

OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE QUERATINA A PARTIR DE RESIDUOS DE LA INDUSTRIA ALIMENTICIA (AVÍCOLA), PLUMAS DE POLLO (*GALLUS GALLUS*), MEDIANTE LA ENZIMA NOVO PRO-D®



DAVID SANTIAGO CÓRDOBA ESTRELLA

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2018**

**OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE QUERATINA A PARTIR DE RESIDUOS DE
LA INDUSTRIA ALIMENTICIA (AVÍCOLA), PLUMAS DE POLLO (*Gallus gallus*),
MEDIANTE LA ENZIMA NOVO PRO-D®**

Trabajo de grado para optar al título de Químico

DAVID SANTIAGO CÓRDOBA ESTRELLA

**Director:
PhD. RICARDO BENÍTEZ BENÍTEZ**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2018**

NOTA DE ACEPTACIÓN:

Director _____
Ph.D. Ricardo Benítez Benítez.

Jurado _____
Dr. Alfonso Enrique Ramírez S

Jurado _____
Dra. Leidy Rocío Niño Camacho

Fecha y Lugar de Sustentación: Popayán, 28 de agosto del 2018

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico a mis padres John Córdoba y Paola Estrella, dos guerreros en todo el sentido de la palabra, quienes me enseñaron que con trabajo duro y disciplina uno es capaz de cumplir sus sueños.

Además, dedico este trabajo de grado a la memoria de mi bisabuela Clara Elisa Delgado quien en vida fue como una segunda madre para mí.

AGRADECIMIENTOS

A mi tía Blanca Moreno por brindarme el apoyo durante estos más de 5 años en la ciudad de Popayán y a mi abuela Aurelia delgado con quien siempre puedo contar y me ha apoyado durante todo este proceso.

A mi compañera, Juliana Bastidas quien me ayudó en momentos de crisis durante el desarrollo de este trabajo, esa mujer que soportó mi malgenio y me enseñó a ser mejor persona, a tener paciencia y a nunca dejar de luchar por mis sueños.

A el profesor Ricardo Benítez Benítez por guiarme durante todo este proceso y por todas sus atenciones y su valiosa colaboración con lo cual logre conseguir mis objetivos trazados.

A la Universidad del Cauca y al departamento de Química.

A todos mis amigos y compañeros por su apoyo y a todos los profesores que me brindaron su conocimiento.

A los jurados por su recepción y colaboración en el mismo.

Finalmente quiero agradecer a todas y cada una de las personas que de una u otra manera fueron partícipes y me brindaron su colaboración desinteresadamente en la realización de este trabajo.

¡Muchas gracias por todo!

CONTENIDO

	Pág.
1. RESUMEN	11
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
3. OBJETIVOS	14
3.1 OBJETIVO GENERAL	14
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
4. FUNDAMENTO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	15
4.1 GENERALIDADES DE LAS PLUMAS DE POLLLO	15
4.2 LA QUERATINA, CARACTERÍSTICAS Y APLICACIONES	16
4.2.1 Generalidades	16
4.2.2 Estructura	17
4.2.2.1 Estructura primaria	18
4.2.2.2 Estructura secundaria	19
4.2.2.3 Estructura terciaria	20
4.2.3 Enlaces e hidrólisis de la queratina	21
4.2.4 Aplicaciones	22
4.3 ASPECTOS MEDIO AMBIENTALES Y SOCIECONÓMICOS	23
4.3.1 Aspecto Ambiental	23
4.3.2 Aspecto socioeconómico	25
4.4 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE QUERATINAS	26
4.4.1. Extracción mediante el método de Shindai	26
4.4.2 Reducción de la queratina con sulfuro de sodio.	27
4.4.3 Hidrólisis con líquidos iónicos	27
4.4.4 Hidrólisis con agua subcrítica	27
4.4.5 Hidrólisis microbológica.	28
4.5 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA Y LA ENZIMA NOVO PRO-D®	28
5. METODOLOGÍA	31
5.1 CONSECUCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA MATERIA PRIMA	31
5.2 ANÁLISIS PROXIMAL A LA MATERIA PRIMA	31
5.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	32
5.4 OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE QUERATINA	32
5.5 CARACTERIZACIÓN DE LA QUERATINA EXTRAÍDA	35

6. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	36
6.1 ANÁLISIS PROXIMAL A LA MATERIA PRIMA	36
6.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	39
6.3 PERFIL DE AMINOÁCIDOS Y DIGESTIBILIDAD	41
6.4 OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE QUERATINA	43
6.5 EFECTO DE LA GRASA SOBRE LA HIDRÓLISIS	50
6.6 CARACTERIZACIÓN DE LA QUERATINA EXTRAÍDA	52
7. CONCLUSIONES	56
BIBLIOGRAFIA	57
ANEXOS	61
Anexo 1	61
Anexo 2	62
Anexo 3	63
Anexo 4	65
Anexos protocolos	66

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1	Factores experimentales para la Optimización 32
Tabla 2	Diseño experimental 33
Tabla 3	Resultados experimentales para el análisis proximal \pm desviación estándar. 38
Tabla 4	Resultados experimentales para la Actividad enzimática 40
Tabla 5	Perfil de aminoácidos y digestibilidad in vitro para la muestra de estudio e hidrolizado. 42
Tabla 6	Resumen del porcentaje de extracción de queratina para la hidrólisis enzimática. 44
Tabla 7	Resumen Estadístico para Porcentaje de extracción Diseño experimental 45
Tabla 8	Análisis de Varianza (ANOVA) para Porcentaje de extracción en el diseño experimental 46
Tabla 9	Valores para experimentos adicionales con tiempo y relación E/S altos 49
Tabla 10	Comparación de PE de muestras desengrasadas y sin desengrasar 51
Tabla 11	Valores óptimos para los factores independientes para el diseño experimental 51
Tabla 12	Valores óptimos establecidos y experimentales para el diseño experimental 51
Tabla 13	Resultados experimentales de PE, para la predicción en el diseño experimental 52

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1	Pluma de pollo y sus partes. 16
Figura 2	Esquema de la estructura de la queratina en la pluma 17
Figura 3	Enlace disulfuro-Cistina 17
Figura 4	Estructura de la fibra de queratina 18
Figura 5	Estructura primaria de la proteína 18
Figura 6	Estructura secundaria, en α -hélice y en hoja β -plegada, de la queratina 19
Figura 7	Arreglos espaciales de la estructura β -laminar plegadiza 20
Figura 8	Estructura terciaria de la queratina 20
Figura 9	Hidrólisis de la queratina 22
Figura 10	Generación de residuos en fase de beneficio por 5000 pollos 24
Figura 11	Reacción de reducción del enlace disulfuro de la queratina con 2- mercaptoheptanol. 26
Figura 12	Reacción de reducción del enlace disulfuro de la queratina con Na_2S 27
Figura 13	Mecanismo catalítico de serinproteasa 30
Figura 14	Tratamiento de muestras, lavado, secado, molido y pulverizado. 31
Figura 15	Diagrama de Flujo, Extracción de queratina 34
Figura 16	Montaje general del sistema de extracción 34
Figura 17	Curva de calibración de Tirosina (Tyr) por mínimos cuadrados, las barras indican la desviación estándar. 39
Figura 18	Gráfico de probabilidad Normal para el diseño experimental 45
Figura 19	Diagrama de Pareto estandarizado para el porcentaje de extracción en el diseño experimental. 47
Figura 20	Grafica de efectos principales para el diseño experimental 48
Figura 21	Superficie de respuesta del porcentaje de extracción para el diseño experimental, pH vs tiempo. 49
Figura 22	Superficie de respuesta del porcentaje de extracción para el diseño experimental, pH vs tiempo 50
Figura 23	Queratina precipitada mediante el punto isoeléctrico 52
Figura 24	Comparación del espectro infrarrojo de la queratina obtenida por pl de las plumas de pollo con un patrón de queratina. 53
Figura 25	Espectros Uv-Vis de soluciones del patrón de queratina y queratina de plumas de pollo. 54
Figura 26	Termograma de la queratina precipitada por PI 55

INDICE DE ECUACIONES

		Pág.
Ecuación 1	Porcentaje de Humedad (%H).	36
Ecuación 2	Porcentaje de Cenizas en base seca (%Cbs).	36
Ecuación 3	Porcentaje de grasa en base seca (%Gbs).	36
Ecuación 4	Porcentaje de nitrógeno en base seca (%Ntotal).	37
Ecuación 5	Porcentaje de proteína en base seca (%Pbs).	37
Ecuación 6	Porcentaje de fibra cruda en base seca (%Fbs).	37
Ecuación 7	Porcentaje del extracto libre no nitrogenado en base seca (%ELNbs).	37
Ecuación 8	Cambio en la absorbancia en la muestra de ensayo, diferencia entre la absorbancia de la muestra de ensayo y la absorbancia del blanco de muestras.	40
Ecuación 9	Ecuación para la determinación de la Actividad enzimática en U/mL	40
Ecuación 10	Factor de conversión, actividad enzimática en unidades por mg de enzima.	40
Ecuación 11	Porcentaje de nitrógeno extraído (%Next).	43
Ecuación 12	Porcentaje de proteína extraída (%Pext).	43
Ecuación 13	Porcentaje de extracción (%E).	43

1. RESUMEN

Las queratinas son una familia de proteínas estructurales que se pueden aislar a partir de una gran variedad de tejidos animales con función protectora, entre estos se encuentran las plumas de pollo, las cuales son un subproducto de la industria avícola que posee un alto porcentaje de proteína en su composición (80% aproximadamente%) ^[1]; siendo la queratina su principal componente. Las queratinas han sido objeto de investigaciones como biomateriales durante más de tres décadas ^[2] y se ha reportado que los hidrolizados de proteína poseen propiedades fisicoquímicas deseables que se aprovechan en la industria ^[3].

El sector avícola en Colombia está en un constante crecimiento y por ende es de esperarse que la cantidad de sus subproductos aumente de la misma manera, en este contexto, con este estudio se busca explorar la recuperación de biomoléculas tales como hidrolizados de proteína (queratina). Más aun, se ofrece la oportunidad de dar a conocer la funcionalidad de una nueva propuesta más amigable ambientalmente y más eficiente como lo es la extracción via enzimática. La actividad enzimática es específica, es decir que se debe determinar para cada tipo de enzima y sustrato; si se trabaja en condiciones no adecuadas (pH, Temperatura, entre otros) se corre el riesgo de la inactivación de la enzima. De aquí que sea necesario la optimización del proceso de extracción.

Aplicando el programa de superficie de respuesta se logró optimizar el porcentaje de extracción de queratina, el cual fue eficiente y con un valor promedio de 92,759%, mediante hidrolisis enzimática con la enzima Novo Pro-D[®] a partir de plumas de pollo; empleando las variables de pH, Temperatura, tiempo y relación enzima-sustrato. También se caracterizó la queratina obtenida. De esta manera, se consiguió implementar una extracción más amigable con el medio ambiente que las extracciones convencionales, además de que este proceso de extracción es relativamente simple y eficiente.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A nivel mundial se generan millones de toneladas de residuos avícolas como subproducto poco aprovechado en las plantas de procesamiento, 18,5% de los residuos en la industria avícola corresponde a las plumas, estos residuos no reciben un tratamiento específico y se desperdician arrojándolos como desecho; presentándose así un problema de contaminación ambiental. En particular, las plumas de pollo poseen un gran contenido de queratina ^[1], lo que, de utilizarse, representaría un valor agregado a estos residuos para ser aprovechados industrialmente.

En la producción colombiana, el subsector avícola aporta un porcentaje significativo del 10,5% del Producto Interno Bruto nacional (PBI) constituyéndose en generadores directos e indirectos de empleos, mostrándose de esta manera la gran importancia de este subsector a nivel nacional. La Federación Nacional de Avicultores (FENAVI) reporta un elevado consumo de pollo de 32,2 kg/persona en el año 2017 en Colombia ^[4] (FENAVI-Consumo per cápita, 2018). Por su parte, en el Cauca la empresa pollos conquistador (Agrícola mercantil del Cauca AGRICCA S.A) ubicada en el municipio de Cajibío, Departamento del Cauca, en el kilómetro 11, vía Popayán – Piendamó, produce 698 kg de plumas húmedas por cada 5000 pollos sacrificados aproximadamente, esta misma empresa únicamente empaqueta las plumas en costales de fibra, para su posterior transporte a predios donde son enterradas, no se presenta ningún uso posterior para este residuo ^[5]. La industria avícola en general está en un constante crecimiento, esto genera también un incremento en los subproductos, por lo que es necesario buscar alternativas para el control y manejo de estos y así evitar el constante deterioro ambiental. Las plumas como residuo de la industria avícola no reciben un tratamiento adecuado, simplemente se arrojan como un desecho, convirtiéndose en una fuente generadora de contaminación ambiental, esto debido a que su descomposición genera olores desagradables los cuales atraen moscas, roedores y otros animales indeseables que finalmente terminan convirtiéndose en vectores naturales de contaminación, lo que se traduce en un problema de salud pública. Sin embargo, el alto porcentaje de proteína (queratina) que poseen las plumas de pollo en su composición hace que estas sean potencialmente aprovechables como fuente proteica, de tal manera que se reduzcan las cantidades de residuos y se

ayude a controlar los problemas de contaminación ambiental causados por estos, dándole un valor agregado a estas. La extracción de queratina debe realizarse mediante métodos amigables con el medio ambiente y que en lo posible no impliquen cargas contaminantes, es por esto que se optó por elegir a la hidrólisis enzimática utilizando la enzima Novo Pro-D[®] como el método adecuado para el tratamiento de los residuos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

3.1.1 Determinar las condiciones óptimas de extracción de queratina mediante hidrólisis enzimática con Novo Pro-D[®], para el aprovechamiento de residuos avícolas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Realizar el análisis proximal a una muestra de plumas de pollo con el fin de conocer su composición.

3.2.2. Aplicar el programa estadístico de superficie de respuesta en la optimización del porcentaje de extracción empleando las variables pH, tiempo y relación enzima-sustrato.

3.2.3. Caracterizar la queratina extraída mediante FTIR, Uv-Vis y TGA. Además de analizar estadísticamente los datos obtenidos.

4 FUNDAMENTO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

4.1 GENERALIDADES DE LAS PLUMAS DE POLLLO

La pluma es una estructura epidérmica que consta de un eje central rígido llamado raquis con paletas más suaves en cada lado, la paleta se compone de numerosas ramas laterales llamadas barbas. Se sabe que las plumas están compuestas mayormente por queratina y que está por lo general representa aproximadamente 90% de su peso. Pese a que esta proteína posee un bajo valor biológico nutricional puede tener interesantes aplicaciones cosmetológicas, agrícolas, entre otras ^[6].

Las plumas son unas de las estructuras constituidas por queratina más complejas de los vertebrados. Ellas presentan numerosas funciones de vital importancia para la vida y desarrollo de las aves como la habilidad de volar y la regulación de la temperatura, además presentan tienen también otras funciones relacionadas con su color y su vistosidad, como el reconocimiento entre los miembros de la misma especie, el camuflaje, la diferenciación de sexos y el cortejo. ^[7] Su estructura es ramificada ^[8]. La Figura 1 muestra la estructura de una pluma común y sus partes; el cálamo (3) es la parte con la que se inserta en la epidermis del ave, el raquis (4) es el eje del cual se desprenden las barbas (2) que forman el estandarte (1). Estas constituyen cerca del 10% del total del peso de un pollo y son el principal subproducto de la industria avícola. Su composición es aproximadamente 91% proteína, 1% lípidos y 8% agua ^[9], el porcentaje de proteína corresponde a la β -queratina ^[7]. Comúnmente se descartan como desperdicio convirtiéndose en un problema ambiental por su difícil disposición y el desconocimiento de procesos de manufactura para procesarlas ^[10].



Figura 1. Pluma de pollo y sus partes ^[35].

Anualmente en el mundo se producen más de 78 millones de toneladas de carne de pollo, de las cuales Colombia produce más de 1 millón ^[11], posicionando a la industria avícola como uno de los sectores de producción agroindustrial más prósperos del país con un crecimiento anual del 10% ^[12]. Este crecimiento acarrea una alta generación de desperdicios por la etapa de sacrificio como picos, plumas y restos de piel del pollo. Cerca del 10% del peso del pollo son plumas y este es uno de los principales residuos de esta industria; sin embargo, gracias a su alta concentración de β -queratina, las plumas de pollo son la principal fuente de este material en el mundo, convirtiéndolas en un material valioso para el desarrollo de nuevos productos.

4.2 LA QUERATINA, CARACTERÍSTICAS Y APLICACIONES.

4.2.1 Generalidades

La queratina es una proteína que está muy extendida en la naturaleza, se puede encontrar en la piel, pelo y uñas además de encontrarse en la lana, las plumas, pezuñas, cuernos, etc. En la Figura 2 se muestra un esquema general de la queratina en la pluma, la cual es nuestra materia prima de interés.

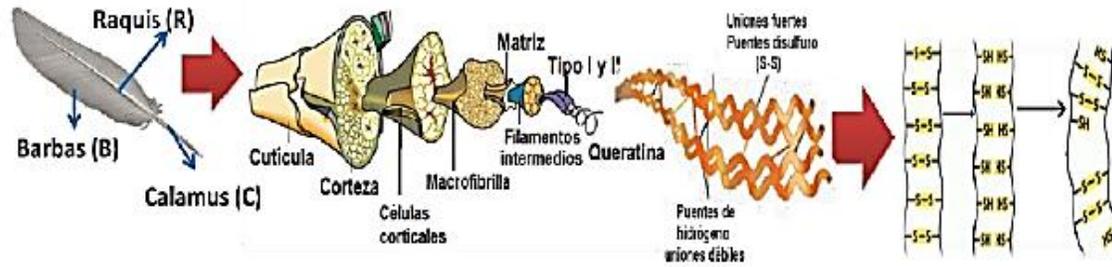


Figura 2. Esquema de la estructura de la queratina en la pluma ^[36].

Esta proteína es insoluble en los solventes que disuelven normalmente proteínas como alcoholes y cetonas, contiene un alto contenido de cistina con una concentración aproximada del 3% ^[13], la cual es un dímero de cisteínas que se enlazan por un puente disulfuro o enlace reticulado, como se muestra en la Figura 3. Las plumas contienen alrededor de 7% de cisteína en la queratina ^[11]. Este aminoácido le confiere cristalinidad, resistencia y cohesión; pues logra agrupar a la queratina en matrices de microfibras entre 72 y 76 Å de diámetro y separadas de 86.5 a 97.5 Å una de otra ^[12].

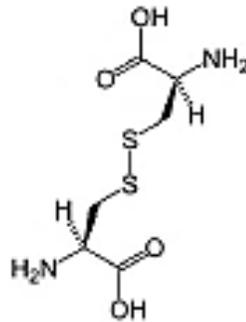


Figura 3. Enlace disulfuro-Cistina ^[37].

4.2.2 Estructura

La queratina es una proteína que se presenta en forma de microfibrillas, como si fuesen una maroma o cuerda. Las proteínas siempre están formadas por cadenas de aminoácidos que se enlazan entre sí formando fibrillas. (Figura 4). La Queratina está compuesta básicamente por un aminoácido azufrado (cisteína). Las Queratinas duras contienen un 15 o un 18% de azufre, mientras que las blandas sólo tienen un 2 y un 4% ^[14].

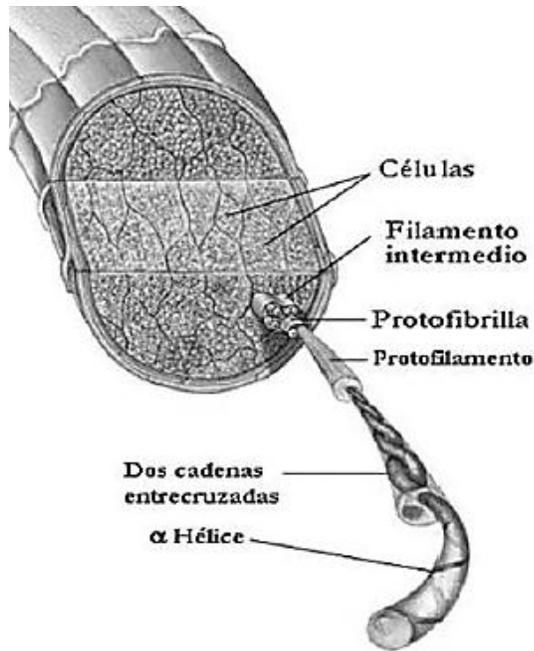


Figura 4. Estructura de la fibra de queratina ^[14].

Debido a las interacciones moleculares la queratina presenta dos configuraciones: la α -queratina que presenta forma de hélice y es característica del cabello humano y la β -queratina que es una estructura laminar plegada y se presenta en cuernos, uñas, garras y plumas. Las queratinas- α pueden presentar también láminas- β , aunque en menor proporción que las queratinas- β . Así mismo las queratinas- β presentan también hélices- α . Esto hace que esta clasificación de las queratinas sea controvertida.

4.2.2.1 Estructura primaria

Esta es fundamental para la forma tridimensional de la proteína, cualquier modificación en la secuencia de aminoácidos podría ocasionar un cambio en la estructura tridimensional y afectará la función biológica ^[13].

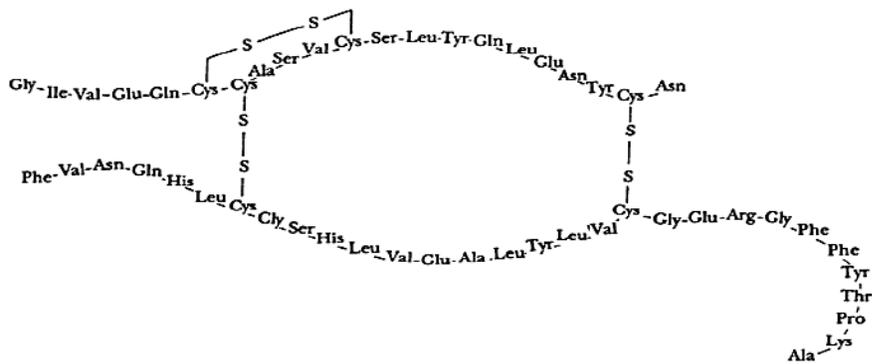


Figura 5. Estructura primaria de la proteína ^[38].

Los aminoácidos más abundantes presentes en la queratina son: Glicina 21,5% (Gli), Fenilalanina 3,9% (Fen), Alanina 11% (Ala), Ácido aspártico 9,3% (Asp), Cisteína 12,2% (CiSH), Lisina 7,3% (Lis), Prolina 2,3% (Pro), Valina 4,2% (Val), Leucina 3.2% (Leu), Isoleucina 1,2% (Ile) Treonina 4,8%(Tre), Otras.19, 1% [11].

4.2.2.2 Estructura secundaria

A medida que la cadena de aminoácidos de queratina se va ensamblando, empiezan a tener lugar interacciones entre los diversos aminoácidos de la cadena. Pueden formarse puentes de hidrógeno, entre el hidrógeno del amino de un aminoácido y el oxígeno del carboxilo de otro. (Figura 6)

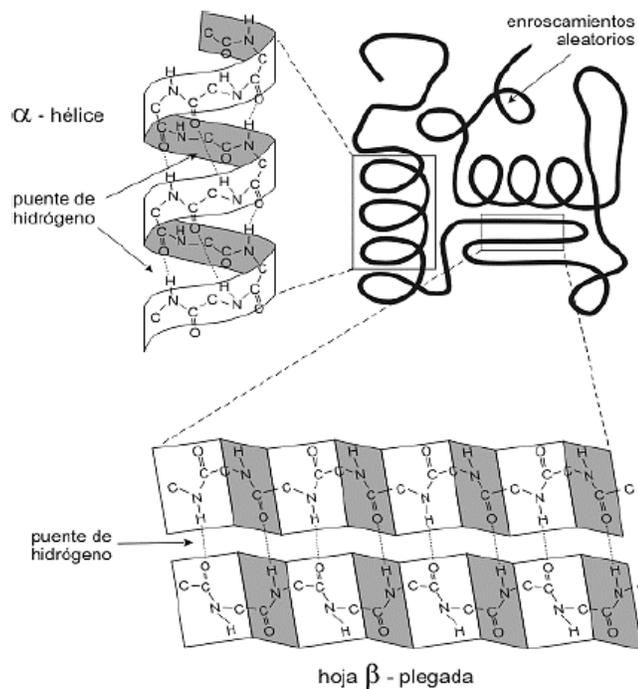


Figura 6. Estructura secundaria, en α -hélice y en hoja β -plegada, de la queratina [38].

La Figura 7 muestra los arreglos espaciales de la estructura beta de la queratina. En ella se observa que las cadenas peptídicas se proyectan de forma inversa por encima y debajo de una cadena eje y que las cadenas se enlazan por puentes de hidrógeno para formar la estructura laminar. La conformación beta se presenta en dos configuraciones, la primera la Figura 7a estructura paralela y la segunda la Figura 7b estructura antiparalela. Las plumas presentan la estructura antiparalela, la que aporta resistencia mecánica debido a su plegamiento a través de puentes de hidrógeno [15] y la hace

químicamente no reactiva ^[13], esta se muestra en la Figura 7c.

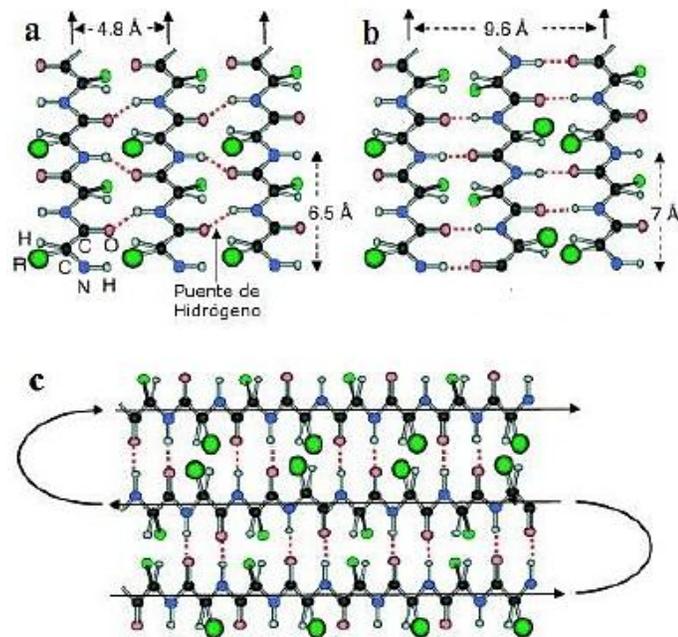


Figura 7. Arreglos espaciales de la estructura β -laminar plegadiza. (a) Estructura paralela, (b) Estructura antiparalela y (c) Plegamiento de la cadena beta antiparalela ^[38].

4.2.2.3 Estructura terciaria

Debido a la interacción de los grupos R de los aminoácidos, la cadena polipeptídica se pliega determinando una intrincada estructura tridimensional. (Figura 8)

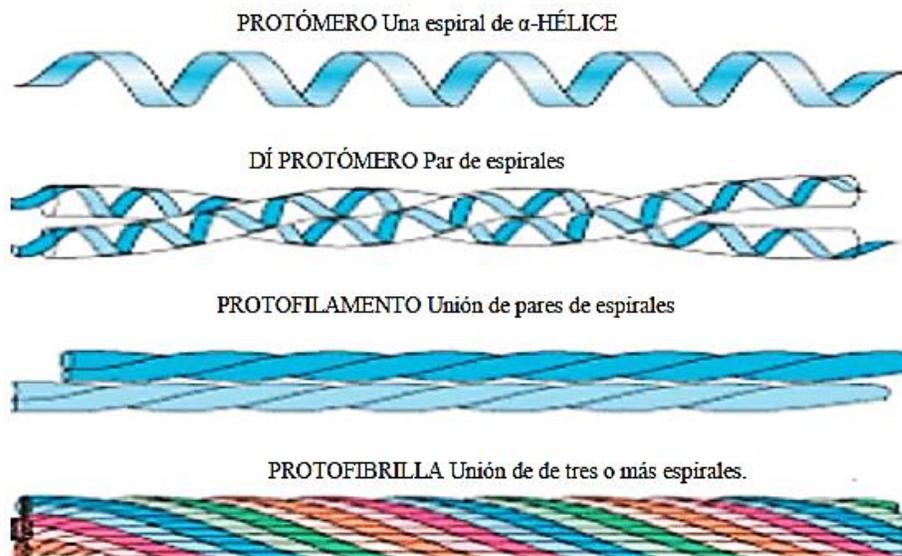


Figura 8. Estructura terciaria de la queratina ^[38].

Los protómeros de queratina se unen entre sí para formar dímeros. El dímero es el primer precursor de la gran molécula de la queratina en el que entran en juego varias proteínas. La unión no tiene lugar de cualquier manera, sino de una forma muy concreta: una subunidad ácida se unirá con una subunidad básica. De esta forma, la macromolécula acabará teniendo la misma proporción de subunidades básicas que de subunidades ácidas. Posteriormente, dos dímeros se unirán entre sí para formar tetrámeros. Multitud de tetrámeros se unen entre sí, unos detrás de otros, dando lugar a los protofilamentos, varios protofilamentos se unen entre sí, en grupos de unos cuatro protofilamentos, formando una protofibrilla, a partir de estas protofibrillas bien cohesionadas se formarán las grandes moléculas de queratina uniéndose muchas subunidades y torsionándose formando un trenzado ^[15].

4.2.3 Enlaces e hidrólisis de la queratina

La queratina presenta propiedades exclusivas como proteína debido a la presencia de enlaces tales como:

- Enlaces amídicos: Unen un aminoácido con otro para formar la cadena principal, son muy sólidos y solo se rompen con soluciones acuosas concentradas de ácidos y bases fuertes.
- Puentes salinos: se forman entre los grupos de ácidos y básicos de las cadenas laterales. Cuando estos grupos sobrantes no forman enlace amídico, están cerca uno del otro, se origina una atracción entre sus cargas o atracciones electromagnéticas.
- Enlaces di sulfuro: es la unión que existe entre los dos átomos de azufre de la molécula de cistina. Esta unión es fuerte y en la molécula de alfa-queratina suele existir un puente de este tipo cada cuatro vueltas de la espiral.
- Puentes de hidrógeno: se originan por la atracción de átomos con polaridad negativa al hidrógeno con polaridad positiva. Por estos puentes las cadenas no son rectilíneas sino helicoides, girando sobre sí misma como una cinta enrollada ^[16].

La queratina con agua da una hidrólisis de los enlaces disulfuro de la cisteína para producir la cisteína (tiol) y ácido sulfónico. (Figura 9)

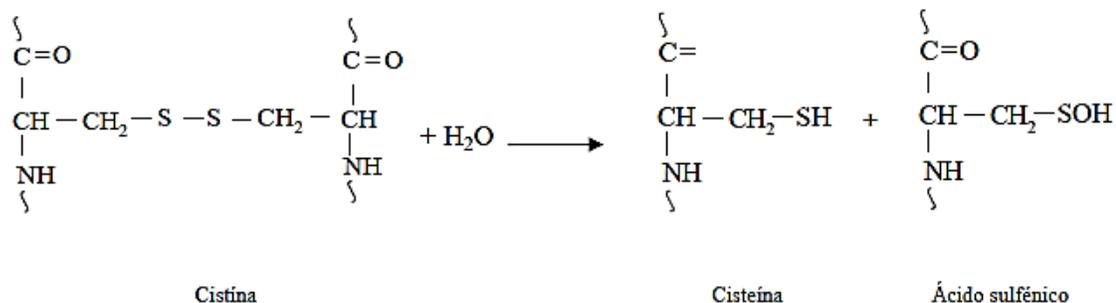


Figura 9. Hidrólisis de la queratina

4.2.4 Aplicaciones

En general, las proteínas son polímeros capaces de promover enlaces intra e intermoleculares, permitiendo que los materiales resultantes tengan una gran variación en sus propiedades funcionales. La queratina nativa es insoluble en agua y en solventes orgánicos, pero pese a su alta estabilidad química mediante tratamientos esta puede ser digerida mediante técnicas químicas o enzimáticas. La hidrólisis de esta proteína puede liberar aminoácidos hidrosolubles con lo cual puede resultar en un líquido cremoso con aplicaciones industriales. La posibilidad de hidrolizar esta sustancia podría ayudar en la consecución de un producto útil para productos donde se requiera gran cantidad y variedad de aminoácidos, brindando una alternativa de uso a esta dura y fibrosa estructura de los tejidos ^[17]. Entre algunas de sus posibles aplicaciones esta:

- **En cosmetología**

La queratina es parte de muchos tratamientos cosméticos capilares, protege el interior del cabello, influye en el color y en el brillo, protegiéndolo de los factores mecánicos, químicos o ambientales que le afectan ^[16].

- **En la industria textil**

La queratina, se usa como material de refuerzo en la fabricación de polímeros industriales, tales como: los polietilenos y los polipropilenos, en la producción de pasta de papel o cartón y la fabricación de biomateriales o materiales biomédicos, entre otros ^[18].

- **En la industria alimenticia.**

La queratina, contenida en las plumas, es un recurso alimenticio potencial. Luego de un proceso hidrolítico, de estos residuos, ellos se transformarán en una proteína digestible, que es útil como concentrado proteico para rumiantes, ya que optimiza el índice de

crecimiento del ganado de engorde y también supe las necesidades de proteína en ganado lechero. Como se extrae de una fuente natural, no contiene toxinas e inhibidores del crecimiento, pueden ser usada en dietas balanceadas sin limitaciones nutricionales ^{[19], [20]}.

- **En la industria agrícola.**

La queratina, presente en las plumas es un recurso adecuado para la elaboración del Compost (proceso de degradación microbiológico aerobio de materiales orgánicos realizado en condiciones controladas, en el que debido a la actividad microbiana se obtiene un abono orgánico) que, en conjunto con una mezcla de materiales fecales, orina, tierra y restos vegetales permiten el proceso de compostaje, permitiendo que la queratina lentamente se degrade y se convierta en una sustancia de fácil biodegradación, contribuyendo al desarrollo de los microorganismos que enriquecerán el suelo con nitrógeno y fósforo ^[21].

4.3 ASPECTOS MEDIO AMBIENTALES Y SOCIECONÓMICOS

4.3.1 Aspecto Ambiental

Las plumas representan el 18.5% de los residuos obtenidos en la industria avícola, sin embargo, cuando estos residuos simplemente se arrojan como desecho se convierte en un factor de contaminación, principalmente porque su descomposición se convierte en un foco de contaminación ambiental y un problema sanitario, por el contrario, si esta se aprovecha debidamente, representa una fuente más de ingresos ^[22]. En el departamento del Cauca, la empresa pollos conquistador (Agrícola mercantil del Cauca AGRICCA S.A) produce 698 kg de plumas húmedas por cada 5000 pollos sacrificados ^[5] (figura 10) , esta misma empresa únicamente empaca las plumas en costales de fibra, para su posterior transporte a predios donde son enterradas, no se presenta ningún uso posterior para este residuo, se considera como un punto crítico de contaminación, puesto que su descomposición atrae a las aves carroñeras, moscas, las cuales pueden ser vectores de enfermedades peligrosas tanto para el hombre como para las aves de los galpones, por otra parte, se generan olores que pueden ser molestos para la comunidad.

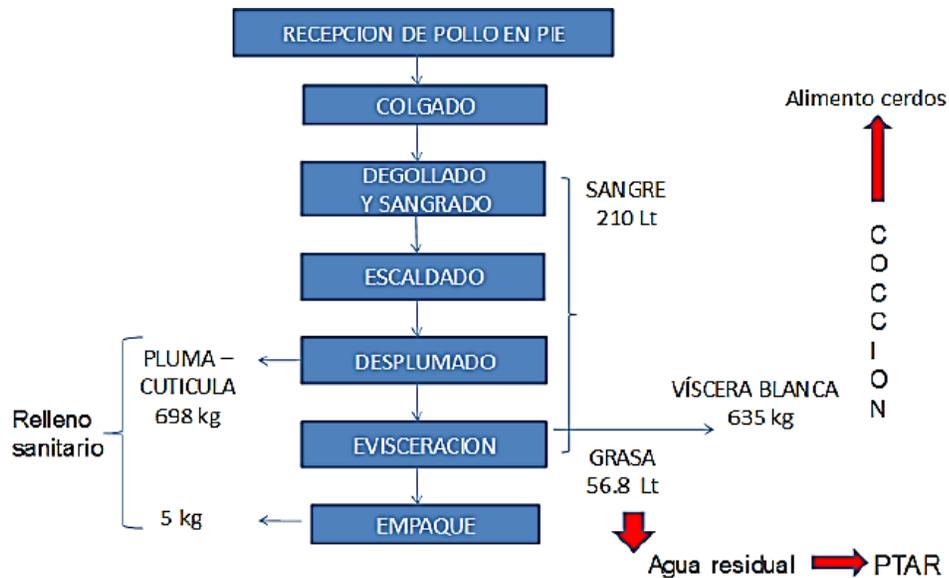


Figura 10. Generación de residuos en fase de beneficio por 5000 pollos ^[5].

En el procesamiento de los pollos, el agua se utiliza principalmente para el desplumado, el lavado antes y después de la evisceración, refrigeración, limpieza y desinfección de equipos e instalaciones, y para el enfriamiento de equipos mecánicos, tales como compresores y bombas ^[23]. El agua residual producida contiene una variedad de contaminantes orgánicos e inorgánicos, que finalmente desembocan en cuerpos de aguas tales como, ríos, mares y océanos.

Como se observa en la figura 10, las plumas de pollo son llevadas a rellenos sanitarios donde simplemente se entierran ^[5]. Esto tiene sus ventajas, siempre y cuando se realice este proceso de manera controlada como, por ejemplo:

la aplicación de los residuos al suelo puede tener un efecto positivo en la fertilidad del suelo, lo que implica un aumento de materia orgánica, actividad enzimática y población microbiana, además de esto estabiliza los agregados del suelo, reduce una posible erosión, mejora la estructura del suelo debido a la formación de compuestos organominerales, aumenta la capacidad de retención del agua y favorece el drenaje del agua permitiendo tener un suelo más aireado, es decir un suelo oxidativo y no reductor. Sin embargo, si las cantidades enterradas son excesivas, es decir, por encima de la capacidad receptora del suelo se pueden presentar problemas como mineralización de la proteína presente en la pluma produciendo como residuo nitratos (NO_3^-), que son especies oxidadas del nitrógeno, algunos de estos son absorbidos por las plantas, pero

si están en exceso no son absorbidos por las plantas y se convierten en fuente potencial de contaminación de aguas subterráneas mediante la lixiviación ^[24].

Por este motivo es necesario el control del aporte de las plumas al suelo, y para ello se deben tener en cuenta las propiedades físicas del suelo como la permeabilidad, su textura, las condiciones climáticas, el tipo de cultivo y el momento de aplicación de la dosis.

4.3.2 Aspecto socioeconómico

En Colombia la Federación Nacional de Avicultores de Colombia (FENAVI) reporta un elevado consumo de pollo, 32,2 kg/ persona, en el año 2017 (FENAVI-Consumo per cápita, 2018) ^[25]. De aquí cabe resaltar las grandes cantidades de residuos sólidos que se generan en esta industria, lo cual genera que estas se conviertan en fuentes de contaminación ambiental, si los residuos no se tratan adecuadamente. La industria avícola no presenta un manejo completamente adecuado de los residuos de plumas, esto puede afectar tanto al entorno humano como rural y agrario. Aunque esta industria es una fuente generadora de empleo también presenta algunos inconvenientes en cuanto al control del residuo de plumas de pollo, como se mencionó anteriormente, estos residuos pueden terminar enterrados bajo el suelo, en cuerpos de agua o simplemente dejados en espacios abiertos sin ningún tratamiento, afectando directamente la calidad de vida de los habitantes, debido a emisión de ruidos, olores, reproducción de plagas como ratas, moscas, larvas entre otros. Por otro lado, y desde un punto de vista agrario, las plumas se pueden tratar de manera adecuada para la formación de abono orgánico de alto valor fertilizante, rico en proteína, lo que se puede considerar un impacto positivo siempre y cuando dicho fertilizante se aplica de manera adecuada. Por otro lado, una carga elevada de plumas de pollo puede aumentar el riesgo de transmisión de enfermedades por medio de vectores naturales, lo que supone un riesgo sanitario más que un riesgo para el medio ambiente ^[24].

Por lo anterior, es necesario generar producciones más limpias, cuyo objetivo principal sea el aprovechamiento de los recursos naturales, siempre y cuando, haya reciprocidad con el medio ambiente, de manera sostenible, con un máximo de beneficio sin alterar su composición, y a su vez reducir el daño que este beneficio pueda causar al ambiente, a través de diferentes prácticas que incluyen la disminución, recuperación, reutilización y

aprovechamiento, de los residuos que se generan en cada etapa del proceso.

4.4 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE QUERATINA

En la literatura se reportan diversos métodos para hidrolizar las plumas de pollo con la acción de bases, ácidos fuertes, el uso de agua saturada a alta presión, enzimas y microorganismos. Todos ellos se enfocan en aumentar la digestibilidad de las plumas y la reactividad de las mismas según su uso final [26]. De los métodos mencionados anteriormente ninguno se ha optimizado con propósitos industriales. Brevemente, algunos de estos métodos de hidrólisis se describen a continuación:

4.4.1. Extracción mediante el método de Shindai

Uno de los métodos más empleados para la extracción de queratina en diferentes matrices es el método de Shindai tradicional. Utiliza una mezcla extractora de 25,0 mM Tris-HCl (pH 8,5), 2,6 M de tiourea, 5,0 M de urea, y el 5,0 % de 2-mercaptoetanol [24]. Esta mezcla es reductora, que transforma los enlaces disulfuros de la cistina en cisteína (Figura 11), posibilitando la solubilización de la queratina. El método Shindai, desarrollado en 2002 es conveniente para la extracción de proteínas a partir de materias primas desengrasadas, con calentamiento a 50°C durante 1-3 días.

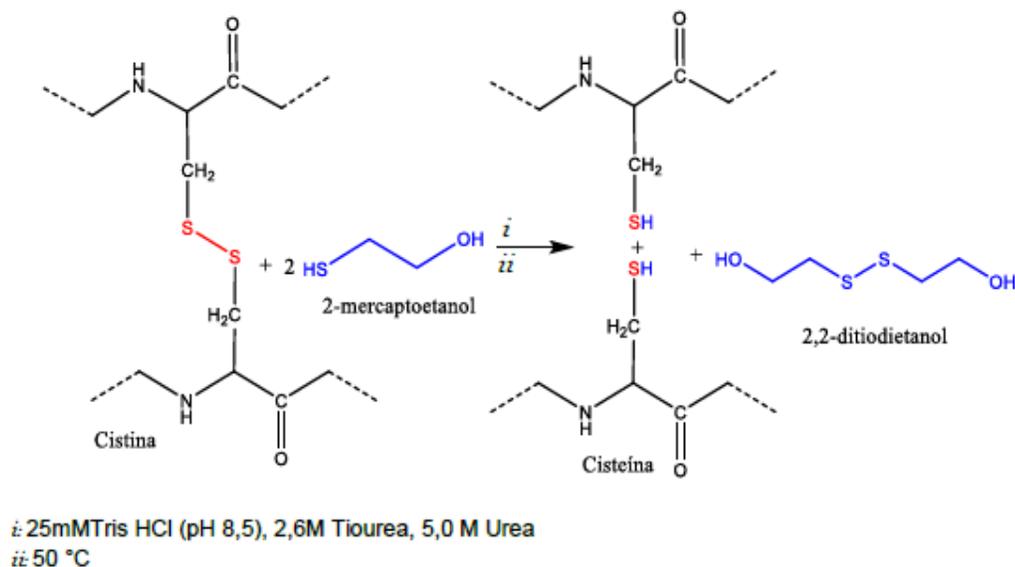


Figura 11. Reducción del enlace disulfuro de la queratina con 2- mercaptoheptanol [24].

4.4.2 Reducción de la queratina con sulfuro de sodio.

Con el Na_2S se favorece la degradación de la queratina, mediante las siguientes reacciones consecutivas: Cuando el Na_2S se disuelve en agua, se produce el NaHS y el medio es básico el NaHS reduce la cistina a cisteína.

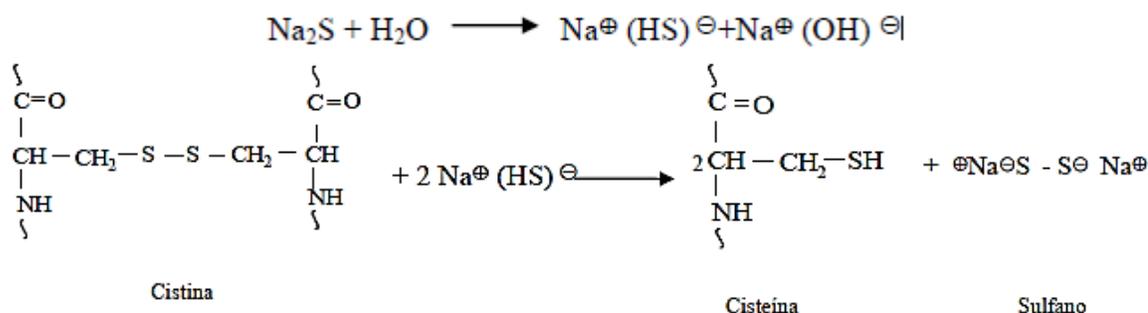


Figura 12. Reacción de reducción del enlace disulfuro de la queratina con Na_2S [39].

Este método facilita el rompimiento de los enlaces de disulfuro, que acompañado con un tratamiento con hidróxido de sodio NaOH genera la hidrólisis de la proteína. Al romper los enlaces que caracterizan la estructura de la queratina presente en las plumas de pollo, esta se puede convertir en una proteína soluble [16].

4.4.3 Hidrólisis con líquidos iónicos

La queratina se extrae de las plumas con el uso de 1-hidroxietil-3-metilimidazolio di(trifluorometanosulfonil) amida ($[\text{HOEMIm}][\text{NTf}_2]$); la queratina que se hidroliza es soluble en agua, mientras que el líquido iónico es inmisible. El rendimiento que se alcanza es 21% a las condiciones de operación 1:1 peso plumas a NaHSO_3 y 1:40 plumas a líquido iónico a 80 °C durante 4 horas. Los resultados muestran que $[\text{HOEMIm}][\text{NTf}_2]$ es eficiente como catalizador y solvente de plumas; además se recupera el 95% de $[\text{HOEMIm}][\text{NTf}_2]$ por ser hidrófobo [27].

4.4.4 Hidrólisis con agua subcrítica

Los fluidos sub- y supercríticos tienen propiedades únicas que les permiten la extracción de componentes de interés químico y farmacéutico, la descomposición de material orgánico y la síntesis hidrotérmica de productos. El agua subcrítica es una de ellos y es aquella que se encuentra a temperaturas entre el punto de ebullición, 100 °C y el punto

crítico, 374 °C, y mantiene su estado líquido por la alta presión a la que está sometida [28].

El tratamiento de las plumas de pollo en agua subcrítica tiene como antecedentes el trabajo que desarrolló Kadri [29] en los Estados Unidos, en el cual se produjo una solución acuosa de proteínas solubles y pepsinas digeribles que se obtuvieron del contacto de vapor saturado (50 a 250 psig) y plumas a agua en una proporción de 30 partes a una en peso. Se lograron conversiones del 80% para la hidrólisis de las plumas y rendimientos superiores al 70% para las proteínas solubles en agua, con lo que se obtuvo una excelente fuente de proteína soluble en agua para consumo animal.

4.4.5 Hidrólisis microbiológica.

El empleo de cepas de bacterias como la *Bacillus licheniformis* y *Vibrio kr2* presenta resultados favorecedores para la transformación de las plumas en medio enzimático. La sepa *Vibrio kr2* degrada las plumas en 5 horas y alcanza un rendimiento de 4.2% sobre el total de plumas en la reacción. La cepa *Bacillus licheniformis* NH1 produce β -amilasa y proteasas alcalinas al degradar las plumas cuando estas se fermentan durante 48 h a 37 °C. Se alcanza una degradación total con la adición de 1 g/L del extracto de la bacteria a 7.5 g de plumas debido a la biosíntesis de enzimas a partir de los residuos de las plumas hidrolizadas. Este proceso no solo hidroliza las plumas, sino que, además, produce otras especies químicas con aplicaciones farmacéuticas [26].

En suma, la hidrólisis de plumas de pollo por vías químicas presenta algunas deficiencias como: largos tiempos de reacción; el uso de soluciones muy concentradas en la base, ácido o sal que se emplea; tratamientos adicionales para los subproductos de la reacción y sus residuos; y finalmente los altos costos energéticos y de reactivos como los líquidos iónicos para algunos de los tratamientos. Es por esto que la extracción via enzimática es una opción viable para llevar a cabo este tipo de procesos.

4.5 HIDROLISIS ENZIMÁTICA Y ENZIMA NOVO PRO-D®

En términos sencillos, la reacción de hidrólisis consiste en la ruptura del enlace existente entre los aminoácidos que componen una cadena peptídica, consumiéndose una molécula de agua por cada enlace roto. En el caso específico de las proteasas,

estas catalizan la ruptura del enlace peptídico dando lugar a las siguientes especies intermedias: proteínas – proteosomas – peptonas - péptidos – aminoácidos. La reacción no catalizada consiste en un ataque nucleofílico por el átomo de O del H₂O sobre el carbono carboxílico del enlace peptídico formando un intermediario tetraédrico. El carácter parcial de doble enlace del enlace peptídico hace que el carbono carboxílico sea mucho menos reactivo que los carbonos carboxílicos en los ésteres. La tarea catalítica de las proteasas consiste en transformar al carbono carboxílico, normalmente no reactivo, en mucho más susceptible al ataque nucleofílico por el agua ^{[30], [32]}.

Se considera que una enzima es una proteína con propiedades catalíticas debidas a su poder de activación específico ^[31]. Las enzimas catalizan las reacciones metabólicas que tienen lugar en el interior de las células de organismos vivos, por lo que su actividad catalítica se desarrolla en las condiciones de un medio de reacción biológico. Es por ello que su actividad catalítica se caracteriza por tener lugar en condiciones suaves de temperatura y pH específicos.

Las proteasas más comunes con aplicación industrial no son enzimas individuales sino que preparados que incluyen mezclas de diferentes enzimas individuales (complejo enzimático) y compuestos añadidos para estabilizar el producto. En cuanto a la enzima de trabajo cabe aclarar que se trata de un complejo enzimático el cual es el ultimo diseño de Novozymes para queratinas. Al tratarse de un complejo enzimático y además ser un preparado enzimático relativamente nuevo, de la cual solo se reportan 2 trabajos hasta la fecha, no se cuenta con información detallada de su mecanismo de acción.

La enzima Novo Pro-D[®] es una proteasa que pertenece a la familia de las hidrolasas y se clasifica según su acción catalítica como una endopeptidasa ya que rompe al azar el interior de las cadenas peptídicas. Según la naturaleza del centro catalítico las endopeptidasas pueden actuar como serinoproteasas, cisteínoproteasas, metaloproteasas y aspartatoproteasas. Según la revisión bibliográfica, la enzima de trabajo puede ejercer su acción catalítica de las formas antes mencionadas. Las serinoproteasas deben su actividad catalítica a un residuo serina y tienen su máxima actividad catalítica a pH alcalino-neutro. Las cisteínoproteasas actúan de manera similar

a las serinoproteasas con la diferencia de que poseen en su centro catalítico un grupo –SH en lugar de un –OH y su máxima actividad se encuentra a pH alcalino, aunque más cercanos a la neutralidad que en el caso de las serinoproteasas. Las metaloproteasas contienen un átomo metálico en su estructura, normalmente Zn, y su pH óptimo se sitúa alrededor de la neutralidad. Su actividad y estabilidad se ve afectada por la presencia de cationes Ca^{2+} y agentes quelantes como el EDTA, que eliminan el átomo de Zn, convirtiéndose en inhibidores. Las aspartatoproteasas tienen un grupo carboxilo de ácido aspártico en el centro activo y presentan su máxima actividad catalítica a pH ácido [30].

Teniendo en cuenta que las enzimas proteolíticas más importantes en la industria son las serinoproteasas, que se dividen en dos tipos principales: las proteasas con actividad catalítica similar a la de la quimotripsina, y las de actividad catalítica tipo subtilisina. En ambos casos, las serinoproteasas actúan mediante un ataque nucleofílico formando un complejo acil-enzima y una posterior ruptura del complejo, liberando los productos de reacción y la enzima libre, el mecanismo catalítico será representado para la quimiotripsina, tal como se aprecia en la figura 13.

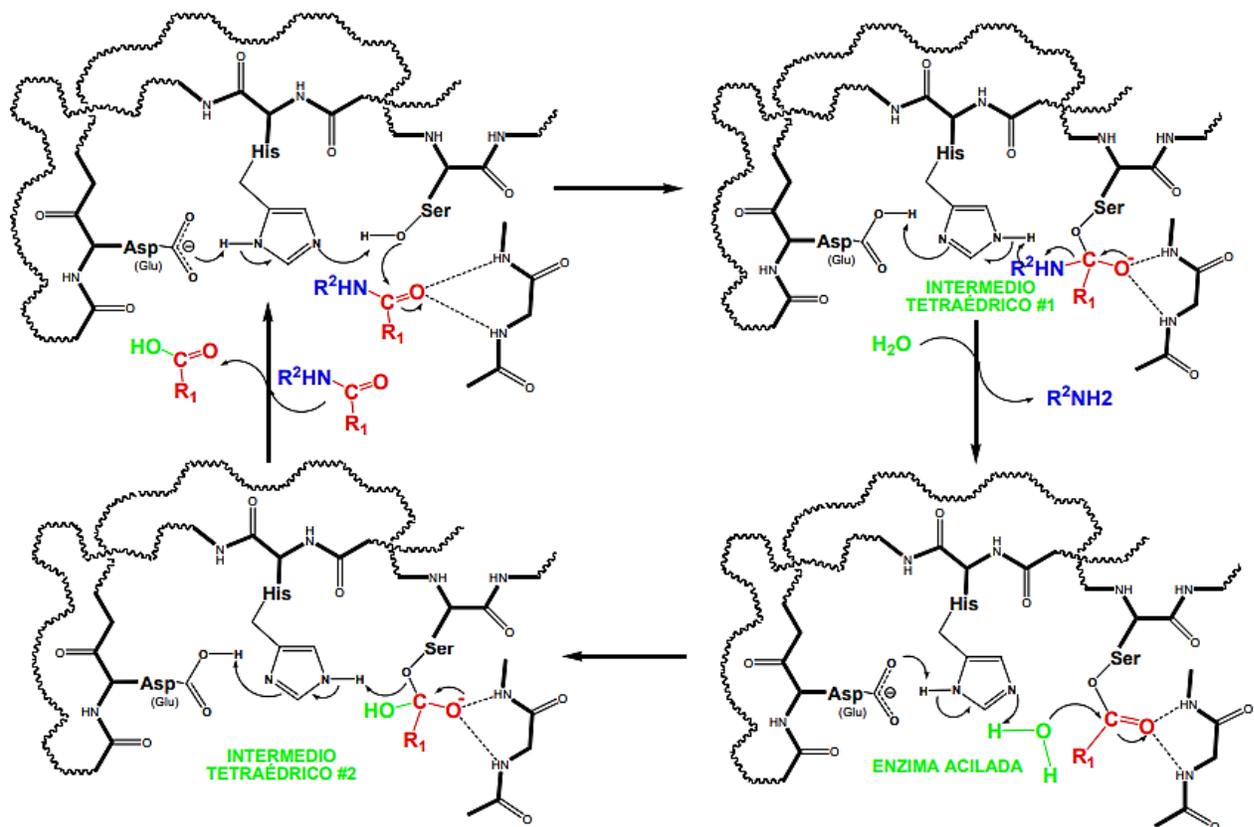


Figura 13. Mecanismo catalítico de serinproteasas ^[40].

5 METODOLOGÍA

5.1 CONSECUCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA MATERIA PRIMA

5,0 kg de plumas de pollo húmedas se adquirieron de la empresa POLLOS CONQUISTADOR (AGRÍCOLA MERCANTIL DEL CAUCA AGRICCA S.A), ubicada en el municipio de Cajibío, km 11, vía Popayán – Piendamó. Las plumas se llevaron al laboratorio de QPN, se lavaron con jabón, se dejaron por 2 horas en una solución al 10% de hipoclorito de sodio, se lavaron con abundante agua y se secaron, inicialmente a temperatura ambiente y radiación solar directa por 5 días y después en un horno a una temperatura de 60 °C hasta peso constante. Posteriormente se procedió a triturar y pulverizar la muestra a través de un molino casero y un molino industrial (Retsch SK 100 Standar) respectivamente. En la figura 14 se resume el procedimiento descrito.



Figura 14. Tratamiento de muestras, lavado, secado, molido y pulverizado.

5.2 CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

La muestra de plumas previamente tratada se sometió a un análisis proximal en el cual se determinó: 1) Contenidos de humedad y cenizas mediante sequedad, incineración y gravimetría. 2) Extracto etéreo o grasa bruta: Método de extracción en equipo Soxhlet. 3) Determinación de nitrógeno (proteína): Método Kjeldahl para determinación de nitrógeno.

5) Fibra bruta y extracto no nitrogenado. Este análisis se realizó siguiendo la norma AOAC. 20th ed. 2016 ^[41]. El procedimiento de laboratorio se detalla en el anexo 1.

5.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La enzima Novo Pro-D[®], suministrada por Novozymes, se almacenó en un desecador a temperatura ambiente, dentro de frascos de vidrio ámbar, lejos de la radiación solar directa. Posteriormente se realizó el análisis de la actividad enzimática a partir de la espectroscopia UV-Vis. El procedimiento de laboratorio se detalla en el anexo 2.

5.4 OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE QUERATINA

Para la optimización de la extracción de queratina, mediante la hidrólisis enzimática, se utilizó como factor de respuesta el porcentaje de extracción (%E) y como factores independientes la temperatura en °C, tiempo de extracción en Horas (h), pH y relación enzima sustrato (E/S). La enzima de estudio Novo Pro-D[®] fue suministrada por Novozymes. La ficha técnica proporcionada para la enzima sugiere un rango de pH de 8 a 9.5 y de Temperatura de 50 a 60 °C donde se encuentra la mejor actividad de dicha enzima.

Teniendo en cuenta lo anterior en la tabla 1 se resumen los niveles altos y bajos escogidos para la optimización.

Tabla 1. Factores experimentales para la Optimización

Factor	Bajo	Alto
Temperatura (°C)	40	70
Tiempo (Horas)	4.0	8.0
pH	7.0	10.0
Relación E/S (w/w)	0.1	0.5

Posteriormente, determinados los niveles y los factores experimentales, se procedió a generar el diseño experimental con la ayuda del programa estadístico *Statgraphics Centurion XVII*[®].

De acuerdo con las condiciones de experimentación y recursos disponibles, además de la prioridad de realizar un proceso para la optimización de la extracción de queratina via enzimática se aplicó un diseño Draper-Lin el cual es un diseño compuesto reducido que consiste en un factorial fraccionado, este diseño estudiara los efectos de los 4 factores en

19 corridas, las cuales constan de 8 puntos factoriales, 8 puntos estrellas y 3 puntos centrales. El diseño fue ejecutado en un solo bloque y los experimentos fueron completamente aleatorios para brindar protección contra el efecto de variables ocultas ^[33]. El diseño experimental se resume en la tabla 2.

Tabla 2. Diseño experimental

Núm	pH	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Relación E/S	Localización
1	10.0	70	8.0	0.10	Factorial
2	10.0	40	8.0	0.50	Factorial
3	10.0	70	4.0	0.10	Factorial
4	8.5	55	6.0	0.30	Central
5	11.0	55	6.0	0.30	Estrella
6	8.5	55	9.0	0.30	Estrella
7	10.0	40	4.0	0.50	Factorial
8	8.5	55	6.0	0.64	Estrella
9	7.0	40	8.0	0.10	Factorial
10	7.0	70	8.0	0.50	Factorial
11	8.5	55	6.0	0.30	Central
12	8.5	55	6.0	0.00	Estrella
13	8.5	30	6.0	0.30	Estrella
14	7.0	40	4.0	0.10	Factorial
15	8.5	80	6.0	0.30	Estrella
16	7.0	70	4.0	0.50	Factorial
17	8.5	55	6.0	0.30	Central
18	8.5	55	3.0	0.30	Estrella
19	6.0	55	6.0	0.30	Estrella

Obtenido el diseño experimental se procedió a su respectiva ejecución, para esto se prepararon soluciones tampón de fosfatos ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) 0,1M a el pH específico de trabajo, las cuales se ajustaban al pH requerido, si era el caso, con HCl al 1,0M y/o con NaOH 1,0M. Para la extracción de queratina via hidrolisis enzimática, se tomó 10,0 g de las plumas de pollo y se adicionó 300,0 mL de la solución tampón en un erlenmeyer de 500,0 mL, esta mezcla se agitó por un tiempo de 30 minutos, posteriormente se llevaron al sistema de extracción donde se completó el volumen hasta 500 mL, se ajustó la temperatura con la ayuda de un termómetro de Hg y el pH con la ayuda de un pH-metro (Accumet Basic AB15) y se volvió a agitar a 500,0 durante 10 min para homogeneizar la mezcla. Terminado este tiempo se agregó el enzima en

solución del tampón de fosfato a la temperatura y pH requeridos, se mantuvo la agitación constante y se cronometró el tiempo establecido, pasado el tiempo de extracción, se desnaturalizó la enzima por ebullición de la solución durante 10,0 min e inmediatamente se filtró al vacío; finalmente se determinó el porcentaje de extracción de la proteína por el método de Kjeldahl. El procedimiento descrito se resume en la figura 15.

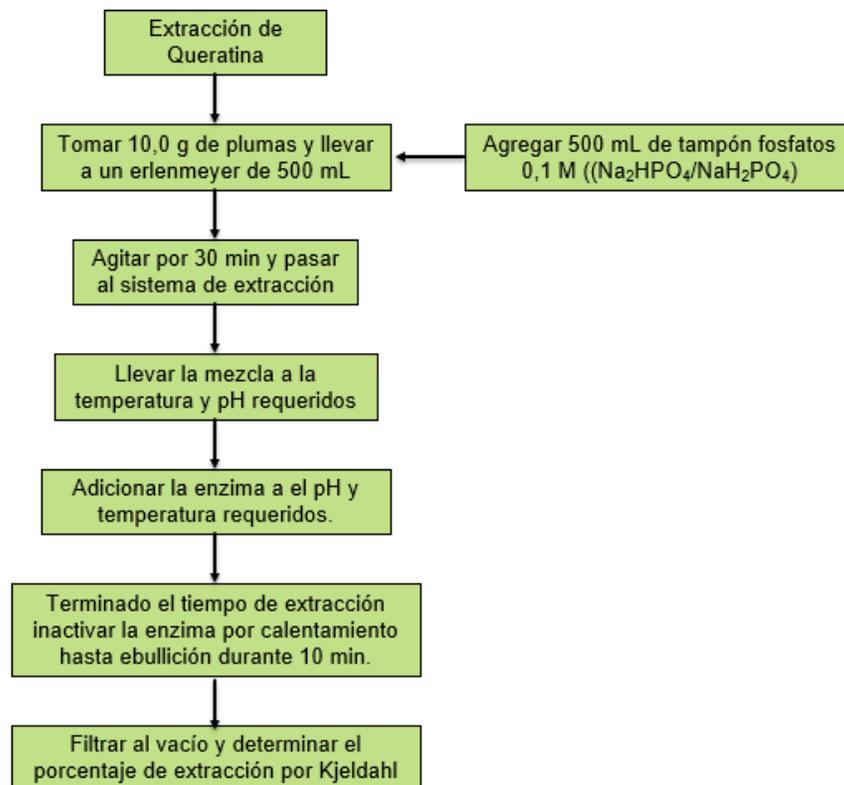


Figura 15 Diagrama de Flujo, Extracción de queratina.

El montaje general del sistema de extracción y el hidrolizado obtenido se muestran en la figura 16.

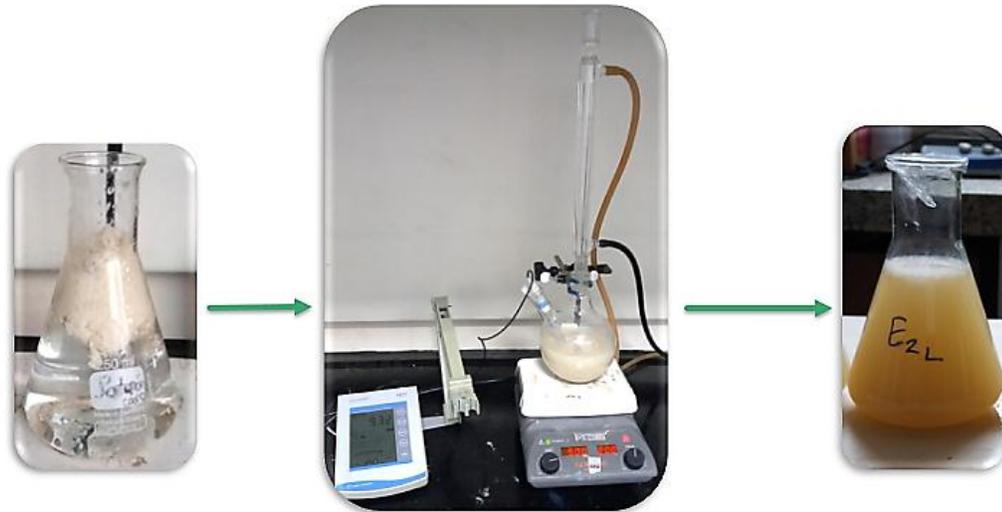


Figura 16. Montaje general del sistema de extracción.

5.5 CARACTERIZACIÓN DE LA QUERATINA EXTRAÍDA

El punto óptimo del diseño experimental se aplicó por triplicado para obtener el mayor porcentaje extracción, posteriormente la proteína en cuestión fue precipitada mediante la aplicación del punto isoeléctrico (pI) agregando HCl 1,0 M, y separada por centrifugación (HERMLE Z 326 K[®]) durante 45 min a -5 °C, finalmente se lavó con agua hasta pH neutro. Extraída y precipitada la queratina, se procedió a caracterizar y comparar la muestra de estudio contra un patrón primario de queratina con pureza mayor al 90% proporcionado por Sigma aldrich[®]. Para ello se utilizó FTIR-ATR (NICOLET iS10-Thermo Scientific[®]), y espectrofotómetro Uv-Vis (Genesys 6-Thermo Scientific[®]). Además, se realizó el análisis termogravimétrico (TGA) (TGA Q50 V20 10 Build 36). El perfil de aminoácidos se hizo de acuerdo al método PICO-TAG de Waters Corporation (AOAC 994.1210) y la digestibilidad *in vitro* de las proteínas siguiendo lo establecido en la norma técnica colombiana NTC 719 y haciendo algunas modificaciones de lo reportado por Miller et al 1997.

6 RESULTADOS Y ANÁLISIS

6.1 ANÁLISIS PROXIMAL

El análisis proximal se realizó siguiendo la guía del anexo 1. Los resultados obtenidos experimentalmente se consignan en la tabla 3. Las ecuaciones usadas para dichas determinaciones se presentan a continuación:

Porcentaje de Humedad:

$$\%H = \frac{W_{cp+mh} - W_{cp+ms}}{W_{mh}} \times 100$$

Ecuación 1. Porcentaje de Humedad (%H).

Dónde:

W_{cp+mh} = peso de la caja de Petri más muestra húmeda en gramos

W_{cp+ms} = peso de la caja de Petri más muestra seca en gramos

W_{mh} = peso de la muestra húmeda en gramos

%H = Porcentaje de humedad

Porcentaje de cenizas:

$$\% C_{bs} = \frac{(W_{c+cenizas} - W_c)}{W_{m\ seca}} \times 100$$

Ecuación 2. Porcentaje de Cenizas en base seca (%Cbs).

Donde:

W_c = peso crisol vacío $W_{m\ seca}$ = Peso muestra seca

$W_{c+cenizas}$ = peso de las cenizas más crisol

%Cbs = porcentaje de cenizas en base seca

Porcentaje Grasa:

$$\% G_{bs} = \frac{(W_{b+pe+grasa} - W_{b+ma})}{W_{m\ seca}} \times 100$$

Ecuación 3. Porcentaje de grasa en base seca (%Gbs).

Dónde:

W_{b+ma} = peso del balón más perlas de ebullición

$W_{b+ma+grasa}$ = peso del balón más perlas de ebullición más grasa

$W_{m\ seca}$ = peso muestra seca

%Gbs = porcentaje de grasa en base seca

Porcentaje de Proteína:

$$\%N_{total} = \frac{(M - B) \times N \times 0,014}{Pm_s} \times 100$$

Ecuación 4. Porcentaje de nitrógeno en base seca (%Ntotal).

$$\%P_{bs} = 6,25 \times \%N_{total}$$

Ecuación 5. Porcentaje de proteína en base seca (%Pbs).

Dónde:

M =volumen de HCl gastados para la titulación de la muestra

B = volumen de HCl gastados para la titulación del blanco

N = normalidad del HCl estandarizado

Pms = peso de la muestra seca

%Pbs = porcentaje de proteína en base seca

Porcentaje de Fibra cruda:

$$\% F_{bs} = \frac{(W_{c+m \text{ en estufa}} - W_{c+cenizas})}{W_{m ds}} \times 100$$

Ecuación 6. Porcentaje de fibra cruda en base seca (%Fbs).

Donde:

g Wc+m en estufa = peso del crisol+tela+ fibra

Wc+cenizas = peso del crisol más cenizas

Wm ds =peso muestra desengrasada y seca

%Fbs = porcentaje de fibra en base seca.

Extracto libre no nitrogenado:

$$\% ELN_{bs} = 100 - (\%H + \%C_{bs} + \%G_{bs} + \%P_{bs} + \%F_{bs})$$

Ecuación 7. Porcentaje del extracto libre no nitrogenado en base seca (%ELNbs).

Dónde:

%ELNbs = porcentaje libre no nitrogenado en base seca.

Posteriormente se calcularon los promedios y las respectivas desviaciones estándar para cada uno de los parámetros medidos en el análisis proximal, los resultados se consignan en la tabla 3.

Los datos obtenidos y los cálculos realizados se pueden apreciar con más detalle en el anexo A1.

Tabla 3. Resultados experimentales para el análisis proximal \pm desviación estándar, análisis por triplicado.

Análisis	Muestra de Plumas
%Humedad	5,7142 \pm 0,4971
%Cenizas	3,3942 \pm 0,6063
%Grasa	2,6562 \pm 0,3330
%Proteína*	86,4250 \pm 0,7141
%Fibra	0,4169 \pm 0,0808
%ELN	1,3924 \pm 0,6320

*Factor 6,25

El análisis proximal realizado fue una herramienta utilizada para establecer la composición de la materia prima en cuestión, determinar algunas de sus propiedades fisicoquímicas y a partir de los resultados obtenidos facilitar, de cierta manera, algunos de los parámetros de extracción como por ejemplo la relación enzima/sustrato que es dependiente del porcentaje de proteína.

Como era de esperarse, las plumas de pollo presentaron un elevado contenido de nitrógeno, el cual era el de real interés para este estudio, además de que esta característica les confiere a las plumas gran aplicabilidad en diferentes industrias. En cuanto al contenido de humedad se puede decir que es relativamente bajo, sin embargo, se debe eliminar para realizar el proceso de extracción; esto básicamente porque el material pesado debe estar completamente libre de agua para que la relación E/S no se vea afectada. Un parámetro de importancia en el análisis proximal es el porcentaje de grasa, ya que esta puede afectar posiblemente la extracción de la queratina por parte de la enzima, sin embargo y como se verá más adelante (subcapítulo 6.5), no se presentaron diferencias significativas cuando el proceso se realizó con la pluma desengrasada y sin desengrasar, esto se podría atribuir a las características de la enzima de trabajo. Algo que es mucho más importante es que nos estaría ahorrando el paso de desengrasado de la materia prima lo cual es muy beneficioso para la extracción ya que posiblemente por las características de la enzima y su interacción con el sustrato el proceso en general estaría ahorrando tiempo, reactivos y gasto energético. Por otro lado, de la tabla 3 se observa que tanto los contenidos de cenizas como de fibra y extracto libre de nitrógeno presentan

valores bajos si se los compara con el contenido de proteína de la muestra, estos valores se pueden atribuir posiblemente a la función de las plumas en el animal la cual es brindar protección térmica debido a su capacidad de retención de calor y además por su propiedad física de ser insoluble en agua permite que el animal posea una baja humedad relativa. En resumen, el análisis proximal realizado a las plumas de pollo confirmo el gran contenido de proteína y por lo tanto la alta funcionalidad que los derivados de estas pueden tener en diferentes usos de tipo industrial, además de brindar información que será tomada en cuenta a la hora de realizar la extracción via enzimática de la queratina.

6.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Los resultados obtenidos se consignaron en la tabla A2.1 del anexo A2. Se graficó la curva de calibración a partir de dicha tabla y se obtuvo la ecuación de la recta por el método de mínimos cuadrados en donde la constante de Pearson generó una linealidad aceptable, $R^2 = 0,9922$, tal y como se muestra a continuación.

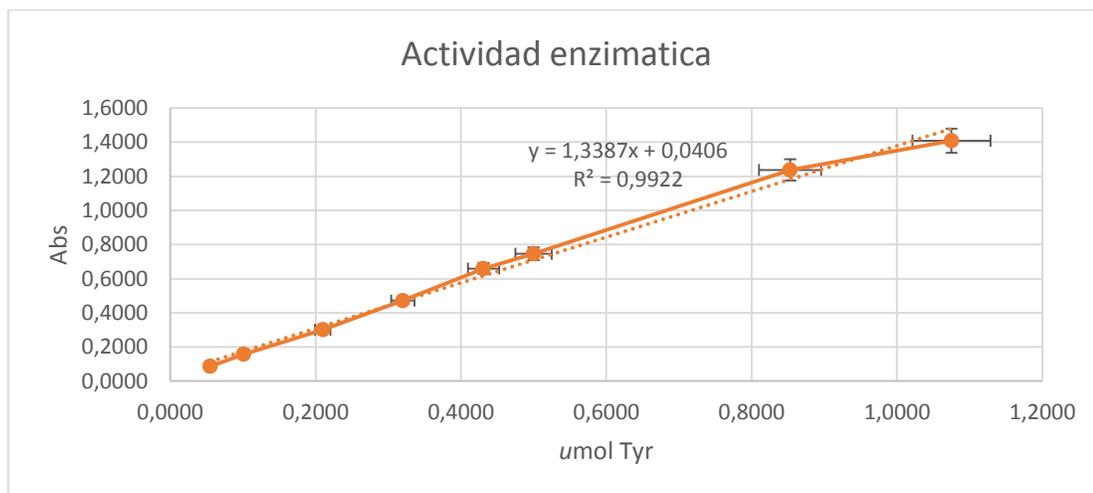


Figura 17. Curva de calibración de Tirosina (Tyr) por mínimos cuadrados, las barras indican la desviación estándar.

Siguiendo la metodología descrita en el anexo 2, se determinó los μmol de Tyr libres después de la hidrólisis de la solución patrón de caseína (1,1 mM), a una temperatura de 37,0 °C, un pH de 7,5 unidades, presión atmosférica y un tiempo de hidrólisis de 10,0 minutos. A partir de la ecuación de la curva de calibración, las ecuaciones 8, 9 y 10 y la tabla A2.1 se determinó la actividad enzimática en Unidades por miligramo de enzima, que se refiere a la cantidad de micro moles de equivalente de tirosina liberados de la caseína

por minuto debido a la hidrólisis efectuada por la enzima. Los resultados se consignan en la tabla 4.

$$\Delta A_{660nm\ Pi} = A_{660nm\ Pi} - A_{660nm\ Pblanco}$$

Ecuación 8. Cambio en la absorbancia en la muestra de ensayo, diferencia entre la absorbancia de la muestra de ensayo y la absorbancia del blanco de muestras.

Dónde: $\Delta A_{660nm\ Pi}$ es el Cambio de absorbancia en las muestras de ensayo

$A_{660nm\ Pi}$ son las absorbancias de las muestras de ensayo

$A_{660nm\ Pblanco}$ es la absorbancia del blanco de prueba

Con el valor de $\Delta A_{660nm\ Pi}$ y la ecuación de la curva de calibración, se calculó el valor de micromoles de Tyr liberados durante la hidrólisis enzimática. Para obtener la actividad de la enzima en unidades por mL, se utilizó la ecuación 9.

$$Actividad\ (u/mL) = \frac{\text{equivalentes de Tyr liberados } (\mu\text{mol}) \times \text{Volumen total del ensayo (mL)}}{\text{Tiempo del enyo (min)} \times \text{Volumen del enzima (mL)} \times \text{Volumen usado en la celda UV/Vis (mL)}}$$

Ecuación 9. Ecuación para la determinación de la Actividad enzimática en U/mL.

Dónde:

equivalentes de Tyr en μmol corresponde al calculado con $\Delta A_{660nm\ Pi}$ y La curva de calibración

Volumen total del ensayo es igual a 11,0 mL

Tiempo de ensayo corresponde a 10,0 min

Volumen de enzima corresponde a 1,0 mL

Volumen usado en la celda UV/Vis corresponde a 2,0 mL

La relación entre los micro moles con minutos es igual a unidades de actividad.

La Actividad enzimática en unidades de U/mg se puede obtener con el siguiente factor de conversión:

$$Actividad\ (U/mg) = \frac{Actividad\ (U/mL)}{\text{concentracion del enzima en mg/mL}}$$

Ecuación 10. Factor de conversión, actividad enzimática en unidades por mg de enzima.

Tabla 4. Resultados experimentales para la Actividad enzimática

Test	$\mu\text{mol Tyr}$ libres	Actividad (U/mL)	Actividad (U/mg)	Promedio (U/mg)
1	0,0100 \pm 0,0006	0,0050 \pm 0,0006	0,2500 \pm 0,0006	0,6017
2	0,0384 \pm 0,006	0,0211 \pm 0,0006	1,0550 \pm 0,0006	
3	0,0182 \pm 0,0000	0,0100 \pm 0,0000	0,5000 \pm 0,0000	

En condiciones de temperatura de 37,0°C, pH de 7,5 unidades, presión atmosférica, 10,0 min de tiempo de hidrolisis y una solución de 1,15 mM de caseína se observó que la enzima Novo Pro-D[®] posee una actividad enzimática promedio de 0,6017U/mg lo cual da un indicio de su cantidad de sitios activos. Si se tiene en cuenta que esta enzima en realidad no es una sola, sino que se trata de un complejo enzimático el cual consta de diferentes tipos de proteasas las cuales generan diferentes ataques y cortes en el sustrato (ver pág. 29) la actividad encontrada es aceptable, además si se compara este valor promedio con el reportado por Correa, L en su trabajo de maestría ^[34]. En el cual se realizó una caracterización de la enzima Novo Pro-D[®] y se obtuvo un valor de actividad de 0,50 U/mg, se aprecia que son valores similares teniendo en cuenta que en ese estudio se realizó la determinación con un sustrato de Azocaseína a una temperatura de 25°C y un pH de 8 unidades.

La actividad de la enzima de trabajo también sugiere que esta enzima es de una elevada pureza y que su eficiencia en el proceso de extracción de proteína (queratina) de las plumas de pollo va a ser adecuada, además de que con este dato se hace una idea inicial de la cantidad de enzima que se debe utilizar por cantidad de sustrato ya que si por ejemplo la actividad hubiese sido baja se debería pensar en utilizar una mayor cantidad de enzima por cantidad de sustrato.

6.3 PERFIL DE AMINOÁCIDOS Y DIGESTIBILIDAD

La determinación del contenido de aminoácidos se realizó a través del laboratorio certificado QUANTAR S.A.S Cali-Colombia con la metodología Waters Pico Tag estandarizada, de acuerdo al método PICO-TAG de Waters Corporation (1995), trabajada por Restrepo et al 2011 y lo establecido por la AOAC 994.1210, mediante la técnica de Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) con columna en fase reversa. Mientras que la digestibilidad in vitro se realizó siguiendo lo establecido en la norma técnica colombiana NTC 719 y haciendo algunas modificaciones de lo reportado por Miller et al 1997. El procedimiento de los análisis se consigna en el anexo A3. Los resultados se resumen en la tabla 5.

Tabla 5. Perfil de aminoácidos y digestibilidad in vitro para la muestra de estudio e hidrolizado.

Aminoácido	Pluma (%)	Hidrolizado (%)
Aspártico	13,7	13,8
Serina	5,7	5,9
Glutámico	6,5	6,3
Glicina	2,4	2,5
Histidina	2,7	2,7
Arginina	1,8	1,8
Treonina	9,9	10,1
Alanina	4,4	4,2
Prolina	9,8	10,0
Cisteína	4,6	4,8
Tirosina	2,3	2,3
Valina	6,6	6,4
Metionina	0,8	0,8
Lisina	4,3	4,4
Isoleucina	1,4	1,4
Leucina	5,5	5,6
Fenilalanina	9,6	9,6
Triptófano	5,8	5,9
Total	97,8	98,6
Digestibilidad	4,3 ± 0,8	81,5 ±0,4

De la tabla 5 se observa que, en cuanto al contenido de aminoácidos presentes, tanto en la muestra de pluma de pollo inicial como en el hidrolizado final, no hay cambios significativos; esto es un indicativo de que la calidad de la proteína extraída mediante hidrólisis enzimática no se ve afectada por dicho proceso. Por otra parte, se aprecia que el ácido aspártico está en mayor proporción respecto a los demás aminoácidos y que la metionina presenta los valores más bajos. Según la literatura, y como se vio anteriormente (sección 4.5) la enzima trabajada no presenta un mecanismo totalmente conocido, entonces, posiblemente se pudieron presentar cortes por aminoácidos por los que no se esperaba. Sin embargo esto no es de gran importancia ya que en el recuento final los porcentajes de aminoácidos fueron similares. En cuanto a los resultados de digestibilidad de las dos muestras en cuestión, es evidente que mediante la hidrólisis via enzimática se logró aumentar este valor. Los resultados obtenidos de digestibilidad evidencian que el hidrolizado obtenido presenta un valor nutricional proteico considerable respecto a la

materia prima de partida y que puede ser una alternativa para el aprovechamiento de las plumas de pollo como una fuente de alimentación animal, lo que le daría un valor agregado a este subproducto de la industria avícola.

6.4 OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE QUERATINA

El porcentaje de extracción de la proteína de estudio, para la hidrólisis enzimática, se determinó mediante el método de Kjeldahl (ver anexo 4) y las ecuaciones 11 y 12.

$$\%N_{ext} = \frac{[M - (B + V_{HCl\ enz})] \times N \times 0,014}{Pm_s} \times 100$$

Ecuación 11. Porcentaje de nitrógeno extraído (%N_{ext}).

$$\%P_{ext} = 6,25 \times \%N_{total}$$

Ecuación 12. Porcentaje de proteína extraída (%P_{ext}).

Dónde:

M = volumen de HCl gastados para la titulación del extracto

B = volumen de HCl gastados para la titulación del blanco

VHCl enz = volumen de HCl gastado para la titulación del enzima

N = normalidad del HCl estandarizado

Pms = peso de la muestra

%N_{ext} = Porcentaje de nitrógeno extraído

%P_{ext} = porcentaje de proteína extraída en base seca

Cabe aclarar que se realizó la titulación de la enzima de estudio por triplicado ya que, en todos los 19 experimentos, aunque esta fue desactivada por calentamiento, a la hora de realizar la determinación de proteína va a aportar nitrógeno. El volumen promedio obtenido fue de 3,57 mL y los resultados presentados de porcentaje de proteína tienen en cuenta dicho volumen.

El porcentaje de extracción (Ecuación 13) se determinó teniendo en cuenta el porcentaje de proteína presente en las muestras, este valor se encontró mediante el análisis proximal.

$$\%E = \frac{\%P_{ext}}{\%P_i} \times 100$$

Ecuación 13. Porcentaje de extracción (%E).

Dónde:

Pext = porcentaje de extracción obtenido en cada ejecución del diseño experimental

%Pi = porcentaje de proteína en la muestra de estudio que es igual a 86,4250%.

Los datos obtenidos experimentalmente y los cálculos realizados se pueden apreciar con detalle en el anexo A4.

Obtenidos los valores experimentales se realizó el análisis estadístico necesario para el diseño experimental, las tabla 6 resumen los resultados experimentales para la hidrolisis enzimática con Novo Pro-D®

Tabla 6. Resumen del porcentaje de extracción de queratina para la hidrolisis enzimática.

Núm.	pH	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	E/S	PE (%)
1	10.0	70	8.0	0.10	43.5
2	10.0	40	8.0	0.50	44.5
3	10.0	70	4.0	0.10	36.4
4	8.5	55	6.0	0.30	63.8
5	11.0	55	6.0	0.30	29.2
6	8.5	55	9.0	0.30	66.9
7	10.0	40	4.0	0.50	49.6
8	8.5	55	6.0	0.64	72.0
9	7.0	40	8.0	0.10	35.3
10	7.0	70	8.0	0.50	42.5
11	8.5	55	6.0	0.30	61.8
12	8.5	55	6.0	0.00	14.3
13	8.5	30	6.0	0.30	50.6
14	7.0	40	4.0	0.10	32.3
15	8.5	80	6.0	0.30	28.2
16	7.0	70	4.0	0.50	37.4
17	8.5	55	6.0	0.30	64.9
18	8.5	55	3.0	0.30	48.6
19	6.0	55	6.0	0.30	33.3

Una vez realizados los 19 experimentos y determinados sus correspondientes porcentajes de extracción se procedió a realizar el análisis estadístico de los datos con ayuda del programa Statgraphics Centurion XVII® y también a determinar los valores óptimos de las variables de estudio con el fin de lograr la optimización del proceso extractivo. Para esto, se aplicó el gráfico de distribución normal para los resultados obtenidos de porcentaje de

extracción (%E) en el diseño experimental, de esta manera se verificó si los resultados provienen de una distribución normal. Además, se determinó tanto el sesgo estandarizado como la curtosis estandarizada.

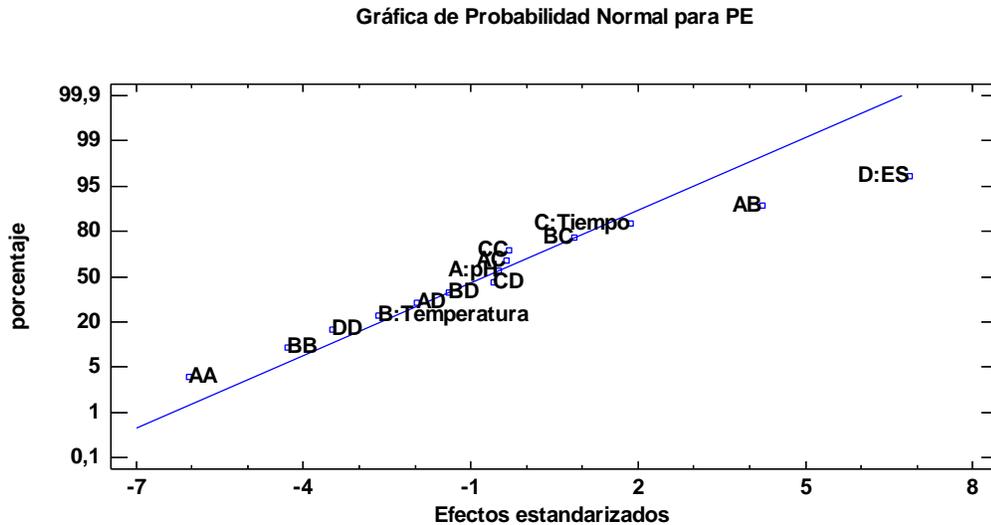


Figura 18. Gráfico de probabilidad Normal para el diseño experimental

Tabla 7. Resumen Estadístico para Porcentaje de extracción Diseño experimental

Recuento	19
Promedio	45.0053
Desviación Estándar	15.4792
Coeficiente de Variación	34.3942%
Mínimo	14.3
Máximo	72.0
Rango	57.7
Sesgo Estandarizado	0.191488
Curtosis Estandarizada	-0.512721

Para poder aplicar o no la estadística paramétrica, es necesario evaluar la normalidad de los resultados obtenidos, para ello se aplicó un gráfico de probabilidad normal, este gráfico se puede apreciar en la figura 18. Como condición es necesario que los datos evaluados, estén distribuidos alrededor de la curva, si los datos siguen esta tendencia se concluye que el porcentaje de extracción proviene de una distribución normal, en la gráfica mencionada se puede evidenciar que, en general, los datos siguen la tendencia de la curva, lo cual concluye que con un $p=0,05\%$, o, en otras palabras, con un 95% de confianza, los datos (%E) provienen de una distribución normal. Para tener mayor seguridad sobre la conclusión, se determinó los valores del sesgo estandarizado y la

curtosis estandarizada, los resultados se consignan en la tabla 7. Esta tabla muestra los estadísticos para Porcentaje de extracción (%E). Incluyendo medidas Promedio, desviación estándar relativa y coeficiente de variación. De particular interés aquí son el sesgo estandarizado y la curtosis estandarizada, las cuales pueden utilizarse para determinar si la muestra proviene de una distribución normal. Valores de estos estadísticos fuera del rango de -2 a +2 indican desviaciones significativas de la normalidad, lo que tendería a invalidar cualquier prueba estadística con referencia a la desviación estándar. En este caso, tanto los valores del sesgo estandarizado (0,19) como de curtosis estandarizada (-0,51) se encuentran dentro del rango esperado para datos provenientes una distribución normal.

Continuando con el análisis estadístico, se procedió a aplicar el análisis de varianza (ANOVA) el cual se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 8. Análisis de Varianza (ANOVA) para Porcentaje de extracción en el diseño experimental

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: pH	8,40413	1	8,40413	0,24	0,6516
B: Temperatura	250,88	1	250,88	7,08	0,0563
C: Tiempo	122,35	1	122,35	3,46	0,1366
D:ES	1664,65	1	1664,65	47,01	0,0024
AA	1297,81	1	1297,81	36,65	0,0038
AB	634,893	1	634,893	17,93	0,0133
AC	4,65125	1	4,65125	0,13	0,7354
AD	136,667	1	136,667	3,86	0,1209
BB	652,199	1	652,199	18,42	0,0127
BC	25,5613	1	25,5613	0,72	0,4434
BD	68,0416	1	68,0416	1,92	0,2380
CC	3,71109	1	3,71109	0,10	0,7624
CD	12,7512	1	12,7512	0,36	0,5808
DD	429,025	1	429,025	12,12	0,1823
Error total	141,643	4	35,4109		
Total (corr.)	4312,89	18			

La tabla ANOVA particiona la variabilidad del Porcentaje de extracción en piezas separadas para cada uno de los efectos. Entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso y como se puede observar en la tabla 8, cuatro efectos tienen una valor-P

menor que 0.05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%. Estos efectos son la relación Enzima/sustrato, el pH, la temperatura y la combinación entre pH y temperatura.

También se obtuvo el diagrama de Pareto, que describe el análisis de varianza (ANOVA), la influencia de los factores y sus relaciones sobre el porcentaje de extracción.

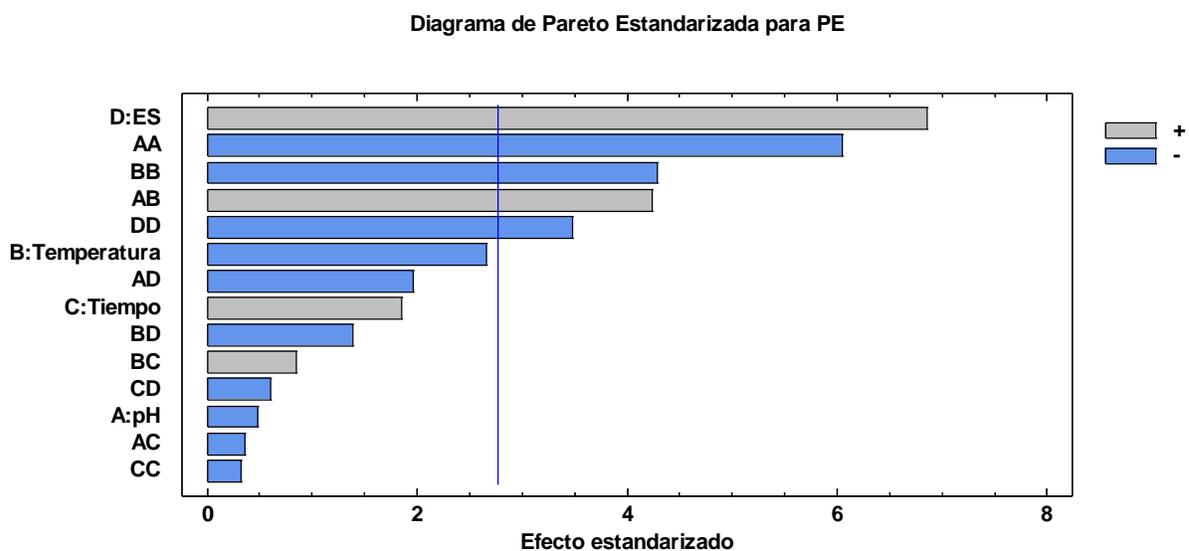


Figura 19. Diagrama de Pareto estandarizado para el porcentaje de extracción en el diseño experimental.

Complementando la información que brinda la prueba ANOVA (Tabla 8), la figura 19 muestra el diagrama de Pareto, que describe el análisis de varianza y la influencia de los factores y sus relaciones sobre el porcentaje de extracción. El orden de importancia sobre procesos se muestra en orden descendente. En este caso, la relación E/S y la interacción entre las variables independientes pH y temperatura sobrepasan la línea vertical, indicando de esta manera que estos dos efectos o factores independientes aportan significativamente a **maximizar** el porcentaje de extracción (barras grises) con un nivel de confianza del 95%. Las variables de pH y temperatura por separado afectan el porcentaje de extracción de forma negativa (barras azules). Las interacciones AD, BD, CD, AC Y CC también afectan al porcentaje de extracción, pero no lo hacen de forma significativa. Finalmente, la interacción CD también aporta a maximizar el porcentaje de extracción, pero no es significativo.

En resumen, para el proceso de extracción vía enzimática la relación E/S y la interacción entre el pH y la temperatura contribuyen positivamente para la optimización

mientras que el pH y la temperatura por separado lo hacen de forma negativa. El tiempo no es un factor de importancia para el proceso en cuestión.

También se realizó un análisis independiente cualitativo de los factores de estudio sobre el factor de respuesta, este se muestra en las grafica de efectos principales y describe los efectos principales sobre el porcentaje de extracción.

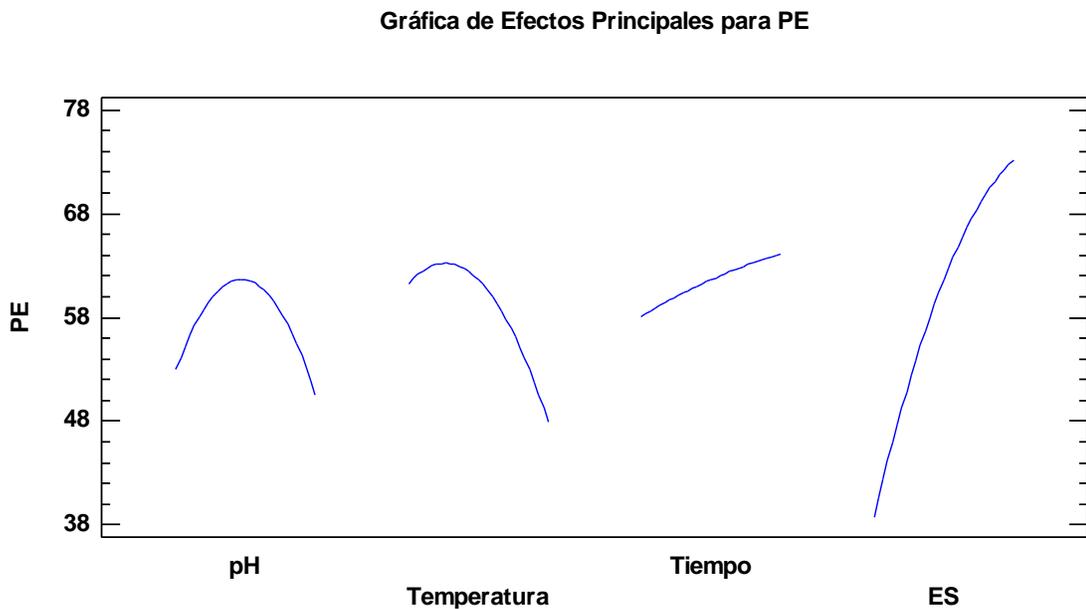


Figura 20. Grafica de efectos principales para el diseño experimental

En la gráfica de efectos principales se observa cualitativamente como se ve afectada la variable de respuesta. La grafica de pH muestra que existe un punto intermedio en él cual el porcentaje de extracción es máximo y que a valores de pH muy altos o muy bajos la eficiencia de extracción disminuye. En cuanto a la temperatura se observa que el mayor PE se obtiene con temperaturas bajas y que a medida que se aumenta se pierde eficiencia, estos aportes negativos se deben a la desnaturalización de la enzima, la cual implica la pérdida de su estructura cuaternaria, que se traduce en la pérdida de su actividad bioquímica. En cuanto a el tiempo y la relación E/S, a medida que se aumenta estas dos variables el PE aumenta, se podría pensar que es necesario realizar la optimización a tiempos más largos y mayor cantidad de enzima, pero se realizaron dos experimentos adicionales a estas condiciones y se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 9. Valores para experimentos adicionales con tiempo y relación E/S altos.

Núm.	pH	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	E/S	PE (%)
1	8.5	55	12.0	0,3	69.47
2	8.5	55	9	0,3	66.90
3	8.5	55	6.0	1,0	80,35
4	8.5	55	6.0	0.64	72.00

De la tabla 9 si se compara los datos 1 y 2 se concluye que aun aumentando el tiempo 3 horas, manteniendo las otras variables constantes el porcentaje de extracción no aumenta de manera significativa por lo que alargar el proceso de extracción no es recomendable y no presentaría ningún beneficio. Comparando los datos 3 y 4 se observa que al aumentar la relación E/S el porcentaje de extracción aumenta de 72.00 a 80.35% lo cual, puede ser significativo, pero como se piensa en términos industriales, aumentar la cantidad de enzima significa un costo de producción más elevado y esto en términos económicos no es viable.

Finalmente, se evaluó tanto la superficie de respuestas como el contorno de la respuesta estimada teniendo en cuenta los resultados experimentales. Statgraphics Centurion XVII® grafica la superficie como los contornos tomando en cuenta el promedio de los valores que no se representan en las gráficas.

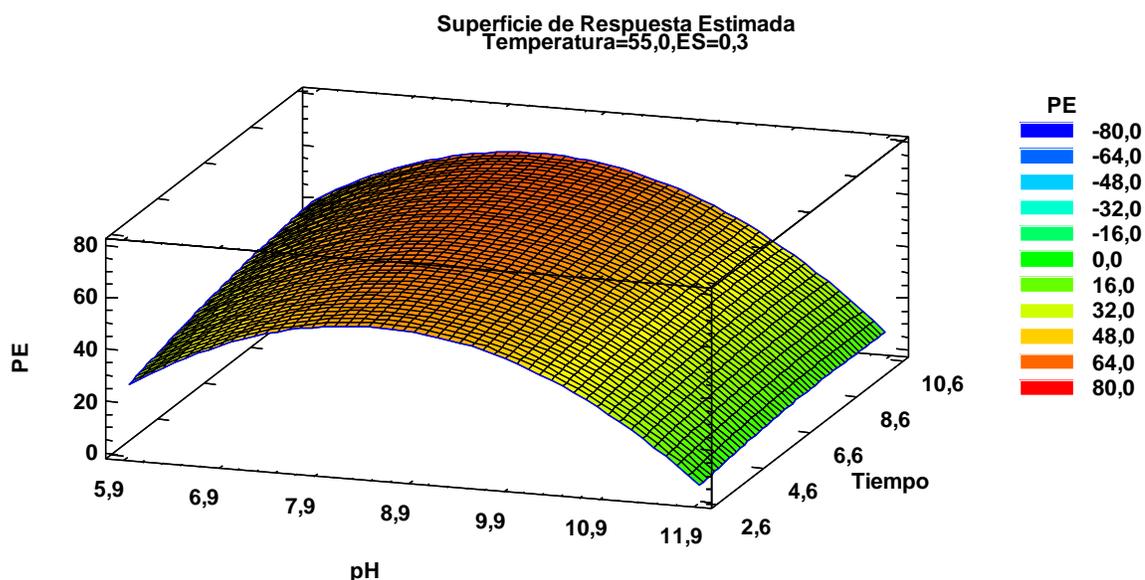


Figura 21. Superficie de respuesta del porcentaje de extracción para el diseño experimental, pH vs tiempo.

En la figura 21 se evidencia la interacción entre el pH y el tiempo, mostrando que valores bajos de pH y relativamente altos de tiempo muestran el mejor porcentaje de extracción (superficie de respuesta).

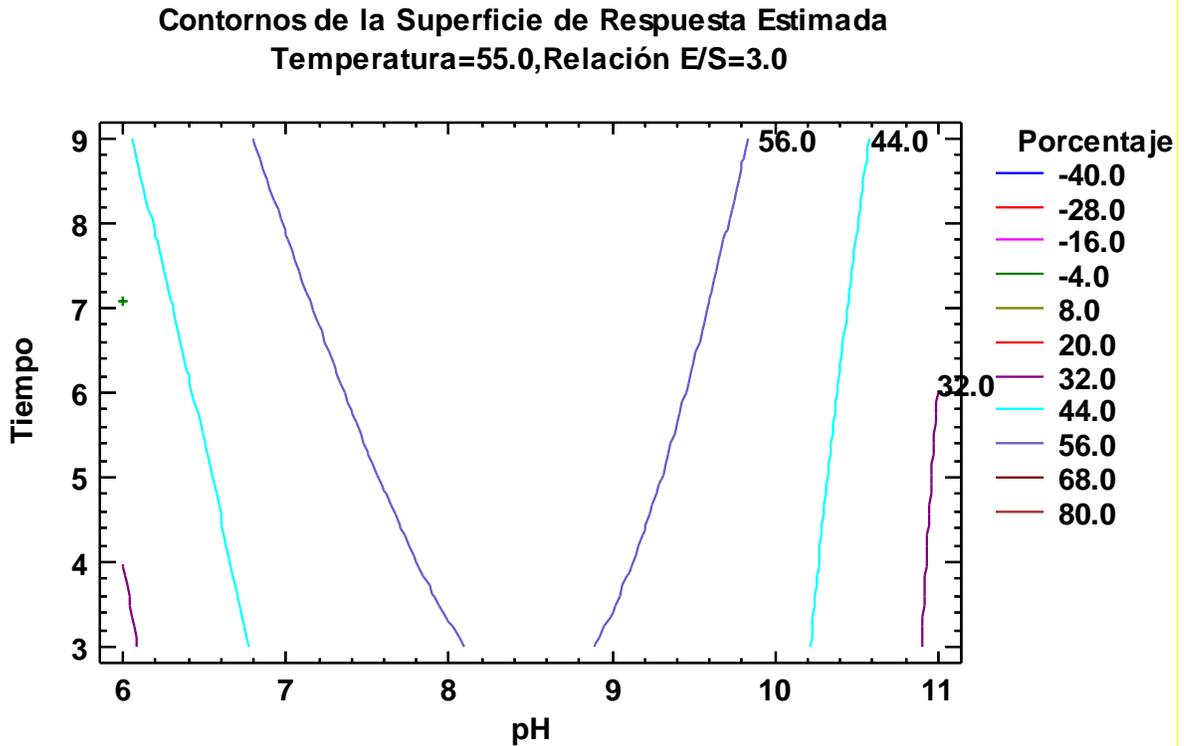


Figura 22. Superficie de respuesta del porcentaje de extracción para el diseño experimental, pH vs tiempo.

De la gráfica 22 se puede apreciar que a un pH aproximado de 6 unidades y un tiempo de 7 horas el diagrama de contornos sugiere que con estos valores se obtiene un porcentaje de extracción entre en 68 y el 80%.

6.5 EFECTO DE LA GRASA SOBRE LA HIDRÓLISIS

Como se mencionó anteriormente en la subsección del análisis proximal de las plumas de pollo, el porcentaje de grasa es un factor a tener en cuenta a la hora de realizar la extracción. En la tabla 10 se presenta una comparación de un análisis por triplicado realizado a muestras de plumas desengrasadas por el método de Soxhlet (datos 1,2 y3) y

los resultados de los 3 puntos centrales del diseño experimental los cuales se realizaron sin el desengrasado de las muestras (datos 4,5 y 6).

Tabla 10. Comparación de PE de muestras desengrasadas y sin desengrasar

Núm.	pH	T (°C)	Tiempo (h)	E/S	PE (%)	Promedio
Desengrasadas	8.5	55	6.0	0.3	69.7	71.267±1.98
	8.5	55	6.0	0.3	70.6	
	8.5	55	6.0	0.3	73.5	
No desengrasadas	8.5	55	6.0	0.3	64.9	63.500±1.57
	8.5	55	6.0	0.3	63.8	
	8.5	55	6.0	0.3	61.8	

Según los resultados presentados en la tabla 10 los valores promedios de los dos triplicados no presentan una gran diferencia significativa. Si se piensa en términos industriales es más conveniente trabajar con las muestras sin desengrasar, aunque el porcentaje de extracción sea relativamente menor que si se realiza dicho desengrasado ya que se esta omitiendo del proceso general un paso que requiere de un tiempo considerable además del uso de reactivos y un gasto energético.

Para finalizar con esta sección se realiza la parte de optimización del proceso extractivo. En la tabla 6 se muestra que el experimento número 8 del diseño se obtuvo el mejor porcentaje de extracción, aproximadamente el 72%, el programa estadístico, gracias al modelo matemático establecido en su algoritmo, ofreció valores óptimos para los factores independientes, en donde se alcanza un porcentaje de extracción del 108,087% aproximadamente, lo anterior se resumen en la tabla 11.

Tabla 11. Valores óptimos para los factores independientes para el diseño experimental

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
pH	5,97731	11,0227	5,99882
Temperatura	29,7731	80,2269	30,2817
Tiempo	2,63641	9,36359	7,99889
E/S	-0,0363586	0,636359	0,636359

Para corroborar el valor predicho se corrió los valores óptimos por triplicado. Los factores independientes experimentales se aproximaron. Los resultados experimentales se resumen en la tabla 12.

Tabla 12. Valores óptimos establecidos y experimentales para el diseño experimental

Factor	Establecimiento	Experimental
---------------	------------------------	---------------------

pH	5,99882	6,0000
Temperatura (°C)	30,2817	30,000
Tiempo (h)	7,99889	8,0000
Relación E/S	0,636359	0,6400

Tabla 13. Resultados experimentales de %E, para la predicción en el diseño experimental.

Predicción		108,87%
Experimental	1	93.348
	2	94.291
	3	90.639
Promedio		92.759
Desviación estándar		1.896

De la tabla 13 se observa que los valores experimentales obtenidos son aceptables y que según estos resultados se puede concluir que se logro optimizar el proceso de extracción de queratina a partir de plumas de pollo mediante una hidrolisis enzimática.

6.6 CARACTERIZACIÓN DE LA QUERATINA EXTRAÍDA

Se determinó el punto isoeléctrico de la queratina de las plumas mediante la adición de HCl al 10%, la medida del pH se realizó con ayuda del pH metro (Accumet Basic AB15), antes de su uso se calibró con solución estándares de pH 7,0 y 4,0 unidades. Las medidas se realizaron por triplicado, el punto isoeléctrico (pI) fue $4,1500 \pm 0000$. La queratina se centrifugó, se lavó con agua y etanol y se secó durante 12 horas a una temperatura de $50,0 \text{ }^\circ\text{C}$ y se caracterizó mediante FTIR y Uv-Vis. En la figura 23 se aprecia la queratina precipitada mediante el punto isoeléctrico (A) y su propiedad de elasticidad (B).

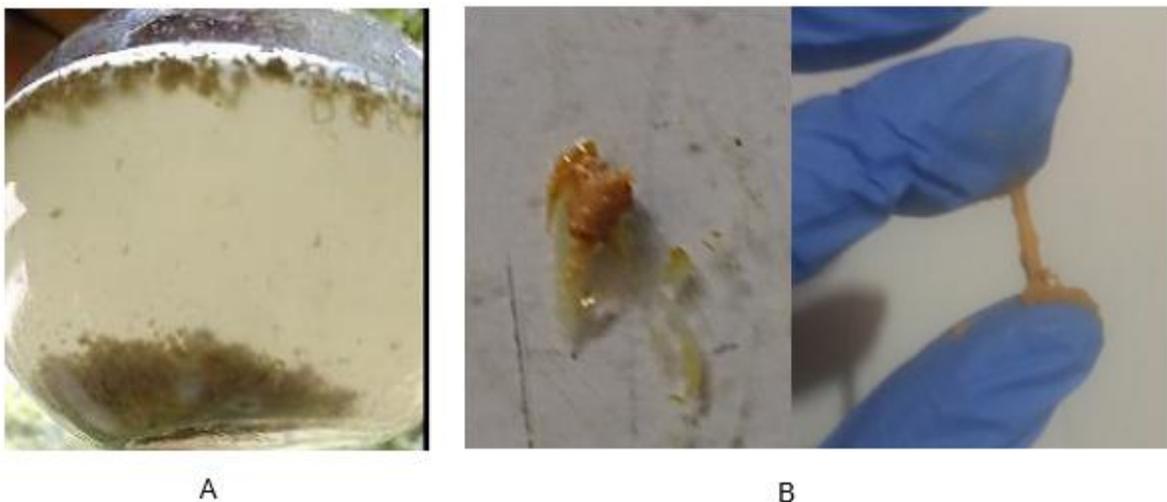
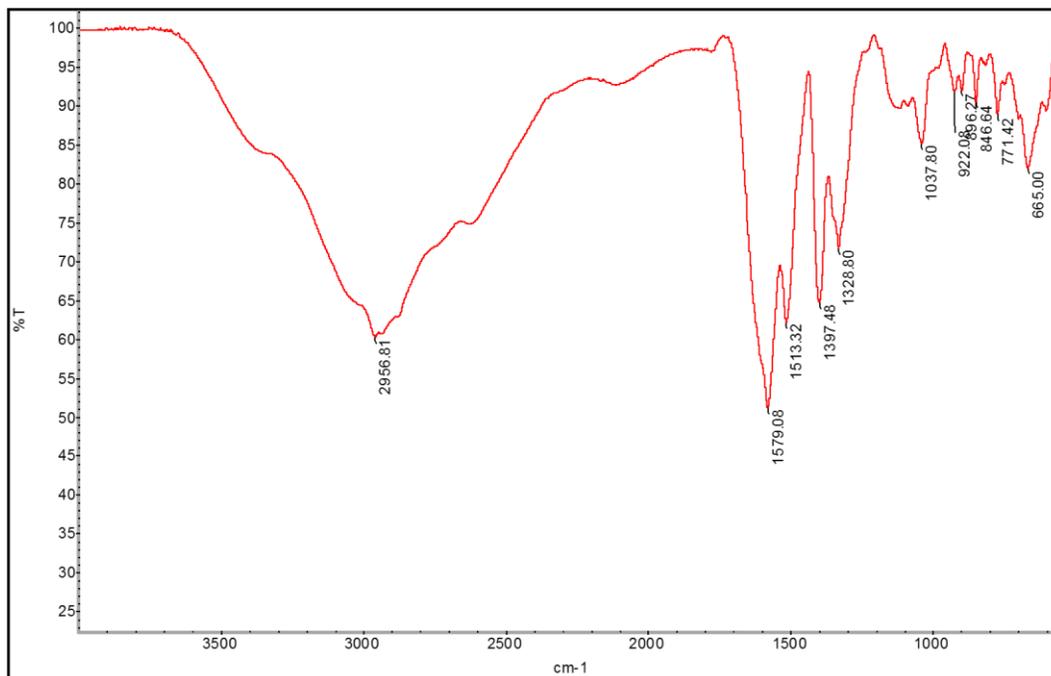
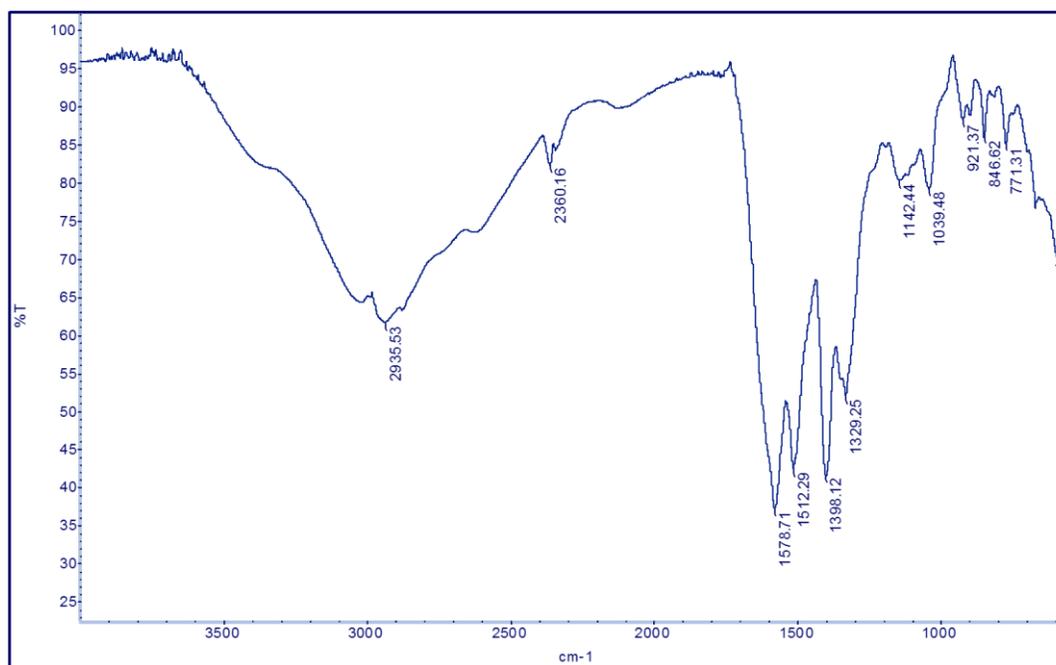


Figura 23. A) Queratina precipitada mediante el punto isoeléctrico y B) Propiedad elástica de la queratina precipitada.

Posteriormente se les determinó tanto los espectros infrarrojos como los ultravioleta. Para la medida de los FTIR se utilizó el ATR. La figura 25 muestra los espectros infrarrojos de la queratina precipitada de plumas de pollo (24.A) comparado con un patrón de queratina suministrado por Sigma Aldrich (24.B)



(A)



(B)

Figura 24. Comparación del espectro infrarrojo de la queratina obtenida por pl de las plumas de pollo con un patrón de queratina.

En la figura 24 se observa que las bandas correspondientes a vibraciones tipo NH ubicadas en 3000 cm^{-1} y 1570 cm^{-1} aproximadamente se replican tanto en el patrón de queratina como en la queratina obtenida por precipitación, de igual manera las vibraciones CH_3 , CH_2 , $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}-\text{H}_3$, $\text{C}-\text{H}_2$ y $\text{C}-\text{S}$ ubicadas aproximadamente en 2800, 2500, 1600, 1400, 1200 y 700 cm^{-1} respectivamente. La banda ubicada en 1100 cm^{-1} aproximadamente, según una revisión bibliográfica sugiere que dicha vibración corresponde posiblemente a un alargamiento $\text{C}-\text{O}$, o un alargamiento $\text{S}=\text{O}$. Según lo anterior el espectro de la queratina precipitada por pl proveniente de las plumas de pollo, es semejante al espectro del patrón de queratina patrón.

Continuando con la caracterización, en la figura 25 se puede apreciar el espectro de absorción Uv- Vis de la muestra de queratina precipitada proveniente de plumas de pollo comparado con el patrón de queratina utilizado, como se evidencia a una longitud de onda de aproximadamente 210 nm se encuentra la mayor absorbancia, de esta manera se evidencia una vez más que la queratina obtenida por hidrolisis enzimática presenta similitud con el patrón de referencia.

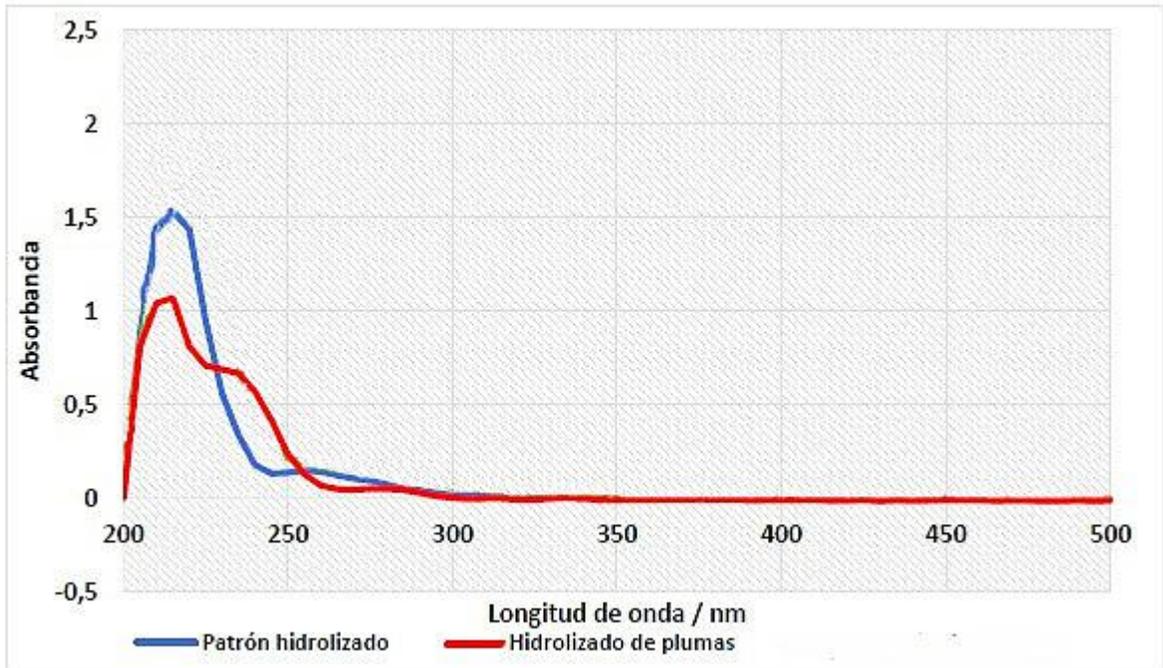


Figura 25. Espectros Uv-Vis de soluciones del patrón de queratina y queratina de plumas de pollo.

Para finalizar se realizó el análisis termogravimétrico (TGA), en la figura 26 se muestra el termograma obtenido para la queratina precipitada por punto isoelectrico.

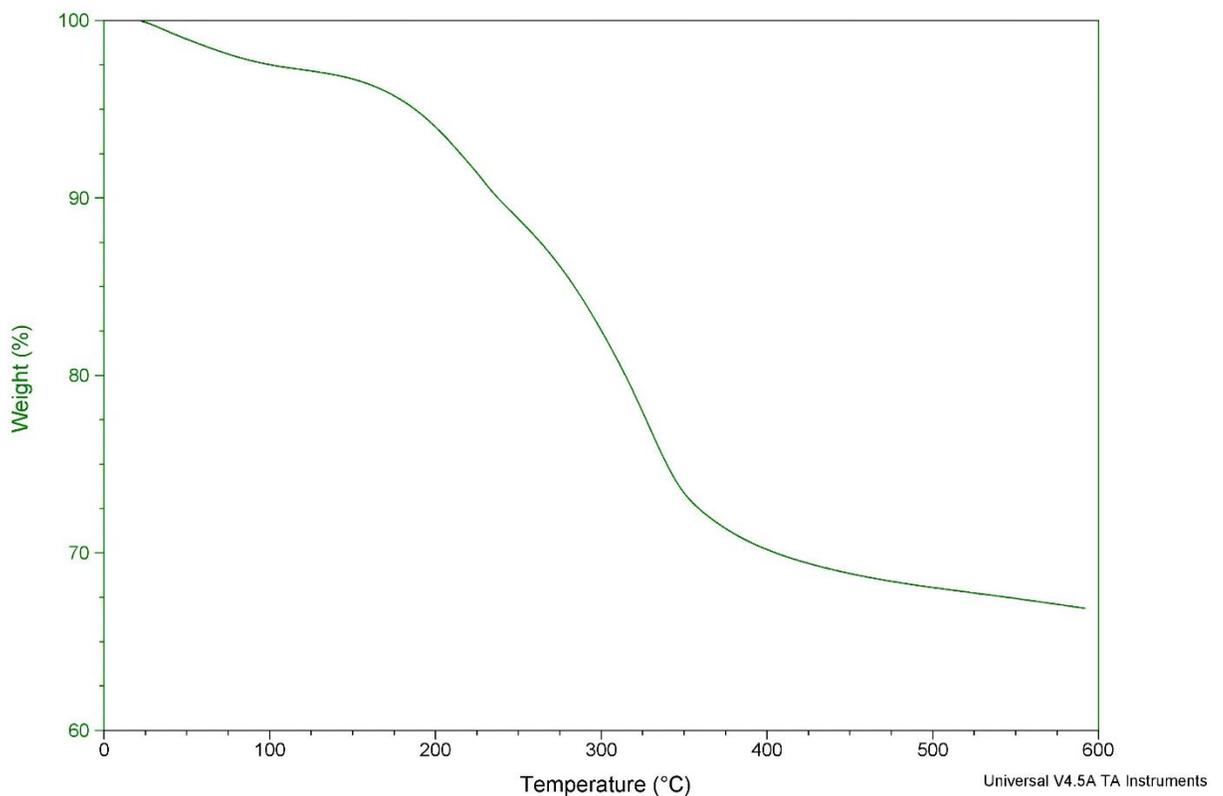


Figura 26. Termograma de la queratina precipitada por PI.

Este tipo de análisis registra de manera continua la pérdida o ganancia de peso de la muestra en función de la variación de temperatura o bien en función del tiempo a temperatura constante. Según esto, la queratina obtenida no presenta una pérdida considerable de peso o degradación hasta aproximadamente los 200 °C, punto en el cual aún posee más del 90% de su peso inicial. Esta característica de la queratina puede aprovecharse para utilizarla como un posible material de refuerzo en la fabricación de polímeros industriales, tales como: los polietilenos y los polipropilenos, en la producción de pasta de papel o cartón y la fabricación de biomateriales o materiales biomédicos, entre otros. Dándole, al igual que como se comentó con la digestibilidad, un valor agregado a un residuo muy poco utilizado como lo son las plumas de pollo.

7 CONCLUSIONES

Se logró optimizar el proceso de extracción de queratina de una muestra de pluma de pollos mediante hidrolisis enzimática utilizando la enzima Novo Pro-D[®] obteniendo valores óptimos de trabajo de pH: 6.0, T: 30°C, Tiempo: 8 h y relación E/S: 0.64.

El programa de superficie de respuesta utilizado para optimizar las variables de trabajo (pH, Temperatura, tiempo y relación E/S) en el proceso extractivo fue eficiente y se logró obtener un porcentaje promedio de extracción de 92,759%.

Las plumas de pollo poseen un gran potencial para su reutilización, pues, si se aprovechan de manera adecuada, su alto contenido de queratina hace que se genere un valor agregado, como por ejemplo un posible uso como fuente alimenticia para animales rica en proteínas, a lo que la industria alimenticia considera un residuo.

La queratina obtenida mediante hidrolisis enzimática fue caracterizada y presentó similitud con un patrón de referencia en el espectro de FTIR y el espectro de absorción de Uv-vis. Además de que se le realizó el análisis de aminoácidos y digestibilidad in vitro.

El análisis termogravimétrico sugiere que la queratina extraída con la enzima Novo Pro-D presenta una adecuada resistencia a cambios de temperatura, esta característica le confiere que pueda ser utilizada en procesos de reforzamiento de algunos materiales.

Se demostró que trabajando con la enzima Novo Pro-D[®] no es necesario realizar el desengrasado de las plumas de pollo, ya que los rendimientos de extracción no varían considerablemente y pensando desde un punto de vista industrial, se está ahorrando tiempo, reactivos y energía en la totalidad del proceso.

Mediante hidrolisis via enzimática se logró mejorar notablemente la digestibilidad de plumas de pollo, lo que sugiere que se puede aprovechar este subproducto de la industria avícola como una posible fuente de nutrición proteica animal, lo que le da un valor agregado importante.

La eficiencia del proceso y la calidad de la queratina extraída se podrían mejorar disminuyendo al máximo posible el tamaño de partícula de la pluma, ya que de esta manera se incrementa el área de contacto de la enzima, traduciéndose esto en una mejor extracción. Por otra parte también se puede mejorar dicha eficiencia mediante la inmovilización de la enzima en cuestión.

Se logró implementar una extracción más amigable con el medio ambiente que las extracciones convencionales, las cuales usan solventes químicos ya que la enzima simplemente se inactiva irreversiblemente dejándola sin actividad bioquímica, por lo que esta no tiene un impacto considerable en el ambiente y muestra una tendencia hacia la química verde. Además de que este tipo de extracción es relativamente simple y eficiente.

BIBLIOGRAFÍA

[1] ROSERO, B., BENÍTEZ, R., & MARTÍN, J. (2014). Evaluación de dos materias primas como fuente de proteína: pluma de pollo (*Gallus gallus*) y pezuña de vaca (*Bos primigenius taurus*). Ingenium, 8(22), p. 21-26

- [2] PAULINA, H., BRANTLEY, H. Some properties of keratin biomaterials: Kerateines. *Biomaterials* 31, 2010, p. 585–593
- [3] HE, S., FRANCO, C. and ZHANG, W. Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). *Food Research International.*, 50 (1), 2013, p. 289-297
- [4] Federación Nacional de Avicultores de Colombia (FENAVI) – Consumo per-cápita (2015) [Online], disponible:
http://www.fenavi.org/index.php?option=com_content&view=article&id=2160&Itemid=556
[28/07/2018]
- [5] DAZA, E. Estudio de gestión ambiental para la empresa Avícola Agrícola Mercantil del Cauca – Agricca S.A. Universidad de Manizales, Maestría en Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente. 2012, p. 20-78.
- [6.] GARCÍA, T. (2010), “Proteínas”. *El Pequeño Larousse Ilustrado*. México: Larousse. pp. 1824
- [7] Lingshou Huixin Mineral Manufacturer, Feather meal [Online]. Disponible: http://www.alibaba.com/product-gs/727298515/feather_meal.html?s=p. [28/07/2018]
- [8] Kock, J.W. Physical and Mechanical Properties of chicken feather materials. Tesis, Maestría en Ingeniería Civil y Ambiental, Instituto Tecnológico de Georgia (2006) p. 1-19.
- [9] Fraser, R.D.B. and Parry, D.A.D. The molecular structure of reptilian keratin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 19 (1996) p. 207–211.
- [10] Ocampo, M. Producción de un hidrolizado proteínico a partir de plumas de pollo: Aprovechamiento de un subproducto de la industria avícola. Tesis, Ingeniería Química, Universidad del Valle, (2010).
- [11] Grazziotin, A. et al. Production of feather protein hydrolysate by keratinolytic bacterium *Vibrio* sp. kr2. *Bioresource Technology*, 98 (2007) p. 3172–3175.
- [12] Bielorai, R. et al. Nutritional value of feather meal protein for chicks. *The Journal of Nutrition*, 112 (1982) p. 249–254.

- [13] CHAMIZO, J. (1994). "Química la ciencia central", [online]. Disponible:http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/htm/sec_4.html [01/08/2018]
- [14] Dvorkin, J. (2010). *Bases fisiológica de la práctica médica*. México: Panamericana pp 47-51
- [15] Kajava, A. V et al. Beta-structures in fibrous proteins. *Advances in protein chemistry*, 73 (2006) p. 1–15.
- [16] Wilkins, J., Moore, M., y Rodriguez, D. (1990). *Cosmetología de Harry*. Madrid: Diaz Santos.
- [17] Navarro, J. (1992) La familia de los genes de a queratina 6: Caracterización y regulación, Tesis doctoral, Universidad complutense de Madrid, Facultad de biología.
- [18] Poole, A.J. et al. Dissolving feather keratin using sodium sulfide for bio-polymer applications. *Journal of Polymers and the Environment*, 19 (2011) p. 995–1004.
- [19] Leme, P. et al. Feather meal as a protein source for range cows story in brief. *Animal Science Research Report* (1978) p. 1976–1979.
- [20] Bertsch, A. and Coello, N. 2005. A biotechnological process for treatment and recycling poultry feathers as a feed ingredient. *Bioresource Technology*, 96 (2005) p. 1703–1708.
- [21] Carlosama, C. (2010). *Asociación colectiva para el desarrollo rural de tierra de campos*. [Online]. Disponible: <http://www.cdrtcampos.es/lanatural/compostaje.htm>. [01/08/2018]
- [22] FASSBENDER, H., W y BORNEMISZA, E. Química de suelos con énfasis en América Latina. Instituto Interoamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA) 2a ed. San José Costa Rica, 1987.
- [23] JAYATHILAKAN, K., SULTANA, K., RADHAKRISHNA, K., and BAWA, A. S. Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. *J Food Sci Technol* 49 (3), 2012, p 278–293.
- [24] Rosero, B. (2016) OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE QUERATINA MEDIANTE EL MÉTODO DE SHINDAI TRADICIONAL E HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA A PARTIR DE RESIDUOS DE LA INDUSTRIA ALIMENTICIA (AVÍCOLA Y GANADERA),

PLUMAS DE POLLO (*Gallus gallus*) Y PEZUÑA DE VACA (*Bos primigenius taurus*), Tesis de pregrado, Universidad del Cauca, FACNED, p.16-21

[25] FENAVI Consumo per cápita de pollo, (2018). [Online] Disponible: http://www.fenavi.org/index.php?option=com_content&view=article&id=2160<. [01/08/2018]

[26] Hmidet, N. et al. Chicken feathers: a complex substrate for the co-production of alpha-amylase and proteases by *B. licheniformis* NH1. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 37 (2010) p. 983–90.

[27] Wang, Y.-X. and Cao, X.-J. Extracting keratin from chicken feathers by using a hydrophobic ionic liquid. *Process Biochemistry*, 47 (2012) p. 896–899.

[28] Brunner, G. Near critical and supercritical water. Part I. Hydrolytic and hydrothermal processes. *Journal of Supercritical Fluids*, 47 (2009) p. 373–381.

[29] Ramos, P. and Márquez, M.C. Kinetics of amino acid production from hog hair by hydrolysis in sub-critical water. *Journal of Supercritical Fluids*, 46 (2008) p. 137–141.

[30] Prieto, C. (2007). DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE UN REACTOR DE MEMBRANA DISCONTINUO PARA LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS, Tesis doctoral, Universidad de granada, Departamento de Ingeniería Química. P. 11-22.

[31] Dixon M. and Webb E. C. *Enzymes*. 3rd ed. Longman, London. United Kingdom. 1979

[32] Loja, G. (2015). Obtención de queratina a partir de plumas de pollo utilizando queratinasas producidas por *Bacillus spp*. Trabajo de grado Bioquímica Farmacéutica. Universidad Técnica de Machala. Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud. [Online]. Disponible: <http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/2829/3/TRABAJO%20COMPLETO.pdf>. [4/08/2018]

[33] Manual de Statgraphics, Curso de formación estadística, Universidad Carlos III de Madrid. P. 2-26

[34] Correa, L. OBTENCAO E CARACTERIZACAO DE HIDROLISADOS ENZIMÁTICOS DE PROTEÍNAS DO FARELO DE SOJA. Tesis doctoral, Universidad federal de San Carlos, Centro de Ciencias Exactas y Tecnología, Departamento de ingeniería Química. p. 43-49.

[35] Parts of a contour feather. [Online]. Disponible: https://www.wpclipart.com/animals/birds/feather/parts_of_a_contour_feather.png.html. [04/08/2018]

[36] Orjuela, P, et al. Desarrollo de productos a base de queratina a partir de residuos de la industria avícola, (2015) p. 503–508.

[37] Barone, J.R. et al. Extrusion of feather keratin. Journal of Applied Polymer Science, 100 (2005) p. 1432–1442.

[38] Kajava, A. V et al. Beta-structures in fibrous proteins. Advances in protein chemistry, 73 (2006) p. 1–15.

[39] Publicaciones textiles. (2007) [Online]. Disponible: http://www.aduanasmexico.com.mx/cgi-bin/ctarnet/notas_ex/not_2830.html. [05/08/2018]

[40] Andrés. R, Proteasas. Grupo de Biotransformaciones, Facultad de Farmacia, p.10.

[41] Official Methods of Analysis. AOAC. 20th ed. Gaithersburg, MD: The association, 2016.

ANEXOS

ANEXO 1: ANÁLISIS PROXIMAL

Los análisis se realizaron por triplicado, se calculó cada factor con las ecuaciones anteriormente mencionadas, el volumen del blanco para la determinación de proteína fue 0,10 mL, el ácido clorhídrico se estandarizó con, Na₂CO₃ seco, se utilizó como indicador verde de bromocresol, la concentración del ácido estandarizado fue 0,0992 N

Tabla A1.0 Datos para la determinación del porcentaje de Humedad (%H)

<i>Muestra</i>	<i>W_{cp+mh}</i>	<i>W_{cp+ms}</i>	<i>W_{mh}</i>	<i>%H</i>
Plumas	98,3451	98,0672	5,0002	5,5578
	96,5249	96,2113	5,0001	6,2719
	91,8521	91,5863	5,0001	5,3159

Tabla A1.1 Datos para la determinación del porcentaje de Cenizas en base seca (%C_{bs})

<i>Muestra</i>	<i>W_{c+cenizas}</i>	<i>W_c</i>	<i>W_{mseca}</i>	<i>%C_{bs}</i>
Plumas	37,3754	37,3723	0,1001	3,0969
	33,7516	33,7475	0,1002	4,0918
	32,8753	32,8723	0,1002	2,9940

Tabla A1.2 Datos para la determinación del porcentaje de grasa en base seca (%G_{bs})

<i>Muestra</i>	<i>W_{b+pe+grasa}</i>	<i>W_{b+ma}</i>	<i>W_{mseca}</i>	<i>%C_{bs}</i>
	153,6529	153,3876	10,0002	2,6529
Plumas	156,2580	155,9589	10,0002	2,9909
	162,3150	162,0825	10,0003	2,3249

Tabla A1.3 Datos para la determinación del porcentaje de Proteína en base seca (%P_{bs}), factor 6,25.

<i>Muestra</i>	<i>mL HCl</i>	<i>P_{ms}</i>	<i>%N</i>	<i>%P_{bs}</i>
Plumas	29,9000	0,3002	13,8391	86,4944
	29,8000	0,3000	13,7086	85,6787
	30,1000	0,3001	13,9363	87,1019

Tabla A1.4 Datos para la determinación del porcentaje de Fibra en base seca (%F_{bs})

Muestra	W_{c+m en estufa}	W_{c+cenizas}	W_{m desengrasada y seca}	%F_{bs}
Plumas	35,7651	35,7610	1,0002	0,4099
	37,7832	37,7798	1,0002	0,3399
	37,8741	37,8690	1,0001	0,5010

Tabla A1.3 Datos para la determinación del porcentaje de extracto libre no nitrogenado (%ELN_{bs})

Muestra	%H	%C_{bs}	%G_{bs}	%P_{bs}	%F_{bs}	%ELN_{bs}
Plumas	5,5578	3,0969	2,6529	86,4944	0,4099	1,7881
	6,2719	4,0918	2,9909	85,6787	0,3399	0,6268
	5,3159	2,9940	2,3249	87,1019	0,5010	1,7623

ANEXO 2: ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

Tabla A2.1. Curva de calibración, las mediciones se realizaron por triplicado

μmol Tyr	Abs[*] 1	Abs[*] 2	Abs[*] 3	Promedio Abs	Desv. STD^{**}
0,0550	0,0890	0,0850	0,0870	0,0870	0,0020
0,1010	0,1610	0,1580	0,1560	0,1583	0,0025
0,2100	0,3010	0,3150	0,2880	0,3013	0,0135
0,3200	0,4730	0,4650	0,4770	0,4717	0,0061
0,4310	0,6920	0,6880	0,5990	0,6597	0,0526
0,5000	0,7890	0,7470	0,7040	0,7467	0,0425
0,8530	1,2540	1,1870	1,27160	1,2375	0,0446
1,0750	1,4100	1,3950	1,4200	1,4083	0,0126

*Absorbancia a 660nm (correspondiente a la diferencia entre el patrón medido y el blanco de reactivos), ** Desviación estándar, n=3

Tabla A2.2. Absorbancia determinada a 660nm para la hidrolisis con Novo Pro-D[®], temperatura 37°C, pH 7,5 y tiempo de hidrolisis de 10 min, los análisis se realizaron por triplicado.

Test	Abs[*] 1	Abs[*] 2	Abs[*] 3	Abs Promedio	Desv. STD^{**}
Test 1	0,0540	0,0550	0,0540	0,054	0,0006
Test 2	0,0910	0,0920	0,0920	0,092	0,0006
Test 3	0,0650	0,0650	0,0650	0,065	0,0000

*Absorbancia a 660nm (correspondiente a la diferencia entre el test y el blanco de test), ** Desviación estándar, n=3

ANEXO 3: DETERMINACION DEL PERFIL DE AMINOACIDOS Y DIGESTIBILIDAD PARA LAS MUESTRAS DE ESTUDIO

1. Determinación del contenido de aminoácidos

La determinación del contenido de aminoácidos se realiza de acuerdo al método PICO-TAG de Waters Corporation (1995), trabajada por Restrepo et al 2011 y lo establecido por la AOAC 994.1210. La cuantificación de aminoácidos se realiza por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con columna en fase reversa. Debido a que el equipo de la Universidad del Cauca no cuenta con las características necesarias para la determinación, se realiza en QUANTAR S.A.S Cali-Colombia con la metodología Waters Pico Tag estandarizada.

Tratamiento de muestra: la muestra debe ser hidrolizada con ácido clorhídrico 6N, durante 24 horas, a 110°C, posteriormente el ácido se evapora a sequedad. La solución de estándares de aminoácidos se prepara en HCl 0,1N a una concentración de 2,5 ppm. La curva de aminoácidos se prepara con concentraciones de 4,2 ppm, 8,3 ppm, 12,5 ppm, 16,7 ppm y 20,8 ppm. Cada corrida fue hecha por triplicado.

Etapas de secado y derivatización: Etapa 1. Proceso de resecado: la solución de resecado está compuesta de etanol, agua y trietilamina en una relación 2:2:1 respectivamente a 50 µL de la muestra y a las soluciones estándar de aminoácidos se adiciona 10 µL de la solución de resecado, posteriormente se liofiliza a sequedad a -40°C durante 30 min hasta eliminación completa del solvente. **Etapa 2.** Preparación del reactivo derivatizante: Se prepara mezclando etanol, agua, trietilamina y fenilisotiocianato (PITC; reactivo de Edman) en la relación 7:1:1:1 respectivamente. **Etapa 3.** Reacción de derivatización: se adicionan 20µL de reactivo derivatizante a la muestra obtenida en la etapa 1, posteriormente se liofiliza durante 30 min con el propósito de secar completamente el fenilisotiocianato que no reacciona.

Preparación de soluciones: Fases móviles y diluentes: Fase móvil A: Mezcla de acetato de sodio 0,150M (pH=6,4, se titula con ácido acético glacial para llevar a este pH) y acetonitrilo (16:1, v/v), posteriormente se agrega 5,2 µL de trietilamina. Fase móvil B: Agua-acetonitrilo (0,6:1, v/v), previamente desgasificada en ultrasonido durante 20 seg. Solución diluyente de la muestra: Solución de fosfato disódico (solución de fosfato disódico 0,005N se lleva a pH=7,4 con ácido fosfórico) y acetonitrilo (19:1, v/v).

Inyección de muestra: A la muestra obtenida en la etapa 3 se le adiciona 600 μL de la solución diluyente Pico -Tag, se agita en vortex y se inyectan 5 μL de la muestra derivatizada. Los aminoácidos derivatizados son separados en una columna C18 Waters Pico Tag (300x3, 9mm, 3 μm) fase reversa, a una velocidad de flujo de 1,0 mL/min, se usa un gradiente multietapas simple de dos solventes, temperatura constante de 38°C, la identificación se realizó utilizando un detector ultravioleta a una longitud de onda de 254 nm.

2. Digestibilidad *in vitro* de proteínas.

La determinación de la digestibilidad *in vitro* se realiza siguiendo lo establecido en la norma técnica colombiana NTC 719 y haciendo algunas modificaciones de lo reportado por Miller et al 1997. La simulación de la digestibilidad *in vitro* de proteínas se da en 2 etapas:

Etapla 1: Simulación de la digestión gástrica: Se pesan 0,5 g de la muestra, posteriormente se agregan 25 mL de buffer fosfato 0,1 M a pH=6, se agita y agregan 10mL de HCl 0,2 N, luego se ajusta a pH=2 con solución de HCl 1N y NaOH 1N. Posteriormente se agregan 25 mg de pepsina y 1mL de antibiótico para evitar el crecimiento bacteriano, seguido de una incubación por 2h a 39°C con agitación constante en el equipo shaker que se observa en la figura A3.1.



Figura A3.1. Shaker, equipo con agitación constante y control de temperatura.

Etapla 2: Simulación de la digestión post-gástrica: Después de terminar el primer periodo de incubación se deja que las muestras se enfríen hasta temperatura ambiente. Se agregan 10mL de buffer fosfato 0,2 M a pH=6,8. Luego se agregan 5 mL de NaOH 0,6M y se ajusta el pH=6,8, con soluciones de HCl 1N y NaOH 1N. Posteriormente se agregan 100mg de pancreatina y se deja incubando por un tiempo de 4 h. Terminado el tiempo de incubación se deja enfriar las muestras a temperatura ambiente y se agregan 5mL de ácido tricloroacético para precipitar las proteínas ligeramente solubles que han quedado sin ser digeridas, por un tiempo de 30 min. Posteriormente se centrifuga y separa la proteína residual que no fue digerida con un solvente orgánico, y se lleva a secar a 40°C

por 12 h. Finalmente se determina el contenido proteico del residuo por el método Kjeldahl. El cálculo de digestibilidad se realiza mediante la ecuación A4.1.

$$\%D = \frac{P_1 - P_2}{P_1} \times 100$$

Ecuación A3.1. *Calculo del porcentaje de digestibilidad in vitro de una proteína*

ANEXO 4: OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE QUERATINA

El valor del porcentaje de proteína extraída se determinó mediante las ecuaciones 11 y 12. El valor del porcentaje de extracción se determinó mediante la ecuación 13, teniendo en cuenta que las plumas de pollo poseen un aporte de 87,4250% de Queratina.

Tabla A4.1. Observaciones del diseño experimental.

N0	V_{HCl Final}	Peso	PN	PNc	PP	PE
	mL	g	%	%	%	%
1	0.7	5.0017	1.9271	1.9726	12.3289	14.3
2	1.38	5.0022	3.8080	3.8979	24.3618	28.2
3	2.38	5.0009	6.5625	6.7174	41.9837	48.6
4	3.18	5.0011	8.7650	8.9718	56.0739	64.9
5	3.13	5.0065	8.6180	8.8214	55.1336	63.8
6	1.63	5.0023	4.4961	4.6022	28.7640	33.3
7	2.08	5.0005	5.7369	5.8723	36.7020	42.5
8	1.58	5.0002	4.3603	4.4632	27.8952	32.3
9	2.48	5.0061	6.8308	6.9920	43.6998	50.6
10	3.28	5.0053	9.0327	9.2459	57.7868	66.9
11	3.53	5.0024	9.7261	9.9557	62.2229	72.0
12	1.73	5.0008	4.7728	4.8855	30.5342	35.3
13	2.18	5.0036	6.0086	6.1504	38.4398	44.5
14	1.83	5.0002	5.0488	5.1679	32.2997	37.4
15	3.03	5.0013	8.3516	8.5487	53.4295	61.8
16	2.43	5.0009	6.7002	6.8583	42.8644	49.6
17	1.43	5.0014	3.9463	4.0394	25.2464	29.2
18	1.78	5.0007	4.9106	5.0265	31.4156	36.4
19	2.13	5.0035	5.8711	6.0096	37.5603	43.5

Donde:

V_{HCl Final} = Volumen de cada muestra menos el blanco y el volumen de la enzima por separado.

PN = Porcentaje de nitrógeno

PNc = Porcentaje de nitrógeno corregido con el patrón de glicina

PP = porcentaje de proteína PE = porcentaje de extracción

ANEXOS: PROTOCOLOS

ANEXO 1: GUÍA DE LABORATORIO EL ANÁLISIS PROXIMAL.

 UNIVERSIDAD DEL CAUCA	FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN DEPARTAMENTO DE QUÍMICA GRUPO DE INVESTIGACION: QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES (QPN)	
	Procedimiento de Laboratorio Análisis proximal	

1. FUNDAMENTO TEÓRICO

El análisis proximal posee etapas bien definidas que permiten determinar la composición química de diferentes muestras. Las determinaciones que se realizan más frecuentemente incluyen la determinación de humedad, cenizas, extracto etéreo (grasa cruda), proteína total, fibra y carbohidratos totales. Así mismo, dependiendo del objetivo del análisis, resultan importantes las determinaciones relacionadas con la caracterización de algún grupo de nutrientes en particular, en este caso proteína. La información generada por un análisis proximal es crítica para el entendimiento de los factores que determinan las propiedades de las muestras.

Las propiedades particulares de una muestra se pueden evaluar por un número considerable de técnicas analíticas, debido a la gran variedad es necesario utilizar la técnica más apropiada, nuestro estudio con llevo un análisis proximal, basado en métodos Físicos y Químicos de la AOAC, los cuales se modificaron en algunos aspectos.

La determinación de la humedad por el método de pérdida de peso se basa en la reducción de peso que experimenta la muestra de estudio cuando se elimina agua por calentamiento, bajo condiciones normalizadas de presión, temperatura y tiempo. Las cenizas en las muestras están constituidas por el residuo inorgánico que queda después de que la materia orgánica se ha oxidado totalmente. Las cenizas obtenidas no tienen necesariamente la misma composición que la materia mineral presente en la muestra original, ya que pueden existir pérdidas por volatilización o alguna interacción entre los constituyentes. La determinación de extracto etéreo o grasa bruta se fundamenta en la separación de un componente de la matriz utilizando la diferencia de solubilidad, para evitar inconvenientes por la humedad de la muestra, esta debe ser sometida a un procedimiento previo de secado en una estufa, para extraer la mayor cantidad de agua posible. La grasa de la muestra seca se extrae mediante su solubilidad con un solvente orgánico. La determinación de nitrógeno

presente en la muestra se basa en el hidrolisis de la proteína que aminoácidos como monómero, hay dos maneras principales para la cuantificación de proteínas, estas se clasifican en dos grupos los métodos directos y los indirectos. Los métodos directos se basan en estimar la cantidad de proteína a partir del contenido de uno o dos aminoácidos particulares fáciles de identificar por su reactividad química específica, los métodos indirectos se basan en estimar la cantidad de proteína a partir de nitrógeno contenido en la muestra, el método directo genera resultado de proteína pura y el método indirecto genera resultados de proteína bruta debido a que los grupos sustituyentes de un aminoácido pueden contener nitrógeno. Este análisis se basa en un método indirecto, el método de Kjeldhal, este método consiste en la digestión ácida de la proteína y de más compuestos orgánicos presentes en la muestra generando la oxidación de los compuestos carbonados hasta CO₂ y generación de amonio NH₄⁺, el cual con la ayuda de NaOH es posible convertirlo en amónico el cual es cuantificado mediante una titulación con HCl. La fibra bruta constituye un índice de las sustancias presentes en las muestras, esta está constituida principalmente por celulosa, lignina y pentosanas, suberinas, cutina, alginatos. El extracto nitrogenado se agrupa como mono y disacáridos, la parte soluble de la celulosa, pentosanas y ligninas, las hemicelulosas, ya determinados todos los factores enunciados el extracto libre.

2. OBJETIVOS

2.1 Determinar cada uno de los parámetros que se exigen en un análisis proximal.

3. MATERIALES

MATERIALES	CANTIDAD
Cajas de Petri	3
Epátala	2
Pinza para crisol	1
Crisol de porcelana con su tapa	6
Vidrio reloj	2
Equipo de extracción Soxhlet	3
Balón de 250 mL	3
Vasos de precipitados de 100 mL	3
Erlenmeyer de 250 mL	6
Pinzas con nueces	6
Equipo de destilación fraccionada	3
Erlenmeyer de 300 mL	6
Pipeta de 10 mL	2
Bureta de 25 mL	1
Probeta de 100 mL	2
Pinzas para bureta	1
Condensador para reflujo con mangueras	2
Varilla de vidrio	1

Equipo de filtración	3
Balones fondo plano 250 mL	6

4. REACTIVOS

REACTIVOS	CANTIDAD
Éter etílico anhidro	100 mL
K ₂ SO ₄ -catalizador*	5,0 g
Indicador de Tashiro**	2 mL
Ácido bórico al 4 %	600 mL
HCl 0,1 N estandarizado***	100 mL
H ₂ SO ₄ 0,255N	300mL
NaOH 0,313 N	300 mL
Etanol	100 mL
H ₂ SO ₄ concentrado	60 mL
Agua destilada	--
Iso-Octano	1L
Na ₂ CO ₃ seco grado analítico	10 g
NaOH 32% comercial	1L
Na ₂ CO ₃ al 20% comercial	3L
azul de bromotimol	100 mg

*10 g K₂SO₄, 0,3 g de TiO₂, 0,3 de CuSO₄.5H₂O

**Mezclar 25 mL de solución alcohólica de azul de metileno al 0,05% y 25 mL de solución al 0,1 % de rojo de metilo (0,2 g de rojo de metilo y 0,1 g azul de metileno en 100 mL de etanol)

*** Para la estandarización pese 0,1 g de Na₂CO₃, secado en estufa a 105 °C y enfriado en el desecador, disuelva aproximadamente a 40 mL de agua, añada 3 gotas de indicador de naranja de metilo (0,1mg en 100mL en etanol) y titule con el ácido a estandarizar.

5. EQUIPOS

EQUIPOS	CANTIDAD
Estufa	1
Balanza analítica	1
Desecador	1
Piedras de ebullición	10
Algodón desengrasado	1
Equipo Kjeldahl- Buchi	1
Mufla	1
Tela filtrante o de dril	1
Cartucho de celulosa para Soxhelt	3
Gramera	1
pH metro	1
Planchas de calentamiento	3

6. PROCEDIMIENTO:

6.1 Determinación de Humedad o sustancias volátiles

6.1.1 Macerar finamente de 90 a 150 g la muestra de estudio, posteriormente realizar un cuarteo hasta obtener una muestra final de 70 g a 90 g

6.1.2 Pesar en 3 cajas de Petri por separado, 10 g de la muestra cuarteada, garantizar que la muestra quede dispersa homogéneamente sobre la superficie inferior de la caja de Petri.

6.1.3 Llevar las 3 cajas de Petri destapadas a desecación en un horno de secado a presión atmosférica entre 98-100°C durante 3 horas.

6.1.4 Retirar las cajas de Petri tapadas y colocar inmediatamente en el desecador hasta que alcance la temperatura ambiente

6.1.5 Pesar las 3 cajas de Petri con la muestra y anotar estos valores Llevar nuevamente las 3 cajas de Petri destapadas al horno de secado a la temperatura anterior y dejar al menos durante 1 hora más.

6.1.6 Llevar nuevamente las 3 cajas de Petri tapadas al desecador hasta temperatura ambiente. Pesar nuevamente las 3 cajas de Petri tapadas

6.1.7 Repetir este procedimiento hasta obtener un peso constante en la medida. Determinar el % de humedad promedio de las 3 cajas de Petri

6.2 Determinación de cenizas o material mineral.

6.2.1 Lavar y secar 3 crisoles de porcelana con su respectiva tapa y secarlos a 100°C por 3 horas en el horno de secado.

6.2.2 Llevar los crisoles al desecador hasta temperatura ambiente

6.2.3 Pesar con la mayor precisión posible 1.5 g de muestra seca en los tres crisoles

6.2.4 Llevar los 3 crisoles con su respectiva tapa a un horno de calcinación, programar una rampa de temperatura hasta los 700°C, rata de 1,88 °C/min durante 6 horas, Asegurarse que la tapa no quede ajustada al crisol. Mantener los 700°C durante 3 horas para obtener las cenizas blancas

6.2.5 Pasado las 2 horas dejar que la temperatura del horno descienda a 60 °C, y sacar las muestras con su tapa respectiva para evitar perdida de cenizas y llevar a desecador hasta temperatura ambiente

6.2.6 Pesar los tres crisoles con sus respectivas tapas.

6.3 Determinación del extracto etéreo o grasa bruta

6.3.1 Lavar el balón de extracción, en conjunto con piedras de ebullición con solución de hidróxido de sodio al 10%, enjuagar bien con agua destilada, luego con éter, y secar en la estufa por 40 min a 100°C.

6.3.2 Lavar con iso-octano el equipo Soxhlet, el cartucho de celulosa y la piedra de ebullición, Pesar el balón de extracción más la piedra de ebullición y un papel filtro por triplicado

6.3.3 En el papel filtro pesar 2,0 g de la muestra secada en la estufa, y colocar todo el conjunto dentro del cartucho de celulosa y luego en la cámara de extracción del Soxhlet.

6.3.4 Conectar el sistema de extracción y dejar en reflujo durante 4 horas con un flujo de 4 a 5 gotas por segundo, garantizar que el nivel inicial del iso-octano se mantenga constante por ello si es necesario adicionar iso-octano se puede hacer

6.3.5 Destilar el éter por columna vigreux, luego llevar el balón de extracción a al horno de secado a 100 °C por 30 min

6.3.6 Pasado el tiempo llevar el balón de extracción al desecador hasta temperatura ambiente

6.3.7 Pesar el sistema del balón, perla de ebullición, y grasa

6.3.8 La muestra que se encuentra en el cartucho se debe guardar para el posterior análisis de Fibra cruda.

6.4 Determinación de nitrógeno (proteína)

6.4.1 Pesar de 0,5 g de muestra en un papel filtro o vidrio reloj, transferir la muestra en un tubo de disgregación BUCHI de 500 mL previamente lavado y secado en el horno

6.4.2 Adicionar 2,0 g del catalizador (K₂SO₄-Catalizador) y 10 mL de H₂SO₄ concentrado en el tubo de disgregación en posición inclinada.

6.4.3 Digestar hasta que la muestra quede completamente clara, libre de materia orgánica; de vez en cuando se debe girar el balón para recoger cualquier material carbonizado adherido a la pared

6.4.4 Enfriar a temperatura ambiente y diluir con precaución con 45 mL de agua destilada.

6.4.5 Adicionar 100 mL de solución de H₃BO₃ al 4 % con 3 gotas de indicador de Tashiro a un Erlenmeyer de 250 mL para recoger el destilado.

6.4.6 Conectar el balón en el aparato de destilación con el extremo del condensador penetrando en la disolución de ácido bórico contenido en el Erlenmeyer.

6.4.7 Adicionar cuidadosamente 50 mL de la solución de hidróxido de sodio al 32 % al tubo de disgregación, esto se hace con la ayuda del destilado de BUCHI.

6.4.8 Calentar con vapor de agua y recoger el destilado hasta viraje a verde del indicador; dejarlo hasta completar un volumen de 200 mL

6.4.9 Retirar el balón y titular el borato con solución estandarizada de HCl 0,1N

6.3 Determinación de fibra bruta y extracto no nitrogenado

6.5.1 Transferir cuantitativamente 1 g del residuo obtenido de la determinación de grasa (muestra desengrasa) a un balón de 250 mL

6.5.2 Calentar en un Erlenmeyer 100 mL de H₂SO₄ 0,255 N hasta ebullición y adicionar en el balón de 250 mL y dejar en reflujo por exactamente 30 min (contados a partir de la ebullición), teniendo cuidado que todo el material este en contacto con la solución

6.5.3 Calentar en un Erlenmeyer calentar 500 mL de agua destilada

6.5.4 Retirar la mezcla del reflujo y filtrar al vacío, a través de una tela ya sea dril o lona y lavar con suficiente agua caliente hasta que el filtrado obtenga un pH neutro, tener cuidado de perder muestra

6.5.5 Calentar 100 mL de NaOH 0,313 N en un Erlenmeyer hasta ebullición y adicionar sobre la muestra filtrada anteriormente y dejar la mezcla durante 30 min en reflujo, y proceder como en la digestión ácida

6.5.6 Transferir la muestra lavada a un vaso de precipitados y adicionar 25 mL de etanol y filtrar utilizando la misma tela y lavando con 25 mL de etanol

6.5.7 Transferir el residuo (muestra más tela) en un crisol (pesado previamente con su tapa) y dejar en la estufa a una temperatura de 110-120°C por 1 hora, y proceder a temperar en un desecador y realizar el mismo procedimiento hasta obtener un peso constante

6.5.8 Luego llevar el crisol más la tapa a la mufla y programar una rampa de temperatura hasta 700°C, dejar a esa temperatura por 3 horas.

6.5.9 Dejar enfriar a 60 °C y llevar el crisol más la tapa al desecador hasta temperatura ambiente y pesa. La pérdida de peso en la incineración se considera como la fibra cruda de la muestra pesada antes de extraer la humedad.

7. OBSERVACIONES, CÁLCULOS Y RESULTADOS

7.1 Determinar cada uno de los parámetros del análisis proximal

Porcentaje de Humedad:

$$\%H = \frac{W_{\text{caja de petri+muestra húmeda}} - W_{\text{caja de petri+muestra seca}}}{W_{m \text{ húmeda}}} \times 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

Dónde: W= peso en gramos, %H= Porcentaje de humedad

Porcentaje de cenizas:

$$\% C_{bs} = \frac{(W_{c+ \text{ cenizas}} - W_c)}{W_{m \text{ seca}}} \times 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

Dónde; Wc=peso crisol vacío, Wmseca= Peso muestra seca, Wc+cenizas= peso de las cenizas más crisol, %Cbs= porcentaje de cenizas en base seca

Porcentaje Grasa:

$$\% G_{bs} = \frac{(W_{b+pe+grasa} - W_{b+ma})}{W_{m \text{ seca}}} \times 100 \quad (\text{Ec. 3})$$

Dónde; Wb+ma=peso del balón más perlas de ebullición, Wb+ma+grasa=peso del balón más perlas de ebullición más grasa Wmseca= Peso muestra seca, %Gbs= porcentaje de grasa en base seca.

Porcentaje de proteína:

$$\%N_{total} = \frac{(M - B) \times N \times 0,014}{Pms} \quad (\text{Ec. 4})$$

$$\%P_{bs} = 6,25 \times \%N_{total} \quad (\text{Ec. 5})$$

Dónde: **M** volumen de HCl gastados para la titulación de la muestra, **B** volumen de HCl gastados para la titulación del blanco, **N** es la normalidad del HCl, **Pw** es el porcentaje de humedad la muestra. **Pms** es el peso de la muestra seca y Pbs= Porcentaje de proteína en base seca

Porcentaje de Fibra cruda:

$$\% F_{bs} = \frac{(W_{c+m \text{ en estufa}} - W_{c+ \text{ cenizas}})}{W_{m \text{ desengrasada y seca}}} \times 100 \quad (\text{Ec. 6})$$

Dónde; Dónde; Wc+m en estufa =peso del crisol+tela+ fibra, Wc+cenizas=peso del crisol más cenizas Wm desengrasada y seca= Peso muestra desengrasada y seca, %Fbs= porcentaje de fibra en base seca.

Extracto libre no nitrogenado:

$$\% \text{ELN} = 100 - (\%H + \%C_{bs} + \%G_{bs} + \%P_{bs} + \%F_{bs}) \quad (\text{Ec. 7})$$

Dónde: %ELN = es el porcentaje libre no nitrogenado.

8. BIBLIOGRAFÍA

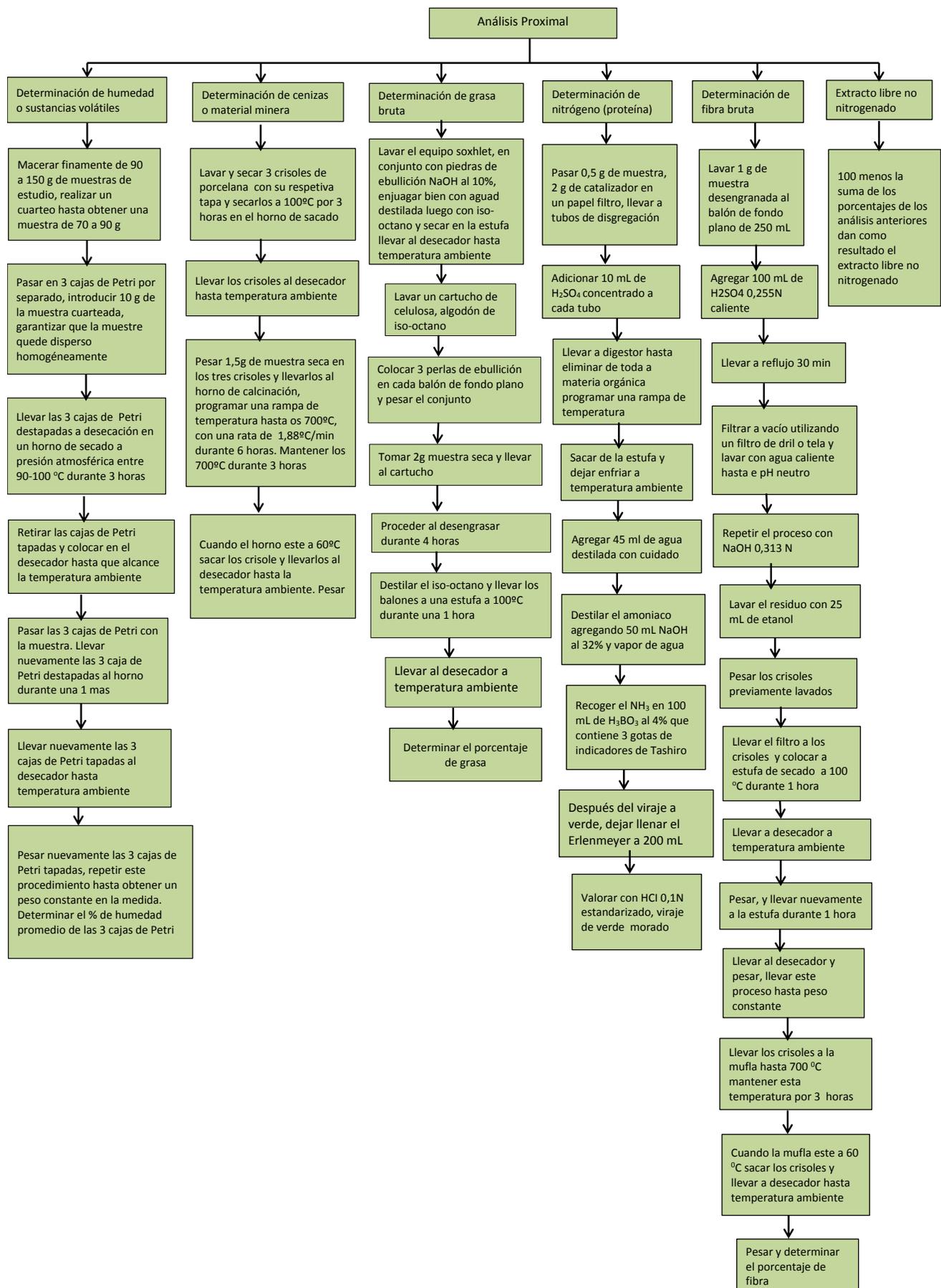
9.1 Official Methods of Analysis. AOAC. 20th ed. Gaithersburg, MD: The association, 2016.

9.2 Manual de Instrucciones – Unidad de Destilación BUCHI K-314

9.3 Manual de Instrucciones – Unidad de Digestion BUCHI K-424

94 Manual de Instrucciones – Unidad de Neutralización BUCHI Scrubber B-414.

9. DIAGRAMA DE FLUJO



ANEXO 2: GUÍA DE LABORATORIO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PROTEASAS.

 UNIVERSIDAD DEL CAUCA	FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN DEPARTAMENTO DE QUÍMICA GRUPO DE INVESTIGACION: QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES (QPN)	
	Procedimiento de Laboratorio Determinación de la actividad enzimática de proteasas	

1. FUNDAMENTO TEÓRICO

Las proteasas son enzimas que rompen los enlaces peptídicos, a menudo es necesario medir y/o comparar la actividad entre proteasas con el fin de conocer la cantidad de enzima activa presente y del nivel de actividad de la misma, por lo que la medida de la actividad es dependiente de las condiciones, que deben ser especificadas cuando se dan valores de actividad. La actividad expresa la cantidad de sustrato convertido por unidad de tiempo, teniendo en cuenta el volumen de reacción.

El ensayo de actividad no específica de la proteasa de Sigma Aldrich, se puede usar como un procedimiento estandarizado para determinar la actividad de proteasas. En este ensayo, la caseína actúa como un sustrato. Cuando la proteasa de estudio digiere caseína, el aminoácido tirosina se libera junto con otros aminoácidos y fragmentos de péptidos. El reactivo de Follin y Ciocalteus o fenol de Follin, reacciona principalmente con tirosina libre para producir un cromóforo de color azul, que es cuantificable y medido como un valor de absorbancia en el espectrofotómetro a 660nm. Cuanta más tirosina se libere de la caseína, más los cromóforos se generan y el más fuerte la actividad de la proteasa. Los valores de absorbancia generados por la actividad de la proteasa se comparan con una curva patrón, que se genera por reacción de cantidades conocidas de tirosina con el reactivo de Follin para correlacionar los cambios en la absorbancia con la cantidad de tirosina en micromoles. A partir de la curva estándar de la actividad de las muestras de la proteasa puede determinarse en términos de unidades, que es la cantidad de micromoles de equivalentes de tirosina liberados de la caseína por minuto.

2. OBJETIVOS

2.1 Determinar la actividad enzimática de proteasas de estudio.

3. MATERIALES

MATERIALES	CANTIDAD
Vasos de precipitados 10 mL	10
Vasos de precipitados 100 mL	5
Matraz aforado de 10 mL	2
Matraz aforado de 25 mL	5
Matraz aforado de 50 mL	1
Matraz aforado de 100 mL	2
Probeta 50 mL	1
Pipeta graduada 10 mL	2
Pipeta graduada 5 mL	5
Pipeta graduada 1 mL	2
Micropipeta 500 -1000 μ L	1
Micropipeta 50-250 μ L	1
Tubos de ensayo tapa rosca	25

4. REACTIVOS

REACTIVOS	CANTIDAD
Fosfato de potasio ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$)	600,0 mg
Acido clorhídrico (HCl) 1M	50,0 mL
Hidróxido de sodio (NaOH) 1M	50,0 mL
Caseína	200,0 mg
Acido tricloroacético (ATC) 99%	1,0 mL
Carbonato de Sodio (Na_2CO_3) 99,9%	6,0 g
Acetato de sodio (CH_3COONa) 99%	25,0mg
Acetato de Calcio (CH_3COOCa) 94%	25,0 mg
Tirosina (Tyr) 98,5%	2,0 mg
Enzima de estudio	0,5 mg

5. EQUIPOS

EQUIPOS	CANTIDAD
pH metro	1
Plancha de calentamiento	1
Magneto	2
Goteros	3
Espátula metálica	2
Cronómetro	2
Magneto de agitación	3
Baño termostático	1

Filtros de jeringa 0,45 micras	15
Microceldas de UV/Vis	10

6. PROCEDIMIENTO:

6.1 Preparación de Soluciones:

6.1.1 Buffer de fosfato de potasio 50 mM, pH 7,5

Pesar 435,5 mg de fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4), disolver con 40 mL de agua destilada, ajustar el pH con HCl 1M hasta 7,5 unidades, finalmente aforar a 50 mL, ajustar el pH nuevamente si existe variación. Llevar la solución a una incubadora a 37°C por 30 min.

6.1.2 Solución de Caseína 0,65% (p/v):

Pesar 162,5 mg de Caseína y aforar a 25 mL con el tampón de fosfato de potasio 50 mM, llevar la solución a una plancha de calentamiento y aumentar la temperatura gradualmente a 80-85°C durante aproximadamente 10 min, con agitación constante, hasta lograr una dispersión homogénea. Es importante no ebullición la solución, dejar enfriar la solución a temperatura ambiente y medir el pH, si es necesario se ajustarlo a 7,5 unidades se debe hacer con HCl 1M o NaOH 1M.

6.1.3 Solución de ácido tricloroacético (ATC) 110 mM:

Tomar 453.8 μ L de TCA al 99% y aforar a 25mL con agua destilada, se debe tener cuidado en la manipulación de este ácido ya que es un ácido fuerte.

6.1.4 Reactivo de Folin-Ciocaltea:

Por cada 1mL del reactivo se debe adicionar 3mL de agua destilada. La solución reaccionará con tirosina para generar un cambio de color medible que se relaciona directamente con la actividad de las proteasas. El reactivo es un ácido y debe manejarse con cuidado.

6.1.5 Carbonato sódico (Na_2CO_3) 500 mM:

Pesar 5,3000 g de Carbonato sódico (Na_2CO_3 anhidro) al 99,9% de pureza y aforar a 100 mL con agua destilada.

6.1.6 Solución diluyente de enzimas-Buffer de acetato de sodio 10mM - acetato de calcio 5 mM:

Pesar 20,7 mg de acetato de sodio (CH₃COONa) al 99% de pureza y 21,0 mg de acetato de calcio (CH₃COOCa) al 94% de pureza, mezclar disolviendo con 5 mL de agua destilada y aforar la disolución a 25 mL con agua destilada, adecuar el pH con NaOH o HCl hasta 7,5 unidades. Incubar a 37 °C.

6.1.7 Solución madre de L-tirosina (Tyr) 1.1mM:

Pesar 2,0 mg de Tyr al 98,5%, adicionar 5 mL de agua destilada y calentar suavemente hasta Solubilización, al igual que la caseína no hervir la solución, enfriar a temperatura ambiente y aforar a 10 mL.

6.1.8 Solución de proteasa:

Pesar 0,2 mg de la proteasa y disolver en 10 mL con solución diluyente de enzimas, o preparar un volumen deseado de un equivalente de 0,1 -0,2 u/mL de proteasa.

6.2 Ensayo de la proteasa y curva de calibración.

Antes de iniciar el procedimiento experimental llevar baño termostático o el baño María a una temperatura de 37 °C

6.2.1 Material de vidrio, tubos de ensayo tapa rosca.

Para la determinación de la actividad enzimática de la proteasa es necesario tener un adecuado tratamiento para los tubos de ensayo tapa rosca, para ello es necesario lavar 4 tubos de ensayo tapa rosca, con capacidad de 15 mL de la siguiente manera: a cada tubo de ensayo lavar con jabón y enjuagar con abundante agua destilada, adicionar 10 mL de HCl 0,1 M, llevar a un vortex y agitar vigorosamente por al menos 10 min, posteriormente repetir el procedimiento pero ahora adicionando 10 mL de NaOH 0,1M, finalmente lavar los tubos nuevamente con abundante agua destilada agitando vigorosamente en el vortex. Llevar al horno de secado a una temperatura de 90 °C para su secado, dejar enfriar a temperatura ambiente. Finalmente rotularlos así: Test 1, Test 2, Test 3 y Blanco

6.2.2 Hidrolisis enzimática

6.2.2.1 Adicionar 5 mL de solución de Caseína 0,65% (p/v) a cada uno de los tubos de ensayo y llevar a incubación a 37°C durante 5 min.

6.2.2.2 Pasados los 5 min adicionar la solución de la proteasa a los tubos de ensayos de la siguiente manera: a Test1 0,5 mL, a Test2 0,7 mL, a Test 3 1,0 mL, a blanco 0,0 mL, posteriormente mezclar suavemente y llevar a incubación a 37°C por 10 min más.

6.2.2.3 Pasado los 10 min adicionar a cada uno de los tubos, incluyendo al blanco, 5 mL de Solución de ATC 110 mM y agregar volúmenes de solución de enzima de la siguiente manera: a Test1 0,5 mL, a Test2 0,3 mL a Test3 0,0 mL y al blanco 1,0 mL. Estos volúmenes de solución de enzima se agregan en estas proporciones para al final tener un volumen total de 1,0 mL de solución de enzima, esto se hace para tener en cuenta el valor

de absorbancia del enzima en sí mismo y para asegurar que el volumen final en cada tubo es igual. Finalmente llevar los tubos de ensayo a incubación a 37 °C por media hora.

6.2.2.4 pasados los 30 min filtrar en filtros de jeringa de 0,45 micras y agregar el filtrado a nuevos tubos de ensayo, posteriormente agregar 5 mL de solución de Na₂CO₃ 500 mM y 1 mL de reactivo de Follin, llevar a incubación a 37°C por 30 min nuevamente.

6.2.3 Curva de calibración de Tyr

6.2.3.1 A 10 tubos de ensayo tapa rosca, previamente lavados, rotular como estándar 1, estándar 2, estándar 3, estándar 4, estándar 5, estándar 6, estándar 7, estándar 8, estándar 9 y estándar blanco

6.3.2 A cada uno de los tubos adicionar un volumen de solución madre de Tyr así: Estándar 1: 15 µL, estándar 2: 50 µL, estándar 3: 100 µL, estándar 4: 200 µL, estándar 5: 300 µL, estándar 6: 400 µL, estándar 7: 500 µL, estándar 8: 800 µL, estándar 9: 1005 µL y estándar blanco: 0 µL, posteriormente adicionar agua destilada así: Estándar 1: 1985 µL, estándar 2: 1950 µL, estándar 3: 1900 µL, estándar 4: 1800 µL, estándar 5: 1700 µL, estándar 6: 1600 µL, estándar 7: 1500 µL, estándar 8: 1200 µL, estándar 9: 995 µL estándar blanco: 2000 µL, finalmente llevar cada uno de los estándares a incubar a 37 °C por 30 min

6.3.3 Filtrar cada uno de los estándares por filtro de jeringa de 0,45 micras, y llevar los 2 mL a nuevos tubos de ensayo tapa rosca y agregar a cada uno de 5 mL de solución de Na₂CO₃ 500 mM, finalmente agregar también 1 mL de reactivo de Follin.

7. MEDIDA DE ABSORBANCIA Y CÁLCULO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

La absorbancia de las muestras se mide mediante un espectrofotómetro utilizando una longitud de onda de 660 nm. La trayectoria de la luz se establece en 1 cm

7.1 Adicionar 2 mL de cada uno de las muestras a medir en las celdas del espectrofotómetro, estos 2 mL deben ser adicionados con la ayuda de filtros de jeringa de 0,45 micras. Medir los estándares y las proteasas a una longitud de onda de 660 nm.

7.2 Graficar el cambio de la absorbancia a 660 nm, es decir la diferencia de cada uno de los estándares con el blanco (eje y), vs los micromoles de Tyr de cada uno de los estándares (eje x)

<i>Estándar</i>	<i>Volumen de Tyr estándar (mL)</i>	<i>µ mol Tyr</i>
1,0000	0,0150	0,0165
2,0000	0,0500	0,0550
3,0000	0,1000	0,1100
4,0000	0,2000	0,2200
5,0000	0,3000	0,3300
6,0000	0,4000	0,4400

7,0000	0,5000	0,5500
8,0000	0,8000	0,8800
9,0000	1,0050	1,1060

7.3 Calcular la ecuación de la recta que mejor se ajuste a la dispersión de los datos, y calcular el cambio en la absorbancia en las muestras de ensayo mediante el cálculo de la diferencia entre la absorbancia de la muestra de ensayo y la absorbancia del blanco de prueba así:

$$\Delta A_{660nm Pi} = A_{660nm Pi} - A_{660 nm Pblanco}$$

Dónde: $\Delta A_{660nm Pi}$ es el Cambio de absorbancia en las muestras de ensayo

$A_{660nm Pi}$ son las absorbancias de las muestras de ensayo

$A_{660nm Pblanco}$ es la absorbancia del blanco de prueba

Con el valor de $\Delta A_{660nm Pi}$ y la ecuación de la recta, calcular el valor de micromoles de Tyr liberados durante la hidrolisis enzimática.

Para obtener la actividad de la enzima en unidades por mL, se realiza el siguiente cálculo:

$$Actividad (u/mL) = \frac{\text{equivalentes de Tyr liberados } (\mu\text{mol}) \times \text{Volumen total del ensayo (mL)}}{\text{Tiempo del enyo (min)} \times \text{Volumen del enzima (mL)} \times \text{Volumen usado en la celda UV/Vis (mL)}}$$

Dónde: equivalentes de Tyr en μmol corresponde al calculado con $\Delta A_{660nm Pi}$

Volumen total del ensayo es igual a 11 mL

Tiempo de ensayo corresponde a 10 min

Volumen de enzima corresponde a 1 mL

Volumen usado en la celda UV/Vis es 2mL

La relación entre los micromoles con minutos es igual a unidades de actividad.

La Actividad enzimática en unidades de U/mg se puede obtener con el siguiente factor de conversión:

$$Actividad (U/mg) = \frac{Actividad (U/mL)}{\text{concentracion del enzima en mg/mL}}$$

8. BIBLIOGRAFIA.

Anson, ML J. Gen. Physiol. 22, 79-89 (1938).

Folin, O., Ciocalteau, V. J. Biol. Chem. 73, 627- (1929).

Cupp-Enyard, C. Sigma's Non-specific Protease Activity Assay - Casein as a Substrate. J. Vis. Exp. (19), e899, doi:10.3791/899 (2008)

9. DIAGRAMA DE FLUJO.

