del espesor**

El espesor de las películas fue medido con un micrómetro Mitutoyo (0.0001") en posiciones aleatorias en el perímetro y en el centro de la película.

### **Propiedades mecánicas**

Para evaluar las propiedades mecánicas de extensión y punción se utilizó el equipo de Sintech 1/S, MTS, USA el cual tiene abrazaderas diferentes para cada prueba y está conectado a una computadora para transferir la información de las pruebas realizadas en tiempo real.

El equipo proporciona el tiempo y fuerza requerida para romper la película y con ayuda de estos datos, se calcularon el esfuerzo y la deformación en cada caso. Adicionalmente se realizó un gráfico para calcular el módulo de young o módulo de elasticidad y que muestra también el comportamiento plástico de las películas. Un ejemplo del comportamiento típico obtenido al graficar dichos datos es el mostrado en la Fig. 15

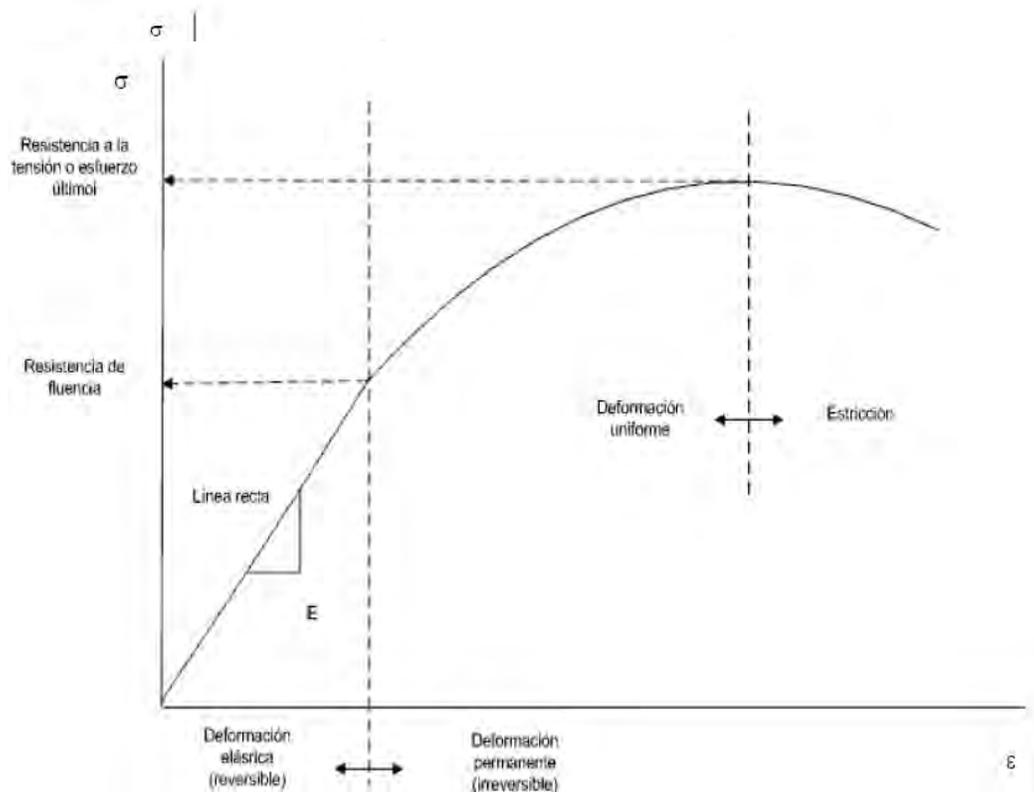


Fig. 15 Gráfico típico obtenido en las pruebas mecánicas <sup>a</sup>

La Figura 16 muestra lo que le sucede a la película mientras transcurre la prueba, delimitando las tres fases del comportamiento elástico de las películas:

Comportamiento elástico → línea recta con pendiente positiva de donde se calcula el módulo de Young y donde la película puede regresar a su forma original.

Comportamiento plástico → al sobrepasar el límite elástico la película se sigue estirando pero ya no puede regresar a su forma original.

Punto de ruptura → la peli <sup>a</sup>Propiedades Mecánicas: Curva Esfuerzo – Deformación Unitaria  
<http://www.uca.edu.sv/facultad/clases/ing/m210031/Tema%2008.pdf> 16/Feb/13

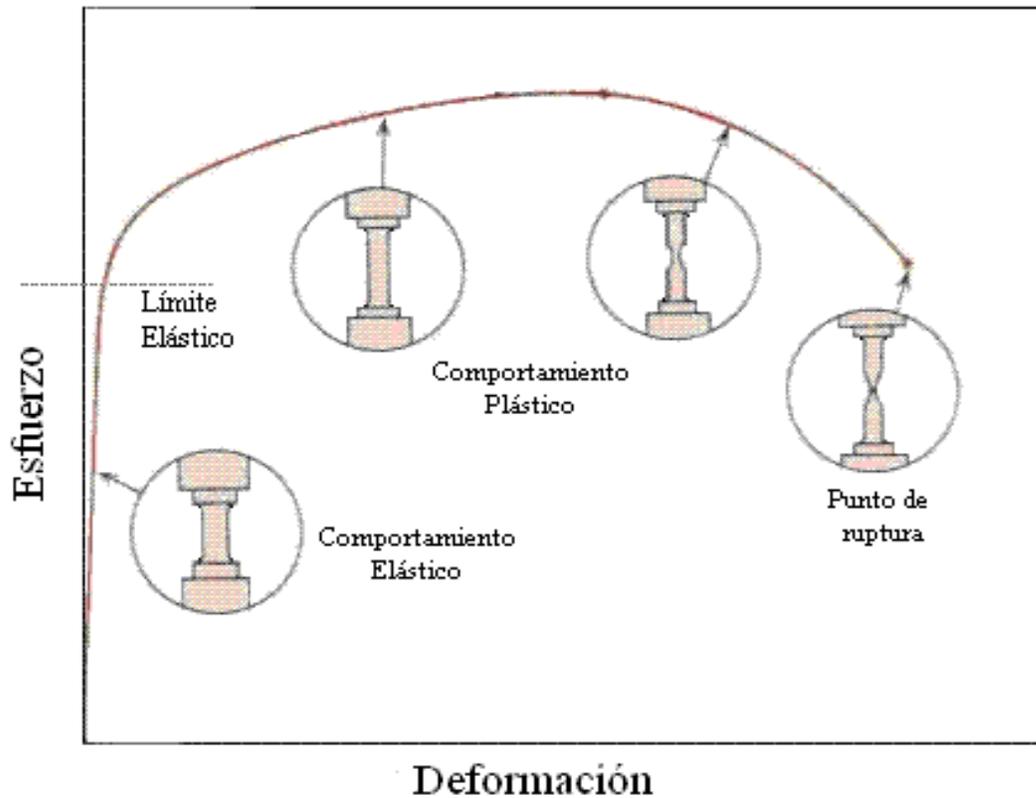


Fig. 16 Fases del comportamiento de la película durante la prueba

Los datos proporcionados por el equipo fueron tratados de la siguiente manera para poder determinar:

- Esfuerzo Nominal Verdadero ( $\sigma_v$ )
- Deformación de Hencky ( $\epsilon_H$ )
- Esfuerzo Máximo
- Módulo de Young

Esfuerzo Nominal

$$\sigma = \frac{F}{A} [=] \frac{N}{m^2} [=] Pa$$

Donde

A extensión → área inicial de la película  $A = \text{espesor} \times \text{ancho}$

A punción → área de la punta  $A = \pi \times r^2 = 1.33 \times 10^{-4} m^2$

Longitud

$$L = v \times t$$

Donde

v → velocidad constante de la prueba y t → tiempo

Deformación de Cauchy

$$\varepsilon = \frac{\Delta L}{L_0}$$

Donde

$\Delta L$  extensión → *Longitud al tiempo t – longitud inicial*

$\Delta L$  punción → *Longitud al tiempo t + 20mm*

Esfuerzo Verdadero

$$\sigma_v = \sigma (1 + \varepsilon)$$

Deformación de Hencky

$$\varepsilon_H = \ln (1 + \varepsilon)$$

Con los valores anteriores se construyeron las gráfica de Esfuerzo Verdadero ( $\sigma_v$ ) vs Deformación de Hencky ( $\varepsilon_H$ ), de esta gráfica se obtuvo el esfuerzo máximo en el eje Y, mientras que la pendiente de la zona inicial (parte lineal de la curva) es el módulo de Young.

## Fuerza de fractura en la extensión

Para esta prueba las películas basadas en proteína de piel de cazón fueron cortadas en tiras de 1 cm de ancho por 8 cm de largo. Dichas tiras se sujetaron de los extremos por medio de abrazaderas conectadas al equipo (Fig. 17) con una separación inicial de 5 cm para posteriormente estirarlas a una velocidad constante de 100 mm/min. La computadora registró en tiempo real la fuerza necesaria para romper las películas. La celda de carga de 100 N se usó en todas las mediciones.



Fig. 17 Representación del equipo en que se llevó a cabo la prueba de fractura en la extensión.

## Fuerza de fractura de punción

Para esta prueba las películas basadas en proteína de piel de cazón fueron cortadas en círculos de 9.5 cm de diámetro las cuales se sujetaron entre dos placas circulares con un orificio en el centro donde posteriormente una punta lisa de 13 mm de diámetro descendía

perpendicularmente a una velocidad constante de 240 mm/min (Fig. 18). La computadora registró en tiempo real la fuerza necesaria para romper las películas. El equipo fue previamente calibrado con una fuerza de 100N.

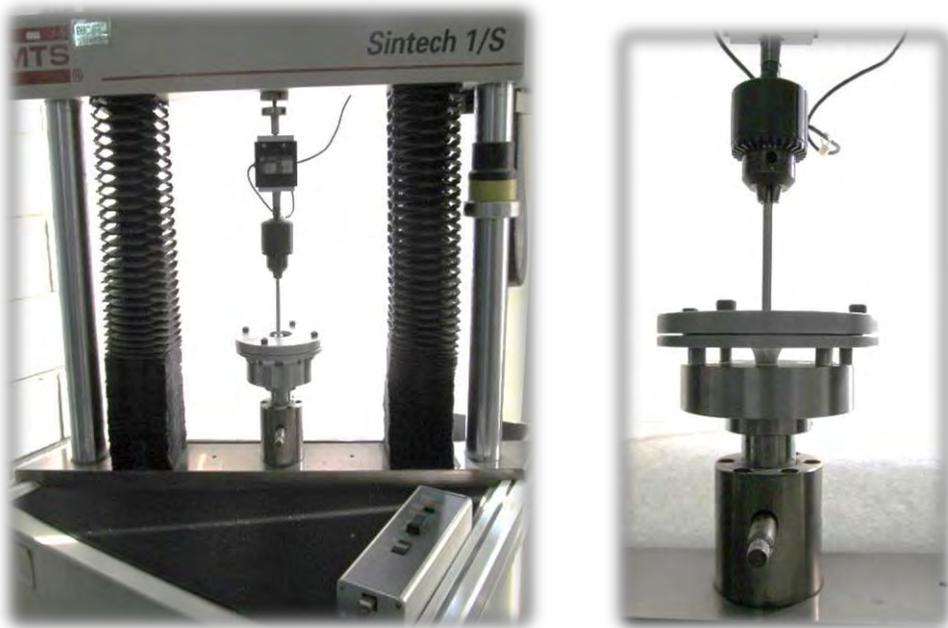


Fig. 18 Representación del equipo en que se llevó a cabo la prueba de fractura en la punción.

## **Propiedades de barrera**

### **Permeabilidad al vapor de agua (PVA)**

La permeabilidad al vapor de agua se determinó de acuerdo al método ASTM E96 / E 96M - 10. (2010). Este es un método gravimétrico que

consiste en determinar la cantidad de agua que pasa a través de la película y que absorbe el desecante (cloruro de calcio anhidro). De esta forma se puede obtener la permeabilidad mediante la determinación del coeficiente de transmisión de vapor de agua.

Para realizar la prueba el desecante se molió para homogenizarlo y se secó en estufa por 2 h, posteriormente se colocó en las celdas acrílicas cierta cantidad conocida dejando un espacio de cabeza de 1 cm, y se dejaron a peso constante en horno al vacío. Las películas basadas en proteína de piel cazón se cortaron circularmente con un diámetro de 7 cm y se fijaron en las celdas acrílicas a peso constante usando cuatro tornillos localizados alrededor de la celda que permiten sellarla herméticamente mediante un empaque.

A las celdas ensambladas se les determinó el peso inicial para posteriormente colocarlas en un desecador con una humedad relativa de  $61 \pm 2$  % HR lograda con una solución saturada de  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y temperatura de prueba de  $22 \pm 2$  °C, ambas condiciones fueron medidas con un termohigrómetro (Fig. 19). De esta manera la presión de vapor de agua en ambos lados de la película proporciona la fuerza que impulsa el vapor de agua a través de ésta. La ganancia de peso se midió cada 24 horas por 4 días. Los datos registrados fueron tratados de la siguiente manera para obtener la permeabilidad al vapor de agua:

Factor de Transmisión de vapor de agua

$$TVA = \frac{G/t}{A} [=] \frac{g}{h m^2}$$

Donde:

$G/t \rightarrow$  pendiente de la gráfica de ganancia en peso (g) vs tiempo (h)

Permeanza

$$Permeanza = \frac{TVA}{S \times R} [=] \frac{g}{h m^2 Pa}$$

Donde:

S → Presión de Vapor de Agua (Pa) a la Temperatura de prueba

R → Humedad Relativa

Permeabilidad al Vapor de Agua

$$PVA = Permeanza \times Espesor [=] \frac{g}{s m Pa}$$

Donde:

Espesor → Es el espesor promedio de la película evaluada



Fig. 19 Representación del equipo y la prueba de PVA

## Permeabilidad al Oxígeno

La permeabilidad al oxígeno se determinó de acuerdo al método ASTM D 1434-82 (2009), con el procedimiento volumétrico. De esta forma se puede obtener la permeabilidad a partir del coeficiente de transmisión

de oxígeno siguiendo el cambio con el tiempo del volumen generado por la transferencia de oxígeno a través de la película.

Se colocaron dos piezas de papel filtro en la parte superior de la celda volumétrica para después colocar las películas cortadas circularmente con un diámetro de 11.5 cm entre los dos compartimentos de la celda. Las películas se sujetaron a la celda para mantener las condiciones de hermeticidad con ayuda de cuatro tornillos colocados simétricamente.

Una vez ensamblada, la película fue sometida a una presión positiva durante 10 minutos con la válvula de escape abierta para purgar el aire en la celda y una vez hecho esto se cerró la válvula y se colocó en el centro de la celda el capilar con un diámetro de 0.5 mm ajustando a la presión de prueba a 29 psi (200 kPa) manométrica. Se tomó el tiempo con un cronómetro, de tal forma que la prueba tuvo una duración de 4 horas. La Fig. 20 muestra la representación del equipo utilizado para realizar esta prueba.

La permeabilidad al oxígeno se obtiene de la siguiente manera:

Velocidad de Transmisión de Gas

$$VTG = \frac{Vr \times \rho_o \times 10^{-6}}{A \times R \times T}$$

Donde:

$Vr \rightarrow$  Velocidad del líquido en el capilar [ $\text{mm}^3/\text{s}$ ]

$\rho_o \rightarrow$  Presión ambiental [Pa] (75993.75 Pa en C.U.)

$A \rightarrow$  Área de transmisión del espécimen [ $\text{mm}^2$ ] (1767.15  $\text{mm}^2$ )

$R \rightarrow$  Constante universal de los gases ideales [Pa L/mol K]  
( $8.314 \times 10^3$  Pa L/mol K)

$T \rightarrow$  Temperatura ambiente [K] (282.15 a 295.15 K)

Permeanza

$$Permeanza = \frac{VTG}{\Delta P}$$

Donde:

$\Delta P \rightarrow$  Diferencia de presión parcial de gas en ambos lados de la película  
(kPa)

Permeabilidad al Oxígeno

$$PO_2 = \text{Permeanza} \times \text{Espesor}$$

Donde:

Espesor  $\rightarrow$  Es el espesor promedio de la película evaluada



Fig. 20 Representación del equipo y la prueba de  $PO_2$

## CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSION

### Análisis Proximal de la Piel de Cazón

Se realizó un análisis químico proximal de la piel de Cazón con la finalidad de conocer la cantidad de proteína disponible para la extracción, se cuantificó también el resto de los componentes para conocer la materia prima: humedad, lípidos y cenizas por triplicado y para cada lote.

Tabla 2. Análisis químico proximal de la piel de pescado Cazón para n=3

(g / 100 g piel)

<b>Piel</b>	<b>Humedad</b>	<b>Proteína</b>	<b>Cenizas</b>	<b>Lípidos</b>
<b>LOTE 1</b>	65.91 ± 0.5 <sup>a</sup>	32.39 ± 1.4 <sup>a</sup>	2.04 ± 0.8 <sup>a</sup>	0.23 ± 0.2 <sup>a</sup>
<b>LOTE 2</b>	65.57 ± 2.1 <sup>a</sup>	31.51 ± 3.8 <sup>a</sup>	2.74 ± 0.4 <sup>b</sup>	0.23 ± 0.0 <sup>a</sup>
<b>Promedio</b>	65.8%	32.0%	2.4%	0.2%

Diferente letra indica diferencia significativa entre lotes con  $\alpha = 0.05$

De acuerdo a la Tabla 1 el componente mayoritario de la piel es la humedad con un promedio 65.8%. El contenido de humedad es muy variable dependiendo de la edad, especie y sexo, sin embargo el resultado no presentó diferencia significativa entre lotes y fue similar a la que reporta Castañeda (2011) de 61.8% para la piel de Cazón. De igual manera también es muy similar para otras especies como el Mero con 65.21% (Granados y Martínez, 2010) o la Raya con 73.25% (Castañeda, 2011).

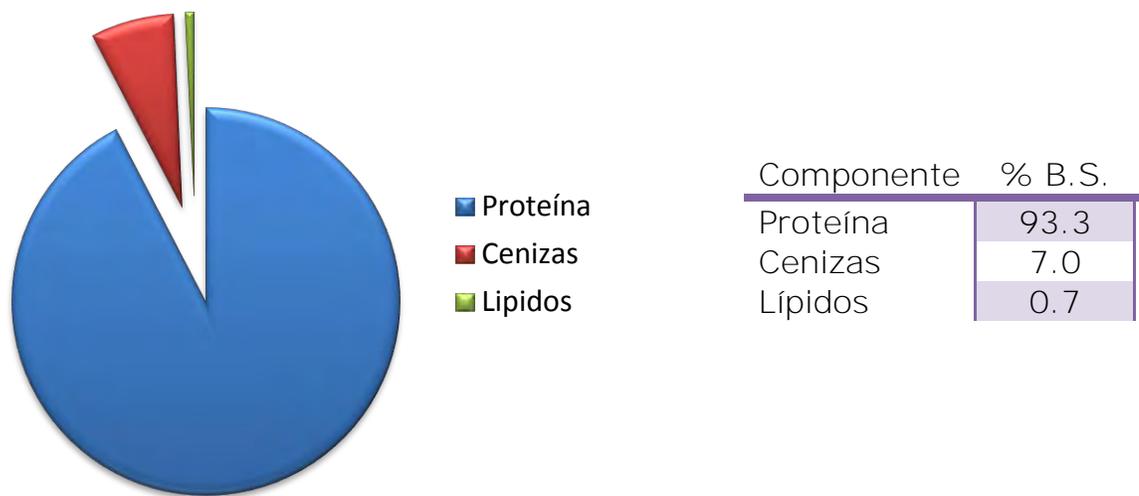


Gráfico. 1 Gráfico de los componentes de la piel de Cazón en Base Seca

De acuerdo al análisis composicional se determinó la aportación de cada componente en base seca como lo muestra el Gráfico 1. El segundo componente mayoritario es la proteína y debido a que la cantidad de cenizas y lípidos es mínima, al eliminar el contenido de agua la piel el Cazón se convierte en una buena fuente de proteína para la extracción con 93.3% de proteína el cual es incluso superior que el presentado para otras especies como el Mero con 75.8% (Granados y Martínez, 2010) o la Raya con 89.35% (Castañeda, 2011).

La piel de Cazón tiene la ventaja de presentar una cantidad de lípidos muy baja (0.7%) ya que un alto contenido como el del Mero (5.44%) podría interferir con el proceso de extracción o formación de películas, generando incluso películas con sensación grasosa.

Las cenizas son consideradas impurezas en el extracto proteínico por lo que el contenido inicial en la piel es un dato relevante. A pesar de que el Cazón tiene un alto contenido de cenizas en la piel en comparación con otras especies como Raya con 3.0% (Castañeda, 2011), el resultado fue

similar al obtenido por Castañeda para la piel de Cazón con 10.1%. La diferencia significativa de estos datos indica que estas impurezas son variables dentro de la misma especie, ya que se ve influenciado además de por la edad y sexo, por el medio en el que se desarrollan.

### **Variación en el Método de Precipitación**

De acuerdo a los resultados obtenidos, se calculó el rendimiento para cada método de precipitación respecto a la cantidad de proteína soluble del extracto alcalino correspondiente a los métodos: isoelectrico, salting out y con solventes.

Para el método de precipitación por solventes (etanol) se obtuvo un rendimiento de 3.82% de extracción de proteína respecto a la proteína soluble inicial. Este método requiere de un riguroso control de temperatura, ya que cuando se va adicionando el etanol (entre los primeros 20% del volumen total) al extracto proteínico la temperatura se eleva en hasta 10 °C debido al  $\Delta H$  negativo de hidratación de las moléculas del disolvente, la curva típica de temperatura para la adición del solvente orgánico lo muestra la Fig. 21, lo cual genera un efecto adverso y la proteína se desnaturaliza y no se precipita (Scopes, 1988).

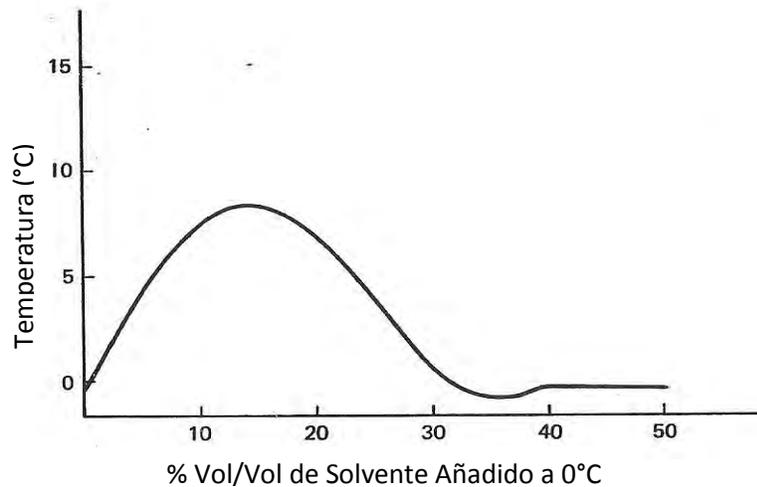


Fig. 21 Cambios de temperatura registrados mientras es añadido el solvente orgánico a la solución acuosa con un enfriamiento eficiente.

En el gráfico anterior se observa el efecto de calentamiento por hidratación, el cual alcanza su máximo alrededor del 15% del volumen añadido del solvente con un enfriamiento eficiente. Por lo que controlar la temperatura durante la primera fase de adición del solvente es un punto crítico del proceso para evitar la desnaturalización. Después del 20% del volumen añadido de solvente el efecto de calentamiento va decreciendo, en esta fase la temperatura ya no es un factor determinante en la desnaturalización de las proteínas.

En la Fig.22 se esquematiza la desnaturalización de las proteínas debido a un deficiente control de temperatura. La estructura proteínica se orienta de forma que expone sus residuos hidrofóbicos internos, estos interactúan con el solvente generando una ruptura de la estructura natural de la proteína.

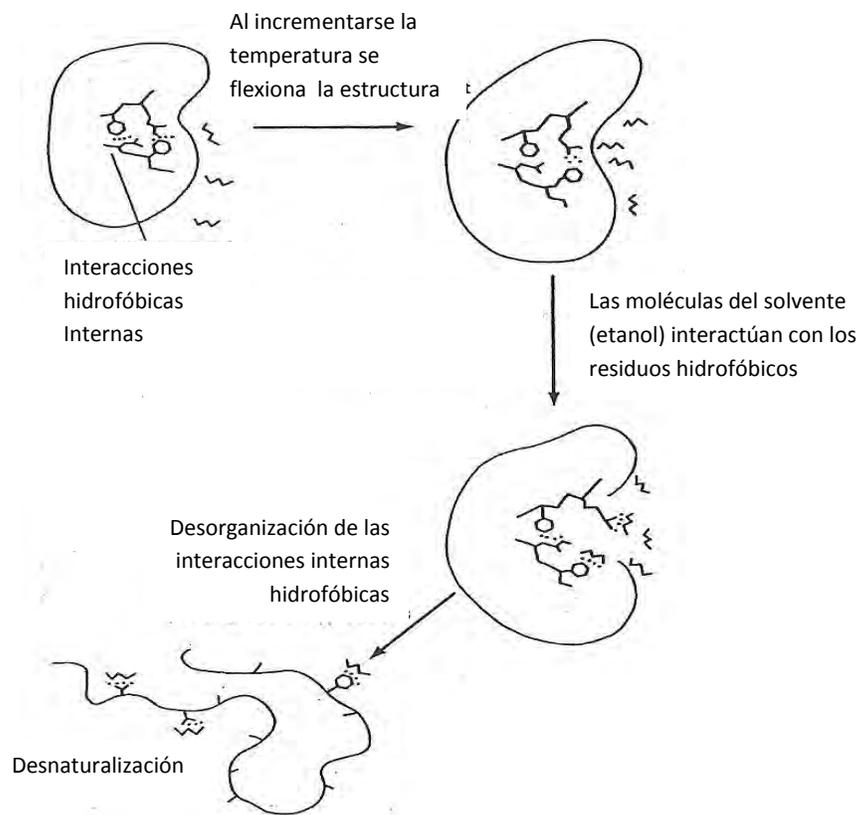


Fig. 22 Efecto de los solventes orgánicos que causa desnaturalización de proteínas

Este método de precipitación es usado principalmente a nivel industrial en donde el control de la temperatura es más eficiente, a nivel laboratorio resultó bastante complejo ya que si no se cuenta con un baño de temperatura controlada, la temperatura ambiental complica mucho el mantener bajo cero la temperatura. Como efecto adverso se encontró que el concentrado proteínico resultante es muy poco soluble en agua a las condiciones requeridas para la generación de películas (de pH neutro a básico y temperatura de 25 ° a 50 °C), por lo que probablemente la proteína precipitada se desnaturalizó al grado de evitar su disolución.

El método de salting out se realizó de manera fraccionada con sulfato de amonio. De acuerdo con Scopes (1988) Al inicio del fraccionamiento con 25% se precipitan las proteínas de menor peso molecular y más

hidrofóbicas por lo que el concentrado proteínico resultante fue insoluble en agua y buffer (desde pH ácido hasta álcali, y a temperaturas de hasta 50 °C). Esta fracción se descartó por completo para su uso en la formación de películas, ya que la disolución del concentrado proteínico es indispensable.

El concentrado proteínico del fraccionamiento al 50% de saturación resultó ser más soluble, debido a que la cantidad de sal disuelta concentra más la solución y se precipitan proteínas más grandes y menos hidrófobas, sin embargo, requiere aumentar la temperatura ligeramente para su disolución, lo que no interfiere con la formación de películas si no se desnaturalizan las proteínas (por lo que se debe mantener la temperatura por debajo de 45 °C).

Finalmente la fracción obtenida al 75% de sulfato de amonio fue completamente soluble, ya que se parte de proteínas más hidrófilas y de mayor peso molecular, su rendimiento disminuye en comparación con el obtenido con 50% de saturación, sin embargo, esto se explica porque una gran cantidad de proteínas ya ha sido precipitada y se parte de una solución con una concentración menor de estas.

Mediante el método de Salting out con sulfato de amonio se logró obtener los siguientes rendimientos para cada fraccionamiento: 2.56% al 25% de saturación, 19.11% al 50% de saturación, y 1.10% al 75% de saturación con base en la proteína soluble.

La Fig.23 muestra la cantidad de proteína precipitada de un extracto crudo de tejido a diferentes intervalos de saturación, siendo alrededor del 50% de saturación el fraccionamiento con mayor rendimiento de extracción. La curva sobrepuesta en el gráfico de barras representa el

rendimiento obtenido para la precipitación de la proteína soluble de Cazón a los diferentes porcentajes de saturación empleados.

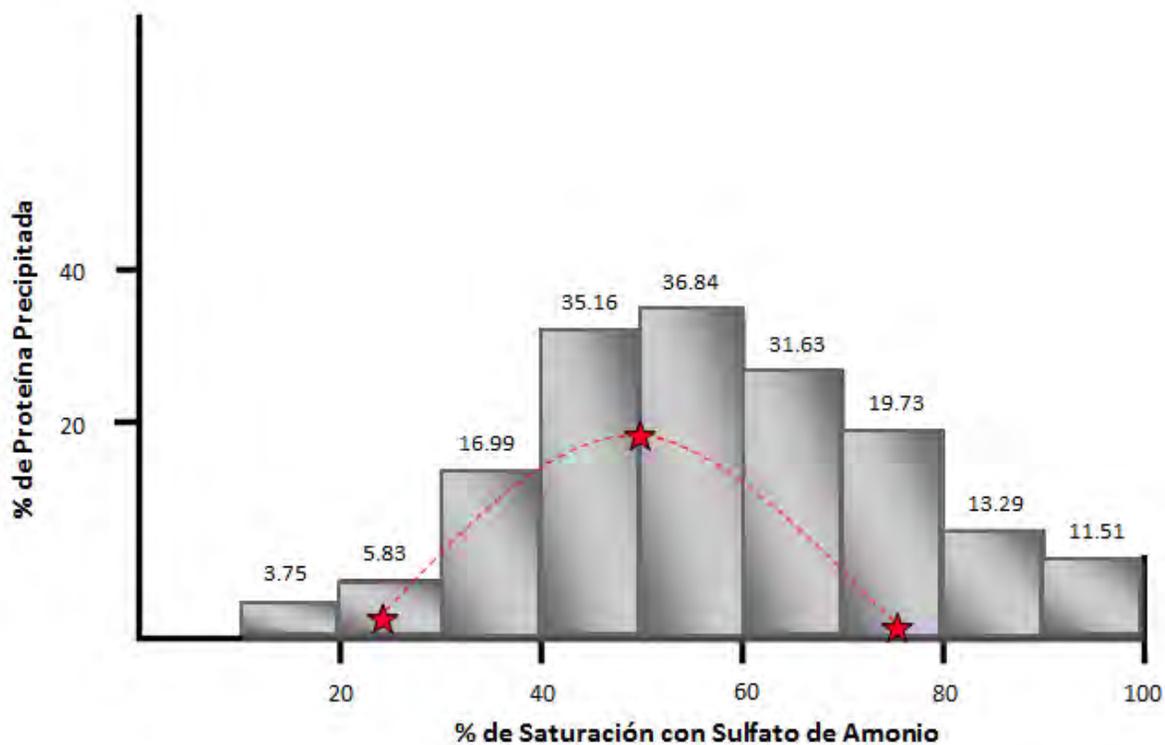


Fig. 23 Intervalos típicos de precipitación de proteínas de un extracto crudo de tejido con sulfato de amonio.

La curva punteada obtenida experimentalmente representa el rendimiento obtenido para la precipitación de la proteína soluble de Cazón a los diferentes porcentajes de saturación empleados, este gráfico tiene el máximo de precipitación en 50% de saturación y sigue una tendencia muy similar al representado gráficamente para el extracto crudo de tejido.

De acuerdo con los resultados se estableció que el 50% de saturación es suficiente para precipitar la mayor cantidad de proteína soluble, sin embargo, de ser necesario se puede recurrir a una precipitación continua y aumentar el porcentaje de saturación de sulfato de amonio hasta 75% para precipitar una mayor cantidad de proteína.

Con la finalidad de evidenciar si existe diferencia significativa entre la cantidad de proteína purificada a diferentes grados de saturación se realizó el análisis estadístico ANOVA y se realizó también la prueba estadística Diferencia Mínima Significativa (LSD) de Fisher, comprobando que existe diferencia significativa entre los rendimientos de purificación obtenidos para las diferentes grados de saturación.

Para el método isoeléctrico se obtuvo un rendimiento de 18.55% el cual es muy similar al obtenido para el método de Salting out con 50% de saturación de 19.11%; sin embargo, se deben tener en cuenta ciertas consideraciones: el método isoeléctrico tiene la ventaja de no tener que dializar el concentrado para realizar las películas con base en proteínas, mientras que con el método de Salting out al incrementar la concentración de sulfato de amonio y realizar un proceso continuo, se extrae una cantidad mayor de proteínas.

En la Tabla.3 se muestra la cantidad de proteína que se logró extraer de la piel al variar el método de precipitación, para hacer posible esta comparación se partió de la proteína del extracto soluble (PS) determinado por Lowry. Este extracto fue obtenido a las mismas condiciones por el método de extracción alcalino estándar (45 °C, pH=12, 2 h).

De acuerdo a los rendimientos reportados por Castañeda (2011) y Granados-Martínez (2010) se encontró que son muy similares a los

obtenidos experimentalmente para el Cazón: Castañeda (2011) con 22.56% para Raya y 19.01% para Cazón mientras que Granados y Martínez (2010) refieren un 26.80% para la piel de Mero (reportados como gramos de proteína precipitada/100 g proteína soluble).

En promedio, el rendimiento de la extracción total de la gelatina de pescado es más bajo que la gelatina de mamífero, dando aproximadamente entre 6% y 19% (expresada en gramos de gelatina seca por 100 g de piel limpia). El bajo rendimiento de extracción de la gelatina de pescado puede ser debido a la pérdida de colágeno extraído por lixiviación durante la serie de pasos de lavado o debido a la hidrólisis incompleta del colágeno.

Otros autores como Gómez-Guillén, et al. (2002) reportaron que el rendimiento de extracción varió ligeramente entre las especies de pescado (Lenguado: 8.3%; Gallo: 7.4%; Bacalao: 7.2% y Merluza: 6.5%). También observaron que la piel de Calamar requiere mayores temperaturas de extracción (80 ° C), pero incluso en estas condiciones, el rendimiento fue de sólo 2.6%, inferior a los rendimientos de la piel de los peces extraídos por un procedimiento más suave

Se encontraron también reportes de la gelatina de piel de Pargo patudo (*Priacanthus macracanthus*) y Pargo Rojo (*Lutjanus vitta*) con rendimientos de 6.5% y 9.4% sobre la base del peso húmedo, respectivamente (Jongjareonrak et al., 2006). Sin embargo, otros reportes indican rendimientos más altos de extracción total de proteína para las especies de Rohu: 12.93%; Carpa Común: 12.0% y Carpa grass 10.57% (Ninan, 2009) o la Perca de Nilo joven y viejo con rendimientos de 12.5% y 16% respectivamente (Muyonga et al., 2004).

Tabla.3 Rendimientos de extracción y precipitación obtenidos por los diferentes métodos de precipitación (n=3)

Método de Precipitación		PROCESO DE EXTRACCIÓN	PROCESO DE PRECIPITACIÓN		
		% Disolución (g PSI / 100 g Piel)	% Precipitación (g PP / PSI)	Rendimiento en BH (g PP / 100 g Piel B.H.)	Rendimiento en BS (g PP / 100 g Piel B.S.)
<b>Isoeléctrico</b>		31.59 ± 0.01	18.55	5.86 ± 0.32 <sup>a</sup>	6.28
<b>Solventes (Etanol)</b>		30.71 ± 0.13	3.48	1.07 ± 0.11 <sup>b</sup>	1.15
<b>Salting out</b>	25% de Saturación	27.31 ± 0.02	2.56	0.70 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.75
	50% de Saturación		19.11	5.22 ± 0.05 <sup>a</sup>	5.59
	75% de Saturación		1.10	0.30 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.32

Diferente letra (a,b) indica diferencia significativa con  $\alpha=0.05$

PP: Proteína Precipitada

PSI: Proteína Soluble Inicial

Además, se ha informado de que algunas proteasas endógenas termoestables presentes en la piel están implicadas en la degradación de las moléculas de gelatina (específicamente las cadenas  $\beta$  y  $\alpha$ ) durante el proceso de extracción a temperaturas elevadas.

Así, Nalinanon et al., (2008) prevé que la adición de un inhibidor de la proteasa adecuada junto con el proceso asistido por pepsina podría ser un medio eficaz para obtener un mayor rendimiento con una hidrólisis insignificante de los péptidos.

De hecho, se demostró que para la extracción de gelatina a partir del pargo patudo, el proceso asistido por pepsina en combinación con un inhibidor de la proteasa (pepstatina A) aumentó notablemente el rendimiento de 22.2% a 40.3% (rendimiento se calculó basándose en el contenido en hidroxiprolina de la gelatina en comparación con la de la piel antes de la extracción).

La variación de estos valores depende de las diferencias tanto en la composición proximal de las pieles y la cantidad de componentes solubles en las pieles (Muyonga et al., 2004), ya que estas propiedades varían con la especie y la edad de los peces.

Además, la variación en el método de extracción también puede tener un efecto sobre los rendimientos. El amplio intervalo en los rendimientos de gelatina también podría atribuirse a diferencias en el contenido de colágeno de la materia prima, sin embargo, esta información no siempre está disponible en los datos publicados (Songchotikunpan et al., 2008).

El rendimiento reportado de gelatina como peso de gelatina seca en comparación con el peso de la piel húmeda es común, pero no muy confiable. El contenido de agua puede variar debido a los diferentes tratamientos para la piel (congelación, salazón, raspado, drenaje, etc.) Por lo tanto, el rendimiento de gelatina debe ser reportado como la cantidad de gelatina seca en comparación con la cantidad de materia seca en la piel (Arnesen y Gildberg, 2007)

## **VARIACIÓN EN LA TEMPERATURA DE EXTRACCIÓN**

Al igual que el estudio realizado por Zhou y Regenstein (2004) sobre la optimización de las condiciones de extracción de gelatina de piel de abadejo, la optimización del proceso de extracción de proteína de Cazón, se enfocó en la variación de temperatura y pH, ya que como menciona Montero y Gómez (2000) el rendimiento y la calidad de la gelatina obtenida por los diferentes métodos de precipitación no sólo están influidas por la especie o el tejido del que se extrae, sino también por el propio proceso de extracción. Zhou y Regenstein (2004) reportan que los rendimientos variaron desde 3% a 19% de gelatina de piel de abadejo y estos son más sensibles a la temperatura de tratamiento previo y la concentración de  $H^+$ .

Para realizar esta comparación se partió de, método estándar de extracción alcalina y posterior precipitación con el método isoeléctrico.

El proceso de extracción alcalino utilizado está orientado a destruir ciertos enlaces químicos presentes en el colágeno así como para eliminar impurezas o material no deseado como cenizas y glicanos.

Durante la conversión de colágeno en gelatina, los enlaces inter e intramoleculares que unen las cadenas de colágeno así como algunos enlaces peptídicos se rompen, este es uno de los efectos poco reconocidos del tratamiento alcalino (También denominado "apertura del colágeno de la piel" en la fabricación de cuero) o la destrucción de los proteoglicanos asociados con las fibrillas de colágeno y mientras más severo sea el proceso de extracción, mayor es la extensión de la hidrólisis de los enlaces peptídicos y por lo tanto mayor es la proporción de péptidos con peso molecular bajo (Ninan, 2009).

Para evidenciar el efecto de la variación de la temperatura se realizó el balance proteínico obtenido por dos diferentes métodos de cuantificación de proteína (Kjeldahl y Lowry) como lo muestra la Tabla 4 con n=3.

El efecto de la temperatura sobre la extracción de proteínas fue muy significativo, ya que como se esperaba, al aumentar la temperatura de extracción las proteínas se hidrolizaron más logrando incrementar su disolución, en ambas determinaciones de proteína se evidencia de igual manera que la cantidad de proteína precipitada aumenta significativamente minimizando el desperdicio de proteína residual.

Tabla 4. Balance proteínico obtenido a diferentes temperaturas por el método estándar.

<b>Método de cuantificación de Proteína</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>g PSI / 100 g Piel B.H.</b>	<b>g PP/ 100 g Piel B.H.</b>	<b>g PR/ 100 g Piel</b>
<b>Kjeldahl</b>	40	4.63 ± 0.00	1.65 ± 0.00	2.36 ± 0.00
	45	5.35 ± 0.00	2.18 ± 0.00	2.37 ± 0.00
	50	10.91 ± 0.40	6.26 ± 0.00	2.56 ± 0.00
<b>Lowry</b>	40	2.55 ± 0.10	1.65 ± 0.10	0.46 ± 0.10
	45	3.23 ± 0.30	2.18 ± 0.00	0.60 ± 0.10
	50	11.14 ± 0.60	6.26 ± 0.20	0.85 ± 0.10

PP: Proteína Precipitada

PSI: Proteína Soluble Inicial

PR: Proteína Residual

Mediante los resultados obtenidos, se logró establecer que la temperatura óptima de extracción es de 50 °C obteniendo la máxima

cantidad de proteína soluble, a pesar de que tras la precipitación se pierda cierta cantidad de proteína, de igual manera los rendimientos de extracción para 50 °C son los mejores tal como lo muestra la Tabla.5 en los que se presentan los rendimientos obtenidos en cada caso.

Tabla.5 Rendimientos de extracción de proteína soluble y de proteína precipitada obtenidos al variar la temperatura de extracción alcalina.

<b>Temperatura (°C)</b>	<b>PROCESO DE EXTRACCIÓN</b>	<b>PROCESO DE PRECIPITACIÓN</b>		
	<b>% Disolución (g PSI/100 g Piel)</b>	<b>% Precipitación (g PP / 100 g Piel)</b>	<b>Rendimiento (g PP / 100 g Piel B.H.)</b>	<b>Rendimiento (g PP / 100 g Piel B.S.)</b>
<b>40</b>	14.5	35.9	5.2	1.8
<b>45</b>	16.7	40.7	6.8	2.3
<b>50</b>	34.1	57.5	19.6	6.7

PP: Proteína Precipitada

PSI: Proteína Soluble Inicial

Además de la temperatura de extracción, se sabe que la edad del animal fuente puede influir en la facilidad con la cual la gelatina puede ser extraída y la extensión de la hidrólisis del péptido durante la extracción. Y que mientras más viejo es el animal, el colágeno es más reticulado y requiere de un proceso más severo para desnaturalizar el colágeno y formar gelatina.

Cuando se utiliza el proceso alcalino con la piel joven, el álcali rompe los enlaces entrecruzados iniciales (piridinolina) y con calentamiento, se

libera el colágeno desnaturalizado, principalmente cadenas alfa en solución.

Una vez que los enlaces entrecruzados de pentosidina se han formado en el colágeno del animal maduro, el principal proceso de desnaturalización tiene que ser la hidrólisis térmica de los enlaces peptídicos, resultando en fragmentos de proteínas de diversos pesos moleculares, es decir fragmentos de proteínas polidispersos (Ninan, 2009).

## **VARIACIÓN DE pH A LA TEMPERATURA ÓPTIMA**

Una vez establecida la temperatura óptima de extracción, se procedió a variar el pH de la solución de NaOH, con la finalidad de aumentar el rendimiento de extracción de proteína aún más.

La naturaleza de la cadena proteínica, está provista de muchas cargas procedentes de los grupos básicos y ácidos colaterales de los aminoácidos y de los grupos  $-NH_2$  y  $COOH$  inicial y final. Estas cargas varían con el pH y hay un pH (punto isoeléctrico) en el que a lo largo de la molécula el número de cargas positivas y negativas es el mismo (la proteína es globalmente neutra).

El pH influye de manera decisiva en la solubilidad, en el punto isoeléctrico la solubilidad es mínima y la capacidad de cristalización es máxima (no hay repulsión y hay muchos puntos de polaridad); a pH extremos la solubilidad es máxima (Primo, 1995).

El método isoeléctrico en sí, permite altos rendimientos de recuperación de proteínas a partir de fuentes de procesamiento difícil como pescado,

pollo y subproductos de carne, además las proteínas recuperadas mantienen sus propiedades funcionales y su valor nutricional. (Reza et al., 2012).

La variación de pH a la temperatura óptima se realizó en dos lotes de pieles diferentes y por triplicado, en la Figura 24 se muestra el proceso de extracción de proteína en el cual se evidencia mediante la turbidez la cantidad de proteína soluble extraída.

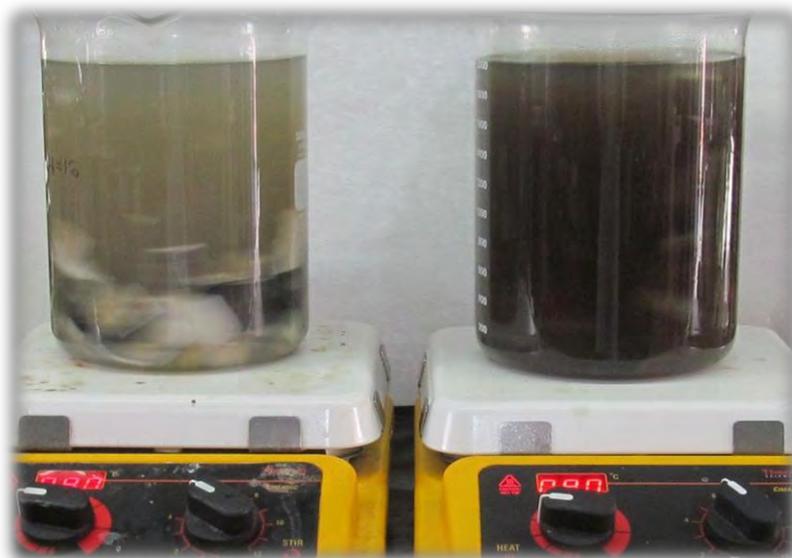


Fig.24 Proceso de Extracción de Proteína. Del lado izquierdo la suspensión extraída a pH =12 y del lado derecho la suspensión extraída a pH =13.6

En la Fig.25 se muestra el proceso de precipitación en el que se evidencia también que al aumentar el pH de extracción la solución proteínica la turbidez aumenta y se observa una mayor cantidad de precipitado proteínico.



Fig.25 Proceso de precipitación por el método isoelectrico del lado izquierdo la extracción a pH =12 y del lado derecho la extracción a pH =13.6

Para corroborar si el aumento de turbidez es relativo al aumento de la proteína soluble se determinó la cantidad de proteína total por el método de Kjeldahl en la proteína soluble inicial, en el concentrado proteínico resultante y en la proteína soluble residual (proteína soluble no precipitada) para realizar el balance proteínico que permitiera establecer los rendimientos de extracción y precipitación. La Tabla 6 muestra las cantidades de proteínas registradas para dos lotes de pieles diferentes y cada determinación se realizó por triplicado.

El lote 1 era una piel de un cazón más pequeño respecto al lote 2 que era un cazón más grande, de acuerdo al análisis de varianza ANOVA no existe diferencia significativa entre los lotes con un nivel de significancia del 95%, sin embargo, sí se nota una tendencia de aumento en la extracción de proteína soluble mientras más grande es el tamaño del pez Cazón.

Tabla. 6 Balance proteínico del proceso de extracción y precipitación a 50°C, pH de 12 y 13.6 para la Piel de Cazón

pH	Lote	Proteína Soluble Inicial	Proteína Soluble Precipitada	Proteína Soluble Residual	
		(g Proteína / 100 g Piel)			
<b>12</b>	1	A	10.52 ± 1.58	4.22 ± 1.30	4.18 ± 0.54
		B	11.19 ± 1.07	5.36 ± 0.50	3.53 ± 0.44
		C	16.80 ± 1.68	8.4 ± 2.55	8.08 ± 0.23
	2	A	9.36 ± 0.78	5.76 ± 5.76	1.39 ± 0.5
		B	10.13 ± 0.80	4.26 ± 1.52	3.28 ± 0.87
		C	5.78 ± 1.61	2.56 ± 1.90	0.62 ± 0.0
<b>13</b>	1	A	26.35 ± 2.67	7.97 ± 2.49	18.08 ± 3.66
		B	27.44 ± 1.80	10.65 ± 4.03	16.82 ± 0.0
		C	27.21 ± 0.88	8.49 ± 5.69	17.28 ± 3.44
	2	A	23.55 ± 0.87	6.50 ± 1.65	17.20 ± 0.0
		B	28.79 ± 2.46	6.26 ± 1.36	19.84 ± 0.00
		C	25.33 ± 2.55	5.43 ± 4.65	19.20 ± 2.20

Con la finalidad de simplificar los resultados en la Tabla 7 se muestran las cantidades de proteína promedio presentes en el extracto para

ambos lotes y el rendimiento de extracción con base en la materia prima en base seca.

Tabla.7 Cantidad de Proteína Soluble Inicial y Rendimiento obtenido respecto a la proteína en la Piel de Cazón (50°C, pH de 12 y 13.6)

<b>Factor de Variación</b>	<b>Lote</b>	<b>(g PSI/100 g Piel)</b>	<b>Rendimiento</b>
pH=12	1	12.84 ± 3.45	40.13
	2	8.42 ± 2.32	26.31
pH=13.6	1	27.00 ± 0.57	84.38
	2	25.89 ± 0.10	80.91
50° C	-	10.91 ± 0.42	34.10

De acuerdo al análisis Anova realizado, si existe diferencia significativa en cuanto a los diferentes tratamientos de pH, este efecto se evidencia en el rendimiento obtenido para cada lote, el aumento de pH de 12 a 13.6 resultó en el incremento del rendimiento de extracción de 2 veces mayor para el lote 1 y 3 veces mayor para el lote 2.

El incremento de pH en el proceso de extracción fue mucho más eficiente respecto al aumento de temperatura ya que se obtuvieron rendimientos de extracción mucho más altos con un promedio de 82.65% de extracción de proteína a partir de la materia prima (32 g Proteína/ 100 g Piel) respecto al rendimiento máximo obtenido a 50°C de 34% de extracción para la piel de Cazón.

De esta manera se establecieron las condiciones óptimas de temperatura y pH para el proceso de extracción que en conjunto hacen

el proceso mucho más eficiente hasta en un 80% de rendimiento. A partir de estos resultados, la temperatura de 50 °C y pH de 13.6 (proporcionado por NaOH 0.1N sin ajuste de pH) serán las condiciones del proceso de extracción.

Para el proceso de precipitación de proteína por el método isoeléctrico se calcularon los rendimientos a partir de la proteína soluble inicial obtenido a las condiciones óptimas de extracción. La Tabla 8 muestra las cantidades de proteína precipitada en promedio para ambos lotes y el porcentaje de precipitación con base en la materia prima en base seca.

Tabla.8 Cantidad de Proteína Precipitada (PP) y Porcentajes de Precipitación (50°C, pH de 12 y 13.6)

<b>pH</b>	<b>Lote</b>	<b>% Precipitación (g PP/100 g Piel)</b>	<b>% de Precipitación (respecto a PSI)</b>	<b>Rendimiento (g Prot/100gPiel B.S.)</b>
12	1	5.99 ± 2.16	46.65	6.3
	2	4.19 ± 1.60	49.76	4.57
13.6	1	9.04 ± 1.42	33.48	9.51
	2	6.06 ± 0.56	23.41	6.62
50°C	-	6.26 ± 0.02	19.60	6.70

De manera contrastante los rendimientos de proteína precipitada respecto a la cantidad de proteína soluble no mejoran al aumentar el pH, para el lote 1 decayó un 13.17% de pH=12 a pH=13.6 y para el lote 2 decayó un 26.35% de pH=12 a pH=13.6; lo cual puede deberse a que las condiciones del método de precipitación isoeléctrico no son suficientemente aptas para precipitar un extracto proteínico tan

concentrado como el obtenido a pH=13.6, por lo que se deben investigar otras opciones para precipitar la mayor cantidad de proteína soluble posible y aprovecharla.

Sin embargo, en promedio el porcentaje de proteína total extraído para el pH=12 es de 5.44 mientras que para el pH=13.6 es de 8.07, por lo que el extracto obtenido a pH de 13.6 en ambos lotes permitió la precipitación de más proteína soluble, aumentando 1.5 veces más para el lote 1 y 1.4 veces más para el lote 2. De igual manera el incremento de pH en el proceso de precipitación fue mucho más eficiente respecto al aumento de temperatura ya que se obtuvieron rendimientos más altos al pH=13.6 con un promedio de 8.07% respecto al rendimiento obtenido a 50°C de 6.07% de extracción para la piel de Cazón.

La influencia del tamaño del pez Cazón también se ve representada en los resultados, ya que mientras más grande es el pez (o más viejo) de la que se extrae la proteína (lote 2), menor es la cantidad de proteína que se logra obtener. Tal como lo menciona Ninan(2009) mientras más viejo es el pez, más reticulado es el colágeno presente en su piel y por lo tanto requiere de procesos más rigurosos de extracción. Por lo que adicionalmente se recomienda el uso de pieles de peces más jóvenes.

En base a los resultados, se comprobó que es posible la optimización del proceso de extracción y precipitación de proteína al modificar las condiciones de temperatura y pH.

## CARACTERIZACIÓN DEL CONCENTRADO PROTEÍNICO

Con la finalidad de conocer la naturaleza del extracto proteínico, se realizó el análisis proximal y la electroforesis del concentrado obtenido del proceso de variación de temperatura y de método de precipitación, los resultados se muestran en la Tabla 9.

Tabla.9 Análisis proximal del concentrado proteínico obtenido

Componente	<b>Método Isoeléctrico (Variación de Temperatura de Extracción)</b>			<b>Método Salting out</b>		
	40° C	45° C	50° C	25% *	50% *	75% *
Humedad	94.45 ± 0.19	86.74 ± 0.20	88.35 ± 0.24	87.83 ± 0.2	89.26 ± 1.18	91.44 ± 0.11
Proteína (B.S.)	84.13 ± 3.99	91.55 ± 1.91	91.81 ± 0.12	70.69 ± 2.67	83.84 ± 0.82	97.62 ± 2.16
Cenizas (B.S.)	1.6 ± 0.3	1.6 ± 0.49	1.64 ± 0.17	0.70 ± 0.09	0.11 ± 0.00	0.3 ± 0.04

\*dializado

El concentrado proteínico obtenido, presentó en general un contenido de proteína alto. La tendencia de aumento en la concentración de proteína respecto a la temperatura y/o porcentaje de saturación corroboró la eficiencia de los métodos, garantizando así que el extracto proteínico obtenido a 50 °C y el obtenido a 75% de saturación con sulfato de amonio contienen el más alto nivel de proteína. A mayor temperatura de extracción, se disuelve más proteína y por lo tanto, existe más proteína disponible para precipitarla, de igual manera mientras mayor sea el

porcentaje de saturación, mayor es la cantidad de proteína que se precipita.

Los extractos proteínicos presentaron un nivel bajo en cenizas, inferior al máximo recomendado de 2,6% (Ninan, 2009), por lo que se consideran extractos prácticamente puros. El proceso de diálisis brindó la ventaja de obtener un concentrado proteínico más puro, característica que se percibió mediante el color del concentrado, ya que este era más claro respecto a los obtenidos por el método isoelectrico no dializados. Es importante destacar que el proceso de diálisis fue clave importante al reducir el contenido de sal y cenizas del extracto proteínico del método salting out eliminando aún más impurezas respecto al concentrado del método isoelectrico.

Sin embargo, los diferentes contenidos minerales entre las pieles de las especies podrían estar asociados a diversas razones por lo que la naturaleza de la ceniza es importante. Por ejemplo, un 2% de  $\text{CaSO}_4$  en la gelatina puede tener una excelente claridad (Ninan, 2009).

Algunos resultados de la caracterización de gelatina obtenida en diversos estudios, son reportados en la Tabla 10.

Los resultados de caracterización del extracto proteínico obtenidos de diversas fuentes pesqueras son muy similares a los obtenidos experimentalmente para la piel de Cazón, lo cual nos da la seguridad de que la gelatina obtenida es de buena calidad no importando que los métodos de extracción y de precipitación usados en cada caso sean diferentes.

Respecto a la edad de las pieles, un estudio sobre la extracción de la gelatina de la piel y el hueso de la perca del Nilo de Muyonga et al. (2004) ha demostrado que la composición proximal de gelatina varia

con el tipo de tejido utilizado como materia prima, sin embargo en este caso no fue afectado por la edad del pez.

Tabla.10 Caracterización de gelatinas obtenidas de diversas fuentes pesqueras

Fuente	Humedad (% B.S.)	Proteína (% B.S.)	Lípidos (% B.S.)	Cenizas (% B.S.)
Cazón <sup>♥</sup>	--	84.1	--	--
Raya <sup>♥</sup>	--	78.5	--	--
Mero <sup>^</sup>	--	63.8	--	--
Escamas Pez Lagarto	10.5	86.9	0	2.33
Tiburón*	7.98	90.9	0.21	0.54
Carpa Gras <sup>♣</sup>	12.3	--	0.2	0.12
Pargo ojo grande <sup>♦</sup>	--	87.9	--	--
Pargo ojo marrón <sup>♦</sup>	--	88.6	--	--

<sup>♥</sup>Castañeda (2011)

\*Cho et al., (2004)

<sup>^</sup>Granados & Martinez (2010)

<sup>♣</sup>Kasankala et al., 2007

<sup>♦</sup>Jongjajareonarak et al., (2006)

En cuanto al contenido de humedad de la gelatina puede ser tan alta como 16%, sin embargo, normalmente es aproximadamente de entre 10% y 13% (McCormick, 1995).

Se evidenció que al utilizar cualquiera de los métodos de precipitación propuestos (Isoeléctrico y Salting out) se obtiene una gelatina de alta calidad, ya que los valores de impurezas (cenizas) se encuentran muy por debajo del contenido máximo recomendado de 2.6% (Jones, 1977).

## PESOS MOLECULARES. ELECTROFORESIS SDS-PAGE

Con la finalidad de evaluar el efecto de los diversos factores estudiados en la naturaleza de la proteína purificada, se prepararon geles al 10% de acrilamida para separar las proteínas de alto, medio y bajo peso molecular.

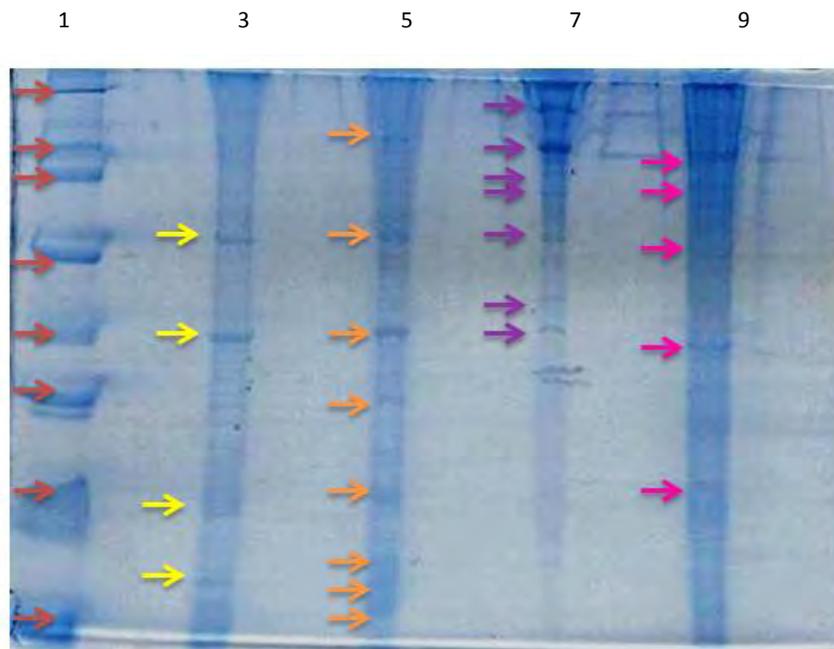
Durante la fabricación de gelatina, la conversión de colágeno a gelatina genera moléculas de diferente tamaño, debido a la incisión de enlaces entre cadenas cruzadas covalentes y la desfavorable rotura de algunos enlaces peptídicos intra-cadenas (Zhou et al., 2006). Como resultado, la gelatina obtenida tiene un peso molecular menor que el colágeno nativo, y consiste en una mezcla de fragmentos con pesos moleculares en el intervalo de 80-250 kDa (Poppe, 1997). En la Tabla 11 se muestran los pesos moleculares calculados por comparación de las diferentes muestras.

Tabla.11 Pesos moleculares de la proteína purificada obtenida a diferentes temperaturas y pH por el método isoelectrico.

	Marcador	40 °C pH12	45 °C pH12	50 °C pH12	50 °C pH13.6
<b>Alto peso molecular</b>	200.0 kDa			125.36 kDa	
	116.3 kDa	70.1 kDa	102.8 kDa	102.8 kDa	102.8 kDa
	97.4 kDa		117.8 kDa	100.8 kDa	100.8 kDa
			70.1 kDa	77.9 kDa	77.9 kDa
<b>Medio peso molecular</b>	66.2 kDa			70.1 kDa	
	45.0 kDa	46.9 kDa	46.9 kDa	51.7 kDa	67.3 kDa
	31.0 kDa			46.9 kDa	
<b>Bajo peso molecular</b>	21.5 kDa		19 kDa		
	14.4 kDa	17.7 kDa	10.3 kDa		
	6.5 kDa	8.4 kDa	8.4 kDa		46.9 kDa
			7.8 kDa		

Los pesos moleculares calculados fueron obtenidos de acuerdo al gel de electroforesis como se muestra en la Fig 26 en el que se corrieron las muestras.

De acuerdo a los cálculos presentados, al aumentar la temperatura de extracción se logró extraer y precipitar proteínas cada vez más grandes las cuales están asociadas al colágeno tipo I.



→ 1: Marcador de amplio rango. → 3: CP extraído a 40°C, pH=12. → 5: CP extraído a 45°C, pH=12.  
→ 7: CP extraído a 50°C, pH=12. → 9: CP extraído a 50°C, pH=13

Fig.26 Gel de Electroforesis SDS-PAGE del concentrado proteínico obtenido por el método isoelectrico a diferentes temperaturas y pH

Ninan (2009) menciona que las cadenas  $\alpha$  presentan un peso aproximado de 100 kDa y componentes  $\beta$  con un peso de alrededor de 200 kDa, típicas del colágeno de tipo I. La Tabla 11. Presenta valores calculados entre los cuales pueden encontrarse cadenas  $\alpha$  por los pesos

moleculares obtenidos entre 102 y 125 kDa presentes en la muestra obtenida a 50°C a pH=12 y pH=13.

Sin embargo, también se evidencia la gran mezcla de pesos moleculares que se obtienen ya que no existe un proceso selectivo de extracción de proteínas solubles. En el estudio realizado por Schrieber y Gareis (2007) mencionan que las gelatinas de mamíferos y pescado tienen una distribución poli-dispersa del peso molecular relacionada con la estructura de colágeno y proceso de producción. Además de diferentes oligómeros de las subunidades  $\alpha$ , también están presentes algunas cadenas  $\alpha$  intactas y parcialmente hidrolizadas, dando lugar a una mezcla que contiene moléculas de diferentes pesos moleculares.

Chiou et al., (2006) informaron que la gelatina de salmón y abadejo tenían perfiles ligeramente diferentes de peso molecular en comparación con la gelatina porcina. Además, las gelatinas de pescado contenían especies de menor peso molecular que no estaban presentes en la gelatina porcina.

De igual manera se realizaron geles al 10% de Acrilamida para conocer el peso molecular de las proteínas obtenidas mediante el método de precipitación salting out. La Tabla 12 muestra los pesos moleculares calculados por comparación de las muestras obtenidas por Salting out y en la Fig 27 el gel de electroforesis en el que se corrieron las muestras.

Tabla.12 Pesos moleculares de las proteínas obtenidas por el método de salting out.

	Marcador	50% Sat	75% Sat
<b>Alto peso molecular</b>	200.0 kDa		191.6 kDa
	116.3 kDa	114.5 kDa	117.4 kDa
	97.4 kDa		
<b>Medio peso molecular</b>	66.2 kDa	53.6 kDa	
	45.0 kDa	49.3 kDa	67.64 kDa
		46.9 kDa	45.74 kDa
	31.0 kDa	34.9 kDa	
<b>Bajo peso molecular</b>	21.5 kDa	26.9 kDa	
	14.4 kDa	19.5 kDa	
	6.5 kDa		

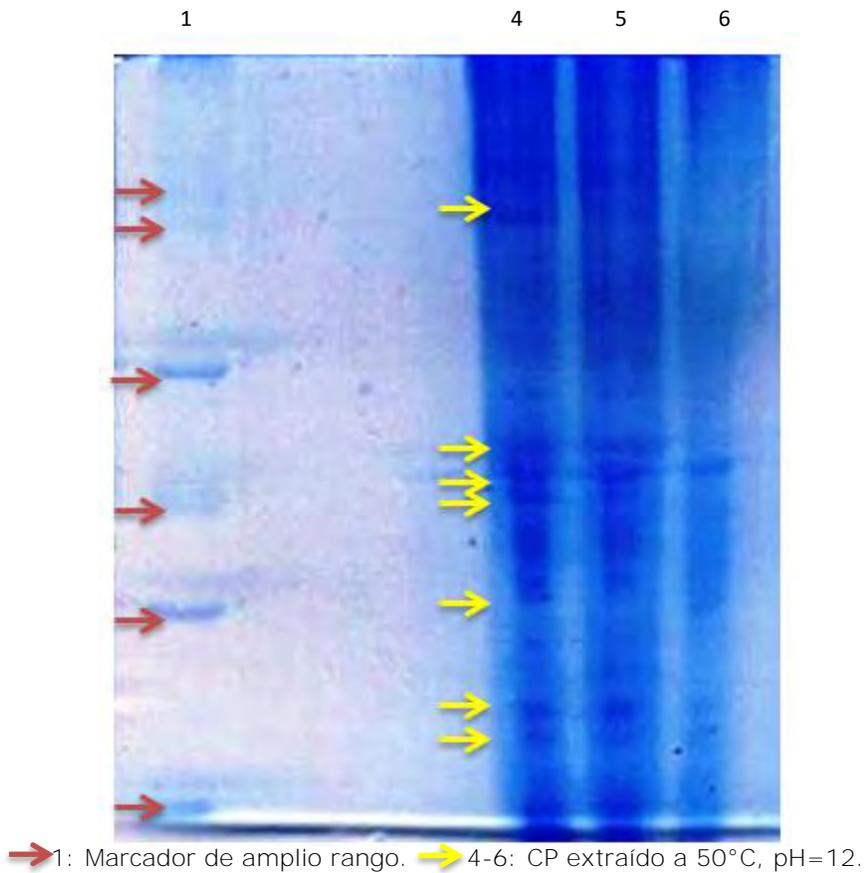
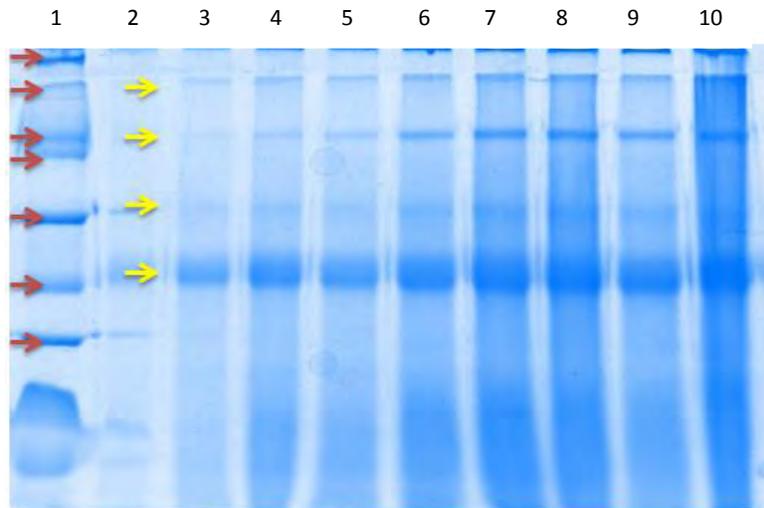


Fig.27 Gel de Electroforesis SDS-PAGE del concentrado proteínico extraído por el método salting out a 50% de saturación

La elaboración de la electroforesis de las muestras obtenidas al 25% de saturación, no pudieron realizarse debido a la nula solubilidad de esta fracción. Se realizó una prueba de solubilidad mediante el proceso secuencial de Osborne y Mendel (1914) y para la cuantificación de proteína soluble se utilizó el método de Lowry, sin embargo, las muestras contaban con una concentración muy baja de proteína soluble por lo que no pudieron hacerse las lecturas para su cuantificación. Recordando la teoría, las proteínas más pequeñas y menos solubles son las que precipitan primero, por lo que esta fracción contiene las proteínas menos solubles de la extracción alcalina.

La fracción del 50% de saturación es en cambio más soluble y proteínas más grandes se logran extraer con esta saturación, la banda con el peso molecular de 114.5 kDa podemos asociarla a la cadena  $\alpha$  del colágeno muy probablemente, aunque gracias a la electroforesis realizada se evidenció que esta fracción aún arrastra proteínas pequeñas y escasamente solubles, causando interferencia en la definición de las bandas ya que a pesar del proceso de diálisis arrastran impurezas evidenciadas en el gel por el barrido.

Para las muestras del concentrado proteínico extraído a 75% de saturación se corrió el gel de electroforesis como se muestra en la Fig 28.



1: Marcador de amplio rango. 2-10: CP extraído a 50°C, pH=12.

Fig.28 Gel de Electroforesis SDS-PAGE del concentrado proteínico extraído por el método salting out a 75% de saturación

Mediante estas electroforesis se logró evidenciar el efecto del fraccionamiento con sulfato de amonio, ya que para la última fracción al 75% de saturación solo se observan proteínas grandes, entre ellas muy probablemente cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , ya que se presentan bandas alrededor de 192 y 117 kDa. Esta fracción es totalmente soluble en agua corroborando nuevamente la teoría del fraccionamiento.

## EVALUACIÓN DE PELÍCULAS

Con el concentrado proteínico obtenido por los diferentes métodos de precipitación y por la variación de pH se desarrollaron las películas basadas en proteínas. A continuación se muestra la descripción de las películas obtenidas:



Película obtenida con el extracto proteínico a pH = 12  
Flexible, brillante, olor a pescado, color oscuro.



Película obtenida con el extracto proteínico a pH = 13.6  
Flexible, opaca, olor a pescado, color oscuro



Película obtenida con el extracto proteínico al 50% de saturación con sulfato de amonio.

Flexible, Translúcida, Ligero olor a pescado, Color beige

## **PRUEBAS MECÁNICAS**

El equipo utilizado para las pruebas mecánicas (Sintech 1/S) proporciona las variables fuerza y tiempo. A partir de estos datos se genera un gráfico para evidenciar el comportamiento plástico de la película.

Los cálculos y resultados obtenidos en las pruebas de extensión y punción para las películas de cada método se muestran a continuación.

### **Extensión**

La fuerza de extensión se define como la fuerza de tensión requerida para que un material se deforme hasta romperse, mediante la fuerza de extensión es posible determinar el esfuerzo aplicado (fuerza aplicada por unidad de área); así mismo, la deformación es el cambio de tamaño o forma de un cuerpo debido a la aplicación de una o más fuerzas sobre este. Gracias a estas propiedades es posible determinar la resistencia a la deformación de las películas basadas en proteínas y compararlas con otros materiales usados para el envase de alimentos. La Tabla.13 muestra las propiedades mecánicas de las películas estudiadas.

Tabla.13 Propiedades mecánicas de extensión de las películas de cazón obtenidas por los métodos de precipitación Isoeléctrico y Salting out (n=20)

Tipo de Película	Espesor ( $\mu\text{m}$ )	Esfuerzo de Fractura (MPa)	Deformación máxima (%)	Módulo de Young (MPa)	
<b>Método isoelectrico</b>	pH = 12	140 $\pm$ 31.0 <sup>a</sup>	4.84 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	91.9 $\pm$ 35.0 <sup>a</sup>	20.8 $\pm$ 11.0 <sup>a</sup>
	pH = 13.6	112 $\pm$ 38.0 <sup>a</sup>	1.32 $\pm$ 0.60 <sup>a</sup>	70.4 $\pm$ 29.0 <sup>b</sup>	10.5 $\pm$ 3.00 <sup>a</sup>
<b>Método Salting out</b>	50% sat	133 $\pm$ 68.0 <sup>a</sup>	2.55 $\pm$ 0.70 <sup>a</sup>	64.4 $\pm$ 21.0 <sup>b</sup>	11.3 $\pm$ 3.00 <sup>a</sup>

Diferente letra indica diferencia significativa con  $\alpha=0.05$

Las películas elaboradas de la gelatina obtenida por los diferentes métodos de precipitación no muestran diferencias significativas en cuanto al esfuerzo de fractura y el módulo de Young, sin embargo, la tendencia muestra que las películas de pH=12 son más elásticas ya que presentan un módulo de Young mayor y son más plásticas respecto a las demás por obtener los valores más altos en la deformación máxima o resistencia a la ruptura.

El análisis estadístico ANOVA no muestra diferencia significativa en el espesor de las películas, por lo que este no es un factor que influya en las diferencias encontradas para la deformación máxima de las películas.

Las propiedades mecánicas de películas de origen sintético y de otras fuentes son mostradas en la Tabla.14, mientras que las

representaciones gráficas del comportamiento típico para cada método se muestran en las gráficas 2, 3 y 4.

Tabla.14 Propiedades mecánicas de extensión para películas de diversas fuentes.

Tipo de Película	Esfuerzo de Fractura (MPa)	Deformación máxima (%)
Colágeno : Sorbitol : Glicerina (8.8 : 0.8 : 1)	8.7	49
Colágeno : Glicerina (3.4 : 1)	10.7	43
Gluten de trigo : Proteína de soya: Glicerina (1.75:0.75:1)	4.4	233
Proteína de soya : Glicerina (1.7:1) pH=8	4.3	78
LDPE	8.6-17.3	500
HDPE	17.3-34.6	300
PET	175	70-100

(Krochta et al., 1994)

Las propiedades de las películas basadas en proteínas de pez Cazón son muy similares a las películas elaboradas a partir de otras fuentes de proteínas como la soya y el trigo, sin embargo, se debe de tener en cuenta que las comparaciones entre las propiedades de las películas se deben de hacer con cuidado ya que además de la fuente, dependen de otros factores como el proceso de extracción, instrumentos, parámetros

y acondicionamiento que pueden tener un impacto significativo en las propiedades de las películas (Krochta et al., 1994).

En cuanto a las películas sintéticas presentadas en la Tabla: PET, HDPE y LDPE la diferencia es muy marcada. Estos materiales son de los más empleados en la elaboración de envases alimenticios, por lo que la investigación en la mejora de las propiedades mecánicas de las películas basadas en proteínas debe ser mucho más extensa para lograr mejorar el desempeño de estas y ampliar sus posibilidades de uso.

Gráfico.2 Comportamiento promedio de las películas obtenidas por el método Isoeléctrico a pH=12

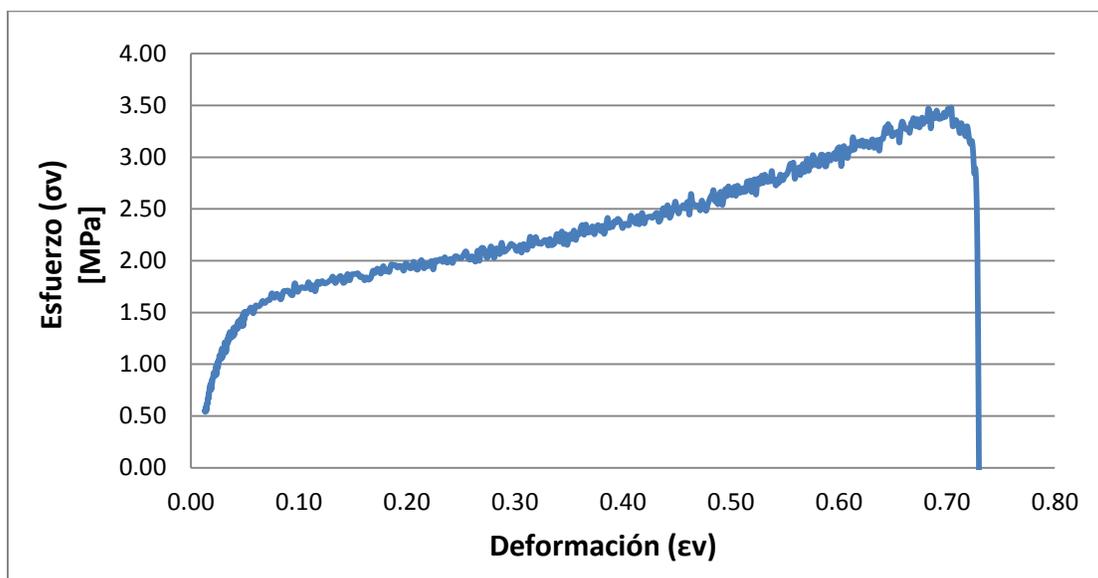


Gráfico.3 Comportamiento promedio de las películas obtenidas por el método Isoeléctrico a pH=13.6

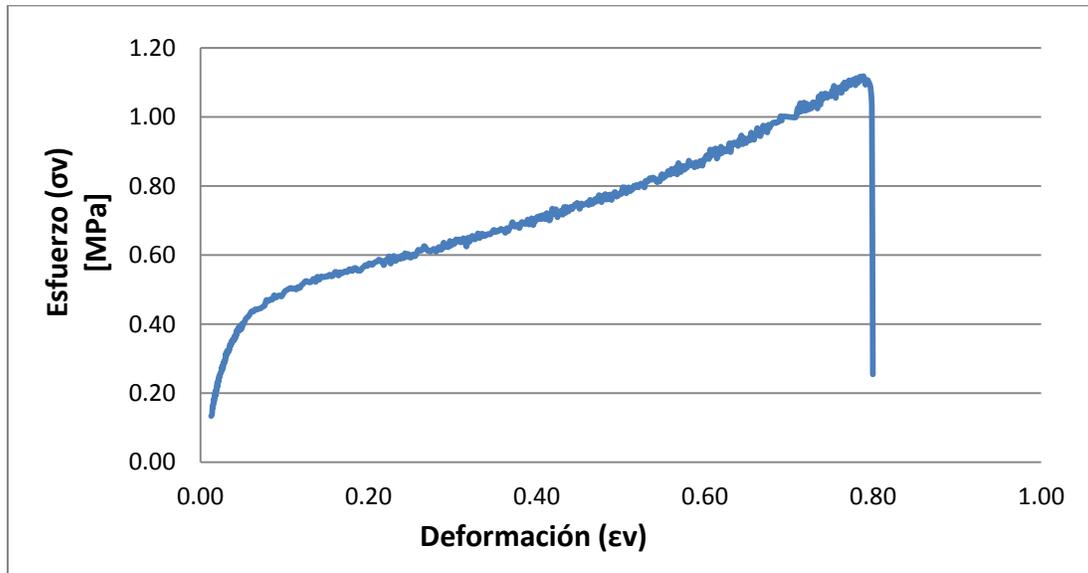
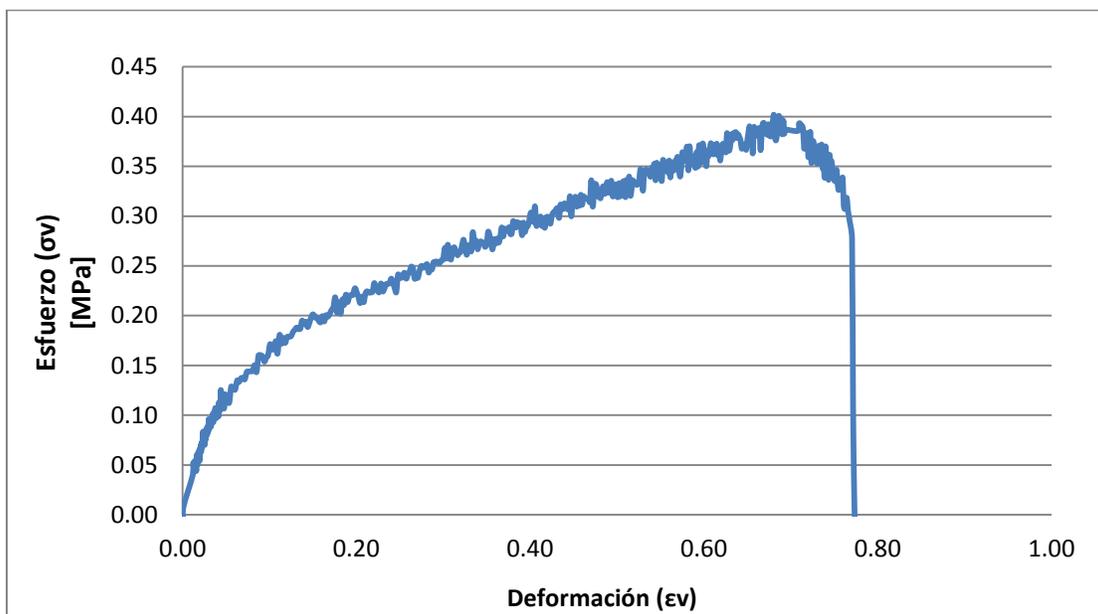


Gráfico.4 Comportamiento promedio de las películas Salting out



En los tres casos observamos que el comportamiento plástico es similar, es decir su deformación es considerablemente parecida; sin embargo existe una gran diferencia en el punto de estrés máximo ya que las películas elaboradas a pH=12 resultan ser más resistentes a la fractura ya que requieren un esfuerzo mayor para romperse.

## Punción

La evaluación de la punción de las películas es un complemento de la evaluación de las propiedades mecánicas, estas muestran un comportamiento similar y no presentan diferencia significativa en ninguna de las propiedades calculadas. La Tabla 15 muestra los resultados obtenidos para esta prueba.

Tabla. 15 Propiedades mecánicas de punción de las películas de Cazón obtenidas por los métodos de precipitación Isoeléctrico y Salting out n=6

Tipo de Película		Espesor ( $\mu\text{m}$ )	Esfuerzo de Punción (kPa)	Deformación máxima (%)
Método isoeléctrico	pH = 12	123 $\pm$ 16 <sup>a</sup>	339.6 $\pm$ 215 <sup>a</sup>	69.3 $\pm$ 0 <sup>a</sup>
	pH = 13.6	114 $\pm$ 25 <sup>a</sup>	353.3 $\pm$ 105 <sup>a</sup>	69.3 $\pm$ 0 <sup>a</sup>
Método Salting out	50% sat	97 $\pm$ 32 <sup>a</sup>	296.3 $\pm$ 99 <sup>a</sup>	69.3 $\pm$ 0 <sup>a</sup>

Mediante estos resultados y el análisis estadístico ANOVA se puede deducir que la variación en el método de precipitación de proteína no tiene un efecto significativo en las propiedades mecánicas de punción de las películas desarrolladas.

Los gráficos 5, 6 y 7 son representativos de las muestras obtenidas con los diferentes métodos de precipitación y variación de pH.

En los tres casos observamos que el comportamiento plástico o la deformación es muy diferente, sin embargo esto se observa de esta manera ya que difieren hasta después de 4 cifras decimales en la deformación, en realidad y de acuerdo al análisis estadístico su deformación es considerablemente parecida. De la misma manera existe una gran similitud en el punto de estrés máximo, pero el esfuerzo que requieren para romperse es muy pequeño por lo que en ningún caso se consideran valores ideales.

Gráfico.5 Comportamiento promedio de las películas obtenidas por el método isoeléctrico a pH=12

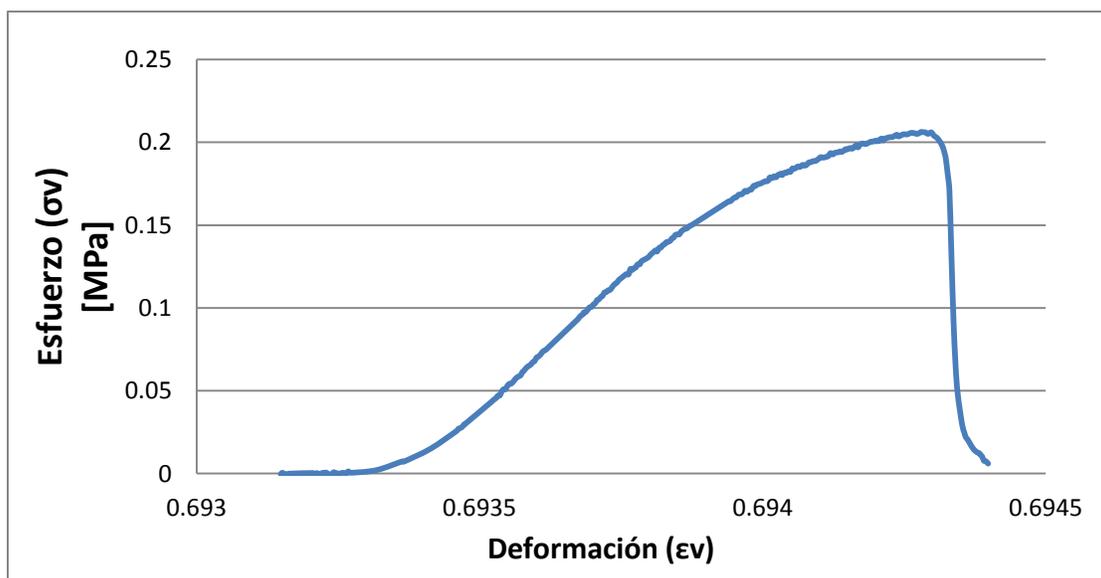


Gráfico.6 Comportamiento promedio de las películas obtenidas por el método isoelectrico a pH=13.6

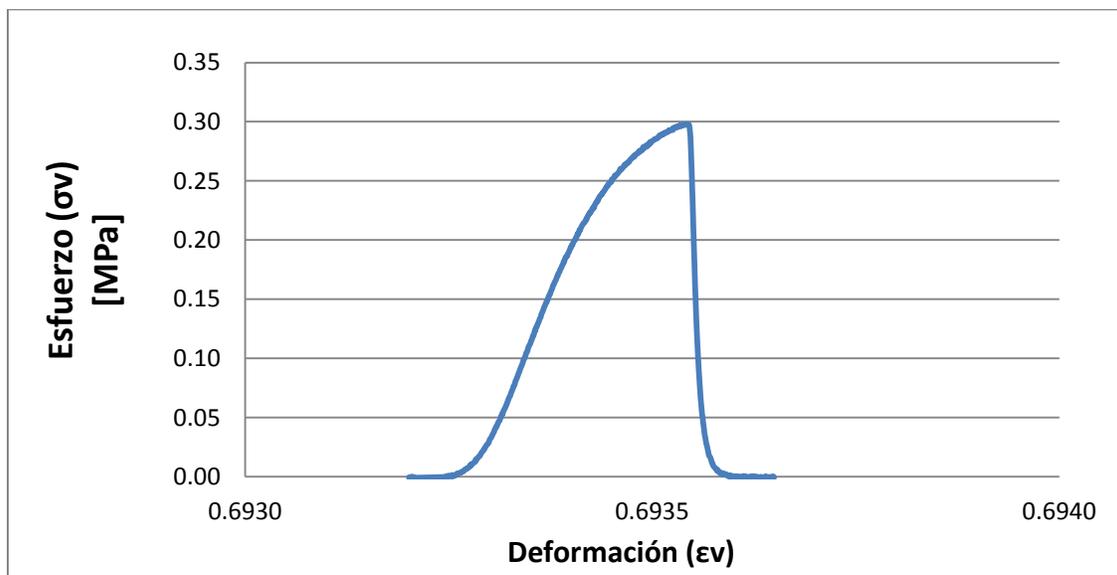
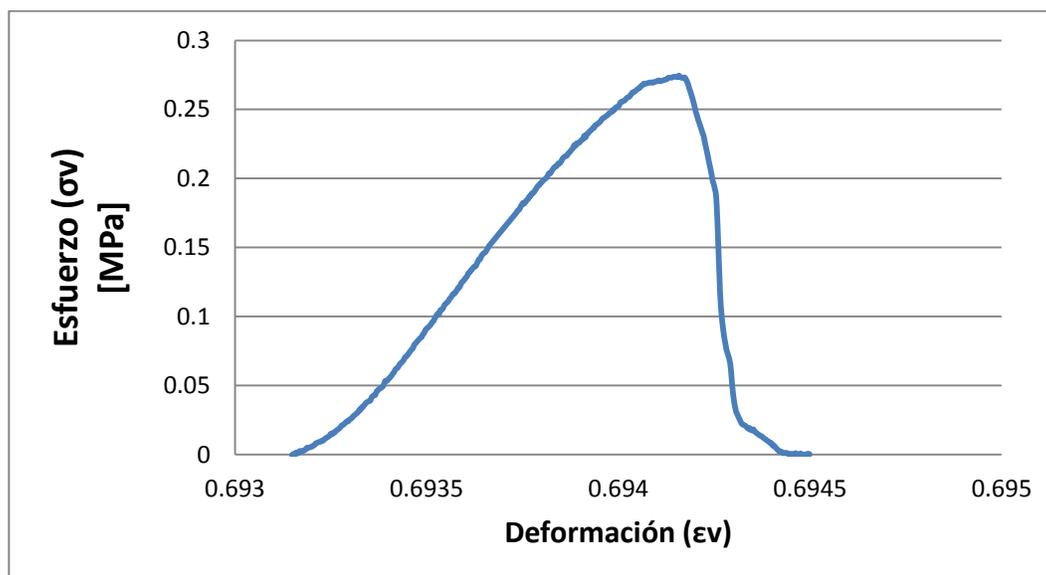


Gráfico.7 Comportamiento promedio de las películas obtenidas por el método Salting out



## **PRUEBAS DE BARRERA**

La Permeabilidad al Vapor de Agua (PVA) y la Permeabilidad al Oxígeno (PO) son las propiedades de barrera más comúnmente investigadas para evaluar la habilidad de las películas basadas en proteínas de proteger alimentos del ambiente y (en el caso de PVA) de componentes adyacentes con actividad acuosa diferente (Krochta et al., 1994).

### **Permeabilidad al Vapor de Agua (PVA)**

La filtración de vapor de agua en el empaque puede causar un aumento en la humedad que puede provocar empañamiento o crecimiento microbiano en el alimento. Mientras que si el vapor de agua se escapa del empaque, puede causar una pérdida de humedad que se verá reflejada en cambios indeseables en la textura del alimento (Castañeda, 2011).

La naturaleza hidrofílica de las proteínas de colágeno que son extraídas por los diferentes métodos de precipitación, son en general las principales responsables de los altos valores obtenidos para la permeabilidad al vapor de agua, al formar las películas las proteínas mantienen su gran afinidad por el agua evitando que estas sean buenas barreras a la humedad.

A continuación se muestran los resultados obtenidos por el método ASTM E96-00 (2003) para la permeabilidad al vapor de agua en la Tabla.16

Tabla.16 Permeabilidad al vapor de agua de las películas basadas en proteínas elaboradas a partir de diferentes métodos de precipitación n=3

<b>Tipo de Película</b>	<b>Condiciones de Prueba (T y HR)</b>		<b>Espesor (μm)</b>	<b>Permeanza (g/h m<sup>2</sup> Pa)</b>	<b>PVA (ng/Pa s m)</b>
<b>Método Isoeléctrico</b>	pH =12	21°C; 63%HR	143 ± 47 <sup>a</sup>	6x10 <sup>-6</sup> ± 1x10 <sup>-6</sup> <sup>a</sup>	0.99 ± 0.35 <sup>a</sup>
	pH =13.6	20°C; 60%HR	152 ± 33 <sup>a</sup>	1x10 <sup>-5</sup> ± 3x10 <sup>-6</sup> <sup>b</sup>	1.7 ± 8x10 <sup>-4</sup> <sup>b</sup>
<b>Método Salting out</b>	50% sat	20°C; 61%HR	108 ± 13 <sup>a</sup>	7x10 <sup>-6</sup> ± 8x10 <sup>-7</sup> <sup>a</sup>	0.76 ± 0.05 <sup>a</sup>

Diferente letra indica diferencia significativa con  $\alpha=0.05$

Al comparar la PVA entre los diferentes métodos de precipitación se observa que las películas provenientes del método isoelectrico a pH=13.6 son las más hidrofílicas, esto se debe muy probablemente a que a este pH el método isoelectrico logra precipitar una mayor cantidad de proteínas entre ellas algunas más polares. De manera contrastante, el fraccionamiento del método salting out permitió reducir la precipitación de proteínas solubles disminuyendo también la permeabilidad al vapor de agua.

En la Tabla 17 se muestran la permeabilidad de otras películas basadas en proteínas y de películas sintéticas.

Tabla.17 Permeabilidad al vapor de agua de películas sintéticas y de otras fuentes.

Tipo de Película		Condiciones de Prueba (T y HR)	Espesor (µm)	PVA (ng/Pa s m)
Películas Comestibles Basadas en Proteínas	Gluten: Glicerina (2.5: 1)	26°C 50-100% HR	140	1.26
	Proteína de Suero: Glicerina (1.6: 1)	25° C 0-65% HR	121	1.39
Películas Comestibles Basadas en Polisacáridos	SA: PA: HPMC: PEG	25° C 97-65% HR	41	0.022
	Cera de abeja: MC,PEG (11.3: 4)	25° C 97-65% HR	50	0.017
Películas Basadas en Lípidos	Parafina	25° C 0-100% HR	---	$2.2 \times 10^{-4}$
	Cera Candelilla	25° C 0-100% HR	90-110	$1.8 \times 10^{-4}$
Películas de Empaques Sintéticos	LDPE	38° C 0-90% HR	---	$9 \times 10^{-4}$
	HDPE	38° C 0-90% HR	---	$2 \times 10^{-4}$
	Celofán	38° C 0-90% HR	---	0.084

(Krochta et al., 1994)

La permeabilidad es proporcional a la naturaleza hidrofílica del material con el que se elaboran las películas, de tal modo que la base de proteínas aunado con el plastificante sorbitol generan las películas más hidrofílicas. Las películas elaboradas presentan valores más altos de PVA

respecto a las basadas en polisacáridos y en lípidos cuya naturaleza hidrofílica es menor o prácticamente nula. A pesar de los bajos valores de PVA obtenidos por las películas basadas en lípidos, las películas sintéticas son aún más eficientes como barrera a la humedad, por lo que las películas basadas en proteínas podrían complementarse con lípidos con la finalidad de disminuir la PVA y aumentar su eficiencia como barrera.

### **Permeabilidad al Oxígeno (PO<sub>2</sub>)**

El oxígeno es un factor importante en el deterioro de los alimentos, ya que favorece el crecimiento de microorganismos patógenos, propicia reacciones de oxidación de lípidos así como alteraciones de color en los alimentos. Por estas razones el implementar empaques que protejan al alimento de la interacción con el oxígeno es fundamental para alargar la vida de anaquel del producto.

La permeabilidad a diferentes gases de los materiales plásticos es de considerable importancia en muchas aplicaciones. A menudo puede ser deseable para lograr un cierto grado de permeabilidad a ciertos gases determinados, en lugar de producir un empaque completamente impermeable (Ninan, 2009).

Sin embargo, y por el gran riesgo que implica las interacciones del oxígeno con el alimento, se busca generar películas que disminuyan el intercambio del gas del ambiente con el alimento.

La Tabla.18 muestra los resultados obtenidos para las diferentes películas elaboradas por los métodos de precipitación.

Tabla.18 Permeabilidad al Oxígeno de las películas elaboradas a partir de diferentes métodos de precipitación n=3

Tipo de Película		Espesor ( $\mu\text{m}$ )	PO <sub>2</sub>
<b>Método Isoeléctrico</b>	pH =12	126 $\pm$ 34	No hay
	pH =13.6	197 $\pm$ 20	No hay
<b>Método Salting out</b>	50% saturación	175 $\pm$ 35	No hay

Las películas de proteínas son excelentes barreras a los gases, particularmente a bajos valores de Humedad relativa (Hr) (Krochta et al., 1994). En todos los casos estudiados, se determinó la ausencia de permeabilidad al oxígeno, esto debido probablemente a la red homogénea y muy compacta generada en la polimerización de la película entre las proteínas y el plastificante, lo que impide la difusión de las moléculas de oxígeno a través de ella.

A través de los datos reportados en la Tabla 19 para películas elaboradas a partir de diversas fuentes, se puede evidenciar la influencia de la Hr en la permeabilidad, ya que tanto en los casos de las películas elaboradas a partir de colágeno, proteína de suero y celofán se observa que al aumentar la HR se incrementa la permeabilidad al oxígeno.

A pesar de que la Hr es muy alta en las pruebas realizadas a las películas basadas en proteínas de Cazón, los resultados de permeabilidad son muy bajos respecto a las películas basadas en polisacáridos y lípidos. Además los resultados obtenidos para las películas de Cazón demuestran la eficiencia de estas sobre las películas sintéticas en cuanto a la permeabilidad al oxígeno proporcionándoles la funcionalidad de protectoras de alimentos.

Tabla19 Permeabilidad al O<sub>2</sub> de películas sintéticas y de diversas fuentes

Tipo de Película		Condiciones de Prueba (T y HR)	Espesor (μm)	PO <sub>2</sub> (cm <sup>3</sup> μm/m <sup>2</sup> d kPa)
Películas Comestibles Basadas en Proteínas	Colágeno	23°C 0% HR	---	1.2
	Colágeno	23° C 63% HR	---	23.3
	Colágeno	23° C 93% HR	---	890
	Proteína de Suero : Sorbitol (1.5:1)	23° C 30% HR	118	1.03
	Proteína de Suero : Sorbitol (1.5:1)	23° C 75% HR	118	144.92
	Proteína de Suero : Sorbitol (1:1)	23° C 40% HR	118	2.35
Películas Comestibles Basadas en Polisacáridos	AM : HPC : PEG (9:9:3)	30° C 0% HR	150	298
	Almidón	24° C	--	13,130
Películas Basadas en Lípidos	Cera de Abeja	25° C 0% HR	40-50	931.7
	Cera Candelilla	25° C 0% HR	40-50	175.4
Películas de Empaques Sintéticos	LDPE	23° C 50% HR	---	1870
	HDPE	23° C 50% HR	---	427
	Celofán	23° C 0% HR	---	0.7
	Celofán	23° C 50% HR	---	16
	Celofán	23° C 95% HR	---	252

(Krochta et al., 1994)

## **CONCLUSIONES**

De acuerdo al método de extracción alcalina estándar (45°C/pH=12) se logró obtener un porcentaje de extracción de 18.55 respecto a la PSI.

Se estableció que el método de precipitación isoeléctrico a las condiciones estándar (45°C/pH=12) es el método más eficiente de precipitación de proteína con un rendimiento de 6.28% respecto a la cantidad de proteína en la piel. Sin embargo, se debe considerar que el método salting out (a 50% de saturación) presentó un rendimiento muy cercano al método isoeléctrico (5.59%) por lo que también resulta ser un método muy eficiente de precipitación.

Al realizar las variaciones de temperatura y pH se pudo determinar la temperatura óptima de extracción por el método alcalino siendo esta de 50°C con un porcentaje de extracción de 34. (2 veces mayor que el obtenido a las condiciones estándar) y el pH de extracción 13.6 (NaOH 0.1M) a la temperatura óptima con un porcentaje de extracción promedio de 82.65% (5 veces mayor respecto al obtenido a las condiciones estándar).

A partir de las condiciones óptimas de extracción (50°C, pH=13.6) y precipitación de proteína por el método isoeléctrico se logró un rendimiento promedio de 8.07% respecto a la cantidad de proteína en la piel. Esto es 1.4 veces mayor que el rendimiento obtenido a las condiciones estándar.

El desarrollo de películas basadas en proteínas de Cazón se realizó a partir del 5% de extracto proteínico y 75% de sorbitol con agua como disolvente. Las películas basadas en proteínas con mejores características organolépticas (color, aroma) es la obtenida por el concentrado proteínico obtenido mediante el método de precipitación

salting out, debido a la diálisis del extracto proteínico que remueve minerales y aromas del mismo.

La electroforesis evidenció que al incrementar la temperatura de extracción de proteína se extraen proteínas cada vez más grandes: a 40°C se extraen proteínas pequeñas y de medio tamaño de entre 8 y 70 kDa, a 45°C se extraen proteínas de entre 19 y 117 kDa y a 50°C se extraen las proteínas más grandes de entre 46 y 125kDa. En cuanto al extracto proteínico resultado de la extracción a diferentes pH, no se observó gran diferencia ya que en ambos casos la temperatura es el factor determinante en el tipo de proteínas extraídas que en este caso son de entre 46 y 125kDa.

La electroforesis del concentrado proteínico extraído por el método Salting out evidencia la selectividad del mismo, ya que al aumentar la concentración de sales, se extraen proteínas más grandes, a 50% de saturación se extraen proteínas de entre 19 y 114kDa, mientras que a 75% de saturación se extraen proteínas desde 45 hasta 119 kDa.

En la prueba de extensión la película de pH=12 obtuvo el mayor esfuerzo de fractura de 4.8 Mpa respecto a las películas de pH=13.6 y de salting out con 1.32 y 2.55 Mpa respectivamente. Igualmente la película de pH=12 obtuvo los valores más altos en módulo de Young y deformación (20.8MPa y 91.9%) respecto a las películas de pH=13.6 y de salting out con 1.32 y 2.55 Mpa de deformación y el módulo de Young 10.48 y 11.34 % respectivamente. Por lo que las películas del extracto proteínico a pH=12 son más resistentes al extenderlas respecto a las demás.

En la prueba de punción las películas no presentaron diferencia significativa respecto al esfuerzo de tensión y la deformación.

Los valores de PVA de las películas de salting out (0.76 n g/Pa s m) son los más bajos a comparación de las películas elaboradas a pH=12 y pH=13.6 (0.99 y 0.0016 n g/Pa s m respectivamente), sin embargo, la permeabilidad de las películas basadas en proteínas es muy elevada respecto a las películas sintéticas de PE y LDPE con valores de 0.019 y 0.002 n g/Pa s m respectivamente, lo que pone en desventaja la eficiencia de las películas como envase alimentario y es motivo de más investigaciones en el área.

En contraste con las películas sintéticas, las películas basadas en proteínas son excelentes barreras al oxígeno, ya que ninguna permitió el paso de este gas.

Las propiedades mecánicas son buenas, sin embargo, se recomienda investigar el efecto de adición de otros componentes que puedan mejorarlas.

Las películas de cazón son buenos empaques potenciales para alimentos ya que poseen una excelente barrera al oxígeno y una barrera al vapor de agua que puede mejorarse, por lo que son capaces de proporcionar la calidad requerida para proteger el alimento y reducir el uso de los empaques sintéticos.

Es necesario hacer énfasis en la edad del animal de la materia prima ya que se sabe que este factor juega un papel significativo en la estructura molecular de la gelatina derivada.

Es recomendable investigar más en los compuestos activos que pueden ser añadidos a la formulación de las películas estudiadas como antioxidantes o antimicrobianos con la finalidad de buscar la mejora de las propiedades de esta.

## BIBLIOGRAFÍA

- AOAC Official Method 2001.11. (2001). Protein (crude) in animal feed, forage (plant tissue), grain, and oilseeds. AOAC Internacional
- Arnesen, J. A & Gildberg, A. (2007) Extraction and characterisation of gelatin from Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin. *Biores. Tech.* 98(1), 53-57
- ASSAÂD, S., Rim N., Mourad J., Rafik B., Moncef N., Ali B., (2012). **Characterization of trypsin purified from the viscera of Tunisian barbel (*Barbus callensis*) and its application for recovery of carotenoproteins from shrimp wastes.** *Food Chem.*, 132, 1287-1295.
- ASTM D 1434-82 (2009). Standard test method for determining gas permeability characteristics of plastic film and sheeting. Annual Book of ASTM Standards, ASTM Internacional (EUA). Vol. 15.10
- ASTM E96 / E 96M - 10. (2010). Standard test method for water vapor transmission of materials. Annual Book of ASTM Standards, ASTM Internacional (EUA). Vol. 04.06
- BADUI, S. (2006). *Química de los alimentos*. Cuarta edición. Madrid. Prentice Hall México.
- CASTAÑEDA, K. (2011). *Desarrollo y evaluación de propiedades de películas proteínicas de pesquerías de la subclase **elasmobranchi***. Tesis, Facultad de Química, UNAM.
- CHEFTEL J.C., Cuq J.L. y Lorient D. (1989). *Proteínas Alimentarias. Bioquímica. Propiedades funcionales. Valor nutricional. Modificaciones químicas*. Zaragoza: Acribia.
- CHIOU, B. S., Avena-Bustillos, R. J., Shey, J., Yee, E., Bechtel, P. J., Imam, S. H., Glenn, G. M., & Orts, W. J. (2006). Rheological

and mechanical properties of cross-linked fish gelatins. *Polymer*, 47, 6379-6386.

- CHO, S.M., Gu, Y.S & Kim S.B. (2005). Extracting optimization and physical properties of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin gelatin compared to mammalian gelatins, *Food Hydrocoll.*19, 221-229.
- CHO, SH., Jahncke, M.L., Chin, K.B & Eun, J. B. (2006). The effect of processing conditions on the properties of gelatin from skate (*Raja kenoi*) skins. *Food Hydrocoll.*20, 810- 6.
- CHO, S.M., Kwak, K.S., Park, D.C., Gu, Y.S., Ji, C.I., Jang, D.H., Lee, Y.B & Kim, S.B. (2004). Processing optimization and functional properties of gelatin from shark (*Isurus oxyrinchus*) cartilage *Food Hydrocoll.*18, 573-579.
- CONAPESCA (2008). Estudio de mercado de gran visión [http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/estudio\\_mercado](http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/estudio_mercado) Consultado en Enero 2013.
- CONAPESCA (2011). Anuario estadístico de acuicultura y pesca. [http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona\\_anuario\\_estadistico\\_de\\_pesca](http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona_anuario_estadistico_de_pesca). Consultado en Febrero 2013
- CONAPESCA (2013). Consulta específica por especie. [http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/consulta\\_especifica\\_por\\_produccion](http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/consulta_especifica_por_produccion). Consultado en Enero, 2013.
- DAMODARAN, S. y Paraf, A. *Food Proteins and their Applications*, segunda edición. Marcel Dekker, New York, (1997).
- FISH BASE (2013). Consulta específica por especie. <http://www.fishbase.org/summary/Galeorhinus-galeus.html>. Consultado en Febrero del 2013.

- FUNDACIÓN ESPAÑOLA DE LA NUTRICIÓN. El cazón (2013). <http://www.fen.org.es/MercadoAlimentosFEN/pdfs/cazon.pdf>. Consultado en Febrero del 2013.
- GOMEZ-GUILLEN, M.C., Turnay, J., Fernandez-Diaz, 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 Hydrocoll.* 16, 25-34.
- GRANADOS, S. (2010). Aprovechamiento de proteínas de pesquería del género *Epinephelus* para la obtención de películas modificadas. Tesis, Facultad de Química, UNAM.
- HERNÁNDEZ, M. (2011). Evaluación de películas de pesquerías modificadas como barreras para alimentos. Tesis, Facultad de Química, UNAM.
- JONES, N.R. (1977). Uses of gelatin in edible products. IN A. G. Ward, & A. Courts (Eds.). *The science and technology of gelatins* (pp. 365-394). New York: Academic Press.
- JONGJAREONRAK, A., Benjakul, S., Visessanguan, W & Tanaka M (2006). Skin gelatin from bigeye snapper and brownstripe red snapper: Chemical compositions and effect of microbial transglutaminase on gel properties. *Food Hydrocoll.* 20, 1216-1222.
- KASANKALA, L. M., Xue, Y., Weilong, Y., Hong, S. D & He, Q. (2007). Optimization of gelatin extraction from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fish skin by response surface methodology. *Biores. Tech.* 98 (17), 3338-43.
- KIRK R. S., Sawyer R; Egan, H. Composición y análisis de alimentos de Pearson, segunda edición; Compañía editorial continental SA de CV, México, (1996).

- KROCHTA, J., Baldwin E. y Nisperos-Carriedo, M., (1994). Edible Coatings and Films to Improve Food Quality. New York: CRC Press LLC, 201, 249.
- LOWRY, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193:265-275
- MCCORMICK-GOODHART, M. H. (1995). Research Techniques in Photographic Conservation. Proc. Copenhagen Conference. 65-70.
- MONTERO, P & Gomez-Guillen, M. C. (2000). Extracting conditions for megrim (*Lepidorhombus boscii*) skin collagen affect functional properties of the resulting gelatin. J. Food Sci., 65 (3), 434-438.
- MURADO, M. A., Montemayor M. I., Cabo, M.L., Vázquez, J. A., González M. P. (2011). Optimization of extraction and purification process of hyaluronic acid from fish eyeball. Food and Bioproducts Processing, 276, 1-8.
- MUYONGA, J. H., Cole, C. G. B & Duodu, K. G. (2004). Extraction and physico-chemical characterisation of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin. Food Hydrocoll. 18 (4), 581-592.
- NALINANON, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Kishimura, H. (2008). Improvement of gelatin extraction from big eye snapper skin using pepsin-aided process in combination with protease inhibitor. Food Hydrocoll, 22(4), 615-622.
- NELSON D.L., Cox M.M. y Cuchillo C.M. (2001). Lehninger Principios de Bioquímica. Tercera edición. Barcelona: Ediciones Omega.
- NIELSEN S. (ed); Food Analysis Laboratory Manual; Kluwer Academic/Plenum Publishers, Nueva York, (2003).

- POPPE, J. (1997). Gelatin. In A. Imeson (Ed.), Thickening and gelling agents for food (2da Ed.) London: Blackie Academic and Professional, 144-168.
- PRADO, L. A. (1999). Avances en Purificación y Aplicación de Enzimas en Biotecnología. Distrito Federal: Casa Abierta al Tiempo UAM.
- PRICE, N.C., (1996). Salting out: Ammonium sulfate precipitation. En: Hames B.D. y Rickwood D. eds. Proteins LabFax. San Diego: Bios Scientific Publishers, 31-32.
- SCOPES, Robert k., (1988). Separation by precipitation. En: C.R. Cantor ed. Protein Purification: Principles and Practice. New York: Sringer-Verlay, 41-62.
- SOBRAL, P. J. A., Menegalli, F. C & Guilbert, S. (1999). Phase transition of bovine hide gelatin plasticized by water. In: P. Colonna, & S. Guilbert (Eds.), Biopolymer science, food and non food applications Paris: Editions INRA. 11-123.
- SONGCHOTIKUNPAN, P., Tattiyakul, J & Supaphol, P. (2008). Extraction and electrospinning of gelatin from fish skin. Inter. Journal Biol. Macromol. 42, 247-255.
- TEIJÓN, José M. Bioquímica Estructural. (2001). Conceptos y Tests. Editorial Reverte. 126-128.
- ZHOU, P, Steven, J, M y Regenstein, J. M. (2006). Properties of Alaska Pollock skin gelatin: A comparison with Tilapia and Pork skin gelatins. J. Food Chem. 71(6), 313-321.
- ZHOU, P y Regenstein, J. M. (2004). Optimization of extraction conditions for Pollock Skin Gelatin. J Food Scien. 393-398.

## Fraccionamiento con sulfato amónico sólido

Concentración final de sulfato amónico — % de saturación a 0°C

	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
<i>Sulfato amónico sólido a añadir a 100 ml de disolución</i>																	
0	10,6	13,4	16,4	19,4	22,6	25,8	29,1	32,5	36,1	39,8	43,6	47,6	51,6	55,9	60,3	65,0	69,7
5	7,9	10,8	13,7	16,6	19,7	22,9	26,2	29,6	33,1	36,8	40,5	44,4	48,4	52,6	57,0	61,5	66,2
10	5,3	8,1	10,9	13,9	16,9	20,0	23,3	26,6	30,1	33,7	37,4	41,2	45,2	49,3	53,6	58,1	62,7
15	2,6	5,4	8,2	11,1	14,1	17,2	20,4	23,7	27,1	30,6	34,3	38,1	42,0	46,0	50,3	54,7	59,2
20	0	2,7	5,5	8,3	11,3	14,3	17,5	20,7	24,1	27,6	31,2	34,9	38,7	42,7	46,9	51,2	55,7
25	0	0	2,7	5,6	8,4	11,5	14,6	17,9	21,1	24,5	28,0	31,7	35,5	39,5	43,6	47,8	52,2
30	0	0	0	2,8	5,6	8,6	11,7	14,8	18,1	21,4	24,9	28,5	32,3	36,2	40,2	44,5	48,8
35	0	0	0	0	2,8	5,7	8,7	11,8	15,1	18,4	21,8	25,4	29,1	32,9	36,9	41,0	45,3
40	0	0	0	0	2,9	5,8	8,9	12,0	15,3	18,7	22,2	25,8	29,5	33,5	37,6	41,8	46,3
45	0	0	0	0	2,9	0	2,9	5,9	9,0	12,3	15,6	19,0	22,6	26,3	30,2	34,2	38,3
50	0	0	0	0	3,0	0	3,0	6,0	9,2	12,5	15,9	19,4	23,0	26,8	30,8	34,8	38,8
55	0	0	0	0	3,0	0	3,0	6,1	9,3	12,7	16,1	19,7	23,5	27,3	31,3	35,3	39,3
60	0	0	0	0	0	0	3,1	6,2	9,5	12,9	16,4	20,1	23,9	27,9	31,9	35,9	39,9
65	0	0	0	0	0	0	0	3,1	6,3	9,7	13,2	16,8	20,5	24,4	28,4	32,4	36,4
70	0	0	0	0	0	0	0	0	3,2	6,5	9,9	13,4	17,1	20,9	24,9	28,9	32,9
75	0	0	0	0	0	0	0	0	3,2	6,6	10,1	13,7	17,4	21,2	25,1	29,1	33,1
80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3,3	6,7	10,3	13,9	17,7	21,6	25,6	29,6
85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
95	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(Concentración inicial de sulfato amónico % de saturación a 0°C)