



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



Aprovechamiento de la piel y vejiga natatoria de totoaba (*Totoaba macdonaldi*): obtención de colágeno

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA EN ACUACULTURA

PRESENTA

Yadira Cortes Santiago

Ensenada, Baja California, a 26 de agosto de 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



TESIS

Aprovechamiento de la piel y vejiga natatoria de totoaba (*Totoaba macdonaldi*): obtención de colágeno

Presentada por

Yadira Cortes Santiago

y aprobada por el siguiente comité:

M.C. Honorio Cruz López
Director de tesis

Dra. Lus Mercedes López Acuña
Sinodal

Dra. Leticia Olivera Castillo
Sinodal

Ensenada, Baja California, a 26 de agosto de 2019

Dedicatoria

Dedico este proyecto de tesis a Dios y a mis padres. A Dios porque ha estado conmigo a cada paso que doy, cuidarme y dándome fortaleza para continuar, a mis padres, pilares fundamentales en mi vida, con mucho amor y cariño, les dedico todo mi esfuerzo, en reconocimiento a todo puesto para que yo pueda estudiar, se merecen esto y más.

Agradecimientos

- Gracias a la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) y a la Facultad de Ciencias Marinas (FCM), México por recibirme y otorgar mis estudios profesionales en la carrera de Biotecnología en Acuicultura.
- Estoy muy agradecida por los apoyos recibidos para financiar la investigación del presente proyecto, así como la beca otorgada como tesista-becaria, por medio del Fondo Sectorial SAGARPA-CONACYT, proyecto 2017-04-291837 # 247698 *“Innovaciones tecnológicas para la conservación y reproducción de peces marinos con énfasis en totoaba (Totoaba macdonaldi)”* a cargo de la Dra. Lus M. López Acuña.
- Muchas gracias a todos los miembros del Laboratorio de Nutrición Acuícola de FCM-UABC y a la Unidad de Biotecnología en Piscicultura FCM-UABC por la asistencia y apoyo incondicional para la realización de esta Investigación.
- A la Unidad de Biotecnología en Piscicultura (UBP) por los apoyos con muestras para la realización de este estudio.
- De manera especial a mi director de tesis, M.C. Honorio Cruz López por ser mi mentor, por darme la oportunidad de trabajar en el presente proyecto, guiarme y compartirme su conocimiento, por toda la confianza y paciencia brindada, por su apoyo para desarrollarme profesionalmente y en algunas cuestiones de la vida. Muchas gracias, por todo el tiempo dedicado.
- A mis sinodales, Dra. Lus M. López Acuña y Dra. Leticia Olivera Castillo por sus acertadas observaciones y sugerencias que contribuyeron al mejoramiento de mi trabajo de tesis y formación profesional.
- A mi tutor, Dr. Luis Manuel Enríquez Pares por todo su apoyo durante esta etapa.
- Por último, pero no menos importante, a mi familia y amigos:
 - Mis padres, por todo el apoyo brindado durante esta y todas las etapas de mi vida, por darme los valores necesarios para conseguir las metas que me propongo. Por el apoyo moral y el cariño incondicional que me dan, por cada una de sus palabras de amor, paz, aliento a pesar de la distancia, los amo.
 - A mis hermanas y hermano por estar presente en cada momento, ayudándome cada que los necesito.

- A la Sra. Rosalba y su esposo por compartir su hogar conmigo cuando necesite un lugar donde quedarme, muchas gracias.
- A la Dra. Karina Del Carmen Lugo Ibarra por su amistad y consejos, durante esta etapa.
- A mis amigas Laura, Vanessa, Paola (pola), Griselda y Vania, por estar siempre para mí, gracias por la ayuda cuando en ocasiones me sentía triste, por su interés en mi proyecto, les agradezco no solo por la ayuda brindada, sino por los buenos momentos en los que convivimos. Las voy a extrañar.
- A mis compañeros de carrera, Pedro y Agustín, por todo el apoyo técnico durante este proyecto y carrera, además por sus consejos, pero sobre todo por su amistad.
- A Romel, por toda tu ayuda técnica en el laboratorio, por tu amplia disposición de ayudar, muchas gracias, me facilitaste más las cosas.
- A todas las personas que de alguna manera ayudaron en la realización de este proyecto, muchas gracias.

Resumen

Debido a su baja antigenicidad e inmunogenicidad y excelente biocompatibilidad, el colágeno es ampliamente utilizado en productos alimenticios, farmacéuticos, biomédicos y cosméticos. La principal fuente de colágeno es la piel y los huesos del ganado vacuno y porcino, sin embargo, su aplicación se ha restringido debido al riesgo de transmisión de enfermedades y cuestiones religiosas. Por tal motivo, el colágeno de organismos acuáticos como fuente alternativa de colágeno terrestre está ganando mayor atención. La totoaba (*Totoaba macdonaldi*) es una especie endémica del Golfo de California, México y se encuentra en peligro de extinción. A pesar de esta situación, existe permiso para su cultivo y comercialización, a través de las Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA), de hecho, el interés en el cultivo de totoaba está incrementando. Al igual que otros peces, la totoaba es comercializada entera y eviscerada, el principal producto utilizado es el filete. Durante el procesamiento de totoaba se generan residuos secundarios conocidos como subproductos tales como la piel y vejiga natatoria (VN) que pueden ser aprovechadas como fuentes de colágeno. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue obtener colágeno a partir de la piel y vejiga natatoria de juveniles de totoaba y su caracterización parcial. Los peces fueron proporcionados por la Unidad de Biotecnología en Piscicultura (UBP) de la Facultad de Ciencias Marinas (FCM-UABC) y mataron a través de punción para la obtención de la piel y VN. Ambos organos recibieron un pretratamiento mecánico y químico para remover, escamas, grasa, pigmentos y proteínas no colágenas. El colágeno fue extraído en solución ácida con pepsina (CSP). Finalmente, el colágeno obtenido se caracterizó por medio de electroforesis (SDS-PAGE), espectrometría (UV-vis y FTIR), calorimetría (DSC) y cromatografía (CLAR). El análisis proximal reveló que la piel y VN tuvieron valores de humedad de $65.48 \pm 0.82\%$ y $70.34 \pm 0.97\%$, respectivamente. Mientras que en base seca los valores de proteína fueron de 94.47% para la piel y de 96.74% para la VN con bajos niveles de lípidos (piel: 4.77 y VN: 2.46%) y cenizas (piel: 0.76 y VN: 0.80%). El rendimiento de CSP en base a peso seco fue de $83.68 \pm 0.46\%$ en la piel y $69.14 \pm 0.41\%$ en la vejiga natatoria. El colágeno se identificó como colágeno tipo I de acuerdo con el patrón electroforético y los análisis espectrofotométricos. La temperatura de

desnaturalización del colágeno en la piel fue de $29.67 \pm 0.02^{\circ}\text{C}$ y en la vejiga natatoria $32.19 \pm 0.03^{\circ}\text{C}$. La composición de aminoácidos fue ligeramente similar en el colágeno de la piel y vejiga natatoria, ambos con contenidos predominantes de glicina, prolina, alanina y ácido glutámico. El contenido de iminoácidos (prolina e hidroxiprolina) fue mayor en piel (215 / 1000 residuos de aminoácidos) comparada con la vejiga natatoria (205 /1000 residuos de aminoácidos). Los resultados obtenidos indicaron que la piel y VN de juveniles de totoaba son una fuente potencial de colágeno tipo I y los rendimientos obtenidos fueron mayor en la piel ($83.68 \pm 0.46\%$) que en la VN ($69.14 \pm 0.41\%$). Sin embargo, es importante continuar con su caracterización para posteriores estudios relacionados con su aplicación.

Palabras claves: colágeno soluble en pepsina, piel, vejiga natatoria, *Totoaba macdonaldi*, caracterización, colágeno marino.

Abreviaciones

CSP	Colágeno soluble en pepsina
CSP	Colágeno soluble en ácido
EEB	Encefalopatía espongiforme bovina
EET	Encefalopatías espongiformes transmisibles
Gly-X-Y	Glicina, prolina e hidroxiprolina
nm	Nanómetros
PM	Peso molecular
PrP^c	Glicoproteína
PrP^{Sc}	Glicoproteína patológica
Td	Temperatura de desnaturalización
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
UV-vis	Espectroscopia ultravioleta-visible
FTIR	Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier
DSC	Control electrónico de estabilidad
CLAR	Cromatografía líquida de alta eficiencia

Lista de figuras

Figuras		Página
1	Totoaba (<i>Totoaba macdonaldi</i>).	3
2	Estructura molecular del colágeno.	5
3	Piel y vejiga natatoria de <i>Totoaba macdonaldi</i> .	10
4	Subproductos de <i>Totoaba macdonaldi</i> .	14
5	Rendimiento de CSP de la piel y vejiga natatoria de <i>Totoaba macdonaldi</i> .	16
6	Perfil electroforético del CSP de la piel y vejiga natatoria de <i>Totoaba macdonaldi</i> .	19
7	Termograma del colágeno aislado de la piel y vejiga natatoria de <i>Totoaba macdonaldi</i> .	21
8	Espectroscopia UV-vis de CSP de la piel y vejiga natatoria de <i>Totoaba macdonaldi</i> .	22
9	Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR) del CSP de la piel y vejiga natatoria de <i>Totoaba macdonaldi</i> .	22

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Composición química proximal de la piel y vejiga natatoria de <i>Totoaba macdonaldi</i> .	15
2	Composición de aminoácidos del CSP de la piel y vejiga natatoria de <i>Totoaba macdonaldi</i> .	18

Contenido

	Página
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Resumen	v
Abreviaciones	vii
Lista de figuras	vii
Lista de tabla	viii
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1. Totoaba (<i>Totoaba macdonaldi</i>)	3
2.2. Subproductos de peces	4
2.3. Colágeno	5
2.3.1. Aplicaciones.....	6
2.3.2. Fuentes de obtención.....	6
2.4. Extracción de colágeno en peces	7
3. Justificación	8
4. Hipótesis	9
5. Objetivos	9
5.1. Objetivo general	9
5.2. Objetivo específicos	9
6. Metodología	10
6.1. Materia prima	10
6.2. Composición proximal	10
6.3. Aislamiento de colágeno.....	11
6.3.1. Pretratamiento.....	11
6.3.2. Extracción	11
6.4. Caracterización parcial del colágeno	12
6.4.1. Espectroscopia UV-Vis	12
6.4.3. Electroforesis SDS-PAGE	12
6.4.4. Estabilidad térmica	12
6.4.5. Perfil de aminoácidos.....	13

6.4.5. Análisis estadístico	13
7. Resultados y discusión	14
7.1. Composición proximal de la piel y vejiga natatoria.....	14
7.2 Rendimiento de CSP de la piel y vejiga natatoria	16
7.3. SDS – PAGE del CSP de la piel y vejiga natatoria	18
7.4. Composición de aminoácidos del CSP de la piel y vejiga natatoria	¡Error!
Marcador no definido.	
7.5. Estabilidad térmica del CSP de la piel y vejiga natatoria.....	23
7.6. Espectro UV–Vis	¡Error! Marcador no definido.
7.7. Espectroscopia FTIR	24
9. Conclusión.....	25
10. Bibliografía	26

1. Introducción

El colágeno es una proteína fibrosa presente en los tejidos conectivos de los animales. En los vertebrados constituye aproximadamente el 30% de la proteína total y su principal función es proporcionar estructura y soporte a los organismos (Gelse et al., 2003). Hasta la fecha, se han reportado 29 tipos de colágeno (Söderhäll et al., 2007), entre ellos el más abundante es el tipo I y se encuentra distribuido en la piel, tendones, ligamentos y los huesos (Gelse et al., 2003). Debido a su baja antigenicidad y excelente biodegradabilidad, el colágeno es ampliamente utilizado en productos alimenticios, farmacéuticos, biomédicos y cosméticos (Ahmed et al., 2018). La principal fuente de colágeno es la piel y los huesos del ganado vacuno y porcino. Sin embargo, su aplicación se ha restringido debido al riesgo de transmisión de enfermedades, tales como la fiebre aftosa, la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) y la influenza aviar (Sadowska et al., 2003). Además, en algunos grupos étnicos es inapropiado el consumo de productos derivados de estas fuentes (Morimura et al., 2002). Por tal motivo, el colágeno de organismos acuáticos está ganando mayor atención. Por ejemplo, se ha logrado aislar el colágeno de diferentes especies de peces (Nagai, 2000), esponjas (Sascha et al., 2007), medusas (Khong et al., 2018) y moluscos (Tabakaeva et al., 2018).

El colágeno acuático presenta ventajas con respecto al colágeno de fuentes terrestre, entre las cuales destaca: un menor riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas a humanos, mejor absorción debido a su menor peso molecular, además una menor preocupación religiosa (Silva et al., 2014). Cabe mencionar que la fuente principal de colágeno son los tejidos de los peces que generalmente forman parte de los subproductos generados durante su procesamiento, en especial la piel (Nagai, 2000), los huesos y escamas (Minh et al., 2014). Estudios previos han reportado rendimientos de colágeno en peso seco en la piel de loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) de 27.32% (Wang et al., 2018) hasta 84.85% en la gallineta de fondo (*Nibea japonica*) (Yu et al., 2018). Asimismo, se ha descrito que la vejiga natatoria de los peces es una buena fuente de colágeno, con rendimientos hasta del 85.0% en la lubina (*Lates calcarifer*) (Sinthusamran et al., 2013). En general, se han observado variaciones en los rendimientos, la

composición de aminoácidos y estabilidad térmica. Se cree que se debe a los procesos de extracción y condiciones ambientales del nicho ecológico en el que viven los peces (Kittiphattanabawon et al., 2005), por lo que es indispensable caracterizar el colágeno de cada fuente potencial.

La totoaba (*Totoaba macdonaldi*) es un pez marino que pertenece a la familia *Sciaenidae*, además es endémico del Golfo de California, México. Fue la primera y más importante pesquería en el Golfo de California (SEMARNAT-CONANP, 2007). Sin embargo, debido a la sobrepesca su población disminuyó, por lo cual, el gobierno mexicano aplicó varias regulaciones, entre ellas, clasificar a totoaba como una especie en peligro de extinción (NOM-051-SEMARNAT-2010). No obstante, existe permiso para cultivar totoaba a través de las Unidades de Manejo para la Conservación de Vida Silvestre (UMA). Por lo tanto, actualmente existen UMA's que comercializan esta especie a nivel nacional. Al igual que otros peces, la totoaba es comercializada entera eviscerada, pero el principal producto utilizado es el filete. Así, durante su procesamiento, se generan subproductos entre los que se encuentra la piel y la vejiga natatoria, que podrían ser aprovechados como materia prima para la obtención de colágeno. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue utilizar la piel y vejiga natatoria de juveniles cultivados de totoaba para obtener y caracterizar parcialmente el colágeno aislado de estos tejidos.

2. Antecedentes

2.1. Totoaba (*Totoaba macdonaldi*)

La totoaba es un pez marino endémico del Golfo de California, México (Figura 1). Pertenece a la familia *Sciaenidae* y es considerado el pez más grande de esta familia, puede llegar a medir hasta dos metros y pesar 100 kg, son peces longevos que viven entre 20 y 25 años (Cisneros et al., 1955). La pesca de totoaba inicio en 1920, su pesquería fue la más importante del Golfo de California, para 1942 las capturas alcanzaron su máximo histórico con una captura de 2, 261 T. Sin embargo, su captura empezó a descender drásticamente hasta alcanzar 59 T en 1975. Por esta razón desde el mismo año se declaró en veda permanente y en 1976 se prohibió la captura de esta especie (Valenzuela et al., 2011; Mata et al., 2015). Hoy en día, totoaba se encuentra en la categoría de “En peligro de extinción” (P) en la NOM-059-SEMARNAT-2010 (CITES, 1977). En general, estas medidas tomadas por el gobierno mexicano evitan la captura y comercio internacional de totoaba. No obstante, debido al alto valor de su vejiga natatoria conocida como “buche”, existe una pesquería y comercialización ilegal. El informe escrito por Greenpeace en 2017 señala que un gramo de vejiga natatoria de totoaba en el mercado asiático es de aproximadamente 40 dólares (Greenpeace, 2017).



Figura 1. Totoaba (*Totoaba macdonaldi*)

A pesar de esta situación, existe permiso para cultivar totoaba a través de las UMA's. Actualmente, se encuentran registradas seis UMA's. Entre ellas la pionera, Unidad de Biotecnología en Piscicultura (UBP) que pertenece a la Facultad de Ciencias Marinas (FCM) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) la cual desarrollo

la biotecnia para el cultivo de esta especie con fines de repoblamiento e investigación. Debido a sus características biológicas, tales como alta tasa de crecimiento, buenos índices de conversión alimenticia, la calidad de su carne y la buena aceptación entre los consumidores, hacen que totoaba sea un modelo potencial para la acuicultura. Razón por la cual ha despertado el interés del sector acuícola, por ejemplo, Earth Ocean Farms es una empresa que se dedica al cultivo y comercialización de juveniles de totoaba con una talla comercial de aproximadamente tres kilogramos.

2.2. Subproductos de peces

Durante el procesamiento de los peces se generan residuos secundarios conocidos como subproductos, tales como: huesos, cabezas, vísceras, escamas, piel y aletas los cuales pueden llegar a constituir más del 50% del peso total (Shahidi, 2007). Generalmente los subproductos son descartados como basura convencional, además, en algunos casos los peces son eviscerados cerca de la costa lo que podría tener un impacto en el ecosistema marino. Es bien conocido que la descomposición del material orgánico provoca olores desagradables, además la presencia de insectos y roedores, los cuales podrían actuar como un vector infeccioso y de esta manera causar daños a la salud humana e impacto ambiental (Newton et al., 2014). En la actualidad, los subproductos se consideran materia prima para la elaboración de diferentes compuestos, por ejemplo, la industria del salmón del Atlántico (Ytrestoyl et al., 2015) utiliza los subproductos para la producción aceite, harina, concentrados de proteína, ensilaje, fertilizantes y aditivos omega-3.

2.3. Colágeno

La molécula de colágeno está formada por tres cadenas polipeptídicas (cadenas α) presentes en todos los colágenos (Kadler et al., 1996) Figura 2. Estas cadenas pueden ser idénticas (homotrímeros) o tener dos o más cadenas diferentes (heterotrímeros). Para formar la triple hélice, las tres cadenas se enrollan entre sí a través de enlaces de hidrogeno (Gelse et al., 2003). Las cadenas alfa están formadas por aproximadamente 1000 residuos de aminoácidos con una secuencia característica Gly-X-Y, glicina, prolina e hidroxiprolina, respectivamente. Durante la síntesis del colágeno, algunos residuos de prolina sufren una modificación postraducciona (hidroxilación) para dar lugar a la hidroxiprolina aminoácido casi exclusivo del colágeno. Existe diferentes tipos de colágeno y se clasifican en familias de acuerdo con sus características: colágeno que forman fibrillas, colágenos asociados a fibrillas (FACIT), colágenos que forman redes, colágeno que forman fibrillas de anclaje, colágenos transmembrana y colágenos de membrana basal. No obstante, la familia más abundante está representada por los colágenos que forman fibrillas.

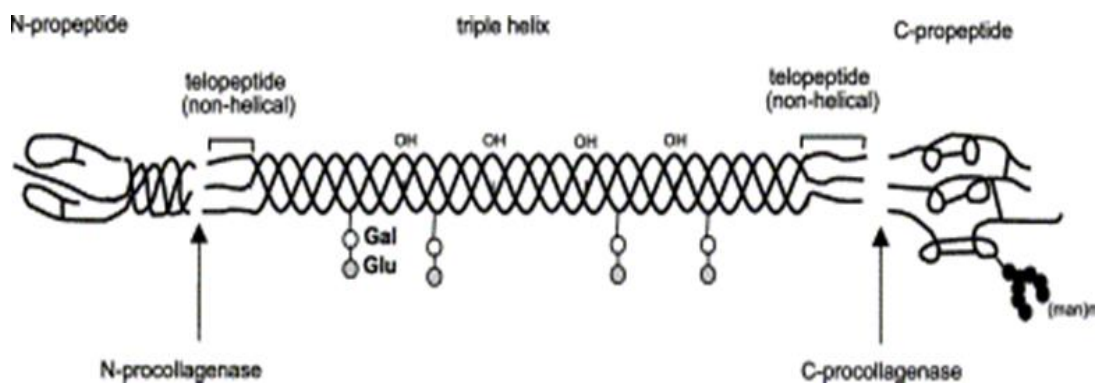


Figura 2. Estructura molecular de los colágenos fibrilares con los diversos subdominios, así como los sitios de N y C terminales (Gelse et al., 2003).

2.3.1. Aplicaciones

Debido a las características químicas únicas, el colágeno se utiliza en diversos campos industriales. En la industria farmacéutica y cosmética el colágeno o sus derivados (gelatina e hidrolizados) se han utilizado para la prevención y tratamiento de arrugas y en la producción de parches para las heridas (Wolfgang, 1998). En la industria biomédica se han desarrollado andamios para proporcionar un soporte mecánico temporal y desarrollar una estructura porosa para promover la migración y diferenciación de las células, formando una osteoinducción y mejorando la osteointegración con el tejido del huésped (Stark et al., 2006). También se ha utilizado para la elaboración de esponjas de colágeno, que son usadas comúnmente como apósitos o gasas para heridas (Song et al., 2019) y en la industria alimentaria, para proporcionar consistencia y estabilidad a los productos alimenticios (Silva y Penna, 2012).

2.3.2. Fuentes de obtención

La piel y los huesos del ganado vacuno y porcino, así como las aves de corral son la principal fuente para la obtención de colágeno terrestre. Sin embargo, representan un posible riesgo de transmisión de enfermedades, por ejemplo, la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) y encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) que son causadas por una proteína denominada priónica. Naturalmente esta proteínas se encuentra en las células de los bovinos, sin embargo, cuando la estructura secundaria de esta glicoproteína (PrP^c) es alterada adquiere una propiedad patológica (PrP^S). Según el Registro Nacional de Encefalopatías Espongiformes Transmisibles Humanas en España se han diagnosticado 1,163 casos de enfermedades por priones desde 1993 hasta octubre de 2009. En este registro seis casos estuvieron relacionados con implantes para la regeneración de duramadre (meninge) los cuales estaban elaborados con colágeno bovino (Arranz et al., 2010). Por otro lado, en algunos grupos religiosos y étnicos es inapropiado el consumo de productos derivados del ganado bovino y porcino (Sadowska et al., 2003). Debido a esto, la comunidad científica inició investigaciones en organismos acuáticos, hoy en día, los invertebrados marinos, así como los peces son considerados una fuente alternativa de colágeno (Minh et al., 2014).

2.4. Extracción de colágeno en peces

El colágeno acuático se ha obtenido principalmente de los huesos, piel (Nagai, 2000) y escamas (Minh et al., 2014) y en menor medida de la vejiga natatoria de diferentes especies de peces, en esta sección nos enfocaremos en la piel y vejiga natatoria. La piel de los peces en el exterior está cubierta por escamas y en el interior la dermis, mientras que la vejiga natatoria es un órgano interno lleno de gas presente en la mayoría de los peces (Hoar et al., 1983). Ambos órganos, están compuestos principalmente por agua, seguido de proteína (principalmente de tipo colágena) y en menor cantidad de lípidos y minerales. Hasta la fecha, de la piel se ha logrado obtener rendimientos de 27.32% (Wang et al., 2018) hasta 84.85% (peso seco) (Yu et al., 2018) y en la vejiga natatoria entre 12.0% y hasta un 85.0% (peso seco) de CSP (Sinthusamran et al., 2013).

Debido a la naturaleza del colágeno su extracción se basa en una solubilidad en soluciones ácidas. Los principales ácidos utilizados son; ácido acético, cítrico y clorhídrico, el colágeno obtenido es conocido como colágeno soluble en ácido (CSA). Debido a los bajos rendimientos, así como el tiempo de extracción y una baja purificación en el colágeno obtenido, diversos estudios adicionan pepsina durante el proceso de extracción, este método es conocido como colágeno soluble en pepsina (CSP). La función de la pepsina es romper los enlaces cruzados y los péptidos de la región telopeptídica del colágeno sin dañar su estructura (Sadowska et al., 2003). De esta forma los rendimientos del colágeno generalmente son mayores comparados con otros métodos.

3. Justificación

La principal fuente de colágeno son los tejidos de organismos terrestres, sin embargo, estas fuentes presentan un posible riesgo de transmisión de enfermedades a los humanos. Se ha demostrado, que la piel y vejiga natatoria son una fuente prometedora de colágeno tipo I, sin embargo, las características fisicoquímicas del colágeno varían entre especies. Debido al creciente interés en el cultivo de totoaba y considerando que en su procesamiento al igual que otros peces se generan residuos, entre ellos, la piel y vejiga natatoria que no son utilizados se hace necesario aprovechar estos recursos para la obtención de colágeno. Así, en el presente estudio se generará información sobre algunas de las características fisicoquímicas del colágeno obtenido de la piel y vejiga natatoria. Los resultados obtenidos permitirán conocer si ambos tejidos pueden ser una fuente alternativa de colágeno y de esta forma ser aprovechadas como un ingreso adicional en las empresas de cultivo. De esta manera se pretende contribuir al uso integral de este recurso marino, además se generará información básica para futuros estudios relacionados con la caracterización y aplicación del colágeno.

4. Hipótesis

La piel y la vejiga natatoria de totoaba (*Totoaba macdonaldi*), son una fuente potencial para la obtención de colágeno soluble en pepsina CSP.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Obtener colágeno de la piel y vejiga natatoria de *Totoaba macdonaldi* y caracterizar parcialmente el colágeno aislado.

5.2. Objetivos específicos

1. Determinar la composición químico proximal de piel y vejiga natatoria de *Totoaba macdonaldi*.
2. Extraer el colágeno soluble en pepsina (CSP) presente en la piel y vejiga natatoria de *Totoaba macdonaldi*.
3. Determinar las características del colágeno aislado mediante la espectroscopia (UV-Vis, FTIR), peso molecular (SDS-PAGE) y estabilidad térmica (DSC) de *Totoaba macdonaldi*.
4. Determinar el contenido de aminoácidos del colágeno aislado por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAR) de *Totoaba macdonaldi*.

6. Metodología

6.1. Materia prima

Los juveniles de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) fueron proporcionados por la Unidad de Biotecnología en Piscicultura (UBP) de la Facultad de Ciencias Marinas (FCM) de la Universidad Autónoma de Baja California. La talla de los organismos fue en promedio 57.8 ± 3.30 cm de longitud total y 2.3 ± 0.42 kg de peso. Los organismos fueron transportados al Laboratorio de Nutrición Acuícola donde se mataron por punción cefálica y de acuerdo a lineamientos éticos (NOM-062-ZOO 1999). La piel y vejiga natatoria fueron removidas. Estos tejidos se limpiaron manualmente para eliminar las escamas de la piel, así como la carne residual, la grasa y vasos sanguíneos de la vejiga natatoria. Las muestras limpias se cortaron en piezas pequeñas ($1.0 \text{ cm} \times 1.0 \text{ cm}$) y se almacenaron a -20°C por no más de tres meses Figura 3.

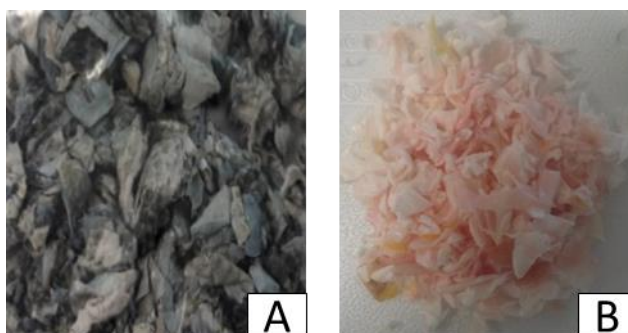


Figura 3. Cortes de piel (A) y vejiga natatoria (B) de totoaba (*T. macdonaldi*).

6.2. Composición proximal

El análisis químico proximal se realizó siguiendo los métodos recomendados por la Asociación Oficial de Química Analítica AOAC (2000). La humedad total se determinó por gravimetría, para esto las muestras se colocaron en un horno de secado a 105°C por 12 h. La misma muestra fue incinerada en un horno (Mufla 6000) a 500°C durante 8 h, la pérdida de la materia orgánica después de la incineración se consideró como ceniza total. Los lípidos totales se determinaron siguiendo el método de Cequier et al. (2008), el cual consiste en extraer los lípidos con diclorometano metanol (2:1). El porcentaje de lípidos

se determinó por la diferencia en peso. Finalmente, las proteínas se determinaron por el método micro-Kjendahl, que consiste en la digestión de la muestra utilizando H_2SO_4 en un digestor (Gerhardt), después la muestra obtenida se destilo y título en la unidad de destilación vapodest (Gerhardt). El porcentaje de proteína se determinó utilizando el factor proteínico (6.25).

6.3. Aislamiento de colágeno

6.3.1. Pretratamiento

El aislamiento de colágeno se realizó de acuerdo con Liu et al. (2012) y Cruz-López et al. (2019, *en revisión*). Para remover las proteínas no colágenas de piel y vejiga natatoria de totoaba se utilizó una solución alcalina NaOH 0.1 M, por 12 horas. Los tejidos tratados en la solución alcalina se lavaron con agua destilada (H_2O_d) hasta llegar a un pH neutro. Posteriormente, los lípidos se removieron con n-butanol al 10% por 12 horas. Finalmente, se lavaron los tejidos con H_2O_d hasta llegar a un pH neutro. Todos los procedimientos se realizaron a 4 °C y con agitación continua, además los solventes se cambiaron cada 3 h.

6.3.2. Extracción

Después del pretratamiento, las muestras fueron sometidas a la extracción de colágeno soluble en pepsina (CSP). La extracción se realizó en una condición ácida (AcOH 0.5 M) con 2% de pepsina por 24 h. Posteriormente, el colágeno obtenido se precipito con cloruro de sodio (NaCl 1.2 M) y se centrifugo por 16000 x g 20 minutos a 4 °C en una centrifuga Megafuge 16R (Thermo scientific). El precipitado se re-disolvio en AcOH 0.5 M por 12 h. El colágeno se purifico con una membrana de diálisis con un corte molecular de 14 kDa (Merck). El colágeno purificado se secó en un liofilizador FreeZone (Labconco). Todos los procedimientos se realizaron a 4 °C

6.4. Caracterización parcial del colágeno

6.4.1. Espectroscopia UV-Vis

El espectro de absorción UV-vis del CSP de la piel y vejiga natatoria se obtuvo utilizando el espectrómetro Multiskan Go (Thermo Scientific). Las muestras se disolvieron en AcOH 0.1 M (1 mg mL^{-1}) con agitación constante por 12 horas a 4°C . Las lecturas se realizaron en un rango de 200 a 450 nm.

6.4.2. Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR)

El espectro infrarrojo del CSP de piel y vejiga natatoria se obtuvo utilizando un equipo de Infrarrojo Spectrum One (Perkin Elmer). Se utilizó un rango de 400 a 4000 cm^{-1} , con 60 exploraciones y una resolución de 4 cm^{-1} a temperatura ambiente. El espectro se analizó con el software del equipo.

6.4.3. Electroforesis SDS-PAGE

El peso molecular (PM) de CSP fue identificado a través una electroforesis en gel de poliacrilamida PAGE-SDS de acuerdo con Laemmli (1970). Las muestras de CSP de piel y vejiga natatoria se disolvieron en AcOH 0.1 M (2 mg mL^{-1}) por 12 h a 4°C . Las muestras solubilizadas se mezclaron en una relación 1:2 (v/v) con una solución amortiguadora (Tris-HCl 0.5 M, 5% de SDS y 20% de glicerol, pH 6.8). Las muestras fueron cargadas ($10 \mu\text{g}$ de proteína) en un gel discontinuo de poliacrilamida, con la primera sección 4% “staging” y la segunda sección “resolving” del 7.5% sometido a una corriente constante de 20 mA. Para la visualización de las bandas en el gel se utilizó 0.1% de Coomassie Brilliant Blue R-250. Para estimar el peso molecular de las proteínas se utilizó marcadores de peso molecular (6.5-250 kDa).

6.4.4. Perfil de aminoácidos

Todos los análisis se realizaron por triplicado y la T_{max} se calculó a partir del termograma. Los colágenos liofilizados de la piel y la vejiga natatoria fueron hidrolizados con HCl 6 N con 0.06% de fenol a 108°C por 22 h. Posteriormente, las muestras se

derivatizaron con fenilisotiocianato (PITC) y fueron inyectadas (5 μ L) en una columna Waters (C18, 3.9 $\times$ 150 mm) en un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) (UltiMate 3000, Thermo Scientific), siguiendo las recomendaciones del protocolo PICO-TAG de Waters Corporation (White et al., 1986).

6.4.5. Estabilidad térmica

Las muestras de CSP de piel y vejiga natatoria se disolvieron en AcOH 0.1 M (20 mg mL⁻¹) por 24 h a 4 °C. Se pesó (10 mg) en un crisol de aluminio sellado y fueron sometidas al análisis en un rango de 5 a 100 °C, con una velocidad de calentamiento de 1 °C por minuto usando un equipo DSC 200 (TA Instruments). Se utilizó un crisol vacío como referencia.

7. Análisis estadístico

Todos los métodos de extracción se analizaron por cuadruplicado en ambos tejidos. El resultado fue presentado como promedio $\pm$ desviación estándar.

7. Resultados y discusión

7.1. Composición proximal de la piel y vejiga natatoria

La piel y la vejiga natatoria representan el 6 y 2% del peso total de totoaba, respectivamente Figura 4. En general, los subproductos de totoaba representan un 53%. La composición proximal de la piel y vejiga natatoria se muestra en la Tabla 1. El principal contenido de la piel y vejiga natatoria (VN) fue el agua $70.34 \pm 0.97\%$ y $65.48 \pm 0.82\%$ respectivamente, lo que coincide con lo reportado para otras especies de peces como la perca del Nilo (*Lates niloticus*) (piel: 72.7%)

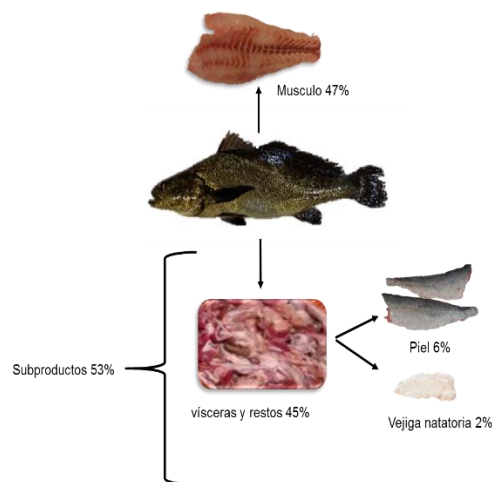


Figura 4. Subproductos de totoaba (*T. macdonaldi*).

(Muyonga et al., 2004), la carpa cabezona (*Hypophthalmichthys nobilis*) (VN: 75.2%) (Liu et al., 2012), la caballa española (*Scomberomous niphonius*) (piel: 76.72%) (Li et al., 2013), el atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*) (VN: 83.33%) (Kaewdang et al., 2014), y en adultos de totoaba (VN: 65.39%) (Cruz-López et al., 2019, *en revisión*). Estos autores, señalan que el agua representa el mayor componente en ambos tejidos, la variación en su contenido se atribuye a las diferencias entre especies, el hábitat, alimentación y la posición anatómica en la que se encuentra los tejidos. Además, aparentemente el contenido de agua en la vejiga natatoria puede variar durante el procesamiento y almacenamiento del tejido (Cruz-López et al., 2019, *en revisión*).

El contenido de proteína en la piel y vejiga natatoria fresca de totoaba fue de 28 y 33%, que corresponde a 94 y 96% (peso seco), respectivamente. Liao et al. (2018), mencionan que la piel de barramundi (*Lates calcarifer*) y tilapia (*Oreochromis niloticus*) contienen 28.92 y 33.45% de proteína, respectivamente. Sin embargo, el contenido de proteína en peso seco es similar entre tejidos. Wang et al. (2007) señala que la piel de la gallineta de fondo marino tiene un 90.6% (peso seco) de proteína, el atún aleta amarilla 73% (peso seco) (Onouma et al., 2014), asimismo, en la clatla 83% (peso seco) (Chandra

et al., 2015). Por otro lado, en la vejiga natatoria de adultos de totoaba (Cruz-López et al., 2019, *en revisión*) se ha reportado un contenido de proteína de 94.28%, el cual es similar con nuestros resultados y con miiuy croaker (91%) (*M. miiuy*) (Zhao et al., 2018).

Tabla 1. Composición química proximal de la piel y vejiga natatoria de totoaba (*T. macdonaldi*).

Peso seco				
Tejido	Humedad %	Proteínas %	Lípidos %	Cenizas %
Piel	70.34 ± 0.97	94.47	4.77 ± 0.01	0.76 ± 0.44
Vejiga natatoria	65.48 ± 0.82	96.74	2.46 ± 0.23	0.80 ± 0.14
Peso húmedo				
Piel	-	28.02	1.41	0.23
Vejiga natatoria	-	33.39	0.85	0.28

Los lípidos en la piel y vejiga natatoria de totoaba representan el 4.77 y 2.46% los cuales son mayores a los reportados en la piel de barramundi (0.41%) y tilapia (1.62%) (Liao et al., 2018). El contenido de lípidos en la vejiga natatoria de totoaba es más bajo comparado con otros peces como el atún aleta amarilla (9%) (Onouma et al., 2014), la clatla (4.7%) (Gaurav y Suresh, 2017) y en miiuy croaker (8%) (Zhao et al., 2018) pero similar a los reportados recientemente en la vejiga natatoria de adultos de totoaba (3.67%) (Cruz-López et al., 2019, *en revisión*). Finalmente, se encontró un bajo contenido de cenizas en la piel y vejiga natatoria de totoaba el cual fue 0.76 y 0.80%, respectivamente. Estudios previos han reportado variaciones en el contenido de cenizas de 0.50-6% en ambos tejidos (Muyonga, 2004; Gaurav y Suresh, 2017). Muyonga, (2004), al realizar una comparación en dos tallas de la perca del Nilo, encontró un mayor contenido de minerales en la piel de adultos comparados con los jóvenes (3.7 y 6.0%), lo cual se atribuye a un aumento en la mineralización, que incrementa de acuerdo con la edad de los peces. Esto coincide al comparar nuestro resultado con el contenido de cenizas en la vejiga natatoria de adultos de totoaba (1.92%) (Cruz-López et al., 2019, *en revisión*). En general, el contenido proximal cambia de acuerdo con la especie, edad, condiciones del hábitat, alimentación y manipulación que reciben los tejidos antes de ser

analizados (pretratamientos) (Muyonga, 2004; Zhao et al., 2018; Cruz-López et al., 2019, *en revisión*).

7.2. Rendimiento de CSP de la piel y vejiga natatoria

El rendimiento de CSP (en base a peso seco) fue mayor en la piel comparado con la vejiga natatoria, como se puede observar en la Figura 5. Estudios previos han reportado rendimientos en la piel del bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) (Liu et al., 2007), 46.6% en la carpa (*C. idella*) (Zhang et al., 2007), 28.0% en el bagre grande de aleta larga (*Mystus macropterus*) (Zhang et al., 2009), dojo (*M. anguillicaudatus*) de 27.32% (Wang et al., 2018), 38.4% y 84.85% en la gallineta gigante (*Nibea japonica*) (Yu et al., 2018). En la vejiga natatoria se han registrado rendimientos de 59.0% en la carpa cabeza (*H. nubilis*) (Liu et al., 2012), 85.0% en la lobina (*L. calcarifer*) (Sinthusamran et al., 2013) y 37.7% en el esturión (*Bester*) (Zhang et al., 2014). Los autores mencionados anteriormente describen que la diferencia en los rendimientos varía de acuerdo con la especie de pez, las condiciones biológicas y por el entrecruzamiento covalente en la región telopeptídica e intermolecular del colágeno (Jongjareonrak et al., 2005). Además, otro factor determinante es el método utilizado en el proceso de extracción del colágeno (Sadowska et al., 2003), por ejemplo, en la piel de la carpa herbívora se describe que al adicionar pepsina el rendimiento incrementa del 8.0% (CSA) a 46.6% (CSP), esto debido a que la pepsina hidrolizó los enlaces intermoleculares de la región telopeptídica (Zhang et al., 2007). Esto coincide con otros estudios, en la piel del bagre (CSA: 16.8%; CSP: 28.0%) (Zhang et al., 2009), el pez globo (CSA: 10.7%; CSP: 44.7%) y el bagre de canal (CSA: 25.8%; CSP: 38.4%).

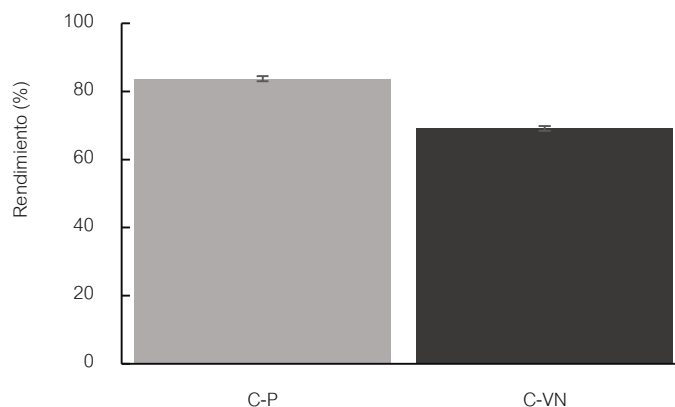


Figura 5. Rendimiento de CSP de la piel (C-P) y vejiga natatoria (C-VN) de totoaba (*T. macdonaldi*). Las barras representan la desviación estándar (n = 4).

Liu et al. (2012) al comparar los rendimientos de colágeno de las aletas, escamas, piel, hueso y vejiga natatoria de la carpa cabezona (*H. nobilis*) señalaron que existe una variación entre tejidos y encontraron rendimientos similares en la piel (60.3%) y vejiga natatoria (59.0%). Sin embargo, Sinthusamran et al. (2013), obtuvo un mayor rendimiento en la vejiga natatoria (85.0%) comparado con la piel (58.1%) de la lubina (*L. calcarifer*). Se ha informado que la solubilidad del colágeno cambia con la edad, es decir, en los peces jóvenes la solubilidad es mayor que en los adultos (Muyonga et al., 2004). Este patrón está relacionado con el grado de entrecruzamiento entre las moléculas de colágeno lo que hace que el colágeno sea más difícil de extraer y el rendimiento sea bajo (Minh et al., 2014). Además, el grado de reticulación cambian de acuerdo con la posición anatómica, es decir, los enlaces cruzados son menores en la vejiga natatoria debido a que se encuentra en el interior del pez comparado con un tejido externo como la piel que requiere una matriz más fuerte para proteger el cuerpo (Liu et al., 2012; Zhang et al., 2014). Sin embargo, los rendimientos de colágeno obtenidos en la piel de adultos tempranos de totoaba son mayores comparado con la piel de la lobina (*L. calcarifer*) (Sinthusamran et al., 2013) y carpa cabezona (*H. nobilis*) (Liu et al., 2012). Al comparar nuestro rendimiento de CSP en la vejiga natatoria de adultos de totoaba (82%) (Cruz-López et al., 2019, *en revisión*) es 12.0% menos. La diferencia en el rendimiento podría estar relacionado a un menor grado de reticulación en los juveniles de totoaba, es decir el tejido está más suelto, lo que provoca una pérdida de colágeno en el pretratamiento y los adultos al tener un mayor grado de reticulación la vejiga natatoria es más fuerte, por

lo tanto, durante el proceso de pretratamiento no se ve afectada. Los resultados obtenidos en este trabajo están de acuerdo con la hipótesis planteada por Cruz-López et al. (2019, *en revisión*).

7.3. Espectro UV-Vis

El espectro UV-vis del colágeno de la piel y vejiga natatoria de totoaba (*T. macdonaldi*) mostró una absorbancia máxima a 228 nm, Figura 8. Los resultados coinciden con los descritos por Veeruraj et al. (2013), en la piel de anguila marina (*Evenchelys macrura*), pez globo (Huang et al., 2011), bagre (Liu et al., 2017), abadejo de Alaska (*Theragra chalcogramma*) (Yan et al., 2008) y en la vejiga natatoria de adultos de totoaba (Cruz-López et al., 2019, *en revisión*). Los autores mencionados anteriormente señalan que la molécula de colágeno tiene una absorbancia característica de aproximadamente 230 nm. Además, Li et al. (2004), describen que los aminoácidos aromáticos (tirosina y fenilalanina) absorben aproximadamente a 280 nm. En el caso del colágeno estos aminoácidos se encuentran en una baja concentración como se puede observar en la Tabla 2. Por lo tanto, la ausencia de picos adicionales se considera un indicador de alta pureza del colágeno y a una buena eliminación de las proteínas no colágenas.

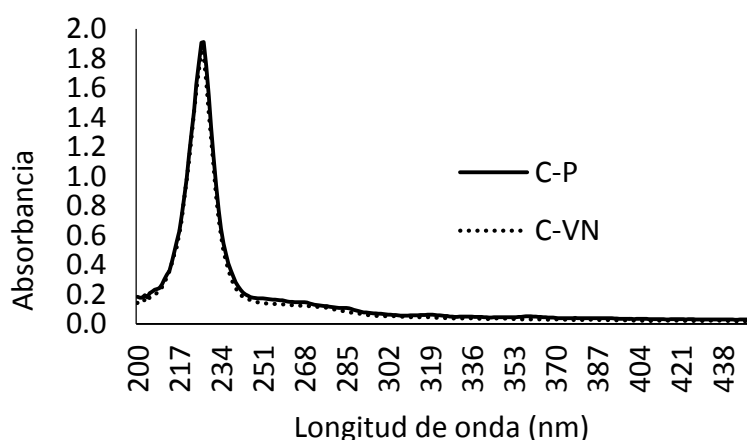


Figura 8. Espectroscopia UV-vis del colágeno asilado de la piel (C-P) y vejiga natatoria (C-VN) de totoaba (*T. macdonaldi*).

7.4. Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros FTIR del CSP de la piel y vejiga natatoria de totoaba se pueden observar en la Figura 9. Los espectros de los colágenos obtenidos fueron similares y se caracterizaron por la presencia de bandas amida. La amida A, se encontró en 3341 y 3336 cm^{-1} en la piel y en la vejiga natatoria, respectivamente y están relacionadas con una vibración y estiramiento de N–H. La amida B se encontró en 2985 cm^{-1} en la piel y en la vejiga natatoria 2988 cm^{-1} , los cuales están relacionados al estiramiento asimétrico de CH_2 (Moyunga et al., 2004).

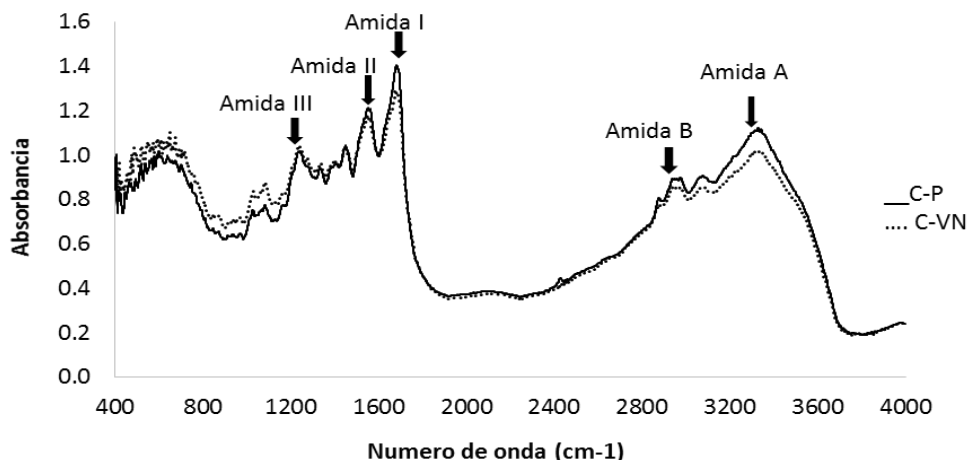


Figura 9. Espectroscopia FTIR del CSP de la piel (C-P) y vejiga natatoria (C-VN) de totoaba (*T. macdonaldi*).

La amida I se encontró en 1700 cm^{-1} en la piel y 1696 cm^{-1} en la vejiga natatoria, los cuales están dentro del rango (1600-1700 cm^{-1}) descritos por Moyunga et al. (2014), además señala que esto ocurre principalmente por la vibración de estiramiento de $\text{C}=\text{O}$. Liu et al. (2012) obtuvo valores similares al estudiar cinco CSP de diferentes tejidos de la carpa, en donde obtuvo a la amida I en 1648 cm^{-1} , lo que coincide también con el pargo patudo (1651-1662 cm^{-1}) (Jongjareonrak et al., 1978). La amida II se encontró en 1575 cm^{-1} en la piel y 1567 cm^{-1} en la vejiga natatoria, que está relacionado con una flexión N–H y una vibración de estiramiento C–N (Duan et al., 2009). Finalmente, la amida III se encontró en 1238 cm^{-1} en la piel y 1241 cm^{-1} en la vejiga natatoria, que están relacionados con un estiramiento N–H y vibración C–N (Benjakul et al., 2010; Ahmad y Benjakul et al.,

2010; Heu et al., 2010). Composición de aminoácidos del CSP de la piel y vejiga natatoria SDS – PAGE del CSP de la piel y vejiga natatoria

7.5. SDS – PAGE del CSP de la piel y vejiga natatoria

Los patrones electroforéticos del colágeno soluble en pepsina (CSP) de la piel y vejiga natatoria de totoaba se muestran en la Figura 6. Los colágenos están compuestos principalmente por dos cadenas α ($\alpha 1$ y $\alpha 2$), las cuales presentaron un peso molecular (PM) de 122-118 kDa, también se logró apreciar cadenas β de aproximadamente 200 kDa. Por lo tanto, el colágeno obtenido de la piel y vejiga natatoria de juveniles de totoaba se clasificó como colágeno tipo I, un heterotrímero con dos cadenas $\alpha 1$ (1) idénticas y una cadena $\alpha 2$ (1) (Gelse et al., 2003).

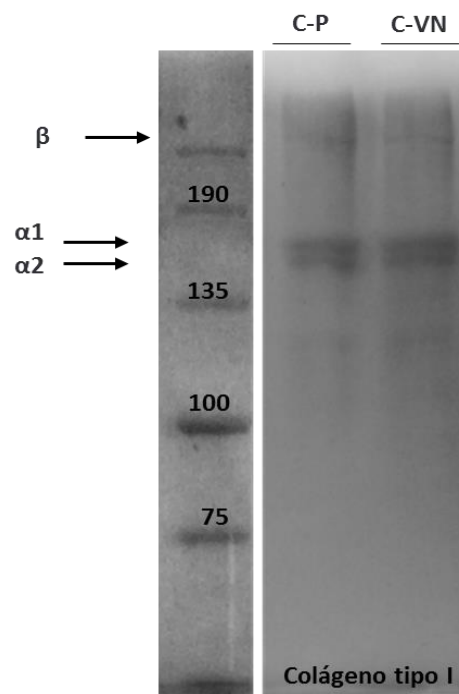


Figura 6. Perfil electroforético del CSP de la piel (C-P) y vejiga natatoria (C-VN) de totoaba (*Totoaba macdonaldi*).

Este patrón electroforético coincide con el colágeno de la piel y vejiga natatoria de la carpa cabezona (Liu et al., 2012), el atún aleta amarilla (Kaewgang et al., 2014) y vejiga natatoria de adultos de totoaba (Cruz-López et al., 2019, *en revisión*). En general

los componentes de alto y bajo PM están relacionados con el proceso de extracción y la formación de dímeros (β) o trímeros (γ). Wu et al., (2015), realizaron una comparación entre CSA y CSP en la carpa (*C. idella*), en donde encontraron la presencia de componentes β y γ en CSA, mientras que en CSP no se observaron estos componentes, por lo que señalan que la pepsina es capaz de romper el entrecruzamiento entre las moléculas de colágeno, esto sin dañar su integridad. Se ha señalado que las bandas de menor PM indican la presencia de otro tipo de proteínas que no se lograron remover durante el proceso de extracción. En el caso de la piel y vejiga natatoria de totoaba no se encontraron bandas de bajo PM, lo que indica una buena integridad y pureza del colágeno, Figura 6.

7.6. Composición de aminoácidos del CSP de la piel y vejiga natatoria

La composición de aminoácidos de la piel y vejiga natatoria de totoaba son expresados como 1000 residuos de aminoácidos Tabla 2. Los aminoácidos presentes en ambos colágenos tenían perfiles similares, los aminoácidos más predominantes fueron glicina, prolina, alanina y ácido glutámico y en menor concentración tirosina, histidina e isoleucina. La glicina representa aproximadamente un tercio de los residuos totales y normalmente está presente en cada tercer residuo de aminoácidos de la molécula de colágeno, excepto los primeros 14 residuos de aminoácidos del extremo N y los primeros 10 residuos del extremo C (Gelse et al., 2003; Foegeding et al., 1996). Este patrón es consistente con los colágenos en la piel y vejiga natatoria de la carpa (*H. nobilis*) (Liu et al., 2012), miiuy croaker (*M. miiuy*) (Zhao et al., 2018), atún aleta amarilla (Kaewdang et al., 2014) esturión (*A. ruthenus*) (Zhang et al., 2014) y adultos de totoaba (Cruz-López et al., 2019, *en revisión*).

Tabla 2. Composición de aminoácidos del CSP de la vejiga natatoria (C-VN) y piel (C-P) de totoaba (*T. macdonaldi*).

1000/residuos de aminoácidos					
	C-VN			C-P	
Asp	52	±	0.48	55	± 0.166
Glu	101	±	0.95	102	± 0.121
Hyp	83	±	1.42	66	± 0.195
Ser	23	±	0.69	25	± 0.054
Gly	309	±	3.15	321	± 0.238
His	5	±	0.34	5	± 0.004
Arg	59	±	6.47	47	± 0.048
Thr	13	±	4.62	8	± 0.207
Ala	132	±	1.27	131	± 0.028
Pro	122	±	1.33	149	± 0.225
Tyr	2	±	0.19	1	± 0.040
Val	16	±	0.03	14	± 0.034
Met	7	±	0.04	4	± 0.007
Cys	nd			nd	
Ile	5	±	0.22	6	± 0.031
Leu	20	±	0.08	18	± 0.019
Hyl	5	±	0.22	5	± 0.002
Phe	19	±	0.54	17	± 0.000
Lys	31	±	0.63	27	± 0.004
Total	1000			1000	
Iminoácidos	205			215	

Kaewdang et al. (2014), señalan que los iminoácidos (prolina e hidroxiprolina) son importantes para la integridad estructural del colágeno, es decir, los iminoácidos contribuyen a la estabilidad térmica del colágeno, la cual es una de las propiedades más importantes que determinan el uso potencial de esta proteína. Shahidi (2007), describe que en general los colágenos de peces de agua caliente tienen un mayor contenido de iminoácidos comparados con peces de agua fría. En el caso de totoaba es una especie que habita en aguas subtropicales, en el Golfo de California. El contenido de iminoácidos en la piel (215 /1000 residuos) fue mayor que en vejiga natatoria (205 /1000 residuos). Este resultado es similar al colágeno aislado de la piel y vejiga natatoria de la carpa herbívora (Liu et al., 2012), miiuy croaker (Zhao et al., 2018) y el esturión (Zhang et al., 2014).

7.7. Estabilidad térmica del CSP de la piel y vejiga natatoria

La temperatura de desnaturalización (T_d) está relacionada con una desintegración en la estructura helicoidal triple del colágeno la cual genera un cambio en las propiedades físicas, como la viscosidad (Usha et al., 2004). La T_d del colágeno de la piel y vejiga natatoria de totoaba fue 29.67 ± 0.02 °C y 32.19 ± 0.03 °C, respectivamente (Figura 7). Los valores de T_d de la piel de totoaba fueron más altos respecto al colágeno de la piel de peces de agua fría, por ejemplo, el bacalao (*Gadus morhua*) (15 °C) (Sadowska et al., 2003) y similar con los peces tropicales como el pargo rojo (*Priacanthus macreacanthus*) (31.5 °C) y el pargo patudo (30.4 °C) (Jongjareonrak et al., 2005). Pero más baja que el colágeno de la piel del bagre rayado (*Pangasianodon hypophthalmus*) (35.37 °C) (Singh et al., 2011) y que el colágeno de la piel de cerdo (37.0 °C) y becerro (40.8 °C) (Duan et al., 2009).

En la vejiga natatoria la T_d de la carpa (*C. idella*) (38.0 °C) fue más alta (Liu et al., 2015), que en la vejiga natatoria de totoaba, pero similar a lo que reportaron Zhang et al. (2011) en el esturión (32.9 °C). Rigby (1968) menciona que los colágenos en los peces están correlacionados con la temperatura ambiental del agua asimismo, señala que la T_d de los organismos marinos es más baja comparada con los animales terrestres, debido al entorno y la temperatura corporal de cada especie. Igualmente, la T_d del colágeno

varía entre especies y tejidos (internos o externos), los internos (vejiga natatoria) poseen valores de Td ligeramente más altos que los tejidos externos (aletas, escamas y pieles) (Liu et al., 2012). También la variación de la Td se atribuye al contenido de iminoácidos (prolina e hidroxiprolina), cuanto mayor es el contenido de iminoácidos más estables son las hélices de la molécula de colágeno (Gustavson, 1955). No obstante, la vejiga natatoria presentó una mayor estabilidad térmica con un menor contenido de iminoácidos comparado con la piel. Zhang et al. (2014), determinaron en el esturión la Td del colágeno de las escamas (29.6 °C), piel (26.8 °C), músculo (29.0 °C), vejiga natatoria (32.9 °C), tracto digestivo (31.6 °C) y notocordio (36.3 °C), sugiriendo que los colágenos de los tejidos internos tienen una Td más alta, sin embargo, no se conoce la razón de este patrón.

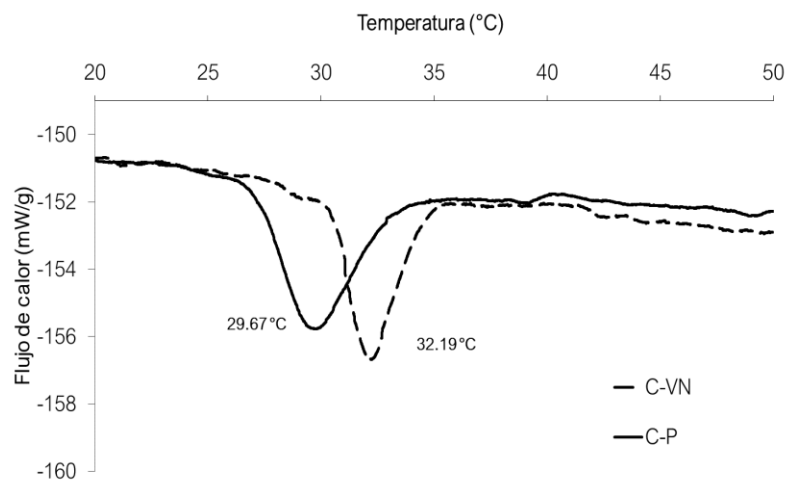


Figura 7. Termograma del colágeno aislado de la piel (C-P) y vejiga natatoria (C-VN) de totoaba (*T. macdonaldi*).

9. Conclusión

En este estudio se realizó por primera vez la extracción y caracterización parcial del colágeno de la piel y vejiga natatoria de adultos tempranos de totoabas (*T. macdonaldi*). En donde se obtuvo un mayor rendimiento en la piel (83.72%) comparado con la vejiga natatoria (69.14%).

Las pruebas de caracterización parcial indicaron a través del patrón electroforético (SDS-PAGE) y análisis espectrofotométricos (UV-vis-FTIR) que el colágeno de la piel y vejiga natatoria es de tipo I con una alta integridad y pureza.

La composición de aminoácidos en ambos colágenos presentó un perfil similar, pero con un mayor contenido de iminoácidos en el colágeno de la piel. La temperatura de desnaturalización (Td) fue más alta en la vejiga natatoria (32.19 °C) comparada con la piel (29.0 °C).

En general ambos colágenos mostraron altos rendimientos y una buena integridad, por lo tanto, la piel y vejiga natatoria de totoaba puede ser utilizada como una fuente potencial para la obtención de colágeno tipo I.

10. Recomendaciones

- Realizar un proceso de optimización durante la extracción de colágeno soluble en pepsina (CSP).
- Hacer comparación del rendimiento de colágeno soluble en pepsina (CSP) en diferentes tallas de totoaba.
- Continuar con la caracterización del colágeno obtenido.
- Determinar la capacidad para formar fibrillas del colágeno del colágeno obtenido.

11. Bibliografía

- AOAC International. 2000.** Official methods of analysis of AOAC International. 17^a edición. Gaithersburg, MD, USA, Asociación de Comunidades Analíticas.
- Ahmad, M., y Benjakul, S. (2010).** Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*). Food Chemistry, 120(3), 817-824.
- Ahmed, R., Getachew, A. T., Cho, Y.-J., y 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, 89, 44-51.
- Greenpeace, 2017.** Alertan de riesgos por posible autorización de pesca de totoaba. México. Available online: <https://www.greenpeace.org/archive-mexico/es/Prensa1/2017/Octubre/Alertan-de-riesgos-por-posible-autorizacion-de-pesca-de-totoaba/> Fecha de consulta: (Mar 29, 2019).
- Arranz-Martínez, E., Trillo-Sánchez-Redondo, G., Ruiz-García, A., y Ares-Blanco, S. (2010).** Prionopatías: las encefalopatías por priones. SEMERGEN - Medicina de Familia, 36(8), 443-448.
- Benjakul, S., Thiansilakul, Y., Visessanguan, W., Roytrakul, S., Kishimura, H., Prodpran, T., y Meesane, J. (2010).** Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagens from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus*). Journal of the Science of Food and Agriculture, 90(1), 132-138.
- Cequier Sánchez, E. C., Rodríguez, A. G. Ravelo y Zarate, R. (2008).** Dichloromethane as solvent for lipid extraction, lipid classes and fatty acid assessment from samples of different nature. Journal Agriculture and Food Chemistry, 56, 4297-4303.
- Chandra, M.V.; Shamasundar, B.A. (2015).** Rheological properties of gelatin prepared from the swim bladders of freshwater fish *Catla catla*. Food Hydrocoll. 2015, 48, 47-54.
- Cherfan, D., Verter, E. E., Melki, S., Gisel, T. E., Doyle, F. J., Scarcelli, G., Kochevar, I. E. (2013).** Collagen Cross-Linking Using Rose Bengal and Green Light to Increase Corneal Stiffness. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 54(5), 3426-33.
- CITES, 1977.** The first meeting of the Conference of the International Trade in Endangered Species of the Wild Fauna and Flora, Bene, Switzerland 1-26, Appendix I.
- Cisneros-Mata, Miguel-A., Montemayor-Lopez, G., Roman-Rodriguez, M. (1955).** Life History and Conservation of *Totoaba Macdonaldi*. Conserv. Biol. 9, 806-814.
- Creighton T. E. (1989).** Protein structure: a practical approach. En: C.T.E., Protein structure: a practical approach. 1, 355. Australia: 6082505.

- Cruz-López Honorio, Rodríguez-Morales Sergio, Enríquez Luis, Villarreal-Gómez Luis Jesús, True Conal D. and López Lus M. (2019).** Swim bladder of totoaba (*Totoaba macdonaldi*): isolation and characterization of collagen. Food Chemistry, *en revisión*.
- Duan, R., Zhang, J., Du, X., Yao, X., y Konno, K. (2009).** Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*). Food Chemistry, 112(3), 702-706.
- Edwards, H. G. M., Farwell, D. W., Holder, J. M., y Lawson, E. E. (1997).** Fourier-transform Raman spectroscopy of ivory: II. Spectroscopic analysis and assignments. Journal of Molecular Structure, 435(1), 49-58.
- Foegeding E.A. Foegeding, T.C. Lanier, H.O. Hultin Collagen O.R. Fennema (1996).** NE:1 Food chemistry (3rd ed.), Marcel Dekker, New York, 902-906.
- Gelse, K., Pöschl, E., Y Aigner, T. (2003).** Collagens—structure, function, and biosynthesis. Advanced Drug Delivery Reviews, 55(12), 1531-1546.
- Wolfgang Friess. (1998).** Collagen – biomaterial for drug delivery (Vol. 45). Eur J Pharm Biopharm. Pp: 113-136.
- Gustavson, K. H. (1955).** The Function of Hydroxyproline in Collagens. Nature, 175(4445), pp: 70-74.
- Heu, M. S., Lee, J. H., Kim, H. J., Jee, S. J., Lee, J. S., Jeon, Y.-J., Kim, J.-S. (2010).** Characterization of acid- and pepsin-soluble collagens from flatfish skin. Food Science and Biotechnology, 19(1), 27-33.
- Hoar, W.S.; Randall, D.J.; Donaldson, E.M. Fish physiology. (1983).** Volume IX, Reproduction. Part B, Behavior and fertility control; Academic Press, 1983; ISBN 9780080585307.
- Huang, Y.-R., Shiau, C.-Y., Chen, H.-H., y Huang, B.-C. (2011).** Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of balloon fish (*Diodon holocanthus*). Food Hydrocolloids, 25(6), 1507-1513.
- Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., y Tanaka, M. (2005).** Isolation and characterization of collagen from bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) skin. Journal of the Science of Food and Agriculture, 85(7), 1203-1210.
- Kadler K. E., Holmes, D. F., Trotter, J. A., y Chapman, J. A. (1996).** Collagen fibril formation. Biochemical Journal, 316(1), 1-11.
- Kaewdang, O., Benjakul, S., Kaewmanee, T., y Kishimura, H. (2014).** Characteristics of collagens from the swim bladders of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). Food Chemistry, 155, 264-270.
- Khong, N. M. H., Yusoff, F. M., Jamilah, B., Basri, M., Maznah, I., Chan, K. W., Nishikawa, J. (2018).** Improved collagen extraction from jellyfish (*Acromitus hardenbergi*) with increased physical-induced solubilization processes. Food Chemistry, 251, 41-50.
- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., y Tanaka, M.**

- (2005).** Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). Food Chemistry, 89(3), 363-372.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, London 227, DELAY, J. (1970). 680-685.
- Li, Z.-R., Wang, B., Chi, C., Zhang, Q.-H., Gong, Y., Tang, J.-J Ding, G. (2013a).** Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin and bone of Spanish mackerel (*Scomberomorous niphonius*). Food Hydrocolloids, 31(1), 10-113.
- Liao, W., Guanghua, X., Li, Y., Shen, X.R., Li, C. (2018).** Comparison of characteristics and fibril-forming ability of skin collagen from barramundi (*Lates calcarifer*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*). Int. J. Biol. Macromol. 2018, 107, 549-559.
- Liu, D., Liang, L., Regenstein, J. M., y 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.
- Liu, D., Zhang, X., Li, T., Yang, H., Zhang, H., Regenstein, J. M., y 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.
- Liu, H., Li, D., y Guo, S. (2007).** Studies on collagen from the skin of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Food Chemistry, 101(2), 621-625.
- Long, J., Hale, M., Mchenry, M., y Westneat, M. (1996).** Functions of fish skin: flexural stiffness and steady swimming of Longnose gar, *Lepisosteus osseus*. Journal of Experimental Biology, 199(10), 2139-2151.
- Mata-Sotres, J. A., Lazo, J. P., y Baron-Sevilla, B. (2015).** Effect of age on weaning success in totoaba (*Totoaba macdonaldi*) larval culture. Aquaculture, 437, 292-296.
- Minh Thuy, L. T., Okazaki, E., y Osako, K. (2014).** Isolation and characterization of acid-soluble collagen from the scales of marine fishes from Japan and Vietnam. Food Chemistry, 149, 264-270.
- Morimura, S., Nagata, H., Uemura, Y., Fahmi, A., Shigematsu, T., y Kida, K. (2002).** Development of an effective process for utilization of collagen from livestock and fish waste. Process Biochemistry, 37(12), 1403-1412.
- Muyonga, J. H., Cole, C. G. B., y 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.
- Nagai, T. (2000).** Isolation of collagen from fish waste material — skin, bone and fins. Food Chemistry, 68(3), 277-281.
- Nagai, T., Araki, Y., y Suzuki, N. (2002).** Collagen of the skin of Ocellate puffer fish (*Takifugu rubripes*). Food Chemistry, 78(2), 173-177.
- Newton, R., Telfer, T., y Little, D. (2014).** Perspectives on the Utilization of Aquaculture

- Coproduct in Europe and Asia: Prospects for Value Addition and Improved Resource Efficiency. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(4), 495-510.
- Pal, G. K., y Suresh, P. V. (2017).** Physico-chemical characteristics and fibril-forming capacity of carp swim bladder collagens and exploration of their potential bioactive peptides by in silico approaches. *International Journal of Biological Macromolecules*, 101, 304-313.
- Rigby B. J. 1968.** Amino acid composition and thermal stability of the skin collagen of the Antarctic ice-fish. *Nature*, 219, 166-167.
- Sadowska, M., Kołodziejska, I., y Niecikowska, C. (2003).** Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Chemistry*, 81(2), 257-262.
- Sascha H., Hermann E., Timothy D., Christiane H., Hartmut Wo., Wolfgang S., y Hanke T. (2007).** Ultrastructural Studies on the Collagen of the Marine Sponge *Chondrosia reniformis* Nardo.
- SEMARNAT-CONANP. 2007.** Programa de Conservación y manejo Reserva de la Biosfera Alto Golfo de California y Delta del Rio Colorado. México 386.
- Shahidi, F. (2007).** Maximising the value of marine by-products. Deterioration of marine biomass. Woodhead. Pp.37.
- Silva, Tatiane Ferreira da; Penna, Ana Lúcia Barretto. (2012).** Colágeno: características químicas y propiedades funcionales. *Revista del Instituto Adolfo Lutz*, 71(3), 530-539.
- Silva, T., Moreira-Silva, J., Marques, A., Domingues, A., Bayon, Y., y Reis, R. (2014).** Marine Origin Collagens and Its Potential Applications. *Marine Drugs*, 12(12), 5881–5901.
- Sinthusamran, S., Benjakul, S., y 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.
- Söderhäll, C., Marenholz, I., Kerscher, T., Rüschenhoff, F., Esparza-Gordillo, J., Worm, M., Lee, Y.-A. (2007).** Variants in a Novel Epidermal Collagen Gene (COL29A1) Are Associated with Atopic Dermatitis. *PLoS Biology*, 5(9), e242.
- Song, J. E., Jeon, Y. S., Tian, J., Kim, W. K., Choi, M. J., Carlomagno, C., y Khang, G. (2019).** Evaluation of silymarin/duck's feet-derived collagen/hydroxyapatite sponges for bone tissue regeneration. *Materials Science and Engineering*: 97, 347-355.
- Stark, Y.; Suck, K.; Kasper, C.; Wieland, M.; Griensven, M.; Scheper, T. (2006).** Application of collagen matrices for cartilage tissue engineering. *Exp. Toxicol. Pathol.* 57, 305-311.
- Tabakaeva, O. V., Tabakaev, A. V., y Piekoszewski, W. (2018).** Nutritional composition and total collagen content of two commercially important edible bivalve molluscs from the Sea of Japan coast. *Journal of Food Science and Technology*, (Vol. 55) 1-10.

- Usha, R., y Ramasami, T. (2004).** The effects of urea and n-propanol on collagen denaturation: using DSC, circular dichroism and viscosity. *Thermochimica Acta*, 409(2), 201–206.
- Veeruraj, A., Arumugam, M., y Balasubramanian, T. (2013).** Isolation and characterization of thermostable collagen from the marine eel-fish (*Evenchelys macrura*). *Process Biochemistry*, 48(10), 1592-1602.
- Wang, J., Pei, X., Liu, H., y 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.
- Wang, L., An, X., Xin, Z., Zhao, L., y Hu, Q. (2007).** Isolation and Characterization of Collagen from the Skin of Deep-Sea Redfish (*Sebastes mentella*). *Journal of Food Science*, 72(8), E450–E455.
- Wang, Z. L., Sun, L., Li, Y., y Li, N. (2015).** Relationship between elasticity and collagen fiber content in breast disease: A preliminary report. *Ultrasonics*, 57, 44–49.
- White, J. A., Hart, R. J., y Fry, J. C. (1986).** An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. *The Journal of automatic chemistry*, 8(4), 170-177.
- Ytrestoyl, T., Aas, T. S., y Asgard, T. (2015).** Utilisation of feed resources in production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. *Aquaculture*, 448, 365-374.
- Yu, F., Zong, C., Jin, S., Zheng, J., Chen, N., Huang, J., Ding, G. (2018).** Optimization of Extraction Conditions and Characterization of Pepsin-Solubilised Collagen from Skin of Giant Croaker (*Nibea japonica*). *Marine Drugs*, 16(1), 29.
- Zhang, M., Liu, W., y Li, G. (2009).** Isolation and characterisation of collagens from the skin of largefin longbarbel catfish (*Mystus macropterus*). *Food Chemistry*, 115(3), 826-831.
- Zhang, X., Ookawa, M., Tan, Y., Ura, K., Adachi, S., y 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.
- Zhang, Y., Liu, W., Li, G., Shi, B., Miao, Y., y Wu, X. (2007).** Isolation and partial characterization of pepsin-soluble collagen from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Food Chemistry*, 103(3), 906-912.
- Valenzuela- Quiñonez, F., García-de-León, F. J., De-Anda-Montañez, J. A., y Balart, E. (2011).** La Totoaba del Golfo de California ¿una especie en peligro de extinción? *Interciencia*, 36, 664-671.
- Zhao, W.-H., Chi, C.-F., Zhao, Y.-Q., Wang, B., Zhao, W.-H., Chi, C.-F., Wang, B. (2018).** Preparation, Physicochemical and Antioxidant Properties of Acid- and Pepsin-Soluble Collagens from the Swim Bladders of Miiuy Croaker (*Miichthys miiuy*). *Marine Drugs*, 16(5), pii: E161.