



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE
GELATINA A PARTIR DE PIEL DE RAYA ARENERA
(*Dasyatis brevis*)**

Por:
Marco Antonio Sántiz Gómez

TESIS APROBADA POR LA
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
DE ORIGEN ANIMAL

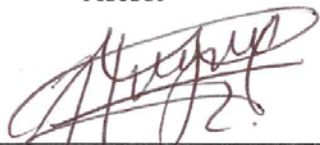
Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS

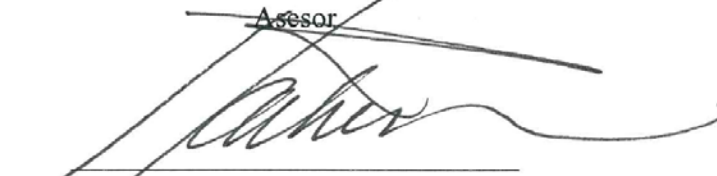
APROBACIÓN

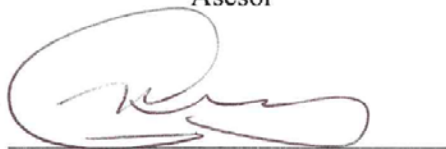
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Marco Antonio Sántiz Gómez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.


Dr. Juan Carlos Ramírez Suárez
Director de tesis


Dra. Celia Olivia García Sifuentes
Asesor


Dr. Humberto González Ríos
~~Asesor~~


Dr. Ramón Pacheco Aguilar
Asesor


Dr. Gerardo Navarro García
Asesor (UNISON)

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

Dr. Pablo Wong González

Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo brindado durante la realización de mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) por haberme permitido alcanzar una meta más dentro de mi formación personal y profesional.

Al Dr. Juan Carlos Ramírez Suárez por permitirme trabajar a su lado y por contribuir en gran parte a mi formación profesional. Sus asesorías, tiempo y paciencia fueron decisivas para este trabajo de investigación.

A la Dra. Celia Olivia García Sifuentes, al Dr. Humberto González Ríos, al Dr. Ramón Pacheco Aguilar y al Dr. Gerardo Navarro García, por ser parte de mi comité de tesis, sus comentarios enriquecieron en grande el presente trabajo de investigación.

Al Dr. Waldo M. Argüelles Monal del Laboratorio de Polímeros Naturales, CIAD, A.C. unidad Guaymas, Sonora. Por el tiempo dedicado y su enorme esfuerzo para la realización de este trabajo.

A la M.C. Guillermina García Sánchez, a la M.C. María Gisela Carvallo Ruiz y a la M.C. María Elena Lugo Sánchez por su tiempo, sus enseñanzas y su excepcional ayuda en el laboratorio, por su gran paciencia y amistad muchas gracias.

A mis padres con mi más profundo respeto, así como por su confianza y apoyo que siempre me han brindado. A mis hermanos por toda su motivación, ya que sin ellos no hubiera podido superarme y conseguir mis objetivos.

A mis amigos y a todas aquellas personas que me brindaron apoyo en los buenos y no tan buenos momentos, sus comentarios y ayuda contribuyeron a que este trabajo de investigación haya concluido.

CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA	3
Pesquería de Elasmobranchios	3
Rayas	4
La Raya Arenera (<i>Dasyatis brevis</i>) Como Recurso Pesquero y Subproductos Durante Su Comercialización en Sonora	5
Biología y Comercialización	6
Posible Obtención de Compuestos con Alto Valor a Partir de Subproductos de Raya Arenera	6
Colágeno: Estructura, Tipos y Aplicación Industrial	7
Conversión de Colágeno a Gelatina	10
Gelatina: Producción y Aplicaciones Industriales	12
Producción	12
Aplicaciones Industriales	13
Propiedades Químicas, Fisicoquímicas y Funcionales de la Gelatina	15
Propiedades Químicas y Estructurales	16
Propiedades Reológicas	16
Otras Propiedades	18
Potencial de Obtención de Gelatina Como Producto Durante el Procesamiento de Raya Arenera	18
HIPÓTESIS	21
OBJETIVOS	22
Objetivo General	22
Objetivos Particulares	22

CONTENIDO **(Continuación)**

MATERIALES Y MÉTODOS	23
Esquema General y Materia Prima	23
Metodología General	23
Obtención de Muestras	23
Análisis Proximal de la Piel	24
ETAPA I	24
Evaluación del Efecto de Dos Ácidos Sobre el Rendimiento y Propiedades Físicoquímicas de la Gelatina Obtenida	24
Pretratamiento de la Materia Prima	24
Extracción de Gelatina	25
Rendimiento de Proteína	25
Electroforesis en Gel de SDS-Poliacrilamida	26
pH 26	
Fuerza de Gel (FG)	27
Análisis Estadístico	27
ETAPA II	27
Optimización del Proceso de Extracción de Gelatina de Piel de Raya Arenera	27
Pretratamiento de la Materia Prima y Extracción de Gelatina	27
Rendimiento de Proteína	28
Fuerza de Gel	28
Viscosidad	28
Diseño Experimental y Análisis Estadístico	29
ETAPA III	32
Validación y Caracterización de las Condiciones Óptimas de Extracción de Gelatina	32
Pre-tratamiento de la Materia Prima y Extracción	32
Rendimiento de Proteína	32
FG y Análisis de Perfil de Textura (APT)	33
Viscosidad	33
Electroforesis en Gel de SDS-Poliacrilamida	34
Evaluación de la Temperatura de Fusión por Calorimetría Diferencial de	

CONTENIDO **(Continuación)**

Barrido	34
Reología Dinámica de Baja Deformación	34
Contenido de Pro, Hyp y Aminoácidos.	36
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
Efecto del Tipo de Ácido Sobre la Extracción de Gelatina	38
Análisis Proximal de la Piel	38
Rendimiento y pH	38
Fuerza de Gel	43
Perfil Electroforético de los Extractos de Gelatina	46
Optimización del Proceso de Extracción de Gelatina	48
Rendimiento de la Extracción, Fuerza de Gel y Viscosidad de Gelatina a Partir de Piel de Raya (<i>Dasyatis brevis</i>)	48
Efecto de los Factores en el Rendimiento de Extracción, FG y V de Gelatina a Partir de Piel de Raya	51
Respuesta Óptima	57
Validación y Caracterización de la Gelatina Optimizada	60
Validación del Modelo Predictivo	60
Caracterización Parcial de la Gelatina Optimizada	62
CONCLUSIÓN	75
BIBLIOGRAFÍA	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla

1. Ejemplo de aplicaciones, concentración y función de la gelatina en algunos alimentos y productos de confitería.	14
2. Variables independientes y niveles utilizados en el DCCR para tres factores.....	31
3. Corridas experimentales para el diseño compuesto rotacional (2^3) y variables de respuesta obtenidas.....	49
4. Modelos de predicción estimados por MSR para rendimiento, fuerza de gel y viscosidad de la gelatina extraída de piel de raya (<i>Dasyatis brevis</i>).....	52
5. Valores experimentales (Exp) y predichos (Pre) del modelo.....	61
6. Temperaturas de transición y entalpías de gelatinas mediante calorimetría diferencial de barrido.	68
7. Temperatura de fusión y gelatinización mediante reología dinámica de baja deformación.	71
8. Contenido de aminoácidos en gelatinas a partir de piel de raya (<i>Dasyatis brevis</i>).....	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura

1. Descripción general de la triple hélice de colágeno.....	9
2. Representación de los tipos de puntos en el DCCR, para k=3 factores.	30
3. Determinación de la temperatura de gelificación (T_g , intersección) con la graficación de G' y G'' durante el proceso de calentamiento-enfriamiento de la gelatina.	35
4. Efecto de la concentración (M) y tipo de ácido sobre el rendimiento de la extracción de gelatina a partir de raya arenera (<i>Dasyatis brevis</i>).	40
5. Efecto de la concentración (M) y tipo de ácido sobre el pH de los extractos de gelatina a partir de raya arenera (<i>Dasyatis brevis</i>).	41
6. Correlación entre el rendimiento de la extracción contra el pH de la gelatina.	42
7. Efecto de la concentración de dos tipos de ácido sobre la Fuerza de gel en la gelatina producida, n=2.	45
8. Perfil electroforético SDS-PAGE de gelatinas obtenidas con los ácidos evluados. ...	47
9. Gráfica de superficie de respuesta y de contornos, para rendimiento (RD).....	54
10. Gráfica de superficie de respuesta y de contornos, para fuerza de gel (FG).....	56
11. Gráfica de superficie de respuesta y de contornos, para viscosidad (V).....	58
12. Perfiles de predicción de respuesta óptima.	59
13. Análisis de Perfil de Textura (APT) de gelatinas a partir de piel de raya arenera (<i>Dasyatis brevis</i>)	63
14. Perfil electroforético SDS-PAGE de gelatinas.	65
15. A: Propiedades viscoelásticas de gelatinas (6.67%) sometidas a un proceso de enfriamiento-calentamiento. B: Espectro de frecuencia de las gelatinas.....	70

RESUMEN

En los últimos años, subproductos pesqueros como la piel de especies marinas han sido utilizados como fuente alternativa para la obtención de gelatina con el propósito de satisfacer las necesidades de los consumidores, incluyendo culturas y/o religiones en donde el uso de gelatinas provenientes de algunos mamíferos es prohibido. Sin embargo, el rendimiento y las propiedades del producto final son dependientes del método de extracción empleado. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue optimizar el proceso de extracción de gelatina a partir de piel de raya (*Dasyatis brevis*) utilizando como factores la concentración de ácido (X_1), tiempo de pretratamiento ácido (X_2) y tiempo de extracción (X_3), utilizando como variables de respuesta el rendimiento (RD), fuerza de gel (FG) y viscosidad (V). Para ello, previamente se valoraron el uso de HCl y CH_3COOH a diferentes concentraciones (previo a un pretratamiento con NaOH 0.1M) para observar el comportamiento en el RD y las características fisicoquímicas de la gelatina obtenida. Lo anterior se tomaría como base para establecer X_1 (del diseño experimental de la metodología de superficie de respuesta), mientras que los otros factores (X_2 y X_3) fueron obtenidos de la literatura. Se observó que la concentración y tipo de ácido influyen ($P \leq 0.05$) sobre RD, pH, FG e intensidad de bandas electroforéticas. Se obtuvo un mayor RD y FG en los pretratamientos utilizando CH_3COOH , así como un aumento en la intensidad de la banda de 110 kDa (correspondiente a la cadena α) al incrementar la concentración de ácido. Es por ello que se utilizó el pretratamiento con CH_3COOH para la optimización del proceso de extracción de gelatina. Las condiciones óptimas predichas por el modelo para obtener un RD de $15.65 \pm 0.4\%$ (el mayor a obtener en base al modelo) fueron las siguientes: $X_1=0.2\text{M}$, $X_2=180$ min y $X_3=12$ h; mientras que para las respuestas de FG y V, el análisis arrojó una $X_1=0.1\text{M}$, $X_2=200$ min y $X_3=6$ h, con valores predictivos de 713 ± 91 g y 10.48 ± 1.1 mPa·s, respectivamente. La validación de los modelos no arrojó

diferencias significativas ($P>0.05$) entre los valores predichos con los obtenidos experimentalmente. Las gelatinas obtenidas se caracterizaron parcialmente obteniéndose las mejores propiedades fisicoquímicas y reológicas empleando el modelo predictivo de FG, proporcionando además mayor viscosidad ($P\leq 0.05$). Este modelo, así como las características de la gelatina obtenida, puede competir con las fuentes tradicionales de extracción.

Palabras clave: Gelatina, piel de raya (*Dasyatis brevis*), optimización por MSR, propiedades reológicas.

ABSTRACT

Nowadays, fish by-products, such as bones and skins, have been used as an alternative source to obtain gelatin. This gelatin meets consumer demand, including the ones from cultures and/or religions where the use of mammal gelatin is forbidden. However, properties and yield depend on extraction method conditions. Therefore, the aim of this research was to optimize the gelatin extraction process from ray skin (*Dasyatis brevis*) using pretreatment acid concentration (X_1), pretreatment time (X_2) and extraction time (X_3) with yield (%), gel strength (g), and viscosity (mPa·s) as response variables. For this purpose, HCl and CH₃COOH were studied at different concentrations evaluating the gelatin physicochemical characteristics and yield. These results were taken to establish X_1 for the surface response methodology design, while X_2 and X_3 factors were obtained from literature. Yield, pH, gel strength and electrophoresis profile were affected ($P \leq 0.05$) by acid type and concentration. CH₃COOH concentration got greater ($P \leq 0.05$) yield and gel strength as well as an increase in the 110 kDa protein bands (corresponding to α chains). Therefore, CH₃COOH was used for the gelatin extraction optimization process. Yield predicted optimal conditions given by the model in order to obtain the highest yield ($15.65 \pm 0.4\%$) were $X_1=0.2M$, $X_2=180$ min and $X_3=12$ h; while those for gel strength and viscosity were $X_1=0.1M$, $X_2=200$ min and $X_3=6$ h, with predicted values of 713 ± 91 g and 10.48 ± 1.1 mPa·s, respectively. Model validation did not show significant differences ($P \leq 0.05$) between the predicted and experimental values. Gelatins obtained by the use of gel strength predictive model obtained the best physicochemical and rheological properties, besides greater viscosities ($P \leq 0.05$). Thus, gelatin obtained under these conditions could compete with commercial gelatins from traditional sources.

Keywords: Gelatin, ray skin (*Dasyatis brevis*), surface response methodology (SRM), rheological properties.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la pesquería de elasmobranquios ha mostrado una dinámica creciente. Dentro de los elasmobranquios se encuentran los tiburones, rayas y quimeras los cuales se clasifican taxonómicamente en la subclase Elasmobranchii (Rose, 1996; Compagno, 2001). La captura de elasmobranquios se distribuye en todo el país; sin embargo, los estados que tienen mayor tasa de captura son los estados del noroeste (53.6%), en especial aquellos que colindan con el Golfo de California (Sonora, Sinaloa, Baja California y Baja California Sur). Las capturas son generalmente incidentales y mayor en pesquerías artesanales o embarcaciones menores. En Sonora se han identificando 9 subórdenes, 4 familias y 21 especies incluyendo dos rayas espinosas. Las especies comúnmente capturadas son el pez guitarra (*Rhinobatos productus*) proporcionando el 29.32% de la captura total de elasmobranquios en el Estado, raya diamante o arenera (*Dasyatis brevis*) aportando 9.96%, raya mariposa (*Gymnura* spp) con 8.17%, y con más del 5% la raya gavilán o tecolote (*Rhinoptera steindachneri*), el diablito (*R. glaucostigma*) y la raya eléctrica gigante (*Narcine entemedor*) (Bizarro et al., 2009). Las especies capturadas son destinadas al consumo local en forma de filete fresco y/o congelado, durante esta comercialización la raya es despojada de todos sus restos (vísceras como el hígado, cartílago y piel, principalmente), subproductos que pudieran ser empleados para la obtención de compuestos con valor agregado.

Los subproductos pesqueros han sido ampliamente estudiados para la obtención de compuestos con valor agregado para aplicaciones en diversos campos (Ferraro et al., 2010). Por ejemplo, el hígado de diversas especies de rayas ha sido fuente de obtención de aceite; del cartílago se han adquirido diversos compuestos como proteoglicanos, sulfato de condroitina y queratán sulfato, mientras que de la piel se han encontrado proteínas de gran importancia como colágeno y gelatina.

En general, el colágeno es una proteína formada por tres cadenas α enrolladas en

forma levógira caracterizándose por tener el mismo patrón de aminoácidos -Gly-X-Y- en sus cadenas, donde X e Y es cualquier aminoácido, aunque existen preferencias por la prolina, hidroxiprolina y menos por la lisina. El colágeno constituye alrededor del 30% del total de proteínas en mamíferos, aunque en peces este porcentaje disminuye (Brodsky y Persikov, 2005; Kadler et al., 2007). La molécula está estabilizada por puentes de hidrogeno inter e intra-molecular. Sin embargo, estas interacciones pueden llegar a ser interrumpidas por soluciones alcalinas y/o básicas. Sí además, a éste se le administra calor a temperaturas moderadas, la estructura colapsa generando con ello cadenas α libres y/o péptidos de diferente masa molecular, dando lugar a la conversión de colágeno a gelatina. Ambos, estarán conformados por la misma secuencia de aminoácidos aunque presentarán propiedades físicas muy diferentes (Schrieber y Gareis, 2007).

Las fuentes tradicionales para obtener gelatina son la piel y huesos de mamíferos. Sin embargo, el consumo de productos a base de gelatina provenientes de estas fuentes ha sido rechazado e incluso prohibido por algunas culturas; además algunos consumidores no descartan la posibilidad de transmitir enfermedades propias de la fuente de extracción. Debido a ello, se han buscado fuentes alternativas que satisfagan las necesidades de toda la sociedad. Los subproductos pesqueros, y en especial la piel de especies marinas, han ganado notoriedad como fuente alternativa para la obtención de gelatina (Regenstein y Zhou, 2007; Karim y Bhat, 2009; Boran y Regenstein, 2010; Gómez-Guillén et al., 2011). Sin embargo, debido a la variación de características fisicoquímicas entre las especies y en consecuencia en las gelatinas obtenidas, surge el interés de optimizar las condiciones del proceso de extracción para obtener un producto seguro y de gran calidad. Por lo anterior, podemos decir que los subproductos generados en la comercialización de la raya arenera (*Dasyatis brevis*) y en especial la piel, cuenta con gran potencial para la obtención de gelatina y su optimización.

REVISIÓN DE LITERATURA

Pesquería de Elasmobranquios

Los elasmobranquios son un grupo de peces que tienen como principal característica el poseer un endoesqueleto formado por cartílago (también denominados condriictios); dentro de los elasmobranquios se encuentran los tiburones, rayas y quimeras los cuales se clasifican taxonómicamente en la subclase Elasmobranchii (Rose, 1996; Compagno, 2001). Éstos pueden habitar diferentes ecosistemas, incluyendo sistemas de agua dulce de lagos y ríos, estuarios costeros y lagunas, aguas costeras, mar abierto, y el océano profundo, mientras que los tiburones son generalmente considerados como peces de hábitat de mayor profundidad (Camhi et al., 1998).

Estudios sobre la producción pesquera de elasmobranquios, tanto a nivel mundial como nacional han evidenciado una dinámica en constante crecimiento, como resultado de la reducción de capturas de pesquerías de mayor interés (Rose, 1996; Bizzarro et al., 2007; Smith et al., 2009). En general, la pesquería a nivel mundial de éste grupo de peces no cuenta con ninguna regulación. Por lo tanto, en algunas situaciones sus registros de capturas tienden a ser muy generalizadas (Smith et al., 2007). Sin embargo en México se ha decretado la norma oficial mexicana NOM-029-PESC-2006 “Pesca responsable de tiburones y rayas. Especificaciones para su aprovechamiento”, para mejorar con ello su conservación y pesca más ordenada (DOF, 2007). En la actualidad, la pesquería mexicana de elasmobranquios se genera como parte de la fauna de acompañamiento de pesquerías mixtas con equipos de pesca de arrastre o de superficie, donde se capturan tanto tiburones costeros como tiburones pelágicos; o bien, con redes de fondo, palangres y/o chinchorros donde llegan a capturarse rayas, quimeras y tiburones (Rose, 1996; Márquez-Farías, 2002; Pérez-Jiménez et al., 2005; Márquez-Farías y Blanco-Parra, 2006).

Los reportes de captura son generados a partir de pesquerías mixtas o de captura incidental y de pesquerías no dirigidas, aunque la mayor parte de la producción total es generada principalmente por pesquerías artesanales de pequeña escala (Bonfil, 1994). En México, el 60% es proporcionado por embarcaciones de mayor tamaño denominadas de altura y mediana altura, mientras que el 40% de la captura total de tiburones y rayas es aportado por las embarcaciones menores, artesanales y ribereñas, (CONAPESCA-INP, 2004; DOF, 2007). El esfuerzo pesquero de esta última consiste en más de 1,300 embarcaciones de donde deriva su importancia en la producción pesquera nacional (Arreguín-Sánchez et al., 2004). Sin embargo, la proporción de captura de elasmobranquios se encuentra tan solo en un intervalo de 2.1 a 3.1% (de 1996 hasta el 2003) del volumen total capturado (Bizzarro et al., 2007).

Rayas

Las rayas se encuentran dentro del Superorden Batoidea, es decir poseen la boca y las hendiduras branquiales en posición ventral. Según la CONAPESCA mediante el Diario Oficial de la Federación, se agrupan con el nombre de rayas y/o similares a los organismos conocidos comúnmente como “cubanas”, “mantas”, “mantarrayas” “mariposas”, “gavilanes”, “rayas”, “diablitos”, “guitarras” y “torpedos” (DOF, 2007).

La pesquería artesanal de rayas es generalmente regional y se realiza todo el año. En especial en estados colindantes al Golfo de California. Su pesquería surge en los noventa como consecuencia de la caída de capturas en la producción de cazón bironche (*Rhizoprionodon longurio*) y debido a la creciente demanda por productos del mar, los pescadores ribereños empezaron a dedicarse formalmente a la pesca de rayas y tiburones (Márquez-Farías y Blanco-Parra, 2006). En las costas del Golfo de California, su captura es considerada como una actividad de gran importancia socioeconómica, representando una alternativa de subsistencia para cientos de pescadores, en especial cuando otros recursos de mayor valor económico escasean (sierra, jaiba y camarón) o están en veda. La composición de las capturas varían de acuerdo a la temporada, el

método de pesca y la zona de pesca (Márquez–Farías y Blanco–Parra, 2006; Bizzarro et al., 2007; Smith et al., 2009).

Dentro del Golfo de California se han identificado 24 especies de rayas, provenientes de la pesquería artesanal. Las familias con más especies son Rhinobatidae, Dasyatidae, Urolophidae y Mobulidae. De esta manera, la familia Rhinobatidae contribuye con 52% aproximadamente del volumen total de rayas capturadas, le sigue la familia Dasyatidae con el 16%, Gymnuridae con 13% y Rhinopteridae 11%. Cabe mencionar que dentro de estas cuatro familias, sobresalen cuatro especies por su incidencia pesquera, entre ellas la raya arenera (*Dasyatis brevis*) (Márquez–Farías y Blanco–Parra, 2006; Bizzarro et al., 2007).

La Raya Arenera (*Dasyatis brevis*) Como Recurso Pesquero y Subproductos Durante Su Comercialización en Sonora

En Sonora, el esfuerzo pesquero de rayas en 1998 y 1999 proporcionó casi el 65% de capturas, del total de elasmobranquios (Márquez-Farías, 2002; Márquez–Farías y Blanco–Parra, 2006), de la cual se clasificaron en 9 subórdenes, 4 familias y 21 especies incluyendo dos rayas espinosas. La incidencia de estas especies presenta gran variabilidad según la temporada y sitio de captura. Sin embargo, en primavera y verano son períodos en los que se ha documentado mayor tasa de captura (Márquez–Farías y Blanco–Parra, 2006; Bizzarro et al., 2007; Bizzarro et al., 2009). Las especies comúnmente capturadas son el pez guitarra (*Rhinobatos productus*) proporcionando el 29.32%, raya diamante o arenera (*Dasyatis brevis*) aportando 9.96%, raya mariposa (*Gymnura* spp) con 8.17%, y con más del 5% las rayas gavilán o tecolote (*Rhinoptera steindachneri*), el diablito (*R. glaucostigma*) y la raya eléctrica gigante (*Narcine entemedor*) (Bizzarro et al., 2009).

Es frecuente obtener volúmenes variados de captura incidental o dirigida según la estación del año. Estudios realizados por Bizzarro et al. (2007), observaron una prospección pesquera de rayas durante las cuatro estaciones del año siendo en invierno la estación menos fructífera en la captura de éstas. Además se observaron variaciones estacionales en la especie abundante capturada, por ejemplo, en el periodo de primavera

y verano se reportó la captura de *Rhinobatos productus* como la de mayor abundancia, mientras que en otoño fue dominada por la raya arenera (*Dasyatis brevis*), aunque la captura de ésta última se observó durante todo el año.

Biología y Comercialización

La raya arenera (*Dasyatis brevis*) también es conocida como raya diamante, rayalátigo, raya de espina, raya batana y según Santana et al. (2004), se puede encontrar sinonimias como *Dasyatis dipterura* (Jordan y Gilbert, 1880), *Dasyatis dipterurus* (Jordan y Gilbert, 1880), entre otras. Es una especie que habita en zonas tropicales entre 1 y 70m de profundidad, aunque se ha reportado incluso hasta los 85m. Son vivíparos y se alimentan generalmente de pequeños peces y crustáceos. Presentan una distribución en el Océano Pacífico, desde el norte de Estados Unidos hasta Perú, incluyendo el Golfo de California. Su captura está relacionada a la gran demanda regional y la pesca dirigida de “manta”. Generalmente se emplean redes agalleras de fondo, aunque también se ha observado la utilización de chinchorro mantero, además de la cimbra y arpón. Dentro de las regiones con mayor captura en Sonora son Bahía de Kino, Puerto Peñasco, el Cholludo, Isla Tiburón entre otros (Bizzarro et al., 2007).

La comercialización de rayas se basa en dos presentaciones principalmente: filete fresco y congelado para consumo humano. Para llevar a cabo la comercialización, ésta es despojada de sus aletas mar adentro y/o en la playa. Se ha observado que los desechos generados comúnmente son: vísceras, cartílago, hígado y piel, y que éstos podrían ser empleados para la obtención de compuestos con alto valor agregado (Márquez–Farías y Blanco–Parra, 2006).

Posible Obtención de Compuestos con Alto Valor a Partir de Subproductos de Raya Arenera

En los últimos años, se ha comprobado que la industrialización y/o comercialización de productos pesqueros genera entre 20 y 60% de subproductos del total procesado

(Ferraro et al., 2010). En rayas, éstos subproductos contienen vísceras, hígado, cartílago y piel principalmente, que son desechados al mar (si el fileteo es a mar abierto) o bien, en los campamentos pesqueros, lo que pudiera generar problemas al ecosistema e incluso a la sociedad, si éstos no son bien tratados (Márquez-Farías y Blanco-Parra, 2006). Los subproductos pesqueros son una alternativa para la obtención de compuestos con alto valor agregado y su campo de aplicación es amplio, de acuerdo al compuesto obtenido o producido a partir de éste (Ferraro et al., 2010).

Los elasmobranquios como las rayas y tiburones poseen un metabolismo lipídico atípico, ya que carecen de un verdadero tejido adiposo y al igual que los peces demersales la mayoría de sus lípidos se almacenan y metabolizan en los lóbulos del hígado (Ballantyne et al., 1993). Algunos estudios han demostrado que el hígado de diferentes especies de raya contiene alrededor del 50% en peso de lípidos (peso del hígado), ricos en ácidos grasos poliinsaturados (AGP), especialmente el eicosapentanoico (EPA, 20:5n-3) y docosahexanoico (DHA, C22:6n-3). El contenido de ácidos grasos altamente insaturados (AGAI) y AGP es similar al de otros aceites que han sido empleados en la acuicultura para la adecuada nutrición animal como el camarón y otros peces, debido a sus características y su gran calidad (Perez-Velazquez et al., 2008; Navarro-García et al., 2009; Navarro-García et al., 2010).

Por otro lado, se han identificado compuestos como el sulfato de condroitina y queratán sulfato del tendón y/o cartílago de raya gavián (*Rhinoptera bonasus*), ambos compuestos de gran importancia en la hidratación de tejidos (Summers et al., 2003); además de proteoglicanos (Sato et al., 2006; Garnjanagoonchorn et al., 2007; Murado et al., 2010), colágeno (Bae et al., 2008) y gelatina a partir de su piel (Cho et al., 2006). Cabe mencionar que éstos últimos son de gran interés por sus características y amplio campo de aplicación.

Colágeno: Estructura, Tipos y Aplicación Industrial

De manera general, el colágeno es una proteína que se encuentra en mayor abundancia en el tejido conectivo, cumpliendo con una gran variedad de funciones. Es el

mayor constituyente de la piel, tendones, huesos, ligamentos, córnea y cartílago (Wess, 2008). Forma aproximadamente el 30% del contenido total de proteínas en mamíferos y 10% en músculo, aunque en peces estos porcentajes se encuentran en menor proporción (Foegeding et al., 1996; Singh et al., 2011). La mayor parte del colágeno fibrilar es soluble en soluciones a pH reducido o neutro y otra parte soluble en pepsina (Hulmes, 2008).

El colágeno posee una estructura única y diferente al de otras proteínas, dependiendo de la localización anatómica en la que se encuentre. Por ejemplo, en el tejido conectivo tiene forma delgada y cilíndrica con longitud de 300 nm y de 1 a 20 nm de diámetro (Hulmes, 2008). Generalmente, se compone por tres cadenas polipeptídicas (cadenas α) en forma de hélice e interconectadas por puentes de hidrógeno (Figura 1); cada cadena se forma por tripletes repetidos de Gly-X-Y. Cada residuo de glicina (Gly) ocupa la tercera posición, mientras que las posiciones “X” e “Y” son frecuentemente ocupadas por los residuos de Prolina (Pro) y 4-Hidroxiprolina (4-Hyp), respectivamente (Brodsky y Persikov, 2005; Kadler et al., 2007). Cada cadena α contiene exactamente 1050 residuos de aminoácidos (Buxbaum, 2007). Su composición de aminoácidos se basa en un tercio de Gly (33%), siguiéndole Pro, 4-Hyp (juntos abarcan el 22%) y 5-Hidroxilisina; aunque, el contenido y secuencia de aminoácidos no necesariamente son iguales en los diferentes tipos de colágeno (Brodsky y Persikov, 2005; Schrieber y Gareis, 2007; Hulmes, 2008; Shoulders y Raines, 2009).

Existen 28 tipos de colágeno agrupados y numerados del I al XXVIII. La diferencia entre cada uno de ellos radica en las interrupciones que presenta la cadena α y no forzosamente pueden llegar a formar largas fibrillas (Kadler et al., 2007). El colágeno fibrilar (Tipo I) es el más común encontrándose principalmente en la piel, tendones, huesos, sistema vascular; el tipo II se encuentra generalmente en el cartílago; el tipo III en piel de embriones, pulmones, y vasos sanguíneos; el tipo IV se presenta en la formación de redes sirviendo como base en la formación de membranas; el tipo V se encuentra en menor cantidad que el colágeno tipo I y en mayor cantidad en la córnea; el tipo IX se encuentra en el cartílago pero en menor cantidad que el colágeno tipo II (Brodsky y Persikov, 2005; Hulmes, 2008; Shoulders y Raines, 2009). Otros colágenos

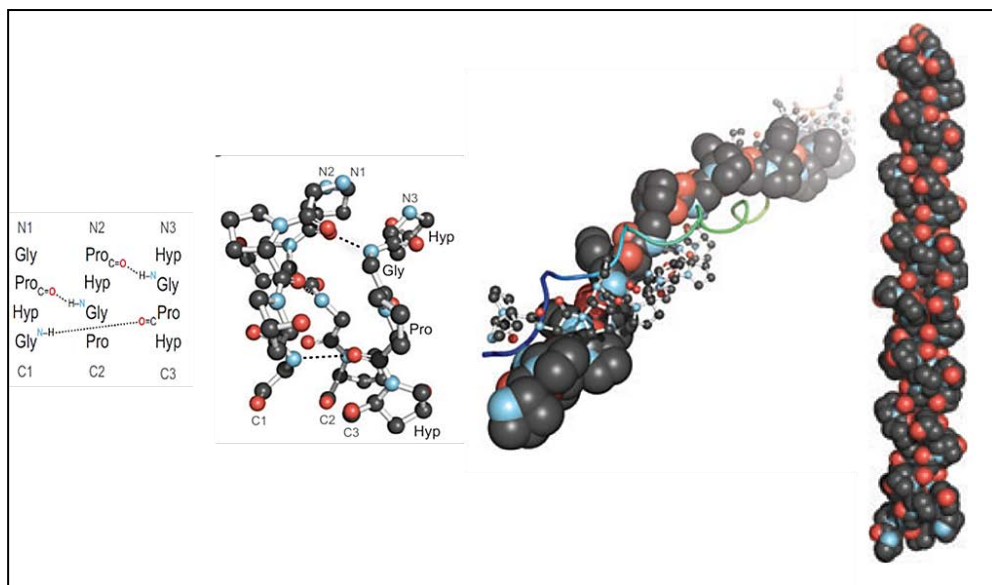


Figura 1. Descripción general de la triple hélice de colágeno.
(Extraído de: Shoulders y Raines (2009)).

se localizan en la superficie de las fibrillas (tipos IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII, XVI), formando redes hexagonales (tipos VIII y X), como filamentos de costura (tipo VI), en las fibrillas de anclaje (tipo VII) o como proteínas de membrana (tipos XIII, XVII, XXIII, XXV). La composición y arreglo de aminoácidos es la que permite la formación de interrupciones y algunas imperfecciones, dando lugar a diferencias en la flexibilidad y arreglo en la estructura triple hélice, que son de importancia para una función en específico de acuerdo al tipo de interacción que desempeña (Gelse et al., 2003).

De los tipos de colágeno, diez han sido caracterizados con la finalidad de tener aplicaciones biomédicas e industriales siendo el tipo I el de mayor abundancia. Los otros se encuentran en menor proporción y usualmente asociados con una estructura biológica en específica. En el campo de biomedicina es ampliamente utilizado debido a que presenta características de bio-compatibilidad y una baja inmunogenicidad. Éste puede ser extraído a partir de distintas fuentes obteniendo un producto con alto grado de pureza y con la capacidad de formar fibras de alta resistencia (de gran utilidad en la cirugía) (Meena et al., 1999). La literatura es amplia en este campo, desde el mejoramiento de las técnicas de extracción, la incorporación a productos comerciales, su aplicación a sistemas de entrega en fármacos y enzimas, entre otras. Es también empleado como un ingrediente para la fabricación de cosméticos, compuestos dentales, plantillas para la regeneración de piel, etc.; mientras que en la industria de alimentos es utilizado en la fabricación de películas y cubiertas para salchichas (Meena et al., 1999; Lee et al., 2001). Por otra parte, también se han estudiado otras formas de uso de esta proteína, principalmente en su forma de gelatina, que al igual que el colágeno, es empleado en diversas industrias como la fotográfica, biomedicina, cosméticos, farmacéutica, entre otras (Meena et al., 1999).

Conversión de Colágeno a Gelatina

Como se mencionó anteriormente, el colágeno es una macromolécula que presenta un estructura en forma de triple hélice estabilizada por puentes de hidrogeno. La

estructura peculiar de ésta, viene precedida por la interacción entre los grupos amino de los residuos de Gly con el grupo carboxilo del aminoácido en la posición “X” del triplete de la cadena α adyacente (Figura 1), ocupado comúnmente por Pro; si éste ocupará la posición “Y” sería fácilmente hidroxilada formando 4-Hyp, siendo éste último de mayor importancia para la formación de enlaces que estabilizan la estructura de la molécula (Kadler et al., 2007; Schrieber y Gareis, 2007; Shoulders y Raines, 2009). Estas interacciones pueden llegar a ser interrumpidas mediante soluciones alcalinas y/o ácidas, provocando escisiones en las interacciones intra e intermoleculares que permiten desestabilizar a las tres cadenas α unidas entre sí. La inestabilidad provocada por el proceso anterior lleva al colapso de la estructura y posterior a un tratamiento térmico moderado conlleva a la desnaturalización parcial irreversible, dando como resultado fragmentos solubles en agua caliente (gelatina). Este fenómeno se le conoce como la conversión de colágeno a gelatina (Haug y Draget, 2009).

De esta manera, colágeno y gelatina estarán conformados por la misma secuencia de aminoácidos, pero presentarán propiedades físicas muy diferentes. Es decir, las cadenas poliméricas de colágeno y gelatina estarán generalmente constituidas por la secuencia de tres monómeros básicos (aminoácidos): Gly, Pro y 4-Hyp (Papon et al., 2006; Haug y Draget, 2009). Los fragmentos polipeptídicos obtenidos por desnaturalización del colágeno exhibirán pesos moleculares variables, en el cual predominarán fragmentos α libres; fragmentos β , conformado por dos fragmentos α unidos covalentemente y fragmentos γ , conformado por la unión covalente de tres fragmentos α . Los fragmentos α libres, dependiente del proceso que se lleve a cabo para su obtención, también podrían ser depolimerizados en subunidades más pequeñas, formando polipéptidos de muy bajo peso molecular (Schrieber y Gareis, 2007; Karim y Bhat, 2009; Boran y Regenstein, 2010).

La conversión de colágeno a gelatina puede llevarse a cabo mediante dos procesos: el alcalino o el ácido. Dependiendo del proceso utilizado se derivan dos tipos de gelatina: tipo B y tipo A, respectivamente. El proceso alcalino consiste en someter a la materia prima en una solución alcalina durante el pretratamiento, este tipo de pre-extracción se realiza cuando la materia prima son huesos, cartílagos y piel de bovino, principalmente. El proceso ácido consiste en tratar a la materia prima con soluciones

ácidas realizándose generalmente en piel de cerdo y pescado. Por otro lado, ambos pretratamientos pueden llegar a excluir la degradación del colágeno por proteasas endógenas y minimizar la rotura enzimática de enlaces peptídicos intramoleculares e intermoleculares de colágeno durante la extracción (Regenstein y Zhou, 2007; Schrieber y Gareis, 2007; Haug y Draget, 2009; Boran y Regenstein, 2010).

Gelatina: Producción y Aplicaciones Industriales

Producción

Hoy en día la industria de la gelatina aplica diferentes procesos para su producción. Se lleva a cabo por la hidrólisis parcial del colágeno en condiciones controladas. En general, el proceso de extracción consiste en cuatro etapas principales, el primero es proporcionar a la materia prima las condiciones necesarias para remover el material no colagénico e impurezas que de alguna manera pudieran interferir en la extracción así como la desestabilización del colágeno (Djagny et al., 2001; Baziwane y He, 2003; Gómez-Guillén et al., 2011). Posteriormente, el tratamiento térmico permitirá que el colágeno se solubilice en agua y obtener una solución de gelatina. Seguido de esto, la solución es sometida a técnicas de concentración de sólidos (secado, filtración, evaporación, centrifugación, etc.). Por último, el proceso de refinamiento se realiza con la finalidad de garantizar un producto con alto grado pureza, aunque esto último solo se realiza a nivel industrial (Djagny et al., 2001; Schrieber y Gareis, 2007; Karim y Bhat, 2009).

La gelatina es considerada como un hidrocoloide versátil con múltiples funciones que le permite abarcar diversos campos de aplicación. Ha mostrado enorme relevancia en la industria médico-farmacéutico, de productos cosméticos y otras más, aunque su aplicación es más notoria como un ingrediente en la industria de alimentos, ya que proporciona consistencia, estabilidad y otras propiedades al producto final (Lee et al., 2001; Schrieber y Gareis, 2007; Karim y Bhat, 2008; Haug y Draget, 2009; Karim y Bhat, 2009; Gómez-Guillén et al., 2011).

Debido a su importancia en diversas áreas, la demanda global de gelatina ha mostrado una dinámica ascendente en los últimos años. Por ejemplo, en 2006 se obtuvo una producción de aproximadamente 326, 000 toneladas en todo el mundo, del cual el 46% es proporcionado por desechos generados de la industrialización del ganado porcino y bovino, de huesos y pesuñas (23.1 y 29%, respectivamente) y tan solo 1.5% provenientes de diversas fuentes, como los subproductos de especies marinas (GME, 2008).

Aplicaciones Industriales

La importancia de la gelatina en la industria de alimentos está relacionada con su propiedad termorreversible. Es decir, habiendo formado geles a bajas temperaturas (< 30°C), puede volver a su estado inicial con la adición de temperatura (incluyendo la corporal). Además, es considerado como un ingrediente alimentario seguro (GRAS por sus siglas en inglés, Generally Recognized as Safe) por la FDA (por sus siglas en inglés, Food and Drug Administration), utilizado en la producción de alimentos bajos en grasa (sustituto de grasa), bajos en carbohidratos (ligante) y un mínimo contenido de calorías, como se puede observar en la tabla 1 (Djagny et al., 2001; Baziwane y He, 2003; Boran y Regenstein, 2010).

El grado de utilización que presenta la gelatina está relacionado con la calidad de ésta (criterios microbiológicos, residuos inorgánicos, olor y sabor, entre otros). Una vez extraída la gelatina se le realizan diversas pruebas adicionales, incluyendo medición de sus propiedades fisicoquímicas, reológicas y funcionales. Otros parámetros a considerar son: composición, solubilidad, transparencia, color, olor y sabor. Sin embargo, las propiedades más importantes que definen de manera específica a un tipo de gelatina, así como el potencial de aplicación que ésta tendrá, son principalmente la fuerza de gel, viscosidad, estabilidad térmica (temperatura de gelatinización y fusión) (Djagny et al., 2001; GMIA, 2006; Schrieber y Gareis, 2007; GME, 2008).

Tabla 1. Ejemplo de aplicaciones, concentración y función de la gelatina en algunos alimentos y productos de confitería.

APLICACIÓN	CONCENTRACIÓN (%)	FUNCIÓN QUE DESEMPEÑA
Postres	1.5-3.0	Formación de gel Textura Transparencia Brillo
Gomas de fruta	6.0-10.0	Formación de gel Textura Transparencia Brillo
Malvaviscos	1.0-3.0	Formación y estabilidad de espuma Formación de gel
Pastillas	1.0-2.0	Ligante Textura Temperatura de fusión Evita la desintegración
Caramelos	0.5-2.5	Emulsificante Estabilidad de espuma Masticabilidad
Yogurt	0.2-1.0	Estabilización de sinéresis Textura Creмосidad
Carne y salchichas	0.5-2.0	Estabilización de emulsión Ligante agua/jugo
Sopas y carne enlatados	0.5-2.0	Agente ligante Textura Facilidad de corte

FUENTE: Schrieber y Gareis (2007).

Propiedades Químicas, Fisicoquímicas y Funcionales de la Gelatina

La gelatina es una mezcla de cadenas poliméricas de diferente masa molecular que se solubiliza (generalmente en agua) a temperaturas moderadas (60°C), formando soluciones coloidales o soles que al enfriarse (<30°C) forman una red tridimensional rígida en forma de gel. Es decir, las cadenas (α , β , γ) generadas durante la extracción, al enfriarse inician una serie de interacciones que promueven la recuperación parcial de la triple hélice del colágeno inicial. Estas interacciones están dominadas principalmente por puentes de hidrogeno, donde las regiones Gly-Pro-Hyp juegan un papel de gran importancia, crucial para la iniciación y estabilización de la estructura formada, la cual le permite poseer gran rigidez. La estructura tridimensional formada podría ser calentada nuevamente favoreciendo la interrupción de las interacciones entre cadenas, lo que llevaría a la formación de la solución coloidal inicial. La formación de geles termorreversibles en agua, es una de las características más importantes de la gelatina en la industria (Regenstein y Zhou, 2007; Schrieber y Gareis, 2007; Boran y Regenstein, 2010).

Las propiedades de mayor importancia tecnológica se encuentran relacionadas con el comportamiento superficial en diferentes medios así como las relacionadas con la gelificación. Las primeras se refieren a la capacidad que tiene para llegar a formar y estabilizar espumas y/o emulsiones así como la capacidad de formar películas. Las segundas son las que se generan antes y/o después de la formación del gel, como viscosidad, tiempo de maduración, textura, espesamiento, capacidad de retención de agua, temperatura de gelatinización/fusión y fuerza de gel, por mencionar algunas (Regenstein y Zhou, 2007; Schrieber y Gareis, 2007). Éstas se encuentran estrechamente relacionadas a factores como: la masa y distribución molecular de los fragmentos formados, concentración de gelatina en solución, tiempo y temperatura de maduración, pH y contenido de sales (Schrieber y Gareis, 2007; Karim y Bhat, 2009; Boran y Regenstein, 2010).

Propiedades Químicas y Estructurales

Las propiedades químicas y estructurales de la gelatina están relacionadas con la composición y distribución del contenido de aminoácidos, los cuales se asemejan al contenido de aminoácidos que conforman al colágeno de la fuente de extracción. Durante la extracción de gelatina se producen cambios y reordenamientos de esta secuencia, lo cual acarrea diferencias en las mismas. Generalmente la composición de aminoácidos en especies marinas presenta muchas variaciones en comparación con la de mamíferos, principalmente en el contenido de iminoácido (Pro e Hyp) (Haug y Draget, 2009). Las gelatinas de mamíferos contienen aproximadamente 30% de iminoácidos, mientras que las gelatinas procedentes de especies de aguas tropicales poseen alrededor de 22-25% y las de aguas frías 17%, aproximadamente (Muyonga et al., 2004). Estas características también se ven afectadas por el tipo de proceso utilizado para la extracción. Durante tal procedimiento se pueden obtener subunidades (α , β y γ) de masa muy variable, provocado por la interrupción de enlaces entre las cadenas y escisiones desfavorables en algunos enlaces peptídicos intermoleculares, lo que da como resultado fragmentos de gelatina con masa molecular de aproximadamente de 80 a 250 kDa, obviamente menores al del colágeno nativo (Schrieber y Gareis, 2007).

Propiedades Reológicas

Los geles a base de gelatina están categorizados como geles físicos, es decir, las interacciones o uniones entre las cadenas que componen al material son de naturaleza física, como fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno (Papon et al., 2006). Tres de las propiedades reológicas más importantes en la industria son fuerza de gel, viscosidad y temperatura de fusión, las cuales están vinculadas a la masa molecular como a las interacciones intermoleculares determinadas por su composición de aminoácidos y la relación de cadenas α/β presentes en la gelatina (Cho et al., 2004).

La fuerza de gel (FG) es un criterio que se basa en la medición de la rigidez de geles a base de gelatina, con la finalidad de diferenciarlas entre sí y determinar el grado de

aplicación que tendrá en la industria. Si la determinación se lleva a cabo en condiciones estándares (abajo mencionado) se le denomina “fuerza Bloom o Bloom strength (en inglés)”. Actualmente las gelatinas comerciales pueden adquirir de 100 a 300 g Bloom (Regenstein y Zhou, 2007; Schrieber y Gareis, 2007; Boran y Regenstein, 2010). El procedimiento estándar consiste en la elaboración de un gel en un frasco denominado “Bloom jar” a una concentración de 6.67% de gelatina, madurado a 10 °C por un período de 16-18 h, para posteriormente cuantificar su rigidez por la fuerza requerida (g) para penetrar la superficie del gel 4 mm a una velocidad de 1 mm/s con un embolo plano de 12.7 mm de diámetro (GMIA, 2006; Regenstein y Zhou, 2007; Schrieber y Gareis, 2007; GME, 2008; Haug y Draget, 2009). Sin embargo, los frascos no son empleados comúnmente por lo tanto, en muchas investigaciones llegan a utilizar contenedores que no solo difieren en el material sino también en las dimensiones, debido a la cantidad de muestra a utilizar (10 g/155 mL H₂O-miliQ). Así, algunos investigadores utilizan concentraciones menores (generalmente 3.3%). Además, el tiempo y temperatura de solubilización aún no han sido bien estandarizados dando como resultado grandes variaciones que en ocasiones se obtienen resultados casi incomparables entre si (Regenstein y Zhou, 2007; Haug y Draget, 2009; Boran y Regenstein, 2010).

Además de la FG, la viscosidad es la segunda propiedad de mayor importancia en la industria de la gelatina. Las gelatinas comerciales poseen viscosidades en un intervalo de 1 y 75 mPa·s. Los valores más altos son empleados en la industria de alimentos (como estabilizante), farmacéutica y fotográfica, mientras que los valores bajos son utilizados en la industria de confitería (GMIA, 2006; Schrieber y Gareis, 2007). Además de las propiedades químicas de la propia gelatina, la viscosidad depende de la concentración, temperatura, pH y presencia de aditivos, siendo de mayor importancia, por su efecto sobre esta propiedad, la distribución de peso molecular, en comparación con otras como FG y punto de fusión (Regenstein y Zhou, 2007).

Cuando un gel termorreversible se le incrementa la temperatura hasta un cierto punto, éste comienza a derretirse (o fundirse), lo cual se le conoce con el nombre de punto de fusión (melting point, en inglés), el cual generalmente es menor a la temperatura corporal, facilitando su derretimiento en la boca. Esta propiedad es de suma importancia para su aplicación en la industria de alimentos y farmacéutica. El punto de

fusión de las gelatinas de puerco y de bovinos se encuentra alrededor de 30-33 °C, mientras que las provenientes de productos pesqueros de aguas tropicales esta entre 23-29 °C y las de aguas frías esta alrededor de 10 °C (Regenstein y Zhou, 2007).

Otras Propiedades

En un estudio realizado por Lobo (2002), se encontró que la gelatina presenta características tensoactivas, por lo que es capaz de actuar como un agente emulsificante (en emulsiones de aceite/agua). Como consecuencia de ello, puede llegar a ser empleada como agente emulsificante, espumante y humectante, características de importancia en los alimentos así como en aplicaciones farmacéuticas y médicas. Por otra parte, la gelatina, y en especial las provenientes de pescados, han presentado excelentes características para la formación de películas que han sido reportados por diversos autores (Muyonga et al., 2004; Schrieber y Gareis, 2007; Gómez-Guillén et al., 2011). En general, se ha observado que las películas a base de gelatina de especies marinas de aguas tropicales como el perca del Nilo (*Lates niloticus*), presenta propiedades similares a la de bovinos (Muyonga et al., 2004).

Choi y Regenstein (2000) estudiaron las propiedades sensoriales de gelatina de pescado y cerdo, concluyendo que los alimentos que presentaron mejor sabor fueron aquellos con formulación a base de gelatina de pescado, los cuales presentaron menor porcentaje de sabores y olores desagradables en comparación con las formulaciones a base de gelatina de cerdo.

Potencial de Obtención de Gelatina Como Producto Durante el Procesamiento de Raya Arenera

Diferentes publicaciones han coincidido en que las fuentes principales de extracción (piel y huesos de mamíferos, principalmente de puerco y bovino) presentan algunos inconvenientes para su consumo y/o aplicación debido a la posibilidad de transmitir enfermedades como el “mal de las vacas locas” (BSE, por sus siglas en inglés). Aunque

algunos estudios han demostrado que el riesgo de adquirir esta enfermedad por el consumo de este colágeno es cercano a cero (Taylor, 2002; Schrieber y Gareis, 2007). De igual manera, existe un rechazo en religiones como el judaísmo y el islam, debido a que de acuerdo a sus costumbres religiosas y sus leyes, prohíben el consumo de productos desarrollados con carne y/o restos de puerco; mientras que los hindúes la prohíben para los de carne y/o restos de bovinos. Por tal motivo diversas investigaciones y revisiones se han realizado para seguir de cerca las fuentes alternativas de gelatina y sus características, así como sus ventajas y desventajas con la finalidad de eliminar las preocupaciones religiosas compartidas por las comunidades judías y musulmanas (Schrieber y Gareis, 2007; Karim y Bhat, 2008; Haug y Draget, 2009; Karim y Bhat, 2009; Boran y Regenstein, 2010; Gómez-Guillén et al., 2011).

En los últimos años, las fuentes alternativas que por su importancia han ganado mayor atención, son principalmente las que provienen de restos de aves y peces. Siendo las de subproductos pesqueros la mejor alternativa para la obtención de gelatina, no solo por sus propiedades funcionales peculiares, sino porque también se acercan a las propiedades de una de las mejores fuentes de extracción (la del cerdo), en especial en subproductos de especies que habitan en aguas tropicales (Baziwane y He, 2003).

Algunos ejemplos de subproductos pesqueros que han sido evaluados como fuente alternativa, son los extraídos de especies de agua fría, como: piel de bacalao (Gudmundsson y Hafsteinsson, 1997), piel de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) (Arnesen y Gildberg, 2007), piel de abadejo de Alaska (Zhou y Regenstein, 2005); especies sub-tropicales o tropicales, como: piel de tilapia roja (*Oreochromis mossambicus*) y negra o plateada (*Oreochromis nilotica*) (Jamilah y Harvinder, 2002), piel y huesos de perca del Nilo (*Lates niloticus*) (Muyonga et al., 2004). Otras especies como lenguado de Dover (*Solea vulgaris*), calamar gigante (*Dossidicus gigas*) y muchos otros han sido documentadas en algunas revisiones al tema (Karim y Bhat, 2008; Karim y Bhat, 2009; Boran y Regenstein, 2010; Gómez-Guillén et al., 2011). Incluso se han estudiado en piel de especies cartilaginosas como, el tiburón bambú (*Chiloscyllium punctatum*) y tiburón punta negra (*Carcharhinus limbatus*) (Kittiphattanabawon et al., 2010a); cartílago de tiburón mako (*Isurus oxyrinchus*) (Cho et al., 2004) y piel de raya (*Raja kenoei*) (Cho et al., 2006).

Sin embargo, debido a la variedad de características que presentan los organismos marinos, las gelatinas producidas (a partir de sus subproductos) poseen propiedades muy diversas. De ahí, surge el interés de optimizar las condiciones del proceso de extracción, para obtener mejores rendimientos sin perder de vista las propiedades fisicoquímicas y funcionales del producto resultante. De esta manera podemos esperar que la raya arenera (*Dasyatis brevis*) cuenta con potencial para la obtención de gelatina a partir de su piel y con ello proporcionar una forma alternativa y lucrativa de utilizar los subproductos generados durante su comercialización.

HIPÓTESIS

Es posible optimizar las condiciones de extracción a través de los factores de pH ácido, tiempo de pretratamiento ácido y tiempo de extracción, para la obtención de gelatina a partir de piel de raya (*Dasyatis brevis*).

OBJETIVOS

Objetivo General

Optimizar el proceso de extracción de gelatina a partir de piel de raya (*Dasyatis brevis*) evaluando sus características fisicoquímicas.

Objetivos Particulares

- Evaluar el efecto de dos ácidos sobre el rendimiento y propiedades fisicoquímicas de la gelatina obtenida a partir de piel de raya.
- Optimizar el proceso de extracción de gelatina, modificando las condiciones de extracción (concentración de ácido, tiempo de tratamiento ácido y tiempo de extracción en agua) utilizando como variables de respuesta el rendimiento, fuerza de gel y viscosidad.
- Extracción y caracterización parcial de la gelatina obtenida mediante la utilización de las condiciones óptimas de extracción.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esquema General y Materia Prima

Metodología General

Para alcanzar los objetivos se planteó un esquema general de tres etapas. La Etapa I fue evaluar dos tipos de ácido (HCl y CH₃COOH) a diferentes concentraciones, evaluando el comportamiento de algunas características de la gelatina obtenida. Posteriormente, la de mayor rendimiento y mejores características (en especial mayor fuerza de gel) fue utilizado en la Etapa II, que consistió en la optimización del proceso de extracción de gelatina. Finalmente, las condiciones óptimas del proceso de extracción fueron empleadas para la Etapa III que consistió en caracterizar parcialmente el producto final.

Obtención de Muestras

Los especímenes de raya arenera (*Dasyatis brevis*) fueron capturados en las costas de Bahía de Kino, Sonora y trasladados en hieleras hasta la planta piloto del Laboratorio de Bioquímica y Calidad de Productos Pesqueros en las instalaciones del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD, A.C. Hermosillo, Sonora). Las rayas fueron lavadas, medidas (longitud de aletas), pesadas y almacenadas a -20 °C, hasta su uso. Para su desollamiento, las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente, separándose la piel inferior y superior por fileteo. Las pieles fueron acomodadas entre papel Whatman #4 (papel-piel-papel) para facilitar su cortado en trozos pequeños (1 x 2 cm, aproximadamente). Posteriormente, se retiró el exceso de papel lavando con agua.

La piel de todos los especímenes se homogenizó y almacenó en congelación (-20 °C) en bolsas Ziploc™ con 100 gr/bolsa, hasta su utilización.

Análisis Proximal de la Piel

El análisis proximal de la piel incluyó humedad, proteína, lípidos y cenizas. De cada bolsa se tomó una porción de muestra y las determinaciones se realizaron por duplicado de acuerdo a los procedimientos recomendados por la AOAC (1996). El contenido de humedad se estimó por medio de una estufa a una temperatura de 105 °C; la determinación de cenizas se efectuó en una mufla a 550 °C; para cuantificar la proteína presente, se calculó a partir del nitrógeno total multiplicando por el factor 5.4 para su estimación (Boran y Regenstein, 2009).

ETAPA I

Evaluación del Efecto de Dos Ácidos Sobre el Rendimiento y Propiedades Físicoquímicas de la Gelatina Obtenida

Pretratamiento de la Materia Prima

Las pieles se descongelaron y lavaron con abundante agua a temperatura ambiente y se pesaron 20 g de piel de cada tratamiento en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Se removieron las proteínas no colagénicas lavando la piel con una solución alcalina de NaOH 0.1 M, durante 60 min a una relación de 1:6 (peso de muestra:volumen de solución alcalina) en agitación constante (125 rpm), el exceso de ésta solución (en la piel) se retiró por filtración a través de un embudo con dos capas de tela de algodón y exprimidas después de reposar por 5 min. Este procedimiento se realizó al menos dos veces. Posteriormente, las pieles fueron tratadas con una solución ácida a diferentes concentraciones (0.01, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.15, 0.2 M) a una relación 1:6 (p/v) por 60 min en agitación constante (125 rpm). Para drenar el exceso de la solución en la piel se utilizó un embudo y dos capas de tela de algodón, dejando reposar por 5 min y

exprimir las. Este procedimiento se realizó al menos dos veces. Se utilizaron ácido clorhídrico (HCl) y ácido acético (CH₃COOH) para ser evaluados como pre-tratamiento ácido. Todas las soluciones empleadas estuvieron almacenadas en refrigeración (4 °C) antes y durante la extracción (Zhou y Regenstein, 2005).

Extracción de Gelatina

Después del pretratamiento de la piel, la extracción de gelatina se llevó a cabo en baño maría a 60 °C en agua miliQ (1:6, p/v) durante 3 horas, la solución de gelatina (SG) fue filtrada a través de dos capas de tela de algodón dejándola reposar por 5 minutos, se midió el volumen total de SG dejándola reposar hasta obtener la temperatura ambiente en la muestra. Posteriormente se almacenó en congelación a -80 °C hasta su liofilización (Zhou y Regenstein, 2005).

Rendimiento de Proteína

Para determinar la concentración de proteína en SG, se tomaron alícuotas de cada tratamiento para ser analizadas por el método de Biuret (Gornall et al., 1949), utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm. Se utilizó Suero Albumina de Bovino (BSA) como referencia. El rendimiento (RD) se calculó usando la siguiente fórmula (Zhou y Regenstein, 2005):

$$RD = \frac{A \times V}{20gr} \times 100$$

Dónde:

A = Concentración de proteína en g/mL

V = Volumen total de SG en mL.

Electroforesis en Gel de SDS-Poliacrilamida

Partiendo de la gelatina liofilizada, se pesaron y disolvieron (5 mg/mL) en agua-miliQ a 60 °C durante 30 min. Posteriormente fueron mezcladas 1:1 con buffer muestra, calentadas a 65 °C por 15 min y posteriormente depositadas en baño de hielo y/o congeladas hasta su posterior análisis. La pureza de las gelatinas fueron analizadas mediante electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE), siguiendo la metodología descrita por Laemmli (1970). Para ello, se realizaron geles discontinuos de 1 cm de grosor, con tamaños de poro del 4 y 7.5% para el gel de inyección y separación, respectivamente. A continuación se inyectaron 10 µL de cada muestra (gelatina:buffer muestra). Se utilizó 80 y 160 V para la migración de las proteínas a través del gel de inyección y separación, respectivamente. Los geles fueron teñidos con una solución de azul de Coomassie R-250 y desteñidos con una mezcla de metanol: agua: ácido acético (5:4:1, v/v/v). Las corridas se realizaron utilizando un equipo de Bio-Rad (cámara y fuente de poder Bio-Rad Power Pac 3000, Bio-Rad Laboratories, Hercules Ca).

pH

La medición de pH en la Etapa I, se partió de la técnica descrita por la GMIA (2006) (por sus siglas en ingles, Gelatin Manufacturers Institute of America), la cual es una institución que además de producir y promover gelatinas comerciales, también realiza pruebas de normalización, a fin de asegurar a los consumidores productos de seguridad consistente y de calidad. Se pesaron 0.05 mg de cada uno de los tratamientos liofilizados y se diluyeron en 5 mL con agua mQ a 60 °C hasta su completa disolución, obteniendo una concentración final de 1% (p/v). Posteriormente, esta solución se conservó en baño maría a 35 °C durante la medición de pH, utilizando un potenciómetro Termo Electrón Corporation, modelo Orion 4 Star (Corning Science Products. N.Y.), calibrándose con estándares de pH 4.0, 7.0 y 10.

Fuerza de Gel (FG)

La fuerza de gel (FG) de las gelatinas fue medida partiendo de la metodología descrita por Kittiphattanabawon et al. (2010a), siguiendo los estándares internacionales para gelatinas comerciales (GMIA, 2006). Para ello, la gelatina liofilizada se disolvió en agua-mQ a una concentración final de 6.67%, utilizando agitación constante a 60 °C hasta su completa disolución. Las gelatinas se depositaron en vasos de precipitado procurando una dimensión de 3 cm de diámetro y 2.5 cm de altura. Su maduración se llevó a cabo en refrigeración (4 °C) durante un periodo de 17±1 h. La medición de FG fue inmediatamente después de haber sido retirado de la refrigeración con un texturómetro TMS-Pro (Texture Lab Pro, Food Technology Corp., Virginia, USA), utilizando un embolo plano de 12.5 mm diámetro con una celda de carga de 100 N a una velocidad de 1 mm/s hasta 4 mm de penetración del gel.

Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos, fueron analizados mediante un diseño factorial de 2×7 donde, los factores fueron los dos tipos de ácido utilizado (ácido clorhídrico y acético) y los niveles la concentración de éstos (0.01, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.15, 0.2 M). Cuando se detectaron diferencias, la comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey-Kramer con un nivel de significancia de 0.05, mediante el paquete estadístico NCCS (Versión: 7.1.8).

ETAPA II

Optimización del Proceso de Extracción de Gelatina de Piel de Raya Arenera

Pretratamiento de la Materia Prima y Extracción de Gelatina

Una vez establecido el ácido a utilizar (ácido acético) para la extracción de la gelatina, se procedió a desarrollar el objetivo II, que fue el de optimizar el proceso de

extracción de la misma. Para ello se procedió a lavar la piel con solución de NaOH 0.1M como fue explicado en la sección anterior. Por otra parte, el pretratamiento ácido consistió de dos variables independientes determinadas en base a los resultados de la etapa anterior y a revisión de literatura, las cuales fueron: la concentración del ácido (X_1) y el tiempo del pretratamiento ácido (X_2). El pretratamiento se llevó a cabo como en la Etapa I modificando los factores X_1 y X_2 de acuerdo al diseño experimental. La extracción se realizó como en la Etapa I modificando el tiempo de extracción (X_3). El número de corridas experimentales y los niveles a probar de cada factor se establecieron en base al diseño experimental.

Rendimiento de Proteína

El rendimiento de proteína fue calculada de acuerdo a lo descrito por Zhou y Regenstein (2005), mediante la ecuación especificada en la Etapa I.

Fuerza de Gel

La medición de FG se llevó a cabo ajustando el pH de la solución a 6.1 ± 0.1 utilizando NaOH 0.1M, midiéndose de acuerdo a la metodología descrita en la Etapa I.

Viscosidad

La viscosidad (mPa·s) de la gelatina obtenida fue determinada siguiendo la metodología descrita por Gudmundsson (2002). La gelatina fue disuelta en agua miliQ a 60 °C, obteniendo la concentración final de 6.67% (preparación descrita anteriormente) para después ajustarse el pH hasta 6.1 ± 0.1 con NaOH 0.1M. Posteriormente, la medición se realizó con un reómetro con plato cónico realizándose un barrido del esfuerzo cortante de entre 36 hasta 1910 mPa a temperatura constante (60 °C).

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos en la sección anterior fueron la base para el establecimiento de las condiciones experimentales para la optimización del proceso de extracción de gelatina a partir de piel de raya arenera (*Dasyatis brevis*). Para establecer las condiciones óptimas de extracción y el efecto de la concentración del ácido (X_1), tiempo de tratamiento ácido (X_2) y tiempo de extracción (X_3) en el proceso de extracción de gelatina se utilizó la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR). Las corridas experimentales y los niveles de los factores fueron establecidas en base a un Diseño Central Compuesto Rotatorio (DCCR) para tres factores, con cuatro puntos centrales (Montgomery, 2003). Para cada factor (X_1 , X_2 , X_3), se definieron los límites mínimos y máximos utilizando como referencia los resultados de la Etapa I (para la variable X_1) mientras que el resto de las variables se realizó en base a literatura (Schrieber y Gareis, 2007; Boran y Regenstein, 2009; Karim y Bhat, 2009; Zeng et al., 2010). Éstos fueron codificados en 5 niveles ($-\alpha$, -1 , 0 , $+1$, $+\alpha$), dando como resultado 18 posibles combinaciones y/o tratamientos. El valor $\pm \alpha$ representó los puntos axiales del diseño (6 puntos), los niveles ± 1 fueron los puntos factoriales (8 puntos) y el 0 indica el punto central u origen (4 puntos), tal y como se muestra en la figura 2 y Tabla 2. Las variables de respuesta evaluadas fueron el RD, FG y viscosidad.

Para llevar a cabo el análisis estadístico de los datos, se ajustó un modelo de regresión para cada variable de respuesta con una probabilidad no mayor al 5% ($P \leq 0.05$). El modelo completo ajustado, consistió en una ecuación polinomial de segundo orden donde se incluyó términos lineales, cuadráticos y cruzados. Como a continuación se muestra:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j$$

Donde:

Y = Variable dependiente (RD, FG y V).

β_0 = Intercepto (valor de la respuesta en el punto central del diseño).

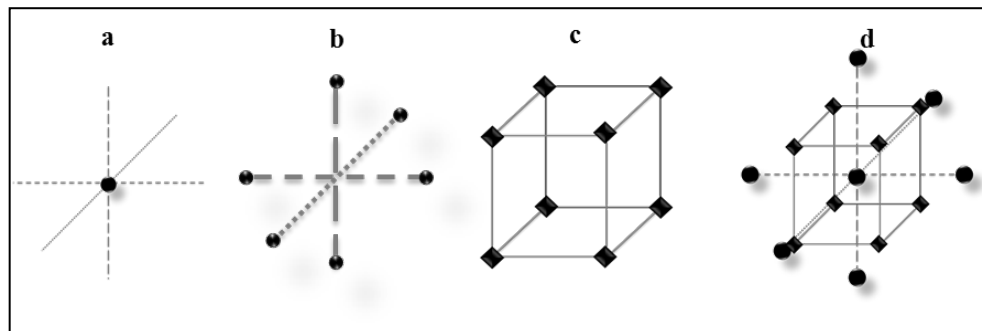


Figura 2. Representación de los tipos de puntos en el DCCR, para $k=3$ factores.

a) punto central; b) Puntos axiales; c) Puntos factoriales y d) DCCR.

Tabla 2. Variables independientes y niveles utilizados en el DCCR para tres factores.

Factores	Símbolo	Niveles				
		$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Concentración ácida (M)	X_1	0.07	0.1	0.15	0.2	0.23
Tiempo del pretratamiento ácido (h)	X_2	2	3	4.5	6	7
Tiempo de extracción (h)	X_3	4	6	9	12	14

Puntos axiales ($\pm\alpha$), puntos factoriales (± 1) y puntos centrales (0) para la metodología de superficie de respuesta (MSR)

$\beta_i, \beta_{ii}, \beta_{ij}$ = Coeficientes de regresión.

X_i, X_j = Niveles de la variable independiente.

Para la presentación de los resultados se realizaron graficas de superficie de respuesta en tercera dimensión. Todo lo anterior mediante el paquete estadístico SAS-JMP (v9; SAS Inst. Inc.).

ETAPA III

Validación y Caracterización de las Condiciones Óptimas de Extracción de Gelatina

Las condiciones óptimas de extracción de gelatina bajo las condiciones del presente estudio fueron obtenidas mediante la manipulación de las graficas de predicción, resultado de la MSR, utilizando el paquete estadístico JMP (v9; SAS Inst. Inc.). La extracción y caracterización de la gelatina se describen a continuación.

Pre-tratamiento de la Materia Prima y Extracción

El pretratamiento de la piel con la solución de NaOH 0.1M se realizó como en la Etapa I. El pretratamiento ácido consistió en aplicar las condiciones óptimas obtenidas por la MSR (X_1 y X_2) utilizando una relación de 1:6 (p/v), la concentración de ésta solución fue definida por la variable independiente X_1 y el tiempo definido por X_2 (min) en agitación constante (125 rpm), siguiendo el mismo procedimiento descrito en secciones anteriores. La extracción de gelatina, se llevó a cabo en baño maría con agua miliQ (1:6, w/v) a 60 °C; el tiempo (X_3) fue definido por el óptimo encontrado por la MSR, la solución de gelatina resultante fue almacenada a -80 °C hasta su liofilización.

Rendimiento de Proteína

El rendimiento de proteína fue calculada de acuerdo a lo descrito por Zhou y

Regenstein (2005), mediante la ecuación especificada en la Etapa I con una modificación en el peso de la muestra (30 gr) para obtener más producto liofilizado para su caracterización.

FG y Análisis de Perfil de Textura (APT)

La FG de las gelatinas se midió partiendo de la metodología descrita por Kittiphattanabawon et al. (2010a), y descrita en la Etapa I ajustando el pH a 6.1 ± 0.1 . El APT se realizó siguiendo el procedimiento de Boran et al. (2010a) inmediatamente después de la medición de FG utilizando un émbolo de 75 mm de diámetro. Se realizó un análisis de perfil de textura (APT) al 60% de compresión en dos ciclos (de acuerdo a pruebas preliminares, a este porcentaje de compresión la gelatina no sufrió ninguna fractura). Para ello la gelatina se comprimió aproximadamente 15 mm del gel con un intervalo de 5 segundos entre cada ciclo. Los resultados fueron reportados como la media de dos repeticiones para cada tratamiento. Con el gráfico resultante se calculó los parámetros de dureza, cohesividad y gomosidad. La dureza fue calculada por medio de la intensidad generada por el pico durante el ciclo de primera compresión, la cohesividad se definió como el cociente de las áreas delimitadas por las curvas de la primera y segunda compresión (A_2/A_1) y la gomosidad se obtuvo con el producto de la dureza y cohesividad (Bourne, 2002).

Viscosidad

La viscosidad fue determinada evaluada mediante la metodología descrita por Gudmundsson (2002) en soluciones de gelatina a una concentración de 6.67%. Estudios preliminares, llevaron a un cambio en la geometría de plato, la cual fue plato-plato (cross hatched) y el resto de la determinación se muestra en la Etapa II.

Electroforesis en Gel de SDS-Poliacrilamida

Este análisis se realizó como en la Etapa I.

Evaluación de la Temperatura de Fusión por Calorimetría Diferencial de Barrido

La temperatura de fusión (T_f) y el cambio de entalpia (ΔH), fue valorada mediante calorimetría diferencial de barrido (DCB) mediante la técnica descrita por Cheow et al. (2007). Se pesó 30 μL de solución de gelatina a una concentración de 6.67% (preparación descrita previamente), en celdas de aluminio y posteriormente selladas herméticamente. Se realizó un barrido de temperatura de 60 a 5 $^{\circ}\text{C}$ y de 5 a 60 $^{\circ}\text{C}$, incrementando la temperatura 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Como referencia, se empleo una celda vacía con un equipo Perkin Elmer modelo DSC7 (Perkin Elmer Diamond, DSC, Shelton, CT06484, USA).

Reología Dinámica de Baja Deformación

La reología dinámica de baja deformación se llevó a cabo con un reómetro (Rheometrics Mod. RFII Fluids Spectrometer, Piscataway, NJ) y se siguió la metodología descrita por Gudmundsson (2002), utilizando una geometría de plato-plato (cross hatched) con soluciones de gelatina al 6.67% a pH 6.1 ± 0.1 . La solución de gelatina se transfirió al sistema hasta alcanzar 40 $^{\circ}\text{C}$ (sistema-gelatina). Se realizó un proceso enfriamiento-calentamiento de 40 a 5 $^{\circ}\text{C}$ y 5 a 40 $^{\circ}\text{C}$ a un flujo de 0.5 $^{\circ}\text{C}$ y un reposo de 15 min al alcanzar la mínima temperatura (1 rad/s a 0.2% de deformación). Se utilizaron frecuencias de 1, 2.15, 4.64 rad/s y después de cada barrido de temperatura se realizó un espectro mecánico entre 0.1 y 100 rad/s. Una vez recolectada la información se determinó la temperatura de gelificación (T_g) y de fusión (T_f) mediante la intersección de las gráficas obtenidas de G' y G'' , durante el periodo de calentamiento-enfriamiento de la gelatina, similar a como lo describe el método de Michon et al. (1993) (figura 3).

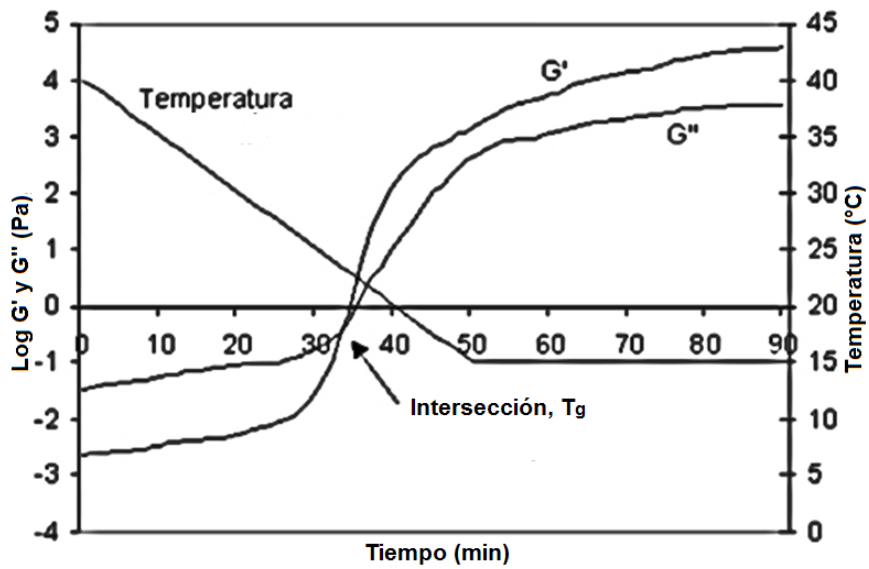


Figura 3. Determinación de la temperatura de gelificación (T_g , intersección) con la graficación de G' y G'' durante el proceso de calentamiento-enfriamiento de la gelatina.

Contenido de Pro, Hyp y Aminoácidos.

El perfil de aminoácidos fue analizado de acuerdo a lo descrito por Vázquez-Ortiz et al. (1995), con ligeras modificaciones. Tres mg de gelatina liofilizada (GL) fueron hidrolizados con ácido clorhídrico (HCl) 6 M por 6 h a 150 °C (utilizando tioglicolato de sodio como antioxidante, 1:1, p/p) y secadas en un rotavapor. La muestra hidrolizada se disolvió en 2 mL de buffer de citratos 0.5M (muestra + buffer de citratos = MB) y/o almacenadas en congelación hasta su posterior análisis.

Para la cuantificación de Pro e Hyp se mezclaron 125 µL de MB con 0.5 mL de buffer de borato 0.4 M, de ésta mezcla se tomó una alícuota y posteriormente derivatizadas (1:1) con NBD-Cl (2 mg/mL) en metanol durante 5 min a 60 °C, la reacción se detuvo con HCl 1 M. La mezcla se filtró con una jeringa adaptada a un filtro de 0.22 micras y el líquido filtrado se recibió en un tubo eppendorf de color ámbar de 1.5 mL. Posteriormente, se inyectó a un cromatografo (HPLC por sus siglas en inglés, High-Performance Liquid Chromatography) Hewlett Packard Modelo GmbH (Hewlett-Packard Co. Waldbrom, Germany), conectado a un detector de fluorescencia. Se utilizó un flujo de gradiente de 1 mL/min de 2 eluyentes [A: metanol al 100% y B: buffer de Acetato de Sodio anhidro 0.1M (pH 7.2), metanol y tetrahidrofurano (900:95:5 v/v)]. La separación de iminoácidos se llevó a cabo mediante una columna en fase reversa C18 octa-decil dimetilsilano (10 cm x 4,6 mm ID y un tamaño de partícula de 3 µm, Varian, Cat No.R0089200E3). Los aminoácidos primarios, Pro e Hyp se identificaron y cuantificaron de acuerdo al tiempo de retención y las áreas producidas, se integraron por el software Chemstation Agilent Technologies (Agilent Technologies Inc. USA) y se compararon con sus respectivos estándares producidos por Sigma Chemical Co. St. Louis, MO.

Los aminoácidos primarios (excepto triptófano), fueron cuantificados a partir de la mezcla de 100 µL de MB, 200 µL EI y 700 µL de H₂O-mQ. Utilizando como EI (Estándar Interno) ácido α-amino butírico (10 µg/mL). Se utilizó una solución de O-Phthaldialdehido (OPA) la cual consistió en 10 mg de OPA + 250 µL de metanol + 37.5 µL de sol. Brij 35 + 25 µL β-mercaptoetanol, aforada a 10 mL con buffer de borato de potasio a pH 10.4. La mezcla y el OPA, fueron filtradas con en una jeringa acoplada a

un filtro de 0.22 micras, el líquido filtrado se recibió en un tubo eppendorf ámbar de 1.5 mL. La derivatización se realizó a una relación de 1:1 (10 μ L de muestra:10 μ L de OPA). Para la separación cromatográfica se utilizó un gradiente de flujo de 1.0 mL/min de 2 eluyentes (A: metanol 10% y B: 90% buffer de acetatos, pH 7.2). El área producida por la fluorescencia de los aminoácidos se registró e integró utilizando el programa Chem Station (Agilent Technologies Inc. USA) y se compararon con sus respectivos estándares producidos por Sigma Chemical Co. St. Louis, MO.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del Tipo de Ácido Sobre la Extracción de Gelatina

Análisis Proximal de la Piel

Los resultados del análisis proximal de la piel de mantarraya (*Dasyatis brevis*) presentaron un contenido de humedad de $63.76 \pm 4.4\%$, seguido de proteína cruda con $29.0 \pm 1.6\%$, $5.6 \pm 0.5\%$ de cenizas y $0.2 \pm 0.0\%$ lípidos. Sin embargo, estos resultados no se pueden relacionar debido a la escasa literatura que existe sobre esta especie y/o rayas en general, excepto con estudios realizados en piel de tiburón, especie que pertenece al mismo grupo taxonómico (elasmobranquios). Así, la piel de tiburón bambú (*Chiloscyllium punctatum*) presentó una composición química muy similar a la especie en estudio, con 61.96% de humedad, 24.75% de proteína, 12.12% de cenizas y 0.19% de lípidos (Kittiphattanabawon et al., 2010b). Aunque, se observó mayor porcentaje de proteína cruda y menor contenido de cenizas en esta especie de raya, la variación entre ambas se relaciona principalmente al tipo de especie, variaciones individuales y anatómicas entre organismos, factores fisiológicos, diferencias entre sexos y cambios estacionales, principalmente (Huss, 1998).

Rendimiento y pH

Diversos autores han considerado el pretratamiento ácido como factor de gran importancia en el proceso de extracción de gelatina, ya que permite romper y/o desestabilizar puentes de hidrógeno que desestabilizan la estructura helicoidal del colágeno (Stainsby, 1987; Schrieber y Gareis, 2007; Zeng et al., 2010).

En el presente estudio, se obtuvieron rendimientos que van desde 2.8 a 5.5% para los extractos tratados con HCl y de 4.1 a 7.0% con CH₃COOH (figura 4). El análisis estadístico arrojó diferencias ($P \leq 0.05$) entre los factores y su interacción con los niveles (tipo de ácido y concentración, respectivamente), observándose mayores rendimientos al utilizar ácido acético en concentraciones por encima de 0.1 M. En la figura 4, puede notarse una relación directa entre y la concentración de CH₃COOH, mostrando un punto máximo a 0.15 M. Las concentraciones mayores de ácido (i.e., 0.2 M) afectaron el rendimiento (ambos ácidos), posiblemente provocado por el aumento en la acidez de la solución, llevando con esto a una desnaturalización desmedida del colágeno, que implica el rompiendo de enlaces covalentes y no covalentes, generando fragmentos de muy bajo peso molecular y con la posibilidad de ser lixiviados durante las etapas de lavado con agua (Jamilah y Harvinder, 2002; Zeng et al., 2010).

La diferencia en el rendimiento entre los dos ácidos pudiera estar relacionada con la capacidad que tienen éstos para disociarse en solución (pKa); es decir, siendo el HCl un ácido fuerte, puede disociarse completamente en el medio, mientras que el CH₃COOH (ácido débil) no se disocia por completo sino que llega al equilibrio entre el ácido no disociado y sus productos de disociación. Así, el pH de una solución de HCl será menor (más ácida) comparada con una solución de ácido acético a la misma concentración (Keith, 1998). Lo que pudiera explicar las variaciones de pH en el producto obtenido, tal y como se puede observar en la figura 5. Los valores de pH recolectados de extractos tratados con HCl estuvieron entre 6.6 a 2.9 y de 6.9 a 3.2 para los de CH₃COOH. La figura 5 muestra el efecto de la concentración de ácido sobre el pH del producto final. En ella se aprecia que al aumentar la concentración de ácido, hasta aproximadamente 0.1 M (para ambos), el pH de la gelatina obtenida disminuye. Sin embargo, a valores mayores a 0.1M de ácido, se observa un aumento en el pH de la gelatina, debido al efecto amortiguador de los péptidos formados (ver análisis electroforético).

Por otro lado, el análisis de correlación (figura 6) entre las variables rendimiento vs. pH arrojó que existe una correlación negativa para ambos ácidos utilizados, de -0.55 y -0.77 para HCl y CH₃COOH, respectivamente. Basados en este análisis los resultados indican que a pH's más ácidos el rendimiento es mayor. Esta tendencia, así como la variación de resultados para ambos ácidos, pudiera estar ligada a la interacción del agua

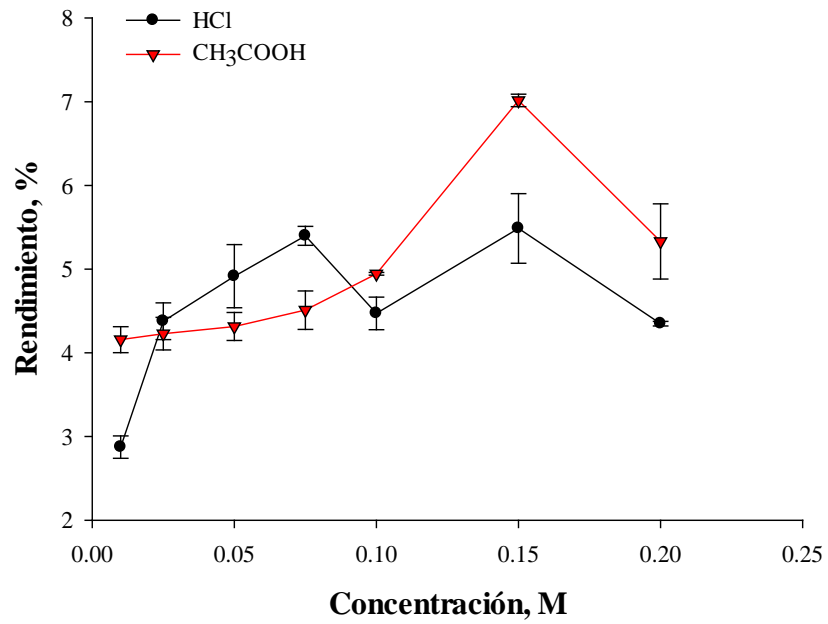


Figura 4. Efecto de la concentración (M) y tipo de ácido sobre el rendimiento de la extracción de gelatina a partir de raya arenera (*Dasyatis brevis*).

Las barras representan la desviación estándar de 2 determinaciones.

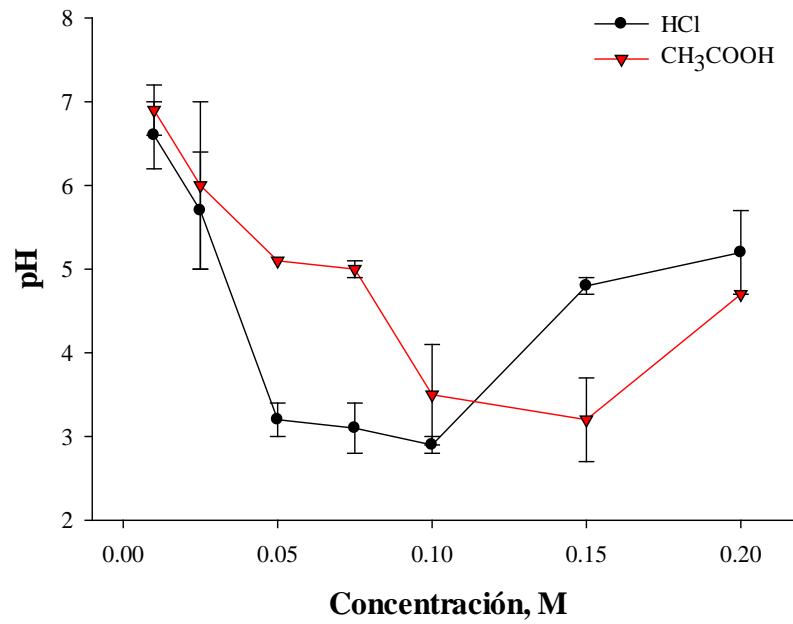


Figura 5. Efecto de la concentración (M) y tipo de ácido sobre el pH de los extractos de gelatina a partir de raya arenera (*Dasyatis brevis*).

Las barras representan la desviación estándar de 2 determinaciones.

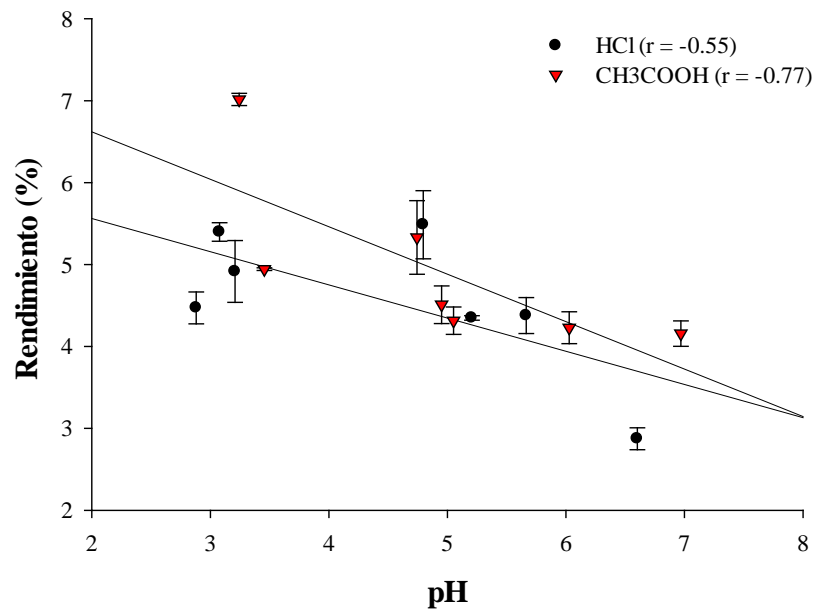


Figura 6. Correlación entre el rendimiento de la extracción contra el pH de la gelatina.

Las barras indican la desviación estándar de 2 determinaciones.

empleada en la extracción y del punto isoelectrico (pI) de la molécula de colágeno nativo, ya que las proteínas cercanas a su pI llegan a interactuar entre si, reduciendo su capacidad de solubilización; mientras que pH's lejanos al pI favorecen esta capacidad dando como resultado una mayor interacción entre la proteína y el medio (Vojdani, 1996; Montero y Gómez-Guillén, 2000). Los resultados obtenidos nos llevan a que el rendimiento del proceso de extracción de gelatina, no solo se ve afectado por la especie sino también por las condiciones del método de extracción.

Los porcentajes en el rendimiento obtenido en el presente estudio, caen dentro del intervalo registrado por Karim y Bhat (2009), para la extracción de gelatina a partir de piel de diversas especies marinas, reportando un intervalo de 5.5 al 22%. También, resultados similares han sido reportados por Cho et al. (2006), quienes obtuvieron mayor rendimiento a menor pH durante el proceso de extracción de gelatina a partir de piel de raya (*Raja kenoei*). Gudmundsson y Hafsteinsson (1997), reportaron rendimientos elevados en intervalos de pH de 2.5 a 3.2 utilizando piel de bacalao. Zhou y Regenstein (2005), observaron rendimientos más altos a pH's más ácidos (entre 2 y 4) utilizando piel de abadejo de Alaska.

Fuerza de Gel

A nivel industrial, especialmente la de alimentos, la gelatina presenta grandes atributos en donde destaca la FG, propiedad más evaluada. A pesar de ello, algunos parámetros durante su solubilización, maduración y/o concentración específica, no han sido completamente estandarizados, dificultando la comparación de resultados entre los diversos estudios. Debido a esto, en el presente trabajo se utilizó gelatina comercial de bovino (Sigma Aldrich, Co. St. Louis, MO) como control, etiquetado con 225 g Bloom (FG medida en condiciones estándares). Posteriormente, al ser evaluada bajo las condiciones mencionadas en la sección de Materiales y Métodos (ver FG en Etapa I), la gelatina control obtuvo una FG de 618.3 ± 19.1 g (n=3). La diferencia entre el valor obtenido y el de etiqueta recae principalmente en el proceso de preparación, maduración de la gelatina y equipo utilizado, tal y como ha sido indicado en diversas publicaciones

(Regenstein y Zhou, 2007; Haug y Draget, 2009; Boran y Regenstein, 2010).

La fuerza “Bloom” ó FG bajo condiciones estándar, es una propiedad de las gelatinas que se puede agrupar en: bajo (<150), medio (150-220) y alto (220-300). En la figura 7 se pueden observar los valores obtenidos en FG para cada uno de los tratamientos, exhibiendo en la mayoría de las concentraciones utilizadas una mayor fuerza para el tratamiento con CH₃COOH (con un máximo de 653±71 g, pH 3.2 a 0.15M), y con valores ligeramente menores cuando se utilizó HCl (valor máximo de 619.5±82 g, pH 5.2 a 0.2M). Además, se lograron apreciar diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre los factores (tipo de ácido) y los niveles (concentración ácida) pero no en la interacción de ellas. Se ha observado que a pH's cercanos al pI de los polímeros de gelatina (valores en el rango de 6 a 9, dependiendo de la especie) se promueven la formación de geles más compactos y rígidos (Gudmundsson y Hafsteinsson, 1997; Cho et al., 2006; Karim y Bhat, 2009).

Respecto al pretratamiento con ácido acético, los valores obtenidos no muestran tal tendencia, sino lo contrario, al alejarse del pI la FG aumentó; lo anterior considerando que es una gelatina tipo A, las cuales presentan un pI entre 6 y 9. Zhou y Regenstein (2005) determinaron el efecto de dos ácidos orgánicos (ácido acético y cítrico) vs. ácido sulfúrico durante la extracción de gelatina utilizando piel de Abadejo de Alaska. Estos autores encontraron que además de pH's neutros, condiciones ácidas débiles (como las promovidas por los ácidos orgánicos) produjeron valores altos de FG (entre 350-500). Este mismo comportamiento se manifestó durante la extracción de gelatina a partir de piel de pez Gallo (*Lepidorhombus boscii*) (Gómez-Guillén y Montero, 2001), obteniendo un mayor hinchamiento de la piel cuando el pretratamiento consistió en una solución alcalina diluida (como en el presente estudio), seguido de un pretratamiento con ácido orgánico (ácido acético ó propiónico), proporcionando las condiciones necesarias de pH y fuerza iónica para producir cadenas de peso molecular favorables (alrededor de 100 kDa) para alcanzar una mayor rigidez en la gelatina. Lo anterior, pudiera explicar los resultados obtenidos de FG y RD en la gelatina a partir de piel de raya (*Dasyatis brevis*). Además, si tomamos en consideración la fuerza “Bloom” del control utilizado como referencia, pudiéramos deducir que la máxima FG exhibida por los pretratamientos con CH₃COOH y HCl (bajo las condiciones del estudio), nos

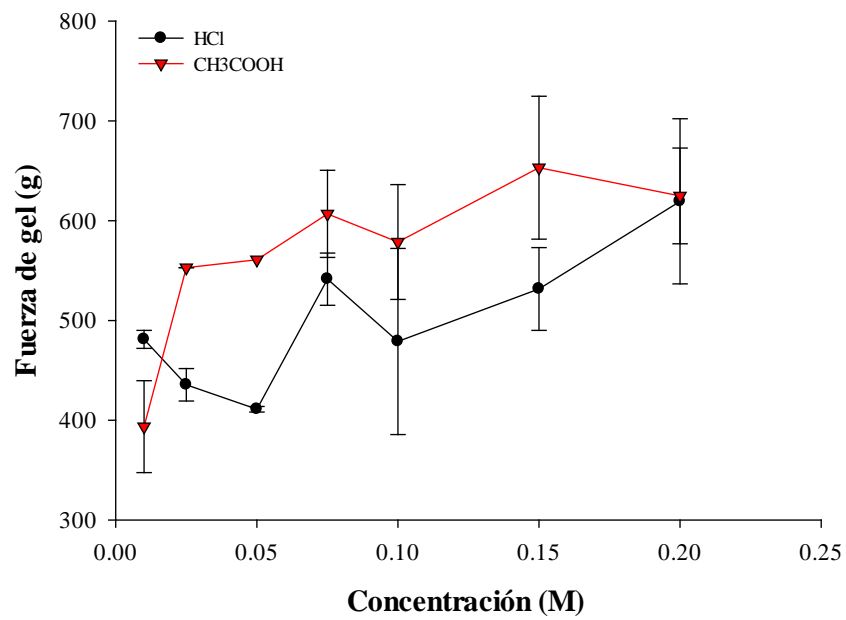


Figura 7. Efecto de la concentración de dos tipos de ácido sobre la Fuerza de gel en la gelatina producida, n=2.

producirían una fuerza de “Bloom alta” (alrededor de 225 g).

La fuerza “Bloom” de diferentes gelatinas (a partir de piel) ha sido reportada para varias especies como: Abadejo de Alaska (98 g), tilapia (23 g) (Zhou et al., 2006); salmón del Atlántico (108 g) y bacalao (71 g) (Arnesen y Gildberg, 2007); tiburón bambú (206 g) y tiburón punta negra (214 g) (Kittiphattanabawon et al., 2010a), bagre gigante (153 g) (Jongjareonrak et al., 2010), comparándose con gelatina de bovino y porcino con 200 y 240 g “Bloom”, respectivamente. La variación en la fuerza “Bloom” de las diferentes gelatinas posiblemente se deba a la composición de aminoácidos contenidos en el colágeno de las diferentes fuentes de extracción y/o a la proporción-peso molecular de cadenas α , β , y γ obtenidas durante la extracción del producto.

Perfil Electroforético de los Extractos de Gelatina

La electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés) es uno de los métodos más utilizados para la purificación, análisis y caracterización de proteínas en el que se separan biomoléculas en dependencia, entre otros factores, de su carga, todo bajo la acción de un campo eléctrico (García-Descalzo et al., 2012). En el presente estudio se empleó SDS-PAGE bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras (figura 8).

El pretratamiento ácido promueve el hinchamiento de la materia prima mediante la desestabilización y/o rompimiento tanto de interacciones débiles como de covalentes (dependiendo del tipo de ácido y condiciones) presentes en el colágeno, produciendo cadenas de diferente tamaño molecular que permite su solubilización en agua. Los resultados (figura 8) muestran la degradación del colágeno, lo cual, produce fragmentos de masa molecular variada. Todos los tratamientos exhibieron dos bandas de gran intensidad, la primera con masa molecular 200 kDa y la segunda de 125 kDa, aproximadamente. También, se observa una banda de menor intensidad pero apreciable aproximadamente a 100 kDa, en especial los pretratamientos con CH_3COOH . De acuerdo a la literatura, estas bandas corresponden a cadenas β (aprox. 200 kDa), α_1 y α_2 (aprox. 100 kDa, $\alpha_2 < \alpha_1$)

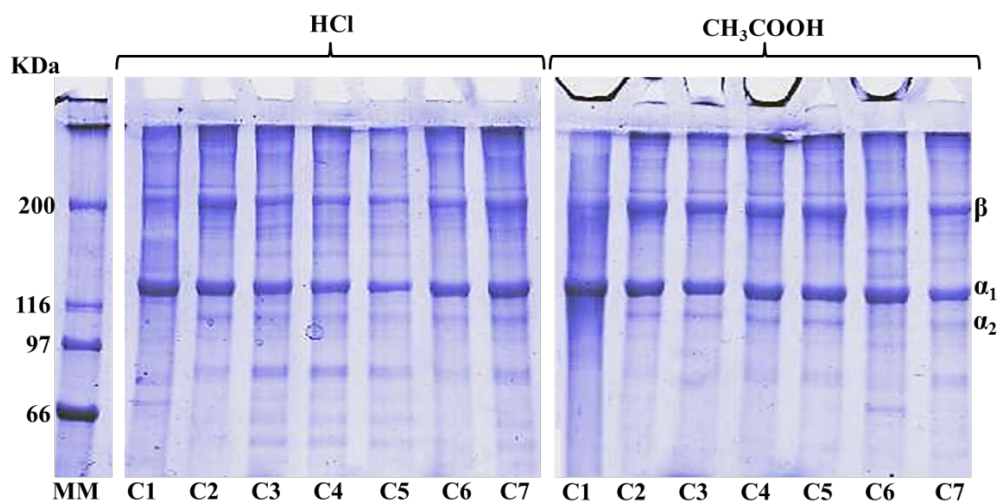


Figura 8. Perfil electroforético SDS-PAGE de gelatinas obtenidas con los ácidos evluados.

C1: 0.01, C2:0.025, C3:0.05, C4:0.075, C5:0.1, C6: 0.15, C7:0.2 M; MM: Marcador molecular. α (1 y 2) y β representan cadenas de gelatina.

(Schrieber y Gareis, 2007; Haug y Draget, 2009; Karim y Bhat, 2009). Se puede observar que los tratamientos con HCl presentaron, además de las mencionadas bandas, otras de menor masa molecular, en especial cuando se utilizó concentraciones mayores a 0.05M (de C3 a C7). La utilización de HCl para la extracción de gelatina promovió un mayor grado de hidrólisis de la molécula de colágeno obteniéndose péptidos de muy variado y menor peso molecular (84, 72, 65, 57 kDa).

Otra diferencia sobresaliente entre ambos pretratamientos, es la nitidez de la banda localizada a 100 kDa, presentando mayor intensidad en los pretratamientos con CH₃COOH, indicándonos una mayor producción de la misma durante el proceso de extracción. Lo mismo sucedió con la banda de 125 kDa (α_1) cuando se utilizó 0.15M del mismo ácido. Se conoce que las cadenas α juegan un papel de gran importancia para la formación de geles rígidos. De acuerdo a Schrieber y Gareis (2007) la FG está estrechamente relacionada con la proporción de fragmentos con masa molecular aproximada a 100 kDa; además se ha observado una fuerte correlación entre la FG y el contenido de cadenas α . A mayor contenido de cadenas α mayor FG, lo que explica la mayor FG encontrada para este pretratamiento, CH₃COOH 0.15 M. De la misma manera, la distribución de pesos moleculares, así como el contenido de aminoácidos en las cadenas producidas y las cadenas α/β presentes en la solución coloidal son un factor importante en otras características como viscosidad y temperatura de gelificación, entre otras (Cho *et al.*, 2006).

Optimización del Proceso de Extracción de Gelatina

Rendimiento de la Extracción, Fuerza de Gel y Viscosidad de Gelatina a Partir de Piel de Raya (*Dasyatis brevis*)

En la tabla 3 se muestra los valores obtenidos de las tres variables de respuesta evaluadas, el rendimiento de extracción (RD), fuerza de gel (FG) y viscosidad (V) de la gelatina resultante para las distintas corridas experimentales, los tratamientos con menor RD fueron el 1, 9 y 13 obteniendo valores de 12.0, 12.1 y 12.5%, respectivamente. Por el contrario, los tratamientos 6 y 11 fueron los de mayor rendimiento con 15.5 y 15.1%.

Tabla 3. Corridas experimentales para el diseño compuesto rotacional (2^3) y variables de respuesta obtenidas.

T	Variable independiente			Variable de respuesta		
	X ₁	X ₂	X ₃	RD	FG	V
1	-1	-1	-1	12.5	651	10.4
2	-1	-1	1	14.9	653	9.5
3	-1	1	-1	12.9	668	9.5
4	-1	1	1	12.7	675	12.2
5	1	-1	-1	13.0	666	9.2
6	1	-1	1	15.5	412	5.9
7	1	1	-1	14.4	668	8.2
8	1	1	1	14.5	606	6.8
9	$-\alpha$	0	0	12.0	661	11.9
10	α	0	0	14.9	651	7.5
11	0	$-\alpha$	0	15.1	625	9.3
12	0	α	0	14.1	646	7.4
13	0	0	$-\alpha$	12.1	875	8.9
14	0	0	α	14.1	606	7.1
15	0	0	0	13.8	626	8.3
16	0	0	0	13.8	682	9.1
17	0	0	0	13.6	658	9.1
18	0	0	0	13.7	650	9.1

T: tratamiento; X₁: Concentración del ácido, X₂: tiempo de pretratamiento, X₃: tiempo de extracción; RD: rendimiento, FG: fuerza de gel, V: viscosidad.

El de mayor RD se obtuvo a partir de un pretratamiento de 3 h con ácido acético 0.2 M por un tiempo de extracción de 12 h.

Se observó la tendencia de que a mayor concentración ácida y tiempos prolongados de extracción se obtiene una mayor producción de gelatina, mientras que, a menor concentración ácida (tratamiento 9) y corto periodo de extracción (tratamiento 13) los rendimientos disminuyen. Este mismo comportamiento ha sido reportado por diversos estudios (Zhou y Regenstein, 2004; Kasankala et al., 2007; Boran y Regenstein, 2009; Wangtueai y Noomhorm, 2009; Mohtar et al., 2010; Tabarestani et al., 2010), en los cuales se ha observado que el rendimiento del proceso de extracción aumenta en relación al incremento de la concentración ácida y el tiempo de extracción. Esta tendencia pudiera estar relacionada al hinchamiento que sufre la materia prima debido a la desestabilización de enlaces covalentes y no covalentes en el colágeno, durante el pretratamiento con ácido, mientras que, el tiempo de extracción favoreció a que las cadenas desestabilizadas pudieran desdoblarse y con ello, mayor capacidad para disolverse en agua caliente (Gómez-Guillén y Montero, 2001).

También, se observa una FG de 412 ± 8 g en el tratamiento 6 (T6, tabla 3), mientras que el tratamiento 13 duplicó esta cantidad alcanzando 875 ± 10 g; cabe señalar que T6 fue el que produjo mayor RD. Por lo tanto, este efecto pudiera deberse al largo tiempo de extracción y a la concentración ácida elevada, a la cual fue expuesta la piel de raya arenera (*Dasyatis brevis*), esta combinación de factores pudo haber ocasionado y/o promovido la formación de fragmentos de cadenas α y cadenas de muy bajo peso molecular, lo que implicaría menor fuerza de gel (Schrieber y Gareis, 2007; Boran y Regenstein, 2010), proceso muy viable en este estudio. El mismo comportamiento se ha reportado en diversas investigaciones (Zhou y Regenstein, 2004; Boran y Regenstein, 2009; Wangtueai y Noomhorm, 2009; Tabarestani et al., 2010), en las cuales se han observado que tratamientos con mayor rendimiento la FG se ve inversamente afectada. Por el contrario, menor concentración ácida y tiempos cortos de extracción conserva las condiciones necesarias para que la hidrólisis sea mas uniforme, promoviendo la obtención de cadenas α libres, la cual, favorece a la formación de geles mas rígidos (Schrieber y Gareis, 2007; Boran y Regenstein, 2010), tal y como se observó con el tratamiento 13.

Además, si fueran eliminados los resultados de FG mas afectados, es decir los tratamientos 6 y 13 de la tabla 3, se obtendría con ello una media global de 650 ± 22.85 g con los tratamientos restantes. Este comportamiento pudiera deberse a la modificación del pH de la gelatina durante la preparación de la misma, el cual fue ajustado (6.2 ± 0.1) en todos los tratamientos antes de su medición. En un estudio realizado por Gudmundsson y Hafsteinsson (1997), presentaron un comportamiento muy similar en gelatinas a partir de piel de bacalao, ellos midieron la FG con y sin el ajuste de pH 6.0, en el cual observaron que la FG era mucho mayor y valores más uniformes en geles donde el pH había sido ajustado, atribuyéndole este efecto al pI de las gelatinas de pescado que se encuentran en intervalo de entre 6 y 9.

Por otra parte, la viscosidad (V) es la segunda características de la gelatina de mayor importancia a nivel industrial. En la tabla 3, se observa que T6 fue el de menor viscosidad (5.9 mPa) y T4 fue el de mayor viscosidad (12.2). El resultado en T6 era de esperarse, ya que fue el tratamiento en el que se obtuvo mayor RD y menor FG, provocado posiblemente por la desnaturalización desmedida del colágeno, generando cadenas de muy bajo peso molecular. Boran y Regenstein (2009) observaron resultados muy parecidos en gelatinas a partir de piel de carpa plateada, ellos obtuvieron valores de 2.1 a 13.9 cP (1cP = 1mPa), además sus tratamientos con FG débil fueron también aquellos que mostraron menor viscosidad. Así, la viscosidad de las gelatinas se ve favorecida con cadenas de alto peso molecular, mientras mas grande sea ésta la viscosidad será mayor, aunque esto no significa que la FG también aumente (Boran y Regenstein, 2010).

Efecto de los Factores en el Rendimiento de Extracción, FG y V de Gelatina a Partir de Piel de Raya

Los coeficientes de regresión de los modelos obtenidos para los términos lineales (X_1 , X_2 y X_3), cuadráticos (X_1^2 , X_2^2 , X_3^2) e interacciones, junto con sus probabilidades respectivas para cada una de las variables de respuesta se muestran en la Tabla 4. También se muestran los coeficientes de determinación (R^2) de cada modelo, que indican que tanto de la variación total de la variable respuesta es explicada por el modelo

Tabla 4. Modelos de predicción estimados por MSR para rendimiento, fuerza de gel y viscosidad de la gelatina extraída de piel de raya (*Dasyatis brevis*).

Variable Respuesta*	R ²	Modelo predictivo									
		β_0	$\beta_1 X_1$	$\beta_2 X_2$	$\beta_3 X_3$	$\beta_1^2 X_1^2$	$\beta_2^2 X_2^2$	$\beta_3^2 X_3^2$	$\beta_{12} X_1 X_2$	$\beta_{13} X_1 X_3$	$B_{23} X_2 X_3$
RD	0.97	13.636	0.679	-0.226	0.598	--	0.344	-0.186	0.275	--	-0.625
		<.0001	<.0001	0.0046	<.0001	--	0.0003	0.0145	0.0069	--	<.0001
FG	0.75	644.811	-22.832	19.794	-55.606	--	-15.911	21.212	19.625	-40.625	24.625
		<.0001	0.165	0.223	0.0051	--	0.327	0.200	0.346	0.070	0.244
V	0.85	8.856	-1.384	-0.109	-0.434	--	--	--	--	-0.813	0.688
		<.0001	<.0001	0.605	0.057	--	--	--	--	0.0107	0.0252

* En el primer renglón de cada variable respuesta se muestran los coeficientes de regresión obtenidos, mientras que el segundo renglón indica su nivel de probabilidad asociada.

β_i = coeficientes de regresión. R² indica el nivel de la varianza total de la variable respuesta explicada por el modelo predictivo.

RD: rendimiento, FG: fuerza de gel, V: viscosidad.

X₁: Concentración del ácido, X₂: tiempo de pretratamiento, X₃: tiempo de extracción.

matemático ajustado (Montgomery, 2003). En el primer ajuste de los datos de las tres variables respuesta al modelo predictivo completo, no fue posible predecir su comportamiento de manera significativa mediante todos sus términos. Lo cual fue observado a través de las probabilidades de cada término y la falta de ajuste del modelo (la cual, mide la incapacidad del modelo para representar los datos en el dominio experimental). Por lo que fue necesario buscar un modelo reducido que explicara los datos de una mejor manera, mediante la eliminación de aquellos términos del modelo con menor contribución probabilística, a fin de mejorar o mantener la R^2 obtenida con el modelo completo y que la falta de ajuste fuera no significativa. En base a lo anterior, quedaron los modelos reducidos que se muestran a detalle en la tabla 4 y en su forma algebraica en las siguientes ecuaciones:

$$RD = 13.6 + 0.67X_1 - 0.23X_2 + 0.59X_3 + 0.34X_2^2 - 0.17X_3^2 + 0.28X_1X_2 - 0.63X_2X_3 \quad (\text{Ec. 1})$$

$$FG = 644.8 - 22.8X_1 + 19.8X_2 - 55.6X_3 - 15.9X_2^2 + 21.2X_3^2 + 19.6X_1X_2 - 40.6X_1X_3 + 24.6X_2X_3 \quad (\text{Ec. 2})$$

$$V = 8.85 - 1.38X_1 - 0.11X_2 - 0.43X_3 - 0.81X_1X_3 - 0.68X_2X_3 \quad (\text{Ec. 3})$$

Los valores experimentales obtenidos para la variable RD se encuentran en un intervalo de 12.0 hasta 15.5% (Tabla 3). El coeficiente β_0 y los tres factores en su forma lineal, cuadrática y la interacción entre ellos fueron significativos ($P \leq 0.05$), excepto los términos X_1^2 y la interacción X_1X_3 (tabla 4). Así, el modelo reducido (Ec. 1) explica el 97.4% de la variabilidad de los datos (R^2). En la figura 9, mediante una grafica en 3D, se puede apreciar el efecto de los tres factores sobre RD. Además, se puede observar la gráfica de contornos para cada una de las variables respuesta. Tomando en cuenta el modelo reducido expuesto anteriormente y la grafica de contornos (se observa en línea roja) en la superficie de respuesta resultante para las variables X_1 y X_2 , produjo una gráfica denominada “de cresta ascendente” en la superficie proyectada. A este tipo de superficie se la ha observado especialmente cuando hay combinación de valores negativos y positivos en el modelo. De igual forma, la superficie obtenida a partir de los factores X_2 y X_3 , fue una gráfica típica de “silla de montar” (saddle point, en inglés) en

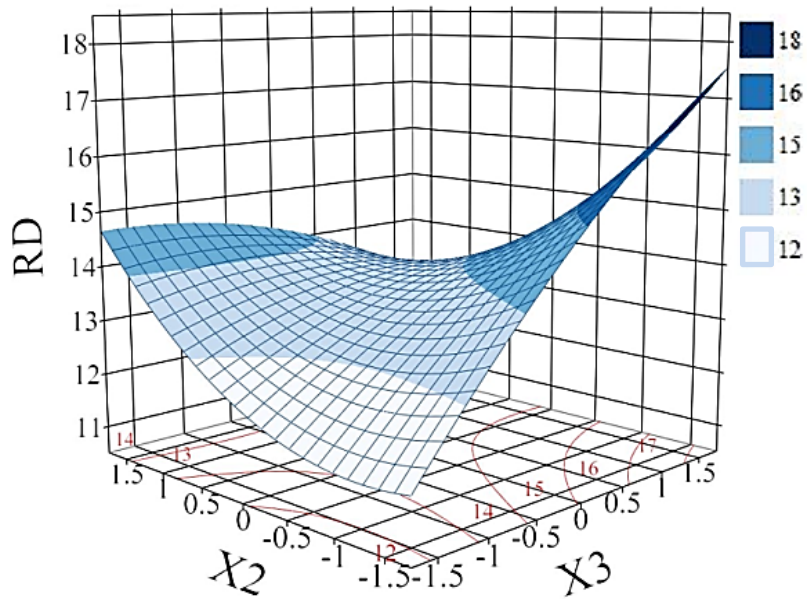
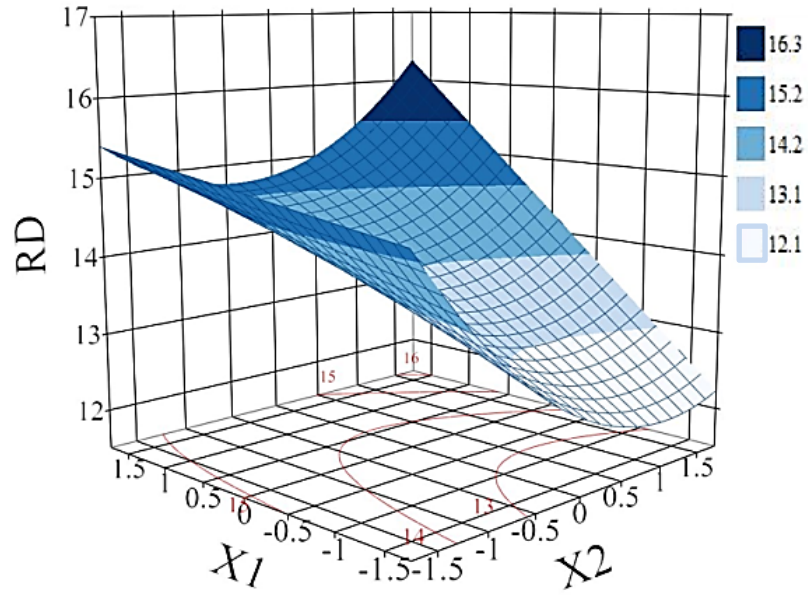


Figura 9. Gráfica de superficie de respuesta y de contornos, para rendimiento (RD).
 X_1 : Concentración de ácido; X_2 : tiempo de pretratamiento ácido;
 X_3 : tiempo de extracción.

donde se observa que, la variable RD aumenta o disminuye a partir del centro de la superficie, según la dirección tomada (Montgomery, 2003).

No obstante, se hubiera esperado que tanto las graficas de proyección y el modelo ajustado, presentaran una superficie de respuesta de tipo máximo; tecnológicamente el RD de la extracción es de gran importancia económica. Sin embargo, no obtuvimos el comportamiento deseado y pudiera recaer principalmente en el procedimiento previo a la optimización (independiente al tipo ácido). Ya que en otros estudios (Zhou y Regenstein, 2004; Yang et al., 2007; Boran y Regenstein, 2009) previo a la optimización del proceso, se llevó a cabo un esbozo más amplio mediante diseños factoriales fraccionados, obteniendo con ello superficies de respuesta máxima. Aunque, en dichos estudios algunas propiedades de importancia de la gelatina como FG y V (principalmente), se vieron afectadas de forma negativa al obtener mayor RD.

Durante la medición de FG se observaron valores experimentales dentro de un intervalo de 412 ± 8 a 875 ± 10 g (Tabla 3). En la tabla 4 se visualiza que esta variable tan solo se vio afectada por el coeficiente β_0 y la forma lineal de X_3 (tiempo de extracción). Además, se logró observar una decremento sobre el parámetro R^2 durante la eliminación de términos no significativos, por lo que se redujo hasta obtener la falta de ajuste $P > 0.05$ (Ec. 2), el cual se obtuvo con la eliminación del término X_2^2 y que explica el 75% de la variación de los resultados. Aunque, cabe señalar que valores altos de R^2 , no implica necesariamente el mejor modelo. Montgomery (2003) señala que modelos ajustados de optimización se recomienda que el estadístico R_{aj}^2 (coeficiente de determinación ajustado) explique al menos el 70%, sí este fuera menor se adoptaría como mejor tratamiento el de valores más altos en el análisis de las graficas de efectos (figura 10). Se obtuvo una R_{aj}^2 para el modelo ajustado de 0.54, lo cual explicaría el 54% del comportamiento de la variable respuesta (FG). Las proyecciones en 3D para esta variable de respuesta se aprecian en la figura 10, en ella se aprecia claramente un punto máximo al reducir los niveles de X_1 y X_2 (parte superior), de igual forma, mayor FG al reducir los niveles de X_3 y X_2 (parte inferior).

Respecto a los resultados de viscosidad (V), éstos se observaron dentro de un intervalo de 5.9 a 12.2 mPa·s; el coeficiente β_0 , la forma lineal de X_1 y X_3 y la interacción X_1X_3 y X_2X_3 significativos para el modelo (Ec. 3). Al igual que la variable

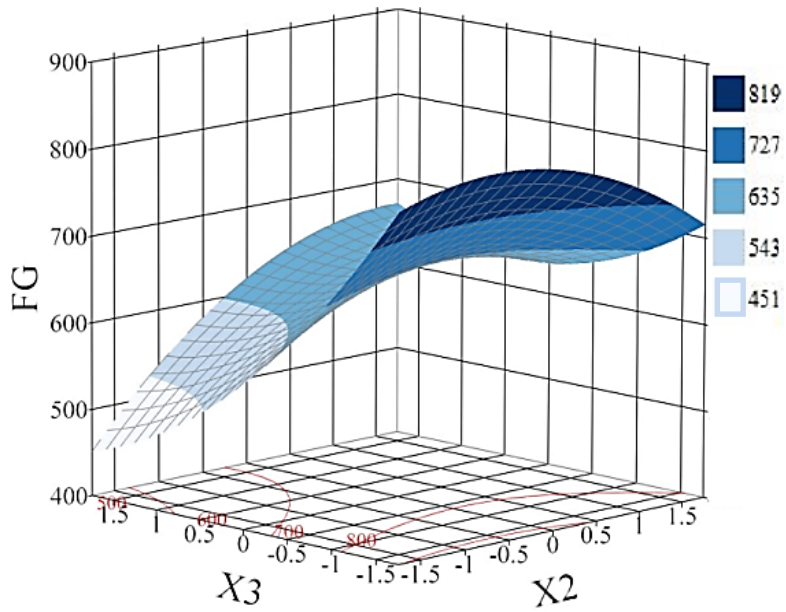
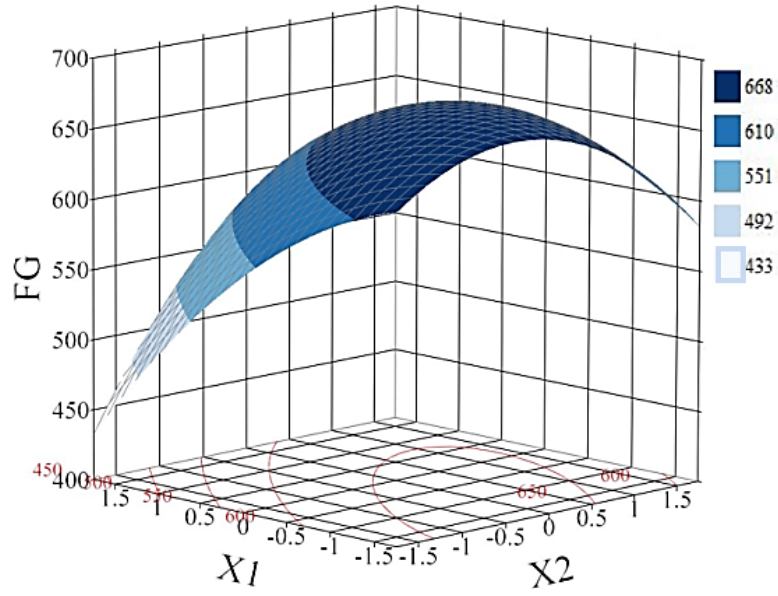


Figura 10. Gráfica de superficie de respuesta y de contornos, para fuerza de gel (FG).

X₁: Concentración de ácido; X₂: tiempo de pretratamiento ácido;
 X₃: tiempo de extracción.

FG el modelo reducido provocó un descenso en el valor de R^2 inicial (de 0.92 a 0.85), lo que pudiera recaer en el número de factores que influyen sobre el modelo reducido, a mayor número de factores significativos el parámetro R^2 aumentará (Montgomery, 2003; Baş y Boyacı, 2007), el estadístico R_{aj}^2 para este modelo fue de 0.78, lo que explicaría el 78% el comportamiento de V y la prueba de falta de ajuste no fue significativo ($P > 0.05$). La superficie de respuesta obtenida bajo el modelo reducido, se puede observar en la figura 11. La superficie proyectada muestra un punto de silla con cresta ascendente al aumentar X_3 (tiempo de pretratamiento) mientras X_1 disminuye; mientras que la interacción de X_2 y X_3 (figura 11, inferior), se observan crestas ascendentes en los límites máximos y mínimos de estas variables.

Respuesta Óptima

La respuesta óptima de las variables respuesta (RD, FG y V) se encontraron en diferentes niveles de cada factor de estudio; debido a esto, se tuvo que seleccionar en base al perfil de predicción (figura 12), los niveles que maximizaran las variables respuesta. En la figura 12 las líneas verticales y horizontales en rojo (punteada) indican las condiciones óptimas (valor señalado en rojo), la curva y/o recta (línea negra) y las líneas azules (punteadas) indican la media y desviación estándar para cada variable de respuesta. El perfil de predicción para RD, se observó que el aumento de X_1 , la reducción de X_2 y el incremento de X_3 , poseen una tendencia a incrementar esta variable. Por otra parte, la FG acercándole al extremo mínimo de X_1 , X_2 y X_3 pudieran obtenerse mayor rigidez en los geles, al igual que una viscosidad alta (V). Tomando en consideración lo anterior, se obtuvo valores predictivos de las variables RD, FG y V (el modelo utilizado para la verificación de estas dos últimas fue el mismo). De esta manera, se encontró para RD un perfil predictivo de $15.65 \pm 0.37\%$ a una concentración ácida de 0.2 M, 180 min de tiempo de pretratamiento ácido y 12 h de extracción. Mientras que la máxima FG (713 ± 91 g) y viscosidad elevada (10.48 ± 1.08) se encontró en una concentración ácida de 0.1 M por 200 min y un tiempo de extracción de 6 horas.

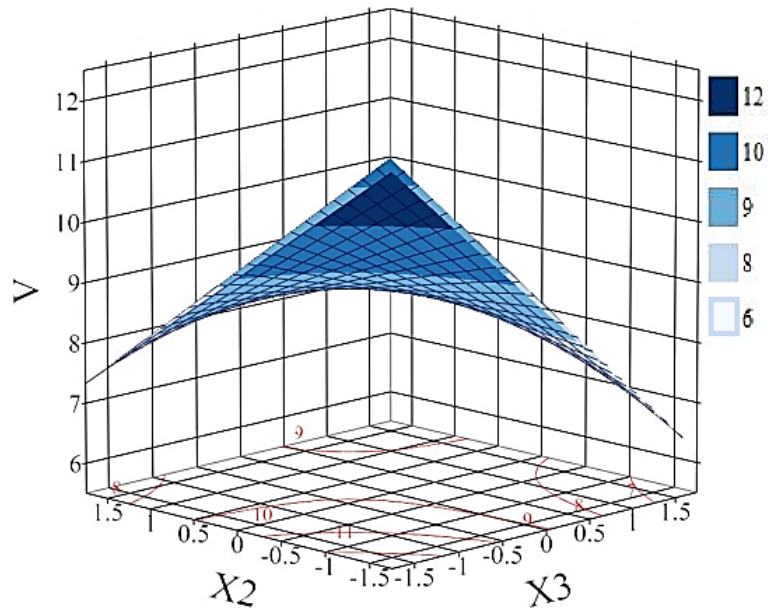
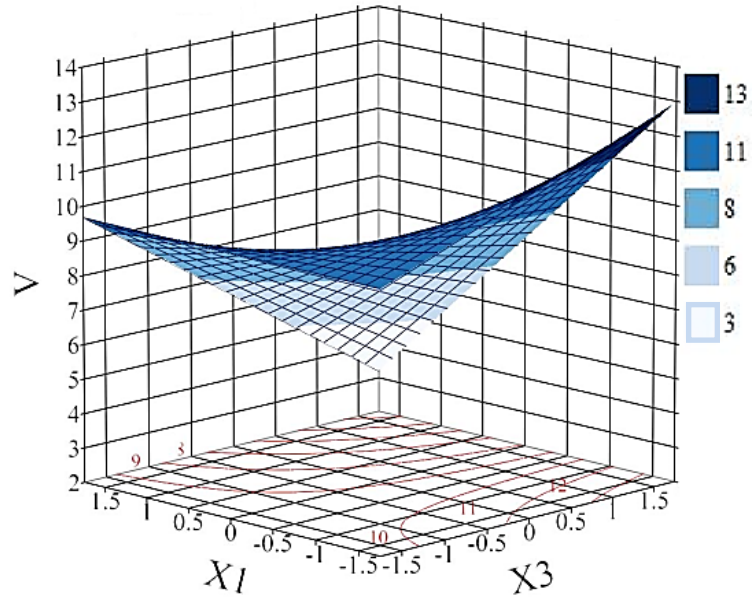


Figura 11. Gráfica de superficie de respuesta y de contornos, para viscosidad (V).

X₁: Concentración de ácido; X₂: tiempo de pretratamiento ácido; X₃: tiempo de extracción.

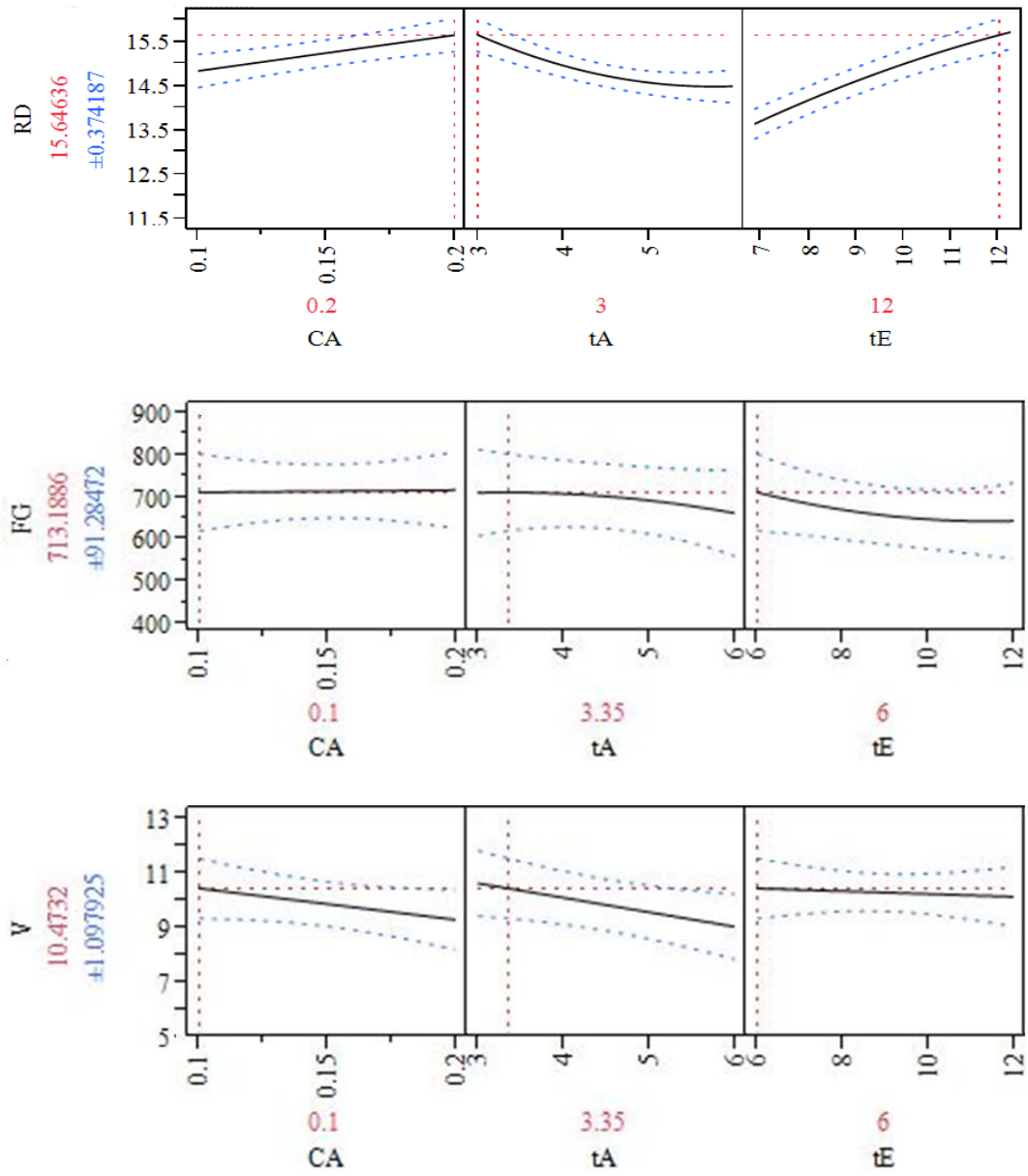


Figura 12. Perfiles de predicción de respuesta óptima.

CA: concentración ácida, tA: tiempo de pretratamiento ácido y tE: tiempo de extracción. Las líneas verticales y horizontales en rojo indican la solución óptima para los factores (valor señalado en rojo por debajo de las figuras).

Validación del Modelo Predictivo

Para comprobar la validez de los modelos de predicción obtenidos en la sección anterior, se realizaron dos extracciones diferentes: una con la finalidad de verificar el modelo obtenido con la variable de respuesta rendimiento (RD), y otra para el caso de fuerza de gel (FG) (ambas por duplicado). En el primer modelo se obtuvo un rendimiento de $16.29 \pm 0.14\%$, mientras que para el segundo se obtuvo una FG de 633 ± 6.8 g (Tabla 5). Además, a ésta misma muestra se midió viscosidad, ya que el mismo modelo predictivo arrojaba una mayor viscosidad, obteniéndose una viscosidad experimental de 10.6 ± 2.5 (Tabla 5). La verificación del modelo para las variables respuesta (RD, FG y V) se llevó a cabo mediante una prueba de “t” pareada a un nivel de significancia de $P \leq 0.05$. En la tabla 5 se puede observar que no existe ninguna diferencia ($P > 0.05$) entre el valor obtenido experimentalmente y el predicho por los modelos, lo que nos conduce a decir que las condiciones óptimas obtenidas son las adecuadas para alcanzar mayor rendimiento (por un modelo) y fuerza de gel y viscosidad elevados (para el otro modelo).

En estudios realizados por Tabarestani et al. (2010), durante el proceso de extracción de gelatina a partir de piel de trucha arcoíris (*Onchorhynchus mykiss*), observaron que la concentración de NaOH juega un papel trascendental sobre la viscosidad, en comparación con otros factores. Además, observaron un efecto sinérgico entre la concentración de la solución alcalina y la de ácido acético. Este mismo fenómeno pudiera explicar los resultados obtenidos en el presente estudio, ya que ambos tratamientos (modelos predictivos) utilizaron soluciones (NaOH-CH₃COOH) que permitieron la formación de cadenas de alto peso molecular obteniendo una gelatina de fuerza de gel y viscosidad alta. Los resultados indicaron una mayor fuerza de gel en gelatina a partir de raya arenosa en comparación con la de piel de bovino ($P \leq 0.05$), no obteniéndose diferencia significativa ($P > 0.05$) en lo que respecta a viscosidad (tabla 5).

Tabla 5. Valores experimentales (Exp) y predichos (Pre) del modelo.

Variables de respuesta	VALORES		Control
	Pre	Exp	
RD (%)	15.7±0.4 ^a	16.3±0.1 ^a	--
FG (g)	713.2±91.6 ^a	633.0±6.8 ^a	556.0±13.0 ^b
V (mPa·s)	10.5±1.1 ^a	10.6±2.5 ^a	13.7±5.2 ^a

RD = Rendimiento; FG = Fuerza de gel; V = Viscosidad. Diferente literal en la misma fila indica diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

Caracterización Parcial de la Gelatina Optimizada

La caracterización parcial de ambos modelos de regresión consistió en evaluar algunas propiedades de la gelatina obtenida y observar las posibles diferencias que en ellas pudieran existir tanto en su fisicoquímica como en su reología.

Análisis de perfil de textura (APT)

Los resultados de APT se resumen en la figura 13. En la misma se puede observar que los modelos predictivos mostraron mayor dureza en la gelatina de raya que el control (bovina). Como se esperaba, el modelo predictivo para obtener una fuerza de gel elevada (T2 en figura 13) resultó con el valor más alto de dureza. Sin embargo, el análisis estadístico no mostró ninguna diferencia significativa ($P>0.05$) entre tratamientos y el control. El comparar los resultados con estudios similares resulta difícil debido a las diferentes condiciones, dimensiones tanto de la preparación y el tiempo de maduración, principalmente. Un estudio realizado por Boran et al. (2010b), en el cual se analizaron gelatinas de carpa plateada (*Hypophthalmichthys molitrix*) con alta y baja fuerza de gel y viscosidad, observaron mayor dureza en gelatinas con alta fuerza de gel y mayor viscosidad en comparación con las de menor fuerza de gel y viscosidad baja, similar a los resultados obtenidos en este estudio.

Respecto a la cohesividad de las gelatinas obtenidas por los dos modelos predictivos y el control, ésta se encontró entre un rango de 0.6 y 0.7, no mostrando diferencias significativas ($P>0.05$) entre ellas. A pesar de esto, se observó que los dos modelos predictivos mostraron tendencias más altas en este parámetro (figura 13).

En relación a la gomosidad ésta, al igual que los otros parámetros medidos, no presentó diferencia significativa ($P>0.05$) entre los tratamientos y el control. En un estudio realizado por Boran et al. (2010a) donde midieron el APT de diferentes tipos de gelatina de diferentes fuentes, incluyendo la obtenida a partir de piel de carpa plateada, observaron que la gelatina de porcino y de bovino fueron las de mayor dureza, mientras que las de porcino y de carpa plateada resultaron con mayor gomosidad. La diferencia entre los resultados del presente estudio con el de Boran *et al.* (2010a) recaen en que las

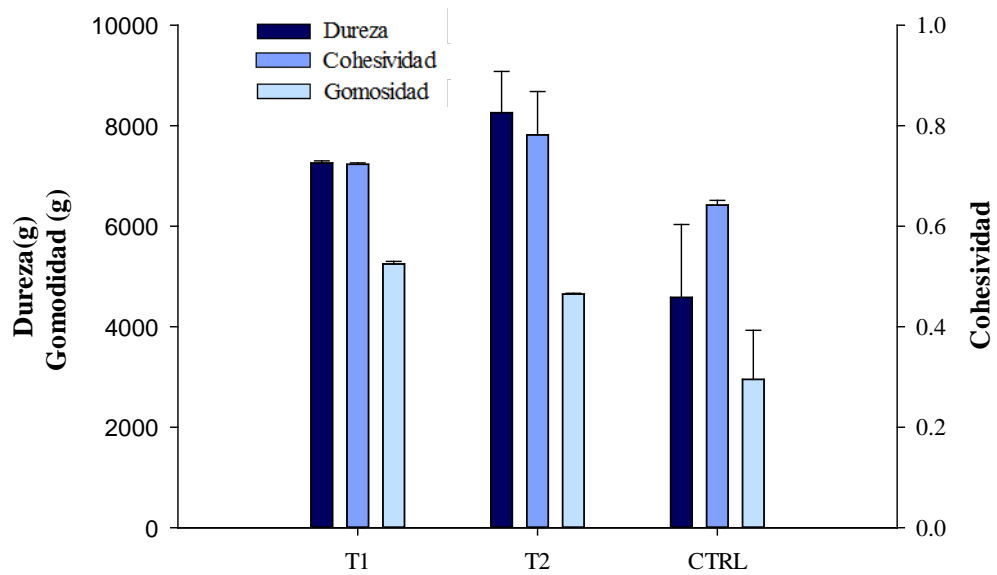


Figura 13. Análisis de Perfil de Textura (APT) de gelatinas a partir de piel de raya arenera (*Dasyatis brevis*)

T1= gelatina obtenida por el modelo predictivo para RD y T2= gelatina obtenida por el modelo predictivo para FG. CTRL= Control, gelatina comercial de bovino.

propiedades viscoelásticas de la gelatina no solo dependen del tipo de extracción, preparación y/o composición, sino también de las características de la especie (edad, talla sexo, temporada de captura, etc.) (Binsi et al., 2009; Karim y Bhat, 2009).

Perfil electroforético

El perfil electroforético de los productos obtenidos a partir de los modelos predictivos se muestran en la figura 14. En ella se pueden observar cadenas de alto peso molecular (entre 123 y 212 kDa) y otras de bajo peso molecular (entre 80 y 45 kDa) en ambas gelatinas. La principal diferencia entre ellas recae en la intensidad de las bandas electroforéticas de alto peso molecular, presentando mayor intensidad en las bandas de la gelatina obtenida por el modelo predictivo para FG (T2) en contraste con la gelatina obtenida por el modelo predictivo para RD (T1). Estas bandas corresponden a cadenas α (aprox. 100 kDa) y β (aprox. 200 kDa) que presentan las gelatinas y quienes le dan las características a las mismas.

De acuerdo con otros autores (Regenstein y Zhou, 2007; Haug y Draget, 2009; Boran y Regenstein, 2010; Tabarestani et al., 2010), el contenido y/o formación de cadenas α y β en la gelatina giran en base al proceso de extracción (en especial el pretratamiento alcalino-ácido: temperatura, concentración y tiempo de permanencia en las soluciones), en el tiempo y temperatura de extracción y, una vez extraída la gelatina, de otros factores como la preparación y temperatura de solubilización de la misma. Las temperaturas comúnmente utilizadas para la extracción se encuentran en un intervalo de entre 45 y 60 °C. Por otra parte, la gelatina resultante a partir de temperaturas inferiores a 60 °C y periodos cortos de extracción, promueven un menor rendimiento pero un producto de gran calidad, es decir, promueven la formación de cadenas específicas que favorecen con ello interacciones que terminan en una mayor firmeza y de mayor viscosidad en la gelatina (Boran y Regenstein, 2010). Tal y como se ha observado en el presente estudio y apoyados en el perfil electroforético, la figura 14 muestra que la mayor concentración de cadenas α y β se obtuvieron al emplear una menor concentración de solución ácida (0.1 M) y corto tiempo de extracción (6 h) (condiciones de T2), aumentando su capacidad para formar geles mas rígidos y compactos,

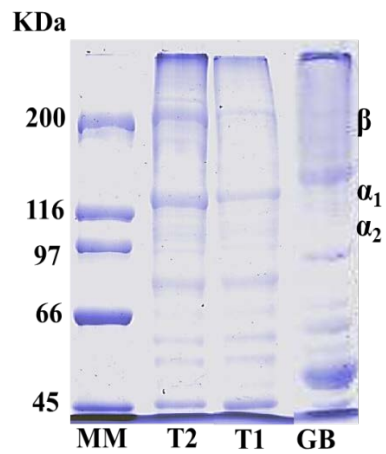


Figura 14. Perfil electroforético SDS-PAGE de gelatinas.

T1= gelatina obtenida por el modelo predictivo para RD y T2= gelatina obtenida por el modelo predictivo para FG. MM= Marcador molecular, GB= gelatina de bovino comercial, Control. α (1 y 2) y β representan cadenas de gelatina.

además de presentar la mayor viscosidad. Por otra parte, la utilización de concentraciones elevadas de ácido (0.2 M) y tiempo prolongado de extracción (12 h) promovieron una mayor degradación del colágeno dando como resultado fragmentos peptídicos de menor masa molecular (condiciones de T1). De acuerdo a diversos autores (Badii y Howell, 2006; Schrieber y Gareis, 2007; Tabarestani et al., 2010), gelatinas con una distribución de fragmentos de alto peso molecular (entre 100 y 150 kDa) presentan mejores propiedades de gelificación, ya que permiten una mejor organización y estabilización de las interacciones moleculares para formar una red tridimensional más firme, en comparación con gelatinas que contengan mayor cantidad de fragmentos de bajo peso molecular. Por otro lado, los fragmentos de alto peso molecular (entre 150-300 kDa) favorecen ampliamente a la viscosidad, lo cual verifica los resultados obtenidos. Respecto al control, se observó un barrido en bandas de alto peso molecular, lo que indicaría fragmentos de peso molecular variable, además de una banda de aproximadamente 50 kDa de mayor intensidad, lo que pudiera explicar su menor fuerza de gel. Como se ha mencionado con anterioridad, las características de mayor importancia para la gelatina a nivel industrial (en especial la alimenticia) son: en primer lugar la fuerza de gel y en segundo la viscosidad. Ambas están estrechamente relacionadas con las complejas interacciones intra- e intermoleculares y determinadas por su composición de aminoácidos, así como la cantidad de componentes α y β presentes.

Calorimetría diferencial de barrido

La principal diferencia entre la gelatina proveniente de mamíferos terrestres con respecto a la de pescado se encuentra principalmente en las temperaturas de fusión (T_f) y gelatinización (T_g), siendo éstas más bajas en la gelatina proveniente de pescado. Se han observado que las gelatinas de bovino y porcino tienen T_f y T_g en intervalos de temperatura de 28 a 31 °C y de 20 a 25 °C, respectivamente, mientras que para gelatinas de especies marinas, éstas se encuentran de 11 a 29 °C y de 8 a 25 °C, respectivamente. El amplio rango de temperaturas encontradas en especies marinas recae principalmente en el origen de la materia prima utilizada, siendo las especies de aguas tropicales las que

presentan mayor temperatura de gelatinización y fusión (Regenstein y Zhou, 2007; Karim y Bhat, 2009).

Los estudios de calorimetría diferencial de barrido dan un indicio de la estabilidad térmica de la estructura del gel. Los resultados obtenidos de este análisis se pueden apreciar en la tabla 6. En ella se puede observar la temperatura de gelatinización (T_g), temperatura de fusión (T_f) y el cambio de entalpia (ΔH , J/g de solución de gelatina al 6.67%). La entalpía refleja la cantidad de energía necesaria para provocar un estado de transición, encontrándose relacionada al número de zonas de unión que se ven involucradas durante las diferentes transiciones térmicas. Como se observa, no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) en lo que respecta a las temperaturas de transición entre tratamientos pero sí con el control ($P \leq 0.05$). Sin embargo, se puede observar que el tratamiento que requirió, tanto de mayor energía como de temperatura para desdoblarse las interacciones formadas (T_f y ΔH) fue el T2 (modelo predictivo para mejorar la FG), mismo tratamiento que mostró mejores propiedades reológicas (FG, APT, entre otros). En un estudio realizado por Al-Saidi et al. (2011) a partir de piel de *Lethrinus microdon* en el cual evaluaron el efecto de diferentes temperaturas de extracción y concentración de ácido acético sobre la temperatura de fusión, observaron que a mayor temperatura de extracción y concentración ácida, la temperatura de fusión se vio inversamente afectada. Aunque el presente estudio no mostró cambios en la temperatura de extracción, sí lo hizo en el tiempo de extracción ($T1 = 12$ h; $T2 = 6$ h) y en la concentración de ácido utilizado ($T1 = 0.2$ M; $T2 = 0.1$ M), observándose un comportamiento similar al expuesto por Al-Saidi et al. (2011). Se puede concluir que a mayor tiempo de extracción y concentración de ácido utilizado, hay formación de cadenas de bajo peso molecular, las cuales a su vez afectan la formación del gel, requiriendo de una menor temperatura de fusión y por consiguiente de la energía (ΔH) necesaria para fundir dicho gel.

Tabla 6. Temperaturas de transición y entalpías de gelatinas mediante calorimetría diferencial de barrido.

Tratamiento	T _g	Δ _f H (J/g)	T _f
T1	23.1±1.0 ^a	4.2±0.4 ^a	30.6±0.7 ^{ab}
T2	23.2±0.9 ^a	5.2±0.5 ^a	30.9±0.6 ^a
CTRL	25.0±0.4 ^a	2.3±0.4 ^b	28.0±2.5 ^b

T1= gelatina obtenida por el modelo predictivo para RD T2= gelatina obtenida por el modelo predictivo para FG. CTRL=Control de gelatina comercial de bovino. T_g = temperatura de gelatinización, °C; T_f = temperatura de fusión, °C; Δ_fH = entalpia de fusión, J/g. Diferente literal en la misma columna indica diferencias significativas (P≤0.05).

Reología dinámica de baja deformación (RDBD)

La formación del gel a partir de gelatinas de raya arenera (*Dasyatis brevis*) fue analizada mediante reología dinámica de baja deformación. La figura 15A muestra el desarrollo de los módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G'') sometidas a un proceso de enfriamiento-calentamiento. Se ha reportado que un incremento en el módulo (G') de almacenamiento en gelatinas de pescado corresponden a un incremento en la concentración de estructuras triple hélice formadas durante el proceso de gelificación (Chiou et al., 2006). Las tres gelatinas evaluadas mostraron un comportamiento muy similar de G' y G'' durante el enfriamiento y calentamiento (de 40 a 5 °C y viceversa). Por otro lado, se observa que el tratamiento que obtuvo mayor fuerza gel (T2) es el que presentó mayor módulo de almacenamiento (G' , es decir, más elástico), y un menor módulo de pérdida (G''), seguido del tratamiento de modelo predictivo para obtener un mayor rendimiento (T1) y del control (gelatina de bovino comercial). Comportamientos similares fueron reportados por diversos autores (Choi y Regenstein, 2000; Gómez-Guillén et al., 2002; Chiou et al., 2006; Cheow et al., 2007; Liu et al., 2008; Binsi et al., 2009; Boran et al., 2010a) en gelatinas de piel de diferentes especies marinas, atribuyendo este efecto (mayor elasticidad) al amplio contenido de cadenas α para la formación de geles más firmes y estables, como el mostrado por el modelo predictivo FG (T2).

En la figura 15B se observan los espectros mecánicos de los geles formados. En éstos se observa un comportamiento típico de un gel con valores de G' lineales e independientes de la frecuencia de deformación y valores G'' menores y dependientes de la frecuencia. Este comportamiento es similar a lo reportado por otros autores (Cheow et al., 2007; Boran et al., 2010a) indicando que bajo estas condiciones los geles son fuertes y estables contra la velocidad de cizalla, similar a lo observado en el presente estudio.

Como se comentó en la sección de Materiales y Métodos, con este tipo de análisis también se puede obtener tanto la temperatura de fusión (T_f) como de gelificación (T_g) de las gelatinas. Para estos datos se tomaron los puntos de intersección de G' con G'' , durante el calentamiento y el enfriamiento, respectivamente. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 7. Comparando estos resultados con los obtenidos con la calorimetría diferencial de barrido, se observan diferencias de 2 a 3 °C (menores) y de

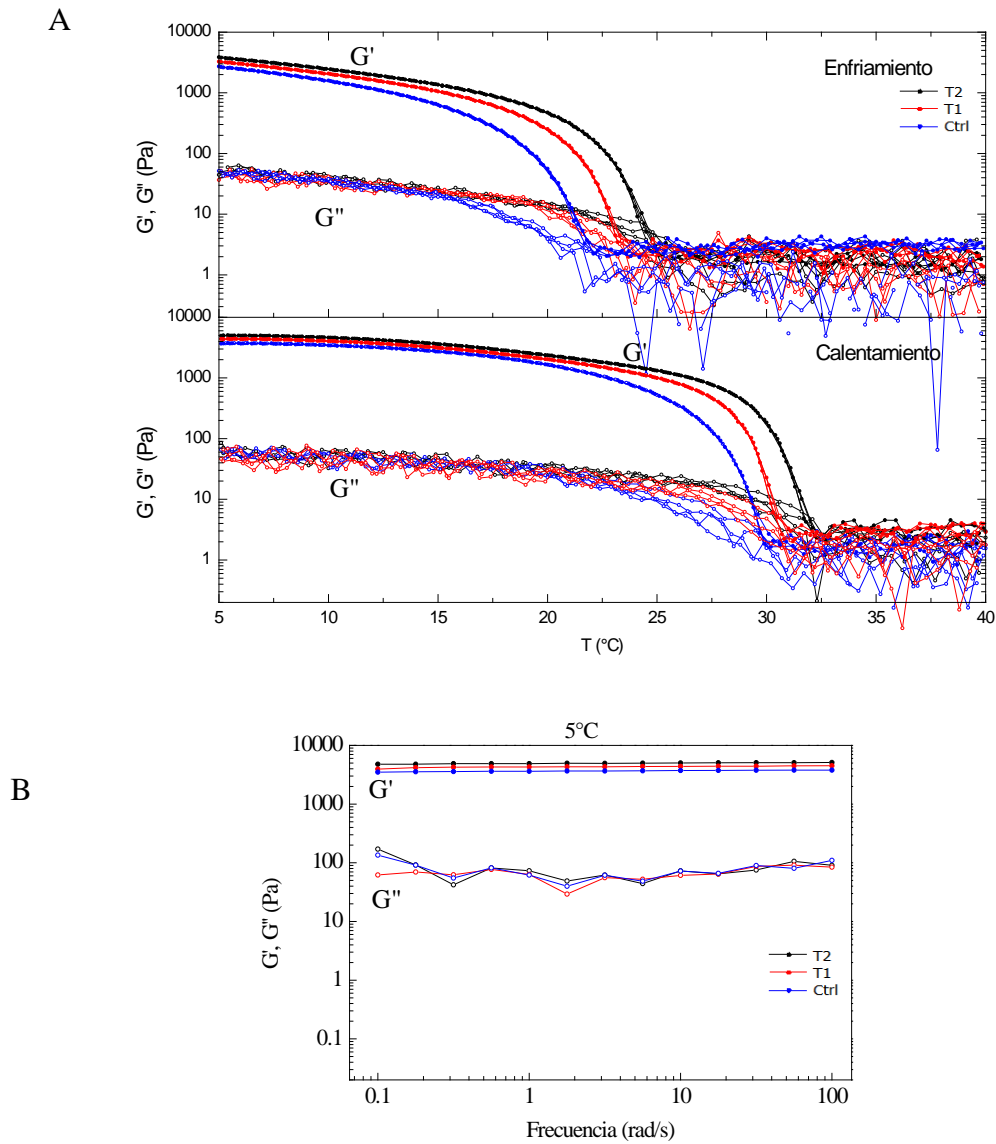


Figura 15. A: Propiedades viscoelásticas de gelatinas (6.67%) sometidas a un proceso de enfriamiento-calentamiento. B: Espectro de frecuencia de las gelatinas.

T1= gelatina obtenida por el modelo predictivo para RD. T2= gelatina obtenida por el modelo predictivo para FG. CTRL=gelatina comercial de bovino. G' : módulo de almacenamiento y G'' : módulo de pérdida.

Tabla 7. Temperatura de fusión y gelatinización mediante reología dinámica de baja deformación.

Tratamiento	T _g	T _f
T1	22.0±0.5 ^{ab}	29.7±0.3 ^{ab}
T2	23.5±0.1 ^a	31.0±0.1 ^a
CTRL	20.6±0.0 ^b	29.1±0.0 ^b

T1= gelatina obtenida por el modelo predictivo para RD. T2= gelatina obtenida por el modelo predictivo para FG. CTRL=gelatina comercial de bovino. T_g = temperatura de gelatinización, °C; T_f = temperatura de fusión. Diferente literal en la misma columna indica diferencias significativas (P≤0.05).

alrededor de 2 °C (mayores) para las temperaturas de gelificación y fusión, respectivamente. Estas diferencias se deben a la naturaleza de los análisis (métodos diferentes), uno realizando el análisis de forma estática (CDB) y el otro de forma dinámica (RDBD). Sin embargo, los valores obtenidos mediante estas dos técnicas se encuentran dentro de lo reportado por Karim y Bhat (2009) para gelatinas de pescado provenientes de aguas tropicales. Mediante ésta última metodología, se observaron valores significativamente menores ($P \leq 0.05$) entre la gelatina de piel de bovino (Control) y la obtenida por el modelo predictivo para FG (T2). Esta diferencia pudiera recaer en la composición y concentración de cadenas α y β de la gelatina obtenida (T2), como se observó en el perfil electroforético (figura 14).

Contenido de aminoácidos totales

El contenido de aminoácidos de las gelatinas obtenidas por los modelos de predicción (para RD y FG), pueden observarse en la tabla 8. En ella, se observa que ambas gelatinas presentan un alto contenido de glicina, prolina, ácido glutámico e hidroxiprolina (ordenadas de mayor a menor contenido). Además, se logran apreciar diferencias ($P \leq 0.05$) en el 35% de los aminoácidos analizados entre los que tenemos al ácido aspártico e histidina (mayores en T1) y glicina, treonina, lisina e hidroxiprolina (mayores en T2). Glicina representó el 21.7% en T1 y el 23.3% en T2 del total de aminoácidos. Estos mismos porcentajes de recuperación han sido reportados por Cho et al. (2006) en gelatina obtenida a partir de piel de raya (*Raja Kenojei*). El total de iminoácidos (prolina e hidroxiprolina) para T1 fue de 209.1 ± 2.4 (22.8%) y para T2 de 225.2 ± 13.1 mg/g de gelatina (23.4%), porcentajes mayores a lo obtenidos por Cho et al. (2006) en gelatina obtenida a partir de piel de raya (*Raja Kenojei*) (17.3% de iminoácidos). El análisis no detectó la presencia de cisteína, asparagina y glutamina. Cabe mencionar que el primero no ha sido detectado en gelatina (Foegeding et al., 1996) mientras que los dos últimos son oxidados (a ácido aspártico y glutámico, respectivamente) durante la hidrólisis ácida, previa a su cuantificación por HPLC (Jongjareonrak et al., 2010).

Por otro lado, se obtuvo baja concentración de tirosina y metionina, característica de todas las gelatinas. La estabilidad de la estructura tridimensional de las gelatinas esta

Tabla 8. Contenido de aminoácidos en gelatinas a partir de piel de raya (*Dasyatis brevis*)

Aminoácidos (mg/g de gelatina)	Tratamientos	
	T1	T2
Ácido Aspártico (Asp)	52.0±2.6 ^a	46.7±1.9 ^b
Ácido Glutámico (Glu)	108.5±4.2 ^a	103.3±1.8 ^a
Serina (Ser)	28.0±6.0 ^a	36.8±2.0 ^a
Histidina (His)	16.1±0.5 ^a	13.9±0.7 ^b
Arginina (Arg)	69.5±0.8 ^a	67.9±3.3 ^a
Glicina (Gly)	197.1±10.3 ^b	224.2±2.8 ^a
Treonina (Thr)	0.4±0.1 ^b	1.2±0.1 ^a
Tirosina (Tyr)	2.8±0.5 ^a	2.0±0.0 ^a
Alanina (Ala)	46.7±1.4 ^a	47.9±3.3 ^a
Metionina (Met)	23.7±1.3 ^a	22.3±1.2 ^a
Valina (Val)	30.3±1.6 ^a	29.7±1.7 ^a
Fenilalanina (Phe)	21.5±0.9 ^a	19.5±0.5 ^a
Isoleucina (Ile)	20.5±0.9 ^a	20.5±1.6 ^a
Leucina (Leu)	40.6±1.5 ^a	42.5±2.4 ^a
Lisina (Lys)	50.9±1.1 ^b	58.8±2.6 ^a
Hidroxiprolina (Hyp)	84.5±2.0 ^b	96.5±3.0 ^a
Prolina (Pro)	124.6±0.4 ^a	128.7±10.1 ^a
Iminoácidos (Pro+Hyp)	209.1±2.4 ^a	225.2±13.1 ^a

T1= gelatina obtenida por el modelo predictivo para RD. T2= gelatina obtenida por el modelo predictivo para FG. Diferente literal en la misma fila indica diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

asociada proporcionalmente al contenido de iminoácidos como Pro, Hyp y Gly (Lehninger et al., 1993); así gelatinas con un mayor contenido de estos aminoácidos (en especial Hyp), presentan mayores propiedades viscoelásticas y así como mayor capacidad para estabilizar y generar estructuras mas rígidas en geles.

Además, la estabilidad térmica de las gelatinas esta ampliamente relacionada al número y estabilidad de regiones ricas en prolina; en este tenor, se ha observado que una mayor concentración de prolina e hidroxiprolina proveen una mayor temperatura de gelificación y de fusión (Gómez-Guillén et al., 2002), lo cual concuerda 100% con nuestros resultados (ver contenido de iminoácidos en T2 y su relación con T_g y T_f de Tabla 7). Por otro lado, el estudio realizado por Badii y Howell (2006) en gelatinas de pescado, observó que los aminoácidos hidrofóbicos: Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe y Met, contribuyen para obtener mayor fuerza de gel (Fuerza bloom) en gelatinas de tilapia comercial. A este respecto, en el presente estudio, los aminoácidos hidrófobos representaron más del 30% en ambos tratamientos, lo que pudiera explicar el comportamiento observado en sus propiedades reológicas (FG y V, APT, T_g y T_m , etc.).

CONCLUSIÓN

Con los resultados obtenidos en el presente estudio se concluye que el ácido acético resultó ser mejor que el ácido clorhídrico para ser utilizado como pretratamiento durante el proceso de extracción de gelatina a partir de piel de raya arenera (*Dasyatis brevis*), teniendo su concentración, gran influencia sobre la fuerza de gel del producto final. Mediante la utilización de éste ácido, fue posible la optimización de propiedades reológicas (fuerza de gel y viscosidad) de gelatina a partir de esta materia prima, así como el incremento en el rendimiento de su obtención, ambos parámetros de gran interés tecnológico. De los modelos optimizados, las condiciones de menor concentración de ácido (0.1M) y menor tiempo de extracción (6 h) resultaron las mejores para obtener una gelatina con buenas características reológicas, características que le permitirán competir con gelatinas comerciales.

BIBLIOGRAFÍA

- Al-Saidi G., Rahman M. S., Al-Alawi A. y Guizani N. 2011. Thermal characteristics of gelatin extracted from shaari fish skin. *Journal of thermal analysis and calorimetry*, **104**(2): 593-603.
- AOAC 1996. Official methods of analysis of AOAC international. Gaithersburg, Maryland, AOAC International.
- Arnesen J. A. y Gildberg A. 2007. Extraction and characterisation of gelatine from Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin. *Bioresource Technology*, **98**(1): 53-57.
- Arreguín-Sánchez F., Hernandez-Herrera A., Ramírez-Rodríguez M. y Pérez-España H. 2004. Optimal management scenarios for the artisanal fisheries in the ecosystem of La Paz Bay, Baja California Sur, Mexico. *Ecological modelling*, **172**(2-4): 373-382.
- Badii F. y Howell N. K. 2006. Fish gelatin: Structure, gelling properties and interaction with egg albumen proteins. *Food Hydrocolloids*, **20**(5): 630-640.
- Bae I., Osatomi K., Yoshida A., Osako K., Yamaguchi A. y Hara K. 2008. Biochemical properties of acid-soluble collagens extracted from the skins of underutilised fishes. *Food Chemistry*, **108**(1): 49-54.
- Ballantyne J. S., Glemet H. C., Chamberlin M. E. y Singer T. D. 1993. Plasma nonesterified fatty acids of marine teleost and elasmobranch fishes. *Marine Biology*, **116**(1): 47-52.
- Baş D. y Boyacı İ. H. 2007. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, **78**(3): 836-845.
- Baziwane D. y He Q. 2003. Gelatin: the paramount food additive. *Food Reviews International*, **19**(4): 423-435.
- Binsi P. K., Shamasundar B. A., Dileep A. O., Badii F. y Howell N. K. 2009. Rheological and functional properties of gelatin from the skin of Bigeye snapper (*Priacanthus hamrur*) fish: Influence of gelatin on the gel-forming ability of fish mince. *Food Hydrocolloids*, **23**(1): 132-145.
- Bizzarro J. J., Smith W. D., Hueter R. E., Tyminski J., Márquez-Farías J. F., Castillo-Géniz J. L., Cailliet G. M. y Villavicencio-Garayzar C. J. 2007. El estado actual

de los tiburones y rayas sujetos a explotación comercial en el Golfo de California: una investigación aplicada al mejoramiento de su manejo pesquero y conservación. Traducción por: J. Leonardo Castillo-Géniz. Moss Landing Marine Laboratories Tech. Pub. 2009-02.: 261 pp.

- Bizzarro J. J., Smith W. D., Márquez-Farías J. F., Tyminski J. y Hueter R. E. 2009. Temporal variation in the artisanal elasmobranch fishery of Sonora, Mexico. *Fisheries Research*, **97**(1-2): 103-117.
- Bonfil R. 1994. Overview of world elasmobranch fisheries. Rome, Food and Agriculture Organization of the United State (FAO).
- Boran G., Lawless H. y Regenstein J. 2010b. Effects of extraction conditions on the sensory and instrumental characteristics of fish gelatin gels. *Journal of Food Science*, **75**(9): S469-S476.
- Boran G., Mulvaney S. J. y Regenstein J. M. 2010a. Rheological properties of gelatin from silver carp skin compared to commercially available gelatins from different sources. *Journal of Food Science*, **75**(8): E565-E571.
- Boran G. y Regenstein J. M. 2009. Optimization of gelatin extraction from silver carp skin. *Journal of Food Science*, **74**(8): E432-E441.
- Boran G. y Regenstein J. M. 2010. Fish Gelatin. *En: Advances in Food and Nutrition Research* (Ed: Steve, L. T.), Academic Press. 119-143.
- Bourne M. C. 2002. Food texture and viscosity: concept and measurement. Geneva, New York, Academic Press.
- Brodsky B. y Persikov A. V. 2005. Molecular structure of the collagen triple helix. *Advances in protein chemistry*, **70**: 301-339.
- Buxbaum E. 2007. Cell-cell interactions. *En: Fundamentals of protein structure and function* (Ed: Buxbaum, E.). Portsmouth, Dominica, Springer Verlag. 201-208.
- Camhi M., Fowler S., Musick J., Bräutigam A. y Fordham S. 1998. Sharks and their relatives: ecology and conservation, World Conservation Union.
- Compagno L. J. V. 2001. Sharks of the world: an annotated and illustrated catalogue of shark species known to date. Number 1, Volume 2. Bullhead, Mackerel and Carpet sharks (Heterodontiformes, Lamniformes and Orectolobiformes). FAO Species Catalogue for Fishery Purposes. Rome.
- CONAPESCA-INP 2004. Plan de Acción Nacional para el Manejo y Conservación de Tiburones, Rayas y Especies Afines en México. CONAPESCA y INP. Mazatlán, México, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación

80.

- Cheow C. S., Norizah M. S., Kyaw Z. Y. y Howell N. K. 2007. Preparation and characterisation of gelatins from the skins of sin croaker (*Johnius dussumieri*) and shortfin scad (*Decapterus macrosoma*). Food Chemistry, **101**(1): 386-391.
- Chiou B. S., Avena-Bustillos R. J., Shey J., Yee E., Bechtel P. J., Imam S. H., Glenn G. M. y Orts W. J. 2006. Rheological and mechanical properties of cross-linked fish gelatins. Polymer, **47**(18): 6379-6386.
- Cho S.-H., Jahncke M. L., Chin K.-B. y Eun J.-B. 2006. The effect of processing conditions on the properties of gelatin from skate (*Raja Kenojei*) skins. Food Hydrocolloids, **20**(6): 810-816.
- Cho S. M., Kwak K. S., Park D. C., Gu Y. S., Ji C. I., Jang D. H., Lee Y. B. y Kim S. B. 2004. Processing optimization and functional properties of gelatin from shark (*Isurus oxyrinchus*) cartilage. Food Hydrocolloids, **18**(4): 573-579.
- Choi S. S. y Regenstein J. M. 2000. Physicochemical and sensory characteristics of fish gelatin. Journal of Food Science, **65**(2): 194-199.
- Djagny K. B., Wang Z. y Xu S. 2001. Gelatin: a valuable protein for food and pharmaceutical industries: review. Critical reviews in food science and nutrition, **41**(6): 481-492.
- DOF 2007. NORMA Oficial Mexicana NOM-029-PESC-2006, Pesca responsable de tiburones y rayas. Especificaciones para su aprovechamiento. SAGARPA. México, Diario Oficial de la Federación. **44**.
- Ferraro V., Cruz I. B., Jorge R. F., Malcata F. X., Pintado M. E. y Castro P. M. L. 2010. Valorisation of natural extracts from marine source focused on marine by-products: A review. Food Research International, **43**(9): 2221-2233.
- Foegeding E. A., Lanier T. C. y Hultin H. O. 1996. Characteristics of edible muscle tissues. *En: Food Chemistry* (Ed: Fennema, O. R.). New York, Marcel Dekker. 879-942.
- García-Descalzo L., García-López E., Alcázar A., Baquero F. y Cid C. 2012. Gel Electrophoresis of Proteins. *En: Gel Electrophoresis Principles and Basics* (Ed: Magdeldin, S.). Croatia, InTech. 69-88.
- Garnjanagoonchorn W., Wongekalak L. y Engkagul A. 2007. Determination of chondroitin sulfate from different sources of cartilage. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, **46**(5): 465-471.
- Gelse K., Pöschl E. y Aigner T. 2003. Collagens - structure, function, and biosynthesis. Advanced drug delivery reviews, **55**(12): 1531-1546.

- GME. 2008. Gelatin Manufacturers of Europe. Disponible en: <http://www.gelatine.org/>.
- GMIA 2006. Gelatine Manufacturers Institute of America: Standard methods for the testing of edible gelatine. New York, Gelatin Manufacturers Institute of America, Inc.
- Gómez-Guillén M., Turnay J., Fernández-Díaz M., Ulmo N., Lizarbe M. y Montero P. 2002. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. *Food Hydrocolloids*, **16**(1): 25-34.
- Gómez-Guillén M. C., Giménez B., López-Caballero M. E. y Montero M. P. 2011. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*.
- Gómez-Guillén M. C. y Montero P. 2001. Extraction of gelatin from megrim (*Lepidorhombus boscii*) skins with several organic acids. *Journal of Food Science*, **66**(2): 213-216.
- Gornall A. G., Bardawill C. J. y David M. M. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry*, **177**(2): 751-766.
- Gudmundsson M. 2002. Rheological properties of fish gelatins. *Journal of Food Science*, **67**(6): 2172-2176.
- Gudmundsson M. y Hafsteinsson H. 1997. Gelatin from cod skins as affected by chemical treatments. *Journal of Food Science*, **62**(1): 37-39.
- Haug I. J. y Draget K. I. 2009. Gelatin. *En: Handbook of Hydrocolloids* (Ed: Phillips, G. O. y Williams, P. A.), Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC. 142-162.
- Hulmes D. J. S. 2008. Collagen diversity, synthesis and assembly. *En: Collagen: Structure and Mechanics* (Ed: Fratzl, P.). Germany, Springer Verlag. 49-74.
- Huss H. H. 1998. El pescado fresco: su calidad y cambios de calidad. Manual de capacitación preparado por el Programa de Capacitación FAO/DANIDA en Tecnología Pesquera y Control de Calidad. Roma, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación: 147.
- Jamilah B. y Harvinder K. G. 2002. Properties of gelatins from skins of fish—black tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and red tilapia (*Oreochromis nilotica*). *Food Chemistry*, **77**(1): 81-84.
- Jongjareonrak A., Rawdkuen S., Chaijan M., Benjakul S., Osako K. y Tanaka M. 2010. Chemical compositions and characterisation of skin gelatin from farmed giant catfish (*Pangasianodon gigas*). *LWT - Food Science and Technology*, **43**(1): 161-

- Kadler K. E., Baldock C., Bella J. y Boot-Handford R. P. 2007. Collagens at a glance. *Journal of Cell Science*, **120**(12): 1955.
- Karim A. A. y Bhat R. 2008. Gelatin alternatives for the food industry: recent developments, challenges and prospects. *Trends in Food Science and Technology*, **19**(12): 644-656.
- Karim A. A. y Bhat R. 2009. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*, **23**(3): 563-576.
- Kasankala L. M., Xue Y., Weilong Y., Hong S. D. y He Q. 2007. Optimization of gelatine extraction from grass carp (*Catenopharyngodon idella*) fish skin by response surface methodology. *Bioresource Technology*, **98**(17): 3338-3343.
- Keith A. H. 1998. Acid-base chemistry of aquatic systems. Dunedin, New Zealand, University of Otago.
- Kittiphattanabawon P., Benjakul S., Visessanguan W., Kishimura H. y Shahidi F. 2010b. Isolation and characterisation of collagen from the skin of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*). *Food Chemistry*, **119**(4): 1519-1526.
- Kittiphattanabawon P., Benjakul S., Visessanguan W. y Shahidi F. 2010a. Comparative study on characteristics of gelatin from the skins of brownbanded bamboo shark and blacktip shark as affected by extraction conditions. *Food Hydrocolloids*, **24**(2-3): 164-171.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**(5259): 680-685.
- Lee C. H., Singla A. y Lee Y. 2001. Biomedical applications of collagen. *International journal of pharmaceutics*, **221**(1-2): 1-22.
- Lehninger A. L., Nelson D. L. y Cox M. M. 1993. Threedimensional structure of proteins. *En: Principles of biochemistry* (Ed. New York, Worth Publishers, Inc. pp. 160-197.
- Liu H., Li D. y Guo S. 2008. Rheological properties of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) gelatine from fish skins preserved by different methods. *LWT-Food Science and Technology*, **41**(8): 1425-1430.
- Lobo L. 2002. Coalescence during emulsification: 3. Effect of gelatin on rupture and coalescence. *Journal of Colloid and Interface Science*, **254**(1): 165-174.
- Márquez-Farías J. F. 2002. The artisanal ray fishery in the Gulf of California: development, fisheries research and management issues. *IUCN Shark Specialist*

Group, Shark News, **14**: 7-8.

Márquez-Farías J. F. y Blanco-Parra M. 2006. Rayas. *En*: Sustentabilidad y pesca responsable en México (Ed: Arreguín-Sánchez, F., Gúzman-Anaya, P. y Fuentes-Castellanos, D. F.). Mexico, Instituto Nacional de la Pesca. 303-321.

Meena C., Mengi S. A. y Deshpande S. G. 1999. Biomedical and industrial applications of collagen. *Journal of Chemical Sciences*, **111**(2): 319-329.

Michon C., Cuvelier G. y Launay B. 1993. Concentration dependence of the critical viscoelastic properties of gelatin at the gel point. *Rheologica acta*, **32**(1): 94-103.

Mohtar N. F., Perera C. y Quek S. Y. 2010. Optimisation of gelatine extraction from hoki (*Macruronus novaezelandiae*) skins and measurement of gel strength and SDS-PAGE. *Food Chemistry*, **122**(1): 307-313.

Montero P. y Gómez-Guillén M. C. 2000. Extracting conditions for megrim (*Lepidorhombus boscii*) skin collagen affect functional properties of the resulting gelatin. *Journal of Food Science*, **65**(3): 434-438.

Montgomery D. C. 2003. Diseño y análisis de experimentos. México, Limusa-Wiley.

Murado M. A., Fraguas J., Montemayor M. I., Vázquez J. A. y González P. 2010. Preparation of highly purified chondroitin sulphate from skate (*Raja clavata*) cartilage by-products. Process optimization including a new procedure of alkaline hydroalcoholic hydrolysis. *Biochemical Engineering Journal*, **49**(1): 126-132.

Muyonga J. H., Cole C. G. B. y Duodu K. G. 2004. Extraction and physico-chemical characterisation of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin. *Food Hydrocolloids*, **18**(4): 581-592.

Navarro-García G., Ramirez-Suarez J., Ortega-García J., García-Camarena R., Márquez-Farías F., Santos-Valencia J. y Bringas-Alvarado L. 2009. Lipid composition, natural antioxidants and physicochemical characteristics in liver oil from rajiforms from the Gulf of Mexico. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **86**(4): 323-328.

Navarro-García G., Ramírez-Suárez J. C., Cota-Quiñones E., Márquez-Farías F. y Bringas-Alvarado L. 2010. Storage stability of liver oil from two ray (*Rhinoptera bonasus* and *Aetobatus narinari*) species from the Gulf of Mexico. *Food Chemistry*, **119**(4): 1578-1583.

Papon P., Leblond J. y Meijer P. H. E. 2006. The physics of phase transitions: concepts and applications. Netherlands, Springer-Verlag.

Pérez-Jiménez J. C., Sosa-Nishizaki O., Furlong-Estrada E., Corro-Espinosa D., Venegas-Herrera A. y Barragán-Cuencas O. V. 2005. Artisanal shark fishery at

- “Tres Marias” islands and Isabel island in the Central Mexican Pacific. *Journal of Northwest Atlantic Fisheries Science*, **35**: 333-343.
- Perez-Velazquez M., González-Félix M. L., Navarro-García G. y Valenzuela-Escalante E. 2008. Nutritional value of various ray fish liver oils to the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Lipids*, **43**(11): 1009-1016.
- Regenstein J. y Zhou P. 2007. Collagen and gelatin from marine by-products. *En: Maximising the value of marine by-products* (Ed: Shahidi, F.). Cambridge, England, Woodhead Publishing Limited. 279-303.
- Rose D. A. 1996. An overview of world trade in sharks and other cartilaginous fishes. Traffic International, 1996. Cambridge, UK.
- Santana O., Castillo J., Sosa O. y Rodríguez C. 2004. Catálogo de tiburones, rayas y quimeras (Chondrichthyes) que habitan en las aguas del norte del Golfo de California. Reporte Técnico, Laboratorio de Ecología Pesquera, CICESE. México.
- Sato K., Tsutsumi M., Nomura Y., Murata N. y Kondo N. 2006. Proteoglycan isolated from cartilaginous fish and process for producing the same. United States Patent Application, EP Patent 1,614,697. **US 2007/0010430 A1**: 18.
- Schrieber R. y Gareis H. 2007. *Gelatine handbook: Theory and industrial practice*. Alemania, Wiley-VCH Weinheim.
- Shoulders M. D. y Raines R. T. 2009. Collagen structure and stability. *Annual review of biochemistry*, **78**: 929.
- Singh P., Benjakul S., Maqsood S. y Kishimura H. 2011. Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Food Chemistry*, **124**(1): 97-105.
- Smith W. D., Bizzarro J. J. y Cailliet G. M. 2009. The artisanal elasmobranch fishery on the east coast of Baja California, Mexico: Characteristics and management considerations. *Ciencias marinas*, **35**(2): 209-236.
- Smith W. D., Cailliet G. M. y Melendez E. M. 2007. Maturity and growth characteristics of a commercially exploited stingray, *Dasyatis dipterura*. *Marine and Freshwater Research*, **58**(1): 54-66.
- Stainsby G. 1987. Gelatin gels. *En: Collagen as a food* (Ed: Pearson, A. M., Dutson, T. R. y Bailey, A. J.). New York, Van Nostrand Reinhold. 209-222.
- Summers A. P., Koob-Emunds M. M., Kajiura S. M. y Koob T. J. 2003. A novel fibrocartilaginous tendon from an elasmobranch fish (*Rhinoptera bonasus*). *Cell and Tissue Research*, **312**(2): 221-227.

- Tabarestani H. S., Maghsoudlou Y., Motamedzadegan A. y Sadeghi Mahoonak A. 2010. Optimization of physico-chemical properties of gelatin extracted from fish skin of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Bioresource Technology*, **101**(15): 6207-6214.
- Taylor D. 2002. Inactivation of the BSE agent. *Comptes Rendus Biologies*, **325**(1): 75-76.
- Vázquez-Ortiz F. A., Caire G., Higuera-Chiapara I. y Hernández G. 1995. High performance liquid chromatographic determination of free amino acids in shrimp. *Journal of Liquid Chromatography*, **18**: 2059-2059.
- Vojdani F. 1996. Solubility. *En: Methods of testing protein functionality* (Ed: George, M. H.). St. Edmundsury, Bury St. Edmunds Press. 11-60.
- Wangtueai S. y Noomhorm A. 2009. Processing optimization and characterization of gelatin from lizardfish (*Saurida* spp.) scales. *LWT-Food Science and Technology*, **42**(4): 825-834.
- Wess T. J. 2008. Collagen fibrillar structure and hierarchies. *En: Collagen: Structure and Mechanics* (Ed: Fratzl, P.). Germany, Springer Verlag. 49-74.
- Yang H., Wang Y., Jiang M., Oh J. H., Herring J. y Zhou P. 2007. 2 Step optimization of the extraction and subsequent physical properties of channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) skin gelatin. *Journal of Food Science*, **72**(4): C188-C195.
- Zeng S., Yan X., Cao W., Hong P., Zhang C. y Li L. 2010. Original article: Optimisation of extraction conditions and characteristics of skin gelatin from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International Journal of Food Science and Technology*, **45**(9): 1807-1813.
- Zhou P., Mulvaney S. J. y Regenstein J. M. 2006. Properties of alaska pollock skin gelatin: a comparison with tilapia and pork skin gelatins. *Journal of Food Science*, **71**(6): C313-C321.
- Zhou P. y Regenstein J. M. 2004. Optimization of extraction conditions for pollock skin gelatin. *Journal of Food Science*, **69**(5): C393-C398.
- Zhou P. y Regenstein J. M. 2005. Effects of alkaline and acid pretreatments on Alaska pollock skin gelatin extraction. *Journal of Food Science*, **70**(6): c392-c396.