

W. A. Millano y J. Morales
División de Postgrado
Facultad de Ingeniería
Universidad del Zulia
Maracaibo, Venezuela

OBTENCION, PURIFICACION Y LIOFILIZACION DE COLAGENO

RESUMEN

Se presenta la metodología para procesar pieles de bovino, puerco y tendones de bovino, para obtener materia colágeno cuyo nivel de pureza se determinó en función del contenido de hidroxiprolina. Los extractos de materia colágena fueron deshidratados por liofilización lográndose obtener un producto de fácil manejo y a los cuales se les determinó su composición química, encontrándose un contenido de humedad entre 2,04 a 12,12% para la piel de novato y tendones respectivamente. El colágeno de mayor pureza se obtuvo de pieles de vaca (93,13%) y de becerro (80,45%), demostrándose la ventaja de que estos desechos pueden mezclarse para obtener materia proteica con alto contenido de colágeno.

ABSTRACT

A methodology is presented to process cattle and pig skins, and cattle tendons to obtain collagen matter; the purity level was determined as a function of hydroxiprolin contents. The extracts of collagen matter were dehydrated by freeze-drying achieving a product easy to manage and analyzed for its chemical composition, finding a water content of 2,04% and 12,13% for newborns and tendon skin, respectively. The collagen with highest purity was obtained from cow's (93,13%) and calf's (80,45%) skin, showing the advantage that this waste material may be mixed to obtain protein matter with a high contents of collagen.

INTRODUCCION

Venezuela es un país, que a pesar de sus grandes recursos naturales, presenta el problema del consumo de alimentos superior a la producción, situación que puede resolverse, a través del aprovechamiento al máximo de muchos materiales de desecho que constituyen una fuente potencial de proteínas destacándose entre ellas el colágeno. Algunos de éstos, como los recortes de pieles, patas, hocicos, orejas, huesos y tendones recién extraídos de los animales, así como también los desechos de todo tipo de cuero que procede de tenerías

Actualmente todo el colágeno y sus derivados utilizados en nuestro país, a nivel industrial, procede de importaciones. Donde es usado como preservativo, aglomerante, humectante y para dar textura en diferentes productos alimenticios, para producir envolturas de salchicha, gelatina y derivados de gelatina. Por tal motivo, en este trabajo se obtendrá de piel de bovino, piel de puerco y tendones de bovino, con el objeto de establecer rendimiento de extracción, pureza y deshidratación del producto por liofilización.

PARTE EXPERIMENTAL

PREPARACION DE LA MUESTRA:

Las muestras utilizadas fueron de pieles frescas de vaca, becerro, novato (animales por nacer), puerco y tendones de bovino, obtenidas en el Frigorífico Industrial Bolívar y las dos últimas en carnicería locales. Las edades y peso de los animales portadores de dichas pieles se indican en la Tabla I. Luego de cortadas en tiras y lavadas, las pieles fueron sometidas a un proceso de encalado en lechada de cal durante 48 horas para desintegrar las materias albuminoideas extrañas y convertirlas en combinaciones solubles y facilitar el proceso de depilación, para después separar la capa externa que es abundante en queratina de la interna o capa portadora del colágeno. Esta última se molió y se sometió a la extracción de la proteína. Las muestras de tendones fueron molidas y se homogenizaron con solución 0,2 M de NaCl.

PROCEDIMIENTO:

La extracción y purificación del colágeno se realizó según los métodos de Turkot et. al.⁽¹⁾ para las muestras de pieles y de Vognarova et. al.⁽²⁾ para tendones. La deshidratación del colágeno se hizo por liofilización⁽³⁾. La composición química y la cuantificación del colágeno obtenido se realizó siguiendo los métodos de la A.O.A.C.⁽⁴⁾ y de Bergman et. al.⁽⁵⁾ respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados estadísticos del rendimiento, composición y pureza de los extractos liofilizados se presentan de acuerdo a las diferentes etapas de crecimiento para las muestras de pieles de bovino, así como para mezcla de tendones y piel de puerco, con la finalidad de establecer la influencia de la edad del animal y el tipo de muestra sobre estos parámetros.

La Tabla No. 1, contiene los resultados expresados en % p/p del rendimiento de materia colágena. Se observa que el menor valor en el rendimiento medio es en piel de vaca (13,46 ± 1,1%) y el mayor es en tendones (46,31 ± 5,98%). No se encontró información en la literatura revisada sobre recuperación de colágeno en la materia prima estudiada, por lo que no es posible una comparación de estos valores.

En la Tabla No. 2 se reporta la composición química del colágeno liofilizado con respecto al contenido medio porcentual de humedad, materia seca, cenizas, grasa, carbohidratos, proteína total e hidroxiprolina para las diferentes muestras. En general, se observó bajo contenido de humedad, siendo menor en piel de nonato (2,04%) y mayor en tendones (12,13%). Como consecuencia del bajo contenido de humedad, los extractos liofilizados revelan un contenido medio de materia seca que está entre 87,87% y 97,96%, lo cual permite considerar que la materia protéica es de alto valor y tiene poca probabilidad de alteración por acción microbiana.

Los resultados encontrados para proteínas y carbohidratos (Tabla No. 2), en pieles de bovino, coinciden con lo esperado según la edad del animal⁽⁶⁾. El menor contenido protéico sobre base húmeda obtenido para el extracto liofilizado de tendones (70,36%) y piel de puerco (26,16%), refleja el efecto de dilución de la carne magra dejada en los tendones y la grasa remanente en la piel de puerco, ésto último se demuestra con la presencia de 47,15% de grasa encontrada en el extracto liofilizado de la piel de puerco en su ausencia en los extractos. En consecuencia, el contenido protéico en el extracto de piel de puerco podría mejorarse con desengrasado previo a la extracción, siendo este tópicó objeto de investigación.

Los porcentajes de cenizas o minerales mostrados en la Tabla No. 2, para pieles de ganado vacuno, son muy similares y no muestran variación apreciable según la edad del animal. El mayor porcentaje de minerales o cenizas se encontró para tendón y el menor para piel de puerco, no siendo posible una comparación de estos últimos valores, por no encontrarse datos sobre los mismos en la literatura consultada.

En cuanto a los resultados de hidroxiprolina (Tabla No. 2), el mayor contenido se encontró en el extracto liofilizado de colágeno de piel de vaca (10,53%) y becerro (9,43%), tal como era de esperarse dado que el contenido protéico fue mayor en estas muestras. Estos valores son muy parecidos a los encontrados por Mc Clain et.al.⁽⁷⁾ en colágeno

de piel de rata (10%) y en colágeno intramuscular de bovino (10,5%), pero mayores al encontrado por Gelasinski et.al.⁽⁸⁾ en piel de novillos (7,64%), valor muy similar al encontrado en el presente trabajo para colágeno de piel de nonato (7,38%) y de tendones (7,95 por ciento), lo que confirma el buen rendimiento del proceso utilizado en el presente trabajo.

En la Tabla No. 3, se presentan los resultados de la pureza y rendimiento del colágeno basado en el valor teórico máximo de hidroxiprolina (11,3%) encontrado en colágeno tipo I⁽⁹⁾ la especie más abundante en piel, tendón y hueso. Se observa que la materia colágena obtenida de mayor pureza fue la de vaca con un 93,19% y un rendimiento del 76,94%, lo que demuestra la eficiencia en la capacidad extractiva debido a que el grosor de la piel permite separar completamente la dermis de la epidermis⁽³⁾. En cuanto a la menor pureza del extracto de colágeno de tendón (70,35%), podría atribuírsele a la presencia de elastina acompañando al colágeno y para piel de puerco debido al alto contenido de grasa, la pureza es la más baja (33,72%).

La Tabla No. 4, contiene los resultados del análisis de la varianza para la hidroxiprolina en los extractos liofilizados de colágeno al nivel de probabilidad de $p < 0,05$. Se concluye que existe diferencia altamente significativa entre las medias de hidroxiprolina.

Con la finalidad de determinar entre cuales extractos existe diferencia, se presenta el Análisis de Duncan⁽¹⁰⁾ en la Tabla No. 5 donde se contrasta el contenido de hidroxiprolina de cada muestra estudiada. La prueba señala que realmente existe diferencia significativa para el nivel de $p < 0,05$ en todos los extractos con el de piel de puerco y no existe entre nonato-tendón, tendón-becerro y vaca-becerro. La diferencia entre vaca-nonato es notable, ya que a $p < 0,05$ es altamente significativa, siendo incluso diferente entre nonato-becerro. Esto nos permite afirmar que la edad del animal es importante y debe considerarse a la hora de obtener materia colágena con un cierto nivel de pureza.

Tabla No. 1
VALORES ESTADÍSTICOS DEL RENDIMIENTO PORCENTUAL (% P/P) DEL EXTRACTO LIOFILIZADO DE COLÁGENO DE PIELS Y/O TENDONES DE BOVINO Y PUERCO

ORIGEN	EDAD (Años)	PESO (kg)	COLÁGENO				
			R	S	W	CV	
PIEL							
Nonato ^{1/}	-	12 - 16	19,17	24,01	21,74	2,17	8,98
Becerro	9,33	70 - 100	18,65	20,28	19,54	0,48	3,47
Vaca	3-4	430 - 550	12,15	14,91	13,46	1,18	8,17
Puerco	-	-	29,83	42,86	35,86	2,57	8,97
TENDÓN ^{2/}	-	-	42,68	50,67	46,31	5,48	12,91

^{1/} Animales por meses de aparcamiento 8 meses.

^{2/} Mezcla de tendones de especies de bovino.

n = 10

Tabla N° 2
COMPOSICION QUIMICA DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS LIOFILIZADOS DE COLAGENO

CARACTERISTICAS	Piel de Sesato %	Piel de Becerro %	Piel de Vaca %	Piel de Puerco %	Tendones %
Humedad	2,84	4,28	3,18	4,06	12,13
Materia Seca	97,96	95,86	95,11	91,84	87,87
Chalaza	1,87	1,55	1,37	0,82	4,72
Grasa	-	-	-	47,15	-
Carbohidratos	13,81	13,21	7,93	21,23	12,85
Proteinas	82,28	85,13	86,69	23,14	70,36
Hidroxi-prolina	7,38	9,43	10,53	3,81	7,95

n = 10

Tabla N° 3
CONTRASTE DEL CONTENIDO DE HIDROXI-PROLINA EN LOS EXTRACTOS LIOFILIZADOS DE COLAGENO

COMPARACION	DIFERENCIA	SIGNIF.	CONCLUSION
P Vs B	3,88	1,78	*
P Vs T	4,55	2,43	**
P Vs B	5,95	2,98	**
P Vs V	7,09	3,43	***
B Vs T	0,69	1,08	NS
B Vs B	3,09	1,28	*
B Vs V	3,23	1,53	**
T Vs T	2,54	1,46	*
B Vs V	1,14	1,21	NS

* Diferencia significativa.
** Diferencia muy significativa.
*** Diferencia altamente significativa.
NS Diferencia no significativa.

CONCLUSIONES

- 1.- Los porcentajes de recuperación de materia proteica indican la posibilidad de industrialización de los desechos de tendones y pieles de ganado bovino.
- 2.- El secado del producto por liofilización puede garantizar poca probabilidad de ser descompuesto por acción microbiana, hecho que debe ser comprobado conociendo los niveles de actividad de agua.
- 3.- El contenido de hidroxiprolina indica una alta pureza para el extracto de piel de vaca y becerro, y una baja pureza para el extracto de piel de puerco.
- 4.- Los desechos de piel de vaca y becerro pueden mezclarse con el fin de lograr una materia con alto contenido de colágeno.

LITERATURA CITADA

- 1) TURKOT, V.A.; KOMANOWSKY, M.; SINNAMON, H.J. : "Comminuted Collagen: Estimated Cost of Commercial Production". Food Technology, 32 (4):48-52, 1978.
- 2) VOGNAROVA, I.; DVORAK, Z.; BOHM, R.: "Collagen and elastin in different cuts of veal and beef" Journal of Food Science, 33: 339-342, 1968.
- 3) MILLANO, W.A.: "Obtención, Purificación y Liofilización de Colágeno". Tesis de Magister. Facultad de Ingeniería, División de Postgrado, L.U.Z., 1987.
- 4) A.O.A.C.: "Methods of analysis of the association of official analytical Chemists". 13th ed Washington, U.S.A., 1975.

Tabla N° 3
RESULTADOS DE LA PURIFICACION Y REFINAMIENTO DEL COLAGENO EXTRAIDO, EN BASE AL CONTENIDO DE HIDROXI-PROLINA

ORIGEN	HIDROXI-PROLINA %	COLAGENO	
		Pureza %	Residuo %
Tendón ^{1/}	11,3	100	100
PIEL			
Sesato	7,38	83,31	52,64
Becerro	9,43	83,45	68,10
Vaca	10,53	93,19	76,84
Puerco	3,81	33,72	7,17
Tendón ^{2/}	7,95	70,25	83,48

1/ En tendones y piel el colágeno extraído es del tipo I donde el contenido de hidroxiprolina alcanza un valor de 11,3% en peso?

2/ Mezcla de tendones de diferentes de bovino.

Tabla N° 4

ANALISIS DE LA VARIANZA DEL CONTENIDO DE HIDROXI-PROLINA EN EL EXTRACTO LIOFILIZADO DE COLAGENO

FUENTE DE VARIACION	GL	SC	CM	F
Entre tratamientos	4	1417,84	404,41	419,95***
Dentro de los tratamientos	40	28,23	0,7062	
TOTAL	44	1446,07		

*** Diferencia altamente significativa para p < 0,05 = 3,794

- 5) BERGMAN, I.; LOXLEY, R.: "Lung tissue hydrolysates: studies of the optimum conditions for the spectrophotometric determination of hydroxyproline". *Analyst*, 94: 575-584, July, 1969.
- 6) HENRICKSON, R.L.; RANGANAYAKI, M.D.; ASGHAR, A.: "Age Breed, Sex, and nutrition effect on hide collagen". *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 20, Issue 3: 159-172.
- 7) PRINCE, J.F.; SCHEWEIGERT, B.S.: "Ciencia de la carne y de los productos cárnicos". Ed. Acribia - Zaragoza (España), 1976.
- 8) GALASINSKI, W.; GODEK, A.; RATKIEWIEZ, A.; RZECZYCKI, W.: "A convenient modification of the method for hydroxyproline determination in proteins". *Analytical Biochemistry*, 85: 550 - 555, 1978.
- 9) ETHERINGTON, D.J.; SIMS, T.J.: "Detection and estimation of collagen". *J.Sci. Food Agric.*, 32: 539-546, 1981.
- 10) BAUER, E.L.: "Manual de Estadística para Química". Ed. Alhambra, S.A. Madrid-España, 1974.

Recibido en 20 de Junio de 1988

En forma revisada el 11 de Julio de 1989