



**UNIVERSIDAD
DE ANTIOQUIA**

**MODELAMIENTO DEL PROCESO DE
EXTRACCIÓN DE COLÁGENO A PARTIR DE
SUBPRODUCTOS PISCÍCOLAS MEDIANTE EL
USO DE MEMBRANAS DE FILTRACIÓN A
FLUJO CRUZADO**

Diego Enrique Giraldo Ríos

Universidad de Antioquia

Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias

Medellín, Colombia

2019



**Modelamiento del proceso de Extracción de colágeno a partir de subproductos
piscícolas mediante el uso de membranas de filtración a flujo cruzado**

Diego Enrique Giraldo Ríos

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Doctor en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias

Asesor:

José Edgar zapata Montoya, PhD

Línea de Investigación:

Aprovechamiento de subproductos

Grupo de Investigación:

Nutrición y Tecnología de Alimentos

Universidad de Antioquia

Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias.

Medellín, Colombia

2019

Dedicatoria

*A Dios que me ha dado más de lo que merezco
y a mi familia por su amor y apoyo
incondicional.*

Contenido

Contenido	4
Índice de figuras	8
Índice de tablas.....	10
Índice de imágenes	11
Glosario	12
Resumen.....	13
Abstract	14
1. INTRODUCCIÓN	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
3. OBJETIVOS.....	9
3.1. Objetivo General.....	9
1.2. Objetivos Específicos	9
2. MARCO TEÓRICO.....	9
4.1. Tilapia Roja (<i>Oreochromis sp</i>)	9
4.2. Trucha Arco Iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	11
4.3. Tilapia Nilótica (<i>oreochromis niloticus</i>).....	12
4.4. Colágeno	14
4.4.1. Estructura	14
4.4.2. Síntesis	16
4.4.3. Fuentes y Aplicaciones	17
4.5. Proceso de obtención del Colágeno	18
4.5.1. Lavado y acondicionamiento	19
4.5.2. Pretratamiento Alcalino	19
4.5.3. Desmineralización.....	20
4.5.4. Desengrasado	20
4.5.5. Extracción ácida.....	20
4.5.6. Precipitación.....	20
4.5.7. Diálisis	21

4.5.8. Filtración	21
4.5.9. Liofilización y caracterización	21
4.6. Extracción sólido-líquido.....	21
4.6.1. Generalidades	21
4.6.2. Transferencia de masa interfacial.....	23
4.6.3. Análisis macroscópico para transferencia de masa.....	23
4.6.4. Factores que afectan el proceso de extracción sólido-líquido en el pretratamiento alcalino.....	24
4.6.5. Modelos empíricos	26
4.6.6. Procedimiento general para el modelado de procesos	31
4.6.7. Ecuaciones para el modelo fenomenológico.....	31
4.6.8. Análisis dimensional y Similitud	40
5. METODOLOGÍA	42
5.1. Métodos Analíticos	42
5.1.1. Análisis Bromatológicos.....	42
5.1.2. Análisis de Proteína por el método de Lowry.....	42
5.1.3. Análisis de Colágeno.....	43
5.1.4. FTIR	43
5.1.5. SDS-PAGE.....	44
5.1.6. SEM	44
5.2. Caracterización de los subproductos de pescado	44
5.2.1. Piel de tilapia nilótica (PTN)	44
5.2.2. Escamas de tilapia Roja (ETR)	45
5.2.3. Espina dorsal de trucha (EDT).....	45
5.3. Selección del mejor subproducto	45
5.3.1. Obtención de colágeno a partir de ETR	46
5.3.2. Obtención de colágeno a partir de EDT	47
5.3.3. Obtención de colágeno a partir de PTN	47
5.3.4. Comparación de los tres subproductos.....	47

5.4. Implementación del proceso de obtención de colágeno a partir del mejor subproducto (PTN)	48
5.4.1. Implementación del pretratamiento alcalino, para el mejor subproducto (PTN).....	48
5.4.2. Modelado del pretratamiento alcalino.....	53
5.4.3. Escalado del pretratamiento alcalino mediante análisis dimensional.	57
5.4.4. Implementación de la extracción ácida	57
5.4.5. Modelado de la extracción ácida.....	59
5.4.6. Escalado de la extracción ácida.....	59
5.4.7. Filtración tangencial.....	59
5.4.8. Liofilización	62
6. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	62
6.1. Caracterización de los subproductos.....	62
6.2. Selección del mejor subproducto	63
6.2.1. Obtención de colágeno a partir de ETR	63
6.2.2. Obtención de colágeno a partir de EDT	64
6.2.3. Obtención de colágeno a partir de PTN	64
6.2.4. Comparación de los rendimientos de Extracción.....	65
6.3. Implementación del tratamiento alcalino de la PTN	65
6.3.1. Determinación de la velocidad de extracción	66
6.3.2. Determinación de los tiempos de extracción	66
6.3.3. Análisis de la concentración de base.....	67
6.3.4. Diseños experimentales del primer pretratamiento alcalino	68
6.3.5. Segundo pretratamiento alcalino.....	74
6.4. Análisis cinético, modelado y escalado del pretratamiento alcalino	77
6.4.2. Análisis cinético de la primera extracción alcalina.....	77
6.4.3. Modelado del primer pretratamiento alcalino	80
6.4.4. Escalado del primer pretratamiento alcalino.....	91
6.4.5. Modelado del segundo pretratamiento alcalino	94

6.4.6. Modelo general.....	94
6.5. Extracción ácida de la PTN desproteinizada	95
6.5.1. Determinación de las condiciones de extracción	95
6.5.2. Diseño central compuesto	95
6.6. Análisis cinético, modelado y escalado de la extracción ácida	98
6.6.2. Análisis cinético	98
6.6.3. Modelado	101
6.6.4. Escalado	103
6.7. Filtración tangencial	104
6.7.1. Filtración del extracto ácido a través de la membrana de 10 kDa	105
6.7.2. Modelado de la filtración en la membrana de 50 kDa.	108
6.8. Liofilización y caracterización del colágeno	111
6.8.1. Liofilización	111
6.8.2. SDS-PAGE.....	112
6.8.3. FTIR	113
6.8.4. SEM	114
Conclusiones	114
7. REFERENCIAS	117

Índice de figuras

Figura 1. Producción pesquera mundial y cantidades destinadas a exportación (FAO, 2018)	5
Figura 2. Producción Acuícola en Colombia (Merino, 2018)	5
Figura 3. Diagrama de Flujo del proceso de extracción de colágeno ácido soluble a partir de subproductos de pescado.	18
Figura 4. Diagrama del sistema de filtración tangencial	60
Figura 5. Concentración de proteína no colagenada (PNC) en función de la velocidad de agitación (Temperatura (T) = 10 °C, concentración de NaOH (C_b) = 0.5 M, tamaño (L) = 5 cm, tiempo (t) = 5 h). Las barras de error representan la desviación estándar.	66
Figura 6. Concentración de proteína no colagenada (PNC) vs. el tiempo para la primera, segunda y tercera etapa de extracción alcalina (T = 10 °C, C_b = 0.7 M, L = 1 cm). Las barras de error representan las desviaciones estándar.	67
Figura 7. Pérdidas de colágeno en el primer pretratamiento alcalino a altas concentraciones de base ($L=1$ cm, $T=20$ °C, $R'=30$ mL g ⁻¹)	68
Figura 8. Superficie de respuesta para: EPNC (%) en función de L y C_b (A), EPNC (%) en función de C_b y T (B), PC en función de L y C_b (C), y PC en función de T y C_b (D).....	74
Figura 9. Superficie de respuesta para EPNC (%) en función de T (°C) y C_b (M) para el segundo pretratamiento alcalino.	77
Figura 10. Predicción de la cinética de la primera extracción alcalina mediante el MSO y efecto de la concentración (C_b), temperatura (T) y tamaño de PTN (L) sobre la concentración de la PNC (CPNC). (A), (B), (C) para $L = 5$ cm; (D), (E), (F) para $L=3$ cm; (G), (H), (I) para $L=1$ cm.	78
Figura 11. Efecto de la concentración C_b y del tamaño L sobre el EPNC (%) en la primera desproteínización alcalina a $T=20$ °C, $N=400$ rpm y $R' = 33.33$ mL g ⁻¹	79
Figura 12. Predicción de la concentración de la PNC (CPNC) en la primera extracción alcalina mediante el modelo fenomenológico. (A), (B), (C) para $T = 10$ °C, (D), (E), (F) para 15 °C, (G), (H), (I) para 20 °C. $R' = 33.33$ mL g ⁻¹ a 400 rpm.	83
Figura 13. Predicción de la concentración de la PNC (C_{PNC}) en la primera extracción alcalina mediante el modelo general a 10 °C, 15 °C y 20 °C. $R' = 33.33$ mL g ⁻¹ a 400 rpm.	87
Figura 14. Comparación de la evolución de C_{PNC} a 200 mL y 2000 mL. Las barras de error representan las DE ($n=3$).....	93
Figura 15. Comparación de las PC a 200 mL y 2000 mL para la primera extracción alcalina a las condiciones óptimas. Las barras de error representan las DE ($n=3$).....	93
Figura 16. Superficie de respuesta de la extracción ácida de colágeno. $T=20$ °C la de la izquierda y $R'=40$ (mL g ⁻¹) la de la derecha.....	97

Figura 17. Predicción de la C_{COL} en la extracción ácida mediante el MDS a una $T=15\text{ }^{\circ}\text{C}$, $R'=50\text{ mL g}^{-1}$ y $C_{AC}=0.55\text{ M}$ en función del tiempo. Las barras de error representan las desviaciones estándar para $n=6$. R' : relación entre el volumen de la solución de ácido acético y la masa de PTN desproteínizada (mL g^{-1}).	98
Figura 18. Predicción de la C_{COL} en la extracción ácida mediante el MDS a $C_{AC}=0.30\text{ M}$ en función del tiempo y efecto de R' y T sobre el proceso de extracción ácida. R' : relación entre el volumen de la solución de ácido acético y la masa de PTN desproteínizada(mL g^{-1}).....	99
Figura 19. Predicción de la C_{COL} en la extracción ácida mediante el MDS a $C_{AC}=0.80\text{ M}$ en función del tiempo. R' : relación entre el volumen de la solución de ácido acético (mL) y la masa de PTN desproteínizada (g).	100
Figura 20. Predicción de la C_{COL} en la extracción ácida mediante el MDS a $T=15\text{ }^{\circ}\text{C}$ en función del tiempo. R' : relación entre el volumen de la solución de ácido acético (mL) y la masa de PTN desproteínizada (g). .	100
Figura 21. Predicción de la C_{COL} en la extracción ácida mediante el MDS a $C_{AC}=0.55\text{ M}$ y $R'=50$ en función del tiempo. R' : relación entre el volumen de la solución de ácido acético (mL) y la masa de PTN desproteínizada (g).	101
Figura 22. Escalado de la extracción ácida en el punto óptimo ($T=20\text{ }^{\circ}\text{C}$ $C_{AC}=0.787\text{ M}$ y $R'=40\text{ mL/g}$)	103
Figura 23. Calibración de la membrana de 10 kDa	104
Figura 24. Calibración de la membrana de 50 kDa	105
Figura 25. Filtración tangencial de 500 g de extracto ácido de colágeno a las condiciones óptimas ($T=20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $C_{AC}=0.783\text{ M}$ y $R'=40$) con membrana de 10 kDa hasta 125 g de concentrado a una PTM de 2 bar	105
Figura 26. Filtración tangencial de 500 g de extracto ácido de colágeno en membrana de 10 kDa hasta 125 g de concentrado a una PTM de 2 bar	106
Figura 27. Diafiltración de 125 g de concentrado en membrana de 10 kDa a PTM de 2 bar agregando agua hasta 1250 g.....	107
Figura 28. Diafiltración de 125 g de concentrado en membrana de 10 kDa a PTM de 2 bar hasta obtener 1250 g de permeado.	108
Figura 29. Filtración de 300 g del extracto ácido de colágeno en la membrana de 50 kDa a diferentes PTM para aumentar su concentración en un factor de 10.....	109
Figura 30. Diafiltración de 900 g de retenido de colágeno en la membrana de 50 kDa hasta obtener 900 g de permeado a una PTM de 2.5 bar	110
Figura 31. Filtración de 900 g del retenido obtenido de la diafiltración en la membrana de 50 kDa hasta 90 g.	111
Figura 32. ATR-FTIR Análisis del colágeno ácido soluble liofilizado extraído a partir de PTN.....	113

Índice de tablas

Tabla 1. Condiciones de operación de las principales etapas del proceso de extracción de colágeno a partir de piel de tilapia nilótica (PTN) reportadas por algunos autores _____	7
Tabla 2. Trabajos sobre modelado de cinética de extracción sólido-líquido _____	8
Tabla 3. Clasificación taxonómica de la Tilapia roja (Acosta-Villota, 2017) _____	10
Tabla 4. Clasificación taxonómica de la Trucha arcoíris (Roberts & Shepherd, 1974). _____	11
Tabla 5. Clasificación taxonómica de la Tilapia nilótica (Rivas-Barragán, 2017) _____	13
Tabla 6. Proceso de extracción de colágeno para cada uno de los tres subproductos a 8 °C _____	46
Tabla 7. Variables involucradas en el primer pretratamiento alcalino _____	57
Tabla 8. Análisis Próximo de los tres subproductos _____	63
Tabla 9. Rendimiento del colágeno extraído de los diferentes subproductos _____	65
Tabla 10. Variables de respuesta para cada tratamiento del diseño factorial (DF) del primer pretratamiento _____	69
Tabla 11. Análisis de varianza para la primera desproteínización alcalina _____	70
Tabla 12. Variables de respuesta para cada tratamiento del diseño central compuesto (DCC) del primer pretratamiento alcalino. _____	73
Tabla 13. Variables de respuesta del DCC en el segundo pretratamiento alcalino _____	76
Tabla 14. Parámetros del MSO en el DF del primer pretratamiento alcalino _____	81
Tabla 15. Parámetros del MDP y del MDS en el DF del primer pretratamiento alcalino _____	82
Tabla 16. Parámetros del Modelo Fenomenológico en el DF del primer pretratamiento alcalino _____	84
Tabla 17. Validación del modelo general de la primera extracción alcalina _____	86
Tabla 18. Parámetros del MSO y MDP para el DCC del primer pretratamiento alcalino _____	88
Tabla 19. Parámetros del modelo de dos sitios (MDS) para el primer pretratamiento alcalino con base en el DCC _____	89
Tabla 20. Comparación de modelos empíricos en el DCC del primer pretratamiento alcalino _____	90
Tabla 21. Determinación números adimensionales para el escalado del primer pretratamiento alcalino _____	91
Tabla 22. Comparación de la primera extracción alcalina a las condiciones óptimas en ambas escalas _____	92
Tabla 23. Parámetros de los modelos empíricos de la segunda desproteínización alcalina _____	94
Tabla 24. Variable de respuesta ECOL ₃ de la extracción ácida de colágeno _____	96
Tabla 25. Análisis ANOVA del DCC de la Extracción ácida _____	96
Tabla 26. Parámetros de los modelos empleados en la extracción ácida _____	102
Tabla 27. Parámetros del modelo de filtración _____	110

Índice de imágenes

Imagen 1. Morfología externa de la tilapia roja (<i>Oreochromis</i> sp) (Castillo-Campos, 2011)	10
Imagen 2. Escamas de tilapia roja (ETR)	11
Imagen 3. Morfología externa de la Trucha arcoíris	12
Imagen 4. Espina dorsal de trucha (EDT)	12
Imagen 5. Morfología externa de la tilapia nilótica (<i>Oreochromis</i> sp)	13
Imagen 6. Piel de tilapia nilótica (PTN) cortada sin residuos de músculo	14
Imagen 7. A la izquierda: estructura de la alfa-hélice. A la derecha: estructura de las hojas plegadas beta. A. Paralela B. Anti paralela (Meisenberg y Simmons 2018).	15
Imagen 8. Estructura química de la hidroxiprolina (izquierda) y la hidroxilisina (derecha)	16
Imagen 9. Mecanismos de bloqueo en la filtración tangencial. (a) Completo. (b) Intermedio. (c) Estándar. (d) Formación de torta.	36
Imagen 10. Identificación gráfica de los mecanismos de bloqueo. (a) Bloqueo completo. (b) Bloqueo estándar. (c) Bloqueo intermedio. (d) Formación de torta (Iritani y Katagiri, 2016).	37
Imagen 11. Principales etapas del proceso de extracción de CAS a partir de la PTN. DF:diseño factorial, DCC: diseño central compuesto.	48
Imagen 12. Etapas del proceso de obtención de colágeno a partir de ETR	64
Imagen 13. Etapas del proceso de obtención de colágeno a partir de EDT	64
Imagen 14. Obtención de colágeno a partir de PTN	65
Imagen 15. Colágeno liofilizado: A la izquierda filtrado y a la derecha diafiltrado.	112
Imagen 16. Electroforesis (SDS-PAGE) del colágeno extraído a las condiciones óptimas. A: filtrado, B: diafiltrado.	112
Imagen 17. Micrografías SEM del colágeno extraído a partir de PTN	114

Glosario

Colágeno: Es la proteína más abundante del cuerpo humano y está presente en animales terrestres y acuáticos. Posee una estructura de triple hélice.

Diálisis: Separación entre dos sustancias que se encuentran mezcladas en una misma disolución mediante una membrana con un tamaño de corte.

Filtración tangencial: Proceso de separación de un sólido suspendido en un líquido, haciendo recircular este último de manera tangencial a la superficie de una membrana porosa.

FTIR: Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier: utiliza la radiación infrarroja para el análisis de los componentes químicos de una muestra.

Modelo: Es una representación de un objeto o sistema, que tiene como propósito ayudar a explicar, entender o mejorar dicho sistema.

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio: técnica que sirve para determinar pesos moleculares.

SEM: Microscopio electrónico de barrido: Permite tomar fotos en alta resolución para visualizar microestructuras.

Tilapia: Es el nombre genérico con el que se denomina a un grupo de peces de origen africano, que consta de varias especies, algunas con interés económico, pertenecientes al género *Oreochromis*

Resumen

En este trabajo se estudió el proceso de extracción de colágeno a partir de tres subproductos de pescado: escamas de tilapia roja (ETR), espina dorsal de trucha (EDT) y piel de tilapia nilótica (PTN). En general, el proceso consistió en 4 etapas: desengrasado, pretratamiento alcalino, extracción ácida y filtración tangencial. Para seleccionar el mejor subproducto se compararon los rendimientos de extracción porcentuales de colágeno. El mejor subproducto resultó ser la PTN, con esta se estandarizó el proceso de extracción de colágeno mediante la implementación de diseños experimentales con el fin de establecer las condiciones óptimas del pretratamiento alcalino y de la extracción ácida mediante la metodología de superficie de respuesta. Adicionalmente se hizo un estudio cinético y se obtuvo un modelo fenomenológico (primera extracción alcalina) y varios empíricos (pretratamiento alcalino y extracción ácida) que mostraron una buena capacidad de predicción de los datos experimentales correspondientes a la concentración de la proteína no colagenada (PNC). Para el caso de la primera y segunda extracción alcalina fue posible construir un modelo general, basado en el modelo de segundo orden (MSO), que permitió estimar la concentración del soluto en términos de temperatura, tamaño de piel, concentración de NaOH y del tiempo. El modelo general fue ajustado para los 135 experimentos del diseño experimental de la primera extracción alcalina promediando un R^2 de 0.99. Adicionalmente, se realizó un escalado del pretratamiento alcalino y de la extracción ácida desde 200 mL hasta 2 L. El extracto ácido de colágeno obtenido se concentró mediante un proceso de filtración tangencial, la cual se modeló usando mediante teoría fundamentada en los mecanismos de bloqueo de poro y formación de torta, con una capacidad de ajuste aceptable. Así mismo, se hicieron diafiltraciones con el fin de obtener un colágeno que cumpliera con los requerimientos de la norma técnica colombiana. Finalmente, el colágeno obtenido se liofilizó y se caracterizó, resultando ser tipo I, el cual tiene aplicaciones en el campo farmacéutico y alimentario.

Palabras clave: Colágeno, Cinética, Modelado, subproductos de pescado, optimización

Abstract

In this work the collagen extraction process was implemented from three fish by-products: red tilapia scales (RTS), trout dorsal spine (TDS) and Nile tilapia skin (NTS). In general, the process consisted of four stages: defatted, alkaline pretreatment, acid extraction and cross flow filtration. In order to select the best by-product, the percentage yields of collagen extraction were compared and the NTS resulted to be the best. Then collagen extraction process from NTS was standardized through the implementation of experimental designs in order to establish the optimal conditions of alkaline pretreatment and acid extraction using response surface methodology. Additionally, a kinetic study was carried out and a phenomenological model (first alkaline extraction) and three empirical models (alkaline pretreatment and acid extraction) were developed and they showed a good prediction of the experimental data of the non-collagenous protein (NCP) concentration. In the case of the first and second alkaline extraction it was possible to build a general model, based on the second order model (SOM) which allowed estimating the liquid concentration of NCP in terms of temperature, skin size, NaOH concentration and time. This model was fitted with 135 experiments of experimental design in the first alkaline extraction averaging a R^2 of 0.99. Additionally, an alkaline pretreatment and acid extraction scaling up from 200 mL to 2 L was performed. The collagen acid extract obtained was concentrated by a cross flow filtration process, which was modeled using the theory of pore blocking and cake formation mechanisms, with a good prediction of the experimental data. Likewise, diafiltration were made in order to obtain a collagen that met the requirements of the Colombian technical standard. Ultimately, Freeze-dried collagen was analyzed by infrared spectroscopy, SEM and SDS-PAGE and it resulted to be a type I collagen, which has applications in the pharmaceutical and food industry.

Key words: collagen, kinetics, modeling, fish by-products, optimization

Nomenclatura

- A*: área a través de la cual se da la transferencia de masa (cm^2)
- A'*: factor pre-exponencial de Arrhenius para el Def
- B*: factor pre-exponencial de Arrhenius para *k* ($\text{mL g}^{-1} \text{h}^{-1}$)
- b*: constante de velocidad de ensuciamiento de la membrana
- C*: concentración de la sustancia que se difunde en el líquido (g mL^{-1})
- C_{AC}*: concentración molar de ácido acético (mol L^{-1}).
- C_b*: concentración molar de base (mol L^{-1})
- C_e*: concentración del soluto extraído en el líquido en equilibrio (mg mL^{-1})
- C_L*: concentraciones del soluto que se va a extraer en el líquido (mg mL^{-1})
- C_{Li}*: concentración del soluto en la interfase en el lado del líquido (mg mL^{-1})
- C_{NaCl}*: Concentración molar de NaCl (mol L^{-1})
- C_{PCR}*: concentración de PNC en equilibrio extraída de células intactas (vía lenta) (mg mL^{-1})
- C_i – C_e*: concentración hipotética de la PNC que queda en la piel si estuviera completamente disuelta en la solución extractora, en el equilibrio. (mg mL^{-1})
- C_{PCR}*: concentración de PNC en equilibrio extraída de células rotas (vía rápida) (mg mL^{-1})
- C_s*: concentración del soluto en el sólido en cualquier tiempo (% m/m)
- C_{si}*: concentración del soluto en la interfase por el lado del sólido (mg mL^{-1})
- C_{so}*: concentración del soluto en el sólido inicialmente (% m/m)
- C_i*: concentración del soluto en el líquido en cualquier tiempo (mg mL^{-1})
- D*: coeficiente de difusión molecular ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$)
- D_{ef}*: difusividad efectiva ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$)
- ε*: porosidad del sólido
- E_a*: energía de activación (kJ mol^{-1})
- F*: fracción másica del soluto extraído mediante el proceso por la vía rápida
- M_i*: flujo másico del componente *i* (g s^{-1})
- h*: velocidad de extracción inicial ($\text{mg mL}^{-1} \text{h}^{-1}$)
- J*: flujo volumétrico por unidad de área (flux) ($\text{mL m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
- J_o*: flujo volumétrico inicial por unidad de área ($\text{mL m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
- k*: constante de velocidad de extracción de segundo orden ($\text{mL g}^{-1} \text{h}^{-1}$)

K'_{eq} : constante de equilibrio con base en la extracción sólido-líquido referida al MDS.

K_1 : constante de velocidad de Peleg ($\text{h g sólido g}^{-1} \text{ soluto}$)

k_1 : constante de velocidad asociada a la vía rápida (h^{-1})

K_2 : constante de capacidad de Peleg ($\text{g sólido g}^{-1} \text{ soluto}$)

k_2 : constante de velocidad por la vía lenta (h^{-1})

K_{BIP} : constante de bloque intermedio de poro

K_f : parámetro auxiliar que simplifica el modelo de filtración tangencial

K_L : coeficiente de transferencia de masa en la fase líquida (m h^{-1})

K_m : coeficiente de transferencia de masa (m h^{-1})

K_p : coeficiente de partición.

K_r : constante de resistencia

K_S : coeficiente de transferencia de masa en la fase sólida (m h^{-1})

l : espesor de lámina (piel)

L : tamaño de piel en cm

μ_a : viscosidad del agua (Pa s)

n : índice de la serie de Fourier directamente proporcional al grado de convergencia

n' : orden de la cinética de disolución

nb : índice de bloqueo de poro

P_e : presión a la entrada de la membrana tangencial (bar)

P_s : presión a la salida de la membrana tangencial (bar)

PTM : presión transmembrana

R^{**}_c : parámetro auxiliar para simplificar el modelo de filtración

R^*_{BIP} : resistencia adimensional en el bloqueo intermedio de poro

R^*_c : resistencia adimensional debida a la formación de la torta

R : constante de gas ideal ($\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)

R' : volumen de solución extractora / masa de subproducto (mL g^{-1})

R_{BIP} : resistencia cuando ocurre el bloqueo intermedio de poro (m^{-1})

R_c : resistencia debida a la formación de la torta (m^{-1})

R_m : resistencia hidráulica de la membrana (m^{-1})

R_t : resistencia total al proceso de filtración (m^{-1})

T : temperatura en $^{\circ}\text{C}$

t : tiempo en h

τ : tortuosidad del sólido

t_1 : tiempo de filtración antes de que se empiece a formarse la torta (min)

T_a : temperatura absoluta (K)

V : volumen de permeado (mL)

V_s : volumen de la partícula sólida (cm³)

x : distancia a lo largo de la cual se difunde la sustancia (cm)

Z : logaritmo natural del producto entre A y J_0

ΔG : cambio en la energía libre de Gibbs específica (kJ mol⁻¹)

ΔH : cambio en la entalpía específica (kJ mol⁻¹)

ΔS : cambio en la entropía específica (J mol⁻¹ K⁻¹)

Δt : término de corrección en la medición del tiempo al principio de la filtración

Π_i : número adimensional para el proceso de escalado

1. INTRODUCCIÓN

El colágeno representa aproximadamente entre el 25% y 30% de la proteína total en animales (Liu, Zhang, et al., 2015) y es considerada la más abundante. Está presente en huesos, cartílagos, piel, tendones, dientes, ligamentos, córnea y en otros órganos de los vertebrados (Senaratne et al., 2006; Song et al., 2006). Se han identificado 29 tipos de colágeno siendo el más común el colágeno tipo I (Chen et al., 2016; Martínez-Ortiz et al., 2015). Debido a sus propiedades estructurales, el colágeno ha sido muy utilizado en aplicaciones farmacéuticas, en la producción de cosméticos y en la manufactura de alimentos (Ahmed et al., 2018; Bhagwat y Dandge, 2016; Kiew y Mashitah, 2013) y se ha obtenido tradicionalmente a partir de pieles y huesos de cerdos y vacas (Lin et al., 2011; Santos et al., 2013). Sin embargo, el brote de algunas enfermedades, como la de las vacas locas, ha provocado ansiedad entre los consumidores de colágeno obtenido a partir de animales terrestres y además, el colágeno obtenido de estas fuentes no puede ser utilizado en algunos países debido a restricciones de tipo religioso (Jongjareonrak et al., 2005; Liang et al., 2014). Lo anterior ha impulsado la búsqueda de fuentes alternativas de colágeno, fijándose la atención principalmente en los residuos de pescado como huesos, pieles y escamas, a pesar de que este colágeno posee menor contenido de aminoácidos provocando que su estabilidad térmica sea más baja que la del que se extrae de mamíferos (Kittiphattanabawon et al., 2005). Por tal motivo, se han realizado muchos estudios para la obtención y caracterización de colágeno a partir de desechos de pescado con el fin de aprovecharlos, ya que se generan en gran cantidad como consecuencia de una alta producción de peces a nivel mundial (Bhuimbar et al., 2019; Li et al., 2013; Pal et al., 2015; Zelechowska et al., 2010).

El proceso de extracción de colágeno a partir de subproductos de pescado inicia con el lavado y acondicionado del subproducto, el cual se somete inicialmente a un proceso de extracción con una solución de butanol (Ali et al., 2018) o hexano (Wang et al., 2008) para eliminar la mayor cantidad de grasa posible del sólido y luego se lleva a un pretratamiento alcalino para extraer la proteína no colagenada (PNC). En algunos casos también se hace necesario tratar el subproducto con soluciones de EDTA para eliminar algunos minerales como el calcio (Liang et al., 2014). El sólido obtenido, sin las sustancias indeseables, es sometido después a una extracción ácida (normalmente de ácido acético) con el fin de disolver el colágeno (Liu, Wei, et al., 2015). La solución ácida obtenida se somete a diálisis (Chen et al., 2016) o filtración (Shen et al., 2009) y el

concentrado obtenido se liofiliza para ser caracterizado mediante análisis de SDS-PAGE, FTIR, DSC, entre otros, mientras que su microestructura puede ser observada mediante SEM (Huang et al., 2016; Krishnamoorthi et al., 2017; Li et al., 2018).

Una de las materias primas exploradas para la obtención de colágeno son los subproductos de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) y la tilapia roja (*Oreochromis s.p.*). Diversos estudios han evaluado el efecto de las diferentes variables de proceso sobre el rendimiento de extracción y sobre la estabilidad del colágeno en cada una de las etapas del proceso (Chen et al., 2016; Li et al., 2018; Potaros et al., 2009; Quintero & Zapata, 2017) En particular, hay estudios que muestran que el colágeno (tipo I) extraído de la piel de tilapia nilótica (PTN) es un compuesto que puede ser utilizado como biomaterial para la regeneración de tejidos (Li et al., 2018).

En Colombia se produjeron 73641 toneladas de tilapia en el 2017, representando un 61% de la producción total en dicho año y fue exportado como filete, lo que provoca una gran producción de residuos entre ellos la piel (Ministerio de Agricultura, 2017). En la mayoría de los trabajos que utilizan la piel de pescado como fuente de colágeno se ha evaluado el efecto de diferentes variables como la concentración de base (C_b), relación entre el volumen de la solución extractora y la masa de materia prima (R'), la temperatura (T) y el tiempo de extracción (t) entre otros (Blanco et al., 2019; Pal et al., 2015), pero no se ha estudiado el efecto del tamaño de la piel (L) (Takeshi Nagai et al., 2002; Wang et al., 2018) y en algunos ni siquiera especifican este factor (Li et al., 2018).

En cuanto al modelado de procesos, son escasas las publicaciones en el tema de extracción de colágeno a partir de subproductos piscícolas (Blanco et al., 2019; Kiew et al., 2014), y más escaso aún en lo referente al estudio de la cinética en las etapas previas del proceso como el pretratamiento alcalino que se lleva a cabo para eliminar la PNC y que tiene implicaciones desde el punto de vista económico-ambiental y sobre el grado de pureza del colágeno (Liu, Wei, et al., 2015). Sin embargo, hay varios autores que han evaluado modelos empíricos (ley de potencia, difusión parabólica, ecuación de Peleg, la ecuación de Elovich) para predecir la cinética en la extracción ácida del colágeno a partir de la piel de bagre de malasia (*Hybrid Clarias* sp.) (Kiew et al., 2014) y de la tilapia roja (Kiew y Mashitah, 2013). También se ha utilizado la herramienta de redes neuronales (MATLAB) para modelar el rendimiento de extracción de colágeno a partir de carpa herbívora en función del tiempo de extracción, el pH y la concentración de pepsina (Wang et al., 2008). En trabajos más actuales, se han realizado estudios de la cinética de autoensamblaje del colágeno tipo I obtenido a partir de PTN mediante la prueba de fluorescencia de Tiboflavina T

(Yan y Wang, 2018). En otras investigaciones se ha evaluado el efecto del tratamiento alcalino (para eliminar la PNC del subproducto) sobre el rendimiento de extracción de colágeno y sobre su estructura química (Liu, Wei, et al., 2015). Algunos trabajos hacen dicho tratamiento alcalino en un solo lote (Sun et al., 2017) y otros lo hacen en varios lotes en los que ni el tiempo de extracción (t) ni la concentración de base (C_b) varían entre lote y lote (El-Rashidy et al., 2015).

La mayoría de los trabajos de extracción de colágeno, reportan temperaturas de operación de 4 °C y se enfocan principalmente en lo que ocurre con la estructura de la triple hélice del colágeno durante cada una de las etapas del proceso de extracción (Krishnamoorthi et al., 2017; Liu et al., 2014; Pati et al., 2010), sin embargo, dicha estructura, propia del colágeno tipo I, no es térmicamente estable a la temperatura del cuerpo humano (Leikina et al., 2002) y las proteínas una vez se consumen, son sometidas a una hidrólisis ácida en el estómago y luego a una enzimática en el intestino (Freeman et al., 2004). Por lo anterior, se hace interesante enfocar este trabajo en la evaluación de algunos modelos cinéticos, que son una herramienta útil para facilitar la optimización, diseño, simulación y control del proceso, y que permitan hacer predicciones de los resultados experimentales que conlleven al ahorro de costos, de energía y de tiempo (Kiew et al., 2014).

Con base en la hipótesis de que es posible obtener colágeno a partir de los tres subproductos (escamas de tilapia roja (ETR), espina dorsal de trucha (EDT) y PTN) y que mediante las herramientas de análisis cinético y estadísticas es posible evaluar efectos de variables importantes que no han sido estudiadas en el proceso de extracción de colágeno a partir de dichos subproductos, el principal objetivo planteado en este trabajo es evaluar el efecto de la $T(^{\circ}\text{C})$, C_b (mol/L) y L (cm) sobre el porcentaje de extracción de proteína no colagenada (EPNC) y el porcentaje de pérdidas de colágeno (PC) del pretratamiento alcalino, además de determinar las condiciones óptimas de esta operación mediante la metodología de superficie de respuesta (MSR). Con base en los datos experimentales de las concentración de PNC a diferentes tiempos de la primera y segunda extracción básica, evaluar y validar la capacidad de predicción de los modelos de segundo orden (MSO) y de Peleg (MDP) que han sido utilizados en análisis de la cinética de la extracción ácida de colágeno a partir de subproductos de pescado (Kiew et al., 2014) y también del modelo de dos sitios (MDS) que se ha empleado en el modelado de la extracción de proteínas a partir de plantas (Zhong et al., 2014). Posteriormente, se pretende modelar la etapa de extracción ácida con los mismos modelos empíricos. Adicionalmente, plantear un modelo fenomenológico fundamentado

en los balances de masa y en las leyes de Fick, con el fin estimar coeficientes de transferencia de masa (TdeM) para cada tratamiento del diseño. También hacer un escalado del pretratamiento alcalino y de la extracción ácida para realizar la filtración del extracto ácido obtenido empleando membranas tangenciales a diferentes condiciones de operación con el fin de modelar esta etapa mediante modelos de bloqueo de poro y de formación de torta, para estimar los parámetros que permitan determinar cuál de los mecanismos controla cada parte del proceso. Adicionalmente caracterizar el colágeno filtrado mediante análisis de FTIR, SDS-PAGE y SEM para determinar sus propiedades.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el departamento de Antioquia se cultivan diferentes especies de pescado como la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), la Tilapia roja (*Oreochromis sp*) y la Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) las cuales, al ser procesadas para su comercialización, generan una gran cantidad de subproductos que impactan el ambiente (FAO, 2018). Se sabe que los subproductos del pescado contienen colágeno, el cual tiene diferentes aplicaciones en alimentos, en el campo biomédico y en química farmacéutica, pero su aplicabilidad se ve muy restringida debido a los altos costos de obtención (Bhagwat y Dandge, 2016). Tradicionalmente las principales fuentes de colágeno han sido las pieles de bovino y porcino. Sin embargo, debido a restricciones de tipo religioso y al posible brote de encefalopatía esponjiforme bovina causado por esta fuente, se ha limitado su obtención a partir de ellas (Chen et al., 2016).

La **Figura 1** muestra que la producción de peces a nivel mundial estuvo aumentando hasta el año 2016, y se puede observar que gran parte de dicha producción se destinó a la exportación (FAO, 2018). Por tal motivo, en los últimos años se han realizado diferentes estudios para encontrar alternativas de aprovechamiento de los residuos generados de esta actividad y una opción es utilizarlos como fuente de colágeno.

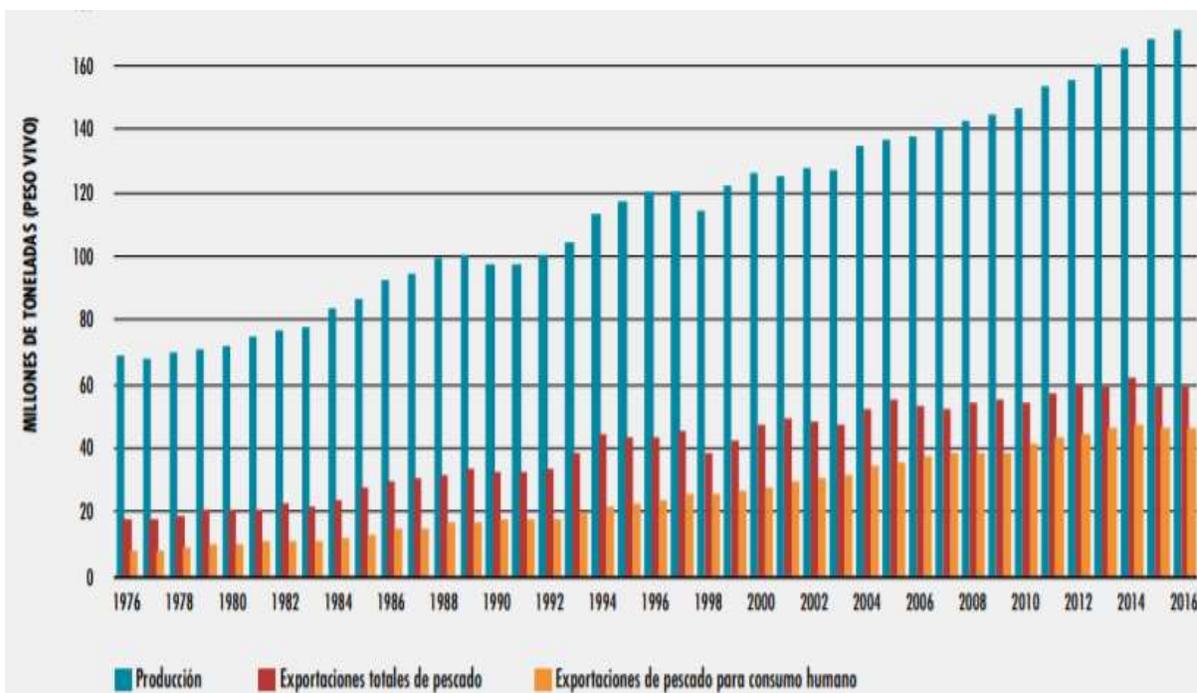


Figura 1. Producción pesquera mundial y cantidades destinadas a exportación (FAO, 2018)

En Colombia, desde el año 2000 hubo un constante aumento en la producción de peces, como se muestra en la evolución histórica de la acuicultura entre 1986 y 2015 (**Figura 2**). De la producción acuícola total lograda en el año 2011 en nuestro país, el 60% se obtuvo a partir del cultivo de la tilapia roja y nilótica, siendo el departamento del Huila el principal productor de estas especies (Ministerio de Agricultura, 2017).

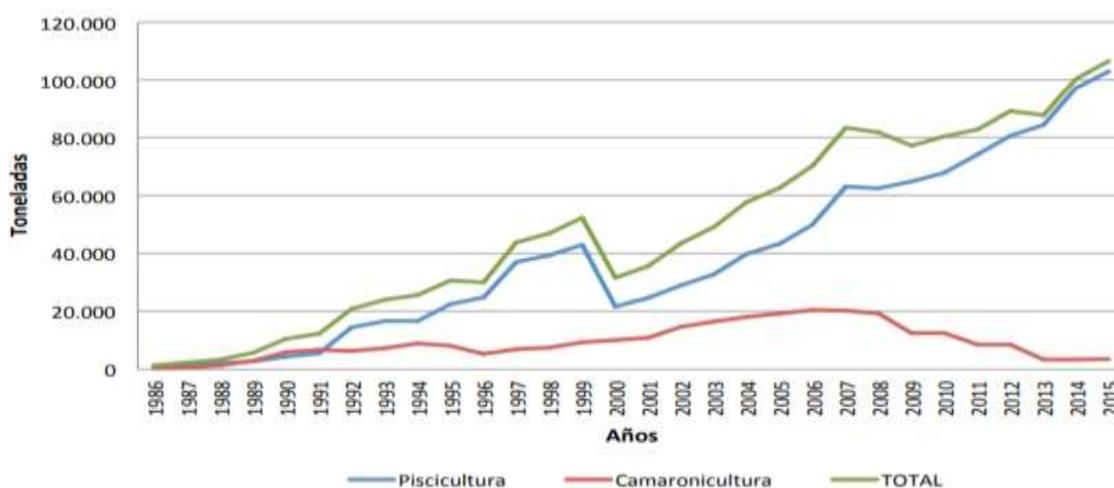


Figura 2. Producción Acuícola en Colombia (Merino, 2018)

El colágeno tipo I ha sido usado ampliamente como biomaterial para el desarrollo de tejidos y soportes para vendaje de heridas debido a su bajo nivel antigénico y a sus propiedades de alta adhesión celular y se está empleando cada vez más en cosméticos y en la industria farmacéutica (Chen et al., 2016).

El proceso de extracción de colágeno a partir de subproductos de pescado se lleva a cabo en varias etapas: desengrasado (piel) y/o desmineralizado (escamas), pretratamiento alcalino para eliminar la PNC (NaOH) (Kiew et al., 2014; Liu, Wei, et al., 2015), extracción ácida del subproducto desproteínizado (ácido acético) (Liu, Wei, et al., 2015; Wang et al., 2018) y finalmente la precipitación del colágeno (sal). El producto resultante se centrifuga y se redissuelve nuevamente en una solución de ácido acético y el sobrenadante que contiene el colágeno soluble en ácido se dializa y se liofiliza para ser analizado y caracterizado. La temperatura de operación más comúnmente usada es 4 °C, esto con el fin de preservar la estructura de triple hélice del colágeno (Krishnamoorthi et al., 2017; Liu et al., 2014). Sin embargo, se ha reportado que el colágeno tipo I, es térmicamente inestable a la temperatura del cuerpo humano (Leikina et al., 2002) y además, cuando se consumen las proteínas, éstas sufren una hidrólisis ácida y enzimática durante la digestión (Freeman et al., 2004). Se ha reportado además, que el colágeno obtenido de especies de peces originarias de climas cálidos, como la tilapia, presentan una mayor composición de aminoácidos y una estructura de triple hélice más estable que el obtenido a partir de especies de clima frío como la trucha (Muyonga et al., 2004). Lo anterior sugiere evaluar el proceso de extracción a una temperatura que no sea tan baja, ya que, además del alto costo de implementar un sistema de enfriamiento, disminuye la velocidad de extracción.

Uno de los subproductos piscícolas más estudiados es la PTN. La **Tabla 1** muestra las principales etapas del proceso de extracción de colágeno a partir de este subproducto y algunas de las condiciones de operación evaluadas en cada una de ellas. Se observa que hay una gran variabilidad en las diferentes investigaciones, principalmente en los tiempos empleados para realizar el pretratamiento alcalino.

Por el contrario, no hay reportes de trabajos sobre extracción de colágeno a partir de EDT y muy pocos a partir de ETR (Quintero y Zapata, 2017). Por lo anterior, se decidió estudiar el proceso de obtención de colágeno a partir de estos tres subproductos (PTN, ETR, EDT) con el fin de comparar los rendimientos de extracción y hacer un estudio más profundo de dicho proceso a partir del subproducto que reporte el mayor porcentaje de extracción.

Tabla 1. Condiciones de operación de las principales etapas del proceso de extracción de colágeno a partir de piel de tilapia nilótica (PTN) reportadas por algunos autores

Referencia	Desproteínización con NaOH	Desengrasado	Extracción Ácida	Precipitación Con NaCl
Potaros et al. (2009)	$T < 10\text{ }^{\circ}\text{C}$, $R' = 10$ $C_b = 0.1\text{ M}$ $t = 4\text{ h}$, $L = 3\text{ cm}$	NR	$T = 4\text{-}6\text{ }^{\circ}\text{C}$, $R' = 70$ $C_{Ac} = 0.5\text{ M}$ $t = 24\text{ h}$	$T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ $C_{NaCl} = 0.9\text{ M}$
Zeng et al. (2009)	$T = 4\text{-}6\text{ }^{\circ}\text{C}$, $R' = 30$ $C_b = 0.1\text{ M}$ $t = 48\text{ h}$, $L = 0.5\text{ cm}$	Butanol (10%), $T = \text{NR}$ $R' = 30$ $t = 24\text{ h}$	$T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $R' = 50$ $C_{Ac} = 0.5\text{ M}$ $t = 72\text{ h}$	$T = \text{NR}$ $C_{NaCl} = 2.3\text{ M}$
Chen et al. (2016)	$T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $R' = 10$ $C_b = 0.1\text{ M}$ NaHCO ₃ $t = 6\text{ h}$, $L = \text{NR}$	NR	$T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $R' = \text{NR}$ $C_{Ac} = 0.5\text{ M}$ $t = 24\text{ h}$	$T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $C_{NaCl} = 0.5\text{ M}$
Zhang et al. (2016)	$T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $R' = 10$ $C_b = 0.1\text{ M}$ $t = 1\text{ h}$, $L = 1\text{ cm}$	Ciclohexano $R' = \text{NR}$ $t = 6\text{ h}$	Ácido Láctico $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $R' = 60$ $pH = 2.3$, $t = 46\text{ h}$	$T = \text{NR}$ $C_{NaCl} = 0.9\text{ M}$
Sun et al. (2017)	$T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $R' = 20$ $C_b = 0.1\text{ M}$ $t = 24\text{ h}$, $L = 0.5\text{ cm}$	NR	$T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $R' = 55$ $C_{Ac} = 0.5\text{ M}$ $t = \text{NR}$	$T = \text{NR}$ $C_{NaCl} = 0.9\text{ M}$
Li et al. (2018)	$T < 10\text{ }^{\circ}\text{C}$, $R' = 20$ $C_b = 0.1\text{ M}$ $t = 24\text{ h}$, $L = \text{NR}$	Butanol (10%) $R' = 20$ $t = 24\text{ h}$	$T < 10\text{ }^{\circ}\text{C}$, $R' = 50$ $C_{Ac} = 0.5\text{ M}$ $t = 48\text{ h}$	$T = \text{NR}$ $C_{NaCl} = 0.9\text{ M}$

T: temperatura ($^{\circ}\text{C}$); L: tamaño (cm); t: tiempo (h); R': Volumen de solución / masa de subproducto (mL g^{-1}); C_b : Concentración molar de base (mol L^{-1}); C_{NaCl} : Concentración molar de NaCl (mol L^{-1}); C_{Ac} : Concentración molar de ácido acético (mol L^{-1}). NR: No se reporta

En lo referente al tema de modelado, en la **Tabla 2**, se muestran algunas referencias que reportan estudios sobre el análisis cinético del proceso de extracción sólido-líquido de proteínas y otros solutos realizados en los últimos años e incluye algunos de los modelos utilizados y los parámetros empleados para el ajuste. Se puede observar que en la mayoría de los trabajos usaron modelos empíricos, debido a que son muy prácticos y mucho más fácil de correlacionar que los modelos físicos fundamentados en el análisis del fenómeno (Kiew et al., 2014).

En cuanto al modelado de las etapas del proceso de extracción del colágeno, es aún escaso (Blanco et al., 2019), y se propone entonces modelar las etapas de desproteínización alcalina y la extracción ácida de las especies de interés del presente trabajo, lo que representa una herramienta útil para el diseño, simulación y escalado del proceso.

Tabla 2. Trabajos sobre modelado de cinética de extracción sólido-líquido

Referencia	Tema	Modelos	Parámetros
Qu et al. (2010)	Modelado de la cinética de extracción de antioxidantes de orujo de granada	Empíricos MSO, Arrhenius	h, C_e, k, E_a
Bucić-Kojić et al. (2013)	Análisis cinético de la extracción de componentes fenólicos de semillas de uva	Empíricos T de M. Arrhenius	De, k_m, E_a
Su et al. (2014)	Modelado de la cinética de extracción de ficocianina a partir de <i>Spirulina platensis</i> .	Empíricos MSO Arrhenius	h, C_e, k, E_a
Castillo-Santos et al. (2017)	Análisis de las ecuaciones de transferencia de masa para el modelado de la cinética de la extracción de vainilla.	Mecanicistas Balances de masa Segunda ley de Fick	De, K_p, K_m, C_e
Kiew y Mashitah (2012)	Modelado de la extracción de colágeno a partir de pescados de agua dulce de Malasia.	Empíricos Ley de potencia Difusión Parabólica Ecuación de Peleg Ecuación de Elovich	Los propios de cada modelo
Kiew et al. (2014)	Modelado de la extracción de colágeno a partir de piel de bagre de Malasia.	Empíricos Ley de potencia Difusión Parabólica Ecuación de Peleg Ecuación de Elovich MSO	Los propios de cada modelo
Zhong et al. (2014)	Cinética de la extracción de proteína a partir de plantas (<i>Caragana ko rshinskii</i> Kom)	Empíricos MSO MDS Arrhenius	h, C_e, k, E_a K_1, K_2, F

MSO: modelo de segundo orden, MDS: modelo de dos sitios. T de M: transferencia de masa.

También se propone aplicar filtración tangencial para eliminar la etapa de precipitación con sal, con lo que se descartarían la centrifugación, la redisolución ácida y la diálisis que normalmente hacen parte de este proceso (Chen et al., 2016; Martínez-Ortiz et al., 2015; Zhang et al., 2009).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Estudiar el proceso de obtención de colágeno a partir de subproductos de pescado mediante el uso de membranas de filtración a flujo cruzado.

1.2. Objetivos Específicos

- Seleccionar el mejor subproducto para la obtención de colágeno mediante un proceso por lotes a partir de espina dorsal de trucha (EDT), escamas de tilapia roja (ETR) y piel de tilapia nilótica (PTN).
- Estandarizar las condiciones de operación del pretratamiento alcalino para el mejor subproducto.
- Optimizar las condiciones de extracción ácida de colágeno para el mejor subproducto.
- Modelar la cinética del pretratamiento alcalino y la extracción ácida para el mejor subproducto.
- Escalar el pretratamiento alcalino y la extracción ácida desde 200 mL hasta 2L.
- Implementar y modelar la filtración tangencial del extracto ácido de colágeno para el mejor subproducto.

2. MARCO TEÓRICO

4.1. Tilapia Roja (*Oreochromis* sp)

“Tilapia” es la designación genérica de un grupo de peces de la familia Cichlidae, que abarca aproximadamente 70 especies pertenecientes a cuatro géneros: *Oreochromis*, *Sarotherodon*, *Tilapia* y *Danakillia* (Leonhardt, 1996). Las tilapias de importancia comercial están divididas en tres principales grupos taxonómicos de acuerdo con el comportamiento reproductivo: *Oreochromis*, *Sarotherodon* y *Tilapia* (Acosta-Villota, 2017). La tilapia roja se originó de múltiples cruces entre cuatro especies de tilapia: *Oreochromis mossambicus*, *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis aureus* y *Oreochromis hornorum*, para mejorar su coloración; lo que estimuló a productores e investigadores a iniciar un acelerado programa de hibridación permitiendo la

obtención de nuevas líneas de tilapia roja (Castillo-Campos, 2011). La **Tabla 3** muestra la clasificación taxonómica de la tilapia roja, como organismo modificado (Acosta-Villota, 2017).

Tabla 3. Clasificación taxonómica de la Tilapia roja (Acosta-Villota, 2017)

Dominio	Eucariota	Superclase	Osteichtyes
Reino	Animalía	Clase	Actinopterygii
Subreino	Bilateria	Orden	Perciformes
Rama	Deuterestomia	Suborden	Percoidei
Infrareino	Chordonia	Familia	Cichlidae
Phylum	Chordata	Genero	Oreochromis
Sub Phylum	Vertebrata	Especie	Oreochromis sp

Dentro de las características morfológicas externas de la tilapia roja, se puede observar que tiene cuerpo comprimido y discoidal, boca protráctil con labios prominentes, mandíbulas con dientes, no poseen bandas en la aleta caudal y su coloración es naranja con tonalidades rojizas (**Imagen 1**).



Imagen 1. Morfología externa de la tilapia roja (Oreochromis sp) (Castillo-Campos, 2011)

Las especies de tilapia son territoriales y habitan en una gran diversidad de cuerpos de poca profundidad. Los rangos óptimos de temperatura oscilan entre 20-30 °C (aunque pueden soportar temperaturas menores) y rangos de altitud de 850 a 2000 m.s.n.m. Las tilapias son especies rústicas y adaptables debido a que toleran bajos niveles de oxígeno y pH alcalinos. Los hábitos alimenticios del género *Oreochromis* son omnívoros, razón por la cual aceptan fácilmente los alimentos suministrados artificialmente. En la **Imagen 1** se muestra la morfología externa de la *Oreochromis sp*.

Las ETR recién quitadas del pescado son delgadas, de tamaño pequeño y de color rojizo como se muestra en la **Imagen 2**. Para extraer colágeno a partir de este subproducto, es necesario

realizar una extracción de todos los componentes que podrían afectar la pureza del producto final de interés. Esto se puede lograr sometiendo a las escamas a una desmineralización y a una desproteinización que permiten obtener este subproducto con color blanco.



Imagen 2. Escamas de tilapia roja (ETR)

4.2. Trucha Arco Iris (*Oncorhynchus mykiss*)

La trucha arco iris actualmente adopta la denominación inicial de *Oncorhynchus mykiss*, nombre propuesto desde 1972. Su clasificación taxonómica se muestra en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Clasificación taxonómica de la Trucha arcoiris (Roberts & Shepherd, 1974).

Reino	Animalia
Subreino	Metazoa
Phylum	Chordata
Clase	<i>Osteichthyes</i>
Orden	Isospondyli
Suborden	Salmonidei
Familia	Salmonidae
Género	<i>Oncorhynchus</i>
Especie	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
Nombre común	Trucha Arcoiris

La piel de la trucha está recubierta por escamas de menor tamaño, moteado más abundante de la cola, aletas y línea iridiscente en la parte inferior de cada lado que se evidencia con determinadas luces (Roberts y Shepherd, 1974) y posee pequeñas glándulas y células caliciformes, que secretan un moco viscoso que reviste al pez con un líquido resbaladizo protector y anti-

infeccioso (**Imagen 3**). Sobre las escamas se hallan células pigmentadas (Melanóforos o cromatóforos o células oscuras que producen la coloración característica del pez).



Imagen 3. Morfología externa de la Trucha arcoíris

La EDT está compuesta por hueso y cartílago y se encuentra recubierta por músculo que le da un aspecto rojizo (**Imagen 4**). Para el proceso de extracción de colágeno a partir de EDT, se hace necesario someter este subproducto a procesos de desmineralización y desproteización para eliminar sustancias contaminantes que buscan mejorar la pureza del producto final de interés.



Imagen 4. Espina dorsal de trucha (EDT)

4.3. Tilapia Nilótica (*oreochromis niloticus*)

La tilapia proviene de África, y hace referencia a la palabra nativa Bechuana “thalpe” que significa pez. Se clasifican en el Orden Perciformes, habitan en las aguas dulces de África, en el Medio Oriente, zonas costeras de la India, América Central, del Sur y el Caribe. Estos animales, son conocidos como peces de acuario por su fácil adaptación a nuevos ambientes y habitan la

mayor parte de las regiones tropicales del mundo, donde las condiciones son favorables para su reproducción y crecimiento. Su clasificación taxonómica se muestra en la **Tabla 5**. Una de las especies más cultivadas a nivel mundial es la *Oreochromis Niloticus* debido a que crecen más rápido y alcanzan mayor tamaño.

La tilapia de género *Oreochromis* tiene distintas clasificaciones, las cuales se diferencian por el tipo de coloración del cuerpo y la aleta caudal (**Imagen 5**). Dentro de las principales especies de *Oreochromis* cultivadas en Latinoamérica se encuentran la *Oreochromis aureus* (líneas de color azul, rojo y blancas) y la *Oreochromis niloticus* (líneas de color gris y rojo) (Rivas-Barragán, 2017).

Tabla 5. Clasificación taxonómica de la Tilapia nilótica (Rivas-Barragán, 2017)

Reino	Animalia
Superclase	Gnostomata
Clase	Telostei
Phylum	Vetebrada
Sub phylum	Craneata
Orden	Perciformes
Suborden	Percoidei
Familia	Cichlidae
Género	Tilapia
Especie	<i>Oreochromis niloticus</i>
Nombre común	Tilapia nilótica

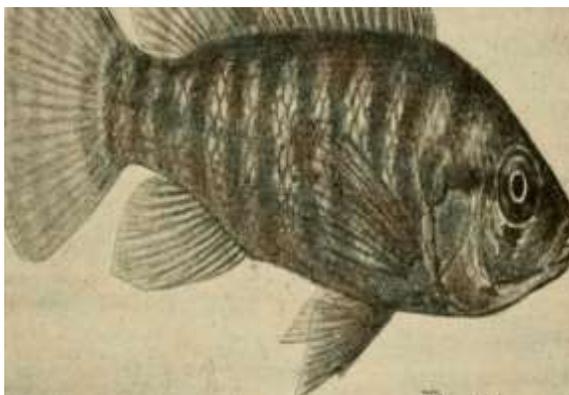


Imagen 5. Morfología externa de la tilapia nilótica (*Oreochromis* sp)

La PTN es delgada con manchas de color negro y fondo grisáceo como se puede ver en la **Imagen 6**. La PTN, obtenida del fileteo del pescado, viene con músculo adherido y está recubierta de escamas, y en el proceso de obtención de colágeno, es necesario retirar estos componentes que no hacen parte de este subproducto.



Imagen 6. Piel de tilapia nilótica (PTN) cortada sin residuos de músculo

4.4. Colágeno

4.4.1. Estructura

El colágeno es una proteína secundaria conformada por una triple hélice (pro-alfa dextrógira) que se encuentra presente en el tejido conectivo y tiene una función protectora y estructural. Su estructura es fibrosa tornándola insoluble en agua. Cada una de las 3 cadenas que conforman la triple hélice de esta proteína son levógiras (orientadas a la izquierda) y en cada giro hay aproximadamente 3.6 residuos de aminoácidos de la forma Glicina-X-Y, donde X e Y son con frecuencia prolina e hidroxiprolina (HP), respectivamente (Senaratne et al., 2006). Para realizar adecuadamente sus múltiples funciones, el colágeno presenta un gran número de variantes genéticas en los organismos superiores.

La glicina es el aminoácido más pequeño y se ubica en interior de la estructura y debido a que su cadena lateral es en H, forma puentes de hidrógeno entre cadena y cadena dándole estabilidad, permitiendo que esta molécula proporcione estructura y fuerza de tensión (Devlin, 2006). La mayoría de los enlaces de hidrógeno entre las cadenas en la hélice triple se establecen entre protones amidas y oxígenos carbonilo, aunque los grupos -OH de la hidroxiprolina también parecen participar en la estabilización de la estructura. Las moléculas individuales (tropocolágeno) se empaquetan juntas formando una fibra de colágeno de una manera muy específica. Cada molécula tiene una longitud de aproximadamente 300 nm y se solapa con su vecina en

aproximadamente 64 nm, lo que permite que dichas moléculas tengan una alta resistencia. Parte de la dureza del colágeno se debe al entrecruzamiento de las moléculas de tropocolágeno mediante una reacción que utiliza las cadenas laterales de la lisina. Algunas de las cadenas laterales de la lisina se oxidan para dar lugar a derivados de aldehídos, que, a continuación, pueden reaccionar con un residuo de lisina o bien unos con otros mediante una condensación aldólica y a una deshidratación para dar lugar a un entrecruzamiento. Este proceso sigue a lo largo de la vida, y los entrecruzamientos que se acumulan hacen que el colágeno sea cada vez menos elástico y más quebradizo (Mathews y Ahern, 2002).

En la **Imagen 7** se observa la estructura de triple hélice del colágeno y las diferentes estructuras de hojas plegadas de dicha molécula, que han sido identificadas mediante pruebas de SDS-PAGE para colágenos obtenidos a partir de subproductos de diferentes especies de pescado (Chen et al., 2016; Meisenberg y Simmons, 2018; Sun et al., 2017). Se han identificado por lo menos 29 tipos de colágeno obtenido de una gran variedad de tejidos de animales (Ahmed et al., 2018; Chen et al., 2016). La HP corresponde aproximadamente a un 12.5% del colágeno y este hecho permite hacer una determinación aproximada (indirecta) del contenido de colágeno mediante los métodos reportados para estimar el contenido de HP (Blanco et al., 2019).

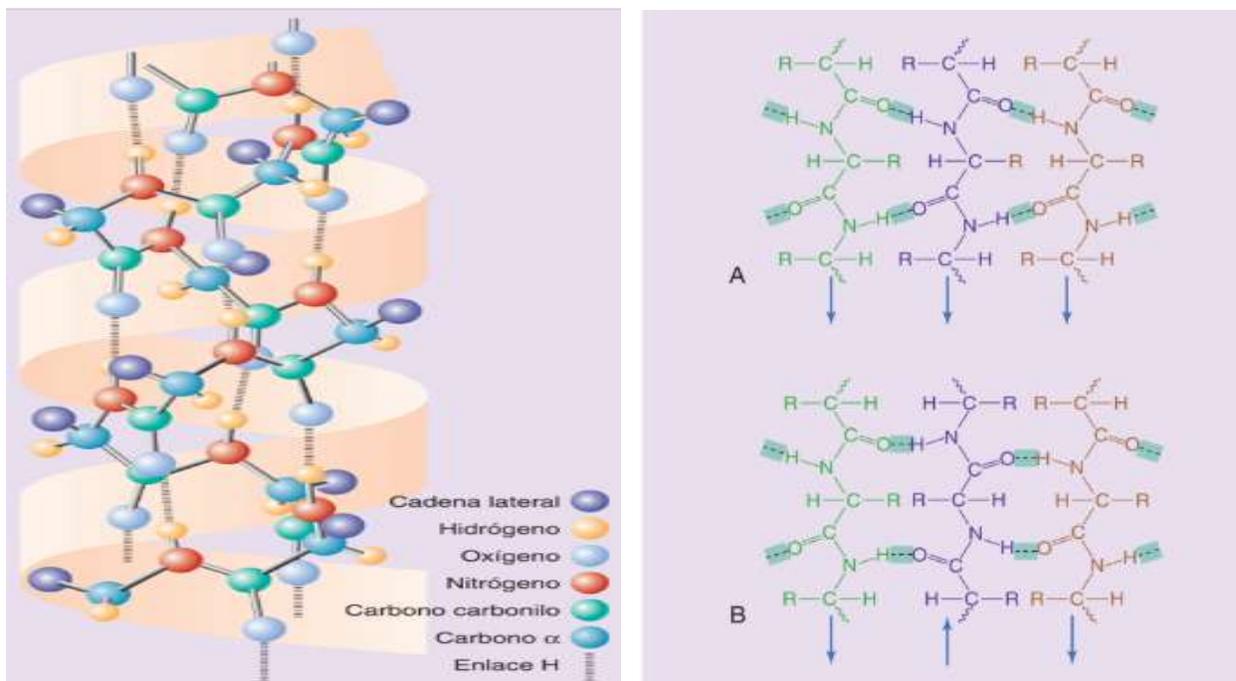


Imagen 7. A la izquierda: estructura de la alfa-hélice. A la derecha: estructura de las hojas plegadas beta. A. Paralela B. Anti paralela (Meisenberg y Simmons 2018).

En las cadenas polipeptídicas del colágeno son producidas dos oxidaciones importantes: la conversión de prolina en hidroxiprolina (a la izquierda en la **Imagen 8**) y la conversión de lisina en hidroxilisina (a la derecha en la **Imagen 8**). A nivel enzimático existe un indicio de que el ácido ascórbico está envuelto en la conversión de prolina a hidroxiprolina, funcionando como agente reductor (Feduchi et al., 2010). Este último favorece la cicatrización de las heridas debido a su importante papel en la síntesis del colágeno.

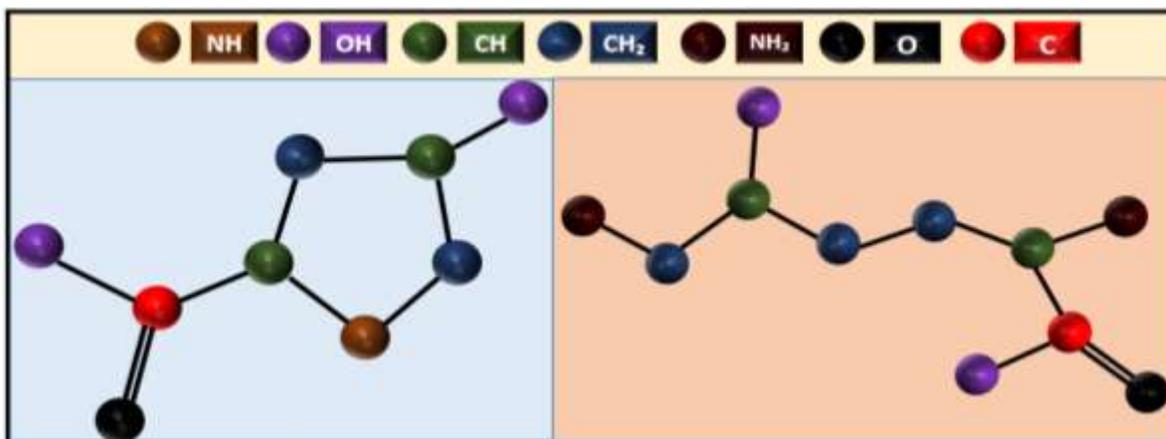


Imagen 8. Estructura química de la hidroxiprolina (izquierda) y la hidroxilisina (derecha)

4.4.2. Síntesis

Cuando una célula se divide en dos partes, se sintetizan todo tipo de macromoléculas portadoras de información, entre ellas las proteínas (Feduchi et al., 2010). Los procesos moleculares que subyacen bajo este flujo genético de información pueden dividirse en tres etapas principales: inicialmente se da una replicación que es la copia de las dos cadenas de un DNA de doble cadena, luego ocurre una transcripción, que es el proceso por el que se copia una cadena de DNA en una molécula de RNA complementaria y finalmente se da la traducción que es cuando una secuencia de RNA dicta una secuencia proteica (Devlin, 2006). Después de la traducción, el polipéptido recién traducido se hidroxila y a continuación los azúcares se unen para dar procolágeno, el cual contiene más de 1000 residuos de aminoácido, de los cuales 500 aproximadamente están en las regiones N-terminal y C-terminal que no tienen la secuencia característica de la fibra de colágeno descrita previamente. Luego, 3 moléculas de procolágeno se enrollan para formar la hélice triple, mientras que las regiones N-terminal y C-terminal se pliegan para dar como resultado estructuras globulares (Meisenberg y Simmons 2018). Las triples hélices

(tropocolágeno) se exportan a continuación al espacio extracelular; en este punto las regiones terminales se separan mediante enzimas específicas, dejando sólo la triple hélice. A continuación, estas moléculas se ensamblan de forma escalonada y finalmente se entrecruzan y pegan formando la fibra resistente de colágeno (Mathews y Ahern, 2002).

4.4.3. Fuentes y Aplicaciones

El colágeno es un constituyente común en las espinas, la piel, las escamas y la carne de la anatomía de los peces y es una fracción importante de los tejidos conectivos tales como los tendones, huesos, sistema vascular y envolturas de tejido conectivo que rodea los músculos de animales (Serrano-Gaona, 2011). En particular el colágeno tipo I se encuentra en la dermis, huesos, tendones, dientes y corneas, y su función principal es la resistencia. El colágeno tipo II se encuentra principalmente en el cartílago y en los ojos, y su función está asociada con la resistencia a cambios de presiones, mientras que el tipo III se encuentra en los vasos sanguíneos y su principal función es la de sostener órganos expandibles (Devlin, 2006). En el caso particular del pescado, se han reconocido un gran variedad de tipos de colágeno siendo el tipo I, el más común, presente en piel, espinas, escamas y aletas de varias especies (Takeshi et al., 2002).

El colágeno se ha obtenido tradicionalmente a partir de pieles y huesos de cerdos y vacas (Lin et al., 2011; Santos et al., 2013). Sin embargo, el brote de la enfermedad de las vacas locas ha provocado ansiedad entre los consumidores de colágeno obtenido a partir de animales terrestres y además el colágeno de dichas fuentes, no puede ser utilizado en algunos países debido a restricciones de tipo religioso (Jongjareonrak et al., 2005). También se han explorado fuentes de colágeno alternativas como las pieles de conejo (Martínez-Ortiz et al., 2015), las patas de pollo (Zhou et al., 2016), la membrana del huevo (Mohammadi et al., 2016) pero se ha fijado principalmente la atención en los residuos de pescado como huesos, pieles y escamas. Por tal motivo, se han realizado muchos estudios para la obtención y caracterización de colágeno a partir de desechos de pescado con el fin de aprovechar tales residuos que se generan en gran cantidad como consecuencia de una alta producción de peces a nivel mundial. Las partes de los pescados que mejor se explotan para la extracción del colágeno son las aletas, la piel, la cabeza picada, las escamas y las espinas molidas (Nagai, 2002).

En los últimos años, se han adelantado estudios sobre la obtención y caracterización de colágeno ácido soluble (CAS), a partir de especies como Tilapia (Chen et al., 2016), pez tambor rojo (Chen et al., 2016) y Bagre (Kiew et al., 2014; Zhang et al., 2009), entre muchos otros.

La mayoría de estudios han sido realizados en países asiáticos como China, Japón y Tailandia, mientras otros pertenecen a países nórdicos, los cuales centran su interés en la industria acuícola (Wang et al., 2014). En esta región predominan los estudios relacionados con el aislamiento y la caracterización del CAS en una gran variedad de especies tanto marinas como de agua dulce (Kittiphattanabawon et al., 2005; Pati et al., 2010; Potaros et al., 2009; Wang et al., 2008; Zhang et al., 2009).

El colágeno tipo I ha sido muy utilizado en aplicaciones farmacéuticas, en la producción de cosméticos y en la manufactura de alimentos debido a sus propiedades estructurales (Bhagwat y Dandge, 2016). El colágeno es ampliamente usado en la industria alimenticia, farmacéutica, cosmética, del cuero y de los biomateriales (Morimura et al., 2002), consecuentemente las investigaciones han sido dirigidas hacia un incremento en la utilización del colágeno residual de los peces para la producción de gelatina (Nagai et al., 2002; Woo et al., 2008; Zhang et al., 2014; Zhang et al., 2009).

4.5. Proceso de obtención del Colágeno

El proceso de extracción del colágeno a partir de subproductos de pescado consta de varias etapas como se muestra en la **Figura 3**.



Figura 3. Diagrama de Flujo del proceso de extracción de colágeno ácido soluble a partir de subproductos de pescado.

A continuación, se describen las principales etapas del proceso de extracción de CAS a partir de subproductos de pescado.

4.5.1. Lavado y acondicionamiento

Con el fin de garantizar la calidad y pureza del producto final, es necesario lavar cuidadosamente el subproducto con sustancias que no afecten la estructura del colágeno y retirar las sustancias indeseables como residuos de músculos y escamas antes de empezar el proceso de extracción. Para aumentar la productividad y el rendimiento de extracción, se puede realizar una disminución de tamaño y aumentar el área superficial del subproducto como es el caso de la EDT y la PTN, facilitando de esta forma el proceso de extracción (Tabarestani et al., 2010; Zhang et al., 2016). En el caso de la espina dorsal, en algunos trabajos las ablandan por medio de martillos (Liu et al., 2012; Wang et al., 2008; Yu et al., 2014). Sin embargo, es importante que el subproducto no quede de un tamaño demasiado pequeño, pues además de ser tedioso y demorado, en el caso de que se haga de forma manual, puede ocurrir que el producto de interés quede demasiado expuesto y provoque su pérdida en las etapas previas a su extracción, disminuyendo el rendimiento y la productividad del proceso.

4.5.2. Pretratamiento Alcalino

El objetivo de esta etapa es eliminar la PNC presente en el subproducto, sometiéndolo a un proceso de extracción con soluciones con pH básico. Por lo general, se realiza con soluciones de NaOH no muy concentradas para evitar un daño temprano sobre la estructura del colágeno en el subproducto (Zhang et al., 2009), aunque también se ha reportado el uso de NaHCO_3 (Chen et al., 2016; Potaros et al., 2009). En la mayoría de las publicaciones sobre extracción de colágeno a partir de subproductos de pescado, realizan el pretratamiento alcalino a bajas temperaturas y en varios lotes empleando concentraciones y tiempos constantes entre etapas. Esta extracción se ha realizado empleando tiempos muy cortos como en el proceso de extracción de colágeno a partir de espinas de atún (Yu et al., 2014), en donde realizaron el pretratamiento alcalino en dos lotes de 3h, pero también hay registro de tiempos de hasta de 36 h para llevar a cabo esta etapa de extracción a partir de huesos de carpa con cambio de solución cada 12 h (Liu et al., 2012). Aunque en la

mayoría de las investigaciones no reportan un nivel de agitación para esta etapa, Yu et al. (2014) realizaron este pretratamiento a 300 rpm con agitador magnético.

4.5.3. Desmineralización

Con el fin de eliminar algunos componentes que afectan la calidad del colágeno como algunos metales (Ca), el subproducto es tratado químicamente con soluciones diluidas de EDTA durante largos tiempos, por lo general hasta 48 horas (Bhagwat y Dandge, 2016). Esta etapa se debe incluir en procesos a partir de subproductos con alto contenido de cenizas como es el caso de la EDT y ETR. Es importante que la concentración de EDTA no sea alta, ya que este podría afectar la estructura del colágeno.

4.5.4. Desengrasado

Como la grasa es un componente que puede afectar la calidad del producto final, se debe eliminar previamente poniendo el subproducto en contacto con un solvente no polar como el butanol (Sinthusamran et al., 2013) o hexano (Wang et al., 2008) durante tiempos entre 12 y 24 h generalmente, en una o en varias etapas y a bajas temperaturas. Ningún trabajo reporta velocidades de agitación para esta etapa.

4.5.5. Extracción ácida

Generalmente se realiza con ácido acético (Arumugam et al., 2018), pero también se han utilizado otros ácidos débiles como el láctico y el cítrico para extraer colágeno a partir de piel de bacalao (Skierka y Sadowska, 2007). En la mayoría de los trabajos, realizan la extracción a bajas temperaturas y dependiendo de las condiciones de las etapas previas, del subproducto y de la concentración del ácido, se han empleado tiempos que van desde 12 h hasta 72 h (Ahmad y Benjakul, 2010; Skierka y Sadowska, 2007; Zeng et al., 2009). En esta etapa se recomienda una agitación suave, ya que un exceso de revoluciones podría afectar la estructura del colágeno.

4.5.6. Precipitación

Para separar el colágeno disuelto en la solución ácida, se somete a un proceso de precipitación normalmente, con NaCl con concentraciones que varían desde el 2% al 3% (m/v).

La precipitación se da porque la sal es muy soluble y le disminuye el agua disponible al colágeno provocando que este se precipite. La mezcla obtenida se centrifuga y se redisuelve en ácido acético (Khong et al., 2018; Matmaroh et al., 2011).

4.5.7. Diálisis

Este proceso se realiza con el objetivo de eliminar el ácido (para aumentar el pH) y los iones de sal desde la fase sólida obtenida. En este proceso la migración se da a través de una membrana de diálisis, la cual retiene las moléculas de colágeno y permite la difusión de la sal y el ácido. En algunos trabajos reportan que esta etapa se realiza contra ácido acético 0.1 M (Zhang et al., 2009) pero generalmente se hace contra agua destilada (Liu et al., 2012).

4.5.8. Filtración

Para aumentar la concentración del colágeno en el sólido obtenido, se realiza una filtración con el fin de eliminar los líquidos que contienen ácido por medio de membranas con un poro menor que el tamaño del colágeno. Se han utilizado membranas de ultrafiltración asimétricas y cargadas para extraer colágeno a partir de medusa (Shen et al., 2009).

4.5.9. Liofilización y caracterización

Finalmente el colágeno se liofiliza para luego caracterizarlo (Li et al., 2018). En la mayoría de los trabajos al colágeno liofilizado se le aplican diferentes técnicas de análisis como SDS-PAGE para determinar su peso molecular (Huang et al., 2016), DSC para determinar su temperatura de desnaturalización (Krishnamoorthi et al., 2017), SEM para determinar su microestructura (Li et al., 2018) y FTIR para identificar sustancias propias de su estructura (Sun et al., 2017).

4.6. Extracción sólido-líquido

4.6.1. Generalidades

La extracción sólido-líquido conocida generalmente como lixiviación, es la disolución preferente de uno o más componentes de una mezcla sólida en un disolvente líquido, por contacto entre las fases. El sólido por extraer está contenido dentro de una red de sólidos insolubles,

conocida como orujo, con solución dentro (ocluida) y, en algunos casos, sólidos solubles o precursores de solutos. La difusión ocurre primariamente entre la solución ocluida pero el orujo resiste los procesos difusivos y afecta fuertemente la velocidad de difusión mientras que la lixiviación de sólidos secos, sólo comienza cuando el sólido está embebido del solvente y este disuelve los solutos internos (Grasso, 2013). A nivel industrial, es importante que la extracción se lleve a cabo de manera rápida y esto está relacionado con la facilidad con la que la sustancia que se va a extraer se disuelva en el solvente y con el tiempo necesario para que dicho componente alcance el equilibrio en la fase líquida extractora. (Chan et al., 2014).

Existen diferentes fenómenos que están involucrados en el paso del soluto desde el sólido hacia el seno del solvente: El soluto se puede difundir a través de los poros internos hasta la superficie del sólido (transporte de masa interno) y luego pasa al seno del líquido por un mecanismo convectivo producido por la diferencia entre las concentraciones del soluto en la solución atrapada dentro de los poros y la propia en el seno de la solución (transporte externo). Por lo tanto, se podría evaluar el transporte convectivo del soluto en la fase líquida y el transporte difusivo producido dentro del sólido a fin de caracterizar la transferencia de materia (Grasso, 2013).

La transferencia de masa en un proceso de extracción sólido-líquido, se da mediante las siguientes etapas: i) El solvente debe estar en contacto con la superficie del sólido. ii) el solvente debe penetrar dentro del sólido y disolver el soluto. iii) La mezcla solvente-soluto debe difundirse nuevamente hacia la superficie. iv) La mezcla debe emerger desde el sólido hacia el seno del líquido (Grasso, 2013).

La velocidad de extracción se puede aumentar entonces, aumentando el gradiente de concentración y el coeficiente de difusión o disminuyendo el tamaño de la partícula sólida, lo que facilitaría el paso del soluto desde la fase sólida a la líquida (Qu et al., 2010).

Se han llevado a cabo muchos estudios experimentales y teóricos sobre la difusión de solutos a través de materiales celulares y biológicos. La difusión es un proceso físico mediante el cual cierta masa es transferida bajo la influencia de gradientes de concentración. En la industria de alimentos, existen numerosos ejemplos de procesos que dependen de la difusión: extracción de azúcar, jugo de manzana y café por lixiviación; blanqueado de vegetales donde la difusión desde el alimento y dentro del alimento es muy importante; conservación por salado y encurtido;

operaciones de deshidratación; fritado, donde se toma aceite y se pierde agua simultáneamente; acidificación donde el ácido difunde desde la solución hacia adentro del alimento (Grasso, 2013).

En la ley de Fick, se usa el gradiente de concentración entre las partículas de soluto en el sólido y el seno de la solución como la fuerza impulsora de la extracción, aunque estrictamente la tendencia de un componente a pasar de una fase a otra está directamente relacionada con la diferencia de potenciales químicos entre las fases (Treybal, 1980). Si se asume que no hay cambios grandes en la difusividad efectiva y que la resistencia externa a la transferencia de masa (T de M) es despreciable, se podrían desarrollar modelos mediante la aplicación de la primera y segunda ley de Fick con base en el planteamiento de los balances de materia, mediante el uso de coeficientes de partición y la ayuda de números y relaciones adimensionales cuando se involucran extractos diluidos (Castillo-Santos et al., 2017).

4.6.2. Transferencia de masa interfacial

Cuando un material es transferido desde una fase a otra, la resistencia a la transferencia de masa en cada fase origina un gradiente de concentración entre ellas. Las concentraciones del material que difunde en las dos fases inmediatamente adyacentes a la interfase generalmente son desiguales, aunque expresadas en las mismas unidades. Usualmente, se asume que están relacionadas entre sí por las leyes del equilibrio termodinámico. Para sistemas en los que las concentraciones de soluto en las fases sólida y líquida son diluidas, la velocidad de transferencia puede expresarse por medio de ecuaciones que predicen que la velocidad de transferencia de masa es proporcional a la diferencia entre la concentración del soluto en el seno del solvente y la concentración de la interfase (sólido-líquido). De esta manera, el coeficiente de transferencia de masa en el sólido puede calcularse a partir de los coeficientes de difusión efectiva, mientras que el coeficiente de transferencia de masa en el líquido puede estimarse a partir de correlaciones empíricas que dependen principalmente las propiedades del solvente (Grasso, 2013).

4.6.3. Análisis macroscópico para transferencia de masa

Para obtener un modelo matemático que describa el proceso de extracción sólido-líquido, en el pretratamiento alcalino y la extracción ácida, deben analizarse los fenómenos de transferencia de masa que implica dicho proceso y las posibles resistencias a la transferencia de masa en las

fases sólida y líquida. Para el transporte del soluto (PNC o colágeno) hasta el seno del fluido, desde el interior de los pedazos de PTN, intervienen las siguientes etapas de transferencia de masa: i) Transferencia de masa entre partículas la cual se refiere a la difusión y mezcla del soluto en el fluido que ocupa los espacios dentro de las partículas sólidas. ii) Transferencia de masa en la interfase, que suele ser tratada como la transferencia en la película del fluido que rodea a las partículas sólidas. iii) Transferencia de masa en la partícula, que consiste en la difusión del soluto en el sólido, en principio en los poros y puede incluso existir en la superficie del mismo (Bucić-Kojić et al., 2007).

Para describir completamente el fenómeno de extracción sólido-líquido, debe plantearse un modelo que describa tanto el fenómeno difusivo como el convectivo, ya que ambos determinan la transferencia de masa. Conociendo el mecanismo de esta transferencia es posible determinar las velocidades de extracción y establecer si el proceso es dominado por la resistencia a la transferencia de masa en la fase líquida o la resistencia a la transferencia de masa en el material sólido (Espinoza-Pérez et al., 2007).

4.6.4. Factores que afectan el proceso de extracción sólido-líquido en el pretratamiento alcalino

Temperatura:

La temperatura, que es una medida de la energía cinética molecular promedio, es un factor controlable que afecta directamente el proceso de extracción sólido-líquido, ya que un aumento de este parámetro provoca una reducción de la tensión superficial y en la constante dieléctrica del líquido provocando un incremento en la transferencia de masa interna (Islam et al., 2013) y además, generalmente provoca un aumento en la solubilidad del soluto en el solvente favoreciendo el proceso de extracción (Zhong et al., 2014). Sin embargo, un nivel de temperatura muy alto, podría provocar daños en la estructura de los componentes de interés, por lo que se hace necesario encontrar un nivel intermedio óptimo de T, que aumente la velocidad de la extracción sin que haya efectos secundarios indeseables (Liu, Wei, et al., 2015; Zhong et al., 2014).

Concentración de la base:

La concentración de la base C_b , al igual que la temperatura, tiene un efecto directo sobre la extracción sólido-líquido, ya que el NaOH ataca químicamente la estructura de la piel para provocar la liberación de la PNC, que es el soluto que se desea extraer. Este efecto, generalmente es más apreciable para tamaños de piel grandes, en las que las moléculas del soluto están menos expuestas debido a que bajo estas condiciones de operación, el área superficial es menor y por lo tanto, el efecto alcalino jugaría un papel más importante a la hora de lograr un porcentaje de extracción considerable (Zhong et al., 2014). Cuando el solvente extractor es una solución, es importante que el soluto de dicho solvente, ataque de manera selectiva al soluto que se desea extraer o eliminar PNC sin afectar los componentes que se desean conservar (colágeno), es decir, que tenga un efecto químico selectivo.

Tamaño de partícula:

A diferencia de T y C_b , este factor tiene un efecto inverso sobre el proceso de extracción sólido-líquido, ya que una disminución en el tamaño de partícula del sólido, provoca un aumento en el área superficial dejando las moléculas del soluto más expuestas, lo que favorece el proceso de extracción ya que en partículas más pequeñas, la transferencia de masa se favorece debido a que las distancias recorridas por los componentes involucrados en la difusión son más cortas (Zhong et al., 2014).

Tiempo de extracción:

Mientras mayor sea el tiempo de contacto entre el sólido y el líquido, mayor es el porcentaje de extracción. Sin embargo, es importante conocer el tiempo en que se alcanza el equilibrio en el líquido, ya que después de alcanzar dicho estado, ya no es posible que el porcentaje de extracción aumente y dejarlo más tiempo, provocaría una disminución en la productividad. Se hace necesario entonces, emplear tiempos en los que la velocidad de extracción sea lo suficientemente alta (máxima) para que se extraiga una cantidad considerable de soluto en un tiempo corto, permitiendo que tanto el rendimiento de extracción como la productividad sean altos.

Velocidad de agitación:

Este parámetro afecta la velocidad y el tiempo de extracción, ya que favorece el contacto entre el sólido y el líquido, además de homogenizar la concentración del soluto en el líquido ayudando a que la extracción sea lo más completa posible. Sin embargo, un exceso de este parámetro podría provocar un gasto energético innecesario, ya que por encima de cierto nivel de agitación, la cantidad de soluto extraído no sería significativa y no se justificaría el alto costo de una alto nivel de agitación, además que, una alta velocidad de agitación podría afectar la estructura de las sustancias de interés (Kiew y Mashitah, 2012).

Relación volumen de solvente a masa de subproducto:

Este parámetro es importante desde el punto de vista económico, ya que una relación muy alta entre el volumen de solvente y la masa de subproducto (R') aumentaría los costos de insumos (solvente) sin provocar un aumento significativo en la velocidad de extracción del componente de interés. Por el contrario, si esta relación es baja, el solvente alcanzaría el estado de equilibrio muy rápido (se saturaría) y no alcanzaría a extraer una cantidad importante del soluto. Por este motivo, es necesario determinar un nivel intermedio adecuado para esta relación que permita que el porcentaje de extracción sea óptimo sin afectar el factor económico, o inclusive ambiental, ya que si el solvente con el soluto disuelto (contaminante) no se puede recuperar, debe ser desechado, y mientras mayor sea la cantidad empleada en el proceso, mayor será el impacto ambiental.

4.6.5. Modelos empíricos

Este tipo de modelos permiten realizar predicciones muy buenas de los resultados cinéticos experimentales del proceso de extracción sólido-líquido de una manera muy práctica y han sido muy utilizados en el campo de la ingeniería química, en ingeniería de alimentos y en química farmacéutica (Bucić-Kojić et al., 2013; Kiew et al., 2014; Qu et al., 2010; Su et al., 2014). A continuación, se muestra el fundamento teórico de cada uno de los modelos empíricos a evaluar en el presente trabajo, en la primera y segunda etapa de desproteínización básica y en la extracción ácida del colágeno.

Modelo de segundo orden (MSO)

Este modelo ha sido usado para describir los procesos de extracción de un sólido en un líquido a partir de subproductos de pescado, por ejemplo en el proceso de obtención de colágeno a partir de piel de bagre de Malasia, en la etapa de extracción ácida con pepsina, permitió desarrollar modelos cinéticos que describen el proceso de manera exitosa, para diferentes variables de proceso tales como la concentración de ácido acético, relación entre la masa de sólido al volumen de la solución extractora y dosificación de enzima (Kiew et al., 2014).

Para el caso de la extracción de una proteína se puede plantear el siguiente mecanismo (Zhong et al., 2014):



El modelo asume que la velocidad de reacción (disolución) solo depende de la proteína en suspensión y que cuando el proceso de extracción alcanza el equilibrio, la concentración de la proteína soluble en la solución extractora es constante.

En general, la ecuación diferencial para una cinética de orden n' (Su et al., 2014) sería:

$$\frac{dC_t}{dt} = k * (C_e - C_t)^{n'} \quad (2)$$

donde k es la constante de velocidad de extracción de segundo orden ($\text{mL g}^{-1} \text{h}^{-1}$), C_e es la concentración en el líquido de la proteína extraída en el equilibrio (mg mL^{-1}), C_t es la concentración en el líquido de la proteína soluble (mg mL^{-1}) en cualquier tiempo t y n' se refiere al orden de la cinética que para este caso se asume que es 2.

Si se define t_e como el tiempo en que se alcanza el equilibrio en la solución extractora, por sustitución de las condiciones iniciales y de frontera ($C_t = 0$ si $t = 0$ y $C_t = C_e$ si $t = t_e$) en la Ecuación (2) con $n = 2$ y haciendo una inversión de términos se puede obtener la Ecuación (3):

$$\frac{t}{C_t} = \frac{1}{k * C_e^2} + \frac{t}{C_e} \quad (3)$$

Si se define la velocidad de extracción inicial como h ($\text{mg mL}^{-1} \text{h}^{-1}$):

$$h = kC_e^2 \quad (4)$$

La Ecuación (3) se puede expresar de la siguiente manera:

$$C_t = \frac{t}{\frac{1}{h} + \frac{t}{C_e}} \quad (5)$$

A partir de la Ecuación (3) se pueden estimar los parámetros de este modelo (Rakotondramasy-Rabesiaka et al., 2007). Existen relaciones tipo Arrhenius entre la constante de velocidad de segundo orden (k) y la temperatura (Qu et al., 2010) como se muestra en la Ecuación (6):

$$k = B \exp \frac{-E_a}{RT_a} \quad (6)$$

Donde B ($\text{mL g}^{-1} \text{h}^{-1}$) es un factor pre-exponencial, R es la constante de gas ideal ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$), E_a es energía de activación (kJ mol^{-1}) y T_a es la temperatura absoluta (K).

Modelo de Peleg (MDP)

Este modelo, que fue propuesto por Peleg (Bucić-Kojić et al., 2007), es también conocido como modelo hiperbólico. Este modelo ha sido utilizado para describir la cinética de procesos de extracción de proteína de plantas vegetales (Zhong et al., 2014) y en la extracción ácida de colágeno a partir de piel de pescado (Kiew et al., 2014). Al compararlo con otros modelos empíricos evaluados en dicho trabajo, presentó los valores de la raíz cuadrada de la desviación media (RMSD) más bajos, lo que indica que describe bien el comportamiento cinético en dichos procesos. Para el caso de extracción de un sólido en un líquido toma la siguiente forma:

$$C_t = \frac{t}{(K_1 + K_2 t)} \quad (7)$$

Donde K_1 es la constante de velocidad de Peleg ($\text{h g sólido g}^{-1} \text{sólido}$) y K_2 es la constante de capacidad de Peleg ($\text{g sólido g}^{-1} \text{sólido}$). Los parámetros K_1 y K_2 se pueden obtener mediante un ajuste de los datos experimentales de la cinética de extracción del soluto a través de una correlación no lineal (Kiew y Mashitah, 2013).

Modelo de dos sitios (MDS)

Este modelo, fundamentado en la teoría de película (Chan et al., 2014), propone que el soluto puede ser extraído más fácilmente de células rotas que de células intactas, ya que, en estas últimas,

el soluto está menos expuesto y por lo tanto tiene menos contacto con el solvente, haciendo más lento el proceso de extracción. En este sentido, es posible tener dos procesos paralelos en la extracción de proteína a partir de subproductos de pescado o de cualquier otra fuente: Uno rápido desde células rotas y otro lento desde las células intactas que pueden ser considerados desde un modelo cinético que tenga en cuenta la extracción desde esos dos posibles sitios (Islam et al., 2013). Este modelo se puede expresar como se muestra en la Ecuación (8):

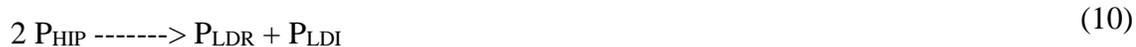
$$\frac{Ct}{Ce} = 1 - Fe^{-k_1*t} - (1 - F)e^{-k_2*t} \quad (8)$$

donde F y $(1 - F)$ son las fracciones másicas del soluto extraído mediante los procesos rápidos y lentos respectivamente mientras que k_1 y k_2 son constantes relacionadas con las velocidades de extracción de cada uno de los dos procesos en cuestión (h^{-1}).

Los valores de F , k_1 y k_2 pueden ser determinados por el ajuste entre los valores calculados por el modelo en la Ecuación (8) con los datos experimentales, mediante una regresión no lineal (Zhong et al., 2014). Para el caso del pretratamiento alcalino, es posible plantear un mecanismo que permita establecer una relación entre las concentraciones de la PNC en el líquido en el equilibrio para el proceso de extracción sólido-líquido, separando la PNC obtenida por la vía rápida de la obtenida por la vía lenta, mediante el planteamiento de un mecanismo simple como el que se muestra en la Ecuación (9):



donde P_{DCI} se refiere a la proteína que se podría extraer desde las células intactas, P_{DCR} la que se podría extraer desde las células rotas, P_{LDR} es la proteína liberada en el solvente (disuelta) obtenida desde las células rotas y P_{LDI} es la proteína liberada en el solvente (disuelta) obtenida desde las células intactas. Si se asume que la proteína que se encuentra en la piel (reactivo) es la misma, el mecanismo sería como se muestra en la Ecuación (10):



donde P_{HIP} denota la PNC que no se ha extraído desde la PTN y cuya concentración se puede calcular de manera hipotética, asumiendo que dicha proteína se disolviera completamente en el solvente (solución) y que serviría como un referente para estimar un parámetro que permita tener una medida del estado de equilibrio establecido por las dos vías propuestas (Zhong et al., 2014) la

cual se podría expresar matemáticamente mediante la ley de acción de masas para estimar la constante de equilibrio (K'_{eq}) como se muestra en la Ecuación (11):

$$K'_{eq} = \frac{C_{PCR} * C_{PCI}}{(C_i - C_e)^2} \quad (11)$$

donde C_{PCR} es la concentración en el equilibrio (mg mL^{-1}) de la PNC extraída a partir de las células rotas (vía rápida), C_{PCI} es la concentración en el equilibrio (mg mL^{-1}) de la PNC extraída a partir de las células intactas (vía lenta) y $C_i - C_e$ es la concentración (mg mL^{-1}) que tendría la PNC que queda en la piel, si estuviera completamente disuelta en la solución extractora, cuando se alcanza el equilibrio. La Ecuación (10), debería involucrar concentraciones molares, pero si se asume que el peso molar de las diferentes PNC involucradas, es el mismo, se puede cancelar, permitiendo obtener una expresión adimensional para la K'_{eq} .

Parámetros termodinámicos

La K'_{eq} estimada como se mostró en la sección anterior puede ser usada sin problema para el análisis termodinámico en las ecuaciones que involucran logaritmos naturales para su desarrollo matemático. De esta manera, se puede relacionar dicha expresión de equilibrio con los cambios de la entalpía específica ΔH (kJ mol^{-1}) y de la entropía específica ΔS ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$) mediante la ecuación de Van Hoff (Zhong et al., 2014) que se muestra en la Ecuación (12):

$$\ln|K'_{eq}| = -\frac{\Delta H}{R} * \frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R} \quad (12)$$

Como se dispone de al menos tres valores de K'_{eq} a tres diferentes temperaturas, se pueden estimar los parámetros termodinámicos a partir de la línea recta obtenida de graficar $\ln K'_{eq}$ vs $1/T$, mediante la determinación de la pendiente y el intercepto (Zhong et al., 2014). A partir de la Ecuación (12), se pueden estimar los valores de ΔH y ΔS y conociendo estos parámetros termodinámicos poder estimar el valor de la energía libre de Gibbs específica (ΔG) mediante la Ecuación (13):

$$\Delta G = \Delta H - T * \Delta S \quad (13)$$

4.6.6. Procedimiento general para el modelado de procesos

En esta sección se enumeran los pasos de un método para la construcción de un modelo semi-físico de base fenomenológica, a partir de los principios básicos del proceso (Alvarez et al., 2009):

- i) Elaborar un diagrama de flujo del proceso acompañado de una descripción.
- ii) Tener claridad de lo que se espera del modelo (que aporta y que problema resuelve).
- iii) Definir los sistemas de proceso (SdeP) sobre el sistema que se modelará con el nivel de exigencia para detallar y representar la relación entre las variables mediante un diagrama de bloques.
- iv) Aplicar el principio de conservación en cada uno de los SdeP.
- v) Elegir las ecuaciones de que resultan de los balances, las que permitan cumplir con el objetivo del modelo.
- vi) Para las ecuaciones seleccionadas, se deben definir los parámetros, las variables y constantes conocidas en cada SdeP.
- vii) Determinar cuáles de las ecuaciones constitutivas, permiten calcular el mayor número de parámetros en cada SdeP.
- viii) Verificar los Grados de Libertad del modelo.
- ix) Resolver las ecuaciones o sistemas de ecuaciones mediante un algoritmo apropiado.
- x) Validar el modelo para diferentes condiciones y determinar su capacidad de predicción.

4.6.7. Ecuaciones para el modelo fenomenológico

Este tipo de modelos se construyen con base en el análisis del proceso mediante los balances de masa microscópicos y macroscópicos, y aplicando las diferentes leyes del equilibrio termodinámico.

Difusividad efectiva (D_{ef})

La D_{ef} describe la transferencia de masa difusional neta a través de un sistema estructural que involucra procesos químicamente complejos. Este parámetro depende directamente de la porosidad del sólido (ε), ya que mientras más poros haya en el interior de la partícula, más cantidad

de solvente estará ocluido y por lo tanto mayor será la difusión desde el sólido hacia el líquido. Por el contrario, mientras más tortuoso sea el camino que debe recorrer el soluto para difundirse, menor será el valor de D_{ef} , por lo que este parámetro, es inversamente proporcional a la tortuosidad. Adicionalmente, la tendencia que tienen las moléculas de un soluto a difundirse está asociada a sus propias características, a las del sólido que lo contiene y a las del solvente; esta propiedad se conoce como coeficiente de difusión molecular y tiene una relación directa con D_{ef} . Con base en el anterior análisis, se puede definir el coeficiente de difusión efectiva de la siguiente manera (Grasso, 2013):

$$D_{ef} = \frac{D \varepsilon}{\tau} \quad (14)$$

El proceso de desproteinización básica es controlado por la convección ya que el nivel de agitación es el suficiente para que la concentración de PNC extraída sea prácticamente la misma en cualquier punto del sistema, y se puede asumir que C_{PNC} es homogénea en un instante determinado. Sin embargo, es posible estimar D_{ef} que está relacionada con la cinética de extracción. Mediante un modelo tipo Arrhenius, como se muestra en la Ecuación (15), es posible estimar la energía de activación (E_a) a partir del D_{ef} a diferentes temperaturas (Grasso, 2013) graficando $\ln D_{ef}$ vs ($1/T_a$):

$$D_{ef} = A \exp \frac{-E_a}{RT_a} \quad (15)$$

Leyes de Fick para la extracción sólido-líquido

La Ecuación (16) muestra la primera ley de Fick (McCabe et al., 2007):

$$J_x = -D_{ef} \frac{\partial C}{\partial x} \quad (16)$$

donde J_x es el flujo másico en la dirección x por unidad de área (flux) en $\text{g cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, D_{ef} es el coeficiente de difusión efectiva ($\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$), C es la concentración de la sustancia que se difunde en el líquido (g mL^{-1}) y x es la distancia (cm) a lo largo de la cual se difunde la sustancia. Del balance de masa en estado transitorio en un diferencial de volumen ubicado en un sistema de coordenadas rectangulares como referencia (Crank, 1979), se obtiene la Ecuación (17) conocida como la segunda ley de Fick:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D_{ef} * \left(\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \right) \quad (17)$$

Cuando la T de M. se da en una sola dirección (si las áreas laterales son muy pequeñas debido a que el espesor es muy pequeño como sucede en las láminas rectangulares planas) y el coeficiente de difusión efectiva es constante, se puede resolver la segunda ley de Fick mediante el método de separación de variables por medio de series de Fourier (Crank, 1979), dando como resultado la Ecuación (18):

$$C_s = \frac{4C_{s0}}{\pi} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{2n+1} \exp \left\langle -D(2n+1)^2 \pi^2 \frac{t}{l^2} \right\rangle \sin \left[\frac{(2n+1)\pi x}{l} \right] \quad (18)$$

La cual se puede transformar para láminas planas infinitas en:

$$\frac{C_s}{C_{s0}} = \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{inf} \frac{1}{(n+1)^2} \exp \frac{((n+1)^2 \pi^2 D_{ef} t)}{l^2} \quad (19)$$

donde C_{s0} es la concentración del soluto (% m/m) en el sólido inicialmente, C_s es la concentración del soluto (% m/m) en el sólido en cualquier tiempo y n es el índice de la serie de Fourier que es directamente proporcional al grado de convergencia (Crank, 1979).

Si se considera solo el primer término de la sumatoria en la Ecuación (19), se obtendría:

$$\frac{C_s}{C_{s0}} = \frac{8}{\pi^2} e^{-\frac{D_{ef} \pi^2 t}{l^2}} \quad (20)$$

Mediante la Ecuación (20) es posible estimar el D_{ef} para el caso de láminas planas siempre y cuando el módulo de Fourier sea superior a 0.25 (Crank, 1979).

Balances de masa para el proceso de extracción sólido-líquido

En el proceso de extracción sólido-líquido, la concentración del soluto dentro del sólido cambia con el tiempo, se puede plantear entonces el siguiente balance de masa para la sustancia que se difunde (soluto) en estado transitorio para la fase sólida:

$$M_{\text{soluto}}^{\text{Dentro del sólido}} = M_{\text{soluto}}^{\text{Entra al sólido}} - M_{\text{soluto}}^{\text{Transfiere al líquido}} \quad (21)$$

donde M se refiere al flujo másico (g s^{-1}). Si se asume que la masa de proteína que entra al sólido por unidad de tiempo es cero, la Ecuación (21) se puede describir en su forma diferencial así:

$$V_s \frac{dC_s}{dt} = -K_s A (C_s - C_{si}) \quad (22)$$

Donde V_s (m^3) es el volumen de la partícula sólida, K_s (m s^{-1}) es el coeficiente de transferencia de masa en la fase sólida, A (m^2) es el área a través de la cual se da la transferencia de masa, C_s (Kg m^{-3}) es la concentración del soluto en el sólido y C_{si} (Kg m^{-3}) es la concentración del soluto en la interfase por el lado del sólido.

La transferencia de masa en el proceso de extracción sólido-líquido se da a través de una interfase debido a la diferencia de concentración del soluto en la interfase en la superficie del sólido (C_{si}) y la concentración del soluto en la interfase al lado del líquido (C_{li}) y se podría plantear el siguiente balance de masa a través de la película:

$$K_s (C_s - C_{si}) = K_L (C_{li} - C_L) \quad (23)$$

donde K_s y K_L son los coeficientes de transferencia de masa en la fase sólida y en la líquida (m s^{-1}), respectivamente, mientras que C_s y C_L son las concentraciones del soluto que se va a extraer en el sólido y en el líquido, respectivamente. Mediante la ley de Nernst se puede establecer una relación entre las concentraciones del soluto en las dos fases en equilibrio:

$$Kp = \frac{C_{Li}}{C_{Si}} \quad (24)$$

Filtración tangencial:

La disminución del flujo de permeado por unidad de área (flux), en el proceso de filtración, se debe al bloqueo de los poros (bloqueo estándar, intermedio, completo o formación de torta) y es con base en dichos mecanismos que se plantean algunas leyes para el modelado de la filtración (Iritani y Katagiri, 2016). Los modelos de ensuciamiento de membranas básicos, asumen que el flux de permeado disminuye en función de el volumen del mismo permeado (Merin y Cheryan, 1980) como se muestra en la Ecuación (25):

$$\frac{J}{J_0} = V^{-b} \quad (25)$$

Donde V (mL) es el volumen de permeado, J_0 (mL m⁻² s⁻¹) es el flujo inicial por unidad de área ($t = 0$) y b es una constante que indica la velocidad de ensuciamiento. Se puede expresar J en términos de la razón de cambio del volumen de permeado así:

$$J = \frac{1}{A} \frac{dV}{dt} \quad (26)$$

donde A (m²) es el área de filtración. Reemplazando la Ecuación (26) en la (25) y sacando logaritmos, se puede obtener una ecuación de la forma:

$$\ln \frac{dV}{dt} = Z - b \ln V \quad (27)$$

donde Z es el logaritmo natural del producto entre A y J_0 . Cuando b sea cero, es decir, no hay ensuciamiento, el flux de permeado será J_0 . Integrando la Ecuación (27) se obtiene:

$$V = [(b + 1)e^Z] \frac{1}{(b+1)t^{(b+1)}} \quad (28)$$

Si se introduce K_f tal que:

$$K_f = [(b + 1)e^Z] \frac{1}{(b+1)} \quad (29)$$

e introduciendo un término de error Δt en la medición del tiempo al iniciar los experimentos, la Ecuación (28) se puede reescribir de la siguiente manera:

$$V = K_f (t + \Delta t) \frac{1}{(b+1)} \quad (30)$$

Y se puede concluir que:

$$J_0 = \frac{1}{A} \frac{K_f^{b+1}}{(b+1)} \quad (31)$$

Existen otros modelos que involucra bloqueo de poro (completo, intermedio y estándar) y formación de torta (Iritani y Katagiri, 2016), los cuales asumen que existe un tiempo t_l a partir del cual los solutos empiezan a depositarse sobre la superficie de la membrana, formando una torta que apantalla los efectos del bloqueo de los poros. Se sabe que el espesor de la torta está restringido por el ancho del canal de la membrana y por el flujo de alimentación al sistema. De esta manera, la ecuación que gobierna la reducción del flujo de permeado debido al bloqueo de poro (Iritani y Katagiri, 2016) es:

$$-\frac{dJ}{dt} = k_r J^{3-n_b} \quad (32)$$

Donde K_r es la constante de resistencia y n_b el índice de bloqueo. En la Imagen 9 se pueden observar los diferentes mecanismos de bloqueo en el proceso de filtración tangencial (Iritani y Katagiri, 2016).

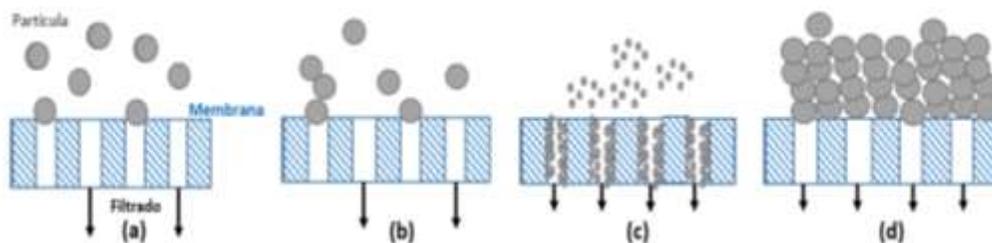


Imagen 9. Mecanismos de bloqueo en la filtración tangencial. (a) Completo. (b) Intermedio. (c) Estándar. (d) Formación de torta.

Para bloqueo completo de poro $n_b = 2$ (Imagen 9 (a)), para bloqueo estándar $n_b = 1.5$ (Imagen 9 (c)), para intermedio $n_b = 1$ (Imagen 9 (b)) y cuando $n_b = 0$, significa que el mecanismo que contrala la filtración es la formación de torta (Imagen 9 (d)).

La Ecuación (32) se puede resolver por separación de variables y para el caso de bloqueo intermedio de poro, al integrar se obtiene:

$$\frac{1}{J} = \frac{1}{J_0} + k_{BIP}t \quad (33)$$

Si se dispone de los valores de volumen de permeado en diferentes tiempos, se podrían estimar los flujos por unidad de área y mediante los gráficos que se muestran en la Imagen 10, se podrían identificar el índice de bloqueo (n_b) y estimar mediante el intercepto y la pendiente el flujo por unidad de área inicial (J_0) y la constante de resistencia (k_r). Dichos parámetros son importantes para el escalado de procesos de filtración tangencial por lotes, pues permiten estimar el tiempo de operación, el cual debe ser menor al necesario para que se dé la formación de torta (Imagen 10 (d)). Los parámetros n_b y k_f son útiles para el escalado del proceso de filtración tangencial en continuo, ya que estos dependen de las condiciones de operación y de las propiedades de la suspensión y de la membrana (Iritani y Katagiri, 2016), entonces se podría evitar la formación de torta, modificando por ejemplo la presión de operación, la porosidad de la membrana o la concentración inicial del soluto en la suspensión de ser posible, para que el proceso en continuo se desarrolle adecuadamente. Para poder escalar el proceso de filtración tangencial, el modelo (laboratorio) y el prototipo (industrial) deben cumplir varias condiciones, algunas son: Similitud geométrica, igual concentración inicial del soluto, la misma presión transmembrana (PTM), membranas del mismo material y con la misma porosidad entre otras (Iritani y Katagiri, 2016).

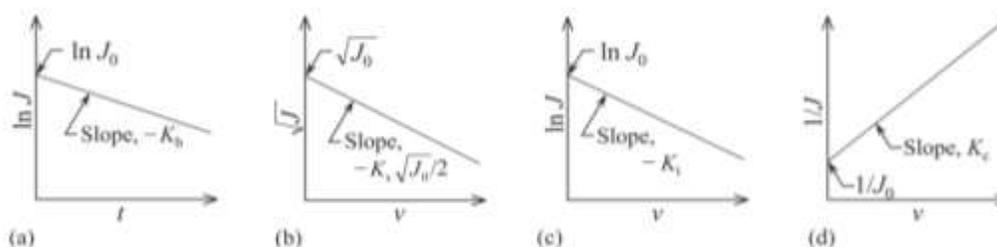


Imagen 10. Identificación gráfica de los mecanismos de bloqueo. (a) Bloqueo completo. (b) Bloqueo estándar. (c) Bloqueo intermedio. (d) Formación de torta (Iritani y Katagiri, 2016).

Como la PTM es un parámetro fundamental para la implementación del proceso de filtración, a pequeña y a gran escala, es necesario que se describa de manera especial, La fuerza que provoca (impulsora) el flujo a través de la membrana es la diferencia entre la presión del lado del retenido (interior) y la presión del lado del permeado (exterior) denotada como PTM (Iritani y Katagiri, 2016). Como la presión del retenido a la entrada de la membrana es mayor que la presión del retenido a la salida de esta (varía dentro de la membrana), se asume que la presión en el interior de la membrana es el promedio dichas presiones. Tomando como referencia una escala manométrica, la presión a la salida de la membrana es cero ya que corresponde a la presión atmosférica, luego la PTM se define como:

$$PTM = \frac{(P_e + P_s)}{2} \quad (34)$$

A medida que la filtración avanza, la viscosidad (u) del retenido aumenta al igual que la resistencia (R_t) al flujo del permeado y, por lo tanto, existe una relación inversa entre estos dos parámetros y el flux como se puede ver en la Ecuación (35):

$$J = \frac{PTM}{u R_t} \quad (35)$$

La Ecuación (35) se podría emplear para estimar el flux máximo de permeado (J_0), a una determinada PTM , el cual se tendría cuando se opere la membrana limpia cuya resistencia (R_m) sería la mínima, y con un fluido de baja viscosidad (como el agua) como se muestra en la Ecuación (36):

$$J_0 = \frac{PTM}{u_a R_m} \quad (36)$$

Cuando los poros se comienzan a bloquear, el flux va disminuyendo debido a que la resistencia aumenta con respecto a la resistencia de la membrana hidráulica (R_m). Por lo tanto, dicha disminución en el flux es proporcional a la relación entre la resistencia cuando ocurre el bloqueo intermedio de poro (R_{BIP}) y R_m . Se define entonces R_{BIP}^* como la resistencia adimensional de bloqueo de poro de acuerdo con la Ecuación (37):

$$R_{BIP}^* = \frac{R_{BIP}}{R_m} \quad (37)$$

Luego, se puede obtener una relación entre J_o y J mediante un análisis dimensional usando la resistencia adimensional definida en la Ecuación (37):

$$J_o - J = R_{BIP}^* J \quad (38)$$

Despejando J de la Ecuación (38) se obtiene la siguiente ecuación:

$$J = \frac{J_o}{(1 + R_{BIP}^*)} \quad (39)$$

Si el bloqueo intermedio de poro ocurre en $t \leq t_1$, se puede aplicar esta condición a la Ecuación (33) y se despeja J en términos de J_o se puede concluir que:

$$R_{BIP}^* = K_{BIP} J_o t \quad (40)$$

Después del bloqueo de poro ($t > t_1$) se empieza a formar la torta, cuyo espesor está restringido por el ancho del canal de la membrana y por el flujo cruzado del alimento. A partir de este momento, J comienza a disminuir con el tiempo hasta hacerse cero cuando la membrana está completamente sucia. Si se aplica la Ecuación (35) para expresar J en términos de la resistencia total, se obtiene la siguiente ecuación:

$$J = \frac{PTM}{u(R_m + R_{BIP}(t_1) + R_c(t - t_1))} \quad (41)$$

Donde R_c se refiere a la resistencia causada por la formación de la torta (cake). Sacando factor común R_m en el denominador del lado derecho de la Ecuación (41), se tiene una expresión para el flux de permeado en términos de las resistencias adimensionales, la cuales se obtienen dividiendo cada resistencia por R_m :

$$J = \frac{J_o}{(1 + R_{BIP}^* + R_c^*)} \quad (42)$$

Cuando ha transcurrido un tiempo t_1 , aún no se ha formado la torta y se obtiene que el flux a dicho tiempo es:

$$J_{t1} = \frac{J_0}{(1 + R_{BIP}^*(t_1))} \quad (43)$$

Si se define:

$$R_c^{**} = \frac{R_c^*}{(1 + R_{BIP}^*(t_1))} \quad (44)$$

Despejando J_0 de la Ecuación (43) y reemplazándolo en la Ecuación (42), al dividir por $1 + R_{BIP}^*(t_1)$ se obtiene la Ecuación (45):

$$J = \frac{J_{t1}}{(1 + R_c^{**})} \quad (45)$$

Derivando la Ecuación (45) con respecto al tiempo se obtiene que:

$$\frac{dJ}{dt} = - \frac{J_{t1}}{(1 + R_c^{**})^2} \frac{dR_c^{**}}{dt} \quad (46)$$

4.6.8. Análisis dimensional y Similitud

En la mayoría de los experimentos, las pruebas iniciales se realizan en un modelo a pequeña escala (geométrica) antes de ensayar en el sistema de tamaño real, con el fin de ahorrar tiempo y dinero. El análisis dimensional permite escalar procesos en cualquier disciplina, pero particularmente en aquellas donde es necesario experimentar o diseñar (Cengel y Cimbala, 2006).

Los principales objetivos de esta herramienta son: i) Generar parámetros adimensionales que ayuden en el diseño de experimentos y en el reporte de estos. ii) Encontrar leyes de escalamiento de tal forma que se pueda predecir el comportamiento de un prototipo a partir del comportamiento de un modelo. iii) Predecir la tendencia en la relación entre parámetros (Cengel y Cimbala, 2006).

Para poder aplicar la técnica de análisis dimensional, es importante entender primero el concepto de similitud. Es necesario que se cumplan tres condiciones para que exista una similitud completa entre un modelo y un prototipo. La primera es la similitud geométrica: El modelo y el prototipo deben tener la misma forma, es decir, que cada una de las dimensiones del sistema real se pueda obtener a partir de las del modelo, multiplicada por una constante. La segunda condición es la similitud cinemática: Esto significa que la velocidad en cualquier punto en el flujo del modelo debe ser proporcional a la velocidad en el punto correspondiente en el prototipo (y la misma dirección).

La tercera y más restrictiva condición es la similitud dinámica: Esta se logra cuando todas las fuerzas en el modelo se pueden escalar mediante un factor constante a las correspondientes en el prototipo.

En el método de Pi Buckingham, se utiliza la letra mayúscula Π para denotar un parámetro adimensional. En un problema general de análisis dimensional, existe un Π_1 que depende de otros Π que son independientes y se relacionan como se muestra en la Ecuación (47):

$$\Pi_1 = f(\Pi_2, \Pi_3, \dots, \Pi_a) \quad (47)$$

donde el subíndice a corresponde al número total de números adimensionales (Cengel y Cimbala, 2006). Para garantizar la similitud completa entre el modelo y el prototipo, se debe cumplir que cada Π independiente del prototipo (p) sea idéntico al correspondiente Π del modelo (m), así:

$$\Pi_2^m = \Pi_2^p, \Pi_3^m = \Pi_3^p, \dots, \Pi_a^m = \Pi_a^p$$

Lo que permite que los números Π dependientes también sean idénticos:

$$\Pi_1^m = \Pi_1^p$$

Si d es el número de dimensiones (unidades) fundamentales en las que se miden las n variables involucradas en cierto proceso físico, entonces, se pueden construir $n-d$ números grupos adimensionales independientes. El primer paso del método es elegir d parámetros (de los n parámetros del proceso). Para explicar el siguiente paso, se puede asumir que $d = 3$ y que de los n parámetros se escogen P_J , P_K y P_L . Se puede plantear entonces una ecuación para un número adimensional π_i de la siguiente forma:

$$\pi_i = P_J^a P_K^b P_L^c \quad (48)$$

El tercer paso es plantear ecuaciones algebraicas bajo el principio de que las unidades del miembro de la izquierda de la Ecuación (48), sean iguales a las unidades del miembro de la derecha de dicha ecuación, con el fin de establecer relaciones entre las diferentes unidades que servirán para hallar los $n-d$ números adimensionales con los F parámetros restantes. Lo anterior se logra tomando un parámetro P_i de los F restantes con i diferente de J , K , L , y se escriben sus unidades mediante los símbolos empleados para las diferentes magnitudes (m , L , t , etc.) y por medio de las

relaciones obtenidas (a partir de la Ecuación (47)), se pueden determinar los valores numéricos de los exponentes a , b y c que se reemplazarían para hallar π_i como se muestra en la misma Ecuación (48) para determinar un número adimensional en términos de P_i , P_j , P_K y P_L .

5. METODOLOGÍA

A continuación, se describe la forma como se realizaron las mediciones de las propiedades de las materias primas y el colágeno y como se desarrollaron los experimentos en cada una de las etapas del proceso.

5.1. Métodos Analíticos

5.1.1. Análisis Bromatológicos

Se tomaron muestras representativas de cada subproducto para realizarles el análisis bromatológico de humedad, grasa, cenizas y proteína total de acuerdo con la AOAC mediante los métodos 950.46B, 960.39B, 920.153, 981.10, respectivamente (AOAC, 2003c, 2003b, 2003a, 2003d).

5.1.2. Análisis de Proteína por el método de Lowry

Para implementar el método de Lowry (Lowry et al., 1951) inicialmente se determinó la longitud de onda de máxima absorción, realizando un barrido sobre la muestra de mayor concentración, en un espectrofotómetro (UV-VIS, Genesys 10S, Thermo scientific, Massachusetts, EE.UU). Luego, a 100 μ L de muestra, se le agregó 1 mL del reactivo C, el cual se preparó con 50 partes del reactivo A (2g de Na_2CO_3 /100 mL de NaOH 0.1 M) y 1 parte del reactivo B (0.25 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ +0.5 g de tartrato de Sodio y Potasio / 50 mL de agua destilada), se agitó durante 7 segundos y se dejó en la oscuridad por 10 min. Después se agregó el reactivo D (1 mL reactivo de Follin + 1 mL de agua destilada) con agitación por 7 segundos y se mantuvo en reposo bajo oscuridad por 30 min para finalmente leer la absorbancia a 670 nm en el espectrofotómetro. El contenido de proteína (mg/mL) se determinó mediante una curva de calibración construida con albumina estándar a la longitud de onda de máxima absorción. Cada muestra se analizó por triplicado.

5.1.3. Análisis de Colágeno

El contenido de colágeno se determinó de manera indirecta mediante el análisis de HP siguiendo el método propuesto por Lins da Silva y colaboradores con ligeras modificaciones (Da Silva et al., 2015). Para las muestras sólidas, se tomaron entre 80 y 100 mg de muestras representativas de los diferentes subproductos y se llevaron a tubos falcon de 15 mL sometiéndolos a digestión básica con 500 μ L de NaOH 7 N a 110 °C por 1 hora en una estufa de convección (Thermo Precision). Luego las muestras tratadas se neutralizaron con 500 μ L de una solución de H₂SO₄ 3.5 M para diluirlas agregando 10 mL de agua ultra-pura. Se tomaron alícuotas de 50 μ L de las muestras neutralizadas y se diluyeron hasta 600 μ L, para adicionarle 300 μ L de Cloramina T en buffer con agitación durante 7 segundos para dejarlas en reposo durante 20 min a T ambiente. Luego se adicionaron 300 μ L de una mezcla de dimetil amino benzaldehído-ácido perclórico – propanol (1 g / 3.5 mL /6.5 mL) y se llevaron a 60 °C en baño seco (Accublock Digital Dry Bath, Labnet D1200, EE.UU.) durante 15 min y se dejaron a 25 °C durante 5 min para finalmente leer la absorbancia a 560 nm en el espectrofotómetro (GENESYS 10S UV-VIS, Thermo scientific™, Massachusetts-EE.UU.). La solución buffer, con que se mezcla la cloramina T, se prepara con 30 g de ácido cítrico monohidratado, 15 g de NaOH, 90 g de acetato de sodio tri-hidratado y 250 g de propanol (pH=6). Para determinar el contenido de HP (mg/mL) se construyó una curva de calibración con hidroxiprolina (trans-4-Hydroxy-L-proline \geq 99% marca Sigma). Como el colágeno contiene aproximadamente un 12.5% de HP, se puede determinar su contenido multiplicando la concentración de HP por 8 (Blanco et al., 2019). Para estimar el contenido de colágeno en el líquido (solución básica, solución ácida, filtrado, retenido, etc.) se tomaron 200 μ L de muestras representativas y se sometieron al mismo procedimiento que las muestras sólidas. Todos los reactivos utilizados para dichos análisis fueron grado analítico. Los análisis se realizaron por triplicado.

5.1.4. FTIR

Al colágeno liofilizado obtenido se le realizó una espectroscopia de reflectancia total atenuada (ATR) en un equipo Thermo iS50, equipado con cristal de diamante. El colágeno liofilizado se ubicó sobre el cristal de diamante del accesorio ATR y la medida se realizó utilizando

32 barridos con una resolución de 4 cm^{-1} . Previo al análisis se midió el background bajo las mismas condiciones con la celda limpia y vacía (Li et al., 2018).

5.1.5. SDS-PAGE

La masa molecular del colágeno se determinó mediante electroforesis con dodecil sulfato de sodio en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de acuerdo con el procedimiento descrito por (Laemmli, 1970) con algunas modificaciones. Inicialmente se redisuelve el colágeno liofilizado en ácido acético 0.1 M de tal forma que su concentración sea de 10 mg/mL y se mezclan partes iguales de dicha solución y de buffer de muestra (1% SDS, 10% glicerol y 0.01% de azul de bromofenol) y se calienta a $90 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 min. Luego 10 μL de muestra desnaturalizada y 5 μL de marcador con peso molar desde 10 kDa hasta 220 KDa (Bench Mark Proteín Ladder) se sembraron en un gel de poliacrilamida con concentración gradiente de 4-20% y se aplica un voltaje constante de 120 voltios por 1 hora y media para obtener las bandas de las proteínas separadas de acuerdo con su peso molecular. El colorante se preparó mezclando azul de Coomassie al 0.2% con una solución al 50% de Metanol y 10% de ácido acético y la decoloración se realizó con una solución al 50% de metanol, 5% de ácido acético y el resto de agua destilada (Chen et al., 2016).

5.1.6. SEM

Las características morfológicas del colágeno obtenido se determinaron mediante un análisis SEM (S-4800; Hitachi, Tokyo, Japan). Las muestras de colágeno liofilizado fueron analizadas a varias ampliaciones. Para formar las fibras de colágeno, se tomó el colágeno liofilizado y se disolvió en HCL 0.01 M. luego las fibras de colágeno fueron fijadas en una solución al 2% de glutaraldehído, lavadas con agua desionizada y finalmente liofilizadas para el análisis SEM (Liang et al., 2014).

5.2. Caracterización de los subproductos de pescado

5.2.1. Piel de tilapia nilótica (PTN)

La tilapia se compró en la plaza minorista de Medellín, Antioquia-Colombia, se sometió a fileteo para retirar la PTN, la cual se lavó y se transportó a baja temperatura hasta el laboratorio

donde se almacenó congelada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se tomaron muestras representativas de PTN y se pusieron en refrigeración por 24 h y con la ayuda de un cuchillo se retiraron las escamas y los pedazos de músculo para determinar su contenido de humedad, cenizas, grasa y proteína total con base en los métodos mencionados en el apartado 5.1. El contenido de colágeno de la PTN se estimó indirectamente mediante el análisis de HP siguiendo el método propuesto por Da Silva y colaboradores con ligeras modificaciones como se describe en la sección 5.1.3 (Da Silva et al., 2015).

5.2.2. Escamas de tilapia Roja (ETR)

Las ETR se consiguieron en el municipio de San Jerónimo, en el occidente antioqueño, y fueron desinfectadas, lavadas y transportadas a laboratorio para ser almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se tomaron muestras representativas y se sometieron a análisis de humedad, grasa, cenizas y proteína con base en los métodos citados en la sección 5.1.1. El contenido de colágeno se determinó indirectamente mediante análisis de HP (Da Silva et al., 2015).

5.2.3. Espina dorsal de trucha (EDT)

La EDT se consiguió en el oriente antioqueño, se lavó y se transportó al laboratorio para almacenarla a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización. La EDT se sometió a una disminución de tamaño con tijeras, hasta obtener pedazos de 1 cm de longitud aproximadamente, se le eliminó la mayor cantidad de músculo y se tomaron muestras representativas para ser caracterizada mediante los métodos descritos en la sección 5.1. El contenido de colágeno se determinó mediante análisis de HP (Da Silva et al., 2015).

5.3. Selección del mejor subproducto

Para seleccionar el mejor subproducto se calculó el rendimiento de extracción. Para lograr esto, se implementó el proceso de extracción ácida de colágeno a partir de cada uno de los tres residuos, bajo las mismas condiciones de operación, de tal forma que los resultados obtenidos fueran comparables. Las condiciones de operación empleadas se seleccionaron con base en el trabajo sobre extracción de colágeno de Quintero y Zapata (2017) a la temperatura más baja que permitiera operar el baño de refrigeración disponible, por lo que cada extracción se hizo a $8\text{ }^{\circ}\text{C}$

por triplicado para cada subproducto. La **Tabla 6** muestra un resumen de las etapas que fueron implementadas para cada uno de los subproductos.

Tabla 6. Proceso de extracción de colágeno para cada uno de los tres subproductos a 8 °C

Etapa	PTN	ETR	EDT
Reducción de tamaño	SI	NO	SI
Desengrasado (butanol 10%) por 12 h	SI	NO	NO
Primera desproteinización con NaOH 0.5 M por 8 h	SI	SI	SI
Segunda desproteinización con NaOH 0.5 M por 12 h	SI	SI	SI
Desmineralización con EDTA 0.5 M por 48 h	NO	SI	SI
Extracción ácida con Ac. Acético 0.7 M por 12 h	SI	SI	SI
Precipitación con NaCl al 10% (m/v)	SI	SI	SI
Centrifugación a 10000 g y 4 °C	NO	SI	SI

PTN: piel de tilapia nilótica, ETR: escamas de tilapia roja, EDT: espina dorsal de trucha

Antes de iniciar el proceso de extracción, cada subproducto se puso en refrigeración a 4 °C 24 h antes de ser procesado. Inicialmente se le hizo una desproteinización alcalina a cada materia prima mezclando 50 g de residuo con 500 mL de solución de NaOH 0.5 M en un reactor de vidrio enchaquetado, para mantener la temperatura a 8 °C, agitando magnéticamente a 300 rpm durante 8 h y luego se sometieron a una segunda etapa desproteinización a las mismas condiciones por 12 h.

5.3.1. Obtención de colágeno a partir de ETR

Las ETR desproteinizadas se sometieron a un proceso de descalcificación con una solución de EDTA 0.5 M durante 24 h empleando un R' de 10 a 8 °C y agitando magnéticamente a 450 rpm en el mismo reactor con cambio de solución a las 12 h (Chuaychan et al., 2015). Las ETR descalcificadas se sometieron a un análisis de cenizas (AOAC, 2003a) y se mezclaron con 500 mL de ácido acético 0.7 M en el mismo reactor y a las mismas condiciones de agitación que en las etapas anteriores, durante 12 h para extraer el CAS. A la solución obtenida se le realizó un análisis de HP (Da Silva et al., 2015) para estimar el contenido de colágeno en dicho extracto y luego se le adicionó sal (10% m/V) para precipitar el colágeno y se centrifugó a 4 °C y 10000 g para separar el sólido de la fase líquida. El precipitado obtenido, también se sometió a un análisis de HP, para

determinar el rendimiento de la extracción. Se determinó el contenido de HP tanto en el extracto ácido como en el precipitado para comparar y validar los resultados con base en el balance de masa de colágeno.

5.3.2. Obtención de colágeno a partir de EDT

La EDT se cortó en pedazos de 1 cm de longitud aproximadamente antes de someterla a las dos etapas de desproteización. Luego, el subproducto desproteizado, se sometió a un proceso de descalcificación similar al de las ETR (Chuaychan et al., 2015). La EDT descalcificada, se sometió a extracción ácida con ácido acético 0.7 M empleando un $R' = 10$ durante 12 h y se tomaron muestras representativas del extracto ácido para determinar su contenido de colágeno. Luego la solución ácida, con el colágeno disuelto, se sometió a precipitación con sal (10% m/V) y se centrifugó a 4 °C y 10000 g para separar el sólido obtenido del sobrenadante. El sólido se somete a un análisis de HP para determinar el contenido de colágeno y evaluar el rendimiento de extracción.

5.3.3. Obtención de colágeno a partir de PTN

La PTN se cortó en pedazos de 2 cm de longitud aproximadamente antes de someterla a las 2 etapas de desproteización. La PTN desproteizada se mezcló con 500 mL de butanol al 10% para eliminar la grasa durante 12 h a 8 °C y 300 rpm. La PTN desengrasada se mezcló con 500 mL de ácido acético 0.7 M durante 12 h para extraer el colágeno presente en la piel a las mismas condiciones de agitación y temperatura que en la etapa anterior. La solución obtenida se sometió a un análisis de HP (Da Silva et al., 2015) para determinar su contenido de colágeno y luego se llevó a cabo la precipitación con sal (10% m/V). El precipitado se filtra usando toallas absorbentes (celulosa-polipropileno) y el sólido se sometió a un análisis de HP (Da Silva et al., 2015) para determinar el contenido de colágeno.

5.3.4. Comparación de los tres subproductos

Para seleccionar el mejor subproducto, se calcularon los rendimientos porcentuales de extracción de colágeno a partir de cada residuo mediante el balance de masa del proceso global y se seleccionó el que registró el mayor valor, que como se verá en los resultados, fue la PTN.

5.4. Implementación del proceso de obtención de colágeno a partir del mejor subproducto (PTN)

La **Imagen 11** muestra las principales etapas que se desarrollaron para obtener el CAS a partir de la PTN y se indica en cuales de ellas se implementaron diseños experimentales.

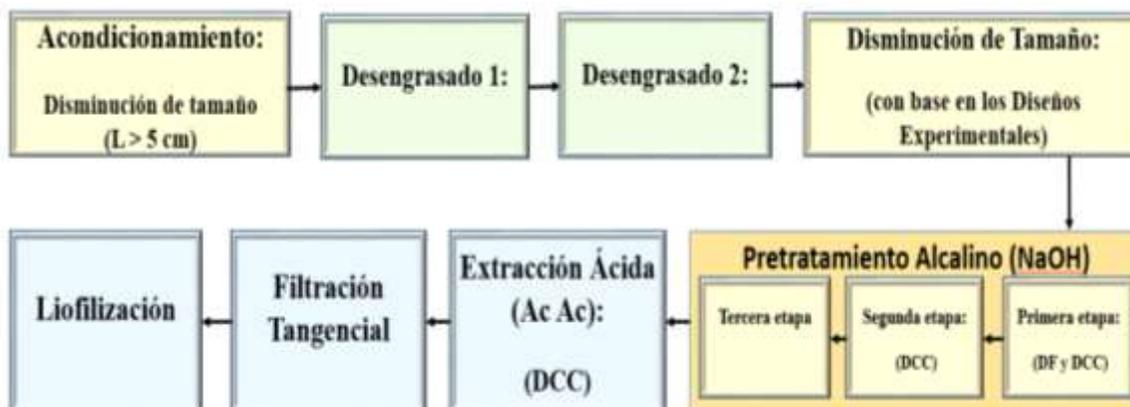


Imagen 11. Principales etapas del proceso de extracción de CAS a partir de la PTN.
DF:diseño factorial, DCC: diseño central compuesto.

5.4.1. Implementación del pretratamiento alcalino, para el mejor subproducto (PTN)

Esta etapa se lleva cabo para eliminar la PNC de la PTN, la cual es soluble en soluciones con pH básico. Aunque en muchos de los trabajos reportados sobre extracción de colágeno a partir de subproductos de pescado se realiza primero el pretratamiento alcalino y luego el desengrasado (Jongjareonrak et al., 2005; Zeng et al., 2009; Zhang et al., 2014), en este trabajo se hace primero el desengrasado (butanol (10%) en agua destilada) porque ayudó a eliminar por completo las escamas residuales en la PTN y facilitó el corte de esta. La PTN desengrasada fue sometida a tres etapas de desproteinización con NaOH (Chen et al., 2016), con el fin de eliminar la mayor cantidad posible de PNC. Inicialmente, se hicieron ensayos, a diferentes condiciones de operación, con el fin de obtener información sobre algunos parámetros propios de la extracción y poder definir los posibles factores a evaluar y sus rangos. Luego se implementaron diseños experimentales para evaluar el efecto de los factores seleccionados, sobre el EPNC y el PC de la primera y segunda etapa de desproteinización con el fin de determinar las condiciones óptimas de operación mediante MSR.

Adicionalmente se midieron las C_{PNC} a diferentes tiempos para realizar análisis de la cinética de extracción de la primera y segunda desproteinización alcalina. Luego se evaluaron algunos modelos empíricos y semiempíricos para modelar dichas etapas. Finalmente, se hizo un escalado del pretratamiento alcalino para tener cantidad de materia prima suficiente para el estudio de la siguiente etapa del proceso de extracción del colágeno.

Acondicionamiento y desengrasado de la PTN

La piel se puso en refrigeración 24 h antes de ser utilizada para descongelarla. Inicialmente se cortó la piel en pedazos grandes (más de 5 cm de lado), se le retiró el músculo residual y la mayoría de las escamas. Luego, la PTN se lavó y se sometió a un proceso de desengrasado en dos etapas: en la primera etapa se mezclaron 400 g de PTN con 4 L de butanol a 10% (en agua destilada) en un reactor de acrílico de 8 L a 10 °C con agitación moderada y después de 8 h se cambió la solución alcohólica para realizar la segunda etapa bajo las mismas condiciones por otras 8 h (Li et al., 2018).

Determinación de la velocidad de agitación

Debido a la gran cantidad de factores que afectan el proceso de extracción sólido-líquido, inicialmente se hicieron ensayos a diferentes velocidades de agitación (N) para eliminar este parámetro como posible factor del diseño. Debido a que en la mayoría de los estudios sobre extracción de colágeno, no se reportan los valores de N empleados (Arumugam et al., 2018; Li et al., 2018), en este trabajo se hicieron ensayos con agitador magnético, empleando 5 niveles de N (100, 200, 300, 400 y 500 rpm) a 10 °C en un reactor enchaquetado de vidrio de 500 mL. En cada experimento se mezclaron muestras representativas de PTN de aproximadamente 5 cm de lado con soluciones de NaOH 0.5 M empleando un valor de R' de 30 mL g⁻¹ durante 5 h con el fin de determinar el valor mínimo de N , por encima del cual la variación en el % de extracción no fue significativa, con el fin de fijar el valor de N y no incluirla como variable de estudio en los diseños experimentales.

Determinación del tiempo de extracción

En la mayoría de los estudios reportados, el pretratamiento alcalino se hace generalmente en tres lotes y emplean un mismo tiempo de extracción para cada uno (Li et al., 2018; Sun et al., 2017). Para definir los tiempos de operación de la primera, segunda y tercera etapa de desproteínización, se realizaron ensayos de cada una de las tres etapas y se hizo seguimiento a la cinética durante 8 horas en cada una, y de acuerdo con las máximas pendientes (velocidades extracción) observadas en el gráfico C_{PNC} vs. t , se determinaron los tiempos en los que la extracción de proteína fue significativa para cada lote. Los ensayos se implementaron en un reactor enchaquetado de vidrio de 500 mL agitado magnéticamente a 400 rpm, a 10 °C mezclando soluciones de NaOH 0.7 M con pedazos de PTN de 1 cm y empleando valores de R' de 30 mL g⁻¹.

Determinación de la concentración de base (C_b) máxima

Para estimar el valor de C_b que se aproximara al límite superior del intervalo en el cual se iba a evaluar dicho parámetro en el diseño experimental, se realizaron ensayos de la primera extracción básica empleando soluciones de NaOH concentradas (que favorecen la extracción de PNC) y se determinó el contenido de HP en el extracto básico (Da Silva et al., 2015) para evaluar las posibles pérdidas de colágeno. Para este análisis se tomaron 20 g de PTN fresca ($L= 1$ cm) y se mezclaron con 600 mL de la solución de NaOH (1.0, 1.2, 1.4 M) manteniendo la temperatura a 20 °C y con una agitación magnética a 400 rpm durante 5 h. Cada experimento se hizo por duplicado.

Diseño Factorial (DF) del primer pretratamiento Alcalino

Con base en los resultados obtenidos en los ensayos previos, se hizo inicialmente un diseño factorial (DF) (3^3) empleando un volumen de operación de 200 mL de solución básica, fijando el tiempo ($t = 5$ h) de extracción y la velocidad de agitación ($N = 400$ rpm). Las condiciones óptimas de la extracción se obtuvieron mediante MSR empleando el programa estadístico Design Expert (STAT EASE). Cada experimento se llevó a cabo en un reactor enchaquetado de vidrio de 500 mL agitado magnéticamente, manteniendo constante el valor de R' (33.33 ml g⁻¹) para evaluar el efecto

de T (10 - 20 °C), L (1 - 5 cm) y C_b (0.3 - 0.7 M) sobre dos variables de respuesta: El EPNC y el PC a las 5 horas de extracción.

El EPNC se estimó con base en la medición del contenido de PNC soluble, presente en las soluciones de NaOH de los diferentes tratamientos (Lowry et al., 1951).

Conociendo el contenido de PNC en la solución básica y el contenido de PNC en la piel, previamente determinada (AOAC, 2003d), se pudo estimar el EPNC (%) después de 5 horas de extracción reemplazando dichos valores en la Ecuación (49):

$$EPNC = \frac{\text{g de PNC extraída en la solución alcalina}}{\text{g PNC en la PTN}} * 100 \quad (49)$$

Para poder determinar el PC en la extracción alcalina, se determinó el contenido de HP en muestras representativas de la solución básica siguiendo el método de Da Silva y colaboradores (Da Silva et al., 2015). El contenido de colágeno en la PTN se estimó siguiendo el mismo método para sólidos como ya se describió en los métodos analíticos y conociendo el contenido de dicho componente tanto en la solución extractora como en el subproducto, se pudo determinar las PC mediante la Ecuación (50).

$$PC = \frac{\text{g de Colágeno presente en la solución alcalina}}{\text{g Colágeno en la PTN}} * 100 \quad (50)$$

Diseño central compuesto (DCC) para el primer pretratamiento alcalino

A partir de los resultados obtenidos en el DF y con el fin de estudiar un rango más amplio de los factores y de mejorar los modelos estadísticos de efectos, se implementó un DCC con 5 repeticiones al centro, con las mismas variables de entrada y de respuesta, y se determinaron las condiciones óptimas de operación mediante MSR. Con base en los valores que arrojó el DCC para los tres factores, se cortó la piel en trozos cuadrados de 1x1, 3x3, 5x5 cm² respectivamente y en otros tamaños (L) correspondientes a puntos axiales propios del diseño. Los rangos de niveles de T y de C_b empleados fueron 10 y 20 °C, y 0.3 y 0.7 M respectivamente y los valores correspondientes a los puntos axiales y centrales para cada factor. Los experimentos se hicieron en el mismo reactor utilizado para el DF y empleando los mismos valores de N , t y R' . La agitación se realizó con un motor de 70 W de potencia usando un agitador de paleta (media luna) de 5.1 cm en acero inoxidable. Las variables de respuesta fueron EPNC y PC, las cuales se calcularon

mediante las Ecuaciones (61) y (62) respectivamente. Para la validación del punto óptimo, se hizo la primera etapa de extracción alcalina a dichas condiciones por triplicado.

Diseño central compuesto (DCC) del segundo pretratamiento alcalino

Conocidas las condiciones óptimas de operación para el primer pretratamiento alcalino mediante MSR, se implementó un DCC con 5 repeticiones al centro, con variables de entrada T (10 - 17 °C) y C_b (0.2 - 0.5 M) y variables de respuesta EPNC (%) y PC (%) para la segunda etapa de desproteínización, excluyendo L como factor, pues este queda determinado de acuerdo con el punto óptimo encontrado para el primer DCC. Los experimentos se desarrollaron mezclando 6 g de PTN desproteínizada (1 vez) con 200 mL de solución básica (a los diferentes valores de C_b lanzados por el DCC), en el mismo reactor utilizado para la primera desproteínización y empleando los mismos valores de R' y N para $t = 6$ h. El tiempo de extracción se estableció con base en la cinética observada en los experimentos previos de la segunda etapa de extracción como ya se mencionó. El valor de C_b empleado en la tercera desproteínización se definió con base en la tendencia de variación de este parámetro entre el punto óptimo encontrado para la primera desproteínización y el óptimo obtenido para la segunda en los DCC mediante MSR.

Determinación de la cinética de extracción del pretratamiento alcalino

Para realizar el análisis cinético del primer pretratamiento alcalino, se tomaron muestras representativas de la solución alcalina en contacto con la PTN, cada hora durante 5 horas y se midió la C_{PNC} para cada punto (triplicado) por espectrofotometría mediante el método de Lowry (Lowry et al., 1951). Conociendo la concentración de PNC en función del tiempo para los diferentes experimentos, se pudieron construir curvas paramétricas de C_{PNC} vs t , cuyos parámetros fueron las variables de estudio (factores), con el fin de determinar de manera gráfica el efecto de cada factor sobre la velocidad de extracción y el rendimiento porcentual. Para el segundo pretratamiento alcalino, se tomaron muestras representativas, de la solución alcalina en contacto con la PTN, cada hora durante 6 horas y se midió la C_{PNC} para cada punto (triplicado) por espectrofotometría mediante el método de Lowry (Lowry et al., 1951) a las condiciones de operación de cada tratamiento. Conociendo la concentración de PNC en función del tiempo para los diferentes tratamientos, se pudieron construir curvas paramétricas de C_{PNC} vs t , con el fin de

analizar de manera gráfica el efecto de cada variable de estudio sobre la velocidad de la extracción de esta segunda etapa.

5.4.2. Modelado del pretratamiento alcalino

Para modelar esta etapa se emplearon modelos empíricos y uno fenomenológico simple con base en los balances de masa. Con el fin de validar la capacidad de predicción de dichos modelos se estimaron el coeficiente de correlación R^2 , $RMSD$ y el porcentaje del error medio absoluto ($MAPE$) (Kiew et al., 2014) mediante las Ecuaciones (51), (52) y (53) respectivamente:

$$R^2 = \frac{\sum(Y_{cal} - Y_{prom})^2}{\sum(Y_{exp} - Y_{prom})^2} \quad (51)$$

$$RMSD = \frac{1}{N} \sqrt{\sum (Y_{cal} - Y_{exp})^2} \quad (52)$$

$$MAPE = \frac{1}{N} \sum \frac{|Y_{exp} - Y_{cal}|}{Y_{exp}} 100 \quad (53)$$

Para el modelado de la primera y segunda extracción alcalina por medio de modelos empíricos, inicialmente se determinaron los parámetros del MSO a partir de la pendiente (m) y el intercepto (b) de la gráfica de t/C_t vs. t , con base en la Ecuación (3). Mediante la Ecuación (54) se puede determinar el valor de C_e para tratamiento en los diseños experimentales de ambas etapas:

$$C_e = \frac{1}{m} \quad (54)$$

Conociendo b y C_e se puede estimar constante de velocidad de segundo orden (k) para cada uno de los tratamientos a partir de la siguiente ecuación:

$$k = \frac{1}{b C_e^2} \quad (55)$$

Y con k y C_e se puede estimar la velocidad de extracción inicial (h) mediante la Ecuación (4). Para determinar los intervalos de confianza, se aplica el método de Monte Carlo (Lambert et al., 2012) desarrollando un algoritmo para generar números aleatorios mediante una función de distribución normal inversa (NI) usando como argumentos una media de cero y una desviación estándar correspondiente al $RMSD$ [$NI(0,RMSD)$] y a partir de los datos experimentales originales,

se generaron 200 réplicas para poder estimar los promedios de los parámetros y mediante un función inversa T-student de dos colas, finalmente se estimaron los intervalos de confianza con una significancia del 5% ($\alpha / 2$ igual a 0.025).

Para el caso del MDP y el MDS, se realizaron correlaciones no lineales mediante el método de mínimos cuadrados que consiste en encontrar el valor mínimo del parámetro RMSD definido en la Ecuación (52). Los valores experimentales corresponden a los resultados de la evolución de C_{PNC} en el tiempo, mientras que los valores calculados son los que se obtienen a partir de cada modelo utilizando como variables de decisión los parámetros k_1 y k_2 para el MDP y F , K_1 y K_2 para MDS. Dicho proceso de optimización se hizo utilizando la función Solver de Microsoft EXCEL. Conociendo los valores de los parámetros que minimizan el valor de $RMSD$, para cada uno de los modelos estudiados, se construyeron curvas (C_t vs. t) que permitieron observar de manera gráfica que tan cercanos fueron los valores experimentales de los predichos por los respectivos modelos, para cada uno de los dos pretratamientos alcalinos. Para estimar los intervalos de confianza se empleó el método de Monte Carlo de manera similar al MSO (Lambert et al., 2012).

Con base en los valores estimados de los parámetros de cada modelo, para cada una de las condiciones de operación de los diferentes tratamientos de los diseños experimentales, en las dos primeras extracciones alcalinas, se realizó un análisis de cada uno de ellos como si fueran una variable de respuesta del diseño experimental y mediante MSR se obtuvieron modelos de efectos que permitieron expresar dichos parámetros, en términos de los factores evaluados en cada diseño. Al reemplazar los parámetros que están en términos de los factores, en cada uno de los modelos empíricos, se obtuvieron expresiones matemáticas que representan un modelo más general para estimar C_{PNC} , en términos de los factores y del tiempo, cuyas capacidades predictivas se evaluaron mediante el cálculo del RMSD y del MAPE para el total de los experimentos.

Para el caso del primer pretratamiento alcalino, mediante la correlación entre los valores predichos para C_{PNC} por cada uno de los modelos evaluados, y los valores experimentales de dicha variable, en cada uno de los tratamientos de los diseños experimentales, se determinaron los valores de los parámetros P_i de cada modelo, que permiten estimar la C_{PNC} mediante expresiones matemáticas en función del tiempo de la forma de la Ecuación (56):

$$C_{PNC} = F(P_1, P_2 \dots, P_n, t) \quad (56)$$

Si se toman los parámetros P_i , como variables de respuesta del diseño experimental, se puede expresar cada uno ellos en función de los factores evaluados, mediante modelos estadísticos de efectos y se podrían encontrar expresiones para cada P_i de los diferentes modelos empíricos de la siguiente forma:

$$P_i = f(C_b, T, L) \quad (57)$$

Reemplazando los parámetros despejados de la forma que muestra la Ecuación (57) en las expresiones para C_{PNC} , para cada uno de los modelos empíricos, despejadas de la forma de la Ecuación (69), se tendría un modelo general de la siguiente forma:

$$C_{PNC} = F^*(C_b, T, L, t) \quad (58)$$

El modelo general se validó para condiciones de operación correspondientes a puntos del DF y del DCC y para condiciones diferentes, pero dentro del rango de estudio de cada factor. La capacidad de predicción se midió mediante el cálculo de los valores de RMSD y el MAPE para todos los datos de cada diseño experimental de la primera y segunda desproteínización. Para el segundo pretratamiento, se aplica la misma metodología. El modelo fenomenológico se desarrolla con base en los balances de masa en la fase sólida y líquida como se vio en la sección 4.6.7. Del balance de masa del sólido de la Ecuación (22) al separar variables se obtiene:

$$\frac{dC_s}{(C_s - C_{si})} = -\frac{k_s A}{V_s} dt \quad (59)$$

En láminas delgadas (espesor l muy pequeño) se puede asumir que la T de M se da solo a través de las caras de área $L \times L$, de tal forma que la transferencia es unidireccional. Sin embargo, en el pretratamiento alcalino, la PTN sufre un hinchamiento cuando entra en contacto con el NaOH, que provoca un aumento rápido de l , haciendo que la T de M a través de las áreas laterales ya no sea despreciable. Con base en lo anterior, el área a través de la cual se da la T de M en la extracción básica sería:

$$A = 2L^2 + 4lL = A(t) \quad (60)$$

Mediante mediciones de l a diferentes tiempos de extracción se encontró una expresión para el espesor en función del tiempo, que al reemplazar en la Ecuación (59) permite obtener la siguiente expresión:

$$\frac{dC_s}{(C_s - C_{si})} = -\frac{k_s}{l(t)} dt \quad (61)$$

De manera similar a como se obtiene la Ecuación (61), del balance de masa en el líquido se obtiene:

$$\frac{dC_L}{(C_L - C_{Li})} = -\frac{k_L A}{V_L} dt \quad (62)$$

Con base en el análisis cinético realizado en las diferentes extracciones del proceso, se pudo conocer la concentración de PNC a diferentes tiempos ($C_L = C_L(t)$). Al reemplazar A en la Ecuación (62), es posible estimar los valores de C_{Li} y K_L (variables de decisión) al resolver dicha ecuación mediante un algoritmo que acople un método numérico de solución de ecuaciones diferenciales (Runge Kutta de orden 4) con un método de optimización que permita minimizar el error entre los valores experimentales y los calculados para cada uno de los tratamientos durante los tiempos evaluados en el análisis cinético (*Función Objetivo* = $RMSD = f(C_{Li}, K_L)$). Los intervalos de confianza se determinaron mediante un algoritmo que acopló el método de Runge-Kutta de orden 4 con el método de Monte Carlo (Lambert et al., 2012) con el fin de estimar los parámetros C_{Li} y K_L para 200 réplicas (aleatorias) de manera similar a como se hizo para los modelos empíricos.

Adicionalmente se estimaron los D_{ef} para cada tratamiento del DCC del primer pretratamiento alcalino mediante la Ecuación (20) asumiendo que la PTN se comporta como una lámina plana. Los Valores de C_s se estimaron mediante un balance de masa entre el sólido y el líquido y se utilizó un valor promedio para l y mediante el método de mínimos cuadrados para hacer una correlación entre los datos experimentales de C_s y los calculados por medio de la Ecuación (20), se pudo estimar el valor de D_{ef} para cada ensayo.

Análisis Termodinámico

Como se realizaron experimentos a tres diferentes temperaturas para cada valor de L y C_b en el DF, fue posible encontrar las E_a a partir de la pendiente y el intercepto de la línea recta que se obtiene al sacar logaritmo natural en ambos lados de la Ecuación (6), conociendo los valores de la constante de velocidad de segundo orden (k) para los diferentes tratamientos. Los valores de ΔG , ΔH y ΔS se pueden estimar a partir de las Ecuaciones (12) y (13) una vez se conozca el valor de K_{eq} por medio de la Ecuación (11).

5.4.3. Escalado del pretratamiento alcalino mediante análisis dimensional.

Con base en el punto óptimo encontrado mediante MSR aplicada a los diseños experimentales implementados para las extracciones alcalinas para un volumen de 200 mL, se escaló el proceso a un volumen de 2 L, utilizando un recipiente de acero inoxidable cilíndrico de 4 L para garantizar la similitud geométrica (McCabe et al., 2007). Con base en el método de PI Buckingham, se hallan números adimensionales en función de un grupo de variables que hacen parte de las propiedades que afectan y determinan el estado del sistema (Cengel y Cimbala, 2006). A continuación, se muestra el procedimiento para escalar el pretratamiento alcalino y en la **Tabla 7** muestra la lista de las variables involucradas en esta etapa (extracción sólido-líquido).

Tabla 7. Variables involucradas en el primer pretratamiento alcalino

Símbolo	R'	C_b	N	ρ	T	Da	L	u	C_{PNC}
unidad	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$	g cm^{-3}	s^{-1}	g cm^{-3}	K	cm	cm	$\text{g cm}^{-1} \text{s}^{-1}$	g cm^{-3}

El número de unidades involucradas en las 9 variables son 4 (cm, g, s y K), es decir, se pueden obtener 5 ($9 - 4$) números adimensionales: $\pi_1, \pi_2, \pi_3, \pi_4, \pi_5$. Por lo tanto, se deben escoger 4 variables de las 9 para que sirvan de base en la construcción de los números adimensionales (McCabe et al., 2007), con cada una de las 5 variables restantes. Si se eligen T, N, D y ρ , entonces la ecuación general para cada número adimensional sería:

$$\pi_i = T^a N^b \rho^c D^d X_i \quad (63)$$

Donde $a, b, c, y d$ son exponentes, cuyos valores deben ser encontrados para que π_i sea adimensional al multiplicar las cuatro variables seleccionadas por cada una de las restantes X_i , con $i=1,2,3,4$ y 5 .

5.4.4. Implementación de la extracción ácida

Esta etapa se realiza con fin de extraer el CAS presente en la PTN desproteinizada mediante el pretratamiento alcalino.

Diseño central compuesto para la extracción ácida

Como el tamaño de la PTN (L), queda determinado a partir de la optimización del pretratamiento alcalino, se excluyó como factor de estudio y se implementó un DCC con 5 repeticiones al centro, con variables de entrada T (10 - 20 °C), C_{Ac} (0.4 - 0.7 M) y R' (40 - 60 mL/g) y como variable de respuesta el % extracción de colágeno (EC) a las 3 h de proceso y determinar las condiciones óptimas mediante MSR. Los experimentos se desarrollaron tomando 200 mL de solución de ácido acético y se mezclaron con las respectivas masas de PTN desproteinizada (3 veces), las cuales fueron calculadas con base en los valores de R' lanzados por el DCC. Las diferentes extracciones se llevaron a cabo en un reactor de vidrio enchaquetado de 500 mL, manteniendo la velocidad de agitación a 400 rpm mediante un agitador de paleta de acero inoxidable de 7.2 cm, el cual fue accionado por un motor de 70 W de potencia y acoplado a un baño de refrigeración para controlar la temperatura en cada uno de los niveles del DCC.

Para poder determinar el porcentaje de extracción (EC), se determinó el contenido de HP en muestras representativas de la solución ácida siguiendo el método de Da Silva y colaboradores para líquidos como se explicó en la sección 5.1.3 (Da Silva et al., 2015). El contenido de colágeno en la PTN se estimó siguiendo el mismo método para sólidos como ya se describió y conociendo el contenido de dicho componente tanto en la solución extractora como en la piel, se pudo estimar el valor de EC mediante la Ecuación (64).

$$ECOL_3 = \frac{\text{g de Colágeno presente en la solución ácida}}{\text{g Colágeno en la PTN}} * 100 \quad (64)$$

Determinación de la cinética de la extracción ácida

Para el análisis cinético de la extracción ácida del colágeno, se tomaron muestras representativas de la solución ácida en contacto con la PTN (desproteinizada 3 veces), cada media hora durante 5 horas y se estimó la concentración de HP para cada punto (triplicado) (Da Silva et al., 2015) a las condiciones de operación de cada tratamiento del DCC con el fin de estimar la concentración de colágeno (C_{col}) en la solución (Blanco et al., 2019). Conociendo C_{col} a diferentes tiempos para los tratamientos, se pudieron construir algunas curvas paramétricas de C_{Col} vs t , con el fin de analizar de manera gráfica el efecto de cada variable de estudio sobre la velocidad de la extracción en esta etapa.

5.4.5. Modelado de la extracción ácida

Para el modelado de esta etapa, solo se emplearon modelos empíricos, ya que la PTN sometida a la extracción se desintegraba disolviéndose por completo en la solución ácida dándose una T de M interfacial temporal y haciendo más complejo el análisis del fenómeno. La capacidad de predicción se midió mediante el R^2 , el $RMSD$ y el $MAPE$ estimados con las Ecuaciones (51), (52) y (53) (Kiew et al., 2014). Los parámetros del MSO se estimaron de manera similar a como se hizo en el pretratamiento alcalino usando las Ecuaciones (54) y (55).

Para estimar los parámetros del MDP y el MDS, se hicieron correlaciones similares a las realizadas para el tratamiento alcalino. Los valores experimentales corresponden a los resultados de la evolución de C_{Col} en el tiempo, mientras que los valores calculados son los que se obtienen a partir de cada modelo utilizando como variables de decisión los parámetros k_1 y k_2 para el MDP y F , K_1 y K_2 para MDS. Dicho proceso de optimización se hizo utilizando la función Solver de Microsoft EXCEL. Conociendo los valores de los parámetros óptimos, para cada uno de los modelos estudiados, se construyeron curvas (C_i vs. t) que permitieron observar de manera gráfica que tan cercanos fueron los valores experimentales de los predichos por los respectivos modelos.

5.4.6. Escalado de la extracción ácida

Con el fin de tener una cantidad suficiente del extracto ácido para implementar la siguiente etapa del proceso (filtración tangencial), mediante un procedimiento similar al que se hizo en el pretratamiento alcalino, se realiza un escalado de 200 mL a 2 L, mediante un análisis dimensional por medio del número de Re (McCabe et al., 2007), usando la Ecuación (63). El proceso se llevó a cabo en un reactor de acero inoxidable de 4 L, empleando un motor de 70 W para mantener el sistema al nivel de agitación obtenido a partir del análisis dimensional, a las condiciones del punto óptimo encontradas mediante MSR en el DCC.

5.4.7. Filtración tangencial

El extracto ácido de colágeno obtenido, se sometió a filtración tangencial a diferentes condiciones de operación para evaluar modelos de bloqueo de poro (completo, intermedio y estándar) y de formación de torta (Iritani y Katagiri, 2016; Mondal y De, 2010), y determinar cuál de estos mecanismos controla dicho proceso de separación y estimar los parámetros que

permitieron hacer el modelado de la misma. El colágeno filtrado se liofilizó y se caracterizó. Adicionalmente se hicieron diafiltraciones del extracto ácido con el fin de bajar la acidez el producto y al igual que en la filtración, el colágeno obtenido se liofilizó y se caracterizó. A continuación, se describe lo que se hizo en esta etapa.

La resistencia de la membrana nueva (R_m) se determinó operando inicialmente una membrana (10 kDa, Vivaflow 200, en PES) con agua desionizada y se midió el flujo de permeado a diferentes PTM (1.3 – 2.8 bar). Los diferentes valores de PTM se obtuvieron variando el caudal de alimentación mediante la modificación de la velocidad de rotación de la bomba peristáltica. El valor de R_m se estimó conociendo la pendiente (mf) de la recta obtenida de graficar J vs. PTM por medio de la siguiente ecuación:

$$R_m = \frac{1}{m_f u_a} \quad (65)$$

Donde u_a es la viscosidad del agua desionizada (0.001 Pa s).

Filtración del extracto ácido

Para la filtración del extracto ácido, se utilizó inicialmente una membrana tangencial de 10 kDa empleando diferentes caudales iniciales de retenido y diferentes volúmenes de alimentación con el fin de evaluar el flujo del permeado durante el proceso a diferentes PTM y determinar el mecanismo controlante de la filtración. El sistema operó en batch mediante una bomba peristáltica de 0.05 hp como se muestra en la **Figura 4**, a 20 °C con recirculación continua del material retenido y evacuación del permeado.



Figura 4. Diagrama del sistema de filtración tangencial

Determinación de la resistencia hidráulica de la membrana (R_m)

El extracto ácido obtenido, se sometió a filtración tangencial usando membranas de 10 y 50 kDa, a diferentes PTM iniciales y se midió la masa de permeado a intervalos de 1 min en balanza analítica para poder estimar el flujo de permeado. Se realizaron medidas del flujo inicial de retenido y se tomaron muestras de este para poder estimar su pH en función del tiempo. Cada experimento se realizó a partir de 300 g de extracto ácido (alimentación) y se sometió a filtración hasta que se aumentó la concentración del colágeno en un factor de 10 en el retenido, es decir, la filtración se detuvo cuando se eliminaron 270 g de permeado. Los experimentos se hicieron por duplicado para cada tamaño de poro, con el fin de evaluar la PTM con valores de 3.4, 2.8, 2.2 y 1.6 bar para determinar el mecanismo controlante de la filtración.

Diafiltración del extracto ácido

Se tomó una masa de 900 g del extracto ácido y se sometió a diafiltración (tangencial) usando las mismas membranas que para la filtración a una PTM inicial de 2.5 bar y se midió la masa de permeado a intervalos de 2 min en balanza analítica, suministrando 10 g de agua destilada en el recipiente de alimentación, cada vez que se eliminaban 10 g de permeado con el fin de mantener la masa en el recipiente de alimentación constante con el objetivo de ir bajando la acidez del colágeno en el retenido (aumentar el pH). Se continuó con este proceso hasta que la balanza marcó 900 g de permeado acumulado de tal forma que estuviera en relación 1:1 con la masa inicial de alimentación. Estos experimentos se hicieron por duplicado.

Lavado de la membrana

En los primeros ensayos de filtración, (cuando aún no se había realizado la diafiltración), la limpieza de la membrana tangencial se realizó haciendo pasar inicialmente 500 mL de ácido acético 0.7 M para que disolviera el colágeno residual en la membrana a una PTM de 2 bar sin recirculación. Luego se hizo pasar 1 L de agua destilada a la misma PTM y después se puso a recircular un volumen de 200 mL de una solución de NaOH 0.5 M durante 2 h. Finalmente, se alimentaron 2 L de agua desionizada a la misma PTM verificando que el pH del líquido residual en la membrana no fuera básico, para finalmente dejar inundada la membrana con una solución de

etanol al 10% (v/v) y guardarla en refrigeración a 4 °C hasta el próximo experimento. Antes de hacer una filtración, se realizaba la calibración de la membrana para verificar que no hubiera quedado sucia y garantizar las mismas condiciones de limpieza para los diferentes experimentos. Para el caso de la diafiltración, el protocolo de limpieza fue casi el mismo, pero en vez de pasar inicialmente los 500 mL de la solución de ácido acético, se hizo circular 1 L del permeado obtenido en la misma diafiltración para que se disolviera parte del colágeno residual en la membrana.

Modelado de la filtración

Inicialmente se estimó R_m usando agua desionizada. Se determinaron los J a diferentes PTM para graficar J vs. PTM , y obtener una línea recta y determinar R_m mediante la Ecuación (65) y el J_{max} por medio de la Ecuación (36). Con base en la Ecuación (27) se determinaron los valores de J_o , b y K_f a partir de la pendiente y el intercepto de la gráfica de $\ln J$ vs. $\ln V$ y de la cual se puede observar el punto a partir del cual termina la tendencia lineal de los datos (bloqueo de poro) y partir de dicho punto se pueden determinar t_l y Jt_l . Por medio de la Ecuación (30) es posible estimar los datos teóricos de J para tiempos menores que t_l donde se asume que ocurre un bloqueo de poro intermedio, para los tiempos mayores a t_l , se estima R_{BIP}^* máximo (t_l) a partir de la Ecuación (38) y R_c^* de la Ecuación (42) con el fin de estimar R^{**}_c en los puntos para tiempos mayores a t_l y por medio de la Ecuación (44), obtener los valores predichos para J en la región donde se asume que domina la formación de la torta.

5.4.8. Liofilización

Para realizar esta operación se utilizó un liofilizador (Labconco Freeze Dryer 3, Cat 75200, Japón) empleando una presión de vacío de -84 kPa a una temperatura de -40 °C durante 24 h con la muestra previamente ultracongelada a -80 °C (Zhang et al., 2016).

6. RESULTADOS Y ANÁLISIS

6.1. Caracterización de los subproductos

En la **Tabla 8** se muestra la composición para EDT, ETR y PTN en base húmeda.

Tabla 8. Análisis Próximo de los tres subproductos

Residuo	Humedad	Proteína	Grasa	Ceniza	Colágeno
EDT	57.20 ± 0.38 ^a	16.38 ± 0.31 ^a	14.89 ± 0.41 ^a	11.88 ± 0.17 ^a	1.55 ± 0.09 ^a
ETR	29.96 ± 0.25 ^b	43.76 ± 0.39 ^b	1.01 ± 0.10 ^b	24.26 ± 0.22 ^b	3.18 ± 0.12 ^b
PTN	54.91 ± 0.44 ^c	29.68 ± 0.37 ^c	13.89 ± 0.23 ^a	1.64 ± 0.08 ^c	5.01 ± 0.16 ^c

Composición (%) promedio ± desviación estándar (n=3) en base húmeda. Los superíndices a, b y c indican si hubo diferencia significativa entre medias de acuerdo con prueba de Tukey. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05).

Para el caso de la PTN, la proteína resultó ser el componente sólido en mayor proporción, mientras que el contenido de colágeno fue aproximadamente un 17% de la proteína total. Este resultado sugirió eliminar gran parte de la PNC correspondiente a un 25% de la PTN, mediante el pretratamiento alcalino. Por otro lado, el bajo porcentaje de cenizas en la PTN, indicó que la desmineralización no era necesaria, lo que resultó ser una ventaja, ya que este tratamiento puede causar deterioro a la estructura de la piel (El-Rashidy et al., 2015; Li et al., 2018) mientras que el alto contenido de grasa justificó su eliminación, ya que esta podría afectar el proceso de filtración y la pureza del colágeno final (Zhang et al., 2009).

Akter et al. 2016 reportaron unos resultados diferentes para la composición proximal de la PTN (71.73% de humedad, 21.31% de proteína, 1.55% de grasa y 3.88% de cenizas) al igual que Li et al. (2018), quienes encontraron que la composición de la PTN fue: 64.10% de humedad, 21.89% de proteína, 2.27% de grasa y 11.7% de cenizas. Dichas discrepancias en composición, podrían deberse a las diferentes condiciones ambientales de las regiones donde las especies fueron cultivadas o a factores genéticos (Villamil et al., 2017).

En cuanto a las ETR se encontró que el porcentaje de humedad es más alto que los valores reportados por Quintero y Zapata (2017), esto se debe posiblemente a que las escamas empleadas en este trabajo, tenían residuos de color rojizo (**Imagen 2**) sin someterlas a ningún pretratamiento previo, lo que provocó que los resultados en base seca para los sólidos fueran también diferentes a los reportados en dicho trabajo. Para la espina dorsal de trucha no se encontraron reportes.

6.2. Selección del mejor subproducto

6.2.1. Obtención de colágeno a partir de ETR

La **Imagen 12** muestra las fotografías del proceso de obtención de colágeno a partir de ETR. En la desproteínización alcalina se observa que la mezcla es de color amarilloso y después de la

desmineralización el subproducto toma un color blancuzco permitiendo obtener en la etapa de precipitación salina un producto de color blanco brillante.



Imagen 12. Etapas del proceso de obtención de colágeno a partir de ETR

6.2.2. Obtención de colágeno a partir de EDT

La **Imagen 13** muestra fotografías de algunas de las etapas del proceso de extracción de colágeno a partir de este producto y se puede observar que se mantiene un color rojizo aun después de realizar la desmineralización, por lo que el precipitado obtenido no fue de color blanco, aunque sí tuvo una apariencia brillante. Lo anterior sugiere que se debe realizar una etapa previa de decoloración para poder obtener un producto con unas características más cercanas a las deseadas.



Imagen 13. Etapas del proceso de obtención de colágeno a partir de EDT

6.2.3. Obtención de colágeno a partir de PTN

La **Imagen 14** muestra fotografías de este subproducto en algunas etapas del proceso y se puede observar que el producto obtenido es de un color blanco brillante. En la foto central inferior de la **Imagen 14** se observa la formación de un precipitado de color blanco, al momento de agregar el NaCl, a diferencia de lo que ocurrió con los otros dos subproductos, en los que este precipitado

no fue tan notable y aunque a simple vista parecía que este subproducto iba a proporcionar el mejor rendimiento de extracción, esto fue confirmado mediante los análisis de HP en el producto final.



Imagen 14. Obtención de colágeno a partir de PTN

6.2.4. Comparación de los rendimientos de Extracción

Tabla 9. Rendimiento del colágeno extraído de los diferentes subproductos

Subproducto	EDT	ETR	PTN
Masa de colágeno inicial (g)	0.78	1.59	2.51
Masa de Precipitado (g)	2.15 ± 0.12	9.01 ± 0.22	47.3 ± 0.31
% Colágeno en precipitado (%)	1.57 ± 0.09	2.63 ± 0.11	1.08 ± 0.05
Rendimiento (%)	4.36	14.92	20.20

Los resultados corresponden a la composición promedio ± desviación estándar (n=3).

En la **Tabla 9** se reportan los rendimientos porcentuales para cada uno de los tres subproductos evaluados bajo las mismas condiciones de extracción y se puede observar que el mayor rendimiento se obtuvo para la PTN, el cual fue similar al reportado por (Potaros et al., 2009) por el método 2 y muy cercano a lo reportado por Li y colaboradores (Li et al., 2018) quienes obtuvieron rendimientos entre el 19 y el 20% medidos con base en el producto liofilizado.

6.3. Implementación del tratamiento alcalino de la PTN

La PTN, con 13.89% de grasa aproximadamente, se sometió a un proceso de desengrasado para disminuir su contenido de grasa (< 1%) e iniciar con los experimentos que permitieron reducir el número de factores a evaluar en los diseños, cuyos resultados se reportan a continuación.

6.3.1. Determinación de la velocidad de extracción

La concentración de PNC en la solución básica no varió significativamente ($p > 0.05$) a velocidades de agitación por encima de las 400 rpm (**Figura 5**), por lo que todos los experimentos fueron realizados a esta velocidad de agitación, con el fin de minimizar las limitaciones de la transferencia de masa externa.

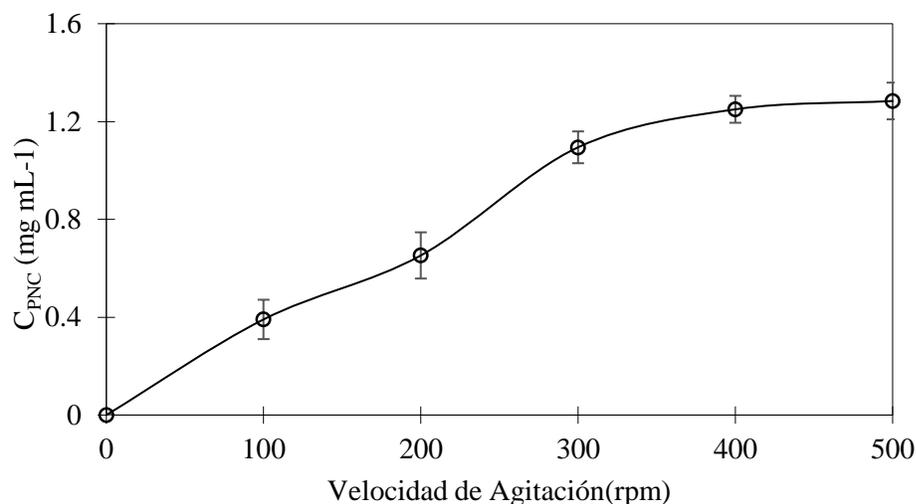


Figura 5. Concentración de proteína no colagenada (PNC) en función de la velocidad de agitación (Temperatura (T) = 10 °C, concentración de NaOH (C_b) = 0.5 M, tamaño (L) = 5 cm, tiempo (t) = 5 h). Las barras de error representan la desviación estándar.

Este valor infortunadamente no se pudo comparar con otros trabajos que obtuvieron colágeno a partir de la PTN, ya que este efecto no fue reportado (Chen et al., 2016; Li et al., 2018; Potaros et al., 2009; Zhang et al., 2016). Sin embargo, la velocidad de agitación obtenida en el presente estudio fue la misma que la empleada en el trabajo sobre extracción de colágeno a partir de bagre de Malasia (*Hybrid Clarias Sp.*) (Kiew y Mashitah, 2012).

6.3.2. Determinación de los tiempos de extracción

Los tiempos de extracción de la primera, segunda y tercera etapa del pretratamiento alcalino fueron 5, 6 y 7 h, respectivamente y se determinaron con base en la pendiente inicial de cada una de las curvas en la **Figura 6**, ya que la velocidad de extracción fue alta al principio de cada etapa y se fue haciendo más lenta a medida que el proceso avanzaba.

De la **Figura 6** se puede observar que la primera desproteínización resultó ser la más rápida y por tanto se empleó menos tiempo para realizar una extracción significativa de PNC y más tiempo en las otras dos etapas. Se puede observar además que durante las primeras dos horas de la primera desproteínización, se extrae más del 70% de la PNC extraída durante las 8 horas. Los tiempos reportados para esta etapa en el proceso de extracción alcalina para la obtención de colágeno a partir de PTN varían entre 4h (Potaros et al., 2009) y 48 h (Zeng et al., 2009) y en los trabajos que extrajeron la PNC en varias etapas, se emplearon tiempos constantes (Li et al., 2018; Sun et al., 2017; Zeng et al., 2009).

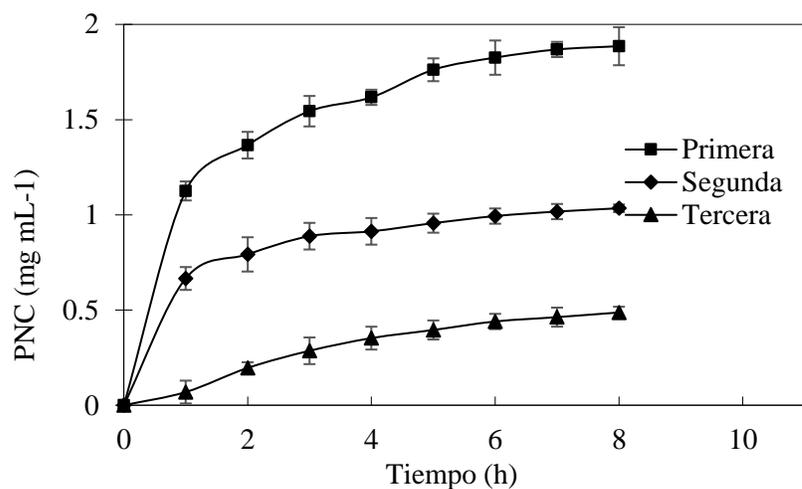


Figura 6. Concentración de proteína no colagenada (PNC) vs. el tiempo para la primera, segunda y tercera etapa de extracción alcalina ($T = 10\text{ }^{\circ}\text{C}$, $C_b = 0.7\text{ M}$, $L = 1\text{ cm}$). Las barras de error representan las desviaciones estándar.

6.3.3. Análisis de la concentración de base

En la **Figura 7** se observa la pérdida de colágeno durante 5 horas de la primera extracción básica a altas concentraciones de base. La extracción se hizo a condiciones de operación que favorecieran la extracción de PNC, es decir, a alta temperatura ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$), tamaño pequeño (1 cm) y un valor de R' alto (33.33). Los resultados mostraron que hubo un efecto muy marcado de C_b sobre la pérdida de colágeno para valores por encima de 1 M después de las 2 primeras horas de extracción. Con base en lo anterior, se elige el límite superior del rango en el que se va a evaluar C_b en el DF, en un nivel por debajo de dicho valor (0.7 M), similar al utilizado en el pretratamiento alcalino por Quintero y colaboradores (Quintero y Zapata, 2017) pero está por encima de los reportados en la extracción de CAS a partir de piel de carpa herbívora (Liu, Wei, et al., 2015)

quienes obtuvieron pérdidas de colágeno para concentraciones de base entre 0.2 y 0.5 M en los ensayos realizados a las temperaturas más altas.

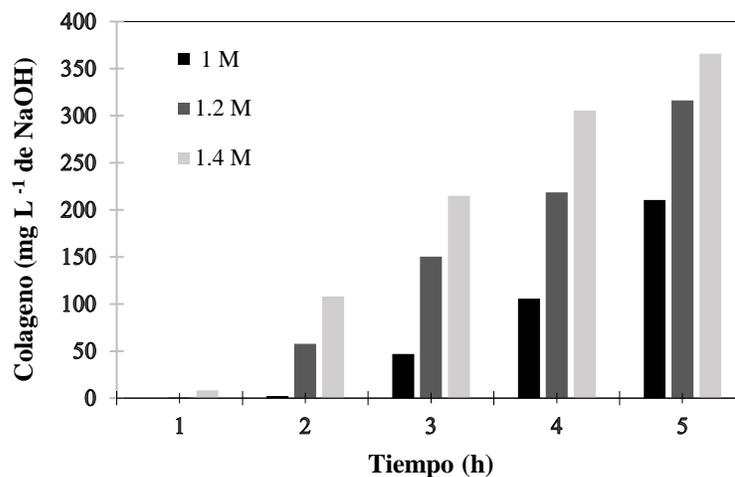


Figura 7. Pérdidas de colágeno en el primer pretratamiento alcalino a altas concentraciones de base ($L=1$ cm, $T=20$ °C, $R'=30$ mL g⁻¹)

6.3.4. Diseños experimentales del primer pretratamiento alcalino

En esta sección se muestran los resultados de los dos diseños experimentales (DF y DCC) implementados para el primer pretratamiento alcalino.

Diseño Factorial (DF)

En la **Tabla 10** se muestran los resultados experimentales para las variables de respuesta *EPNC* y *PC* después de 5 h para el DF. También se puede observar que el máximo valor de *EPNC* de 27.2% fue obtenido para $C_b=0.7$ M, $T= 20$ °C y $L=1$ cm, pero al mismo tiempo se obtuvo un valor máximo para *PC* de 6.4 %.

Las condiciones óptimas de extracción de PNC correspondieron a un punto en el extremo de la región evaluada, esto se debe a que la velocidad de extracción de la PNC es directamente proporcional a T y C_b e inversamente proporcional a L (Zhong et al., 2014), pero al mismo tiempo dichas condiciones provocan mayores pérdidas de colágeno, que no son deseables (Liu, et al. 2015). Por esta razón, se hizo una optimización multi-objetivo mediante MSR con el fin de analizar el efecto simultáneo de los tres factores sobre las 2 variables de respuesta, obteniendo unas

condiciones óptimas de $T=10\text{ }^{\circ}\text{C}$, $C_b=0.7\text{ M}$ y $L=1\text{ cm}$ con valor máximo para $EPNC$ de 24.33% y un valor mínimo para PC de 1.33%.

Tabla 10. Variables de respuesta para cada tratamiento del diseño factorial (DF) del primer pretratamiento

Ensayo	T	C_b	L	EPNC	PC
1	10	0.3	5	15.0	0.0
2	10	0.3	3	16.8	0.0
3	10	0.3	1	21.8	0.1
4	10	0.5	5	16.3	0.0
5	10	0.5	3	17.6	0.0
6	10	0.5	1	23.4	0.1
7	10	0.7	5	17.1	0.8
8	10	0.7	3	18.7	1.2
9	10	0.7	1	24.3	1.8
10	15	0.3	5	17.0	0.5
11	15	0.3	3	18.4	0.1
12	15	0.3	1	22.9	1.6
13	15	0.5	5	18.8	1.1
14	15	0.5	3	19.7	1.0
15	15	0.5	1	24.3	2.7
16	15	0.7	5	20.0	2.0
17	15	0.7	3	21.5	2.6
18	15	0.7	1	25.5	4.1
19	20	0.3	5	20.3	2.1
20	20	0.3	3	20.9	2.3
21	20	0.3	1	24.1	4.0
22	20	0.5	5	21.7	3.0
23	20	0.5	3	22.8	3.2
24	20	0.5	1	25.6	6.3
25	20	0.7	5	22.9	3.1
26	20	0.7	3	24.8	4.2
27	20	0.7	1	27.2	6.4

T: temperatura ($^{\circ}\text{C}$), C_b : Concentración de NaOH (mol L^{-1}), L : tamaño de piel (cm), $EPNC$: Extracción de proteína no colagenada a las 5 h (%), PC : Pérdidas de colágeno a las 5 h (%)

De la ANOVA que se muestra en la

Tabla 11 se puede ver que el R^2 de la Ecuación (70) fue de 0.956. Sin embargo, este modelo presentó una falta de ajuste significativa (Kiew y Mashitah, 2012). Mientras que el análisis de error con base en el coeficiente de variación (2.12%) indica que los valores predichos son cercanos a

los experimentales (Gunst et al., 2006). Para el caso del *PC*, se obtuvo el modelo de efectos que se muestra en la ecuación (71), con un R^2 de 0.874, siendo más bajo que el obtenido para el *EPNC*, y de ahí el CV tan alto (21.64%), indicando que la predicción no es la mejor. Como la falta de ajuste y los R^2 del DF no fueron los mejores, se decidió realizar un DCC.

Tabla 11. Análisis de varianza para la primera desproteinización alcalina

Fuente	DF		DCC	
	<i>EPNC</i>	<i>PC</i>	<i>EPNC</i>	<i>PC</i>
Model	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
<i>L</i>	< 0.0001	0,0035	< 0.0001	0.0024
<i>C_b</i>	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
<i>T</i>	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
<i>L-C_b</i>				< 0.0001
<i>L-T</i>	0,0008		< 0.0001	< 0.0001
<i>C_b-T</i>			< 0.0001	0.0128
<i>L²</i>	0,0009		< 0.0001	< 0.0001
<i>C_b²</i>			0.0002	< 0.0001
<i>T²</i>	0,0141		0.0086	0,0001
<i>L-C_b-T</i>				0.0388
<i>C_b-T²</i>				0.0086
<i>L³</i>				< 0.0001
Falta de ajuste	0.002	0.001	0.3573	0.3357
DE	0,092	0.29	0.012	0.14
C.V.	2,12	21.64	0.25	3.14
R^2	0,9555	0.8741	0.9995	0.9992

En la

Tabla 11 se puede observar que en el DF los factores lineales tuvieron un efecto significativo sobre el *EPNC*, lo que es lógico pues la cantidad de soluto obtenido en un proceso de extracción sólido-líquido, depende directamente del área superficial de la PTN (Zhong et al., 2014), de la energía cinética molecular promedio de la solución extractora (Kiew et al., 2014), y de la concentración en la solución del componente que tiene un efecto químico sobre dicho soluto (NaOH) (Liu, Wei, et al., 2015). Lo anterior es coherente con la teoría de que la mayor cantidad de PNC se extrae a partir de la PTN más pequeña (celdas rotas) que corresponde al proceso de extracción por vía rápida (máxima velocidad de extracción) debido a que el soluto queda más expuesto provocando que el efecto del tamaño sea más significativo que el provocado por *C_b*, el cual al ser de naturaleza química, tendría mayor efecto sobre el proceso de extracción en la PTN de mayor tamaño (Zhong et al., 2014).

También se puede observar que solo la interacción entre L y T tiene un efecto significativo sobre $EPNC$ al igual que los términos cuadráticos de dichos factores, esto apunta a que C_b tiene el efecto menos significativo sobre dicha variable de respuesta y que la influencia de las variables físicas como L y T fueron mas determinantes en el rango de concentraciones de base evaluadas para el tiempo de extracción empleado en el estudio.

En la

Tabla 11 también se observa que solo los tres factores lineales tienen un efecto significativo sobre el PC , lo que es lógico como se justifico para el $EPNC$. Los modelos estadísticos obtenidos para las raíces cuadradas de $EPNC$ y PC en el DF, se muestran en las siguientes ecuaciones:

$$\sqrt{EPNC} = 5.36 - 0.54L + 0.76C_b - 0.11T + 0.0111LT + 0.0366L^2 + 0.004T^2 \quad (66)$$

$$\sqrt{PC} = 2.26C_b + 0.14T - 0.11L - 1.71 \quad (67)$$

De la

Tabla 11 se puede ver que el R^2 de la Ecuación (66) fue de 0.956. Sin embargo, este modelo presentó una falta de ajuste significativa (Kiew y Mashitah, 2012). Mientras que el análisis de error con base en el coeficiente de variación (2.12%) indica que los valores predichos son cercanos a los experimentales (Gunst et al., 2006). Para el caso del PC , se obtuvo el modelo de efectos que se muestra en la ecuación (67), con un R^2 de 0.874, siendo más bajo que el obtenido para el $EPNC$, y de ahí el CV tan alto (21.64%), indicando que la predicción no es la mejor. Como la falta de ajuste y los R^2 del DF no fueron los mejores, se decidió realizar un DCC.

Diseño Central compuesto (DCC)

Con base en el ANOVA que se muestra en la

Tabla 11, los p -valores para todos los coeficientes (de los términos lineales, cuadráticos e interacciones) mostraron que hubo un efecto significativo ($p < 0.05$) sobre la variable de respuesta $EPNC$, excepto para el coeficiente de la interacción entre C_b y L . El valor de $p > 0.05$ para la falta de ajuste, indica que ésta no es significativa y que el modelo es apropiado para predecir el comportamiento de la variable respuesta $EPNC$ en términos de los factores.

El análisis estadístico permitió obtener un modelo cuadrático para estimar *EPNC* a las 5 horas de proceso en términos de los valores reales de los 3 factores evaluados en el DCC como se muestra en la Ecuación (68) con un R^2 de 0.99. Para el caso del *PC* se pudo relacionar con los valores reales de las variables de estudio a través de un modelo cúbico como se puede ver en la ecuación (69) con un R^2 de 0.99. Ambos modelos de efectos predicen las variables de respuesta de manera adecuada, ya que sus respectivos coeficientes de determinación son altos (Kiew y Mashitah, 2012).

$$\sqrt{EPNC} = 4.99 + 0.75C_b + 0.004T - 0.67L + 0.026C_bT + 0.014TL - 0.22C_b^2 + 0.0004T^2 + 0.052L^2 \quad (68)$$

$$PC = -9.38 + 9.63C_b + 1.15T - 3.91L - 0.91C_bT - 0.6C_bL - 0.06TL + 5.22C_b^2 - 0.02T^2 + 1.57L^2 - 0.043LTC_b + 0.038C_bT^2 - 0.14L^3 \quad (69)$$

El modelo de efectos de la Ecuación (68) involucra los coeficientes de los factores individuales, cuadráticos y las interacciones entre ellos. En estas últimas se observa un efecto sinérgico con *EPNC* al igual que para los factores lineales excepto para *L* que dio un efecto antagónico, lo cual es lógico porque mientras menor sea el tamaño de la piel se favorece el proceso de extracción debido a que la *PNC* está más expuesta por el aumento en el área superficial.

La **Tabla 12** muestra los valores de las variables de respuesta *EPNC* y *PC* para el DCC de la primera extracción alcalina. Los valores máximos para *EPNC* y *PC* fueron de 32.4% y 14.6%, respectivamente y se observó en un extremo del diseño ($C_b=1.1$ M, $T=20$ °C y $L=1$ cm).

Debido a que los valores máximos de las dos variables de respuesta coincidieron en el mismo tratamiento, fue necesario realizar una optimización multi-objetivo. Al realizar dicha optimización mediante *MSR*, se obtuvo un valor máximo para *EPNC* de 26,47% obteniendo simultáneamente un valor mínimo de 2.56% para *PC* a las condiciones óptimas de $C_b = 0.734$ M $T= 10$ °C y un $L=1$ cm con una deseabilidad de 0.758. Al comparar este resultado con el obtenido para el *DF*, se puede observar que el valor máximo de *EPNC* para el DCC fue 2 unidades porcentuales mayor que el obtenido en el *DF*, mientras que el valor mínimo de *PC* para el DCC excedió en menos de una unidad porcentual al encontrado para el *DF*, lo que significa que el óptimo (neto) fue mejor en el DCC.

Tabla 12. Variables de respuesta para cada tratamiento del diseño central compuesto (DCC) del primer pretratamiento alcalino.

Ensayo	C_b	T	L	EPNC	PC
1	0,8	15	0,2	31,8	9,52
2	0,8	6,59	3	18,7	0,32
3	0,5	10	1	24,6	0,08
4	1,31	15	3	26,3	9,44
5	1,1	10	5	20,0	4,64
6	0,8	15	3	23,2	3,28
7	0,5	20	1	26,4	6,32
8	0,8	15	3	23,1	3,36
9	0,8	23,4	3	27,2	8,16
10	0,8	15	3	22,9	3,61
11	0,8	15	3	23,0	3,64
12	1,1	10	1	28,8	7,12
13	0,8	15	6,36	22,1	0,72
14	1,1	20	5	28,7	7,68
15	0,5	20	5	22,9	2,96
16	0,30	15	3	19,0	0,08
17	0,8	15	3	23,1	3,52
18	0,5	10	5	16,5	0,08
19	1,1	20	1	32,4	14,6
20	0,8	15	3	23,0	3,36

T : temperatura ($^{\circ}\text{C}$), C_b : Concentración de NaOH (M), L : tamaño de la PTN (cm), EPNC: Extracción de proteína no colagenada a las 5 h (%), PC: Pérdidas de colágeno a las 5 h (%).

Lo anterior es lógico porque el DCC permitió evaluar un rango más amplio de los factores, a pesar de realizar menos experimentos. El valor de C_b óptimo fue similar al obtenido en la extracción de colágeno a partir de membrana de huevo (0.8 M), el cual fue determinado mediante MSR (Mohammadi et al., 2016).

La **Figura 8** muestra las superficies de respuesta correspondientes al punto óptimo del DCC para EPNC (A y B) y para PC (C y D). La región sombreada en cada uno de los gráficos de la **Figura 8** muestra como aumentan ambas variables de respuesta a medida que L disminuye, T y C_b aumentan tanto para EPNC como para PC.

Al promediar los resultados obtenidos en los tres ensayos realizados para validar el punto óptimo, se obtuvo un EPNC del 25.81% con un MAPE del 2.56% y un valor de PC de 2.75% con

un MAPE del 6.9%. Ambos errores de desviación (MAPE) estuvieron por debajo del 10% indicando que la predicción fue buena (Gunst et al., 2006).

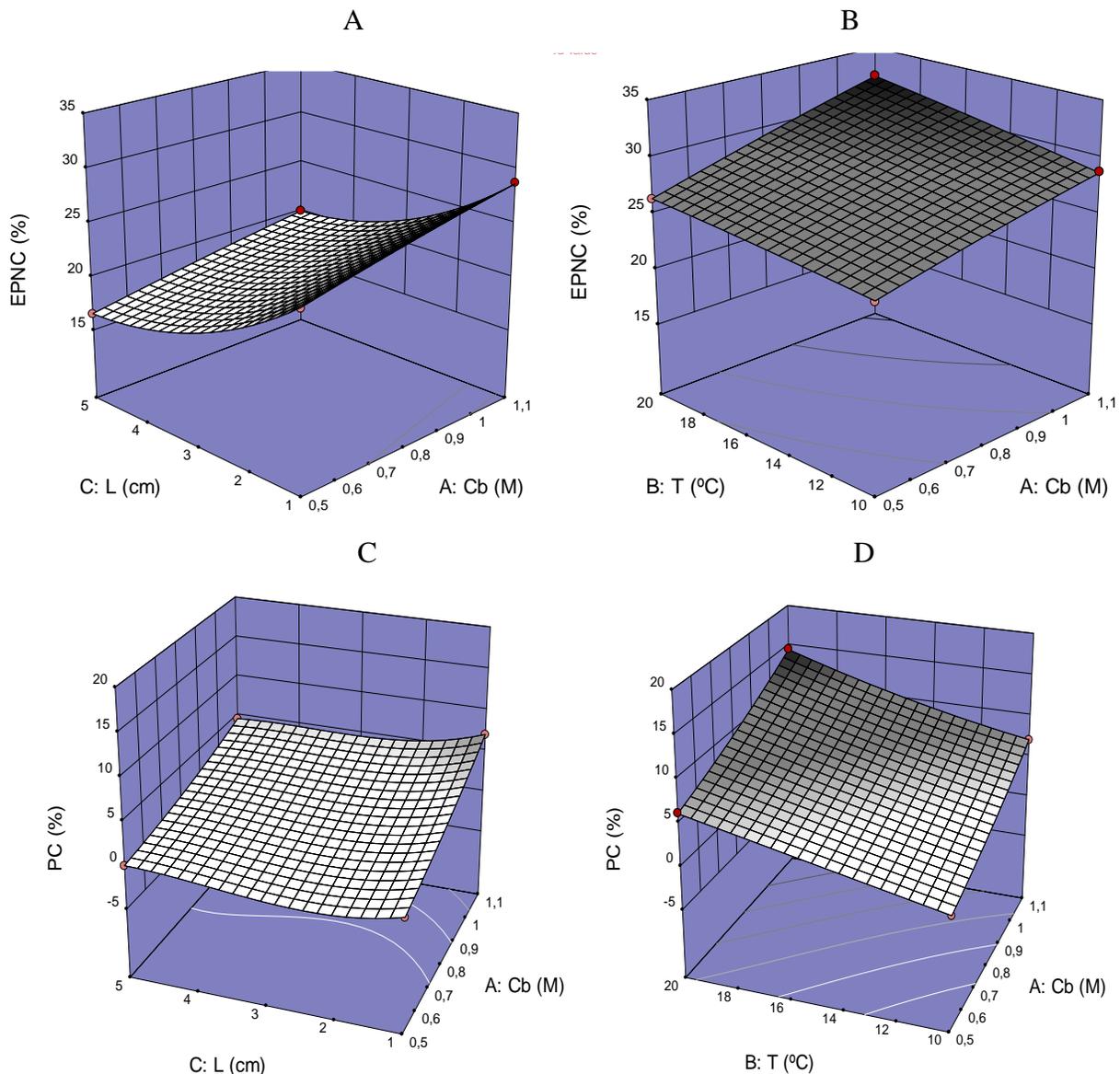


Figura 8. Superficie de respuesta para: EPNC (%) en función de L y C_b (A), EPNC (%) en función de C_b y T (B), PC en función de L y C_b (C), y PC en función de T y C_b (D)

6.3.5. Segundo pretratamiento alcalino

El tiempo de extracción para cada tratamiento del DCC en esta etapa fue de 6 h, el cual se definió con base la máxima velocidad de extracción, la cual se determinó a partir de la pendiente inicial de la curva en la **Figura 6** para la segunda extracción.

Aunque en algunos trabajos realizan una sola etapa de desproteización (Chen et al., 2016; Zhang et al., 2016), en otros trabajos con PTN reportan tiempos de 8 h para esta segunda extracción alcalina (Li et al., 2018; Zeng et al., 2009), pero empleando valores de C_b más bajos. La velocidad de agitación fue de 400 rpm, que corresponde al nivel utilizado en la primera desproteización, y no se pudo comparar con otros trabajos de extracción de CAS a partir de PTN pues no hay reportes de dicho parámetro en ninguna de las etapas del proceso. El tamaño de piel fue de 1 cm, el cual quedó determinado a partir del valor óptimo encontrado por MSR en la primera extracción alcalina, y que coincide con el tamaño utilizado en otros trabajos sobre extracción de CAS a partir de PTN (Zhang et al., 2016).

El valor de C_b máximo que se utilizó en esta etapa fue menor al empleado en la primera extracción alcalina para evitar un posible daño en las moléculas de colágeno, las cuales quedaron más expuestas en esta parte del proceso, debido al hinchamiento que sufrió la PTN después de la primera extracción alcalina y que la hace más sensible al efecto químico del NaOH. De acuerdo con los experimentos iniciales, la temperatura también tuvo un efecto importante sobre las pérdidas de colágeno en esta etapa, por lo que se evaluaron niveles más bajos que los explorados en el primer pretratamiento alcalino. Estos resultados son diferentes a los que se reportan en los trabajos de extracción de CAS a partir de PTN que realizan el pretratamiento alcalino en varias etapas, en donde se emplean los mismos valores de C_b y T en cada una de las extracciones alcalinas (Li et al., 2018; Zeng et al., 2009).

La **Tabla 13** muestra el valor de EPNC y PC después de 6 horas de extracción. El valor máximo de EPNC fue de 41.96% a $T=17$ °C y $C_b=0.5$ M; y la mayor PC se obtuvo para una $C_b=0.56$ M, donde se obtuvo el segundo valor más alto para EPNC. Por este motivo se realizó una optimización multi-objetivo mediante MSR donde se encontró un valor óptimo para EPNC de 36.78% y para PC de 0.012% correspondientes a un $C_b=0.474$ M y una $T=17$ °C con una deseabilidad de 0.742. El valor de C_b en el punto óptimo para esta etapa resultó ser menor que la obtenida en el primer pretratamiento alcalino, a diferencia de lo encontrado en reportes de extracción de PNC a partir de PTN por pretratamiento alcalino en varias etapas, donde emplean la misma concentración de base en cada uno de los lotes (Li et al., 2018; Potaros et al., 2009; Sun et al., 2017; Zeng et al., 2009).

Tabla 13. Variables de respuesta del DCC en el segundo pretratamiento alcalino

Ensayo	T	C_b	$EPNC$	PC
1	10.00	0.20	23.98	0.00
2	13.50	0.35	25.95	0.04
3	10.00	0.50	35.62	0.00
4	18.44	0.35	29.49	0.03
5	8.55	0.35	24.29	0.00
6	13.50	0.13	16.08	0.00
7	13.50	0.35	24.39	0.02
8	13.50	0.35	24.50	0.02
9	13.50	0.56	38.22	0.12
10	13.50	0.35	25.43	0.00
11	17.00	0.20	25.02	0.01
12	13.50	0.35	25.64	0.03
13	17.00	0.50	41.96	0.08

T: temperatura (°C), C_b : Concentración de NaOH (M), C_{PNC} : Concentración de PNC extraída en el líquido (mg mL⁻¹), $EPNC$: Extracción de PNC a las 6 h (%), PC : Pérdidas de colágeno a las 6 h

Sin embargo, de acuerdo con el resultado obtenido en este trabajo, el valor de C_b debe disminuir de lote a lote, pues a medida que la PTN permanece en contacto con la solución básica, se debilita su estructura y un valor alto de dicho parámetro, podría afectar la del colágeno y provocar su pérdida (Liu, Wei, et al., 2015).

Solo el término de la interacción no tuvo un efecto significativo sobre $EPNC$ ($p > 0.05$), como se observa en la Ecuación (70), que corresponde al modelo de efectos, C_b tuvo el efecto más significativo sobre el $EPNC$, lo que es lógico en esta segunda etapa, ya que la PTN hinchada es más sensible al efecto químico. El coeficiente de variación fue de 3.24% con un R^2 de 0.954, indicando que dicha ecuación predice la variable de respuesta de manera adecuada.

$$\sqrt{EPNC} = 6.34 - 0.46C_b - 0.37T + 7.35C_b^2 + 0.016T^2 \quad (70)$$

La **Figura 9** muestra el gráfico de superficie de respuesta para la segunda extracción alcalina y se puede ver como el $EPNC$ aumenta con T y con C_b . La figura muestra el punto de máxima extracción en un extremo, sin embargo, en la tabla 13 se puede ver que para un valor de C_b de 0.56 se obtuvo el mayor PC (0.12%) y esto sugiere que a valores de C_b superiores se puede perder el colágeno de manera indeseable.

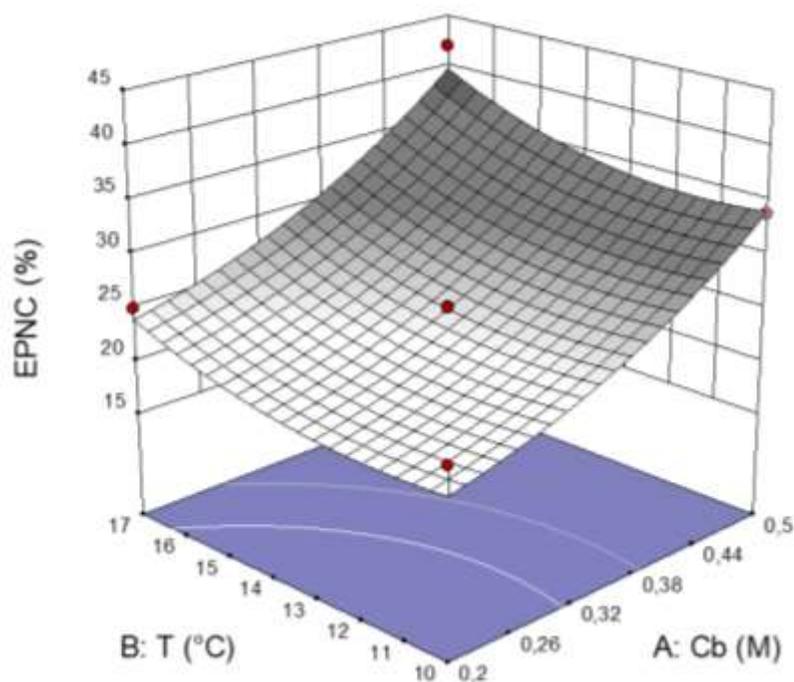


Figura 9. Superficie de respuesta para $EPNC$ (%) en función de T ($^{\circ}C$) y C_b (M) para el segundo pretratamiento alcalino.

6.4. Análisis cinético, modelado y escalado del pretratamiento alcalino

6.4.1. Análisis cinético de la primera extracción alcalina

La **Figura 10** muestra los gráficos cinéticos en términos de T , C_b y L con los resultados experimentales de C_{PNC} registrados para el DF y las curvas de predicción mediante el MSO. De la **Figura 10** se puede ver que el tamaño de piel tiene el efecto inverso más fuerte sobre la eficiencia de la extracción y que su efecto es más marcado a las temperaturas más bajas. Esto se debe a que, para los tamaños más pequeños, se tiene una mayor área superficial que provoca que la proteína esté más expuesta facilitando su extracción. También se puede observar que la temperatura tiene el segundo efecto más fuerte, pero directo sobre el porcentaje de extracción de la PNC. Sin embargo, para tamaños más pequeños de piel, el efecto se hace más débil como ya se había mencionado. Las velocidades de extracción más altas fueron obtenidas a las temperaturas más altas, indicando un posible comportamiento de Arrhenius (Bucić-Kojić et al., 2013).

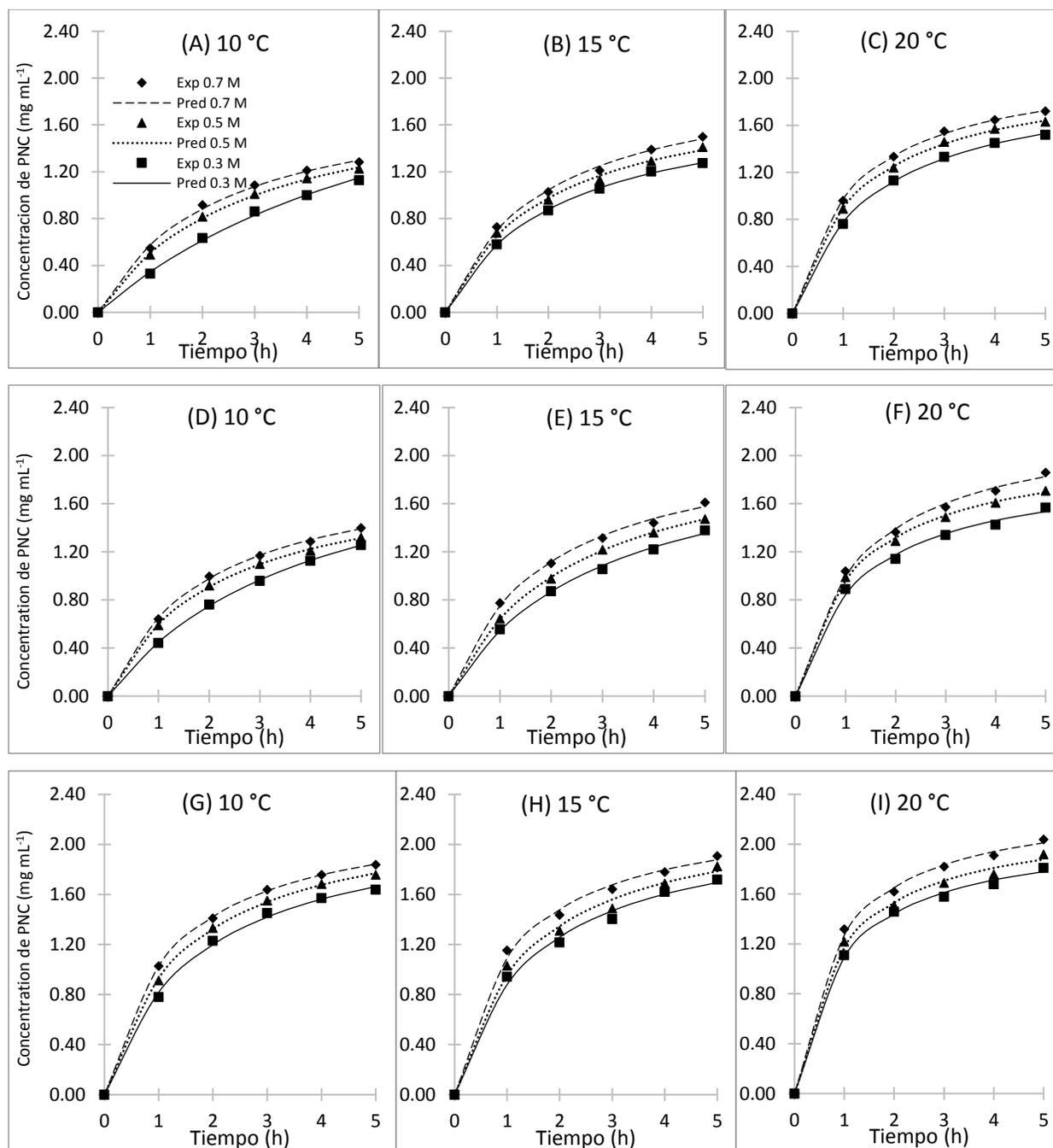


Figura 10. Predicción de la cinética de la primera extracción alcalina mediante el MSO y efecto de la concentración (C_b), temperatura (T) y tamaño de PTN (L) sobre la concentración de la PNC (CPNC). (A), (B), (C) para $L = 5$ cm; (D), (E), (F) para $L = 3$ cm; (G), (H), (I) para $L = 1$ cm.

En cuanto al efecto de C_b sobre la eficiencia de extracción de proteína, se puede concluir que, bajo las condiciones y niveles de factores estudiados, fue moderado pero directo.

En general, todos los gráficos cinéticos mostraron 2 etapas de extracción: la primera se puede distinguir desde el inicio hasta las 2 h, que es la más rápida y es más notoria para los tamaños de PTN más pequeños y la segunda que es más lenta, muestra una tendencia asintótica (Zhong et al., 2014). Es importante resaltar que aproximadamente el 80 % de la extracción total de la PNC, la cual se logra a las 5 h, es alcanzada en la primera hora.

Todos los resultados sugieren que la extracción de la PNC, tiene un comportamiento similar al de una reacción química heterogénea, la cual es favorecida por la temperatura y el área superficial (Qu et al., 2010; Rakotondramasy-Rabesiaka et al., 2007; Zhong et al., 2014). Este hecho soporta el uso de cinéticas de reacción típicas para el modelado de cada una de las etapas, como el MSO, el MDP y el MDS.

Los gráficos cinéticos para la extracción de PNC en términos de T , C_b y L registrados para el DCC de la primera extracción básica mostraron un comportamiento similar a los del DF. En la **Figura 11** se puede observar a través del cruce de las dos curvas centrales, que hay un efecto más fuerte de C_b sobre la C_{PNC} ($C_b=1.1$ M y $L=5$ cm) cuando se utiliza PTN de mayor tamaño. Lo anterior sugiere que la velocidad de extracción de la PNC aumentaría si se hacen desproteinizaciones con soluciones muy concentradas en NaOH y PTN de tamaño grande (lo que disminuiría el tiempo de acondicionamiento de la piel). Sin embargo, esto provocaría la indeseable pérdida temprana de colágeno (Liu, Wei, et al., 2015) como se puede observar en la **Figura 7**.

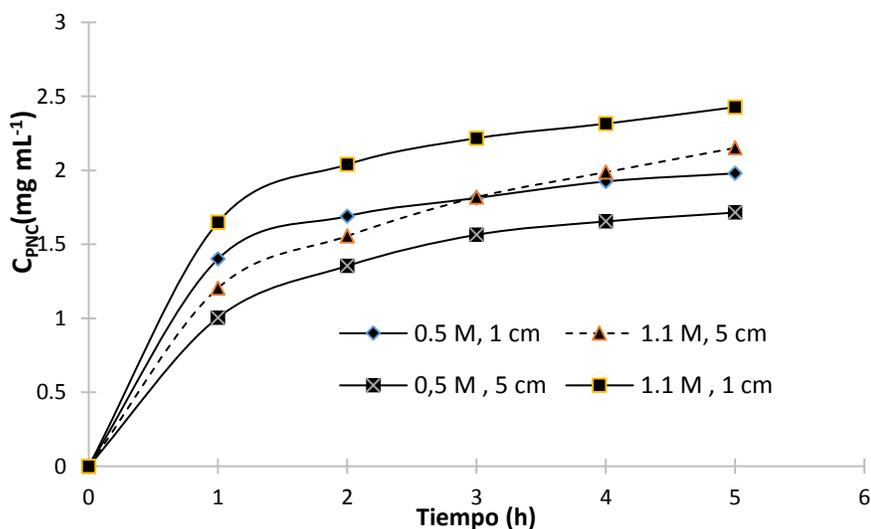


Figura 11. Efecto de la concentración C_b y del tamaño L sobre el EPNC (%) en la primera desproteización alcalina a $T=20$ °C, $N=400$ rpm y $R'=33.33$ mL g^{-1} .

6.4.2. Modelado del primer pretratamiento alcalino

La **Tabla 14** muestra los parámetros del (MSO) con los respectivos intervalos de confianza para cada uno de los tratamientos del DF (con valores de R^2 iguales a 1) y se incluyen además los valores de A y E_a de la ecuación de Arrhenius. Los valores de E_a tuvieron la tendencia de aumentar con L lo que es lógico, pues mientras menos expuesta esté la proteína, se requiere más energía para activar el proceso de extracción.

Todos los valores de E_a dieron positivos y estuvieron en el rango típico de las reacciones químicas (15-122 kJ mol⁻¹), indicando que la extracción estuvo bajo un régimen cinético. Se puede observar que todos los R^2 fueron muy cercanos a la unidad, indicando que hubo una excelente correlación entre los datos experimentales y los predichos por el MSO y que dicho modelo permite predecir los resultados cinéticos con alta precisión. De la **Tabla 14** se puede observar que la constante de velocidad de segundo orden (k) se incrementa ligeramente con la temperatura pero se no afecta significativamente con C_b y L , lo que está de acuerdo con los reportado por Bucic y colaboradores (Bucic-Kojic et al., 2007) quienes concluyeron que k dependía exponencialmente de T siguiendo el comportamiento de Arrhenius, a diferencia de otros trabajos de extracción de proteína (Zhong et al., 2014) que no han encontrado tal dependencia.

En lo referente a C_e , se nota claramente que varía directamente con T y C_b e inversamente con L , y varía de manera similar a la velocidad de extracción, lo que es lógico, pues la extracción se lleva a cabo, hasta alcanzar el equilibrio (Islam et al., 2013).

En cuanto a la velocidad de extracción inicial (h), se observa que los mayores valores se presentan a altas T y bajos valores de L , mostrando una tendencia normal, ya que estas condiciones favorecen la velocidad de extracción, como ya se ha mencionado anteriormente (Qu et al., 2010; Rakotondramasy-Rabesiaka et al., 2007).

En la **Tabla 14** se reportan además los parámetros de Arrhenius (E_a y A) a las condiciones de C_b y L correspondientes a tres diferentes temperaturas. Los valores de E_a estuvieron dentro del rango de algunas reacciones químicas típicas (Zhong et al., 2014) y decrecieron con el aumento de C_b , lo que es lógico, ya que a altos valores de C_b , la PNC se libera más fácilmente y se requiere menos energía para activar el proceso de extracción.

Tabla 14. Parámetros del MSO en el DF del primer pretratamiento alcalino

Factores			Parámetros del MSO						Parámetros de Arrhenius	
C_b (mol L ⁻¹)	L (cm)	T (°C)	C_e (g L ⁻¹)		h (g L ⁻¹ h ⁻¹)		k (L g ⁻¹ h ⁻¹)		A (L g ⁻¹ h ⁻¹)	E_a (kJ mol ⁻¹)
			LI	LS	LI	LS	LI	LS		
0.3	5	10	2.745	2.755	0.395	0.396	0.052	0.053	2.9*10 ²¹	122.8
		15	2.281	2.286	0.557	0.558	0.107	0.107		
		20	2.242	2.244	1.287	1.289	0.256	0.256		
	3	10	1.939	1.942	0.685	0.686	0.181	0.182	5.8*10 ¹⁵	91..0
		15	1.879	1.881	0.875	0.876	0.247	0.248		
		20	2.286	2.288	1.568	1.570	0.300	0.300		
	1	10	1.898	1.900	0.823	0.824	0.228	0.229	1.1*10 ⁸	47.0
		15	1.944	1.946	0.980	0.981	0.259	0.260		
		20	2.299	2.301	1.857	1.860	0.351	0.352		
0.5	5	10	1.840	1.843	0.836	0.838	0.246	0.247	1.510 ⁸	48.4
		15	2.158	2.161	0.725	0.726	0.155	0.156		
		20	2.209	2.210	1.459	1.461	0.299	0.300		
	3	10	1.934	1.936	0.979	0.981	0.261	0.262	2.3*10 ⁵	32. 8
		15	2.186	2.188	0.903	0.904	0.189	0.189		
		20	2.283	2.285	1.638	1.640	0.314	0.315		
	1	10	2.058	2.060	1.058	1.060	0.249	0.250	1.1*10 ⁶	35.7
		15	2.180	2.182	1.141	1.143	0.240	0.241		
		20	2.292	2.293	2.078	2.081	0.395	0.396		
0.7	5	10	2.025	2.027	1.254	1.256	0.305	0.306	9.2*10 ⁵	36.0
		15	1.932	1.933	1.494	1.497	0.400	0.401		
		20	2.112	2.113	2.258	2.262	0.506	0.507		
	3	10	2.073	2.074	1.576	1.578	0.366	0.367	2.0*10 ²	15.8
		15	2.099	2.100	1.761	1.764	0.399	0.400		
		20	2.213	2.214	2.473	2.477	0.504	0.506		
	1	10	2.144	2.146	1.771	1.774	0.385	0.386	8.5*10 ³	23.8
		15	2.310	2.312	1.742	1.744	0.326	0.327		
		20	2.354	2.355	2.753	2.757	0.496	0.498		

T : Temperatura (°C), C_b : Concentración de NaOH (mol L⁻¹), L : tamaño de piel (cm), C_e : concentración PNC en el equilibrio (g L⁻¹), h : velocidad de extracción inicial (g L⁻¹ h⁻¹), k : Constante de velocidad de segundo orden (L g⁻¹ h⁻¹), A : Factor pre-exponencial (L g⁻¹ h⁻¹), E_a : Energía de Activación (kJ mol⁻¹), LI: límite inferior, LS: límite superior.

Por otro lado, los valores de E_a aumentaron al disminuir L pues al incrementar el área superficial, la PNC queda más expuesta y se requiere menos energía para iniciar la extracción.

La **Tabla 15** muestra los parámetros del modelo de Peleg (MDP) y del modelo de dos sitios (MDS) para cada tratamiento del DF y los respectivos valores de RMSD, los cuales fueron muy pequeños indicando que hubo una buena correlación entre los datos experimentales los predichos con ambos modelos. En lo referente al MDP, el mayor valor para la constante de velocidad de Peleg (K_I) se obtuvo a los valores más bajos de T y C_b y al mayor valor de L , es decir, a las

condiciones más desfavorables para la extracción de la PNC, y el mínimo a las condiciones más favorables, lo que es lógico, pues de acuerdo con la Ecuación (7), la concentración de PNC en el líquido es inversamente proporcional a dicho parámetro. Para la constante de capacidad de Peleg, no se observó un efecto significativo por parte de los factores evaluados (Kiew et al., 2014).

Tabla 15. Parámetros del MDP y del MDS en el DF del pirmer pretratamiento alcalino

Factores			Parámetros MDP					Parámetros MDS						
<i>T</i>	<i>C_b</i>	<i>L</i>	<i>K₁</i>		<i>K₂</i>		<i>RMSD</i>	<i>F</i>		<i>k₁</i>		<i>k₂</i>		<i>RMSD</i>
			<i>LI</i>	<i>LS</i>	<i>LI</i>	<i>LS</i>		<i>LI</i>	<i>LS</i>	<i>LI</i>	<i>LS</i>	<i>LI</i>	<i>LS</i>	
10	0.3	5	2.713	2.714	0.294	0.294	0.018	0.478	0.481	0.235	0.241	0.039	0.041	0.005
10	0.3	3	1.812	1.820	0.429	0.431	0.003	0.686	0.689	0.089	0.091	0.579	0.580	0.001
10	0.3	1	0.843	0.858	0.416	0.428	0.016	0.702	0.718	0.325	0.375	0.278	0.301	0.025
10	0.5	5	1.528	1.530	0.488	0.490	0.008	0.466	0.478	0.222	0.238	0.222	0.238	0.018
10	0.5	3	1.165	1.170	0.519	0.521	0.005	0.576	0.589	0.278	0.296	0.281	0.301	0.022
10	0.5	1	0.670	0.672	0.420	0.422	0.004	0.701	0.704	0.262	0.278	1.327	1.333	0.008
10	0.7	5	1.312	1.322	0.485	0.492	0.013	0.486	0.499	0.228	0.272	0.288	0.302	0.022
10	0.7	3	1.043	1.044	0.504	0.506	0.008	0.532	0.550	0.276	0.294	0.346	0.354	0.024
10	0.7	1	0.538	0.541	0.433	0.436	0.006	0.722	0.741	0.391	0.449	0.451	0.474	0.029
15	0.3	5	1.179	1.181	0.548	0.550	0.004	0.398	0.401	0.905	0.915	0.138	0.142	0.005
15	0.3	3	1.318	1.321	0.483	0.486	0.010	0.316	0.327	0.878	0.901	0.141	0.162	0.019
15	0.3	1	0.581	0.598	0.483	0.498	0.024	0.730	0.731	2.996	3.004	0.246	0.254	0.004
15	0.5	5	0.931	0.936	0.547	0.553	0.013	0.588	0.592	0.133	0.147	0.989	0.994	0.007
15	0.5	3	1.089	1.095	0.460	0.463	0.004	0.630	0.630	0.139	0.142	0.848	0.852	0.002
15	0.5	1	0.506	0.519	0.471	0.487	0.027	0.696	0.701	0.242	0.258	2.092	2.108	0.008
15	0.7	5	0.863	0.876	0.508	0.521	0.013	0.561	0.563	0.134	0.146	0.924	0.936	0.006
15	0.7	3	0.815	0.817	0.480	0.482	0.013	0.668	0.669	0.183	0.197	1.293	1.307	0.007
15	0.7	1	0.409	0.423	0.454	0.468	0.019	0.706	0.715	0.322	0.336	1.784	1.816	0.016
20	0.3	5	0.829	0.831	0.480	0.482	0.007	0.549	0.550	0.856	0.864	0.116	0.124	0.004
20	0.3	3	0.588	0.590	0.547	0.549	0.017	0.602	0.608	0.916	0.931	0.156	0.184	0.014
20	0.3	1	0.417	0.420	0.481	0.483	0.012	0.698	0.701	1.082	1.098	0.132	0.148	0.008
20	0.5	5	0.645	0.647	0.477	0.479	0.006	0.476	0.481	0.996	1.003	0.202	0.218	0.008
20	0.5	3	0.521	0.529	0.491	0.497	0.011	0.580	0.580	0.228	0.232	1.688	1.692	0.002
20	0.5	1	0.353	0.360	0.466	0.473	0.017	0.703	0.706	1.189	1.200	0.12	0.14	0.010
20	0.7	5	0.578	0.581	0.459	0.462	0.005	0.401	0.402	0.137	0.143	1.007	1.013	0.003
20	0.7	3	0.511	0.519	0.444	0.461	0.016	0.650	0.651	0.237	0.243	1.917	1.923	0.003
20	0.7	1	0.323	0.326	0.438	0.441	0.015	0.692	0.705	0.373	0.387	2.189	2.207	0.017

***T*: Temperatura (°C), *C_b*: Concentración de NaOH (mol L⁻¹), *L*: tamaño de piel (cm), *K₁*: constante de velocidad de Peleg (h g PTN g⁻¹ PNC), *K₂*: Constante de capacidad de Peleg (g PTN g⁻¹ PNC), *F*: Fracción másica de PNC extraída por la vía rápida, *k₁*: constante de velocidad asociada a la extracción de PNC por la vía rápida (h⁻¹), *k₂*: constante de velocidad asociada a la extracción de PNC por la vía lenta(h⁻¹), *LI*: límite inferior, *LS*: límite superior.**

En cuanto a los parámetros del MDS, los valores de *F* más altos se obtuvieron para los valores de *L*= 1 cm, y los menores para *L*=5 cm, siendo coherente con la teoría de las celdas rotas (Zhong et al., 2014). Al comparar *k₁* y *k₂* en los tratamientos donde se empleó *C_b* =0.7 M, *k₂*

siempre fue mayor que k_1 , esto se debería a que cuando la PNC no está muy expuesta y el efecto químico tiene mayor influencia sobre el proceso (Zhong et al., 2014).

En la **Figura 12** se puede observar que la bondad de ajuste con el modelo fenomenológico fue mejor en los ensayos a bajas temperaturas y que efectivamente no fue tan buena como la obtenida con el MSO.

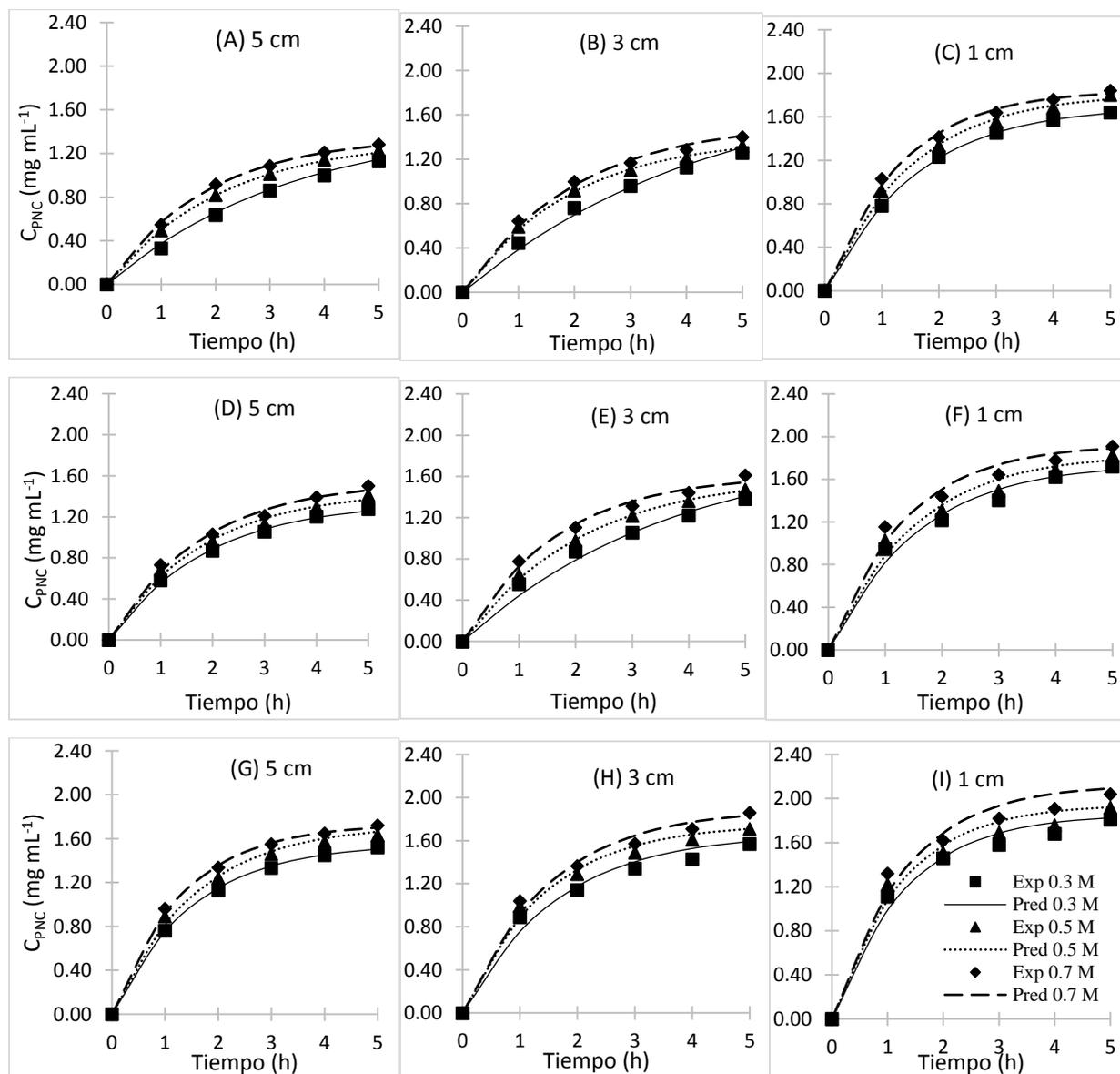


Figura 12. Predicción de la concentración de la PNC (CPNC) en la primera extracción alcalina mediante el modelo fenomenológico. (A), (B), (C) para $T = 10\text{ }^{\circ}\text{C}$, (D), (E), (F) para $15\text{ }^{\circ}\text{C}$, (G), (H), (I) para $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. $R' = 33.33\text{ mL g}^{-1}$ a 400 rpm.

En la **Tabla 16** se reportan los valores de K_L y CL_i (intervalos de confianza), que hacen parte del modelo fenomenológico, con los respectivos valores de RMSD, y aunque no fueron los mejores, fueron bajos, indicando una buena predicción. Se puede observar que los mayores valores de K_L se obtuvieron para las PTN de menor tamaño y para los tamaños de 3 cm y 5 cm y aunque no fue posible compararlo con otros procesos de extracción de PNC, estuvieron cercanos al orden de magnitud de los K_L en la fase líquida reportados para extracción de aceite vegetal (Grasso, 2013). Por otro lado, no fue posible encontrar una correlación que permitiera estimar K_L en términos de los factores evaluados con el fin de obtener un modelo fenomenológico general.

Tabla 16. Parámetros del Modelo Fenomenológico en el DF del primer pretratamiento alcalino

Ensayo	Factores			Parámetros Modelo Fenomenológico				RMSD
	T	C_b	L	K_L		CL_i		
				LI	LS	LI	LS	
1	10	0.3	5	0.012	0.012	1.552	1.598	0.012
2	10	0.3	3	0.041	0.043	1.504	1.535	0.021
3	10	0.3	1	0.532	0.541	1.695	1.705	0.002
4	10	0.5	5	0.021	0.022	1.354	1.373	0.004
5	10	0.5	3	0.066	0.068	1.376	1.390	0.008
6	10	0.5	1	0.597	0.608	1.776	1.785	0.013
7	10	0.7	5	0.024	0.025	1.373	1.389	0.006
8	10	0.7	3	0.069	0.071	1.445	1.458	0.016
9	10	0.7	1	0.665	0.677	1.823	1.832	0.016
10	15	0.3	5	0.024	0.025	1.353	1.367	0.008
11	15	0.3	3	0.051	0.052	1.519	1.539	0.030
12	15	0.3	1	0.589	0.601	1.692	1.702	0.035
13	15	0.5	5	0.026	0.027	1.444	1.458	0.019
14	15	0.5	3	0.059	0.061	1.582	1.599	0.009
15	15	0.5	1	0.637	0.650	1.762	1.771	0.040
16	15	0.7	5	0.026	0.027	1.543	1.557	0.019
17	15	0.7	3	0.071	0.072	1.628	1.641	0.021
18	15	0.7	1	0.745	0.758	1.830	1.838	0.040
19	20	0.3	5	0.030	0.031	1.561	1.571	0.006
20	20	0.3	3	0.093	0.095	1.522	1.531	0.037
21	20	0.3	1	0.826	0.843	1.728	1.735	0.038
22	20	0.5	5	0.034	0.035	1.653	1.663	0.018
23	20	0.5	3	0.098	0.100	1.678	1.687	0.028
24	20	0.5	1	0.857	0.873	1.818	1.826	0.045
25	20	0.7	5	0.036	0.037	1.725	1.733	0.011
26	20	0.7	3	0.091	0.093	1.815	1.825	0.032
27	20	0.7	1	0.877	0.893	1.947	1.955	0.053

T : Temperatura ($^{\circ}\text{C}$), C_b : Concentración de NaOH (mol L^{-1}), L : tamaño de piel (cm), K_L : Coeficiente de transferencia de masa en la fase líquida (m h^{-1}), CL_i : Concentración de PNC en la interfase de lado del líquido (mg mL^{-1}), LI: límite inferior, LS: límite superior.

Los valores de C_{Li} aumentaron directamente con T e inversamente con L , y no hubo un efecto significativo de C_b sobre dicho parámetro. Aunque los valores de C_{Li} fueron menores que los valores de C_e (**Tabla 14**) obtenidos para el MSO, todos los valores estuvieron por encima de la C_{PNC} a las 5 horas en todos los experimentos, y tanto C_e como C_{Li} tuvieron variaciones similares con respecto a los factores del diseño.

Modelo general con base en el DF

No fue posible expresar K_L en términos de C_b , L y T como base para encontrar un modelo general de base fenomenológica para C_{PNC} en función de los factores evaluados y del tiempo. Sin embargo, se pudo desarrollar una ecuación general con base en el MSO, correlacionando cada uno de sus parámetros (C_e , h y k) con los factores de estudio, y obtener un modelo para estimar la concentración de la PNC en términos de los factores de estudio y del tiempo. Los modelos encontrados para cada uno de los parámetros del MSO, se muestran en las Ecuaciones (71), (72) y (73) con su respectivo coeficiente de correlación R^2 :

$$C_e = 3.400 - 0.0812 T - 2.398 C_b - 0.045 L + 0.1565 T * C_b \quad R^2 = 0.87 \quad (71)$$

$$k = 0.30 + 0.704 C_b - 0.028 T - 0.120 L - 0.036 T * C_b + 0.0022 T^2 + 0.0146 L^2 \quad R^2 = 0.98 \quad (72)$$

$$h = 2.694 - 0.208 T + 1.093 C_b - 0.755 L + 0.0099 T^2 + 0.089 L^2 \quad R^2 = 0.92 \quad (73)$$

En algunos estudios previos sobre la cinética de la extracción sólido-liquido, se han reportado correlaciones para h , k y C_e pero en términos de cada uno de los factores estudiados de manera independiente (Qu et al., 2010; Rakotondramasy-Rabesiaka et al., 2007), en este trabajo se obtuvieron expresiones matemáticas para dichos parámetros en términos de los tres factores simultáneamente. Sustituyendo (71) y (72) en (5), se obtiene el modelo general correspondiente a la ecuación (74) que permite estimar el valor de la concentración de PNC ($C_{PNC}=f(T,C_b,L,t)$) en el rango de las condiciones experimentales estudiadas.

$$C_{PNC} = \frac{t}{\frac{1}{2.69 - 0.21T + 1.1Cb - 0.76S + 0.0099T^2 + 0.089S^2} + \frac{t}{3.40 - 0.081T - 2.4Cb - 0.045S + 0.16TCb}} \quad (74)$$

La raíz cuadrada de la desviación cuadrática media (RMSD) y el porcentaje de error medio absoluto (MAPE) para el modelo de la Ecuación (78) fueron 0.0042 y 3.15%, respectivamente. Ambos parámetros que son empleados para medir la capacidad predictiva de modelos, se estimaron para los 135 datos experimentales del DF registrados en la primera etapa de desproteínización. Los valores bajos de RMSD y MAPE, indicaron que la predicción del modelo general fue muy buena (Kiew et al., 2014). La **Tabla 17** muestra los valores experimentales y predichos con el modelo general (Ecuación (78)) e incluye los valores de los porcentajes de los errores absolutos para 10 puntos aleatorios de los 135 datos experimentales y para 10 puntos diferentes a los del diseño experimental. Aunque error máximo fue aproximadamente del 9%, el porcentaje del error medio absoluto para esos dos conjuntos de experimentos estuvieron por debajo del 5%, indicando que el modelo general también es bastante preciso en su predicción y además que es un modelo robusto (Kiew et al., 2014).

Tabla 17. Validación del modelo general de la primera extracción alcalina

Factor	C_b	T	L	t	C_{PNC} Exp	C_{PNC} Pred	Error Absoluto (%)
Puntos dentro del DF	0.4	10	1	4	1.57	1.66	5.96
	0.4	10	5	1	0.49	0.54	7.80
	0.4	10	3	3	1.10	1.16	5.21
	0.4	10	1	5	1.84	1.68	7.20
	0.6	15	5	4	1.20	1.24	2.84
	0.6	15	1	2	1.22	1.30	6.62
	0.6	15	5	5	1.41	1.41	0.13
	0.6	15	1	1	1.16	1.10	7.40
	0.6	20	3	3	1.49	1.49	0.15
	0.6	20	1	2	1.51	1.51	0.24
MAPE (%)							4.35
Puntos por fuera del DF	0.4	15	1	1	0.98	0.94	4.20
	0.4	15	1	3	1.44	1.53	6.52
	0.4	15	3	2	0.99	1.00	1.33
	0.6	15	3	4	1.31	1.36	4.39
	0.6	20	1	1	1.25	1.21	3.42
	0.6	20	1	5	1.94	1.94	0.21
	0.73	10	4	2	0.92	0.90	1.89
	0.73	10	4	5	1.32	1.35	2.43
	0.73	18	4	3	1.51	1.37	8.91
	0.73	18	4	4	1.63	1.50	7.59
MAPE (%)							4.08

T : Temperatura ($^{\circ}\text{C}$), C_b : Concentración de NaOH (mol L^{-1}), L : tamaño de piel (cm), C_{PNC} EXP: Concentración de PNC experimental en el líquido (g L^{-1}), C_{PNC} PRE: Concentración de PNC calculada en el líquido (g L^{-1}), t : tiempo de extracción (h).

En la **Figura 13** se puede observar gráficamente la bondad de ajuste del modelo general de algunos de los experimentos del DF a diferentes temperaturas, a bajas concentraciones de base (0.3 M curvas a la izquierda) y a altas concentraciones de base (0.7 M curvas a la derecha).

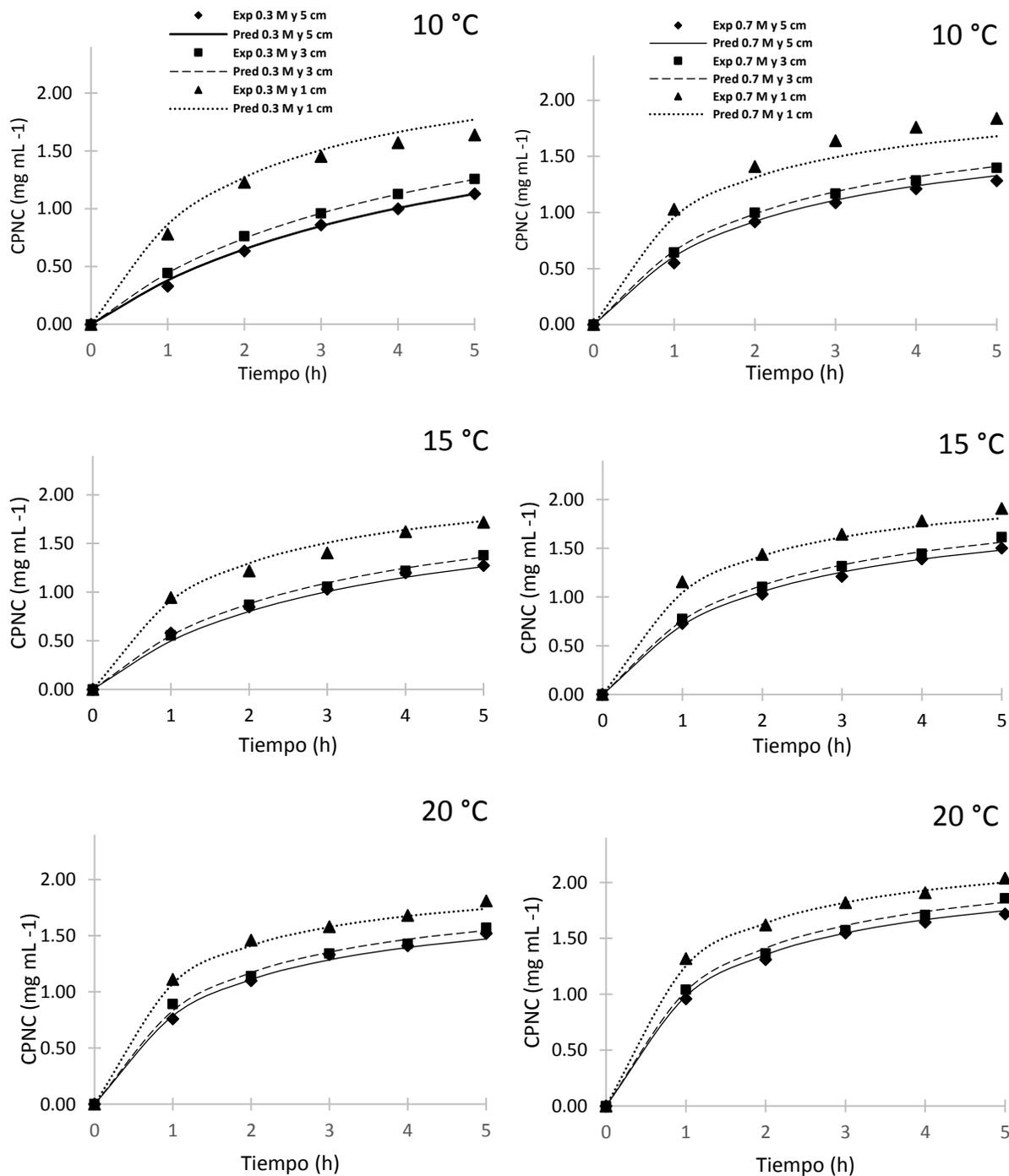


Figura 13. Predicción de la concentración de la PNC (C_{PNC}) en la primera extracción alcalina mediante el modelo general a 10 °C, 15 °C y 20 °C. $R' = 33.33 \text{ mL g}^{-1}$ a 400 rpm.

De la figura anterior se puede notar que a bajas temperaturas (10 °C) hubo un mejor ajuste para tamaños de PTN intermedios y grandes, mientras que a las temperaturas altas (20 °C) la predicción fue muy buena. En las curvas a 10 °C se puede observar que los puntos correspondientes a $L=1$ cm están mucho más separados de los correspondientes a los otros dos tamaños (3 cm y 5 cm), esto se debe a que a pesar de que la velocidad de la T de M es baja a menor temperatura, dicha velocidad de transferencia se ve favorecida por el aumento en el área superficial (Qu et al., 2010), la cual no es lo suficientemente grande para los tamaños intermedios y de la diferencia en la evolución de la C_{PNC} .

Predicción mediante MSO y el MDP en el DCC

La **Tabla 18** muestra los parámetros del MSO y del MDP con sus respectivos R^2 , los cuales resultaron ser iguales a la unidad en su gran mayoría, mostrando la excelente correlación entre los datos experimentales del DCC y los predichos por los dos modelos empíricos.

Tabla 18. Parámetros del MSO y MDP para el DCC del primer pretratamiento alcalino

Ensayo	Factores			Parámetros MSO			R^2	Parámetros MDP		R^2	D_{ef}
	C_b	T	L	C_e	h	K		K_1	K_2		
1	0.80	15.00	0.20	2.93	2.59	0.30	1.00	0.39	0.34	1.00	2.00×10^{-11}
2	0.80	6.59	3.00	2.03	0.95	0.23	1.00	1.05	0.49	1.00	2.98×10^{-9}
3	0.50	10.00	1.00	2.34	1.74	0.32	1.00	0.57	0.43	1.00	3.78×10^{-10}
4	1.31	15.00	3.00	2.37	2.22	0.40	1.00	0.44	0.43	1.00	3.30×10^{-10}
5	1.10	10.00	5.00	2.34	0.84	0.15	1.00	1.18	0.43	1.00	9.52×10^{-10}
6	0.80	15.00	3.00	2.28	1.43	0.27	1.00	0.70	0.44	1.00	3.38×10^{-9}
7	0.50	20.00	1.00	2.21	3.63	0.74	1.00	0.26	0.46	1.00	2.71×10^{-9}
8	0.80	15.00	3.00	2.27	1.43	0.28	1.00	0.70	0.44	1.00	3.36×10^{-9}
9	0.80	23.40	3.00	2.45	2.26	0.38	1.00	0.43	0.41	1.00	3.41×10^{-9}
10	0.80	15.00	3.00	2.25	1.43	0.28	1.00	0.70	0.45	1.00	3.34×10^{-9}
11	0.80	15.00	3.00	2.25	1.46	0.29	1.00	0.68	0.45	1.00	3.32×10^{-9}
12	1.10	10.00	1.00	2.68	2.05	0.29	1.00	0.47	0.38	1.00	4.44×10^{-10}
13	0.80	15.00	6.36	2.24	1.28	0.26	1.00	0.78	0.45	1.00	1.49×10^{-8}
14	1.10	20.00	5.00	2.69	1.98	0.27	1.00	0.49	0.38	1.00	1.49×10^{-8}
15	0.50	20.00	5.00	2.09	1.95	0.45	1.00	0.52	0.48	1.00	1.13×10^{-8}
16	0.30	15.00	3.00	2.27	0.74	0.14	0.99	1.37	0.43	1.00	3.28×10^{-9}
17	0.80	15.00	3.00	2.29	1.42	0.27	1.00	0.70	0.44	1.00	3.41×10^{-9}
18	0.50	10.00	5.00	2.01	0.68	0.17	0.99	1.44	0.50	1.00	7.92×10^{-9}
19	1.10	20.00	1.00	2.72	4.24	0.57	1.00	0.23	0.37	1.00	3.80×10^{-10}
20	0.80	15.00	3.00	2.30	1.37	0.26	1.00	0.73	0.43	1.00	3.44×10^{-9}

T: Temperatura (°C), **C_b :** Concentración de NaOH (mol L⁻¹), **L:** tamaño de piel (cm), **C_e :** concentración PNC en el equilibrio (g L⁻¹), **h:** rata de extracción inicial (g L⁻¹ h⁻¹), **k:** Constante de rata de segundo orden (L g⁻¹ h⁻¹), **K_1 :** constante de rata de Peleg (h g PTN g⁻¹ PNC), **K_2 :** Constante de capacidad de Peleg (g PTN g⁻¹ PNC), **D_{ef} :** difusividad efectiva (m² s⁻¹).

Los valores de los parámetros C_e , h y k del MSO y K_1 y K_2 del MDP fueron muy similares a los obtenidos en el DF, al igual que las variaciones con los factores evaluados en la primera desproteinización. En lo referente a los valores de D_{ef} , se puede observar que el orden de magnitud de los valores encontrados para los experimentos hechos a la más altas concentraciones, fueron del mismo orden de magnitud que los reportados en trabajos sobre extracción de aceites vegetales (Grasso, 2013) a pesar de que en estos ensayos la PTN. Paradójicamente, los mayores valores de este parámetro se obtuvieron a los valores más altos de C_b cuando las ecuaciones empleadas para estimar dicho parámetro no son válidas, pues estas se usan para láminas planas con espesor constante (Crank, 1979), el cual varía por el hinchamiento de la PTN provocado por el NaOH.

En la **Tabla 19** se muestran los valores de los parámetros del MDS e incluye los valores de K'_{eq} para cada tratamiento del DCC de la primera desproteinización alcalina. Se puede observar que el valor de F varía inversamente con L como se esperaba ya que a menor tamaño de PTN se tienen más celdas rotas y la fracción de PNC, obtenida por la vía rápida, es mayor (Zhong et al., 2014). Se puede ver además que no hay un efecto significativo por parte de C_b y de T sobre dicho parámetro.

Tabla 19. Parámetros del modelo de dos sitios (MDS) para el primer pretratamiento alcalino con base en el DCC

Ensayo	C_b	T	L	F	k_1	k_2	$C_i - C_e$	K'_{eq}
1	0.80	15.00	0.20	0.78	0.94	0.02	4.56	0.34
2	0.80	6.59	3.00	0.51	0.57	0.13	5.47	0.19
3	0.50	10.00	1.00	0.72	0.80	0.07	5.17	0.21
4	1.30	15.00	3.00	0.53	0.93	0.08	4.79	0.50
5	1.10	10.00	5.00	0.43	0.08	0.50	5.16	0.26
6	0.80	15.00	3.00	0.52	0.91	0.14	5.22	0.25
7	0.50	20.00	1.00	0.76	1.42	0.12	5.29	0.23
8	0.80	15.00	3.00	0.52	0.90	0.13	5.23	0.24
9	0.80	23.41	3.00	0.53	1.57	0.21	5.06	0.30
10	0.80	15.00	3.00	0.52	0.91	0.14	5.25	0.24
11	0.80	15.00	3.00	0.52	0.91	0.14	5.25	0.24
12	1.10	10.00	1.00	0.70	0.79	0.10	4.82	0.31
13	0.80	15.00	6.36	0.35	0.09	0.87	5.35	0.20
14	1.10	20.00	5.00	0.44	0.26	1.00	5.12	0.27
15	0.50	20.00	5.00	0.42	0.19	0.99	5.41	0.20
16	0.30	15.00	3.00	0.49	0.60	0.07	5.24	0.24
17	0.80	15.00	3.00	0.53	0.91	0.13	5.21	0.25
18	0.50	10.00	5.00	0.38	0.06	0.48	5.47	0.18
19	1.10	20.00	1.00	0.76	1.42	0.11	4.76	0.29
20	0.80	15.00	3.00	0.53	0.90	0.14	5.20	0.25

T: Temperatura ($^{\circ}\text{C}$), **C_b :** Concentración de NaOH (mol L^{-1}), **L :** tamaño de piel (cm), **F :** fracción másica de PNC extraída por la vía rápida, **k_1 :** constante de velocidad asociada a la extracción de PNC por la vía rápida (h^{-1}), **k_2 :** constante de velocidad asociada a la extracción de PNC por la vía lenta (h^{-1}), **$C_i - C_e$:** concentración hipotética de PNC en el sólido, si estuviera disuelta en el líquido en el equilibrio (g L^{-1}), **K'_{eq} :** constante de equilibrio referida al MDS.

Los valores de k_1 fueron más bajos en los tratamientos con los mayores valores de L , donde los valores de k_2 resultaron ser mayores, lo que es lógico pues k_2 está directamente relacionado con la velocidad de extracción por la vía lenta, que se da para las PTN grandes (Zhong et al., 2014). Los valores de $C_i - C_e$ mostró los valores más bajos en los tratamientos donde se utilizó la PTN de menor tamaño, lo que tiene sentido, pues bajo estas condiciones se favorece el paso de la PNC a la fase líquida, quedando menor cantidad de PNC en la PTN sólida (Zhong et al., 2014). Como el valor de la K'_{eq} es inversamente proporcional a $C_i - C_e$, los mayores valores de este parámetro se obtuvieron en los tratamientos donde se usó la PTN de menor tamaño, sin embargo, el máximo valor de K'_{eq} (0.50) se obtuvo para el tratamiento que empleó el mayor valor de C_b (1.3 M), esto se debe posiblemente a que el efecto químico es más fuerte y permite que se extraiga gran cantidad de PNC aunque el área superficial no sea tan grande (Zhong et al., 2014) provocando que el valor de la K'_{eq} aumente.

La **Tabla 20** muestra los valores del RMSD y del MAPE para determinar el modelo que mostró la mejor predicción de los datos experimentales del DCC de la primera desproteización.

Tabla 20. Comparación de modelos empíricos en el DCC del primer pretratamiento alcalino

	MDP		MSO		MDS		Mejor modelo
	RMSD	MAPE (%)	RMSD	MAPE	RMSD	MAPE	
1	0.0040	0.34	0.0038	0.33	0.0052	0.38	MSO
2	0.0093	1.43	0.0078	1.22	0.0046	0.72	MDS
3	0.0070	0.79	0.0068	0.75	0.0057	0.62	MDS
4	0.0072	0.77	0.0070	0.91	0.0030	0.58	MDS
5	0.0067	1.11	0.0058	1.14	0.0029	0.96	MDS
6	0.0049	0.59	0.0046	0.51	0.0018	0.31	MDS
7	0.0071	0.79	0.0079	0.84	0.0012	0.66	MDS
8	0.0038	0.50	0.0037	0.51	0.0211	1.02	MSO
9	0.0105	0.99	0.0099	1.18	0.0026	0.81	MDS
10	0.0042	0.59	0.0041	0.64	0.0016	0.45	MDS
11	0.0063	0.83	0.0063	0.90	0.0247	1.36	MDP
12	0.0221	2.18	0.0196	2.59	0.0019	1.52	MDS
13	0.0111	1.75	0.0101	1.68	0.0124	1.82	MSO
14	0.0209	2.07	0.0177	2.39	0.0398	2.56	MSO
15	0.0056	0.72	0.0054	0.72	0.0027	0.64	MDS
16	0.0132	2.04	0.0092	1.83	0.0049	1.26	MDS
17	0.0040	0.50	0.0035	0.49	0.0012	0.37	MDS
18	0.0129	1.89	0.0090	2.28	0.0023	1.66	MDS
19	0.0133	1.00	0.0111	1.03	0.0063	0.94	MDS
20	0.0043	0.67	0.0037	0.62	0.0121	1.14	MSO

Se puede observar que, en 14, de los 20 tratamientos del DCC, el MDS presentó la mejor predicción, el MSO en 5 y el MDP tan solo en 1.

Mediante la Ecuación (12) y por medio de una correlación lineal se estimaron los valores de ΔH y ΔS ($21.53 \text{ kJ mol}^{-1}$ y $49 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) y mediante la Ecuación (13) se determinó ΔG a

temperaturas de 6.6, 15 y 23.4 °C obteniendo valores de 7.81, 7.40 y 6.99 kJ mol⁻¹, respectivamente. El signo positivo en los resultados de los tres parámetros es coherente ya que el proceso de extracción de la PNC es endotérmico y el hecho de que dicha proteína pase de la fase sólida a la solución alcalina, provoca un aumento en la entropía. Además, se observa una disminución en el cambio de la energía libre de Gibbs con el aumento de T , lo que es también lógico, pues la extracción se favorece mientras mayor sea la T .

6.4.3. Escalado del primer pretratamiento alcalino

En la **Tabla 21** se muestra el desarrollo del análisis dimensional para realizar el escalado del primer pretratamiento alcalino:

Tabla 21. Determinación números adimensionales para el escalado del primer pretratamiento alcalino

X_i	a	b	c	d	Número π
C_{PNC}	0	0	0	-1	$\pi_1 = \frac{C_{PNC}}{\rho}$
C_b	0	0	-1	0	$\pi_2 = \frac{C_b}{\rho}$
R'	0	0	0	1	$\pi_3 = R \rho$
L	0	0	0	-1	$\pi_4 = \frac{L}{D}$
u	0	-1	-1	-2	$\pi_5 = \frac{u}{\rho N D^2}$

De la **Tabla 21** se puede observar que π_5 corresponde al inverso del número Re , el cual involucra el diámetro del impulsor (D), la velocidad de rotación (N), la densidad (ρ) y la viscosidad (μ), que son parámetros que están relacionados directamente con las condiciones de agitación del proceso y se emplea como enlace entre las condiciones a pequeña escala y las condiciones a una escala mayor. Asumiendo que hay similitud completa (geométrica, cinemática y dinámica) y denotando con el subíndice 1, las condiciones del modelo (pequeña escala) y 2 las condiciones del prototipo (gran escala) se puede plantear la siguiente igualdad:

$$Re_1 = Re_2 \quad (75)$$

Reemplazando cada uno con base en la expresión para II_5 que se muestra en la **Tabla 21**, se obtiene:

$$\frac{\rho_1 N_1 D_1^2}{u_1} = \frac{\rho_2 N_2 D_2^2}{u_2} \quad (76)$$

Como se va a operar en ambas escalas con los mismos valores de C_b y T , se puede asumir que las propiedades del líquido son las mismas (propiedades intensivas), por lo que ρ y u se pueden cancelar en ambos lados de la Ecuación (76) obteniendo:

$$N_1 D_1^2 = N_2 D_2^2 \quad (77)$$

Conocidos N_1 , D_1 y D_2 , se puede determinar el valor de N_2 de la Ecuación (67):

$$N_2 = \left(\frac{D_1}{D_2}\right)^2 N_1 \quad (78)$$

La relación entre la altura y el diámetro en reactor pequeño fue de 2 a 3 aproximadamente. Manteniendo esta relación en el reactor de 2 L para garantizar similitud geométrica, se puede estimar D_2 mediante la siguiente ecuación:

$$D_2 = (6 * 2000/\pi)^{1/3} = 15.64 \text{ cm} \quad (79)$$

Mediante la ecuación (78) se estimó el valor de N_2 (85 rpm), asumiendo que la relación entre los diámetros de los impulsores coincide con la de los diámetros de los reactores ($N_1 = 400$ rpm).

La **Tabla 22** muestra algunos de los parámetros empleados en el modelo y el prototipo para la primera extracción alcalina a las condiciones óptimas. Aunque el EPNC obtenidos a las 5 h en el reactor de 2 L fue menor que en el de 200 mL, fueron muy similares.

Tabla 22. Comparación de la primera extracción alcalina a las condiciones óptimas en ambas escalas

Parámetro	Modelo	Prototipo
Volumen de operación (mL)	200	2000
Diámetro (cm)	7.25	15.64
Nivel del líquido (cm)	4.84	10.42
Diámetro del agitador (cm)	5.08	11.18
Velocidad de Agitación (rpm)	400	85
EPNC (%) a las 5 h	25.81	24.68

En la **Figura 14** se muestra la C_{PNC} durante cada hora de la primera extracción alcalina a pequeña y a gran escala y se puede observar que ambas cinéticas tienen la misma tendencia y que la forma de las curvas es muy similar a las de las obtenidas para los diseños experimentales.

Aunque los valores para el volumen de 2 L están por debajo, están muy cercanos a los obtenidos para el volumen de 200 mL.

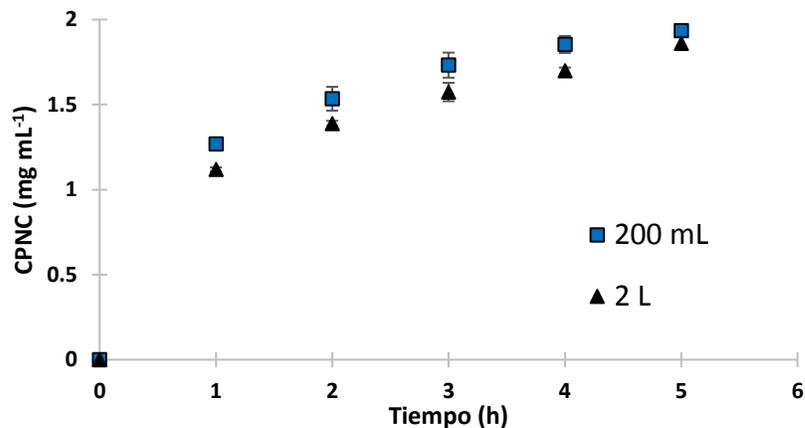


Figura 14. Comparación de la evolución de C_{PNC} a 200 mL y 2000 mL. Las barras de error representan las DE ($n = 3$).

La **Figura 15** muestra las PC durante cada hora de la primera extracción alcalina a 200 mL y 2L. Se puede ver que los valores de PC fueron mucho más altos en el reactor de 2 L durante las primeras 4 horas de la extracción y más similares en la quinta hora. El valor promedio de PC obtenido a las 5 h para los tres desproteinizaciones realizadas a las condiciones del punto óptimo fue de 2.75% y aunque estuvo por encima del estimado por MSR (2.56%), está dentro del rango de error establecido por la desviación estándar (DE).

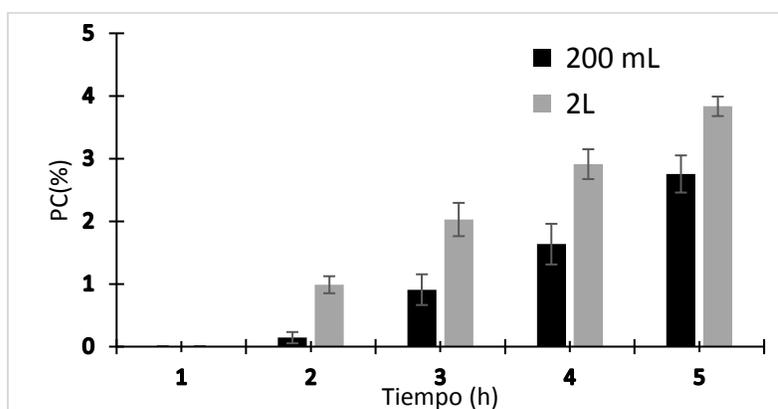


Figura 15. Comparación de las PC a 200 mL y 2000 mL para la primera extracción alcalina a las condiciones óptimas. Las barras de error representan las DE ($n = 3$).

6.4.4. Modelado del segundo pretratamiento alcalino

En la **Tabla 23** se muestran los parámetros del MSO, MDP y MDS con el respectivo RMSD para los experimentos del DCC. Se puede observar que en la mayoría de los casos el menor valor de RMSD lo registro el MDS indicando que hubo una buena correlación entre los datos experimentales y los predichos por este modelo.

Tabla 23. Parámetros de los modelos empíricos de la segunda desproteización alcalina

Factores		MSO				MDP				MDS			Mejor
T (°C)	C_b (M)	C_e	h	k	RSMD	K_1	K_2	RSMD	F	k_1	k_2	RSMD	Modelo
10.00	0.20	0.43	0.21	1.14	0.0029	4.36	2.44	0.0034	0.59	0.24	1.52	0.0053	MSO
13.50	0.35	0.41	0.34	2.04	0.0015	2.82	2.48	0.0017	0.55	0.26	1.61	0.0016	MSO
10.00	0.50	0.57	0.41	1.25	0.0031	2.20	1.84	0.0036	0.63	0.22	1.97	0.0011	MDS
18.44	0.35	0.47	0.35	1.60	0.0070	2.08	2.40	0.0076	0.65	0.22	2.96	0.0023	MDS
8.55	0.35	0.41	0.26	1.55	0.0026	4.28	2.32	0.0031	0.26	0.04	0.67	0.0016	MDS
13.50	0.13	0.35	0.09	0.77	0.0029	11.71	2.47	0.0038	0.40	0.01	0.38	0.0024	MDS
13.50	0.35	0.40	0.29	1.85	0.0021	3.42	2.50	0.0021	0.58	0.24	1.58	0.0061	MDP
13.50	0.35	0.39	0.34	2.20	0.0032	3.08	2.50	0.0031	0.58	0.25	1.51	0.0047	MDP
13.50	0.56	0.59	0.50	1.43	0.0041	1.73	1.78	0.0046	0.60	0.22	2.43	0.0016	MDS
13.50	0.35	0.40	0.38	2.41	0.0026	2.80	2.49	0.0025	0.56	0.25	1.50	0.0039	MDP
17.00	0.20	0.42	0.26	1.46	0.0027	3.48	2.52	0.0033	0.69	0.21	2.05	0.0022	MDS
13.50	0.35	0.41	0.32	1.89	0.0027	2.85	2.50	0.0030	0.58	0.24	1.59	0.0040	MSO
17.00	0.50	0.6	0.62	1.53	0.0055	1.33	1.67	0.0057	0.58	0.26	3.83	0.0004	MDS

T: Temperatura (°C), **C_b :** Concentración de NaOH (mol L⁻¹), **C_e :** concentración PNC en el equilibrio (g L⁻¹), **h :** velocidad de extracción inicial (g L⁻¹ h⁻¹), **k :** Constante de velocidad de segundo orden (L g⁻¹ h⁻¹), **K_1 :** constante de velocidad de Peleg (h g PTN g⁻¹ PNC), **K_2 :** Constante de capacidad de Peleg (g PTN g⁻¹ PNC), **F:** Fracción másica de PNC extraída por la vía rápida, **k_1 :** constante de velocidad asociada a la extracción de PNC por la vía rápida (h⁻¹), **k_2 :** constante de velocidad asociada a la extracción de PNC por la vía lenta(h⁻¹).

6.4.5. Modelo general

El mejor modelo fue MDS y de la **Tabla 23** se puede observar que no hubo un efecto significativo sobre el valor de F , lo que es lógico, pues el valor de L no se modificó y lo mismo ocurrió con el valor de K_1 , mientras que para K_2 se ve un efecto significativo de T y C_b . Para MSO se tiene:

$$C_e = 0.971 - 1.15 C_b - 0.072 T + 0.019 C_b T + 2.67C_b^2 + 0.0026T^2 \quad (80)$$

$$h = 0.95C_b + 0.014T - 0.183 \quad (81)$$

Reemplazando en la Ecuación (5) se obtiene

$$C_{PNC} = \frac{t}{\left(\frac{1}{(0.014T + 0.95C_b - 0.18)} + \frac{t}{(2.67C_b^2 + 0.019C_bT - 0.072T - 1.15C_b + 0.971)} \right)} \quad (82)$$

6.5. Extracción ácida de la PTN desproteínizada

6.5.1. Determinación de las condiciones de extracción

El tiempo de extracción fue de 5 h, pues fue el necesario para que la PTN desproteínizada 3 veces se desintegrara por completo en la mayoría de los experimentos del DCC. La velocidad de agitación fue de 400 rpm, al igual que en los tratamientos anteriores. El valor de L fue de 1 cm que corresponde al valor encontrado en la optimización de la primera desproteínización alcalina. Los valores de T , C_{Ac} y R' se pueden observar en la **Tabla 24**.

6.5.2. Diseño central compuesto

En la **Tabla 24** se muestran los valores de C_{COL} a intervalos de 30 min durante las 5 horas del proceso de extracción ácida y se incluye el valor de la variable de respuesta correspondiente al $ECOL_3$ (%) a las tres horas de extracción. De la **Tabla 25** se concluye que todos los factores individuales, interacciones dobles, términos cuadráticos y la interacción triple, tuvieron un efecto significativo sobre $ECOL_3$. Las condiciones óptimas estimadas por MSR fueron $R' = 40 \text{ mL g}^{-1}$, $C_{AC} = 0.787 \text{ M}$ y $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$, en las que se obtuvo un $ECOL_3$ máximo del 85.3 %.

La Ecuación (83) muestra el modelo de efectos para la extracción ácida. El R^2 fue de 0.998, indicando un buen ajuste. Así mismo, el coeficiente de variación fue pequeño (0.56). Además, la falta de ajuste fue no significativa.

Tabla 24. Variable de respuesta ECOL₃ de la extracción ácida de colágeno

Ensayo	Factores			V. de Respuest a
	<i>T</i> (°C)	<i>R'</i> (mL g ⁻¹)	<i>C_{AC}</i> (mol L ⁻¹)	<i>ECOL₃</i> %
1	23.41	50.00	0.55	81.5
2	10.00	40.00	0.80	59.4
3	20.00	40.00	0.30	75.7
4	15.00	50.00	0.13	82.1
5	15.00	50.00	0.97	69.4
6	15.00	50.00	0.55	79.4
7	15.00	50.00	0.55	80.2
8	20.00	60.00	0.30	84.6
9	15.00	50.00	0.55	80.2
10	10.00	60.00	0.30	76.4
11	15.00	33.18	0.55	71.2
12	15.00	50.00	0.55	80.0
13	20.00	40.00	0.80	84.9
14	15.00	66.81	0.55	80.8
15	10.00	60.00	0.80	73.2
16	6.59	50.00	0.55	68.9
17	20.00	60.00	0.80	77.1
18	15.00	50.00	0.55	80.2
19	15.00	50.00	0.55	80.0
20	10.00	40.00	0.30	67.8

ECOL₃: Porcentaje de extracción de colágeno después de 3 h

Tabla 25. Análisis ANOVA del DCC de la Extracción ácida

Fuente	Valor p
Model	< 0.0001
<i>T</i>	< 0.0001
<i>R'</i>	< 0.0001
<i>C_{Ac}</i>	< 0.0001
<i>R'-T</i>	< 0.0001
<i>C_{Ac}-T</i>	< 0.0001
<i>R'-C_{Ac}</i>	< 0.0001
<i>T</i> ²	< 0.0001
<i>R'</i> ²	< 0.0001
<i>C_{Ac}</i> ²	< 0.0001
<i>R'-C_{Ac}-T</i>	< 0.0001
<i>C_{Ac}-T</i> ²	< 0.0001
<i>T-R</i> ²	< 0.0001
Falta de ajuste	0,0707
DE	0.430
C.V%	0.560
R-Cuadrado	0.998

$$ECOL_3 = 15.19T + 6.93R' - 50.33C_A - 0.32TR' + 0.11TC_{AC} + 2.70R'C_{AC} - 0.29T^2 - 0.073R'^2 - 25.82C_{AC}^2 - 0.22R'TC_{AC} + 0.40C_{AC}T^2 + 0.0039TR'^2 - 149.6 \quad (83)$$

La **Figura 16** muestra la superficie de respuesta para la extracción ácida del colágeno. Se observa que $ECOL_3$ aumenta con la temperatura y con R' . Sin embargo, el efecto de C_{AC} depende de la temperatura. Se observa que a baja temperatura existe una relación inversa con $ECOL_3$, mientras que a alta temperatura, la relación es directa excepto a los valores más altos de C_{AC} . Lo anterior se concluye ya que el valor de $ECOL_3$ en el punto óptimo (C_{AC} de 0.787 M) fue de 85.3% y a 0.8 M fue menor (84.9 %). El efecto inverso de C_{AC} sobre el $ECOL_3$ (solubilidad) a bajas T y altos C_{AC} , se puede explicar mediante la teoría que sugiere que la solubilización del colágeno se inicia con la hidratación del colágeno fibroso y es seguida por el contacto con el ácido (Skierka y Sadowska, 2007) el cual, al estar muy concentrado, puede provocar modificaciones de las interacciones electrostáticas y de la estructura del colágeno ocasionadas por cambios en el pH (Kiew et al., 2014). A valores de pH muy bajos, la capacidad de absorción de agua se reduce debido a que los grupos amino de las proteínas (con carga positiva) forman enlaces con los aniones (CH_3COOH^-) presentes precisamente a valores de pH muy bajos (Skierka y Sadowska, 2007) provocando fuerzas repulsivas electrostáticas que endurecen las fibras de colágeno y reduciendo la capacidad de que estas formen enlaces con el agua con la consecuente disminución de la solubilidad. También se ha reportado que a valores de pH por debajo de 2, las moléculas de colágeno se desnaturalizan por encogimiento (Kiew et al., 2014).

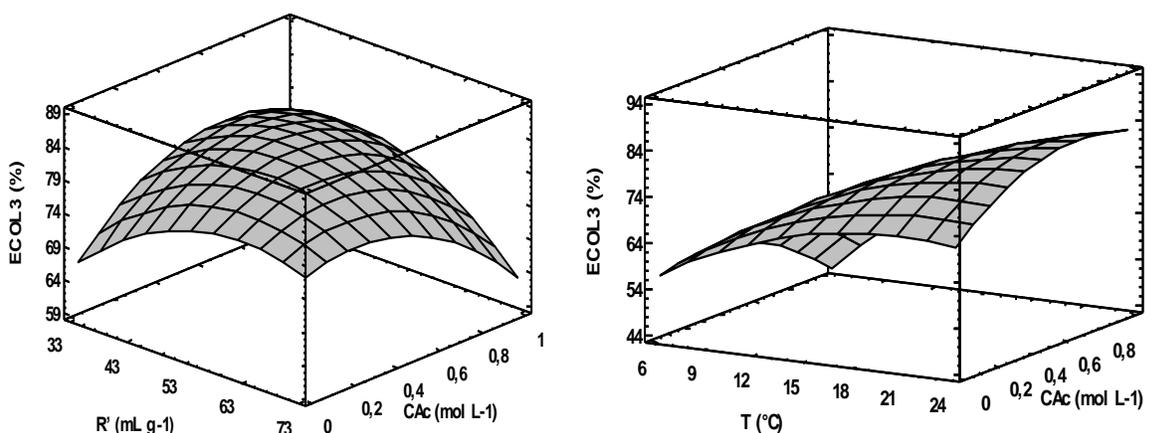


Figura 16. Superficie de respuesta de la extracción ácida de colágeno. $T = 20$ °C la de la izquierda y $R' = 40$ (mL g⁻¹) la de la derecha

6.6. Análisis cinético, modelado y escalado de la extracción ácida

6.6.2. Análisis cinético

La **Figura 17** muestra la cinética correspondiente al punto central del DCC de la extracción ácida que incluye los resultados experimentales de C_{PNC} registrados para 5 repeticiones y la curva de predicción de dicha concentración en función del tiempo mediante el MDS.

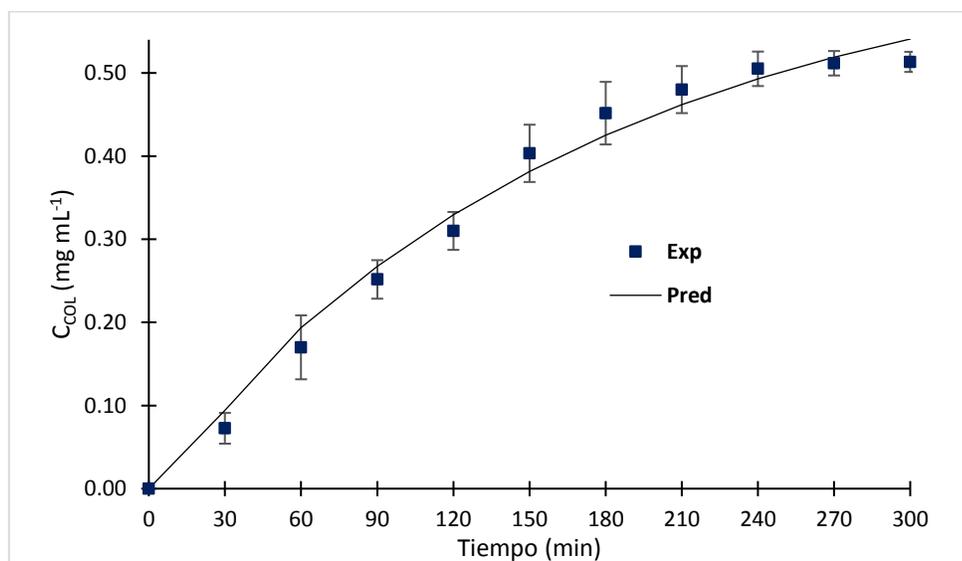


Figura 17. Predicción de la C_{COL} en la extracción ácida mediante el MDS a una $T = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$, $R' = 50\text{ mL g}^{-1}$ y $C_{AC} = 0.55\text{ M}$ en función del tiempo. Las barras de error representan las desviaciones estándar para $n = 6$. R' : relación entre el volumen de la solución de ácido acético y la masa de PTN desproteïnizada (mL g^{-1}).

Al igual que las cinéticas del pretratamiento alcalino, el gráfico cinético anterior y los que se muestran más adelante, registraron 2 etapas de extracción: La primera se puede distinguir desde el inicio hasta las 3 h, que es la más rápida y la segunda que es más lenta y muestra una tendencia asintótica (Zhong et al., 2014). También se puede observar que aproximadamente el 90 % de la extracción total de CAS presente en la PTN desproteïnizada, se logra en las tres primeras horas. Este hecho soporta el uso de cinéticas de reacción típicas para el modelado de cada una de las etapas, como el MSO, el MDP y el MDS (Qu et al., 2010; Rakotondramasy-Rabesiaka et al., 2007).

La **Figura 18** muestra los gráficos cinéticos para la extracción de CAS en soluciones 0.3 M de ácido acético a diferentes valores de T y R' . Se puede observar que la temperatura tiene un efecto directo más fuerte sobre la velocidad de extracción a valores de R' bajos, esto se debe posiblemente a que, a valores de R' altos, los pedazos de PTN desproteïnizada quedan más

dispersos y tendrían un volumen de solución (líquido) asociado mucho mayor, provocando que el efecto químico del ácido predomine sobre el térmico.

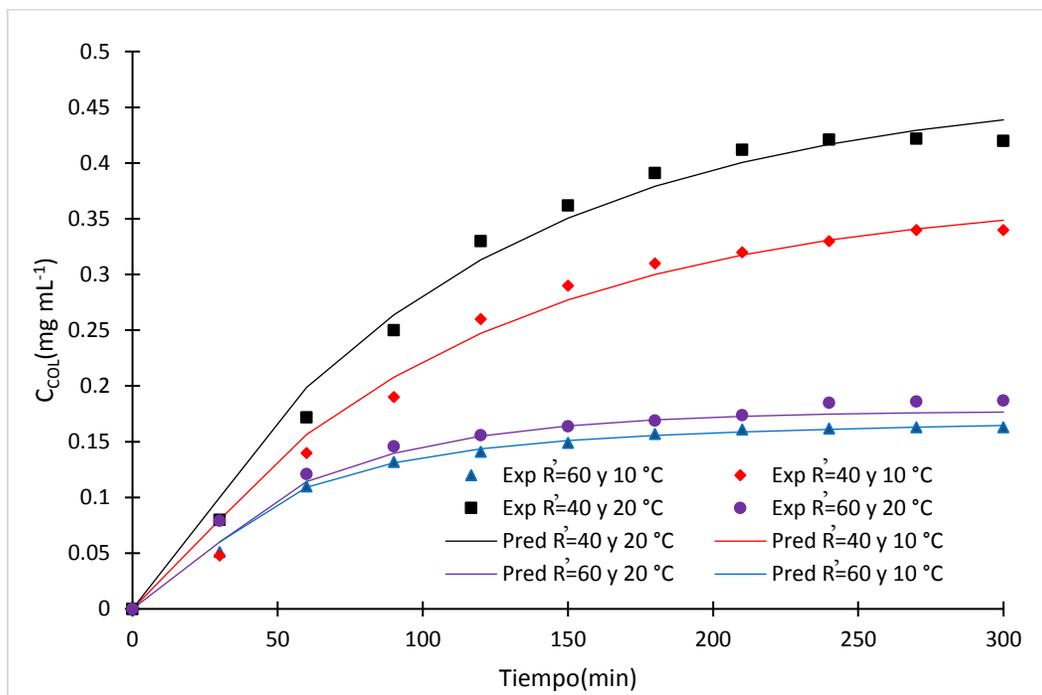


Figura 18. Predicción de la C_{COL} en la extracción ácida mediante el MDS a $C_{AC} = 0.30\text{ M}$ en función del tiempo y efecto de R' y T sobre el proceso de extracción ácida. R' : relación entre el volumen de la solución de ácido acético y la masa de PTN desproteinizada (mL g^{-1}).

Se puede observar claramente que a los valores de R' más altos, la C_{COL} fue muy baja debido a que el valor de R' está directamente relacionado con el volumen de solución, el cual es inversamente proporcional a la concentración (Qu et al., 2010). Debido a que los experimentos se hicieron empleando un volumen constante, los bajos valores de C_{COL} no implican un bajo % de extracción de colágeno, pues este está asociado con la masa de PTN empleada en cada ensayo, la cual cambia de acuerdo al valor de R' .

La **Figura 19** muestra los gráficos cinéticos para la extracción de CAS en soluciones 0.8 M de ácido acético a diferentes valores de T y R' . Al igual que en los experimentos a 0.3 M , la temperatura tiene un efecto directo sobre la velocidad de extracción al valor de R' más bajo, pero se puede observar, que a iguales valores de R' , se alcanzaron mayores C_{COL} a 0.8 M que a 0.3 M , mostrando un efecto directo de la C_{AC} sobre el porcentaje de extracción, en este rango de concentraciones (Kiew et al., 2014).

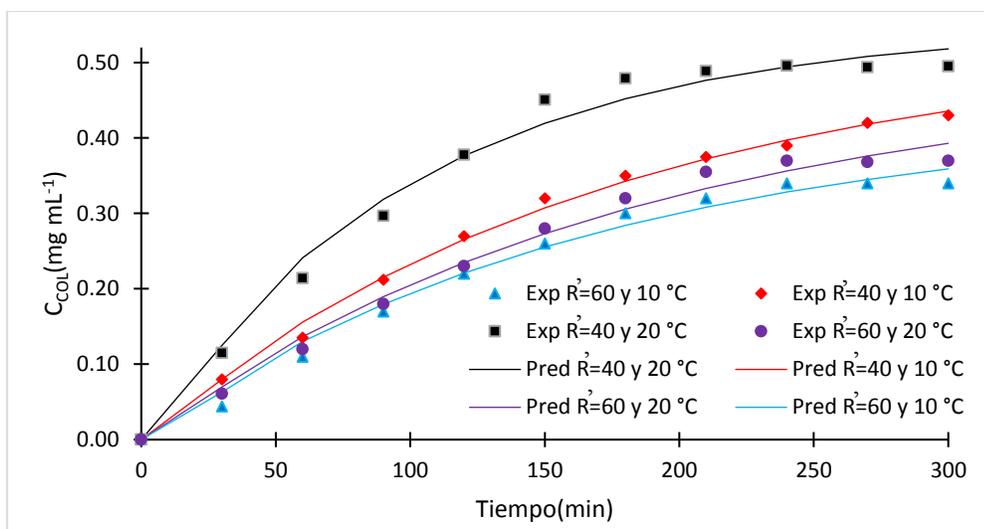


Figura 19. Predicción de la C_{COL} en la extracción ácida mediante el MDS a $C_{AC} = 0.80$ M en función del tiempo. R' : relación entre el volumen de la solución de ácido acético (mL) y la masa de PTN desproteínizada (g).

En la **Figura 20** se muestran los gráficos cinéticos para la extracción de CAS en soluciones de ácido acético a 15 °C y a diferentes valores de C_{AC} y R' . Se puede ver que el efecto de C_b sobre la eficiencia de extracción de colágeno fue directo pero moderado y que para el valor de R' más alto (66.8) se obtuvieron los más bajos valores de C_{COL} .

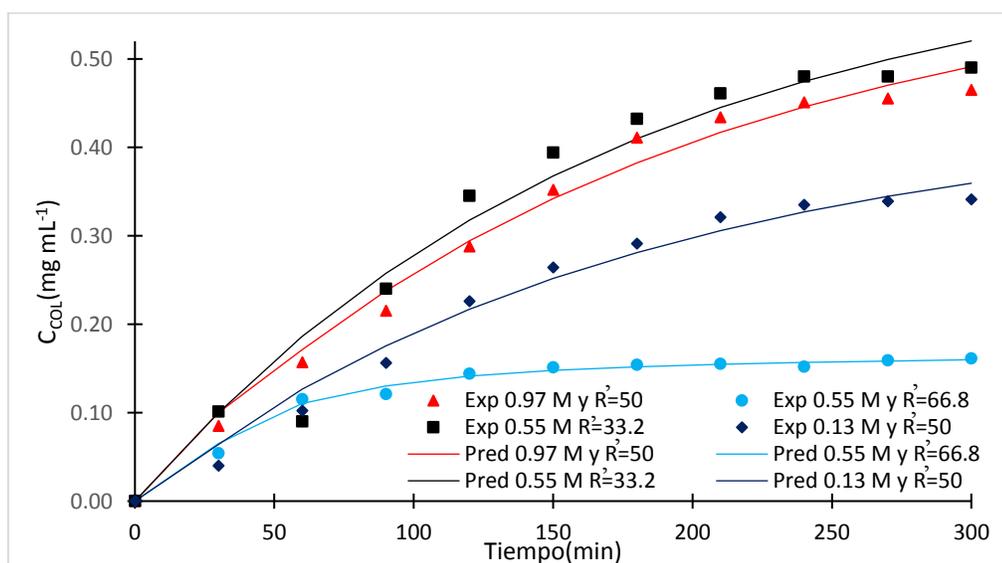


Figura 20. Predicción de la C_{COL} en la extracción ácida mediante el MDS a $T = 15$ °C en función del tiempo. R' : relación entre el volumen de la solución de ácido acético (mL) y la masa de PTN desproteínizada (g).

En la **Figura 21** se muestran los gráficos cinéticos para la extracción de CAS a la más baja y más alta temperatura a valores de R' y C_{AC} intermedios (50 mL g^{-1} y 0.55 M) y se puede observar el efecto directo de T sobre la velocidad inicial de extracción alcanzando primero la zona asintótica la curva correspondiente a la más alta temperatura. Esto puede ocurrir debido a que el colágeno se empieza a desnaturalizar a temperaturas altas (Kiew et al., 2014), pues en la curva a baja T se observa una ligera tendencia a seguir subiendo a las 5 h de la extracción, indicando que aún es posible extraer más colágeno, por lo que los valores C_{COL} a dicho tiempo en ambas curvas se aproximan.

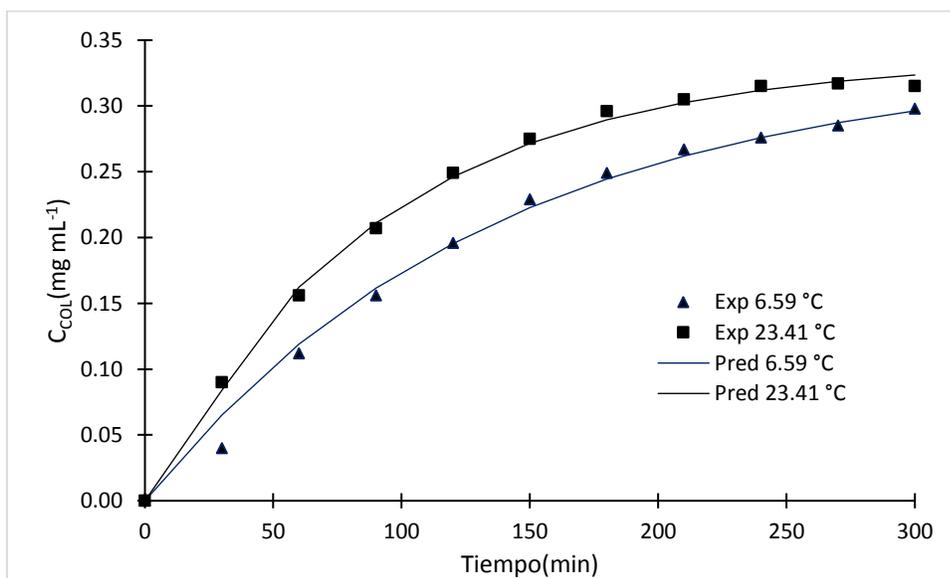


Figura 21. Predicción de la C_{COL} en la extracción ácida mediante el MDS a $C_{AC} = 0.55 \text{ M}$ y $R' = 50$ en función del tiempo. R' : relación entre el volumen de la solución de ácido acético (mL) y la masa de PTN desproteínizada (g).

En general las curvas de predicción construidas con el MDS se aproximaron a los datos experimentales en la mayoría de los ensayos del DCC de la extracción ácida, en la siguiente sección se muestran los valores cuantitativos que muestran la bondad de ajuste de cada modelo en cada uno de los 20 tratamientos.

6.6.3. Modelado

En la **Tabla 26** se muestran los parámetros del MSO, MDP y MDS con los respectivos valores de RMSD para cada uno de los tratamientos del DCC de la extracción ácida. Se puede

observar que el MDS (valores en negrilla) mostró el menor error en la mayoría de los tratamientos, indicando que hubo una excelente correlación entre los datos experimentales y los predichos por el MDS y que dicho modelo permite predecir los resultados cinéticos con buena precisión. El MDP también tuvo valores de RMSD muy bajos indicando que dicho modelo es apropiado para predecir los valores de C_{COL} en la extracción ácida de CAS y que estuvieron inclusive por debajo de valores reportados para dicho modelo (0.01 - 0.095) en la extracción de colágeno (empleando pepsina) a partir de piel bagre de malasia (Kiew et al., 2014).

Tabla 26. Parámetros de los modelos empleados en la extracción ácida

Factores			MSO				MDP				MDS			
T	R'	C _{AC}	Ce	h	k	RMSD	K ₁	K ₂	RMSD	F	k ₁	k ₂	RMSD	
23.4	50.0	0.55	0.71	0.28	0.56	0.060	4.94	0.90	0.010	0.76	0.02	2.40	0.002	
10.0	40.0	0.80	0.78	0.20	0.32	0.004	5.81	1.02	0.005	0.33	0.08	0.35	0.004	
20.0	40.0	0.30	0.75	0.27	0.48	0.017	5.14	0.82	0.010	0.30	0.01	0.43	0.007	
15.0	50.0	0.13	0.92	0.14	0.17	0.009	9.07	0.37	0.009	0.50	0.02	0.34	0.008	
15.0	50.0	0.97	1.34	0.13	0.07	0.023	9.36	0.53	0.018	0.94	0.19	2.34	0.006	
15.0	50.0	0.55	1.29	0.20	0.12	0.014	5.60	0.40	0.009	0.45	0.02	0.33	0.008	
15.0	50.0	0.55	1.06	0.23	0.21	0.007	4.39	0.91	0.001	0.39	0.01	0.36	0.006	
20.0	60.0	0.30	0.21	0.29	6.58	0.001	4.41	4.50	0.001	0.15	0.02	1.03	0.004	
15.0	50.0	0.55	1.26	0.20	0.13	0.007	5.30	0.67	0.005	0.45	0.01	0.30	0.004	
10.0	60.0	0.30	0.40	0.37	2.35	0.044	3.34	2.30	0.003	0.62	0.01	1.21	0.001	
15.0	33.2	0.55	0.89	0.26	0.34	0.015	4.58	0.84	0.007	0.29	0.01	0.35	0.015	
15.0	50.0	0.55	1.17	0.32	0.23	0.011	3.73	0.92	0.009	0.49	0.01	0.50	0.008	
20.0	40.0	0.80	0.63	0.35	0.88	0.006	3.16	1.46	0.002	0.14	0.01	0.58	0.006	
15.0	66.8	0.55	0.18	0.31	9.53	0.001	4.20	5.23	0.001	0.21	0.03	1.35	0.008	
10.0	60.0	0.80	0.77	0.25	0.42	0.032	5.26	0.84	0.009	0.44	0.01	0.36	0.005	
6.6	50.0	0.55	0.65	0.31	0.73	0.068	4.01	1.26	0.005	0.42	0.01	0.20	0.002	
20.0	60.0	0.80	0.75	0.12	0.21	0.019	8.73	1.15	0.002	0.35	0.01	0.33	0.009	
15.0	50.0	0.55	1.19	0.21	0.15	0.007	5.03	0.80	0.006	0.45	0.02	0.32	0.005	
15.0	50.0	0.55	1.11	0.23	0.18	0.012	4.93	0.72	0.005	0.38	0.01	0.31	0.009	
10.0	40.0	0.30	0.48	0.26	1.15	0.010	4.69	1.78	0.009	0.22	0.01	0.54	0.008	

T: Temperatura (°C), **C_{AC}:** Concentración de ácido acético (mol L⁻¹), **R':** relación entre el volumen de solución (mL) y la masa de piel (g), **Ce:** concentración de COL en el equilibrio (g L⁻¹), **h:** velocidad de extracción inicial (g L⁻¹ h⁻¹), **k:** Constante de velocidad de segundo orden (L g⁻¹ h⁻¹), **K₁:** constante de velocidad de Peleg (h g PTN g⁻¹ COL), **K₂:** Constante de capacidad de Peleg (g PTN g⁻¹ COL), **F:** Fracción másica de COL extraída por la vía rápida, **k₁:** constante de velocidad asociada a la extracción de COL por la vía rápida (h⁻¹), **k₂:** constante de velocidad asociada a la extracción de COL por la vía lenta(h⁻¹).

Al analizar los resultados de la **Tabla 26** para determinar el efecto de los factores (*T*, *R'* y *C_{AC}*) sobre los valores de los parámetros de cada uno de los modelos evaluados, no fue posible encontrar correlaciones que permitieran expresar cada parámetro en términos de dichas variables

de estudio. En el caso del MSO, se observa que los valores de h se mantuvieron en un orden de magnitud muy bajo dentro del rango de 0.12 a 0.37 y la mayoría de los valores de k siguieron esta misma tendencia (<1) excepto por 4 valores que dieron mayores de la unidad. Aunque el máximo valor de C_e (1.34) correspondió al ensayo realizado a la mayor C_{AC} (0.97), el menor valor se observó una concentración intermedia y no fue posible encontrar una correlación con ninguno de los factores. En el MDP se puede observar que en la mayoría de los casos K_1 fue mayor que K_2 y mantuvieron cada uno su orden de magnitud. En cuanto al MDS se puede destacar que prácticamente todos los valores de k_1 fueron muy cercano a cero y que los valores de F no tuvieron una tendencia muy marcada, lo que es lógico pues dicho parámetro está relacionado con las celdas rotas e intactas (tamaño del sólido) y en el proceso de extracción ácida, la PTN desproteïnizada se va desintegrando hasta que se disuelva completamente en la fase líquida, por lo que el tamaño de la partícula sólida es variable y por lo tanto F también lo es (Zhong et al., 2014).

6.6.4. Escalado

Los resultados para el escalado de la extracción ácida se obtuvieron mediante los métodos y ecuaciones utilizadas para el pretratamiento alcalino como se mostró en la sección 6.4.3. La velocidad de agitación estimada para el nuevo volumen de operación de 2000 mL fue de 85 rpm.

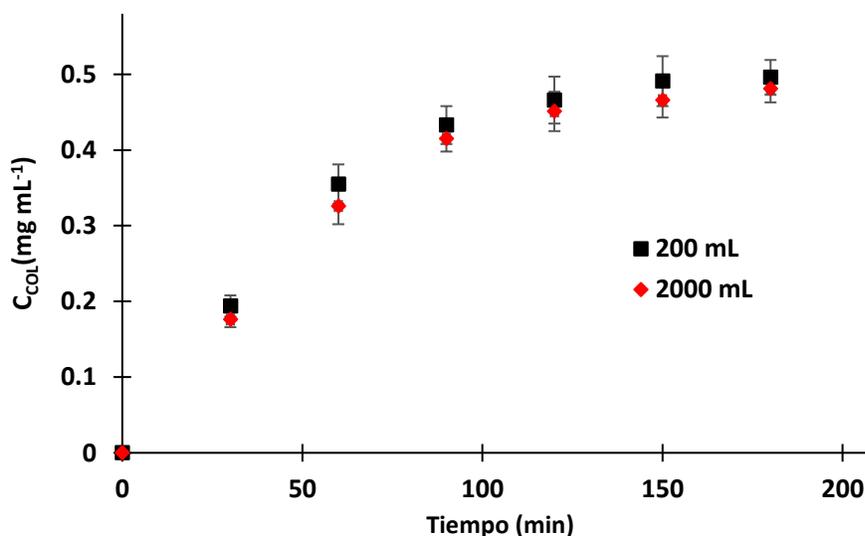


Figura 22. Escalado de la extracción ácida en el punto óptimo ($T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ $C_{AC} = 0.787\text{ M}$ y $R' = 40\text{ mL/g}$)

En la **Figura 22** se muestra la evolución de C_{COL} en el punto óptimo ($T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $C_{AC} = 0.787\text{ M}$ y $R' = 40\text{ mL g}^{-1}$) para la extracción ácida de CAS. Aunque todos los puntos correspondientes a la escala de 2000 mL presentaron un valor de C_{COL} menor que a 200 mL, los resultados de la evolución de dicha concentración durante las 3h estuvieron muy cercanos con un % de error de desviación promedio del 5.5%.

6.7. Filtración tangencial

En la **Figura 23** se observa el gráfico de J vs. PTM para la calibración de la membrana de 10 kDa con agua desionizada. El factor de correlación (R^2) es muy cercano a 1 indicando que los puntos tienen una buena tendencia lineal. La resistencia hidráulica de esta membrana se estimó mediante la ecuación (65) y resultó ser $1.22 * 10^{13}\text{ m}^{-1}$.

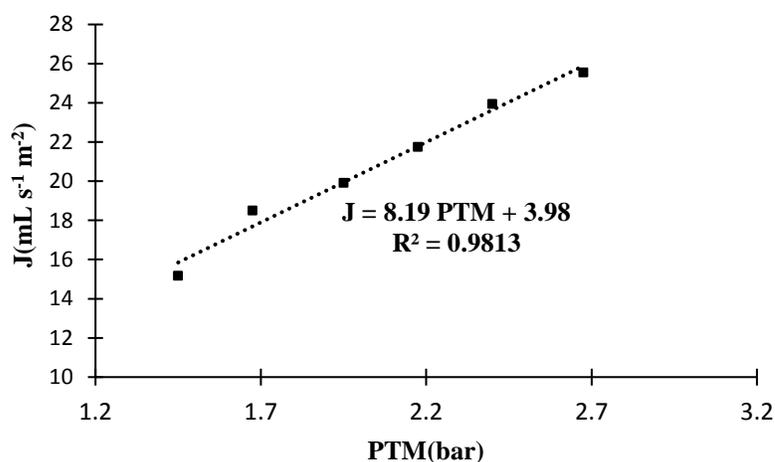


Figura 23. Calibración de la membrana de 10 kDa

En la **Figura 24** se observa el gráfico de J vs. PTM para la calibración de la membrana nueva de 50 kDa con agua desionizada. El factor de correlación (R^2) es muy cercano a 1 indicando que los puntos tienen una buena tendencia lineal. La resistencia hidráulica de esta membrana se estimó con la ecuación (65) y resultó ser $2.45 * 10^{12}\text{ m}^{-1}$. Al comparar las resistencias de ambas membranas, se obtuvo que la de 50 kDa fue la quinta parte de la de 10 kDa como era de esperar, pues a mayor tamaño de poro, la fase líquida cruza más fácil a través de los poros.

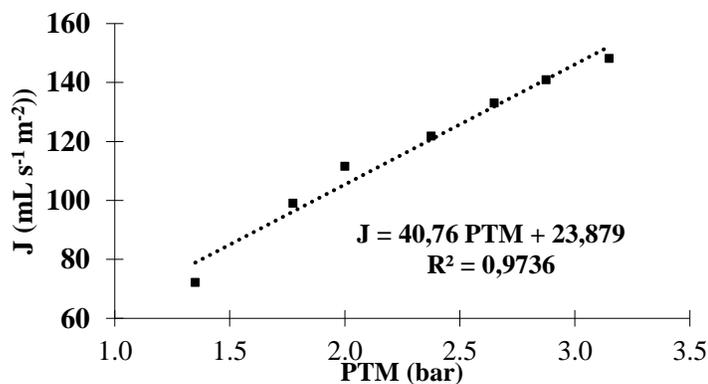


Figura 24. Calibración de la membrana de 50 kDa

6.7.1. Filtración del extracto ácido a través de la membrana de 10 kDa

La **Figura 25** muestra la variación del flux de permeado en función del tiempo, para la filtración tangencial de 500 g de extracto ácido de colágeno (obtenido a las condiciones óptimas de la extracción ácida) mediante la membrana de 10 kDa para obtener 125 g de concentrado y aumentar la concentración de colágeno en un factor de 4.

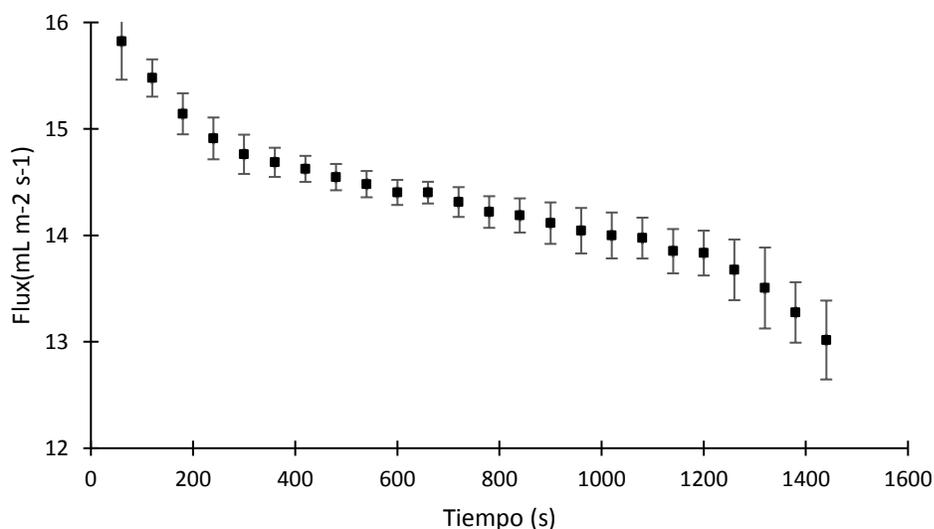


Figura 25. Filtración tangencial de 500 g de extracto ácido de colágeno a las condiciones óptimas ($T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $C_{AC} = 0.783\text{M}$ y $R' = 40$) con membrana de 10 kDa hasta 125 g de concentrado a una PTM de 2 bar.

En la figura anterior se observa como el flux de permeado disminuye en el tiempo con la misma tendencia durante los primeros 20 min del proceso y luego dicho flux cae más bruscamente

posiblemente debido a que el mecanismo que controla la filtración cambia (Mondal y De, 2010). El pH inicial del extracto ácido de colágeno fue de 2.57 ± 0.08 y al finalizar la filtración fue de 2.42 ± 0.10 .

Con el fin de observar más claramente el punto donde posiblemente ocurrió el cambio del mecanismo controlante, en la **Figura 26** se muestra el gráfico de $\ln J$ vs. $\ln V$ y se puede observar que inicialmente los puntos muestran cierta tendencia lineal con pendiente negativa y al final dicha pendiente se vuelve más negativa, indicando que el flux disminuye bruscamente. Lo anterior puede ser debido a que inicialmente los poros de la membrana se empiezan a bloquear (bloqueo de poro) y provocan que el flux vaya disminuyendo debido al taponamiento parcial pero cuando la cantidad de poros taponados es muy grande, se comienza a formar una torta que provoca una disminución más notable en la cantidad del permeado obtenido (Iritani y Katagiri, 2016). Dicha disminución de J también se da debido a que a medida que el retenido se va concentrando, su viscosidad va aumentando, provocando que la resistencia se aumente demasiado y por lo tanto el flux sea muy bajo.

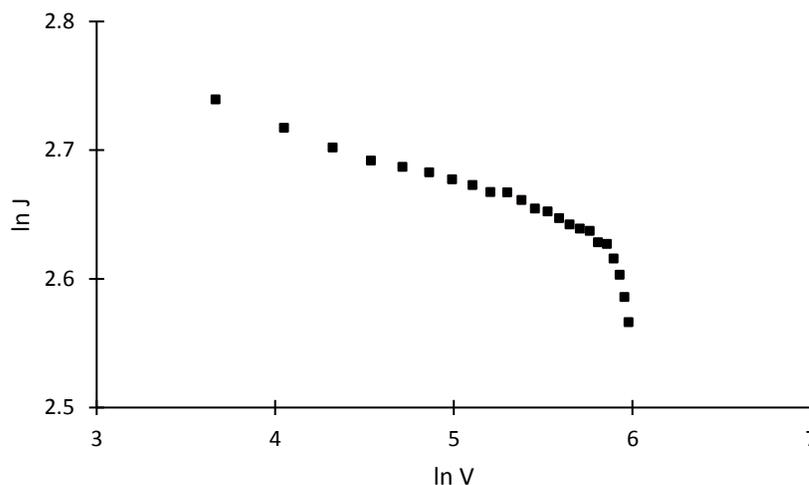


Figura 26. Filtración tangencial de 500 g de extracto ácido de colágeno en membrana de 10 kDa hasta 125 g de concentrado a una PTM de 2 bar

Debido a que el pH del extracto de colágeno concentrado (retenido) fue demasiado bajo, se realizó una diafiltración que permitió obtener un retenido con un pH mayor y al mismo tiempo prevenir la formación de la torta y el aumento de la viscosidad. En la **Figura 27** se muestra el comportamiento J durante la diafiltración de los 125 g de retenido obtenido en la filtración del

extracto ácido de colágeno hasta obtener 1250 g de permeado que corresponde a 10 veces la masa de retenido inicial. Se puede observar que J disminuye bastante al principio del proceso y luego tiende a estabilizarse. Lo anterior se debe posiblemente a que al principio del proceso, cuando aún no se ha agregado mucha cantidad de agua, el retenido tiene alta viscosidad y esto provoca que el flux caiga inicialmente, pero a medida que el agua se va incorporando, la viscosidad comienza a disminuir provocando que la resistencia sea menor y que los valor de J se estabilicen (Iritani y Katagiri, 2016). En la **Figura 27** también se puede observar como el pH del retenido va aumentando a medida que avanza la diafiltración hasta alcanzar un valor final de 3.4, el cual cumple con la norma técnica colombiana (NTC) 3750 (Serrano-Gaona, 2011).

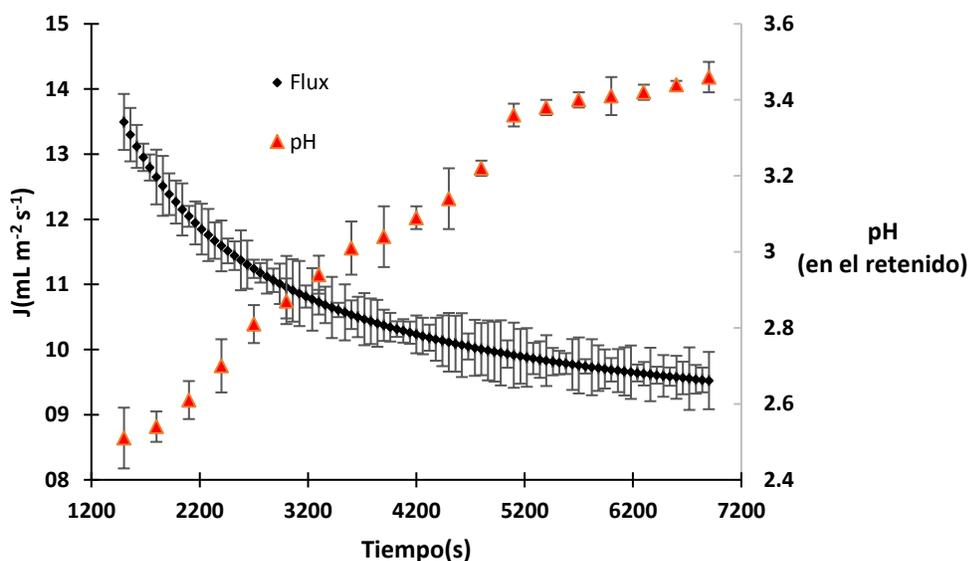


Figura 27. Diafiltración de 125 g de concentrado en membrana de 10 kDa a PTM de 2 bar agregando agua hasta 1250 g

En la **Figura 28** se muestra el gráfico de $\ln J$ vs. $\ln V$ y se puede observar que no hay un punto donde la pendiente de la curva decrezca bruscamente y se concluyó entonces que en la diafiltración solo ocurre el bloqueo de poro y no se da la formación de torta (Mondal y De, 2010).

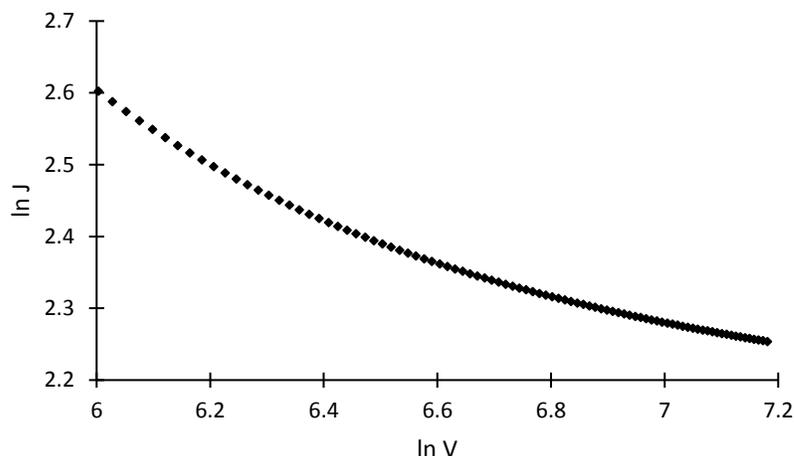


Figura 28. Diafiltración de 125 g de concentrado en membrana de 10 kDa a PTM de 2 bar hasta obtener 1250 g de permeado.

6.7.2. Modelado de la filtración en la membrana de 50 kDa.

Debido a que la resistencia de la membrana de 50 kDa es 5 veces menor que la de 10 kDa, se hicieron filtraciones con la membrana de mayor tamaño con el fin tener mayores flujos de permeado los cuales al ser analizados no mostraron presencia de colágeno. En la **Figura 29** se muestran los valores de J para las cuatro diferentes PTM a las que se realizaron las filtraciones de 300 g de extracto ácido de colágeno en la membrana de 50 kDa para aumentar su concentración en un factor de 10. Al comparar estos resultados con los obtenidos en la membrana de 10 kDa, se puede observar que en los experimentos realizados con la membrana de 50 kDa se presentó una disminución menos pronunciada del flux de permeado al final del proceso y que se pudo obtener un mayor grado de concentración del extracto ácido. Se puede observar además el efecto directo que tiene la PTM sobre J , lo que es lógico pues dicho parámetro es la fuerza impulsora del proceso (Iritani y Katagiri, 2016). En la **Figura 29** se incluye también las curvas generadas con el modelo que permitió hacer la predicción de los datos experimentales de la filtración y se puede observar que la bondad de ajuste fue mejor para los datos a bajas PTM como se corrobora más adelante.

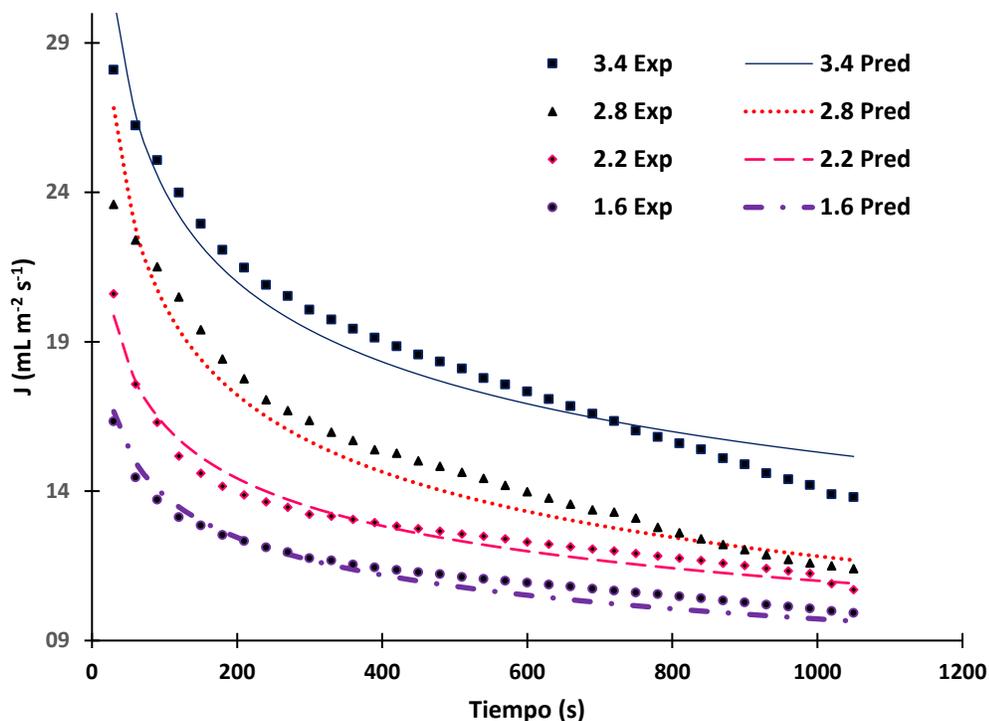


Figura 29. Filtración de 300 g del extracto ácido de colágeno en la membrana de 50 kDa a diferentes PTM para aumentar su concentración en un factor de 10.

En la **Tabla 27** se muestran los valores de los parámetros del modelo (Ecuación (30)) que permitió predecir los datos experimentales de la filtración del extracto ácido en la membrana de 50 kDa a diferentes PTM. En cuanto al flujo inicial (J_0) y el flujo a t_1 (J_{t_1}) se puede observar que variaron directamente proporcional con la PTM, lo que es lógico, ya que la PTM es la fuerza que provoca el proceso de filtración y mientras mayor sea dicho parámetro, mayores serán los flujos de permeado durante todo el proceso (Iritani y Katagiri, 2016). En cuanto al parámetro b , el cual está asociado con la velocidad de ensuciamiento de membrana, se observa que disminuyó a medida que PTM disminuía al igual que k_r . Los valores de b y k_r estuvieron en un orden de magnitud similar a los reportados para diferentes proteínas (alfa-lacto albumina, beta-globulina y albumina) a PTM similares (Merin y Cheryan, 1980). El valor de t_1 resultó ser inversamente proporcional a PTM, lo que tiene sentido, pues mientras mayor sea el flujo de permeado la velocidad de bloqueo es mayor y la formación de la torta se iniciará más pronto (Mondal y De, 2010), provocando que la $R_{BIP\ max}^*$ aumente y de aquí que los valores de este último parámetro variaran directamente con la PTM como se puede observar en la **Tabla 27**. En esta tabla se incluyen además los valores de RMSD para determinar la bondad de ajuste del modelo para cada una de las cuatro PTM evaluadas

y el resultado es coherente con lo que se observó gráficamente, mostrando que los datos predichos se aproximaron más a los experimentales a bajas PTM que reportaron los menores valores para dicho parámetro.

Tabla 27. Parámetros del modelo de filtración

Parámetro	PTM (bar)			
	3.40	2.80	2.20	1.60
J_0 (mL m ⁻² s ⁻¹)	56.36	47.38	31.11	22.12
K_r	1.23	1.12	0.70	0.56
b	0.30	0.24	0.20	0.18
t_1 (min)	11.00	12.50	15.00	17.00
J_{11} (mL m ⁻² s ⁻¹)	17.10	13.94	11.54	9.85
$R^*_{BIP\ max}$	2.42	2.40	1.70	1.25
RMSD	0.15	0.12	0.05	0.05

Diafiltración en la membrana de 50 kDa

En la **Figura 30** se muestra el gráfico de $\ln J$ vs. $\ln V$ para la diafiltración de 900 g de extracto ácido de colágeno hasta obtener 900 g de permeado. La figura tiene forma concava hacia arriba lo que tiene sentido, ya que inicialmente, cuando se ha agregado poca cantidad de agua, J comienza a decrecer suavemente debido a que la cantidad de poros abiertos disminuye por el bloqueo de los mismos lo que también provoca un aumento en la viscosidad del retenido, pero cuando la cantidad de agua agregada es mayor, la viscosidad disminuye y el flux a través de los poros se tiende a estabilizar y al final cuando la cantidad de agua adicionada al sistema es mucho mayor, provoca un aumento relativo de J como se puede ver en la figura (Iritani y Katagiri, 2016).

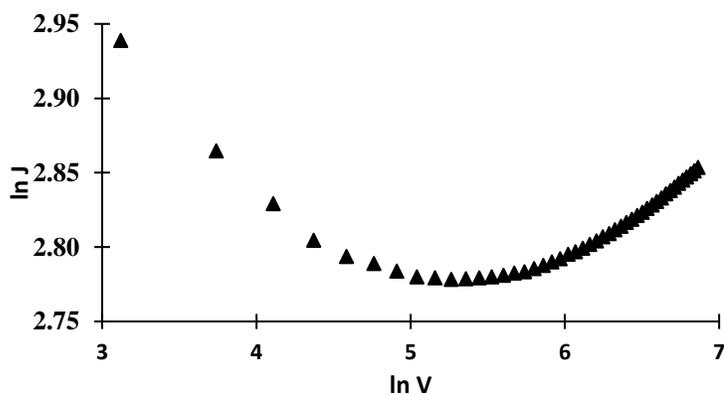


Figura 30. Diafiltración de 900 g de retenido de colágeno en la membrana de 50 kDa hasta obtener 900 g de permeado a una PTM de 2.5 bar

En la **Figura 31** se muestra el gráfico de $\ln J$ vs. $\ln V$ para la filtración de los 900 g del colágeno diafiltrado con el fin de aumentar su concentración 10 veces. El gráfico muestra que el flux de permeado disminuye muy lentamente al principio del proceso y se puede visualizar el punto donde dicho flux cae bruscamente debido a la formación de la torta (Mondal y De, 2010).

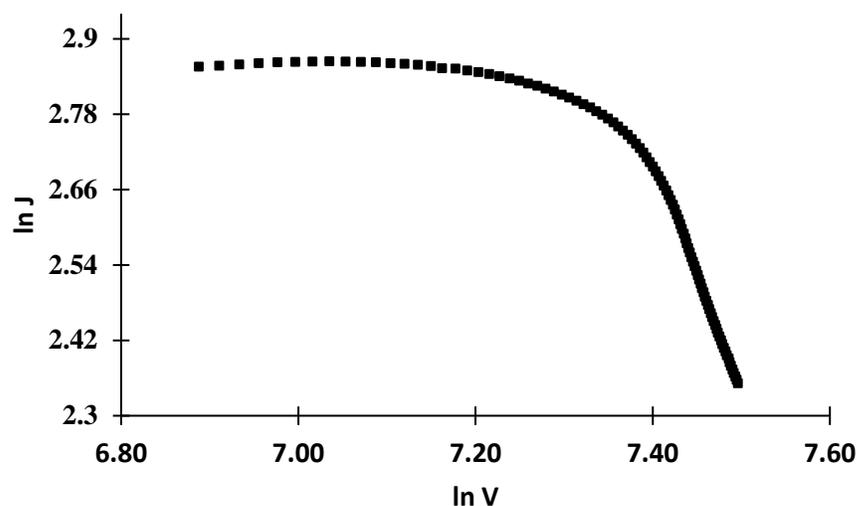


Figura 31. Filtración de 900 g del retenido obtenido de la diafiltración en la membrana de 50 kDa hasta 90 g.

6.8. Liofilización y caracterización del colágeno

6.8.1. Liofilización

En la **Imagen 15** se puede observar el colágeno liofilizado que se obtuvo de la filtración y de la diafiltración tangencial en la membrana de 50 kDa (a la izquierda filtrado a la derecha diafiltrado) el cual, en ambos casos, presentó una consistencia suave y espumosa. El liofilizado obtenido a partir de la filtración mostró un color amarilloso asociado posiblemente a la presencia del ácido acético mientras que el diafiltrado dio un color blanco ya que en esta operación se eliminó gran parte del ácido, como se puede corroborar en la **Figura 27** donde se muestra que el pH del diafiltrado es menos ácido y cumple con el límite mínimo de la norma técnica colombiana NTC 3750 (ICONTEC, 2002) la cual establece un rango de pH entre 3 y 4 para el colágeno ácido soluble. La masa de colágeno liofilizado en promedio fue del $1.55 \% \pm 0.075$ de la masa de extracto ácido (retenido) alimentada al liofilizador.



Imagen 15. Colágeno liofilizado: A la izquierda filtrado y a la derecha diafiltrado.

6.8.2. SDS-PAGE

En la **Imagen 16** se puede observar el SDS-PAGE para el colágeno (liofilizado) extraído a las condiciones óptimas ($T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $C_{AC} = 0.783\text{ M}$ y $R' = 40\text{ mL g}^{-1}$) y concentrado por filtración tangencial (A) y por diafiltración (B). Se puede observar que para ambos casos hay una banda muy gruesa que recorre pesos moleculares entre 125 y 135 kDa para el CAS filtrado y entre 115 y 140 kDa para el diafiltrado y no se pudo distinguir la cadena $\alpha 1$ cuyo peso molecular reportado en trabajos sobre extracción de colágeno a partir de PTN de 117 kDa (Potaros et al., 2009) y 135 kDa (Zhang et al., 2016) de la cadena $\alpha 2$ cuyo peso molecular se reporta alrededor de 114 kDa (Sun et al., 2017) y 125 kDa (Zhang et al., 2016). Lo anterior posiblemente es debido al efecto de la temperatura sobre la estructura helicoidal del colágeno (Chen et al., 2016).

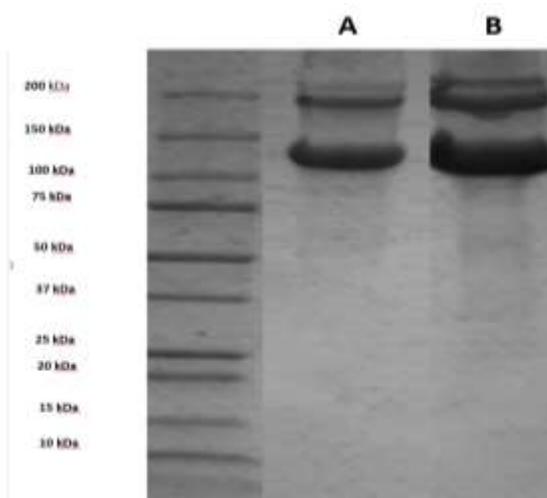


Imagen 16. Electroforesis (SDS-PAGE) del colágeno extraído a las condiciones óptimas. A: filtrado, B: diafiltrado.

Se observan además otras 2 bandas alrededor de los 200 kDa que corresponden a la cadena tipo β , aunque los valores reportados para esta cadena están por encima de 220 kDa (Potaros et al., 2009) esta diferencia se puede deber al daño térmico ya mencionado.

6.8.3. FTIR

En la **Figura 32** se muestra el espectro obtenido para el coageno liofilizado y se observan los picos característicos (las absorbancias máximas) en la región de las amidas (A, B, I, II, III). Los picos correspondientes a las amidas A y I se encontraron a 3305 y 1632 cm^{-1} , respectivamente, mientras que los correspondientes a la amida B, II y III se encontraron a 2923 , 1554 y 1239 cm^{-1} , respectivamente.

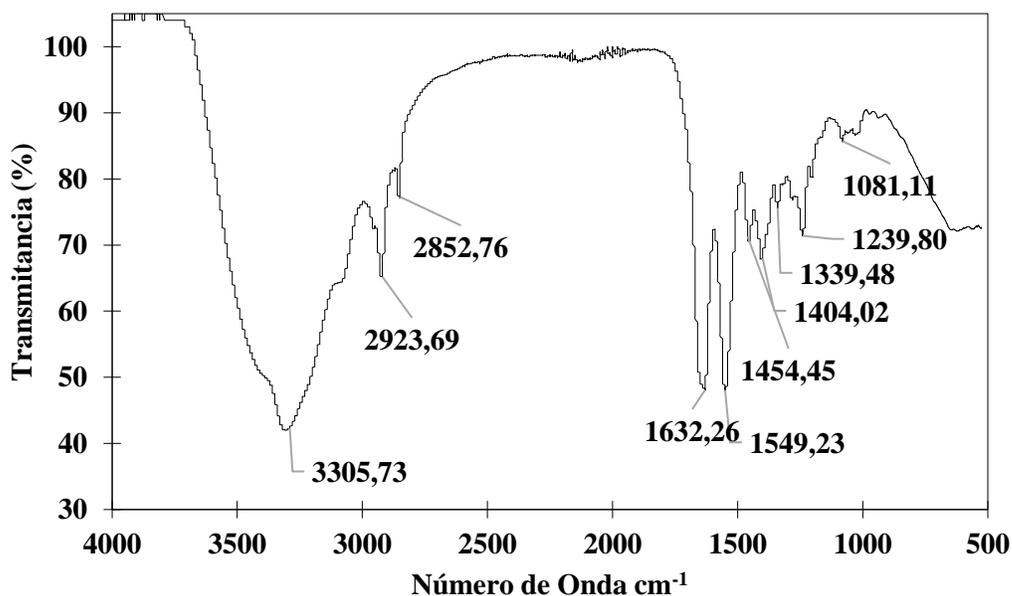


Figura 32. ATR-FTIR Análisis del colágeno ácido soluble liofilizado extraído a partir de PTN.

Los anteriores picos son típicos del colágeno tipo I (Chen et al., 2016; Huang et al., 2016; Zhang et al., 2016).

6.8.4. SEM

Las fotografías SEM para dieferentes ampliaciones que se muestra en la **Imagen 17**. Muestra una estructura filamentosa irregular, rayada y no porosa, que es típica del colágemno Tpo I. (Li et al., 2018) el cual tiene diferentes aplicaciones en Farmacia y alimentos.

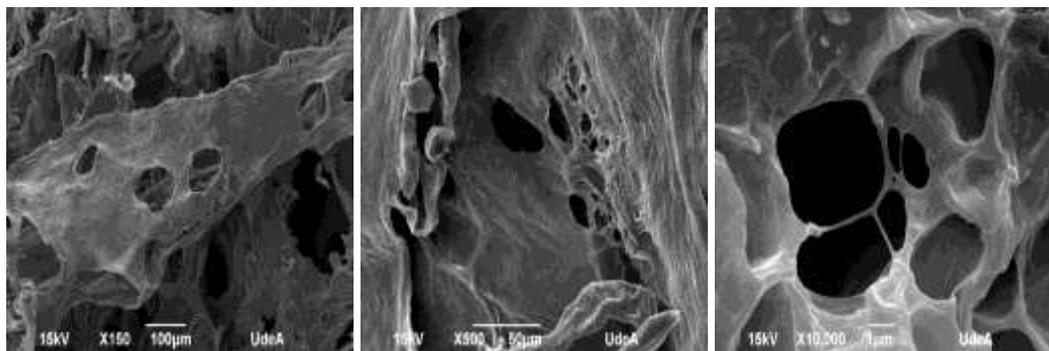


Imagen 17. Micrografías SEM del colágeno extraído a partir de PTN

Conclusiones

El mejor subproducto resultó ser la PTN con un rendimiento porcentual del 20.20%, mientras que la EDR y EDT presentaron valores del 14.92% y 4.36%, respectivamente. Los tiempos de operación de las etapas del pretratamiento alcalino determinados resultaron ser diferentes (5, 6 y 7 h). Asimismo, la concentración de la base empleada disminuyó de etapa a etapa del pretratamiento (0.73, 0.474 y 0.218 M). Las condiciones optimas de la primera extracción básica fueron $C_b = 0.73$, $T = 10$ °C y $L = 1$ cm. En la segunda extracción fueron $C_b = 0.474$ M y $T = 17$ °C. Para los datos arrojados por el diseño factorial de la primera extracción alcalina, el modelo que mostró la mejor capacidad de predicción fue el MSO cuyos valores de R^2 para cada tratamiento del DF fueron prácticamante iguales a la unidad. El modelo general para estimar la C_{PNC} , desarrollado con base en el MSO, predijo datos experimentales del DF con MAPE del 4.35% mientras que en la predicción de datos correspondientes a condiciones por fuera del diseño, registró un MAPE del 4.08%. En el diseño central compuesto, el mejor fue el MDS mostrando el menor valor de RMSD (0.0012 - 0.025) en 14 de los 20 tratamientos. Para la segunda extracción alcalina, el mejor modelo fue el MSO. Por otro lado, el modelo fenomenológico presentó una buena bondad

de ajuste de los datos de la primera extracción alcalina con valores de RMSD que variaron entre 0.002 y 0.05.

Las condiciones óptimas de operación de la extracción ácida de colágeno fueron $C_{Ac} = 0.787 \text{ M}$, $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ y $R' = 40 \text{ mL g}^{-1}$ a las que se pudo obtener $ECOL_3$ de 85.3%. Para esta etapa el mejor modelo fue el MDS que presentó el menor valor de RMSD (0.001-0.008) para 13 de los 20 tratamientos. La concentración de ácido tuvo un efecto negativo sobre el porcentaje de rendimiento de extracción del colágeno a los niveles más altos, dependiendo de la temperatura de operación.

El colágeno obtenido, el cual fue concentrado mediante filtración tangencial, presentó propiedades similares al obtenido por métodos convencionales, pero tuvo la ventaja de evitar la implementación de etapas como la precipitación con sal, la redisolución ácida y la diálisis. Además, la diafiltración permitió obtener un colágeno con menor acidez ($\text{pH} = 3.5$) cumpliendo los requerimientos de la norma técnica colombiana. El modelo propuesto permitió reproducir los datos experimentales para cuatro PTM diferentes, con bondades de ajuste aceptables para un modelo tan simple (RMSD entre 0.05 y 0.15). Adicionalmente, el análisis gráfico del proceso permitió reconocer los dos mecanismos de ensuciamiento de la membrana, el bloqueo de poro, al principio del proceso y la formación de torta al final. También, se pudo determinar que el colágeno obtenido mediante diafiltración, tuvo mejor apariencia física que el obtenido por filtración, el cual resultó ser más amarillento debido a la gran cantidad de ácido acético remanente en el producto final. La diafiltración tuvo la ventaja adicional de evitar el ensuciamiento temprano de la membrana. La filtración tiene la ventaja de que el permeado obtenido es una solución de ácido acético que puede ser reutilizada en la etapa de extracción ácida. Finalmente mediante los análisis FTIR, SDS-PAGE y SEM, se pudo concluir que el colágeno liofilizado obtenido resultó ser tipo I, el cual tiene aplicaciones en el campo farmacéutico y alimentario.

Trabajo futuro en el contexto Colombiano

Con el fin de disminuir el impacto ambiental que provocarían los desechos químicos que se generan en el proceso de extracción de colágeno a partir de PTN, sería interesante utilizar un sistema de membranas de filtración tangencial para recuperar la solución básica, empleada para la extracción de proteína no colagenada con el fin de reutilizarla, ya que se disminuirían los costos y

se evitaría el desecho de dicho residuo químico y simultáneamente, investigar la posible aplicación de la PNC (que quedaría en el retenido) en el campo farmacéutico y alimentario. De igual forma se podría estudiar el proceso de desproteínización alcalina en continuo e implementar diseños experimentales que involucren variables económicas que sirvan como herramienta de predicción de factibilidad de dicho proceso. Lo anterior podría ser de ayuda para la planificación y diseño de los procesos de obtención de colágeno a partir de subproductos de pescado, a gran escala, en un país como Colombia donde la producción piscícola se ha incrementado de manera importante en los últimos años. Adicionalmente se podrían proponer procesos de filtración en continuo que utilicen membranas que funcionen en paralelo con el fin de alternar para hacer el lavado de la misma.

7. REFERENCIAS

- Acosta-Villota, G. (2017). *Detección del genotipo sexual en neohembras de tilapia roja (oreochromis sp.) mediante citogenética clásica y molecular en el valle del cauca.*
- Ahmad, M., & Benjakul, S. (2010). Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*). *Food Chemistry*, *120*(3), 817–824. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.019>
- Ahmed, R., Getachew, A. T., Cho, Y. J., & Chun, B. S. (2018). Application of bacterial collagenolytic proteases for the extraction of type I collagen from the skin of bigeye tuna (*Thunnus obesus*). *LWT - Food Science and Technology*, *89*(May 2017), 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.024>
- Akter, S., Sheikh, B., Rahman, M., Bhowmik, S., Alam, N., Rahman, M. A., & Alam, A. N. (2016). *Assessment of Fishery Wastes and Suitability of Its Utilization in the Manufacture of Fish Glue* . *6*(3), 77–81. <https://doi.org/10.5251/ajfn.2016.6.3.77.81>
- Ali, A. M. M., Kishimura, H., & Benjakul, S. (2018). Extraction efficiency and characteristics of acid and pepsin soluble collagens from the skin of golden carp (*Probarbus Jullieni*) as affected by ultrasonication. *Process Biochemistry*, *66*(December 2017), 237–244. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.01.003>
- Alvarez, H., Lamanna, R., Vega, P., & Revollar, S. (2009). Metodología para la Obtención de Modelos Semifísicos de Base Fenomenológica Aplicada a una Sulfitadora de Jugo de Caña de Azúcar. *Revista Iberoamericana de Automática e Informática Industrial RIAI*, *6*(3), 10–20. [https://doi.org/10.1016/S1697-7912\(09\)70260-2](https://doi.org/10.1016/S1697-7912(09)70260-2)
- AOAC. (2003a). Ash in meat and meat products, Method 920.153. En *Official Methods of Analysis* (17a ed.). AOAC International Publisher.
- AOAC. (2003b). Fat in meat and meat products, Method 960.39B. En *Official Methods of Analysis* (17a ed.). AOAC International Publisher.
- AOAC. (2003c). Moisture in meat and meat products , Method 950.46B. En *Official Methods of Analysis* (17a ed.). AOAC International Publisher.
- AOAC. (2003d). Total nitrogen, Method 981.10. En *Official Methods of Analysis* (17a ed.). AOAC International Publisher.

- Arumugam, G. K. S., Sharma, D., Balakrishnan, R. M., & Ettiyappan, J. B. P. (2018). Extraction, optimization and characterization of collagen from sole fish skin. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 9(March), 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2018.04.003>
- Bhagwat, P. K., & Dandge, P. B. (2016). Isolation, characterization and valorizable applications of fish scale collagen in food and agriculture industries. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7, 234–240. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.06.010>
- Bhumbar, M. V., Bhagwat, P. K., & Dandge, P. B. (2019). Extraction and characterization of acid soluble collagen from fish waste: Development of collagen-chitosan blend as food packaging film. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7(2), 102983. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.102983>
- Blanco, M., Vázquez, J. A., Pérez-Martín, R. I., & Sotelo, C. G. (2019). Collagen extraction optimization from the skin of the small-spotted catshark (*S. Canicula*) by response surface methodology. *Marine Drugs*, 17(1), 1–14. <https://doi.org/10.3390/md17010040>
- Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Bilić, M., & Velić, D. (2007). Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 236–242. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.027>
- Bucić-Kojić, A., Sovová, H., Planinić, M., & Tomas, S. (2013). Temperature-dependent kinetics of grape seed phenolic compounds extraction: Experiment and model. *Food Chemistry*, 136(3–4), 1136–1140. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.087>
- Castillo-Campos, L. F. (2011). *Tilapia roja 2011: una evolucion de 29 años, de la incertidumbre al exito*. Editorial académica española.
- Castillo-Santos, K., Ruiz-López, I. I., Rodríguez-Jimenes, G. C., Carrillo-Ahumada, J., & García-Alvarado, M. A. (2017). Analysis of mass transfer equations during solid-liquid extraction and its application for vanilla extraction kinetics modeling. *Journal of Food Engineering*, 192, 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.07.020>
- Cengel, Y. A., & Cimbala, J. M. (2006). *Mecánica de Fluidos: Fundamentos y Aplicaciones* (Mc Graw Hill (ed.)).
- Chan, C. H., Yusoff, R., & Ngoh, G. C. (2014). Modeling and kinetics study of conventional and assisted batch solvent extraction. *Chemical Engineering Research and Design*, 92(6), 1169–1186. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2013.10.001>
- Chen, J., Li, L., Yi, R., Xu, N., Gao, R., & Hong, B. (2016). Extraction and characterization of

- acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *LWT - Food Science and Technology*, *66*, 453–459. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.070>
- Chen, S., Chen, H., Xie, Q., Hong, B., Chen, J., Hua, F., Bai, K., He, J., Yi, R., & Wu, H. (2016). Rapid isolation of high purity pepsin-soluble type I collagen from scales of red drum fish (*Sciaenops ocellatus*). *Food Hydrocolloids*, *52*, 468–477. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.07.027>
- Chuaychan, S., Benjakul, S., & Kishimura, H. (2015). Characteristics of acid- and pepsin-soluble collagens from scale of seabass (*Lates calcarifer*). *LWT - Food Science and Technology*, *63*(1), 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.002>
- Crank, J. (1979). *The Mathematics of diffusion* (Segunda). Oxford Science Publications.
- Da Silva, C. M. L., Spinelli, E., & Rodrigues, S. V. (2015). Fast and sensitive collagen quantification by alkaline hydrolysis/hydroxyproline assay. *Food Chemistry*, *173*, 619–623. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.073>
- Devlin, T. M. (2006). *Bioquímica* (Cuarta). EDITORIAL REVERTÉ, S.A.
- El-Rashidy, A. A., Gad, A., Abu-Hussein, A. E. H. G., Habib, S. I., Badr, N. A., & Hashem, A. A. (2015). Chemical and biological evaluation of Egyptian Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish scale collagen. *International Journal of Biological Macromolecules*, *79*, 618–626. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.05.019>
- Espinoza-Pérez, J. D., Vargas, A., Robles-Olvera, V. J., Rodríguez-Jimenes, G. C., & García-Alvarado, M. A. (2007). Mathematical modeling of caffeine kinetic during solidliquid extraction of coffee beans. *Journal of Food Engineering*, *81*(72).
- FAO. (2018). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible*. <http://www.fao.org/3/I9540ES/i9540es.pdf>
- Feduchi, H., Blasco, I., Romero, C., & Yáñez, E. (2010). *Bioquímica* (Primera). EDITORIAL MEDICA PANAMEROICANA S.A.
- Freeman, H. J., Kim, Y. S., & Sleisenger, M. H. (2004). Protein digestion and absorption in man. *The American Journal of Medicine*, *67*(6), 1030–1036. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(79\)90645-4](https://doi.org/10.1016/0002-9343(79)90645-4)
- Grasso, V. (2013). Estudios para la extracción de aceites vegetales con pretratamiento enzimático en un extractor columna. *2013, GRASAS Y ACEITES*, 194.
- Gunst, R. F., Myers, R. H., & Montgomery, D. C. (2006). Response Surface Methodology: Process

- and Product Optimization Using Designed Experiments. En *Technometrics* (Vol. 38, Número 3). <https://doi.org/10.2307/1270613>
- Huang, C.-Y., Kuo, J.-M., Wu, S.-J., & Tsai, H.-T. (2016). Isolation and characterization of fish scale collagen from tilapia (*Oreochromis* sp.) by a novel extrusion–hydro-extraction process. *Food Chemistry*, *190*, 997–1006. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.066>
- ICONTEC. (2002). *NTC 3750. Productos para a industria cosmetica. Colageno soluble.*
- Iritani, E., & Katagiri, N. (2016). Developments of blocking filtration model in membrane filtration. *KONA Powder and Particle Journal*, *2016(33)*, 179–202. <https://doi.org/10.14356/kona.2016024>
- Islam, M. N., Jo, Y. T., Jung, S. K., & Park, J. H. (2013). Thermodynamic and kinetic study for subcritical water extraction of PAHs. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, *19(1)*, 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2012.07.014>
- Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., & Tanaka, M. (2005). Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of Brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *Food Chemistry*, *93(3)*, 475–484. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.026>
- Khong, N. M. H., Yusoff, F. M., Jamilah, B., Basri, M., Maznah, I., Chan, K. W., Armania, N., & Nishikawa, J. (2018). Improved collagen extraction from jellyfish (*Acromitus hardenbergi*) with increased physical-induced solubilization processes. *Food Chemistry*, *251*(December 2017), 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.12.083>
- Kiew, P. L., & Mashitah, M. D. (2012). Collagen Extraction from Malaysian Cultured Catfish (Hybrid *Clarias* Sp.): Kinetics and Optimization of Extraction Conditions Using Response Surface Methodology. *ISRN Chemical Engineering*, *2012*, 1–10. <https://doi.org/10.5402/2012/835391>
- Kiew, P. L., & Mashitah, M. D. (2013). Screening and empirical kinetic models of collagen extraction from selected Malaysian freshwater fish. *Journal of Food Process Engineering*, *36(4)*, 428–438. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2012.00683.x>
- Kiew, P. L., Mashitah, M. D., & Ahmad, Z. (2014). Kinetics and modeling of pepsin soluble collagen (PSC) extraction from the skin of malaysian catfish (Hybrid *Clarias* sp.). *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, *57(1)*, 53–66.

<https://doi.org/10.1007/s13765-013-4176-4>

- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., & Tanaka, M. (2005). Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*, *89*(3), 363–372. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.042>
- Krishnamoorthi, J., Ramasamy, P., Shanmugam, V., & Shanmugam, A. (2017). Isolation and partial characterization of collagen from outer skin of *Sepia pharaonis* (Ehrenberg, 1831) from Puducherry coast. *Biochemistry and Biophysics Reports*, *10*(September 2016), 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.02.006>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*, 680–685.
- Lambert, R. J. W., Mytilinaios, I., Maitland, L., & Brown, A. M. (2012). Monte Carlo simulation of parameter confidence intervals for non-linear regression analysis of biological data using Microsoft Excel. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, *107*(2), 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2011.05.009>
- Leikina, E., Mertts, M. V., Kuznetsova, N., & Leikin, S. (2002). Type I collagen is thermally unstable at body temperature. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(3), 1314–1318. <https://doi.org/10.1073/pnas.032307099>
- Leonhardt, J. (1996). Efeito da reversão sexual em tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1757). *Aleph*.
- Li, J., Wang, M., Qiao, Y., Tian, Y., Liu, J., Qin, S., & Wu, W. (2018). Extraction and characterization of type I collagen from skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its potential application in biomedical scaffold material for tissue engineering. *Process Biochemistry*, *74*(July), 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.07.009>
- Li, Z. R., Wang, B., Chi, C. feng, Zhang, Q. H., Gong, Y. dan, Tang, J. J., Luo, H. yu, & Ding, G. fang. (2013). Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin and bone of Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*). *Food Hydrocolloids*, *31*(1), 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.10.001>
- Liang, Q., Wang, L., Sun, W., Wang, Z., Xu, J., & Ma, H. (2014). Isolation and characterization of collagen from the cartilage of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). *Process Biochemistry*, *49*(2), 318–323. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.12.003>
- Lin, Y., Lin, T., & Su, H. (2011). Extraction and characterisation of telopeptide-poor collagen

- from porcine lung. *Food Chemistry*, *124*(4), 1583–1588.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.018>
- Liu, D., Liang, L., Regenstein, J. M., & Zhou, P. (2012). Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). *Food Chemistry*, *133*(4), 1441–1448.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.032>
- Liu, D., Wei, G., Li, T., Hu, J., Lu, N., Regenstein, J. M., & Zhou, P. (2015). Effects of alkaline pretreatments and acid extraction conditions on the acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Food Chemistry*, *172*, 836–843.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.147>
- Liu, D., Zhang, X., Li, T., Yang, H., Zhang, H., Regenstein, J. M., & Zhou, P. (2015). Extraction and characterization of acid- and pepsin-soluble collagens from the scales, skins and swim-bladders of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Food Bioscience*, *9*, 68–74.
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2014.12.004>
- Liu, D., Zhou, P., Li, T., & Regenstein, J. M. (2014). Comparison of acid-soluble collagens from the skins and scales of four carp species. *Food Hydrocolloids*, *41*, 290–297.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.04.030>
- Liu, W., Tian, Z., Li, C., & Li, G. (2014). Thermal denaturation of fish collagen in solution: A calorimetric and kinetic analysis. *Thermochimica Acta*, *581*, 32–40.
<https://doi.org/10.1016/j.tca.2014.02.012>
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, L., & Randall, R. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, *193*, 265–275.
- Martínez-Ortiz, M. A., Hernández-Fuentes, A. D., Pimentel-González, D. J., Campos-Montiel, R. G., Vargas-Torres, A., & Aguirre-Álvarez, G. (2015). Extraction and characterization of collagen from rabbit skin: PARTIAL characterization. *CYTA - Journal of Food*, *13*(2), 253–258.
<https://doi.org/10.1080/19476337.2014.946451>
- Mathews, C. K., & Ahern, K. G. (2002). *Bioquímica*. Pearson Education.
- Matmaroh, K., Benjakul, S., Prodpran, T., Encarnacion, A. B., & Kishimura, H. (2011). Characteristics of acid soluble collagen and pepsin soluble collagen from scale of spotted golden goatfish (*Parupeneus heptacanthus*). *Food Chemistry*, *129*(3), 1179–1186.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.099>

- McCabe, W. L., Smith, J. C., & Harriot, P. (2007). *Operaciones Unitarias en Ingeniería Química* (Séptima). Mc Graw Hill.
- Meisenberg, G., & Simmons, W. H. (2018). *Principos de Bioquímica Médica* (Cuarta). ELSEVIER.
- Merin, U., & Cheryan, M. (1980). Factors Affecting the Mechanism of Flux Decline During Ultrafiltration of Cottage Cheese Whey. *Journal of Food Processing and Preservation*, 4(3), 183–198. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.1980.tb00604.x>
- Merino, M. C. (2018). *Acuicultura en colombia*.
- Ministerio de Agricultura. (2017). *Cadena de la Acuicultura 2017*. 1–46.
- Mohammadi, R., Mohammadifar, M. A., Mortazavian, A. M., Rouhi, M., Ghasemi, J. B., & Delshadian, Z. (2016). Extraction optimization of pepsin-soluble collagen from eggshell membrane by response surface methodology (RSM). *Food Chemistry*, 190, 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.073>
- Mondal, S., & De, S. (2010). 2010. *Mondal. Reducción de flujo A fouling model for steady state.pdf*.
- Morimura, S., Nagata, H., Uemura, Y., Fahmi, A., Shigematsu, T., & Kida, K. (2002). Development of an effective process for utilization of collagen from livestock and fish waste. *Process Biochemistry*, 37(12), 1403–1412. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00024-9](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00024-9)
- Muyonga, J. H., Cole, C. G. B., & Duodu, K. G. (2004). Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry*, 85(1), 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.06.006>
- Nagai, T. (2002). Isolation of collagen from fish waste material — skin, bone and fins. *Food Chemistry*, 68(3), 277–281. [https://doi.org/10.1016/s0308-8146\(99\)00188-0](https://doi.org/10.1016/s0308-8146(99)00188-0)
- Nagai, Takeshi, Araki, Y., & Suzuki, N. (2002). Collagen of the skin of ocellate puffer fish (*Takifugu rubripes*). *Food Chemistry*, 78(2), 173–177. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00396-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00396-X)
- Pal, G. K., Nidheesh, T., & Suresh, P. V. (2015). 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.018>
- Pati, F., Adhikari, B., & Dhara, S. (2010). Isolation and characterization of fish scale collagen of

- higher thermal stability. *Bioresource Technology*, 101(10), 3737–3742. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.133>
- Potaros, T., Raksakulthai, N., Runglerdkreangkrai, J., & Worawattanamatekul, W. (2009). Characteristics of collagen from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin isolated by two different methods. *Kasetsart Journal - Natural Science*, 43(3), 584–593.
- Qu, W., Pan, Z., & Ma, H. (2010). Extraction modeling and activities of antioxidants from pomegranate marc. *Journal of Food Engineering*, 99(1), 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.01.020>
- Quintero, J., & Zapata, J. E. (2017). Optimización de la Extracción del Colágeno Soluble en Ácido de Subproductos de Tilapia Roja (*Oreochromis spp*) mediante un Diseño de Superficie de Respuesta. *Información tecnológica*, 28(1), 109–120. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642017000100011>
- Rakotondramasy-Rabesiaka, L., Havet, J. L., Porte, C., & Fauduet, H. (2007). Solid-liquid extraction of protopine from *Fumaria officinalis* L.-Analysis determination, kinetic reaction and model building. *Separation and Purification Technology*, 54(2), 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2006.09.015>
- Rivas-Barragán, S. A. (2017). *Desarrollo de formulación y procesamiento de conserva de tilapia nilótica (Oreochromis niloticus) preenvasada*.
- Roberts, R. J., & Shepherd, C. J. (1974). *Handbook of trout and salmon diseases*. Fishing News.
- Santos, M. H., Silva, R. M., Dumont, V. C., Neves, J. S., Mansur, H. S., & Heneine, L. G. D. (2013). Extraction and characterization of highly purified collagen from bovine pericardium for potential bioengineering applications. *Materials Science and Engineering C*, 33(2), 790–800. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.11.003>
- Senaratne, L. S., Park, P. J., & Kim, S. K. (2006). Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish (*Lagocephalus gloveri*) skin. *Bioresource Technology*, 97(2), 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.02.024>
- Serrano-Gaona, J. C. (2011). *Estandarización de un proceso de extracción de colágeno a partir de los residuos de fileteo de tilapia (Oreochromis sp) y cachama (Piaractus brachyomus) / Standardization of a process for extracting collagen from filleting waste from tilapia (Oreochromis)*. 85.
- Shen, J. nan, Li, D. dan, Jiang, F. yan, Qiu, J. hong, & Gao, C. jie. (2009). Purification and

- concentration of collagen by charged ultrafiltration membrane of hydrophilic polyacrylonitrile blend. *Separation and Purification Technology*, 66(2), 257–262. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2009.01.002>
- Sinthusamran, S., Benjakul, S., & Kishimura, H. (2013). Comparative study on molecular characteristics of acid soluble collagens from skin and swim bladder of seabass (*Lates calcarifer*). *Food Chemistry*, 138(4), 2435–2441. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.136>
- Skierka, E., & Sadowska, M. (2007). The influence of different acids and pepsin on the extractability of collagen from the skin of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Chemistry*, 105(3), 1302–1306. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.030>
- Song, E., Yeon Kim, S., Chun, T., Byun, H. J., & Lee, Y. M. (2006). Collagen scaffolds derived from a marine source and their biocompatibility. *Biomaterials*, 27(15), 2951–2961. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.015>
- Su, C. H., Liu, C. S., Yang, P. C., Syu, K. S., & Chiu, C. C. (2014). Solid-liquid extraction of phycocyanin from *Spirulina platensis*: Kinetic modeling of influential factors. *Separation and Purification Technology*, 123, 64–68. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.12.026>
- Sun, L., Hou, H., Li, B., & Zhang, Y. (2017). Characterization of acid- and pepsin-soluble collagen extracted from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 99, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.057>
- Tabarestani, H. S., Maghsoudlou, Y., Motamedzadegan, A., & Sadeghi Mahoonak, A. R. (2010). Optimization of physico-chemical properties of gelatin extracted from fish skin of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Bioresource Technology*, 101(15), 6207–6214. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.071>
- Treybal, R. E. (1980). *Operaciones de transferencia de masa* (Segunda). McGraw Hill S.A.
- Villamil, O., Vázquez, H., & Solanilla, J. F. (2017). Fish viscera protein hydrolysates: Production, potential applications and functional and bioactive properties. *Food Chemistry*, 224, 160–171. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.057>
- Wang, J., Pei, X., Liu, H., & Zhou, D. (2018). Extraction and characterization of acid-soluble and pepsin-soluble collagen from skin of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 544–550. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.046>

- Wang, Lin, An, X., Yang, F., Xin, Z., Zhao, L., & Hu, Q. (2008). Isolation and characterisation of collagens from the skin, scale and bone of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*). *Food Chemistry*, *108*(2), 616–623. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.017>
- Wang, Lin, Liang, Q., Wang, Z., Xu, J., Liu, Y., & Ma, H. (2014). Preparation and characterisation of type i and v collagens from the skin of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). *Food Chemistry*, *148*, 410–414. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.074>
- Wang, Lingzhao, Yang, B., Wang, R., & Du, X. (2008). Extraction of pepsin-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin using an artificial neural network. *Food Chemistry*, *111*(3), 683–686. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.037>
- Woo, J. W., Yu, S. J., Cho, S. M., Lee, Y. B., & Kim, S. B. (2008). Extraction optimization and properties of collagen from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) dorsal skin. *Food Hydrocolloids*, *22*(5), 879–887. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.04.015>
- Yan, M., & Wang, X. (2018). Study on the kinetic self-assembly of type I collagen from tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin using the fluorescence probe thioflavin T. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *203*, 342–347. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.05.083>
- Yu, D., Chi, C. F., Wang, B., Ding, G. F., & Li, Z. R. (2014). Characterization of acid-and pepsin-soluble collagens from spines and skulls of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Chinese Journal of Natural Medicines*, *12*(9), 712–720. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(14\)60110-2](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(14)60110-2)
- Zelechowska, E., Sadowska, M., & Turk, M. (2010). Isolation and some properties of collagen from the backbone of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Hydrocolloids*, *24*(4), 325–329. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.10.010>
- Zeng, S. kui, Zhang, C. hua, Lin, H., Yang, P., Hong, P. zhi, & Jiang, Z. (2009). Isolation and characterisation of acid-solubilised collagen from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Food Chemistry*, *116*(4), 879–883. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.038>
- Zhang, J., Duan, R., Huang, L., Song, Y., & Regenstein, J. M. (2014). Characterisation of acid-soluble and pepsin-solubilised collagen from jellyfish (*Cyanea nozakii* Kishinouye). *Food Chemistry*, *150*, 22–26. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.116>
- Zhang, M., Liu, W., & Li, G. (2009). Isolation and characterisation of collagens from the skin of

- largefin longbarbel catfish (*Mystus macropterus*). *Food Chemistry*, *115*(3), 826–831.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.006>
- Zhang, Q., Wang, Q., Lv, S., Lu, J., Jiang, S., Regenstein, J. M., & Lin, L. (2016). Comparison of collagen and gelatin extracted from the skins of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Food Bioscience*, *13*, 41–48.
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.12.005>
- Zhang, X., Ookawa, M., Tan, Y., Ura, K., Adachi, S., & Takagi, Y. (2014). Biochemical characterisation and assessment of fibril-forming ability of collagens extracted from Bester sturgeon *Huso huso* × *Acipenser ruthenus*. *Food Chemistry*, *160*, 305–312.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.075>
- Zhong, C., Zhou, Z., Zhang, Y. M., Jia, S. R., Sun, Z., & Dale, B. E. (2014). Integrating kinetics with thermodynamics to study the alkaline extraction of protein from *Caragana korshinskii* Kom. *Biotechnology and Bioengineering*, *111*(9), 1801–1808.
<https://doi.org/10.1002/bit.25229>
- Zhou, C., Li, Y., Yu, X., Yang, H., Ma, H., Elgasim, A., Yagoub, A., Cheng, Y., Hu, J., Naa, P., & Otu, Y. (2016). LWT - Food Science and Technology Extraction and characterization of chicken feet soluble collagen. *LWT - Food Science and Technology*, *74*, 145–153.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.024>