



**Obtención de colágeno hidrolizado mediante la reacción enzimática con bromelina sobre
gelatina**

Ramos Benítez, Evelyn Mishell

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de Titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Trujillo Toledo, Luis Enrique Ph.D.

28 de enero de 2021

Certificación COPYLEAKS

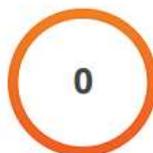


PROYECTO DE TITULACIÓN COPYLEAKS RAMOS EVELYN corr...

Scanned on: 14:59 January 24, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	0
Words with Minor Changes	0
Paraphrased Words	0
Ommited Words	0

LUIS ENRIQUE
TRUJILLO
TOLEDO

Website | Education | Businesses



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación, denominado “**Obtención de colágeno hidrolizado mediante la reacción enzimática con bromelina sobre gelatina**” fue realizado por la señorita **Ramos Benítez, Evelyn Mishell** el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 28 de enero de 2022

Firma:



.....
Dr. Luis E. Trujillo, Ph.D.

C.C.: 1755850276



Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, Ramos Benítez, Evelyn Mishell, con C.C. 1720901147, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: "Obtención de colágeno hidrolizado mediante la reacción enzimática con bromelina sobre gelatina" es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 28 de enero de 2022

Firma:

.....
Ramos Benítez, Evelyn Mishell

C.C. 1720901147



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de publicación

Yo, **Ramos Benítez, Evelyn Mishell**, con C.C. 1720901147, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: "Obtención de colágeno hidrolizado mediante la reacción enzimática con bromelina sobre gelatina" en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad

Sangolquí, 28 de enero de 2022

Firma:



.....
Ramos Benítez, Evelyn Mishell

C.C. 1720901147

Dedicatoria

Dedicado a la memoria de mi Ñaño Alejo, del que siempre llevaré un bonito recuerdo; a mis padres Susana e Iván, por su esfuerzo y sacrificio para sacarme adelante a pesar de las circunstancias; a mis hermanos Danny y Johanna, quienes han sido pieza fundamental de ejemplo y complicidad; a mi tía Olga, por su gran papel de segunda madre; ñaña Alicia, Manuel, Erika por ser quienes han estado apoyándome en cada momento; a mis sobrinos Joel, Danna, Emiliano, Emily, Nicolas, por todas sus muestras de cariño siendo los más pequeños; a mis cuñados Johanna, Andrés, por ser mis segundos hermanos; a todos mis primos, por ser los causantes de muchos momentos divertidos; a Dafne, Lolita y Giovanni; quienes son como mi segunda familia y de manera especial a Darío Sevillano quien forma parte de la causa para encontrarme en este punto de mi vida.

A mi compañero de vida Sebastián y a mis pequeñas Freia y Zoe, quienes me han dado la fortaleza y amor incondicional.

A mis amigos de vida y de la universidad Nati, Nico, Daya, Betty, Mirka, Dome, Ker, Alexis, Mau, Sergio, por ser quienes han sentido y vivido de forma más cercana esta linda etapa.

Agradecimientos

En primer lugar, a Dios por permitirme culminar y alcanzar un objetivo en mi vida académica. A mis padres y hermanos por todo su apoyo y comprensión día tras días y motivarme para no rendirme. Un agradecimiento a todos los que conforman la empresa Wildland, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, así también un agradecimiento al Ingeniero Hernán Paz por tantas enseñanzas tanto en lo profesional como en lo académico, también a la Ingeniera Edith Puga por tantos consejos y lindas experiencias. A Mónica Jadán PhD. Quien fue una docente inigualable y a quien la llevo como un ejemplo de lucha y visión. A Luis Trujillo PhD. Por su colaboración en el presente trabajo de investigación. A la Ingeniera Michelle Paredes por su guía y colaboración. A Nicole Jarrín por ser mi compañera de sufrimiento y apoyo en cada una de las etapas de este proceso.

Índice de Contenido

Certificación COPYLEAKS	2
Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Índice de Contenido	8
Índice de Tablas	11
Índice de Figuras	12
Resumen.....	13
Abstract	14
Capítulo I: Introducción	15
Antecedentes.....	15
Justificación	17
Objetivos de Investigación.....	18
<i>Objetivo General del Proyecto</i>	18
<i>Objetivos Específicos del Proyecto</i>	18
<i>Hipótesis de la Investigación</i>	18
Capítulo 2: Marco Teórico.....	19
Enzimas	19
<i>Características</i>	19
<i>Reacción Enzimática</i>	20
<i>Actividad Enzimática</i>	20
<i>Factores que Influyen en la Reacción Enzimática</i>	20
<i>Clasificación</i>	24
Bromelina	26
<i>Propiedades Químicas</i>	26

<i>Propiedades Físicas</i>	27
Gelatina	28
Colágeno.....	29
<i>Descubrimiento de la Molécula</i>	29
<i>Composición y Ubicación</i>	29
<i>Tipos</i>	31
Hidrólisis.....	32
Capítulo III: Materiales y Métodos	33
Instituciones Participantes.....	33
<i>Colaboradores Científicos</i>	33
Área de Estudio	33
Metodología	33
<i>Materia Prima</i>	33
<i>Condiciones de Hidrólisis de Colágeno con Bromelina</i>	34
<i>Caracterización Organoléptica</i>	34
<i>Determinación del Grado de Hidrólisis</i>	34
<i>Cuantificación de Proteína Mediante el Método de Bradford</i>	35
<i>Análisis de Electroforesis en Gel de Poliacrilamida SDS-PAGE</i>	36
Diseño Experimental	37
Capítulo IV: Resultados y Discusión.....	39
Hidrólisis de Colágeno con Bromelina	39
Caracterización del colágeno hidrolizado	43
<i>Método de Bradford</i>	43
<i>Electroforesis SDS- PAGE</i>	44
Capítulo V: Conclusiones	45

Capítulo VI: Recomendaciones.....	46
Referencias	48
Apéndices.....	56

Índice de Tablas

Tabla 1 <i>Clasificación de las enzimas</i>	25
Tabla 2 <i>Propiedades físicas de la enzima Bromelina</i>	27
Tabla 3 <i>Matriz de la denotación y valores para cada unidad experimental</i>	38
Tabla 4 <i>Datos de la variable respuesta GH y características organolépticas del proceso de hidrólisis</i>	41
Tabla 5 <i>Análisis de varianza de los tratamientos y sus interacciones entre los factores</i>	43

Índice de Figuras

Figura 1 <i>Gráfica de relación del factor pH vs velocidad de la reacción enzimática</i>	21
Figura 2 <i>Gráfica de relación del factor temperatura vs velocidad de la reacción enzimática</i>	22
Figura 3 <i>Gráfica de relación de la concentración de enzima vs velocidad de la reacción enzimática</i>	23
Figura 4 <i>Gráfica de relación de la concentración de sustrato vs velocidad de la reacción enzimática</i>	24
Figura 5 <i>Composición química de la molécula de bromelina</i>	28
Figura 6 <i>Estructura de la molécula de colágeno</i>	30
Figura 7 <i>Curva estandar de BSA en buffer de cloruro de sodio 0.15M</i>	36
Figura 8 <i>Resultado SDS PAGE de colágeno hidrolizad</i>	45

Resumen

La bromelina es una enzima proteolítica de gran importancia en la industria biotecnológica, es extraída del tallo o el fruto de *Ananas comosus* L. (piña) y tiene la capacidad de hidrolizar proteínas como el colágeno, el cual posterior a esta reacción enzimática se convierte en un suplemento de gran valor nutricional ante ciertas afecciones del ser humano. En el presente estudio se llevó a cabo la obtención de colágeno hidrolizado mediante una reacción enzimática con bromelina sobre gelatina. Para lo cual se realizó una hidrólisis con variación de condiciones, con respecto a la concentración de enzima (0.1M, 0.25M, 0.5M), el tiempo (1h, 2h, 3h) y pH (5.85, 6.10, 7); para lo cual la variable respuesta fue el grado de hidrólisis (GH) de cada uno de los tratamientos, posterior a ello se realizó para el tratamiento que presentó los parámetros óptimos M3T3P2 (0.5M, 3h, 6.10) con un GH de 13.685%, la cuantificación de proteína por el método de Bradford que fue de 0.942mg/mL y también se analizó la muestra mediante electroforesis SDS PAGE, se obtuvo un peso de 6500Da; los resultados fueron analizados estadísticamente con ANOVA, lo que comprobó que los tres factores influyen en el GH, comprobando así la hipótesis planteada en la investigación.

Palabras claves:

- **BROMELINA**
- **HIDRÓLISIS**
- **COLÁGENO**
- **PROTEÍNA**

Abstract

Bromelain is a proteolytic enzyme of great importance in the biotechnological industry. It is extracted from the stem or fruit of *Ananas comosus* L. (pineapple) and has the ability to hydrolyze proteins such as collagen, which after this enzymatic reaction becomes a supplement of great nutritional value against certain conditions of the human being. In the present study, hydrolyzed collagen was obtained by means of an enzymatic reaction with bromelain on gelatin. For which a hydrolysis was carried out with variation of conditions, with respect to the enzyme concentration (0.1M, 0.25M, 0.5M), time (1h, 2h, 3h) and pH (5.85, 6.10, 7); for which the response variable was the degree of hydrolysis (GH) of each of the treatments, after which it was carried out for the treatment that presented the optimal parameters M3T3P2 (0.5M, 3h, 6.10) with a GH of 13.685%, protein quantification by the Bradford method was 0.942mg/mL and the sample was also analyzed by SDS PAGE electrophoresis, a weight of 6500 Da was obtained; the results were statistically analyzed with ANOVA, which confirmed that the three factors influence GH, thus confirming the hypothesis proposed in the investigation.

Key words:

- BROMELAIN

- HYDROLYSIS

- COLLAGEN

- PROTEIN

Capítulo I: Introducción

Antecedentes

La piña es una fruta tropical, perteneciente a la planta originaria de América del Sur, conocida como *Ananas comosus* L. En 1493 Cristóbal Colón fue quien llevó la planta a España en donde se otorgó el nombre de piña, debido a su semejanza con el fruto del pino. A finales del siglo XIX se extrajo del jugo de esta fruta, una enzima de gran importancia comercial, llamada bromelina (García, 2021; Pulido, 2007).

Se han realizado varios estudios desde el descubrimiento de la bromelina, los cuales han tenido diferentes enfoques para utilizarse, el principal es la optimización para su extracción, que tiene como objetivo evitar la desnaturalización de la enzima, así también se emplea para investigaciones farmacológicas y alimenticias, las cuales han tenido resultados positivos al ser un procedimiento sin complejidad de acción (Hernández et al., 2003; Almonacid et al., 2019). Una de las aplicaciones más antiguas que le otorga a esta enzima, es de ablandador de carnes, sin embargo, también existen múltiples estudios en la cual describen la efectividad de la producción de hidrolizados a escala industrial, generando así productos que se componen de complementos alimenticios (Headon y Walsh, 1994; Kleef et al., 1996).

Al someter a un sustrato a una reacción de hidrolisis con la presencia de una enzima proteolítica, se ha observado que los residuos de la molécula inicial, llamados péptidos, generan cambios de interés como lo son: aumento en la carga, exposición de grupos hidrofóbicos y el descubrimiento de cadenas laterales reactivas de los aminoácidos que lo componen. El cambiar su composición, le otorga al producto varias propiedades funcionales como lo son: facilidad en

la digestión al ingresar al cuerpo humano y así también aumenta la capacidad antioxidante (Caessens, 1999; Arias et al., 2016).

A través del tiempo, la molécula conocida como colágeno y sus diversos tipos presentes en el cuerpo humano se presenta como una inestable lo que produce ciertas afecciones que atentan contra la salud y bienestar, y frente a este objeto de estudio es en donde varios investigadores han colocado su interés al proporcionar una variedad de productos que actúan previniendo la pérdida natural de esta molécula, a estos productos se los conoce como suplementos de colágeno, es aquí donde nace la fuente de muchos estudios realizados que han comprobado su eficacia (Martínez Valiente, 2018).

Así también en base a estos estudios se ha podido comprobar que la afección que poseen algunas personas con respecto a una deficiencia o disminución de la síntesis natural de la molécula de procolágeno o colágeno como tal, se genera en base a una alteración en la etapa de hidroxilación de los residuos de prolina y lisina, generando así una molécula con menos estabilidad térmica, lo cual va a requerir de suplementos para tener una buena funcionalidad (Martínez Valiente, 2018).

En el año de 1996 los investigadores Arquer y Puyol implementaron un estudio que trataba de la suplementación con 10 g de colágeno hidrolizado, lo cual influía a un incremento de las vitaminas B y magnesio en una muestra de estudio a pacientes de 65 años que poseían algún tipo de afección con respecto a su movilidad articular. Los resultados fueron positivos pues en el transcurso de 16 semanas que produjo una mejoría en la movilidad o ausencia de la afección en un 84.2% del total de los pacientes (Academia Española de Nutrición y Dietética [AEND], 2018).

Justificación

Al momento de elegir el tipo de derivado proteico, es necesario en primer lugar elegir su fuente primaria, la cual puede ser de tres tipos: vegetal, animal o bacteriano; todo depende del enfoque de nuestro producto final. En esta última década se encuentra en auge dentro del área de investigación, el utilizar el material de origen natural para la elaboración de productos que colaboren con el área industrial y de comercialización, para lo cual se requiere que tanto materias primas como de sustento en el proceso sean de bajo costo y una elevada disponibilidad, y es allí donde la obtención de colágeno hidrolizado entra a esta área cumpliendo con los requisitos para ser un producto sustentable, tanto en la parte de investigación como en la de comercialización (Ortega et al.,2017; Almonacid et al.,2019).

Para elección de la fuente proteínica idónea es necesario tener en cuenta la funcionalidad del producto final, así también el aspecto que se quiere conseguir, en general se utiliza colágeno y gelatina para destacar propiedades gelificantes y emulsificantes puesto que tienen una gran capacidad de formación de geles, y es allí nuestro punto de interés ya que se requiere un protocolo que elimine esta propiedad natural que posee esta materia prima (Benítez et al., 2008; Pagán et al., 2013).

Por otro lado, la utilización de una enzima, es sugerido en procesos aplicados en la industria debido a que los productos finales pueden obtenerse en cortos lapsos de tiempo, impulsando reacciones biológicas del proceso sin alterar su composición ni consumirse en el mismo, así mismo estas reacciones son capaces de desarrollarse a bajas temperaturas y presiones, o utilizados materiales económicos. Al referirse a la enzima bromelina, la cual se extrae de *Ananas comosus* L. (piña), una fuente vegetal abundante y de fácil obtención en

Ecuador; su función de interés se direcciona a la degradación eficaz de los aminoácidos debido a su acción proteolítica (Carvajal et al.,2004; Párraga et al.,2019).

El punto de interés donde interviene tanto la fuente de colágeno y la acción enzimática se direcciona a su aprovechamiento en construcción de las células dérmicas, con el fin de generar firmeza y fortalecimiento en la piel, aliviar dolor de las articulaciones, prevenir la pérdida ósea, reducción en riesgo de enfermedades del corazón, entre otras. Al obtener colágeno hidrolizado, se puede realizar varios productos finales, y aprovechar su funcionalidad para una rentabilidad industrial (Juher y Pérez, 2015; Schoenfeld,2018).

Objetivos de Investigación

Objetivo General del Proyecto

Obtener colágeno hidrolizado mediante la reacción enzimática con bromelina sobre gelatina.

Objetivos Específicos del Proyecto

- Evaluar las condiciones óptimas para la hidrólisis de colágeno con bromelina sobre gelatina, que permita estandarizar un protocolo consistente, repetible y escalable.
- Determinar la calidad de colágeno hidrolizado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).
- Cuantificar por el método de Bradford la cantidad de proteína presente en el colágeno hidrolizado.

Hipótesis de la Investigación

Se obtiene colágeno hidrolizado mediante la reacción enzimática con bromelina sobre gelatina.

Capítulo 2: Marco Teórico

Enzimas

Las enzimas son proteínas que cumplen la función de catálisis o regulación de procesos biológicos de los seres, lo que provocan, es una aceleración o retardo en una reacción específica sin alterar su composición; estas macromoléculas poseen múltiples funciones, como, por ejemplo: a nivel industrial, posee varias aplicaciones en alimentos, así también en productos farmacéuticos, en los cuales desarrolla técnicas para obtenerlos en procesos optimizados con respecto del tiempo (Austin, 2019; Charnock y McCleary, 2005; Dalgo, 2012).

Características

Existen varias características de las que las enzimas son responsables y por las cuales se destacan al elegir las para actuar como materia de un proceso (Cárdenas, 2014; Gebauer, 2001):

- Poseen alta especificidad por el sustrato
- Poseen efecto catalizador, disminución en la energía de activación
- No influyen en el estado de equilibrio de la reacción, únicamente en su velocidad.
- Se utiliza pequeñas cantidades para ser eficaces.
- Genera una producción de un complejo enzima-sustrato el cual es reversible.
- Tienen la capacidad de intervenir nuevamente, pues no se consumen a lo largo de la reacción.

Reacción Enzimática

En las reacciones que son catalizadas con una enzima [E], los reactivos sobre los cuales se va a llevar a cabo la reacción se denominan sustratos [S], la composición de este sustrato va a cambiar y se va a formar uno o varios productos de interés, a todo ello se va a poder expresar de la siguiente manera (Dalgo, 2012):



Al unirse la enzima al sustrato, en la primera parte de la reacción se forma el complejo enzima-sustrato que va a ser alterado en su composición y genera en la segunda parte de la reacción el producto deseado, acompañado de la enzima libre que podrá ser reutilizada y actuar sobre un sustrato diferente.

Actividad Enzimática

La actividad enzimática se puede definir como el nivel de enzima que se encuentra activa y presente, para lo cual depende de ciertas condiciones, esta actividad es denotada con la letra U y expresa la cantidad de enzima que cataliza 1 umol de sustrato de interés en un rango de un minuto; sin embargo, también puede ser expresada en unidades de enzima por miligramo de proteína expresada como U/mL prot.

Factores que Influyen en la Reacción Enzimática

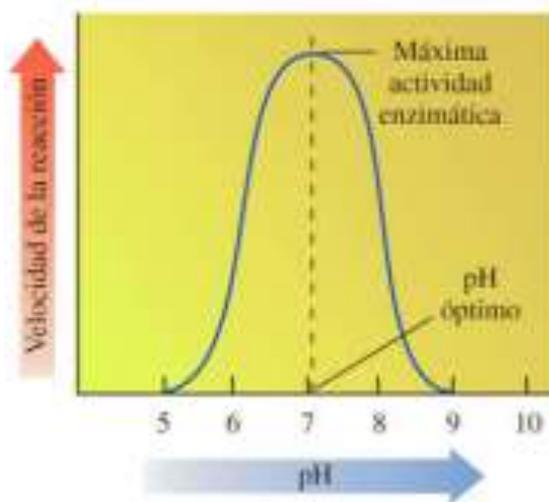
Entre los principales factores que van a influenciar el proceso de la reacción enzimática, y los cuales generan una alteración dándole a la enzima condiciones óptimas para que pueda realizar la unión enzima-sustrato son: pH, temperatura, tiempo y concentración (Khan Academy, 2021).

pH.

Este factor es responsable directo de lo correspondiente a su estructura terciaria ya que es capaz de mantenerla, así también se afirma que la enzima llega a ser más activa cuando se desarrolla en un medio dentro un rango óptimo de este factor. Cuando el valor de pH se encuentra fuera de este rango, existen una alteración con respecto a los grupos R, por lo tanto, va a existir una afección a la estructura terciaria lo cual va a provocar que no se una la enzima al sitio activo y el complejo enzima sustrato no se forme, sin embargo, se puede revertir al cambiar el pH nuevamente en condiciones óptimas, siempre y cuando las variaciones anteriores no hayan sido excesivas **Figura 1** (Khan Academy, 2021; Timberlake, 2013).

Figura 1

Gráfica de relación del factor pH vs velocidad de la reacción enzimática



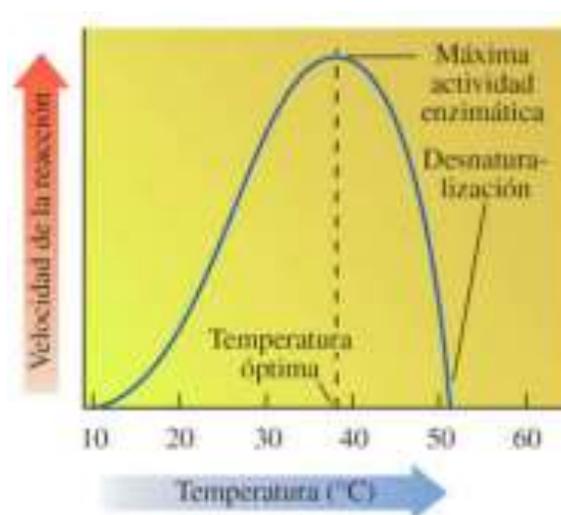
Nota. La gráfica muestra como el pH influye en la velocidad de la reacción, indicando que la máxima actividad enzimática que va a expresarse es cuando el pH es 7, el cual es considerado como pH óptimo (Timberlake, 2013).

Temperatura.

Es necesario que exista un aumento de temperatura puesto que ello ocasiona una aceleración en la reacción, es decir la enzima va a poseer suficiente cantidad de energía para ser utilizada. Sin embargo, la razón más acertada por la que se este factor es indispensable para la reacción, se debe a que, si existe un incremento excesivo de temperatura, la enzima puede llegar a desnaturalizarse, y generaría una pérdida de su actividad enzimática. En varias bibliografías, los autores afirman que la temperatura óptima para un gran grupo de enzimas es correspondiente a los 37°C **Figura 2** (Khan Academy, 2021; Timberlake, 2013).

Figura 2

Gráfica de relación del factor temperatura vs velocidad de la reacción enzimática



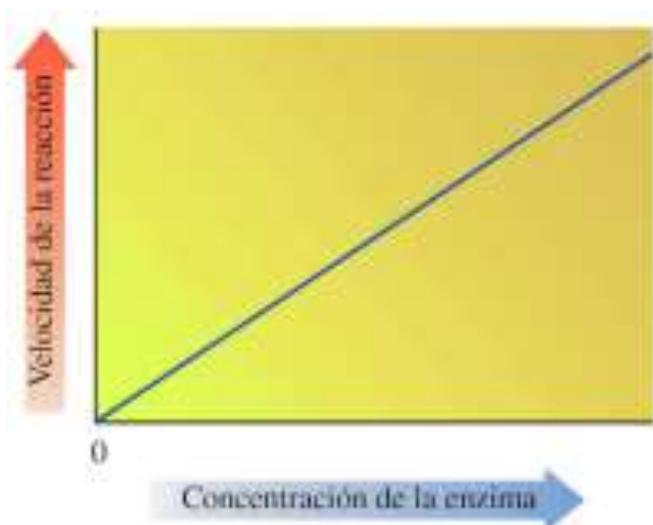
Nota. La gráfica muestra como la temperatura influye notablemente al incrementar, sin embargo, llega a un punto óptimo de entre los 35 y 38°C en que la reacción va a tener su máximo de actividad, sin embargo, si la temperatura de reacción sigue aumentando, puede producir depende del tipo de enzima, que se desnaturalice y pierda su actividad y efecto en la reacción (Timberlake, 2013).

Concentración de Enzima y Sustrato.

Cuando en la reacción se aumenta la concentración con respecto a la cantidad de enzima, lo que se ocasiona es un aumento en la velocidad de reacción, considerando que está presente en la reacción el sustrato al que esta enzima se va a unir. La reacción deja de aumentar su velocidad, una vez que el sustrato se encuentra completamente unido a la enzima; de la misma forma actúa el sustrato al aumentar su concentración, hasta que llega a un cierto punto en el que la enzima disponible va a estar saturada y ya no existirá aumento de la velocidad. La concentración de enzima va a expresarse directamente proporcional con respecto a la actividad enzimática; sin embargo, para que esto sea expresado de esa forma, la concentración de la enzima debe ser menor a la del sustrato **Figura 3 y 4** (Khan Academy, 2021; Timberlake, 2013).

Figura 3

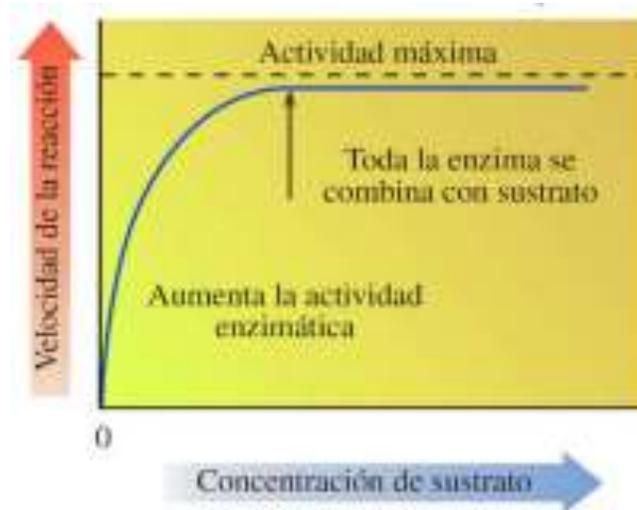
Gráfica de relación de la concentración de enzima vs velocidad de la reacción enzimática



Nota. La gráfica muestra como la concentración de enzima es directamente proporcional a la velocidad de reacción, puesto que si esta aumenta la velocidad también lo hace. Tomado del libro de Química general, orgánica y biológica: estructuras de la vida por Timberlake, 2013.

Figura 4

Gráfica de relación de la concentración de sustrato vs velocidad de la reacción enzimática



Nota. La gráfica muestra como la concentración de sustrato al aumentar produce que la velocidad también lo haga, sin embargo, llega a un punto de actividad máxima en el cual así aumente el sustrato la velocidad de reacción será continua y no se producirá cambios (Timberlake, 2013).

Clasificación

La clasificación de enzimas se realiza en función de su acción catalítica específica (Cárdenas, 2014; Gonzáles, 2017).

Tabla 1*Clasificación de las enzimas*

#	Enzima	Característica
1	Oxidoreductasas	Intervienen en la reacción de transferencia de hidrógeno (H) o electrones (e-) de un sustrato a otro.
2	Transferasas	Se encuentran presentes en reacciones de dadores de un grupo químico específico, que no sean hidrógeno.
3	Hidrolasas	Actúan en reacciones de hidrólisis en presencia de moléculas de H ₂ O.
4	Liasas	Intervienen en reacciones de eliminación, ruptura o soldadura de sustratos.
5	Isomerasas	Participan de la interconversión de isómeros.
6	Ligasas	Producen catálisis para la formación de enlaces mediante la hidrólisis simultánea de nucleótidos de trifosfato (ATP o GTP).

Nota. Recuperado de González, J. M. Copyright 2017 por González. Reprinted with permission.

Proteasas.

Cada uno de los 6 tipos de enzimas, posee una subdivisión; en el caso de las hidrolasas, posee un tipo de enzima llamadas proteasas, también conocidas como peptidasas y son enzimas proteolíticas que son capaces de escindir los enlaces peptídicos de las proteínas lo cual facilitan

su posterior digestión, y cumplen la característica que la reacción se genera en presencia de una molécula de agua (Wiseman, 1985; Dalgo, 2012).

Uno de los ejemplos de enzimas que se extraen de fuentes vegetales y mediante procesos biotecnológico han podido ser útiles para la obtención de productos finales, es la proteasa bromelina (Gacesa y Hubble, 1941; Dalgo, 2012).

Existe otra división de acuerdo al aminoácido o composición de su sitio activo: serín proteasas, asparticoprotasas, cisteín proteasas y metaloproteasas (Dalgo, 2012; Eliécer, 2003).

Bromelina

La bromelina (EC 3.4.22.32) es una enzima proteolítica o glicoproteína perteneciente a las cisteíno proteasas, es extraída del tallo o el fruto de *Ananas comosus* L. (piña), esta enzima es activada por la presencia de cisteína, tiosulfato y glutatión; e inhibida por iones metálicos oxidantes y agentes que reaccionan con tioles (Dalgo, 2012).

Su medio de acción se desarrolla sobre aminoácidos básicos y aromáticos. Posee un rango óptimo de 5 a 8, con una baja tolerancia térmica. Esta enzima se direcciona en aplicaciones para varias industrias: cárnica, cervecera, vinícola, cosmética, farmacéutica y también clínica (Carrera, 2003; Mollejo, 2020).

Propiedades Químicas

En el año de 1970 los investigadores Yasuda, Takanashi y Murashi reportaron por primera vez la estructura y composición de la enzima bromelina; en su composición tiene un residuo y carboxilo terminal que es valina y glicina correspondientemente. Esta glicoproteína presenta un oligosacárido que se encuentra covalentemente unido a la cadena peptídica, posee

también un grupo sulfhidrilo reactivo por molécula y sus aminoácidos presentes en la proteína son: arginina, valina. Ácido aspártico, glicina, serina, metionina, prolina, amonio, alanina y glucosamina tal como se encuentra representado en la **Figura 5** (Pulido, 2007).

Propiedades Físicas

Tabla 2

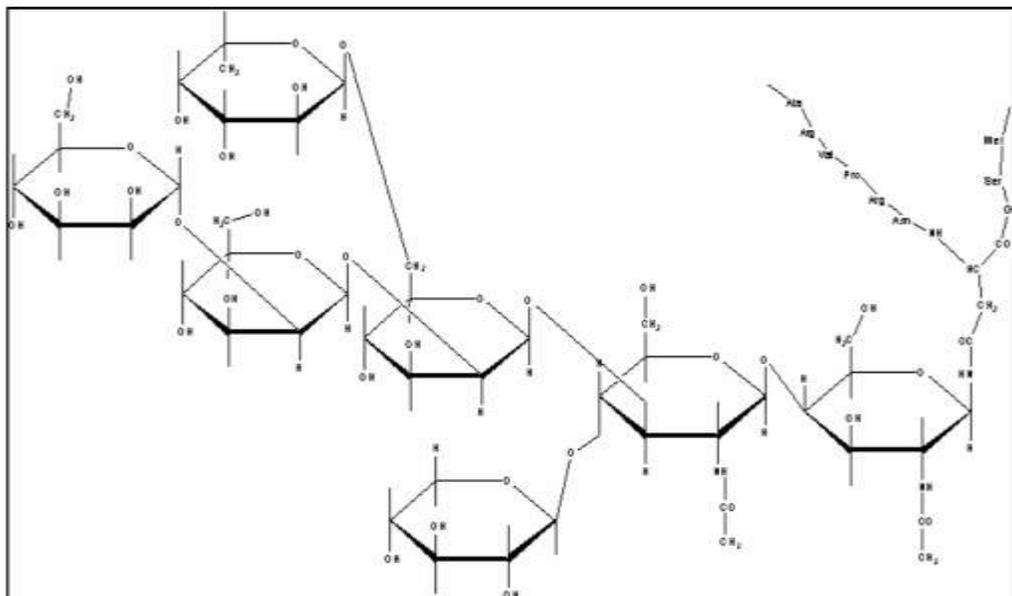
Propiedades físicas de la enzima Bromelina

Propiedades	Tallo de piña
Peso molecular	33000 Da
Color	Blanco
Estado	Polvo
Olor y sabor	Característico
Solubilidad	En agua
pH óptimo	5-8
Actividad enzimática	1200 GDU/g
Temperatura de inactivación	70 °C
Temperatura de almacenamiento	25 °C

Nota. Recuperado de Pulido. Copyright 2007 por Pulido. Reprinted with permission.

Figura 5

Composición química de la molécula de bromelina



Nota. Se observa que la estructura de la enzima Bromelina se encuentra compuesta por diferentes aminoácidos unidos. Tomado del Estudio sobre la obtención de bromelina a partir de desechos de piña y la factibilidad de producirla en México a nivel industrial por Puebla, 1979.

Gelatina

La gelatina es una proteína considerada como producto alimenticio natural, la cual se obtiene mediante hidrólisis ácida, alcalina o enzimática de la molécula de colágeno. La fuente para obtención puede ser: piel de bovinos y porcinos o huesos desmineralizados de animales, así también puede ser escamas de pescados, sin embargo, por la alta contaminación ya no es una buena estrategia para su extracción. La composición de la gelatina que se conoce como gelatina sin sabor es de un 98% de proteína proveniente del colágeno y 2% de sales minerales; en lo cual también posee una variedad de aminoácidos como: glicina 27%, prolina 16%, valina 14%, hidroxiprolina 14% y ácido glutámico 11% (Prodegel, 2017).

Colágeno

Descubrimiento de la Molécula

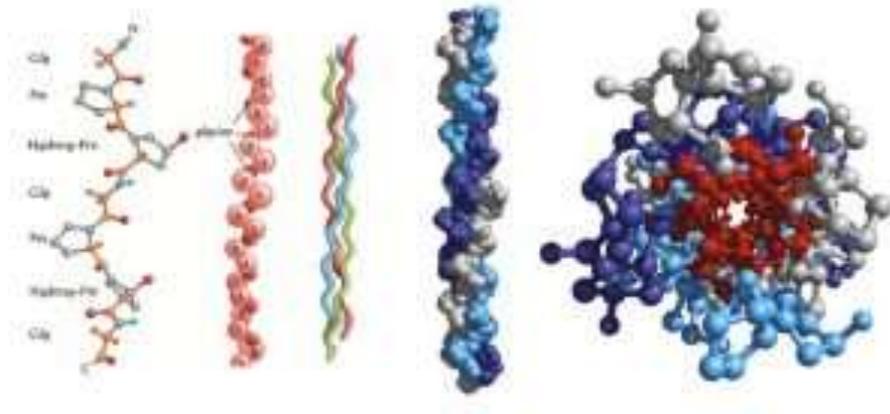
El estudio que se dió de la molécula colágeno en su mínima expresión empezó en el año de 1950, gracias a dos investigadores que fueron Highberger y Schmitt pues realizaron la caracterización de la molécula mediante microscopía electrónica. En 1955 Rich y Crick plantearon modelos para determinar la estructura de tripe hélice del colágeno y Boedtker y Doty en 1956 estipularon las fisicoquímicas que esta molécula contenía. Miller y Matukas, en 1969 presentaron el contenido de fibrillas de colágeno con bandas de 70 nm que fueron clasificadas en tres diferentes clases de colágeno con característica de homología (Saenz Serrano, 2017).

Composición y Ubicación

El colágeno es una molécula que se encuentra dentro de matriz extracelular de los tejidos, como puede ser el caso de piel, hueso, cartílago, tendones y ligamentos a lo cual se le atribuye en sus características principales que es un componente del tejido músculo-esquelético, proporciona estabilidad al tejido. La molécula está constituida por 3 cadenas polipeptídicas que se encuentran unidas para la formación de una triple hélice **Figura 6** (Elsevier, 2019; Baltimore et al., 2000).

Figura 6

Estructura de la molécula de colágeno



Nota. La figura posee las diferentes estructuras del colágeno, siendo la última la triple hélice que lo compone. Tomado de la *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales* por Dávila y Martín, 2016.

La unidad que lo compone fundamentalmente es una proteína larga de 300 nm, de 1,5nm en su diámetro y presenta 3 subunidades en forma de espiral, cada una de las cadenas posee un aproximado de 1050 aminoácidos. Una de las diferencias que denota cada tipo de colágeno es que existen segmentos dispuestos a una interrupción de la triple hélice de su estructura y funcionalidad diferente, la cual se ve representada en la **Figura 6** (Mandal, 2019). Las 3 cadenas que se encuentran componiendo esta molécula de colágeno, poseen una secuencia repetitiva de glicina-X-Y que representa unidades de prolina o hidroxiprolina (Chandler et al., 1988; Guerrero,2019).

La vía de degradación de colágeno se ocasiona en la superficie de los tejidos, gracias al accionar de enzimas colagenasas que tienen la capacidad de unirse a la triple hélice; la

consecuencia de esta vía es la disgregación y aumento de otras posibles degradaciones es decir que se asimile en el cuerpo (Serrano, 2011; bfit,2020).

Tipos

Existe una clasificación extensa para definir los diferentes tipos de colágeno, sin embargo, los más importantes y de interés con respecto al enfoque de suplemento para el ser humano son (Elsevier, 2019):

Colágeno Tipo I.

Su función es el generar resistencia con respecto a la movilidad, dotando al organismo flexibilidad y resistencia. Se considera que el tipo más abundante en el cuerpo humano, se puede encontrar formando parte de piel, hueso, tendón y córnea, es decir la mayoría de tejido conectivo. Se compone de: 33% glicina y 10% de prolina (Elsevier, 2019).

Colágeno Tipo II.

Se localiza como parte del cartílago, aunque también se encuentra en la córnea embrionaria formando fibrillas finas. Sus dimensiones y forma alargada son similares a las del colágeno de Tipo I. Es de gran importancia para la piel y su asimilación se realiza por medio de condrocitos que otorgan la capacidad de la matriz cartilaginosa y resistencia ante una presión intermitente. Este colágeno es una proteína que consta de dieciocho aminoácidos (Elsevier, 2019).

Colágeno Tipo III.

El tejido conjuntivo laxo, es un sitio específico en donde se podrá encontrar este tipo de colágeno, así también en lugares como los vasos sanguíneos y la dermis. La función principal de

este tipo de colágeno es el soporte de órganos que poseen una capacidad de expansión. Su principal composición es la presencia de cadena alfa 3 (Elsevier, 2019).

Colágeno Tipo IV.

Su función radica también en el sostén y a capacidad de filtración, posee una estructura en forma de lámina basal que se encuentra en epitelios (Elsevier, 2019).

Hidrólisis

Una alternativa eficaz para la ingesta y absorción de aminoácidos incorporados en la dieta alimenticia, es la hidrólisis de proteínas, lo cual genera un aumento en la disponibilidad de este tipo de moléculas. El colágeno es otra fuente de proteínas de uso frecuente para hidrolizados. Para lo cual en este proceso se utilizan enzimas que generan una amplia especificidad, proporcionando así una serie de péptidos de diferente extensión de aminoácidos C- y N-terminales variables con una distribución de diferentes pesos moleculares lo cual se genera debido al grado de digestión alcanzado (Benjakul y Morrissey, 1997; Ángeles et al.,2018).

El estado natural del colágeno tiene la característica de ser insoluble para lo cual es indispensable un cambio de temperatura para poder desestabilizar a la molécula, de tal forma que sus hélices se separan y se obtiene moléculas proteicas de menor peso molecular que conservan su estructura helicoidal, las cuales si se sigue aplicando elevación de temperatura se obtendrá una estructura totalmente diferente (Mamani, 2018).

Capítulo III: Materiales y Métodos

Instituciones Participantes

La presente investigación se elaboró en colaboración con las instalaciones de la empresa Wildland Cía. Ltda. y laboratorios de docencia de la Universidad de las Fuerzas Armadas- ESPE.

Colaboradores Científicos

Luis E. Trujillo PhD

Director de tesis

Ing. Hernán Paz

Docente líder del proyecto y fundador de la empresa Wildland Cía. Ltda

Área de Estudio

La primera parte experimental del proyecto se realizará en las instalaciones del laboratorio de la empresa “Wildland” ubicada en Ecuador, en la ciudad de Quito, en el sector de Puengasí - Calle K No. 204 entre calles M y N.

La segunda parte fue realiza en los laboratorios de docencia de la Universidad de las Fuerzas Armadas- ESPE, sede Sangolquí.

Metodología

Materia Prima

La enzima que se utilizó en el presente estudio fue bromelina, suministrada por un proveedor comercial, la cual basada en sus especificaciones posee una actividad enzimática de 1000000 U/g.

El sustrato que actuó en la reacción enzimática fue gelatina, obtenida de la Productora de Gelatina Ecuatoriana S.A. PRODEGEL.

Condiciones de Hidrólisis de Colágeno con Bromelina

Se realizaron diferentes ensayos, en los cuales se aplicó la variación en tres factores diferentes, que alteraron la reacción enzimática entre bromelina y gelatina; con respecto a la concentración de enzima (0.1M, 0.25M, 0.5M), el tiempo (1h, 2h, 3h) y pH (5.85, 6.10, 7) en el proceso de hidrólisis. Se utilizaron 69.75L de agua destilada, 5.25g de gelatina para cada uno de los tratamientos y citrato de sodio para nivelar el pH (0.5g, 1g, 3g correspondientemente) **Tabla 3**. Se consideró una temperatura de 37°C. Para esta parte de la experimentación se consideró como variable respuesta el grado de hidrólisis (GH).

Caracterización Organoléptica

Se realizó una evaluación organoléptica en cada uno de los ensayos, considerando las características de: olor, color y consistencia. La determinación se realizó basado en la investigación de Fernández (2001), el cual planteó que los atributos escogidos, representan una base al momento de obtener resultados cualitativos.

Determinación del Grado de Hidrólisis

Se determinó el grado de hidrólisis (DH) de cada uno de los tratamientos planteados con las variaciones correspondientes de pH, temperatura tiempo. Se utilizó para esta determinación una reacción en donde intervienen los enlaces peptídicos que están presentes como hidrolizados sobre la totalidad de enlaces que están presentes en cada uno de los tratamientos realizados experimentalmente, tal como se expresa en la *Ecuación 1*.

$$DH = \frac{h}{h_{Total}} * 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

- h va a corresponder la cantidad de enlaces peptídicos hidrolizados.
- h_{tot} la cantidad total de enlaces peptídicos que son correspondientes a la proteína nativa [meq/g] (Spellman, 2003).

El método que se utilizó para la medición de cantidad de nitrógeno liberado es Kjeldahl basado y modificando las especificaciones de PanReac AppliChem (2018). Los resultados obtenidos, fueron proporcionados por un laboratorio asociado a la empresa Wildland Cía. Ltda (Figueroa et al.,2016; Llerena y Rodríguez, 2017).

Cuantificación de Proteína Mediante el Método de Bradford

La cuantificación de proteína presente en el producto final, se realizó mediante el método Bradford, el cual permitió determinar la cantidad de proteína que se encuentra presente en el colágeno hidrolizado. En primer lugar, se realizó una curva de calibración utilizando albúmina sérica bovina (BSA), la cual fue la proteína estándar. La solución de BSA se preparó en un buffer de cloruro de sodio 0.15M en una relación 1:1, posterior a ello se realizó 5 diluciones seriadas mg/mL (0.2; 0.4; 0.6 ;0.8; 1) teniendo como resultado final 800uL en cada uno de los tubos con dilución.

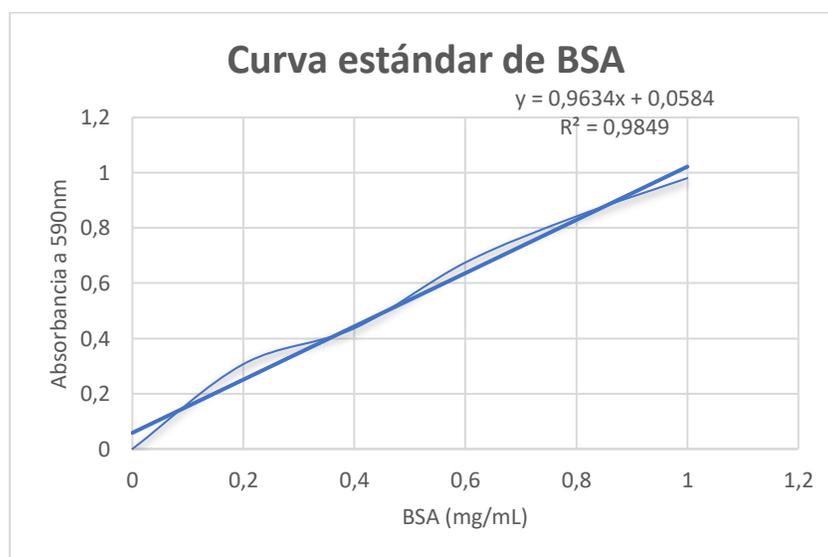
Posterior a ello, se realizó el análisis de la cantidad de proteína presente en el colágeno hidrolizado que se obtuvo del tratamiento en condiciones óptimas, se hizo una dilución 1:1 (muestra y NaCl) para lo cual se colocó en un tubo de ensayo 0.0016g de muestra con 1.6mL NaCl para la primera dilución, posterior a ello se hizo una segunda dilución 1:2; a cada uno de

los tubos tanto para los que respectan a la curva de calibración y a los que contienen la muestra se les añadió 200uL de reactivo de Bradford se incubó la reacción a temperatura ambiente por 5 min (winkler Ltda., 2017).

Finalmente, la lectura de la absorbancia se realizó con el espectrofotómetro Thermo scientific ajustado a 595 nm, y posterior a ello se analizaron y obtuvieron las gráficas de los datos mediante la herramienta Microsoft Excel.

Figura 7

Curva estandar de BSA en buffer de cloruro de sodio 0.15M



Análisis de Electroforesis en Gel de Poliacrilamida SDS-PAGE

Para determinar la pureza del colágeno hidrolizado obtenido y también para identificar la concentración presente en el ensayo a condiciones óptimas se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE el método se empleó en base al protocolo establecidos por Laemmli (1970) y el manual de CAMBREX (2017). La muestra de colágeno hidrolizado (tratamiento

M3T3P2) fue disuelta en SDS 5% e incubada a 70 °C por 20 min. Posterior a ello se solubilizó en buffer de electroforesis 1:1 (25mM Tris Base, 192mM Glicina y 0.1% SDS). La muestra preparada (15ug muestra, 3um buffer de carga y 2ug B-mercaptoetanol) se cargó en un gel concentrador al 5% y un gel separador al 15%; se utilizó un marcador molecular REF P6649 de Molecular Probes by life technologies. La corrida se realizó en una cámara de electroforesis vertical Thermo scientific a 150v y 100mA.

Al finalizar el proceso de electroforesis se realizó una tinción al gel con una solución de Azul de Commassie durante 24h en agitación leve; posterior a ese tiempo se procedió a desteñir el gel mediante lavados de agua tibia hasta lograr una visualización en las bandas con los diferentes pesos moleculares.

Diseño Experimental

El diseño experimental estuvo compuesto por la influencia de 3 factores: pH, concentración de la enzima bromelina y el tiempo de reacción; en cada uno de los factores existió 3 niveles. Y la variable de respuesta fue el grado de hidrolisis que generó cada uno de los tratamientos. En total se obtuvo 27 experimentos, con 2 repeticiones cada uno y fueron denotados por letras y números dependiendo de cada uno de los factores que interactuaron, tal y como se observa de forma general en la Tabla 3.

Tabla 3*Matriz de la denotación y valores para cada unidad experimental*

Factor						Variable de respuesta (%)
Concentración de Bromelina		Tiempo de reacción		pH		Grado de hidrólisis
<i>Denotación</i>	<i>Valor</i>	<i>Denotación</i>	<i>Valor</i>	<i>Denotación</i>	<i>Valor</i>	
	(M)		(h)			
m1	0.1	t1	1	p1	5.85	
m2	0.25	t2	2	p2	6.10	
m3	0.5	t3	3	p3	7	

Para el análisis de resultados se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) en la herramienta Microsoft Excel utilizando un valor de significancia de 0.05, por la cual se evaluó la hipótesis de interés y las alternativas que se plantearon, lo que permitió obtener las condiciones óptimas para establecer un protocolo de obtención de colágeno hidrolizado.

Capítulo IV: Resultados y Discusión

Hidrólisis de Colágeno con Bromelina

Una vez que se relacionó cada factor se obtuvo 27 tratamientos diferentes Tabla 4, Se obtuvo un rango de GH de entre 1.02 y 13.685% de los cuales se obtuvo como mejor experimentación el tratamiento M3T3P2 debido a que su grado de hidrólisis fue en promedio de 13.685%, lo cual, mediante otras investigaciones relacionadas, varios autores afirman que cuando se proporciona una mayor concentración de enzima se logra obtener una mayor cantidad de grado de hidrólisis (Gaviria et al., 2015). Sin embargo, existe la influencia de 2 factores más y al analizar el pH 6.10 en el que se desarrolló; se constató que a pesar de que las variables con respecto a este factor se encontraban dentro del rango establecido (4.5 – 8) (BIOCON,2016), la variable P2 presentó el mayor grado de hidrólisis, tal como se indica en el la gráfica de interacción del **Apéndice 3.2-3.3**. los valores con respecto a este pH fueron los más altos.

El valor del GH de 13.685% obtenido en esta investigación, se consideró el óptimo para poder reproducirlo a gran escala, puesto que en estudios como los de Llerena y Rodríguez (2017) establecen un porcentaje de 12.59% que lo comparan con los resultados en los que Pandia (2011) indicó que el resultado propicio para GH es de 15%, puesto que así se obtiene una mejor capacidad de retención de agua, mayor grado de hidrólisis y también una solubilidad de nitrógeno, un tercer autor emite que ayuda también en la capacidad emulsificante, sienta este GH en su investigación de estudio de 10.5% (Camacho et al., 2007).

En cuestión de las características organolépticas, Fernández (2001) estableció en su investigación ciertas características que colaborarían para obtener el producto final, el tratamiento M3T3P2 presentó un olor agradable al igual que el resto de los tratamientos, ninguno

de ellos tuvo un olor desagradable es decir que en esta investigación no fue un punto problema; las razones para que el olor y sabor varíen es por la intervención de sus elementos en el protocolo, así como el añadir citrato de sodio el cual actuó como un regulador de pH, sin embargo este no actuó alterando estas propiedades organolépticas, esta sustancia química se presenta en polvo cristalino, de color blanco e inodoro (Possehl S.A., 2020). Con respecto al color, se obtuvieron 3 tonalidades: amarillo traslúcido, claro y opaco, lo que produjo este cambio es la cantidad que se necesitó para poder equilibrar y obtener los niveles de pH requeridos, debido a las características antes mencionadas del compuesto el cambio de color se lo muestra en el **Apéndice 1**.

El proceso de obtención de colágeno hidrolizado supone una etapa de desnaturalización la cual se ve reflejada en la disminución de la viscosidad (León et al.,2019), es decir que cualitativamente se vio el cambio de colágeno nativo a uno desnaturalizado, debido a que presentó un cambio luego del tratamiento, es el caso del M3T3P2 que es de nuestro interés, mostró una escasez de viscosidad en su composición luego de estar en las condiciones preestablecidas; así mismo uno de los tratamientos que no lograron un cambio en esta característica fueron los primeros presentados en la **Tabla 4** los cuales poseían en su composición un alto grado de viscosidad y posterior al tratamiento también siguieron gelificando el producto final.

Tabla 4

Datos de la variable respuesta GH y características organolépticas del proceso de hidrólisis

Tratamientos	GH 1 %	GH 2 %	Promedio %	Características Organolépticas		
				Olor	Viscosidad	Color
M1T1P1	1.04	1	1.02	+	++	Amarillo traslúcido
M1T1P2	1.08	1.02	1.05	+	++	Amarillo claro
M1T1P3	1.09	1.05	1.07	+	++	Amarillo opaco
M1T2P1	1.2	1.15	1.175	+	++	Amarillo traslúcido
M1T2P2	1.24	1.11	1.175	+	++	Amarillo claro
M1T2P3	1.24	1.21	1.225	+	++	Amarillo opaco
M1T3P1	1.29	1.19	1.24	+	++	Amarillo traslúcido
M1T3P2	1.31	1.15	1.23	+	++	Amarillo claro
M1T3P3	1.31	1.36	1.335	+	++	Amarillo opaco
M2T1P1	3.45	3.6	3.525	+	++	Amarillo traslúcido
M2T1P2	3.8	3.72	3.76	+	++	Amarillo claro
M2T1P3	3.84	3.81	3.825	+	++	Amarillo opaco
M2T2P1	3.9	3.96	3.93	+	+	Amarillo traslúcido
M2T2P2	3.94	3.84	3.89	+	+	Amarillo claro
M2T2P3	3.96	3.98	3.97	+	+	Amarillo opaco
M2T3P1	4	4.05	4.025	+	+	Amarillo traslúcido
M2T3P2	4.32	4.4	4.36	+	+	Amarillo claro
M2T3P3	4.35	4.65	4.5	+	+	Amarillo opaco
M3T1P1	10.8	10.9	10.85	+	-	Amarillo traslúcido
M3T1P2	12.48	12.32	12.4	+	-	Amarillo claro

Tratamientos	GH 1 %	GH 2 %	Promedio %	Características Organolépticas		
				Olor	Viscosidad	Color
M3T1P3	12.54	12.48	12.51	+	-	Amarillo opaco
M3T2P1	10.08	10.2	10.14	+	-	Amarillo traslúcido
M3T2P2	13.57	13.76	13.665	+	--	Amarillo claro
M3T2P3	12.69	12.72	12.705	+	-	Amarillo opaco
M3T3P1	11.59	11.68	11.635	+	-	Amarillo traslúcido
M3T3P2	13.59	13.78	13.685	+	--	Amarillo claro
M3T3P3	12.78	12.84	12.81	+	-	Amarillo opaco

Nota. Para determinar las características organolépticas se representó para el olor un signo (+) si es agradable y (-) si no es agradable; con respecto a la viscosidad el signo de menos (-) representó poco de disminución en esta propiedad, (--) no presenta viscosidad, (+) presenta viscosidad, (++) presenta alta viscosidad.

La **Tabla 5** corresponde al análisis de varianza de los resultados obtenidos con respecto a la variable de respuesta GH en 2 repeticiones cada tratamiento, se observó que las condiciones óptimas del ensayo fueron pH de 6.10, concentración de bromelina 0.5M y 3h en el tiempo de reacción. Estos valores fueron analizados también mediante la interacción de estos 3 factores presentes en el **Apéndice 3**.

La Influencia de los 3 factores con sus 3 variables se confirmó mediante el análisis ANOVA que se encuentra resumido en la **Tabla 5** donde se dio paso a nuestra hipótesis de estudio, y se obtuvo como resultado que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) tanto en nuestra variable respuesta GH y la dependencia que existe entre las variables; siendo así la concentración de bromelina el factor con mayor influencia sobre el grado de hidrólisis; las gráficas del **Apéndice 3.1-3.2** muestran incremento de GH mientras existe también un aumento de la cantidad de enzima

en el tratamiento, es decir que a una mayor cantidad de enzima la molécula de colágeno logrará descomponerse a péptidos más pequeños de fácil absorción (Gaviria et al., 2015).

Tabla 5

Análisis de varianza de los tratamientos y sus interacciones entre los factores

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
	1223.15193			7335.8	7.73467	1.91262195
Tratamientos	3	26	47.04430513	1426	E-46	9
	1198.64687			93454.	1.43062	3.35413082
Concentración	8	2	599.3234389	9977	E-52	9
				203.79	5.12031	3.35413082
Tiempo	2.61	2	1.306938889	6419	E-17	9
				21.984	3.64185	2.72776530
CB/TR	0.56	4	0.140986111	551	E-08	6
	7.52547777			586.73	5.65098	3.35413082
PH	8	2	3.762738889	9532	E-23	9
	11.1404444			434.29	4.46921	2.72776530
CB/PH	4	4	2.785111111	3965	E-24	6
	0.54964444			21.427	4.71817	2.72776530
TR/PH	4	4	0.137411111	0863	E-08	6
				41.160	3.71491	2.30531317
CTP	2.11	8	0.263958333	1213	E-13	7
Error	0.17315	27	0.006412963			
	1223.32508					
Total	3	53				

Caracterización del colágeno hidrolizado

Método de Bradford

Se obtuvo una absorbancia de 0.2456nm para la primera dilución de muestra de colágeno hidrolizado y para la segunda dilución 0.2451nm, valores que se utilizaron para obtener la concentración de proteína en la muestra. Los valores se obtuvieron utilizando la curva de calibración de BSA con un coeficiente de correlación (R²) de 0.9849 **Figura 7**, de donde

se despejó la *Ecuación A4*. Los valores finales de concentración tanto en la dilución 1 y 2 fueron de 0.1943mg/mL y 0.1941mg/mL correspondientemente.

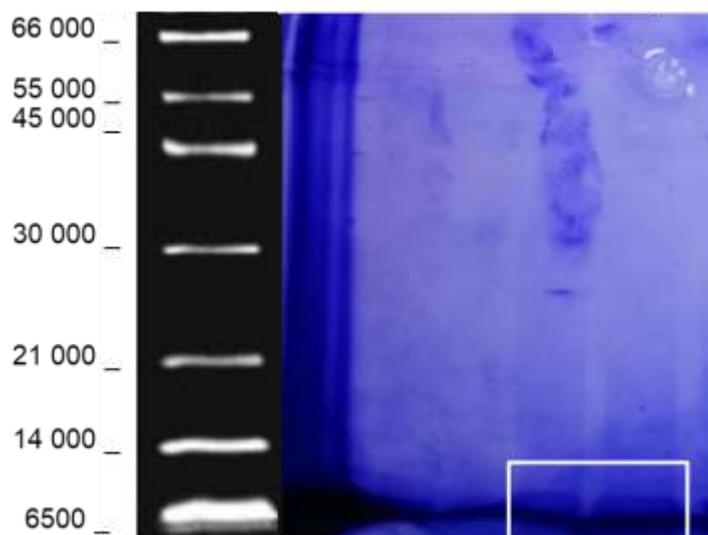
Electroforesis SDS- PAGE

El gel que se obtuvo en la corrida de electroforesis determinó la presencia de colágeno hidrolizado mediante la tinción de las bandas con pesos moleculares de alrededor de 6500 Da, como se observa en la **Figura 8**, peso el cual se encuentra dentro del rango obtenido en estudios previos y bibliografía relacionada con el tipo de enzima utilizada y sustrato, como es el caso del peso molecular de 25 kDa, obtenido de un protocolo con un pH de 6.15, 45°C y una concentración de enzima de 5.70mg/mL, sin embargo el tiempo de digestión fue de 22.5 h lo cual no se encuentra dentro del rango del presente estudio.

El colágeno cuando se encuentra en estado nativo, es decir en forma de gelatina, con una alta viscosidad posee pesos moleculares superiores a los 100 kDa, cuando este colágeno ha pasado por una reacción enzimática de hidrólisis pueden obtenerse valores en un rango inferior es decir entre 90 a 50 kDa, sin embargo, mientras mayor sea su grado de hidrólisis se van a obtener péptidos de bajo peso molecular, valores inferiores a los 40 kDa (Gorgieva y Kokol, 2011). Lo que genera el tener estos pesos inferiores es la desnaturalización de la molécula de colágeno lo cual origina que no se posea la triple hélice en su composición estructural (Rabotyagova y Cebe, 2008).

Figura 8

Resultado SDS PAGE de colágeno hidrolizado



Capítulo V: Conclusiones

Se obtuvo colágeno hidrolizado a partir de una reacción enzimática de bromelina sobre gelatina, pues esta enzima tiene una alta actividad proteolítica, lo que le permitió actuar frente al sustrato y así permitió escindir a la proteína en péptidos de menor tamaño, lo cual fue constatado mediante las características organolépticas, en esta investigación no existió un cambio en cuanto al olor, pero si al color en tres tonalidades y la viscosidad del líquido fue la característica cualitativa que permitió confirmar cual fue el mejor tratamiento, debido a la ausencia de la misma en el de mayor grado de hidrólisis.

Con respecto con los datos obtenidos de la presente investigación, se observó que la hidrólisis enzimática con bromelina, se desarrolla de forma eficiente, cuando la temperatura de 37°C permanece constante, el pH del medio es básico 6.10, la concentración de enzima es 0.5M y se requieren 3h de tiempo de reacción; como resultado se obtiene un grado de hidrólisis de

13.685%, que se encuentra dentro del rango aceptable y lo que indica que el colágeno fue hidrolizado por la enzima bromelina, y sus propiedades organolépticas fueron de color amarillo claro, ausencia de viscosidad y sin cambio de olor.

El análisis estadístico demostró que la concentración de bromelina representa la variable más relevante dentro del proceso de hidrólisis, sin embargo, tanto ese como los otros dos factores influyen directamente en la obtención de la proteína hidrolizada.

La cuantificación de proteína obtenida después de la hidrólisis fue mediante el método de Bradford del cual se obtuvo el valor de 0.1942mg/mL en base a la curva de calibración de BSA.

Se determinó mediante la tinción de SDS PAGE que el peso del colágeno hidrolizado que se obtuvo con el tratamiento en óptimas condiciones fue de 6500 Da.

Capítulo VI: Recomendaciones

La hidrólisis enzimática que se realizó en base a la bromelina sobre gelatina permitió que se origine un nuevo producto que es el colágeno hidrolizado, sin embargo ello da cabida a diferentes propiedades funcionales con respecto a su composición inicial en lo cual también intervienen varios factores que no fueron analizados en la presente investigación, sin embargo sería conveniente en una futura investigación tomarlos en cuenta para obtener una caracterización completa ante un producto final obtenido, los factores que podrían analizarse serían: capacidad de absorber grasas, capacidad absorción de agua, solubilidad y capacidad espumante, las cuales se presentarían también como variables respuesta antes nuestra variable de estudio.

Posterior a la experimentación y análisis de bibliografía se observó que podía ser tomada en cuenta la temperatura como un cuarto factor que pueden comprobarse si tiene significancia en el grado de hidrólisis, por lo que se sugiere realizar una investigación posterior, con respecto a una variabilidad de temperatura y corroborar si existen cambios con respecto a la influencia de los otros parámetros que fueron pH, concentración de bromelina y tiempo de reacción.

Para obtener otro tipo de caracterización, posterior a la hidrólisis de colágeno y se pretende corroborar la presencia de los resultados obtenidos, se recomienda utilizar otra técnica molecular, por ejemplo, cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), la cual se presenta también como una técnica para cuantificar la pureza del colágeno obtenido.

Referencias

- Academia Española de Nutrición y Dietética - AEND. . (2018). *Avances en nutrición y dietética clínica: Prevención, tratamiento y gestión*. Obtenido de II Congreso de alimentación, nutrición y dietética 22(Supl. 1). Rev Esp Nutr Hum Diet.:
<https://renhyd.org/index.php/renhyd/article/view/656>
- Acosta, E. G., Benítez, R. B., Lenis, L., & Concha, J. (2015). Optimización de la hidrólisis enzimática de proteínas presentes en semillas de Guandul (*Cajanus cajan*). *Biotecnología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial*, 13(2), 114–122.
- Almonacid, L., Agudelo, R., & Vallejo, J. (2019). Evaluación de la hidrólisis alcalina-enzimática para la obtención de colágeno hidrolizado a partir de virutas de cuero curtido. *Revista ION*, 32(1), 55-62. doi:doi:http://dx.doi.org/10.18273/revion.v32n1-2019005
- Andrade Ortega, A., Rodríguez Aranda, A., López Villaseñor, R., & Ramírez Barragán, C. (2017). Propuesta para extracción de colágeno soluble en ácido (CSA) de escamas de tilapia del Nilo. *Journal CIM*, 5(2). Obtenido de
https://www.researchgate.net/publication/326066766_Propuesta_para_extraccion_de_colageno_soluble_en_acido_CSA_de_escamas_de_tilapia_del_Nilo
- Ángeles, M., Jiménez, R., & Martínez, V. (2018). *Efecto del tipo de enzima utilizado en el proceso de extracción de colágeno ovino hidrolizado*. Obtenido de Boletín de Ciencias Agropecuarias del ICAP . : <https://doi.org/10.29057/icap.v4i8.3340>
- Arias, A., Pérez, S., López, O., Mendoza, R., & C., A. (2016). CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE PÉPTIDOS OBTENIDOS DE HIDROLIZADOS DE TILAPIA CON BROMELINA Y PAPAÍNA. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos.*, 782-788.

Austin, h. P. (2019). *National Human Genome Research Institute*. Obtenido de NIH:

<https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Enzima>

Baltimore, D., Darnell, J., Harvey Lodish, A., Lawrence Zipursky, S., & Matsudaira, P. (2000).

Molecular Cell Biology (Vol. Vol. 4th edition). New York: W. H. Freeman. Obtenido de

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21582/>

Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Protein hydrolysates: processes and applications. *Acta*

Bioquím Clín Latinoam, 42 (2): 227-36.

Benjakul, S., & Morrissey, T. (1997). Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 3423-30.

bfit. (30 de enero de 2020). *Síntesis de colágeno en tendones, una historia que nos va a*

sorprender. Obtenido de <https://bfit-getxo.com/sintesis-de-colageno-en-tendones-una-historia-que-os-va-a-sorprender/>

BIOCON. (septiembre de 2016). *Biocon.es*. Obtenido de [https://biocon.es/wp-](https://biocon.es/wp-content/uploads/2016/12/FT-Bromelain_esp.pdf)

[content/uploads/2016/12/FT-Bromelain_esp.pdf](https://biocon.es/wp-content/uploads/2016/12/FT-Bromelain_esp.pdf)

Caessens, P. W. (1999). β - lactoglobulin hydrolysis. II Peptide identification, SH/SS exchange, and

functional properties of hydrolysate fractions formed by the action of plasmid. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47: 20980-2990.

Camacho, D., Moreno, M., García, D., Medina, C., & Sildovaras, A. (2007). Caracterización de un

hidrolizado proteico enzimático obtenido del pez caribe colorado (*Pygocentrus cariba*). *Humboldt*, 1821.

CAMBREX. (2017). *A handbook for gel electrophoresis*. The sourcebook.

- Cárdenas, J. L. (2014). *Clasificación de las enzimas y factores que afectan la velocidad de la Rx enzimática*. Obtenido de https://dipa.unison.mx/posgrado-alimentos/docentes/jose_luis_cardenas/materialdeapoyo/2-Clasificaciondelasenzimas2014.pdf
- Carvajal, C., Hernández, M., & Márquez, M. (2004). Aislamiento de enzimas proteolíticas a partir de restos de cosecha de piña. *Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas*, 25(4), 95-102.
- Chandler, G., Yamauchi, M., Mechanic, G., & Young, D. (1988). Cross-linking and new bone collagen synthesis in immobilized and recovering primate osteoporosis. 9(6), 415-418. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/875632828890124X>
- Charnock, S., & McCleary, B. (2005). *Enzymes: Industrial and analytical applications*.
- Dalgo, V. (2012). *Repositorio UTA*. Obtenido de <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/3061/1/SBQ.27.pdf>
- Dávila Pérez, J., & Martín Landrove, R. (s.f.). Demora mediada por fructosa del proceso de renaturalización de la cadena de triple hélice de gelatina en medio acuoso. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, 36(2), 131-143. Obtenido de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0255-69522016000200003&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Elsevier. (30 de enero de 2019). *Elsevier Connect*. Obtenido de <https://www.elsevier.com/es-es/connect/medicina/colagenos-tipos-composicion-distribucion-tejidos#:~:text=El%20col%C3%A>

- Fernández, A. (2001). *UNALM*. Obtenido de Tesis Mg Sc. Tecnología de Alimentos.:
<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/19918/1/FV-29279.pdf>
- Figueroa, O. Z. (2016). Optimización de la Hidrólisis Enzimática de Proteínas de Plasma Bovino. *Scielo*, 39-52.
- Gacesa, P., & Hubble, J. (1941). *Tecnología de las enzimas*. Zaragoza-España: Acribia S.A.
- García, A. H. (2021). *PULEVA*. Obtenido de <https://www.lechepuleva.es/aprende-a-cuidarte/tu-alimentacion-de-la-a-z/p/pina>
- Gebauer, G. H. (2001). *LA HOMEOPATÍA, LAS ENZIMAS Y LA INFORMACIÓN*. Obtenido de CARACTERÍSTICAS DE LAS ENZIMAS:
<http://www.homeoint.org/books3/enzimas/caracter.htm>
- González, J. M. (2017). *CURSO DE BIOMOLÉCULAS*. Obtenido de Curso orientado a estudiantes de Bioquímica y Biología Molecular: <http://www.ehu.es/biomoleculas/index.htm>
- Gorgieva, & Kokol. (2011). Collagen vs Gelatine-Bases biomaterials and their biocompatibility: Review and Perspectives. *Biomaterials Applications for Nanomedicine*.
- Guerrero, J. (2019). *Elaboración de crema facial a partir del colágeno presente en las escamas de pescado*. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/19838/1/T-UCE-0017-IQU-067.pdf>
- Headon, D., & Walsh, G. (1994). *The industrial production of enzymes*. Biotechnology Advance.
- Hernández, M., Chávez, M., Báez, R., Carvajal, C., Márquez, M., & Santos, R. (13 de noviembre de 2011). *Nueva tecnología para la obtención de un preparado de bromelina de tallo de*

piña (Ananas comosus L. Merr). 3pp . Obtenido de

<http://elfoscientiae.cigb.edu.cu/PDFs/BA/2003/20/3/BA002003RP180-182.pdf>

Juher, T. F., & Pérez, E. B. (2015). Revisión de los efectos beneficiosos de la ingesta de colágeno hidrolizado sobre la salud osteoarticular y el envejecimiento dérmico. *Nutrición Hospitalaria*, 62-66.

Khan Academy. (2021). *Khan Academy*. Obtenido de <https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/cellular-energetics/environmental-impacts-on-enzyme-function/a/hs-enzymes-review>

Kleef, R., Delohery, T., & Boubjerg, D. (1996). *Selective modulation of cell adhesion molecules on lymphocytes by bromelain*. Pathobiology.

Laemmli. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 680-685.

Laemmli. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 680-685.

León, A., Morales, A., Martínez, V., Vargas, A., Dimitrios, Zeugolis, & Aguirre, G. (2019). Fuentes y aplicaciones de colágeno hidrolizado. *Molecules*. doi: 10.3390/molecules24224031

Llerena, & Rodríguez. (2017). Obtención y caracterización de un hidrolizado de colágeno purificado producido mediante el uso de la enzima delvolase. *Anales Científicos*, 78 (2), 251 - 259. Obtenido de https://revistas.lamolina.edu.pe/index.php/acu/article/view/1067/pdf_66

Mamani, C. A. (2018). Obtención de colágeno por el método de hidrólisis alcalina a partir de (Tarsos) de pollo provenientes de la Industria Avícola en la Región Arequipa. [Tesis de

Ingeniería Química]. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Arequipa, Perú.

Obtenido de Obtención de colágeno por el método de hidrólisis alcalina a partir de

(TARSOS) de Pollo provenientes de la Industria Avícola en la Región de Arequipa:

<http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/7216/IQmahuca.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Mandal, A. (19 de abril de 2019). *News medical life sciences*. Obtenido de Síntesis del colágeno:

[https://www.news-medical.net/health/Collagen-Synthesis-\(Spanish\).aspx](https://www.news-medical.net/health/Collagen-Synthesis-(Spanish).aspx)

Martínez Valiente, P. (2018). Suplementos de colágeno: ¿Moda o salud? [*Trabajo de fin de grado*]. Universidad Complutense, Madrid. Obtenido de

<http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/PABLO%20MARTINEZ%20VALIENTE.pdf>

Pagán, J., Ibarz, A., Falguera, V., & Benítez, R. (2013). Enzymatic hydrolysis kinetics and nitrogen recovery in the protein hydrolysate production from pig bones. *Journal of Food Engineering*, 119: 655–659.

Pandia, S. (2011). Pandia, Obtención y Evaluación de las Propiedades Funcionales de un

Hidrolizado Proteico Obtenido a Partir de Anchoqueta (*Engraulis ringens*). *Tesis Ingeniero Pesquero. UNALM*, 102.

PanReac AppliChem . (2018). *ITW Reagents*. Obtenido de Determinación de Nitrógeno:

https://www.itwreagents.com/uploads/20180122/A173_ES.pdf

Párraga Álava, R. M., Verduga López, C., & Zambrano Vélez, M. (2019). Uso de papaína y

bromelina y su efecto en las características organolépticas y bromatológicas de chuletas de cerdo ahumadas. *RECUS*, 4(2), 38-42. Obtenido de <https://docplayer.es/182090218->

Jose-patricio-munoz-murillo-maria-isabel-zambrano-velez-ramona-cecilia-parraga-alava-cristhian-dario-verduga-lopez.html

Possehl S.A. (2020). *Possehl S.A.* . Obtenido de Studi8cho®:

<https://www.possehl.mx/productos/alimentos-y-bebidas/acidulantes/citrato-de-sodio/>

Prodegel. (2017). *elatina. GELCO INTERNATIONAL*. Obtenido de Planta Ambato:

http://www.prodegel.com.ec/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=8&Itemid=10&lang=es

Puebla, B. (1979). *Estudio sobre la obtención de bromelina a partir de desechos de piña y la factibilidad de producirla en México a nivel industrial*. México: Tesis ESIQIE.

Pulido, A. (2007). *INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL*. Obtenido de Estudio técnico-económico para la fabricación de bromelina:

<https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/7327/PULIDO%20SALINAS.pdf?sequence=1&isAllowed=y#:~:text=La%20Bromelina%20es%20una%20enzima,americano%20como%20efectivo%20agente%20terap%C3%A9utico.>

Rabotyagova, Cebe, & Kaplan. (2008). Collagen structural hierarchy and susceptibility to degradation by ultraviolet radiation . *Materials Science and Engineering*, 1420-1429.

Saenz Serrano, N. (2017). Obtención de material colagenoso de escamas de pescado y su esterilización con radiación GAMMA. *[Tesis de Licenciatura]*. Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México. Obtenido de

https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/_Public/49/062/49062888.pdf

- Saenz Serrano, N. (2017). *Obtención de material colagenoso de escamas de pescado y su esterilización con radiación GAMMA*. (U. A. México, Productor) Obtenido de https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/_Public/49/062/49062888.pdf
- Schoenfeld, P. (2018). Colágeno: Rejuvenece tu piel, fortalece las articulaciones, y siéntete más joven gracias a la dieta que aumenta la producción y el consumo de colágeno. *Málaga: SIRIO S.A.*
- Timberlake, K. (2013). *Química general, orgánica y biológica: estructuras de la vida*. . México: Pearson.
- winkler Ltda. (2017). *Kit para determinación de proteínas*. Obtenido de <http://winklerltda.cl/quimicav2/wp-content/uploads/2017/04/kit-proteinas-bradfor.pdf>
- Wiseman. (1985). *Manual de Biotecnología de los Enzimas*. Zaragoza-España: Acribia S.A.

