

Optimización de la Extracción del Colágeno Soluble en Ácido de Subproductos de Tilapia Roja (*Oreochromis spp*) mediante un Diseño de Superficie de Respuesta

Julian Quintero y José E. Zapata*

Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, Grupo de Nutrición y Tecnología de Alimentos, Universidad de Antioquia, Calle 67 No. 53-103, Medellín, Colombia (jquintero0627@gmail.com; jedgar_4@yahoo.es)

* Autor a quien debe ser dirigida la correspondencia

Recibido May. 16, 2016; Aceptado Jun. 20, 2016; Versión final Ago. 22, 2016, Publicado Feb. 2017

Resumen

Se evaluó el efecto de temperatura y concentración del hidrolizante en la extracción de colágeno soluble en ácido a partir de tres regiones anatómicas de la tilapia roja (*Oreochromis spp*): escamas, espinas y pieles. Se optimizó el proceso de extracción aplicando dos diseños experimentales en cada matriz estudiada en las etapas de hidrólisis básica (NaOH) para la liberación de proteínas del tejido conectivo (PTC) e hidrólisis ácida (CH₃-COOH) para la obtención del colágeno. Los resultados revelaron que a 25°C y 0.4M de NaOH en la hidrólisis básica, se obtiene la mayor liberación de PTC en las matrices estudiadas. Además, se puede alcanzar el máximo porcentaje de colágeno (% CI) en la hidrólisis ácida con una solución 0,7M de CH₃-COOH y temperaturas de 18,5°C, 11,0°C y 21,5°C para piel (0,88%), escamas (2,16%) y espinas (0,51%), respectivamente.

Palabras clave: colágeno ácido; hidrólisis básica; hidrólisis ácida

Optimization of the Extraction of Acid-Soluble Collagen from Byproducts Red Tilapia (*Oreochromis spp*) using Response Surface Design

Abstract

The effect of temperature and concentration of the hydrolyzing agent on the extraction of acid soluble collagen from three anatomical regions of red tilapia (*Oreochromis spp*) was evaluated: scales, bones and skin. The extraction process is optimized using two experimental designs in each matrix studied in the stages of basic hydrolysis (NaOH) for the release of connective tissue proteins (CTP) and acid hydrolysis (CH₃ COOH) to obtain collagen. Results showed that at 25°C and 0.4M solution of NaOH in the basic hydrolysis the maximum CTP in the studied matrixes are obtained. Also, the optimum condition of collagen extraction by acid hydrolysis can be achieved at 0.7M solution of CH₃-COOH and temperatures of 18.5°C, 11.0 °C and 21.5°C for skin (0.88%), scales (2.16%) and spines (0.51%), respectively.

Keywords: acid collagen; basic hydrolysis; acid hydrolysis

INTRODUCCIÓN

Anualmente en el mundo se recogen alrededor de 158 millones de toneladas de pescado y específicamente en Colombia la producción piscícola supero las 89.000 toneladas para el año 2012 (FINAGRO, 2014), siendo la tilapia la especie de mayor importancia, con el 58,5% (MinAgricultura, 2013). Por otro lado en la industria piscícola solo alrededor del 40% se destina al consumo humano y el 60% restante generalmente se vierte o se destina a aplicaciones de bajo valor añadido (Jae et al., 2007). Los residuos están constituidos principalmente por huesos, piel, cabezas, escamas y vísceras, los cuales son fuente importante de proteínas con alto valor nutricional y comercial, que generalmente se vierten a los efluentes de agua o se destinan a aplicaciones de bajo valor añadido, como alimentos para animales, harina de pescado y fertilizantes (Benjakul y Morrissey, 1997; Hsu, 2010; Jae et al., 2007). Específicamente en el procesamiento de tilapia, el 60-70% del cuerpo es subproducto, lo cual incluye, residuos de carne, cabeza, piel, escamas, espinas, esqueleto y vísceras (Silva et al., 2014).

La riqueza proteica de los subproductos propicia el que sean convertidos a productos de mayor valor agregado por medio de hidrólisis, con la que se pueden recuperar proteínas de alto valor comercial como lo es el colágeno (Gomez et al., 2011). El cuál es la proteína más abundante de origen animal (Muyonga et al., 2004), que constituye aproximadamente el 25-30% de todas las proteínas de los organismos animales (Bae et al., 2008), es un componente importante de todos los tejidos conectivos del cuerpo (músculos, dientes, huesos y piel) y se ha utilizado como un material para alimentos, cosméticos, productos farmacéuticos y reactivos experimentales (Zeng et al., 2009).

El colágeno se obtiene principalmente de origen porcino y bovino (Almeida, et al., 2013), pero la comunidad científica en la última década ha buscado nuevas fuentes de extracción debido al rechazo asociado a creencias religiosas y enfermedades bovinas, como los brotes de encefalopatía esponjiforme bovina (EEB) y fiebre aftosa (FA) que pueden pasar de los bovinos a los humanos (Liu y Huand, 2016). Recientemente, colágeno extraído de pescado ha ganado más atención debido a subproductos de pescado tienen más colágeno y se consideran una fuente de colágeno más seguro en comparación con otros animales (El et al., 2015). En el mercado colombiano actualmente se oferta colágeno de origen bovino y marino. El primero es fabricado y comercializado por laboratorios colombianos, el segundo es importado principalmente de Alemania, Japón, Países Bajos, Francia y Canadá (Liu y Huand, 2016). A partir del proceso de fileteo se generan piel, espinas y escamas de pescado, que constituyen residuos con impactos ambientales importantes. A nivel global se han adelantado estudios para la obtención de colágeno de diferentes tipos de peces a partir de sus escamas (Ikoma et al., 2003; Nagai et al., 2002; Serrano, 2011), pieles (Serrano, 2011), espinas (Gómez et al., 2011) y huesos (Wang et al., 2013).

La mayoría de estos trabajos se han desarrollado en peces marinos, por lo que es de interés desarrollar trabajos para la extracción de colágeno a partir de peces de agua dulce de zonas cálidas, que se sabe que tienen mayor estabilidad térmica, como en el caso de la tilapia roja (*Oreochromis spp*) (Serrano, 2011). Por otro lado, es este grupo de peces ocupa el tercer lugar en importancia a nivel mundial, después de la carpa y el salmón, y su cultivo también es una de las actividades de mayor crecimiento (Tirado et al., 2015; El et al., 2015). Sumado a esto no se encuentran reportes que evalúen y optimicen el efecto de las variables del proceso sobre la recuperación de colágeno ácido soluble en subproductos de diferentes regiones anatómicas de la tilapia roja. El objetivo de este trabajo fue optimizar la extracción de colágeno ácido soluble de escamas, espinas y pieles de Tilapia roja (*Oreochromis spp*), en función de la temperatura y la concentración del agente hidrolizante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se describe la materia prima usada, el análisis fisicoquímico de las matrices, la hidrólisis de las proteínas del tejido conectivo y la eliminación del extracto etéreo. Luego se explica la descalcificación y la obtención de colágeno para finalmente presentar el análisis estadístico realizado.

Manejo de Materiales

Se utilizaron espinas, escamas y piel de tilapia roja (*Oreochromis spp*) suministradas por la piscícola el Gaitero, Sopetran, Antioquia-Colombia con menos de 24 horas de faenado. Las cuales se transportaron refrigerados (4 a 6°C) hasta el laboratorio del grupo de investigación en Nutrición y Tecnología de Alimentos de la Universidad de Antioquia, donde las espinas, escamas y pieles fueron lavadas con hipoclorito de sodio (NaClO) a 250 ppm. Las pieles se cortaron en trozos de 0,5 cm x 0,5 cm y las espinas 0,5 cm de largo, se les realizó los análisis fisicoquímicos a las tres partes anatómicas (humedad, grasa, cenizas y proteína total) y las muestras restantes fueron se almacenaron a -20°C hasta su uso. En el momento de realizar las pruebas posteriores a la congelación de las matrices, estas fueron descongeladas transfiriéndolas a refrigeración 24 horas antes de su uso. Todos los reactivos usados fueron grado analítico.

Análisis fisicoquímico de las matrices

El contenido de humedad, grasa, cenizas y proteína total (N x 6,25), fueron determinados siguiendo la metodología descrita en la AOAC, 1995 (AOAC, 1995).

Cuantificación de hidroxiprolina

La hidroxiprolina es el aminoácido característico del colágeno, es producido por la hidroxilación en presencia de la prolina y la glicina (El *et al.*, 2015). Su cuantificación se realizó aplicando el método colorimétrico descrito en la Norma Técnica Colombiana NTC 3750 (ICONTEC, 2002). Las muestras fueron sometidas a una hidrólisis ácida con HCl 6,0 M durante 12 horas a 90 °C, posteriormente se diluyó una alícuota del hidrolizado en relación 1:20 con agua destilada. 1 ml de la solución se mezcló con una relación igual de sulfato cúprico 0.01N, hidróxido de sodio 2,5 M, peróxido de hidrogeno al 6% y 0,1 ml de sulfto ferroso 0.05 M. luego de agitar vigorosamente la muestra hasta que desaparecieran las burbujas de gas, se adiciono 4,0 ml de ácido sulfúrico 3N y 2 ml de la solución de p-dimetilaminobenzaldehido al 5%. Se calentó durante 16 min a 70 °C con un posterior choque térmico en un baño de hielo, se midió la absorbancia en un espectrofotómetros UV/VIS Genesys 10s marca Thermo a 540nm (Tang *et al.*, 2015). La curva de calibración se realizó usando seis soluciones estándar de trans-4-Hydroxy-L-proline ≥99% marca Sigma.

Extracción de colágeno ácido soluble

El proceso completo desde el material crudo hasta el colágeno, comprende varias etapas a saber: Extracción de proteínas de tejido conectivo, desengrasado, descalcificación y extracción de colágeno. Las cuales se aplicaron a cada matriz según el requerimiento, como se describe a continuación.

Hidrólisis de las proteínas del tejido conectivo

Este proceso se realizó a las tres matrices y se requiere para eliminar las proteínas distintas al colágeno presentes en la muestra y que pueden convertirse en contaminantes del colágeno al final del proceso (Serrano, 2011). Se realiza con hidróxido de sodio (NaOH), el cual es un agente irritante y al entrar en contacto con las proteínas de los tejidos vivos produce su rompimiento por efectos de hidrólisis (Liu *et al.*, 2015). Luego de la hidrólisis los aminoácidos y péptidos más pequeños se liberan al medio acuoso, pero al ser una base fuerte podría así mismo hidrolizar la molécula de colágeno a pesar de ser una molécula fibrosa y resistente, por esta razón no se recomienda usar altas temperaturas o altas concentraciones de NaOH (Serrano, 2011; Pal *et al.*, 2015). Se usó un reactor de vidrio con camisa de circulación de agua para regular la temperatura y un sistema con agitación constante de 450 rpm y en proporción muestra/solución de 1:10 (w/v) para cada región anatómica estudiada, durante 12 horas continuas. Posteriormente las matrices se lavaron con agua destilada hasta obtener pH neutro en el agua de lavado (Pal *et al.*, 2015).

Eliminación del extracto etéreo

Se realizó solo a las pieles debido a su alto contenido de grasa, para reducir el contenido de grasa en el colágeno final. Para ello se utilizó una solución de n-Butanol al 10% (v / v) en proporción muestra/solución de 1:10 (w / v) durante 12 h con agitación suave (Zeng *et al.*, 2009). La piel desgrasada se lavó con agua destilada y se almacenó a -20°C hasta la siguiente etapa.

Descalcificación

Se realizó en las espinas y escamas por su alto contenido de calcio que afectaría significativamente la pureza del colágeno. Se utilizó con una solución de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,5 M con hidróxido de sodio (NaOH) a un pH de 8 en proporción muestra/solución de 1:10 (w / v) durante 48 h con una agitación suave. Las espinas y escamas descalcificadas se lavaron con agua destilada (Muyonga *et al.*, 2004).

Obtención de colágeno

En esta etapa se busca liberar, solubilizar y recuperar en medio ácido el colágeno presente en cada una de las matrices. Para ello se aplicó una solución de ácido acético (CH₃-COOH), en un reactor de vidrio con camisa de circulación de agua para regular la temperatura, en un sistema con agitación constante de 450 rpm y en proporción muestra/solución de 1:10 (w / v) para cada matriz estudiada durante 12 horas para las espinas y escamas, 5 horas para la piel. Posteriormente a la solución ácida se le adicionó una solución de 12% en NaCl, para precipitar el colágeno por la acción que esta sal tiene sobre la fuerza iónica, posteriormente se filtró en embudo de polisulfona, para su análisis posterior (Liu *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2014).

Análisis estadístico

Se desarrollaron dos diseños experimentales factorial central compuesto (DOE) en cada matriz, uno en la etapa hidrólisis de las proteínas del tejido conectivo (NaOH) y otro en la obtención de colágeno en la fase con ácido acético (CH₃-COOH). En ambos se tomó como factores la concentración de la solución y la temperatura (tem), en los niveles que se presentan en la tabla 1. A partir de estas condiciones se establecieron 13 corridas experimentales en cada DOE, las cuales se presentan en forma aleatoria en la tabla 2, en la forma siguiente. Variables respuesta DOE hidrólisis alcalina: % proteína en la matriz sólida al final, en base seca (%Pm), % colágeno en la matriz sólida al final en base seca (%Cm) y la concentración proteínas hidrolizadas en la fase líquida (Cph). Variable respuesta DOE hidrólisis acida: % colágeno liberado (%CI).

Tabla 1. Niveles de los factores para los DOE en cada etapa

Factor	DOE hidrólisis alcalina		DOE hidrólisis acida	
	Nivel inferior	Nivel superior	Nivel inferior	Nivel superior
Concentración NaOH (M)	0,10	0,40	-----	-----
Concentración CH ₃ -COOH (M)	-----	-----	0,30	0,70
Tem (°C)	10,00	25,00	10,00	25,00

Para el análisis de los resultados se desarrolló el análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%, la cual incluye la significancia estadística de cada uno de los términos del modelo ajustado (Valor - P), los efectos estimados en cada término, el coeficiente de determinación del modelo (R²) y la carencia de ajuste, con el fin de establecer la exactitud del modelo para representar los datos experimentales. Se utilizó el software Design Expert Versión 8.0.6 (Stat-Ease, EE.UU).

Tabla 2. Diseño factorial central compuesto implementado en las etapas de hidrólisis de las proteínas del tejido conectivo y obtención de colágeno en cada una de las matrices.

Ensayo	Concentración NaOH (M)	Concentración CH ₃ -COOH (M)	Tem (°C)
1	0,25	0,50	17,50
2	0,04	0,22	17,50
3	0,25	0,70	17,50
4	0,25	0,50	17,50
5	0,25	0,70	17,50
6	0,10	0,50	25,00
7	0,40	0,78	10,00
8	0,10	0,50	10,00
9	0,25	0,30	28,11
10	0,46	0,30	17,50
11	0,25	0,50	6,89
12	0,25	0,50	17,50
13	0,40	0,50	25,00

Optimización.

A los modelos obtenidos del ANOVA se les aplicó un método de optimización multicriterio, en el cual se determinaron los niveles de las variables que entregan los máximos o mínimos valores de las respuestas según el caso. En el caso de la hidrólisis de las proteínas del tejido conectivo, se buscó los niveles de los factores que maximizaban el % colágeno en la matriz sólida al final en base seca y la concentración proteínas hidrolizadas en la fase líquida. En el caso de la obtención del colágeno soluble en ácido se buscaron los niveles que maximizaran la variable respuesta % de colágeno extraído.

Caracterización parcial del colágeno obtenido optimizado.

Se tomaron muestras de los ensayos realizados para el proceso de optimización de los dos procesos, hidrólisis de eliminación de proteínas del tejido conectivo y la hidrólisis acida donde se libera el colágeno. Posterior a las hidrólisis se recuperó el colágeno de la solución ácida precipitándolo con una solución de cloruro de sodio como ya se describió. Al colágeno obtenido por el proceso de optimización estandarizado se le cuantifico la hidroxiprolina presente, el contenido de sólidos y el pH.

RESULTADOS Y DISCUSION

La composición química proximal en base seca, de las matrices evaluadas se expone en la tabla 3. El contenido de colágeno reportado en dicha tabla se cuantifico a partir del contenido del hidroxiprolina con un factor de 7,45 (ICONTEC, 2002). Este resultado para piel, está por encima del reportado por Serrano en 2011 (7,46 %), trabajando con piel de tilapia roja (*Oreochromis spp*) (Serrano, 2011). En general los valores están en el rango de los reportes de literatura para escamas de otras especies, que han fluctuado entre 41-84%

(Chalamaiah *et al.*, 2012; Minh Thuy *et al.*, 2014; Sankar *et al.*, 2008), mientras que las espinas y esqueletos han oscilado entre 14-67% (Chuesiang, 2015; Hemung, 2013), en algunos de los cuales se han realizado mejoras genéticas o cruces entre especies con el objetivo de aumentar la productividad de músculo para la producción de filetes (FAO, 2006). Además es posible explicar los amplios rangos de las características fisicoquímicas reportados en la literatura, con especial énfasis en el contenido del colágeno y proteína, debido que estos están influenciados por los diferentes procesos de extracción, las distintas especies, el lugar de cultivo de los animales y con gran influencia el tipo de alimentación y la temperatura de su medio de crecimiento; como lo reporta Torres *et al.* en el 2008, los cuales afirman que el contenido de colágeno en el músculo del pescado es mayor en especies con temperaturas más elevadas de cultivo (Torres *et al.*, 2008).

Tabla 3: Composición fisicoquímica de escamas, piel y espinas de tilapia roja (*Oreochromis spp*) usadas para la extracción de colágeno. * Calculados en base seca.

Composición	Escamas			Piel			Espinass		
% colágeno	6,54	±	0,73	15,57	±	0,17	5,65	±	0,12
% Humedad	15,18	±	0,27	69,94	±	0,04	53,46	±	0,07
% Extracto etéreo*	1,05	±	0,17	18,37	±	0,13	7,36	±	0,09
% cenizas*	32,08	±	0,23	1,26	±	0,10	22,91	±	0,09
% Proteína*	67,96	±	0,19	82,27	±	0,66	55,54	±	0,22

Los resultados del presente estudio concuerdan con los de Ikoma *et al.* en el 2003 trabajando con colágeno de piel de *Oreochromis niloticus*. Quienes reportaron que la piel tiene un contenido de aminoácidos superior (hidroxiprolina y prolina) que las escamas de dicha especie (Ikoma *et al.*, 2003) los cuales están directamente relacionados con el contenido de colágeno y su estabilidad, porque son esenciales para la formación de enlaces hidrogeno intermoleculares (El *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2016). La menor solubilización del colágeno en escamas y espinas se puede deber a la presencia de enlaces cruzados entre cadenas de colágeno (enlaces covalentes) formados a través de la reacción de condensación de aldehído con lisina e hidroxilisina en la región de telopéptido (Pal *et al.*, 2015). Esto podría resolverse utilizando enzimas como la pepsina, ya que esta tiene la capacidad de dividir esas regiones telopéptidas exponiendo el resto de la hélice al medio ácido sin dañar la integridad de la triple hélice (Pal *et al.*, 2015). Por otra parte, los porcentajes de proteínas colagenadas obtenidos en las regiones anatómicas de esta especie con respecto al total de proteína bruta (9,62% escamas; 13,41% espinas y 18,93% piel) son menores que los encontrados en zonas anatómicas de otras especies como la piel de cerdo y las patas de pollo, con 30% y 62%, respectivamente (Almeida, *et al.*, 2013), sin embargo, estos materiales tienen usos alimentarios, mientras que los residuos piscícolas no lo tienen.

Efecto de los factores en la Hidrolisis de las proteínas de tejido conectivo.

Con el objetivo de evaluar el efecto que los factores (Concentración NaOH y Tem) tienen sobre las variables respuesta (%Pm, %Cm y Cph), se desarrolló el DOE que se presenta en la Tabla 2, con las corridas experimentales en forma aleatoria, mientras que en la tabla 4 se presentan los valores obtenidos para las variables respuesta en cada corrida. Estos datos se emplearon en el ajuste de un modelo polinomial, cuyos coeficientes fueron calculados por regresión múltiple.

Tabla 4: resultados obtenidos para él %Pm, %Cm y Cph en la hidrolisis de las proteínas del tejido conectivo en la piel, escamas y espinas de tilapia roja aplicando un diseño factorial central compuesto (DOE).

Ensayo	Escamas			Espinass			Piel		
	% Pm	% Cm	Cph (mg/mL)	% Pm	% Cm	Cph (mg/mL)	% Pm	% Cm	Cph (mg/mL)
1	79,49	9,70	19,10	16,89	7,99	124,48	35,74	6,91	147,92
2	82,97	9,26	15,10	17,74	7,40	119,62	38,00	6,37	117,71
3	79,93	9,96	18,92	16,83	8,01	124,13	31,13	7,19	147,22
4	81,62	10,02	21,70	16,90	8,03	126,04	35,38	7,76	145,49
5	79,83	10,21	19,62	16,99	7,99	124,31	33,36	7,73	146,18
6	82,74	12,40	21,70	16,72	7,84	127,08	35,85	7,31	132,12
7	73,61	10,13	21,88	15,79	8,08	126,39	27,72	7,42	171,88
8	77,44	8,95	20,49	17,71	7,31	125,69	51,49	6,50	129,51
9	79,48	12,33	19,62	17,24	8,58	124,83	27,55	8,14	191,49
10	77,43	11,21	28,65	16,26	8,96	133,68	33,06	7,98	173,09
11	72,12	9,52	17,01	16,57	7,53	122,40	34,47	6,82	125,52
12	79,49	10,48	19,44	16,90	8,08	124,13	37,07	7,42	145,66
13	75,15	12,89	23,61	16,08	9,16	129,17	31,59	8,25	182,12

En la Tabla 5, se presenta el análisis de varianza (ANOVA) para el DOE, donde se entrega el valor P para cada factor en cada uno de los sustratos evaluados y en las ecuaciones 1-9, los modelos ajustados con los términos significativos para cada respuesta, en cada matriz. En ella se observa la significancia del modelo, y la no significancia de la carencia de ajuste, lo cual indica un buen manejo, independencia y homogeneidad de las variables.

Tabla 5: ANOVA para las dos variables respuestas del diseño factorial central compuesto en la etapa de la eliminación de la proteína del tejido conectivo para la piel, escamas y espinas de la tilapia roja.

Factor	Valor P								
	Escamas			Espinias			Piel		
	% Pm	% Cm	Cph (mg/mL)	% Pm	% Cm	Cph (mg/mL)	% Pm	% Cm	Cph (mg/mL)
Modelo	<0,0001	0,0001	0,0004	< 0,0001	< 0,0001	0,0040	0,0015	< 0,0001	< 0,0001
A- NaOH	0,0002	0,0097	0,0468	< 0,0001	< 0,0001	0,0003	0,0006	0,0001	< 0,0001
B-Tem	0,0004	<0,0001	-----	0,0004	< 0,0001	0,0862	0,0185	0,0005	< 0,0001
AB	-----	-----	-----	< 0,0001	< 0,0001	0,6153	0,0059	-----	0,0568
A ²	-----	-----	0,0010	-----	0,0007	0,0232	0,0148	-----	0,9244
B ²	0,0004	0,0166	-----	0,8524	-----	0,9766	-----	-----	0,0001
A ² x B	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	< 0,0001
A x B ²	-----	-----	-----	0,0053	-----	0,0036	-----	-----	0,0239
Error de ajuste	0,2544	0,1041	0,4027	0,1622	0,4501	0,0644	0,3740	0,9661	0,0573
R ²	0,9156	0,894	0,8558	0,9906	0,997	0,9235	0,8952	0,8818	0,9981
Ajuste R ²	0,8875	0,8586	0,8198	0,9827	0,995	0,8471	0,8353	0,8555	0,9954

$$\%Pm (\text{Escamas}) = + 66,385 - 16,034 * \text{Concentracion NaOH} + 1,725 * \text{Tem} - 0,041 * \text{Tem}^2 \quad (1)$$

$$\%Cm (\text{Escamas}) = + 9,204 + 3,684 * \text{Concentracion NaOH} - 0,158 * \text{Tem} + 9,388E-003 * \text{Tem}^2 \quad (2)$$

$$\text{Cph} (\text{Escamas}) = + 25,815 - 58,823 * \text{Concentracion NaOH} + 134,611 * \text{Concentracion} \quad (3)$$

$$\%Pm (\text{Espinias}) = + 17,610 - 4,834 * \text{NaOH} + 0,147 * \text{Tem} - 0,462 * \text{NaOH} * \text{Tem} - 7,794E-003 * \text{Tem}^2 + 0,031 * \text{NaOH} * \text{Tem}^2 \quad (4)$$

$$\%Cm (\text{Espinias}) = + 6,974 - 0,252 * \text{NaOH} + 0,021 * \text{Tem} + 0,123 * \text{NaOH} * \text{Tem} + 3,349 * \text{NaOH}^2 \quad (5)$$

$$\text{Cph} (\text{Espinias}) = + 158,372 - 160,929 * \text{NaOH} - 4,376 * \text{Tem} + 18,051 * \text{NaOH} * \text{Tem} + 66,840 * \text{NaOH}^2 + 0,126 * \text{Tem}^2 - 0,506 * \text{NaOH} * \text{Tem}^2 \quad (6)$$

$$\%Pm (\text{Piel}) = + 80,432 - 206,542 * \text{NaOH} - 1,443 * \text{Tem} + 4,336 * \text{NaOH} * \text{Tem} + 173,583 * \text{NaOH}^2 \quad (7)$$

$$\%Cm (\text{Piel}) = + 5,450 + 3,454 * \text{NaOH} + 0,058 * \text{Tem} \quad (8)$$

$$\text{Cph} (\text{Piel}) = + 200,574 - 813,366 * \text{NaOH} - 5,165 * \text{Tem} + 46,732 * \text{NaOH} * \text{Tem} + 2083,177 * \text{NaOH}^2 + 0,011 * \text{Tem}^2 - 19,187 * \text{NaOH}^2 * \text{Tem} + 0,416 * \text{NaOH} * \text{Tem}^2 \quad (9)$$

Se observa que el factor NaOH en su forma lineal es el más influyente en la liberación o hidrolizado de proteínas del tejido conectivo (Cph) en las tres matrices estudiadas, mientras la Tem, solo fue influyente para Cph en piel y espinas. Esto debido que el NaOH siendo un agente irritante que al entrar en contacto con las proteínas de los tejidos vivos produce su rompimiento, al estar más concentrado en el medio se aceleraría la reacción, sin embargo no se puede exceder en la concentración del agente hidrolizante, ya que luego de la hidrólisis los aminoácidos y péptidos más pequeños se liberan al medio acuoso, pero al ser una base fuerte podría también hidrolizar la molécula de colágeno a pesar de ser una molécula fibrosa y resistente (Magrama, 2012). Este efecto acompañado de un incremento de la Tem puede afectar las moléculas de colágeno presentes en la matriz (Mohammadi *et al.*, 2016). Por otro lado Tem tanto en su forma cuadrática como lineal, al igual que NaOH y algunas interacciones entre ellas, si fueron influyentes en el contenido de proteína (%Pm) y colágeno (%Cm) presente en las matrices luego del proceso de hidrolizado, variables respuesta que son de relevancia para continuar con el proceso de obtención del colágeno.

Optimización de la extracción de las proteínas de tejido conectivo.

Los modelos de las ecuaciones 1-9 se sometieron a un proceso de optimización para predecir los valores de los factores que maximizaban el parámetro Cph y %Cm, debido que estos representan las proteínas del tejido conectivo hidrolizadas por el NaOH y el colágeno que permanece en la matriz sólida, que son los objetivos de esta etapa del proceso (Liu *et al.*, 2015). En la Tabla 6 se presentan los valores máximos

locales de la variable Cph y los predichos para %Pm y % Cm, los valores de cada uno de los factores que los definen con su respectiva deseabilidad, la cual es un compromiso entre los valores extremos de cada respuesta. También se presentan los resultados experimentales obtenidos a las condiciones óptimas predichas, junto con el sesgo relativo obtenido.

Tabla 6: máximos locales predichos en la optimización de la hidrólisis básica de proteínas del tejido conectivo en piel, escamas y espinas de tilapia roja aplicando un diseño factorial central compuesto.

Muestra		NaOH	Tem	% Pm	% Cm	Cph (mg/mL)	Deseabilidad
Piel	Predicho	0,39	25,00	32,39	8,25	182,26	0,951
	Experimental	0,40	25,00	37,46	7,03	191,67	
	Sesgo relativo (%)	16,22	-14,58	4,96			
Escamas	Predicho	0,40	25,00	77,42	12,57	23,83	0,92
	Experimental	0,40	25,00	74,42	12,34	23,68	
	Sesgo relativo (%)	-3,86	-1,84	-0,53			
Espinass	Predicho	0,40	24,99	17,57	9,166	128,10	1,00
	Experimental	0,40	25,00	16,39	8,94	128,44	
	Sesgo relativo (%)	-7,15	-2,52	0,26			

Los datos obtenidos en el sesgo relativo demuestran que los datos simulados por el modelo optimizado en el diseño experimental se ajustan a los datos experimentales, deduciendo que los modelos ajustados son válidos para la predicción del comportamiento del hidrolizado de las proteínas del tejido conectivo en las pieles, escamas y espinas de tilapia roja. Por otro lado es de interés que se hayan obtenido los mismos rangos de los factores para las tres matrices, a pesar de que el rango de dichos factores era suficientemente amplio, lo cual indica la apropiada selección del rango de estudio, particularmente en el caso del NaOH. En este caso se requiere que se tenga máximo Cph y máximo % Cm, mientras que % Pm, por contener proteínas del tejido conectivo y colágeno, no se puede maximizar. El hecho de que la deseabilidad se aleje de la valor 1 en algunos casos, se debe a que no es posible alcanzar los valores deseados para todas las respuestas simultáneamente, por lo que se observan sesgos negativos en variables en las que lo deseable es cero o sesgo positivo. Debido a que este parámetro define qué tanto se pudo lograr lo que se deseaba en el ensayo.

Efecto de los factores en la Hidrólisis acida para obtención de colágeno.

El diseño de experimentos planteado en esta etapa permitió estudiar el efecto de la Tem y CH₃-COOH en la liberación del colágeno presente en la piel, escama y espinas de la tilapia roja. En la Tabla 7 se muestran los resultados del % de colágeno obtenidos después del tiempo de hidrólisis acida en cada matriz. Estos resultados se emplearon en el ajuste de modelos polinomiales para cada respuesta en cada matriz, cuyos coeficientes fueron calculados por regresión múltiple. En la Tabla 8, se presenta el análisis de varianza (ANOVA) para el diseño factorial, donde se entrega el valor P para cada uno de los modelos obtenidos en cada respuesta para cada matriz evaluada; y en las ecuaciones 10, 11 y 12, los modelos ajustado con los términos significativos.

Tabla 7: Porcentaje de colágeno extraído en la hidrólisis acida en la piel, escamas y espinas de tilapia roja aplicando un diseño factorial central compuesto.

Ensayo	Concentración CH ₃ -COOH (M)	Tem (°C)	% CI		
			Escamas	Espinass	Pieles
1	0,50	17,50	2,15	0,45	0,57
2	0,22	17,50	1,66	0,38	0,36
3	0,70	10,00	3,16	0,51	0,41
4	0,50	17,50	2,60	0,42	0,65
5	0,70	25,00	2,12	0,56	0,55
6	0,50	17,50	2,50	0,44	0,61
7	0,78	17,50	2,81	0,62	0,88
8	0,50	6,89	2,50	0,42	0,34
9	0,30	10,00	1,82	0,44	0,41
10	0,30	25,00	2,98	0,44	0,57
11	0,50	17,50	2,30	0,46	0,66
12	0,50	28,11	2,11	0,49	0,57
13	0,50	17,50	2,40	0,45	0,56

En la Tabla 8 se observa que hay efecto estadísticamente significativo para CH₃-COOH y Tem tanto en sus términos lineales como en la interacción cuadrática entre ellos, para las tres matrices estudiadas; escamas, espinas y piel de tilapia roja. En la figura 1^a se observa el comportamiento gráfico de la variable respuesta en función de los factores, para cada matriz. La figura 1A representa el comportamiento en escamas, en esta figura al seguir el curso sobre el eje de Tem mínima la respuesta crece con el aumento de la concentración de ácido (CH₃-COOH), mientras que en el eje de máxima concentración de ácido, la respuesta crece con el descenso en la Tem. En las zonas intermedias de la superficie se tiene una concavidad hacia abajo, indicando que en las regiones intermedias de ambas variables se pueden alcanzar valores altos de la respuesta, esto se debe a que el término de segundo orden tiene signo contrario que el de los términos lineales (ecuación 10). El comportamiento de los términos lineales en dicha ecuación, se pueden explicar porque en el rango de trabajo, al aumentar la Tem o el agente hidrolizante, se puede acelerar la reacción de rompimiento favoreciendo la extracción, por otro lado, si se aumentan simultáneamente la Tem y el agente hidrolizante, se podría generar el rompimiento de la molécula de colágeno (Nagai , 2000).

Tabla 8: ANOVA para las dos variables respuestas del diseño factorial central compuesto en la etapa de obtención de colágeno para la piel, escamas y espinas de la tilapia roja.

Factor	Valor P % CI		
	Escamas	Espinas	Piel
Modelo	0,0002	< 0,0001	0,0003
A-Concentracion CH ₃ -COOH	0,0003	< 0,0001	< 0,0001
B-Tem	0,0284	0,0013	0,0015
AB	0,0065	-----	0,8237
A ²	-----	0,0276	-----
B ²	-----	-----	0,0011
A x B ²	-----	-----	0,0006
Ajuste de error	0,7806	0,1094	0,4749
R ²	0,9070	0,9412	0,9447
R ² ajustado	0,8727	0,9216	0,9053

$$CI (\text{Escamas}) = -0,208 + 5,820 * CH_3\text{-COOH} + 0,0923 * Tem - 0,227 * CH_3\text{-COOH} * Tem \quad (10)$$

$$CI (\text{Espinas}) = +0,44 + 0,084 * CH_3\text{-COOH} + 0,036 * Tem + 0,022 * CH_3\text{-COOH}^2 \quad (11)$$

$$CI (\text{Piel}) = + 0,60 + 0,18 * CH_3\text{-COOH} + 0,081 * Tem - 5,206E-003 * CH_3\text{-COO} * Tem - 0,090 * Tem^2 - 0,019 * CH_3\text{-COOH} * Tem^2 \quad (12)$$

En el caso de las espinas se observa un comportamiento similar al de las escamas, solo que en este caso se tiene un efecto de segundo orden de la concentración de ácido (ecuación 11), lo cual se puede explicar del mismo modo que en las escamas, porque ambas variables ejercen efecto positivo sobre la extracción de colágeno, como puede apreciarse en la figura 1B. Es decir en esta matriz al igual que en las escamas, al incrementar la Tem y la concentración de ácido se favorece la liberación de colágeno desde la fase sólida.

En la piel se observa un comportamiento con mayor grado de complejidad que en las dos matrices anteriores, ambos factores tienen efectos positivos en sus términos lineales, pero se presentan una serie de interacciones de segundo y tercer orden, con signos contrarios, que se traduce en lo que se observa en la figura 1C, en la cual aparecen regiones con puntos de máximos y regiones con puntos de mínimos. En general el ácido favorece la liberación del colágeno, pero en la región de bajas concentraciones se observa un mínimo en los valores intermedios de Tem, mientras que en los valores altos de la concentración de ácido, se obtiene un punto de máxima también en los valores medios de Tem, el cual se puede explicar si se asume que la Tem y el ácido pueden favorecer la liberación del colágeno, pero a altas concentraciones de ácido, existe un valor de Tem por encima de la cual el colágeno puede verse afectado de manera negativa, es decir, aunque se libere en mayor medida de la matriz sólida, puede estarse acercando a Tem de desnaturalización (Nagai, 2000), bajo esas condiciones de acidez. En relación al efecto de la Tem sobre la desnaturalización del colágeno, es importante considerar que la Tem de desnaturalización del colágeno de peces de aguas fría es menor que la que presenta los peces de aguas tropicales, por ejemplo en el caso de escamas de *Labeo rohita* (Rohu) y *Catla catla* (Catla), se pueden alcanzar Tem de hasta 36,5°C (Nagai, 2000; Pati, 2010).

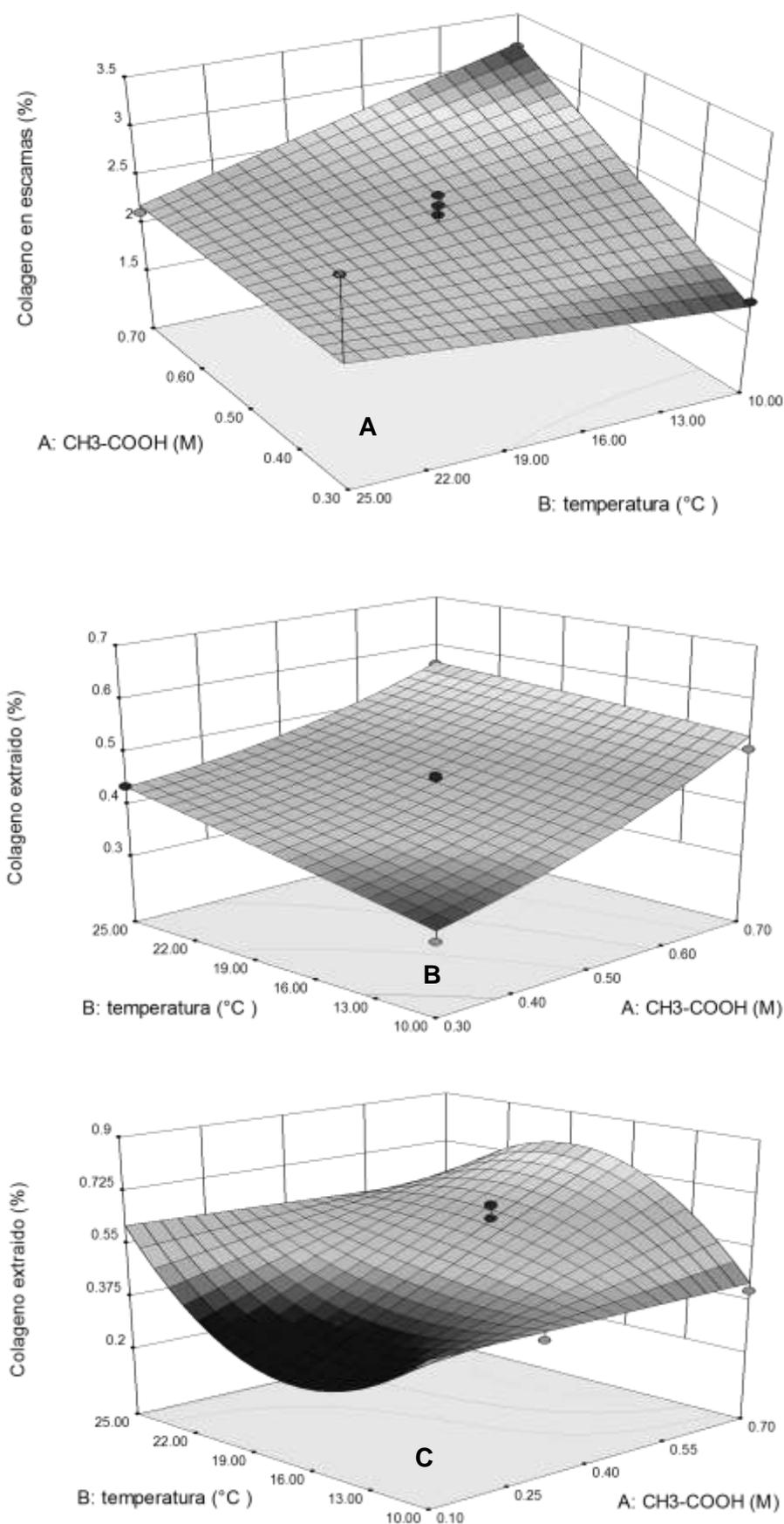


Fig. 1: Superficie de respuesta para los efectos de Tem (°C) y concentración de ácido acético (M) sobre: (A) % de colágeno extraído en escamas de tilapia roja; (B) % de colágeno extraído en espinas de tilapia roja y (C) % de colágeno extraído de pieles de tilapia roja.

Optimización de la extracción de colágeno.

Los modelos de las ecuaciones 10, 11 y 12 se sometieron a un proceso de optimización para predecir los valores de los factores que maximizaran la variable respuesta % de colágeno extraído (%CI). En la Tabla 9 se presentan los valores máximos locales de la variable respuesta y los valores de cada uno de los factores que los definen con su respectiva deseabilidad, además, se presentan los resultados experimentales obtenidos a las condiciones óptimas predichas, junto con el sesgo relativo obtenido.

Tabla 9: máximos locales predichos en la optimización de la extracción de colágeno a partir de piel, escamas y espinas de tilapia roja aplicando un diseño factorial central compuesto.

Muestra		CH ₃ -COOH	Tem	CI (%)	Deseabilidad
Piel	Predicho	0,70	18,52	1,49	0,84
	Experimental	0,70	18,50	1,59	
	Sesgo relativo (%)			6,87	
Escamas	Predicho	0,70	10,33	2,16	0,99
	Experimental	0,70	10,00	1,56	
	Sesgo relativo (%)			-19,48	
Espinass	Predicho	0,70	21,47	0,57	0,85
	Experimental	0,70	21,50	0,54	
	Sesgo relativo (%)			-5,06	

Los datos obtenidos en el sesgo relativo demuestran que los datos simulados por el modelo optimizado en el diseño experimental se ajustan a los datos experimentales, deduciendo que los modelos obtenidos son válidos para la predicción del comportamiento de la liberación de colágeno en las pieles, escamas y espinas de tilapia roja.

Caracterización parcial del colágeno obtenido.

El colágeno obtenido presentaba una consistencia viscosa y un color blanco, mientras la solución filtrada era transparente. Los valores obtenidos en la caracterización fisicoquímica en los parámetros de humedad, hidroxiprolina y pH del colágeno, se muestran en la tabla 10, en la que cada valor se expresa media \pm Desviación estándar. Se observó que los resultados para la hidroxiprolina, el contenido de sólidos y el pH del colágeno obtenido tanto de las escamas, espinas y piel de tilapia roja cumplen con los parámetros establecidos por la NTC 3750 (ICONTEC, 2002).

Tabla 10: Caracterización parcial del colágeno obtenido a partir de escamas, piel y espinas de tilapia roja (*Oreochromis spp*)

Composición	Escamas			Piel			Espinass		
Hidroxiprolina (%)	0,23	\pm	0,07	0,30	\pm	0,09	0,29	\pm	0,12
Humedad (%)	96,01	\pm	0,04	95,14	\pm	0,10	95,67	\pm	0,05
pH	3,12	\pm	0,08	3,50	\pm	0,06	3,02	\pm	0,04

CONCLUSIONES

Es posible optimizar el proceso de obtención de colágeno a partir de escamas, espinas y pieles de tilapia roja, en función de la temperatura y la concentración de los agentes químicos utilizados (NaOH y CH₃-COOH). El colágeno obtenido de las tres zonas anatómicas de la tilapia roja (*Oreochromis spp*) bajo las condiciones del presente trabajo, cumple con la norma técnica Colombiana (NTC) 3750.

AGRADECIMIENTOS

Los autores del presente trabajo dan las gracias a la Gobernación de Antioquia, al Sistema General de Regalías de Colombia, a COLCIENCIAS y a la estrategia de sostenibilidad 2014-2015 del Comité para el Desarrollo de la Investigación en la Universidad de Antioquia (CODI), por el apoyo financiero entregado.

REFERENCIAS

Almeida, P. F.; Silva, J. R.; Lannes, S. C. S.; Farias, T. M. B.; Santana, J. C. C. Quality assurance and economical feasibility of an innovative product obtained from a byproduct of the meat industry in Brazil. doi: 10.5897/AJBM2013.6977, African J. Business Management. Vol. 7(27), pp. 2745- 2756, 21 July, (2013)

AOAC. official methods of analysis (16th ed.). Washington,DC, EU, (1995).

Bae, I., Osatomi, K. y otros autores, Biochemical properties of acid-soluble collagens extracted from the skins of underutilised fishes, doi:10.1016/j.foodchem.2007.10.039, Food Chemistry, 108(1), 49–54, (2008)

Benjakul, S. y Morrissey, M. T., Protein Hydrolysates from Pacific Whiting Solid Wastes, doi: 10.1021/jf970294g, Journal of Agricultural and Food Chemistry(en línea), 45(9), 3423–3430, (1997)

Chalamaiah, M., Dinesh Kumar, B. y otros autores, Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review, doi:10.1016/j.foodchem.2012.06.100 , Food Chemistry(en línea), 135(4), 3020–3038, (2012)

Chuesiang, P. y Sanguandeeikul, R., Protein hydrolysate from tilapia frame: antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitor properties, doi: 10.1111/ijfs.12762, International Journal of Food Science and Technology(en línea), 50(6), 1436–1444, (2015)

El R., A., Gad, A. y otros autores, Chemical and biological evaluation of Egyptian Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish scale collagen. International journal of biological macromolecules, 79, 618-626, (2015)

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). National Aquaculture Sector Overview: China. National Aquaculture Sector Overview: China, (2006)

FINAGRO. Fondo para el financiamiento del sector Agropecuario. Perspectiva del sector agropecuario Colombiano, (2014)

Gómez, M. C., Gimenez, B., y otros autores, Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review, doi:10.1016/j.foodhyd.2011.02.007, Food Hydrocolloids (en línea), 25(8), 1813–1827, (2011)

Hemung, B., Properties of Tilapia Bone Powder and Its Calcium Bioavailability Based on Transglutaminase Assay, doi: 10.7763/IJBBB.2013.V3.219, International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics(en línea), 3(4), 306-309, (2013)

Huang, C., Kuo, J. y otros autores, Isolation and characterization of fish scale collagen from tilapia (*Oreochromis sp.*) by a novel extrusion hydro extraction process. Food chemistry, 190, 997-1006, (2016)

Hsu, K. C., Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product, doi:10.1016/j.foodchem.2010.02.013, Food Chemistry(en línea), 122(1), 42–48, (2010)

ICONTEC, Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. NTC 3750, Productos para a industria cosmetica. Colageno soluble, (2002)

Ikoma, T., Kobayashi, H. y otros autores, Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticus*, doi:10.1016/S0141-8130(03)00054-0, International journal of biological macromolecules(en línea), 32(3), 199-204, (2003)

Jae, J., Qian, Y. y otros autores, Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis, doi:10.1016/j.procbio.2007.02.006, Process Biochemistry (en línea), 42(5), 840–846, (2007)

Liu, D., Zhang, X. y otros autores, Extraction and characterization of acid- and pepsin-soluble collagens from the scales, skins and swim-bladders of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), doi:10.1016/j.fbio.2014.12.004, Food Bioscience(en línea), 9, 68–74, (2015)

Liu, D., Zhou, P. y otros autores, Comparison of acid-soluble collagens from the skins and scales of four carp species, doi:10.1016/j.foodhyd.2014.04.030, Food Hydrocolloids(en línea), 41, 290–297, (2014)

Liu, H. y Huand, K., Structural Characteristics of Extracted Collagen from Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) Bone: Effects of Ethylenediaminetetraacetic Acid Solution and Hydrochloric Acid Treatment. International Journal of Food Properties, 19(1), 63-75, (2016)

MAGRAMA. Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente (Gobierno de España). Guía para el aprovechamiento de los subproductos de pescado para la obtención de productos funcionales y bioactivos. (2012)

MinAgricultura. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Diagnóstico del estado de la Acuicultura en Colombia, (2013)

- Minh Thuy, L. T., Okazaki, E. y Osako, K., Isolation and characterization of acid-soluble collagen from the scales of marine fishes from Japan and Vietnam, doi:10.1016/j.foodchem.2013.10.094, Food Chemistry(en línea), 149, 264–270, (2014)
- Mohammadi, R., Mohammadi, M. y otros autores, Extraction optimization of pepsin-soluble collagen from eggshell membrane by response surface methodology (RSM), doi:10.1016/j.foodchem.2015.05.073, Food Chemistry (en línea), 190, 186–193, (2016)
- Muyonga, J. H., Cole, C. G. B. y Duodu, K. G., Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*), doi:10.1016/j.foodchem.2003.06.006, Food Chemistry(en línea), 85(1), 81–89, (2004)
- Nagai, T., Araki, Y., y Suzuki, N., Collagen of the skin of ocellate puffer fish (*Takifugu rubripes*), doi:10.1016/S0308-8146(01)00396-X, Food chemistry(en línea), 78(2), 173-177, (2002)
- Nagai, T. y Suzuki, N., Isolation of collagen from fish waste material—skin, bone and fins, doi:10.1016/S0308-8146(99)00188-0, Food Chemistry (en línea), 68(3), 277-281, (2000)
- Pal, G., Nidheesh, T. y Suresh, P., Comparative study on characteristics and in vitro fibril formation ability of acid and pepsin soluble collagen from the skin of catla (*Catla catla*) and rohu (*Labeo rohita*). Food Research International, 76, 804-812, (2015)
- Pati, F., Adhikari, B. y Dhara, S., Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability, doi:10.1016/j.biortech.2009.12.133, Bioresource Technology(en línea), 101(10), 3737-3742, (2010)
- Sankar, S., Sekar, S. y otros autores, Preparation and partial characterization of collagen sheet from fish (*Lates calcarifer*) scales, doi:10.1016/j.ijbiomac.2007.08.003 International Journal of Biological Macromolecules(en línea), 42(1), 6–9, (2008)
- Serrano, C., Estandarización de un proceso de extracción de colágeno a partir de los residuos de fileteo de tilapia (*Oreochromis sp*) y cachama (*Piaractus brachyomus*), 5-65, Universidad Nacional de Colombia, Bogota, Colombia, (2011)
- Silva J. F. X., Ribeiro K. y otros autores, Utilization of tilapia processing waste for the production of fish protein hydrolysate, doi:10.1016/j.anifeedsci.2014.06.010, Animal Feed Science and Technology(en línea), 196, 96–106, (2014)
- Tang, L., Chen, S., Su, W. y otros autores , Physicochemical properties and film-forming ability of fish skin collagen extracted from different freshwater species. Process Biochemistry, 50(1), 148-155, (2015)
- Tirado, D., Acevedo, D. y Montero, P., Transferencia de Calor y Materia durante el Proceso de Freído de Alimentos: Tilapia (*Oreochromis niloticus*) y Fruta de Pan (*Artocarpus communis*), doi:18-07642015000100010, Inf. tecnol. (en línea), 26 (1), 85-94 (2015)
- Torres A., W., Pacheco, R. y otros autores, Caracterización parcial del colágeno extraído a partir del manto, aleta y tentáculos de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) partial characterization of collagen from mantle, fin, and arms of jumbo squid (*Dosidicus gigas*). CYTA-Journal of Food, 6(2), 101-108, (2008).
- Wang, B., Li, L., Chi, C. y otros autores, Purification and characterisation of a novel antioxidant peptide derived from blue mussel (*Mytilus edulis*) protein hydrolysate, doi: 2012.12.002, Food Chemistry(en línea), 138(2-3), 1713–1719, (2013)
- Wang, B., Li, Z. R. y otros autores, Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin and bone of Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*), doi:2012.10.001, Food Hydrocolloids(en línea), 31(1), 103–113, (2013)
- Yu, D., Chi, C. y otros autores, Characterization of acid-and pepsin-soluble collagens from spines and skulls of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*), doi:10.1016/S1875-5364(14)60110-2, Chinese Journal of Natural Medicines (en línea), 12(9), 712–720, (2014)
- Zeng, S., Zhang, C. y otros autores, Isolation and characterisation of acid-solubilised collagen from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), doi:10.1016/j.foodchem.2009.03.038, Food Chemistry (en línea), 116(4), 879–883, (2009)