



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

OBTENCIÓN DE QUERATINA A PARTIR DE PLUMAS DE LA INDUSTRIA
AVÍCOLA MEDIANTE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Autora

María Belén Valencia Andrade

Año
2018



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

OBTENCIÓN DE QUERATINA A PARTIR DE PLUMAS DE LA INDUSTRIA
AVÍCOLA MEDIANTE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniera Ambiental en Prevención y
Remediación

Profesor Guía

MSc. Daniel Hernán Hidalgo Villalba

Autora

María Belén Valencia Andrade

Año

2018

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido el trabajo, Obtención de Queratina a partir de plumas de la industria avícola mediante hidrólisis enzimática, a través de reuniones periódicas con la estudiante María Belén Valencia Andrade, en el semestre 2018-1, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Daniel Hernán Hidalgo Villalba

Magister en Ciencias de la Ingeniería Especialización Ingeniería Ambiental

C.I.: 180191444-9

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado éste trabajo, Obtención de Queratina a partir de plumas de la industria avícola mediante hidrólisis enzimática, de María Belén Valencia Andrade, en el semestre 2018-1, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Viviana Pavlova Sigcha Terán

Master Universitario en Gestión Integral del Agua

C.I.: 172221616-3

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

María Belén Valencia Andrade

C.I. 171542279-4

AGRADECIMIENTOS

A mi familia y a Dios por darme la fortaleza para continuar y ser perseverante. A mis amigos, que de una u otra manera han puesto su granito de arena en mi vida con enseñanzas y a mis profesores, que me han inspirado a ser una profesional competente y una persona de ética.

DEDICATORIA

A mis padres y a mis hermanos. A
mi abuela Martha.

RESUMEN

La industria avícola con el pasar del tiempo, ha ido creciendo, convirtiéndose en unas de las que tienen mayor demanda alrededor del mundo. Ésta industria genera miles de toneladas de residuos sólidos orgánicos al año, los cuales usualmente son reutilizados como abonos. En el proceso de faenamiento de las empresas de mediana y pequeña escala, las plumas, se han convertido en un residuo con una gran problemática ambiental, por su falta de tratamiento y difícil degradación, lo que ocasiona su acumulación y alteración de los recursos naturales. Éste residuo suele ser transformado en harina para la elaboración de alimentos balanceados de los mismos animales mediante hidrólisis de presión, sin embargo, no suele tener una digestibilidad alta, por lo que puede generar enfermedades. El presente trabajo de titulación tuvo como finalidad formular un tratamiento de hidrólisis enzimática para las plumas generadas en el proceso de faenamiento y así, disminuir el impacto ambiental causado por éste residuo.

Para lograr el objetivo planteado, se efectuó una caracterización de las plumas para posteriormente realizar una preparación de la proteína, la cual, consistió en efectuar pruebas con Sulfuro de Sodio y Metabisulfito de Sodio a distintas concentraciones y así, obtener las condiciones óptimas. El resultado conseguido permitió la ejecución de las pruebas de hidrólisis enzimática, bajo distintas concentraciones de enzima y tiempos de reacción y de ésta manera, obtener un porcentaje óptimo de hidrolizado de queratina. Se concluyó que la concentración de enzima óptima para el proceso de hidrólisis es de 0,075% a las 6 horas de tratamiento, con un 2.9% de queratina hidrolizada.

Palabras clave: Hidrólisis enzimática, grado de hidrólisis, proteína, queratina, enzima.

ABSTRACT

Through the time, poultry industry has grown in a big scale, becoming one with the highest demands across the world. This industry generates thousands of tons of organic solid waste per year, which are usually reuse like fertilizers. During the harvest process in medium and small companies, feathers have become one of the wastes with more environmental problems, because of their lack of treatment y hard deterioration, which causes accumulation and changes in natural resources. Generally, this waste is use like raw material to produce feather flour in the balance diet of the animals by strain hydrolysis; however, it is not very digestible, which can generate diseases. The purpose of the present project was to formulate a treatment of enzymatic hydrolysis for feathers that are generate in the harvest process and reduce the environmental impact that this waste causes.

To achieve the goals established, a feather characterization had to be made, so that this could give a way to the protein preparation, which consisted in carry out test with sodium sulfide and sodium metabisulfite at different concentrations and obtain the optimal conditions. The reach result, allowed the execution of the enzymatic hydrolysis tests under different concentrations of enzyme and time, giving an optimal percentage of hydrolyzed keratin. The project conclude that, the optimal enzyme concentration is 0.075% at 6 hours of treatment, with a percentage of 2.9% of hydrolyzed keratin.

Key words: Enzymatic hydrolysis, degree of hydrolysis, protein, keratin, enzyme.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Objetivos.....	2
1.2.1. Objetivo general	2
1.2.2. Objetivos específicos.....	3
1.3. Alcance	3
1.4. Justificación	3
2. Marco Teórico	5
2.1. Faenamiento.....	5
2.1.1. Diagrama de flujo del proceso de faenamiento	7
2.2. Generación de residuos sólidos en el proceso de faenamiento	7
2.2.1. Vísceras	9
2.2.2. Sangre.....	9
2.2.3. Plumas	10
2.3. Proteínas	13
2.3.1. Queratina.....	15
2.4. Enzimas	19
2.4.1. Queratinasa.....	20
2.5. Hidrólisis	22
2.5.1. Hidrólisis ácida	22
2.5.2. Hidrólisis alcalina.....	23

2.5.3. Hidrólisis enzimática.....	23
3. Metodología	24
3.1.Descripción de estudio	24
3.1.1. Metodología experimental	24
3.2.Caracterización de materia prima.....	26
3.2.1. Obtención de muestra	26
3.2.2. Caracterización de plumas	26
3.3.Preparación de la queratina	27
3.3.1. Preparación de materia prima	27
3.3.2. Tratamiento con Sulfuro de Sodio y Metabisulfito de Sodio	28
3.4.Hidrólisis enzimática	29
3.4.1. Proceso de hidrólisis enzimática	29
3.4.2. Determinación de grado de hidrólisis	31
4. Resultados y Análisis	32
4.1.Caracterización de la materia prima	32
4.2.Preparación de la materia prima.....	33
4.2.1. Análisis de Varianza (ANOVA)	36
4.3.Hidrólisis enzimática	37
4.3.1. Análisis estadístico	42
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	53
5.1.Conclusiones	53
5.2.Recomendaciones	54
REFERENCIAS.....	56
ANEXOS	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de pollo (1,600 gramos).....	8
Tabla 2. Composición de harina de sangre.....	10
Tabla 3. Composición de las plumas.....	12
Tabla 4. Tratamientos de preparación de proteína.....	29
Tabla 5. Diseño experimental de hidrólisis enzimática.....	30
Tabla 6. Resultados de caracterización de la materia prima.....	33
Tabla 7. Resultados de preparación de la materia prima, gasto ml de HCl.....	33
Tabla 8. Resultados de preparación de la materia prima, porcentaje	34
Tabla 9. ANOVA para la preparación de la materia prima.	36
Tabla 10. LSD de preparación de materia prima.....	37
Tabla 11. Resultados de hidrólisis enzimática Prueba 1 (0,025% enzima).....	38
Tabla 12. Resultados de hidrólisis enzimática Prueba 2 (0,050% enzima).....	38
Tabla 13. Resultados de hidrólisis enzimáticas Prueba 3 (0,075% enzima)	39
Tabla 14. Resultados de hidrólisis enzimática Prueba 4 (0.1% enzima).....	39
Tabla 15. Promedio de resultados de concentraciones de enzimas (%).....	40
Tabla 16. Medias y Desviaciones Estándar de hidrólisis según tiempo.....	42
Tabla 17. Medias y Desviaciones Estándar de hidrólisis según concentración	42
Tabla 18. Análisis de Varianza de dos factores para hidrólisis enzimática	44
Tabla 19. LSD para concentración de enzima.....	45
Tabla 20. LSD para tiempo de reacción.....	46
Tabla 21. LSD para combinado, concentración de enzima por tiempo.	48
Tabla 22. Resultados de correlación	49
Tabla 23. Resultados de covarianza.	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de eviscerado.....	6
Figura 2. Diagrama de Proceso de Faenamiento.....	7
Figura 3. Estructura y partes de la pluma.....	11
Figura 4. Estructura secundaria de las proteínas.....	14
Figura 5. Clasificación de proteínas.....	15
Figura 6. Estructura de α -queratina.....	16
Figura 7. Estructura de β -queratina.....	17
Figura 8. Enlaces disulfuro dentro de la estructura de la queratina.....	18
Figura 9. Clasificación y características de enzimas.....	20
Figura 10. Diagrama de metodología experimental.....	24
Figura 11. Valores promedio, preparación de la materia prima.....	35
Figura 12. Concentraciones de enzima con respecto al tiempo.....	41
Figura 13. Tiempos con respecto a las concentraciones de enzima.....	41
Figura 14. Medias de hidrólisis según concentración de enzima y tiempo.....	43
Figura 15. Diferencia de medias LSD con respecto a la concentración de enzima	46
Figura 16. Diferencia de medias LSD con respecto al tiempo.....	47
Figura 17. Supuesto de normalidad.....	52

1. Introducción

1.1. Antecedentes

La industria avícola alrededor del mundo ha tenido una respuesta beneficiosa, gracias al éxito que ha obtenido en varios países, cuyos factores principales se han implementado dentro de su producción para una mejor eficiencia (Leeson, Summers, y Diaz, 2000, pp.251-253). Uno de dichos factores ha sido el crecimiento poblacional, el cual se ha vuelto un detonante para implementar mejoras en la producción de carne proveniente de aves, convirtiéndolo más seguro para el consumo humano.

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO), ha implementado la División de Producción y Sanidad Animal (AGA), la cual se encuentra destinada al enfoque de las productoras de mediana y pequeña escala dentro de los países en vías de desarrollo (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2016, párr.4). Así mismo, la FAO implementó la Red Internacional para el Desarrollo de la Avicultura Familiar (RIDAF) el 13 de diciembre del 1997 para la provisión de información, guías, soporte técnico y económico para dichas empresas (Thieme et al., 2014, pp.1-3).

En el Ecuador, las empresas avícolas realizan la crianza y producción de pollos de engorde, los cuales tienen un ciclo de crianza de 40 a 50 días, teniendo como peso promedio 2,5 kilogramos (Salazar Cedillo, 2013, p.1). Durante el año 2006, se realizó el primer y único censo avícola del país con la participación de AGROCALIDAD, el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP) y la Cooperación Nacional de Avicultores del Ecuador (CONAVE), mediante el cual se estableció que en el país existían 1567 granjas. Éstas se encuentran en todas las provincias del país, y tienen un proceso de faenamiento

permanente durante todo el año (Vizcaíno, Vargas Estrella y Santiana Jara, 2013, p.6-9).

Los residuos principales dentro de la industria avícola incluyen viseras, sangre y plumas, los cuales, anteriormente, solían ser incinerados para producir harina y ser incluida como parte del alimentos de las aves, generando así enfermedades en las mismas (Gousterova et al., 2004, p.335-337). En el Ecuador, mensualmente una empresa avícola promedio libera aproximadamente 72 toneladas de plumas, las cuales, no tienen un tratamiento adecuado para su desecho. Durante el año 2006, al finiquitar el proceso de faenamiento, se liberaron un total de 4,5 millones de libras de plumas, las cuales representan el 39% de los residuos (Mendieta Orellana, 2016, p.1).

En el país el 90% de las empresas avícolas se consideran medianas y pequeñas, dependiendo de la cantidad de pollos procesados al mes, éstas, comúnmente no tienen un tratamiento para las plumas después del proceso de faenamiento, lo cual ocasiona su acumulación (Orellana Jarrín, 2015). Éste residuo, contiene un alto nivel de queratina, la cual es una proteína muy difícil de degradar, por lo cual, su acumulación fue mayor al pasar de los años, ocasionando que en algunos países se prohibiera su uso (Calderón, 2000, p.1).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Formular un tratamiento de hidrólisis enzimática para la obtención de queratina a partir de plumas provenientes de la industria avícola.

1.2.2. Objetivos específicos

- i. Caracterizar las plumas del plantel avícola bajo los parámetros de cantidad de proteína, aceites y grasas.
- ii. Establecer las condiciones óptimas de preparación de materia prima para la hidrólisis.
- iii. Establecer condiciones óptimas de tiempo y concentración de enzima, para la obtención de la queratina a partir de plumas.

1.3. Alcance

Con el presente proyecto de investigación se buscó establecer a escala de laboratorio, un tratamiento de hidrólisis alcalina – enzimática para el residuo de plumas que se generan en los planteles avícolas, las cuales no tienen un procesamiento de las mismas, mitigando de ésta manera, la acumulación de desechos.

Para el desarrollo de la investigación, se realizó una caracterización inicial de las plumas tomadas como muestra al final del proceso de faenamiento, con parámetros de proteínas, aceites y grasas. Posteriormente, el residuo fue lavado e hidrolizado, extrayendo el mayor porcentaje de queratina posible, utilizándose como indicador el grado de hidrólisis, que permite determinar las mejores condiciones para el proceso.

1.4. Justificación

La Constitución del Ecuador, indica en su Artículo 14 lo siguiente: *“Se reconoce el derecho de la población a vivir un ambiente sano y ecológicamente equilibrado, que garantice la sostenibilidad y el buen vivir, sumak kawsay”* (Constitución de la República del Ecuador, 2008, Art.14).

El Plan Nacional para el Buen Vivir 2017-2021, establece como Eje 1, los derechos para todos durante toda la vida; dentro de este eje, el Objetivo 3 es garantizar los derechos de la naturaleza para las actuales y futuras generaciones. Este Plan promueve la articulación entre el desenvolvimiento de la economía con los problemas del medio ambiente, la cultura y la sociedad sin olvidar que el desarrollo humano es mucho más que crecimiento económico, planteándose como metas al 2021, el incrementar el porcentaje de residuos sólidos reciclados, en relación al total de residuos generados (Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo, 2017, p.55-58).

Cabe señalar que, la normativa y leyes relacionadas con el manejo y disposición de los residuos sólidos, los consideran como fuentes potenciales de contaminación, sean éstos de cualquier procedencia y, en las Políticas Nacionales de Residuos Sólidos, el Estado Ecuatoriano declara como prioridad nacional la gestión integral de los residuos sólidos en el país, como una responsabilidad compartida por toda la sociedad, que contribuya al desarrollo sustentable a través de un conjunto de políticas intersectoriales nacionales.

Las plumas al ser un residuo sólido que contiene queratina, se vuelve difícil de degradar naturalmente, a esto, se le añade que, al final del proceso de faenamiento, se mezclan con otros desechos como sangre, grasas, microorganismos y agua, lo que ocasiona una resistencia mayor de las mismas a su degradación natural. Esta situación, genera una acumulación al momento de la disposición final de este residuo, convirtiéndose en un foco de contaminación para el ambiente, generando malos olores y proliferación de plagas, que pueden ser dañinas para las personas que están involucradas directa o indirectamente.

Por tales razones, la presente investigación plantea una solución para dicho problema, implementando un tratamiento para el aprovechamiento de las plumas, que permite la disminución de su volumen y acumulación y por consiguiente, la potencial contaminación derivada de su inadecuada disposición; estableciendo además, que mediante su procesamiento la empresa pueda conseguir un beneficio económico al obtener como producto un hidrolizado de queratina para otros fines.

2. Marco Teórico

2.1. Faenamiento

El faenamiento de aves tiene como fin, el sacrificio ordenado y regulado bajo normas y pautas, para evitar el estrés que se puede generar en los animales y de ésta manera, obtener carne en condiciones óptimas para el consumo humano (Roldán, Pardo, Durán Naranjo, Martínez, y Durán Ramírez, 2004, p.61). Éste proceso comienza con la fase de colgado y termina en la fase de deshuesado y puede realizárselo manual o automáticamente, dependiendo de la industria (Mejía, 2013, p.5).

La fase de colgado, donde se coloca a las aves boca abajo con ganchos, durante aproximadamente tres minutos para la adaptación antes de llegar a la zona de aturdimiento. La segunda fase, consiste en el aturdimiento eléctrico del ave, que puede ser alto o bajo voltaje, para crear un espasmo electropléctico (Sabow et al., 2017, p.125).

Posteriormente al aturdimiento se procede a la sangría, donde se realiza el degüello para el inicio de desangrado del ave, siendo una zona separada sobre un canal recolector de la misma. El proceso de faenamiento continúa con el escaldado, donde se introduce al ave dentro de un tanque a una temperatura de

50°C, dando paso a la fase de desplumado y eviscerado (Roldán et al., 2004, p.61). La fase de desplumado se la realiza automáticamente con ayuda de máquinas construidas a base de cilindros o discos, los cuales contienen lengüetas de goma que son las encargadas de quitarlas. A medida del arranque de las plumas, éstas son retiradas de la zona con chorros de agua por medio de canales, hacia una cisterna de recolección (Bremner, 1981, p.49-50).



Figura 1. Proceso de eviscerado

Tomado de (García, 2008)

El proceso posterior al desplume, es el desprendimiento de la cabeza y corte de patas, permitiendo el lavado previo de las vísceras para removerlas. Éstas últimas, son retiradas mediante equipos manuales o automáticos, teniendo disponibilidad de agua para evitar la adherencia de las vísceras a la parte interior del ave. Una vez limpia el ave, debe pasar por el proceso de enfriamiento para la correcta absorción del agua, dando paso a la última fase de proceso de faenamiento, la cual consiste en el deshuesado del ave (Rodríguez Saldaña, 2011, p.24-26). Dentro de estos procedimientos inicia la generación de los principales residuos, sangre, vísceras y plumas.

En el Ecuador, existe el Manual de procesamientos para la inspección y habilitación de mataderos, el cual es regulado a través de AGROCALIDAD para garantizar la calidad sanitaria de los mismos mediante disposiciones de construcción, mecanismos, distribución y manejo en general ("Faenamiento artesanal de aves en el Ecuador", 2017, p.28).

2.1.1. Diagrama de flujo del proceso de faenamiento

A continuación, se presenta un diagrama de flujo del proceso de faenamiento, en el cual se indican sus fases correspondientes, especificando aquellas donde se generan residuos.



Figura 2. Diagrama de Proceso de Faenamiento

2.2. Generación de residuos sólidos en el proceso de faenamiento

En la avicultura se estima que un aproximado de 1000 gallinas, generan alrededor de 115 litros de desechos por día, con un contenido de humedad del 70%, lo que equivale a un contenido de 250 kilogramos de Nitrógeno Total en un ave con un peso promedio de 2,5 kilogramos; usualmente el 50% de dichos desechos, son excretados como ácido úrico (Lon-Wo, 2003, p.29). Dentro del proceso de faenamiento existen fases en las cuales se generan más residuos sólidos, que representan el 20% del peso total del ave (Arshad et al., 2017, p.1242), siendo los más comunes las vísceras, la sangre y las plumas. Éstos residuos, se caracterizan por ser sólidos ricos en proteínas y grasas, por lo que, usualmente se los reutilizan como materia prima para el alimento de los animales o como abono (Yoon, Kim, Oh y Kim, 2014, p.204).

Existen ciertos desechos que pueden clasificarse como reutilizables, aquellos que usualmente son comestibles y se los procesa con el resto del ave. Para un mejor procesamiento de dichos desechos, se debe conocer la composición del ave (Roldán et al., 2004, p.94), la cual se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 1.

Composición de pollo (1,600 gramos)

Componente	Porcentaje (%)
Carne de canal	62.5
Cabeza	3
Patas	3.9
Corazón	0.4
Hígado	2.1
Molleja	3
Cuello	4.1
Pulmones, bazo y páncreas	0.9
Riñones	0.6
Intestinos	7.9

Sangre	3.5
Plumas	8.1
TOTAL	100

Adaptado de (Roldán et al., 2004).

2.2.1. Vísceras

Se toma como parte de vísceras a todo órgano del ave que se encuentre rodeado de una bolsa serosa, siendo los principales, intestinos, mollejas, hígado, pulmones, corazón, páncreas y riñones. Sin embargo, se consideran las menudencias dentro de ésta agrupación: patas, cuello y cabeza, ya que éstas también son incluidas dentro del proceso de fabricación de harina de carne aviar (Ferreira et al., 2017, p.4-6).

Al final del proceso, se clasifican las vísceras en desechos comestibles y desechos no comestibles. En los primeros se consideran la cabeza, patas, cuello, molleja, corazón e hígado; y en los segundos el resto de desechos que se encuentren en buen estado (Galarza Vinueza, 2011, p.11).

2.2.2. Sangre

La sangre es otro de los desechos que se generan dentro del proceso de faenamiento. Ésta debe ser recogida dentro de canales construidos específicamente para ella, ya que, tiende a acumularse. El sistema más eficiente para la recolección de sangre, es un tanque de almacenamiento, el cual esté conectado a los canales de recolección (Bremner, 1981, p.109).

La sangre, al igual que muchos de los residuos generados en la industria avícola, es abundante en proteína, por lo que se considera beneficioso reutilizarla. Está

compuesta por desechos sólidos de la sangre del procesamiento, consistiendo de membranas celulares, electrolitos y hemoglobina (Leeson et al., 2000, p.58). Comúnmente se reutiliza este residuo para fabricar harina de sangre, que es abundante en proteína cruda y lisina, sin embargo, no es recomendable implementar en la dieta de los animales por su baja digestibilidad, ya que genera problemas de bajo crecimiento y emplume normal (Roldán et al., 2004, p. 239).

Tabla 2.

Composición de harina de sangre

Características	Porcentaje (%)
Proteínas	40
Humedad	12
Grasa	25

Adaptado de (Ricci, 2012)

2.2.3. Plumas

Las plumas son estructuras epidérmicas tegumentarias que carecen de células vivas, abundantes en queratina y minerales, lo cual les permite mayor resistencia a efectos del medio ambiente. Forman una capa densa y aislante que protege a las aves del frío y radiaciones solares, ayudando a regular la temperatura corporal (Menon y Menon, 2000, p.540).

Gil Cano (2010, p.2-3) señala que las plumas se pueden diferenciar en tres tipos fundamentales:

- Plumas de revestimiento: se subdividen en Remeras (las plumas de las alas), timoneras (plumas de la cola) y coberteras.

- Plumón: son las plumas pequeñas que se encuentran envueltas por las de revestimiento.
- Filoplumas: son aquellas que tienen funciones sensoriales.

La pluma comprende de un eje central llamado *raquis*, la cual permite rigidez a la estructura. La fracción del raquis que se encuentra insertada a la piel del ave se la denomina *cálamo*, aquella, forma un hueco por la falta de vasos sanguíneos una vez que la pluma deja de crecer, a dicho hueco se lo nombra *ombiligo inferior*. El raquis tiene dos márgenes donde crece el *vexilo*, el cual conforma la parte visible de la pluma, ésta a su vez se encuentra formada por *barbillas* que parten en dos lados opuestos del raquis, formando una lámina (Alonso et al., 1995, párr.4).

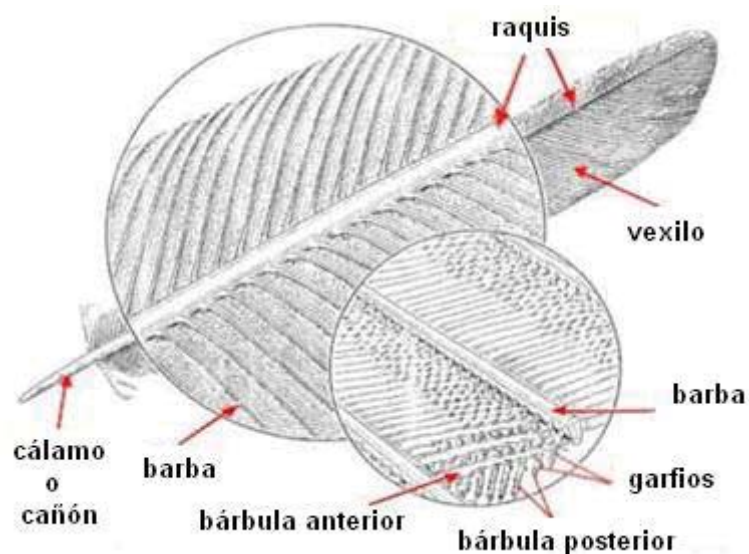


Figura 3. Estructura y partes de la pluma

Tomado de (Rodríguez, 2013)

Las plumas representan del 5% al 8% del peso total del animal, lo cual equivale a 200 gramos promedio, sin embargo, éste peso dependerá de la edad que tenga el ave (Gupta, Kamarudin, Gek, y Bin, 2012, p.732).

Las plumas, al igual que la mayoría de residuos orgánicos producidos en la industria avícola, son altos en proteína, sin embargo, al contener queratina, éstas se vuelven más difíciles de degradar, gracias a la estructura de esta proteína, como se explica posteriormente. Ésta proteína es abundante en cisteína, aminoácido importante para mantener la estructura de la pluma (Leeson et al., 2000, p.252). En la siguiente tabla se visualiza la composición de las plumas del ave.

Tabla 3.

Composición de las plumas

Compuesto	Porcentaje (%)
Queratina (proteína cruda)	90
Aminoácidos totales	60
Arginina	7.1
Valina	6.5
Cistina	5.5
Lisina	2.4
Treonina	4.2
Metionina	0.7
Hierro	0.06
Magnesio	0.2
Sodio	0.8
Zinc	10 ppm
Selenio	0.7 ppm
Cobre	12 ppm

Adaptado de (Leeson et al., 2000)

El residuo de las plumas, solían ser incinerados o depositados en campo abierto, lo cual en muchos países se encuentra prohibido por la problemática ambiental

que presentan, generando plagas y acumulación. Usualmente se utiliza las plumas para fabricar alimento, fertilizantes y proteína digerible, así mismo, el hidrolizado de las mismas usualmente puede convertirse en gas metano, fuente de combustible o para la producción de biohidrógeno (Brandelli, Sala y Juliano, 2015, p.4).

La harina de plumas es el principal producto fabricado para el tratamiento de las plumas, añadiéndola usualmente al mismo alimento de los animales. Es un producto generado a partir de la molienda de éste residuo, estando éste seco o hidrolizado, siendo el último el más común (R. Gupta, Tiwary, Sharma, Rajput y Nair, 2013, p.896). Éste producto se lo realiza bajo tratamiento térmico, usando temperaturas de 150°C pero cuando existe temperaturas demasiado altas dentro del proceso, se pueden llegar a eliminar los aminoácidos esenciales para la harina (Roldán et al., 2004, p.240).

2.3. Proteínas

Las proteínas son macromoléculas en sistemas vivos y esenciales en distintos procesos biológicos, funcionando como catalizadoras, transportadoras y de almacenamiento para otras moléculas (Deis, Gerber, Gumpert y Koeppe, 2016, p.21). Son cadenas de aminoácidos que contienen grupos funcionales dentro de su estructura, tales como, grupos amino, nitrógeno, oxígeno, carbono, hidrógeno, alcoholes y ácidos carboxilos, lo cual permite reacciones químicas y determinan la funcionalidad de la proteína (Berg, Tymoczko, Gatto y Stryer, 2015, p.27-28).

Existen proteínas que actúan como enzimas dependiendo su funcionalidad y naturaleza, las cuales facilitan los procesos dentro de las células. Las proteínas como el colágeno o la queratina, son parte de aquellas de estructura secundaria,

ya que forman largos filamentos en forma de hélice alfa (α) o en zigzag, a los cuales se los denomina lámina beta (β) (López Fandiño, 2014, p.8-10).

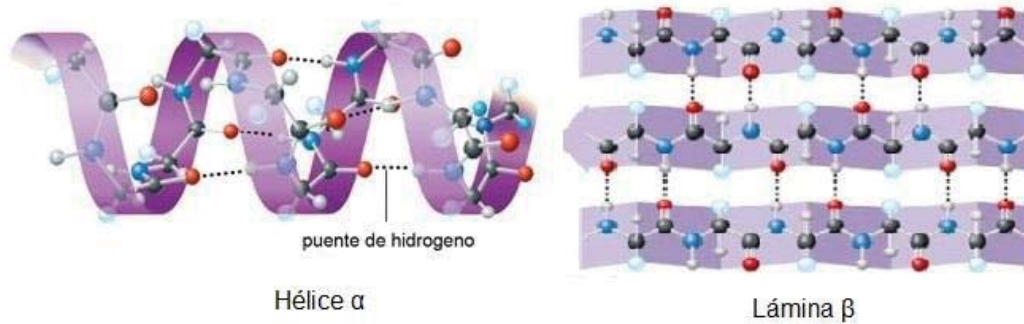


Figura 4. Estructura secundaria de las proteínas

Tomado y adaptado de (Castaños, 2015)

A las proteínas se las puede identificar por sus distintas clasificaciones, las cuales pueden ser, por su composición, por sus propiedades físicas y solubilidad, por su conformación, por sus grupos prostéticos y por su función biológica (Teijón y Garrido, 2009, p.92-95). Cada una de éstas, presenta distintas clases y sus características, lo que quiere decir, que una proteína puede abarcar varias clasificaciones.

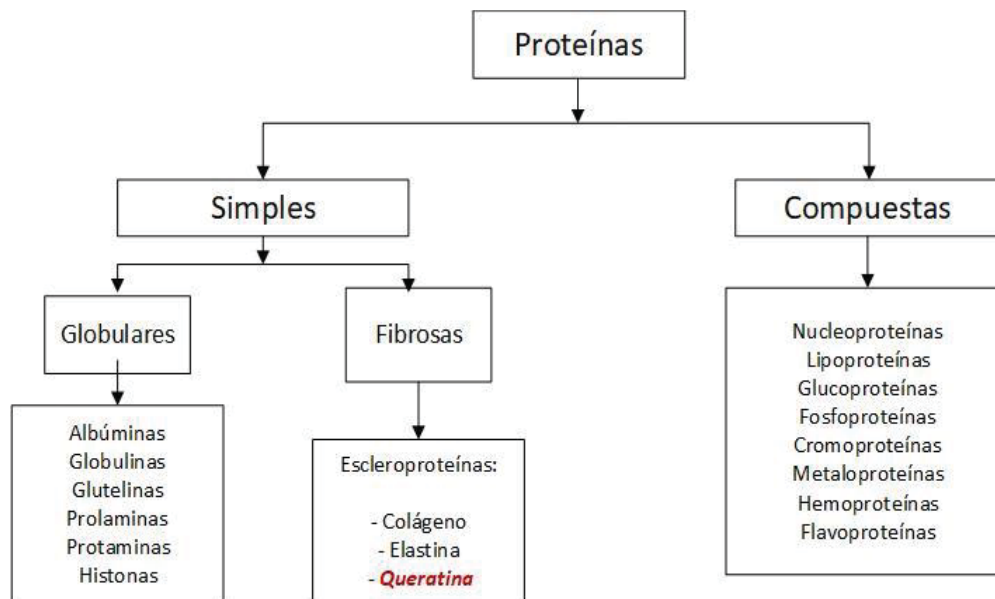


Figura 5. Clasificación de proteínas

Adaptado de (Teijón y Garrido, 2009)

Las proteínas fibrosas son aquellas que forman cadenas ordenadas paralelamente, formando láminas, teniendo la característica de ser insolubles en agua o en soluciones salinas (López Fandiño, 2014, p.11). Por otro lado, las proteínas globulares son aquellas que tienen cadenas encogidas de tal manera que toman formas esféricas y son solubles en agua (Teijón y Garrido, 2009, p.94).

2.3.1. Queratina

La queratina es una proteína simple fibrosa, la cual forma parte de las capas externas de la epidermis, ésta proteína se encuentra presente dentro de pelo, uñas, lana, plumas y piel (en la parte correspondiente a la epidermis), ésta proteína tiene como aminoácido principal la cistina, la cual contiene azufre (Barioglio, 2013, p.350). Al tener como componente el azufre, la queratina tiene dentro de su estructura puentes disulfuro, lo que agrega dureza a la misma.

(Gacén Guillén, 1964, p.46-47). Mientras mayor es el número de enlaces disulfuro, mayor es la dureza de la queratina.

Existen dos tipos de queratina, alfa (α) y beta (β). La primera mencionada es la más comúnmente encontrada dentro de las uñas y los cuernos de los animales. Contiene una gran cantidad de glicina y alanina, los cuales son aminoácidos pequeños, ésta puede contener residuos ricos en cistina y residuos abundantes en glicina (Tombolato, Novitskaya, Chen, Sheppard y Mckittrick, 2009, p.319). Éste tipo de queratina, forma parte de un grupo de proteínas denominadas “superhelicoidales”, las cuales tienen como característica principal hélices enrolladas, proporcionando así, una estructura más firme (Berg, Tymoczko y Stryer, 2008, p.45).

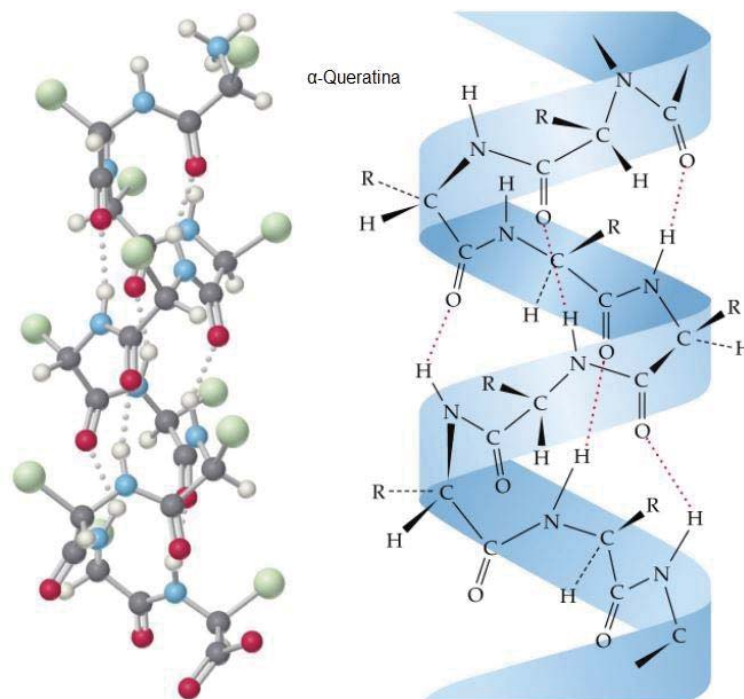


Figura 6. Estructura de α -queratina

Tomado de (“Why Wool?”, 2008)

Por otro lado, la queratina beta no presenta enlaces disulfuro ya que, no tiene presencia de cisteína, por lo que se le considera inextensible, frecuentemente se la encuentra en la tela de araña (QuimiNet, 2013, párr.6).

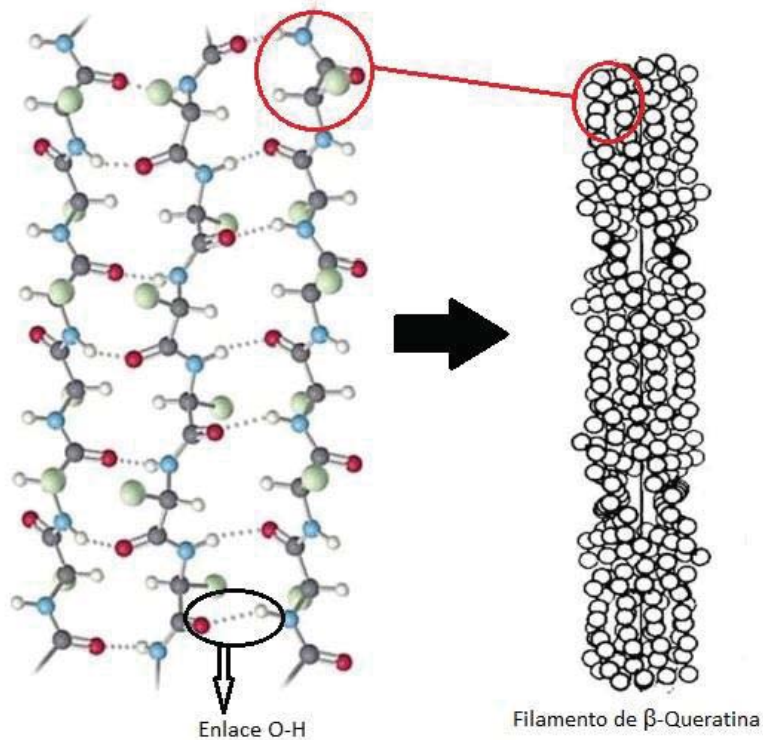


Figura 7. Estructura de β -queratina

Adaptado de (Wang, Yang, Mckittrick y Meyers, 2016)

2.3.1.1. Enlaces disulfuro

Los enlaces disulfuro o también llamados puentes disulfuro (S-S), son enlaces covalentes, que se forman cuando un grupo sulfhidrilo (-SH), presente en el aminoácido cisteína, pierde el hidrógeno (H), gracias a la presencia de oxígeno, dejando libre los azufres (S), provocando la unión entre los mismos. La unión de éste enlace S-S, junto con la cisteína, dan paso a la formación de cistina (Sánchez, 2011, párr.10).

Los puentes están comprendidos por residuos de cisteína, los cuales pueden pertenecer a distintas cadenas polipeptídicas que se encuentran cercanas, de tal manera que al juntarse generan estabilidad a la cadena. Éstos enlaces son importantes para la formación proteica secundaria y terciaria de la proteína gracias a que producen la interrelación de las cadenas laterales de los aminoácidos (Alberts et al., 2006, p.143 y Lodish et al., 2006, p.675).

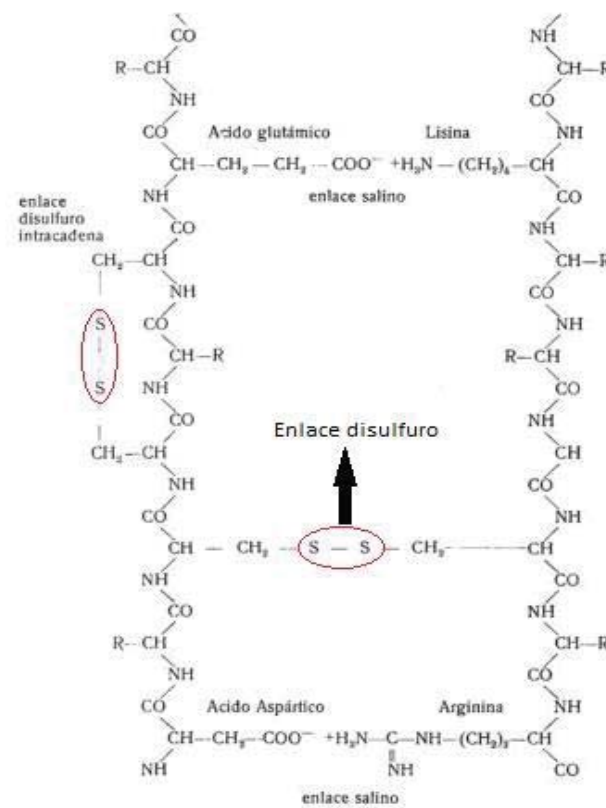


Figura 8. Enlaces disulfuro dentro de la estructura de la queratina
Tomado y adaptado de (Gacén Guillén, 1964)

2.4. Enzimas

Se consideran a las enzimas como sustancias de naturaleza proteica, las cuales manipulan ciertas reacciones que ocurren dentro de las células. Éstas pueden actuar dentro o fuera del organismo; sin embargo, actúan sobre una determinada sustancia, es decir son específicas (Armendaris, 2002, p.229).

Su función principal es catalizar y también transformar un tipo de energía en otra, la primera lo efectúan estabilizando los estados de transición, logrando así determinar qué reacción química se realiza (Deis et al., 2016, p.39). Las enzimas suelen ser específicas para las reacciones que catalizan, ya que, la mayoría de las éstas no consiguen ser perceptibles sin enzimas. Usualmente catalizan una sola reacción química; al contrario, para aquellas reacciones que se encuentran relacionadas existen las enzimas proteolíticas, las cuales son comúnmente utilizadas en procesos de hidrólisis de un enlace peptídico (Berg et al., 2015, p.215-126).

Según Armendaris (2002, p.230), las enzimas se clasifican de acuerdo a la función que ejercen y se las puede denominar por el sustrato sobre el cual actúa (figura 9), así mismos indica que existen cuatro factores importantes que influyen su velocidad de reacción: la concentración de sustrato, la concentración de enzima, la temperatura y el Potencial de Hidrógeno (pH).

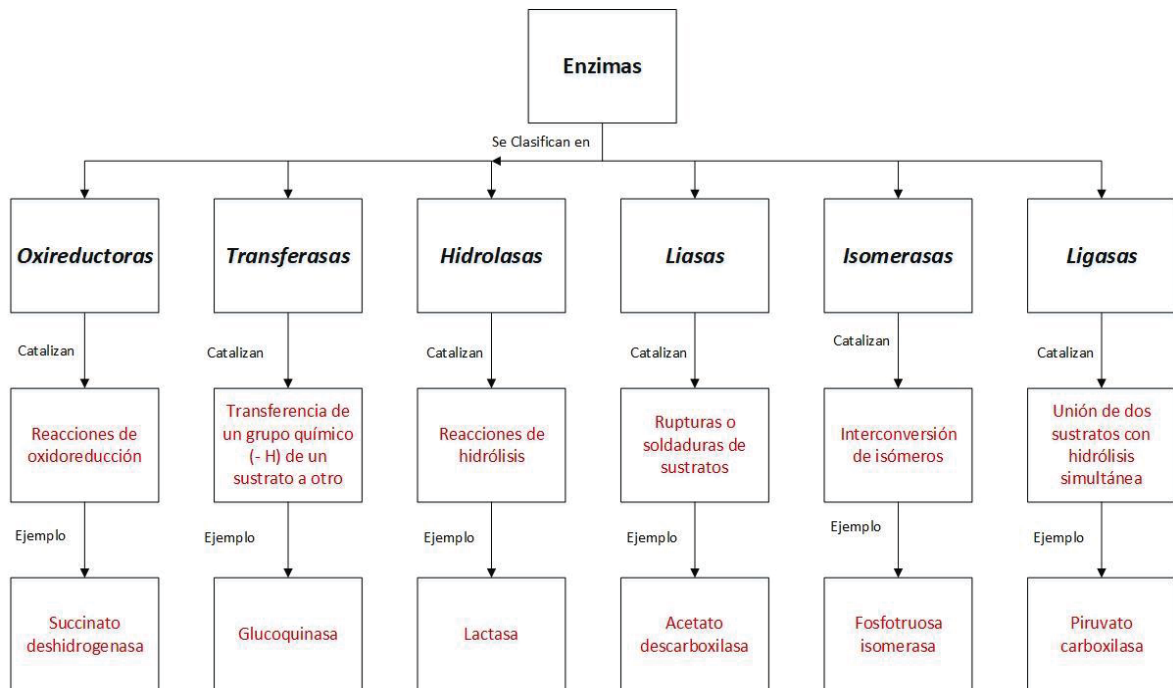


Figura 9. Clasificación y características de enzimas

Adaptado de (Armendaris, 2002)

2.4.1. Queratinasa

Queratinasa es el nombre que se le da a la enzima proteolítica que degrada queratina, la cual se presenta en ciertos microorganismos, como por ejemplo, *Bacillus licheniformis*, *Ferrodobacterium pennivorans* o *Ferrodobacterium islandicum*, éste último, siendo el que presenta mayor actividad queratinolítica (Nam et al., 2002, p.538). Éstas enzimas tienen un comportamiento similar a las proteasas, difiriendo de aquellas no queratinolíticas en cuanto a la degradación de la proteína insoluble. Intervienen en el proceso de sulfitólisis, en donde los puentes disulfuro de la proteína se rompen sin afectar a los aminoácidos presentes, excepto al triptófano (Galarza et al., 2012, p.71).

Las queratinasas tienden a ser amplias con respecto a la especificidad a los sustratos proteicos sin importar que sean o no solubles, siendo las únicas

capaces de degradar queratina (Cavello, 2013, p.12). La mayoría de éstas enzimas suelen tener un pH óptimo de 7.0 a 9.0 pero se han presentado casos en los cuales su pH óptimo funcional es mayor a 12.0, ya que, tienen extrema alcalinidad (Prakash, Jayalakshmi y Sreeramulu, 2010, p.626). Todas las características que incrementan el potencial de éstas enzimas, ayudan a que sean de un uso más eficiente en algunas industrias, ya que, tienen una temperatura manejable de 10° C a 60°C y mejorando su funcionamiento cuando se la junta con otras enzimas proteasas, como la tripsina (Bernal, Cairó y Coello, 2006, p.49).

2.4.1.1. Kynzyme VP

En el presente estudio se utiliza la enzima comercial *Kynzyme VP*. Ésta enzima es una queratinasa compuesta por endonucleasa y exonucleasa, siendo enzimas de restricción, la primera, se encarga de la ruptura de enlaces covalentes dentro de las cadenas polipeptídicas y la segunda, tiene la funcionalidad de la división de los enlaces a los extremos de las cadenas (Salas y Arenas, 2001, p.8). Ésta es elaborada por la empresa Qingdao Vland Biotech Group CO., LTD.

Kynzyme VP, es capaz de hidrolizar las plumas de la industria avícola mediante la degradación de las macromoléculas de las proteínas para la solubilidad u obtención de aminoácidos para mejorar los productos. Ésta enzima tiene una actividad mínima de 100,000 U/g por lo que se obtiene una cantidad mayor de proteína digerible y soluble. La ficha técnica del producto se presenta en el Anexo 1.

2.5. Hidrólisis

Hidrólisis se denomina a la reacción que se da a la descomposición de sustancias por acción de las moléculas de agua, generando compuestos más solubles en la misma. Éste proceso por lo general es lento y requiere de parámetros idóneos de temperatura, revoluciones y pH, cambiando propiedades de los compuestos, por lo que generalmente se realiza mediante el uso de catalizadores, que aceleran la reacción (Castells, 2000, p.73). Existen tres tipos principales de efectuar la hidrólisis, con ácidos, bases o enzimas.

2.5.1. Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida es aquella en la que se utiliza un compuesto ácido como catalizador para romper los enlaces. Los ácidos más comunes para éste proceso suelen ser, el Ácido Sulfúrico (H_2SO_4), Ácido Fosfórico (H_2PO_4), Ácido Clorhídrico (HCL) y Ácido Nítrico (HNO_3) (Hilpmann et al., 2016, p.377). Usualmente este proceso consiste en dos etapas, la primera en los enlaces más difíciles de degradar, en este caso, en los enlaces disulfuro, la segunda etapa, consiste en la reducción de las cadenas de aminoácidos (Dai, Li, Zhang y Cheng, 2018, p.123).

El tiempo debe ser un parámetro correctamente monitoreado dentro del proceso, ya que, dependiendo de éste será la cantidad de aminoácidos degradados. Durante las primeras horas se presenta la ruptura de las cadenas, sin embargo, al pasar el tiempo, cuando se emplean parámetros no idóneos, se puede manifestar una destrucción de aminoácidos (Navarro, García y Sanchez, 2009, p.123), siendo en su totalidad el triptófano (Robbins, 2012, p.109).

2.5.2. Hidrólisis alcalina

Este tipo de hidrólisis requiere de una base para poder actuar, las más comunes siendo Hidróxido de Sodio ($NaOH$), Sulfuro de Sodio (Na_2S), Hidróxido de Potasio (KOH), entre otros (Wang, Wu, Yi y Qui, 2016, p.367). Este proceso tiene como fin principal la ruptura de los enlaces disulfuro, no posee el riesgo de destruir los aminoácidos presentes en la cadena de la proteína y tiene la capacidad de destruir los potenciales agentes infecciosos existentes (Jin, Kim, Jeong, Yoon y Park, 2017, p.74). La reacción de hidrólisis alcalina, o básica, se da cuando el pH de la base está entre 10 y 13 (Gupta et al., 2012, p.736).

2.5.3. Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática, es aquella que utiliza enzimas hidrolasas como catalizadores para lograr la ruptura de los enlaces, como se menciona previamente, éstas enzimas son nombradas según el compuesto sobre el cual actúan (Mokrejs, Svoboda, Hrcirik, Janacova y Vasek, 2010, p.2). Dentro del proceso existe un cambio de composición y propiedades hidrofóbicas de la proteína (Wang, Su, Jia y Jin, 2013, p.2).

Se sabe que dependiendo el método, tipo de proteína y enzima, la hidrólisis se puede encontrar dentro de un rango de tiempo de 4 a 48 horas (Hou, Wu, Dai, Wang y Wu, 2017, p.3), teniendo como resultado, una obtención de proteína menor al 70%, por lo que se recomienda realizar una hidrólisis alcalina o ácida adicional a ésta (Sinkiewicz, Sliwinska, Staroszczyk y Kołodziejka, 2017, p.1046).

Para la obtención de queratina, éste tipo de hidrólisis suele ser la más económica, por lo que es la más recomendable. A pesar de ello, las enzimas queratinasas, son escasas, por lo que usualmente, toma más tiempo, ya que, el

procedimiento inicia con el cultivo de las cepas de las bacterias u hongos utilizados para las mismas (Chandra Barman et al., 2017, p.2).'

3. Metodología

3.1. Descripción de estudio

El presente trabajo de titulación tiene como finalidad, implementar una alternativa para la reducción de la contaminación de las plumas que se generan como residuos en la industria avícola, mediante una hidrólisis enzimática de la proteína que contiene la pluma (queratina). Así mismo, esta investigación se ha realizado bajo el método experimental, en la cual se manipula una o más variables independientes para obtener resultados de la variable dependiente.

3.1.1. Metodología experimental

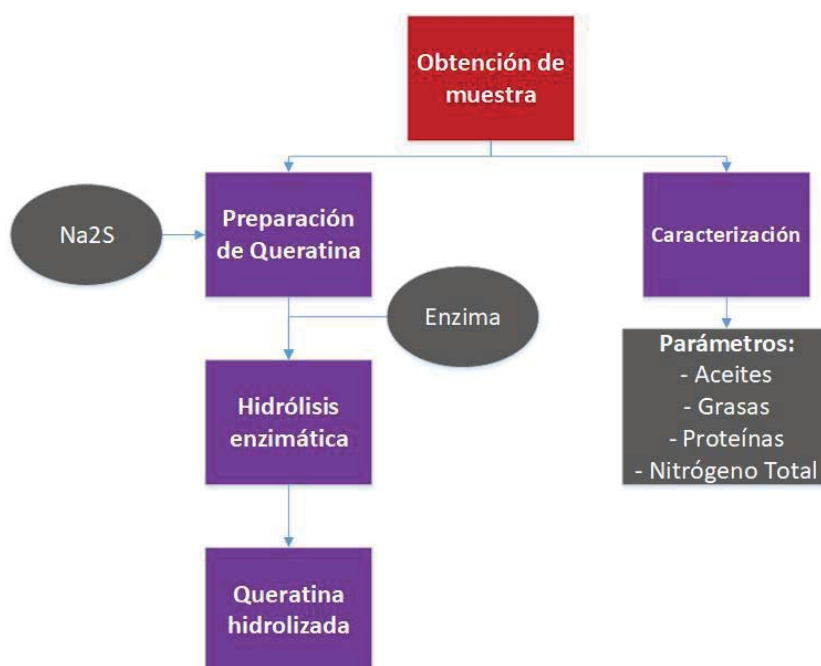


Figura 10. Diagrama de metodología experimental

Se plantearon dos diseños experimentales dentro de la investigación, el primero, para la preparación de la queratina, el cual buscaba determinar las mejores condiciones de los reactivos (Sulfuro de Sodio y Metabisulfito de Sodio), para proceder con la hidrólisis enzimática. Aquí, se determinaron las siguientes variables:

- *Variables independientes:* Concentraciones de Sulfuro de Sodio y Metabisulfito de Sodio.
- *Variables dependientes:* Cantidad de aminos libres (grado de hidrólisis)

Para el proceso de hidrólisis enzimática, se realizó un segundo diseño experimental, donde se determinaron las siguientes variables:

- *Variables independientes:* Tiempo de reacción (Tratamiento con Sulfuro de Sodio + Tratamiento enzimático) y Concentración de enzima.
- *Variables dependientes:* Cantidad de queratina hidrolizada (grado de hidrólisis).
- *Variable constante:* Concentración de Sulfuro de Sodio

Para la selección de las variables independientes de tiempo de tratamiento, se tomaron como referencia estudios previos sobre hidrólisis alcalina. Así mismo, para las concentraciones de las enzimas, se tomó como referencia el valor indicado por el fabricante, y valores inferiores y mayores.

3.2. Caracterización de materia prima

Para la determinación del primer objetivo específico del presente estudio, se realizó una caracterización de parámetros físico químicos de una muestra previamente obtenida.

3.2.1. Obtención de muestra

La muestra de la materia prima (plumas), se la tomó de una empresa avícola mediana, la cual tiene un procesamiento de faenamiento durante todo el año, donde se desecha finalmente el residuo. La obtención de la muestra se basó en lo indicado por el “Método Sencillo de Análisis de Residuos Sólidos” del CEPIS/OPS, siendo el método de cuarteo el principal efectuado.

El método de cuarteo consiste en una toma de muestra de cinco kilogramos, la misma que se homogenizó para posteriormente dividirla en cuatro partes, de las cuales se seleccionan dos partes opuestas para generar un montón más pequeño (Sakurai, 2000). Dicho procedimiento, permitió tener alrededor de 2,5 kilogramos de muestra final húmeda, la cual fue posteriormente tratada.

3.2.2. Caracterización de plumas

De las muestras tomadas, se seleccionó un montón de 300 gramos y se los analizó en el Laboratorio Centro de Soluciones Analíticas Integrales CENTROCESAL Cia. Ltda. Éste laboratorio se encuentra en el Servicio de Acreditación Ecuatoriano (SAE), con el número de certificado: OAE LEC C 12-001. Los análisis realizados fueron de los parámetros: aceites, grasas y proteína.

La determinación de aceites y grasas se realizó bajo el método AOAC 2003.05, el cual se basa en el principio de Randall, donde se sumerge una porción de la prueba seca en un solvente hirviendo, reduciendo así, el tiempo de extracción. Dicho solvente, disuelve grasas, aceites y pigmentos existentes, conocidos como “grasa cruda”. Posteriormente, se recuperó el solvente mediante evaporación y condensación, lo cual permitió que la grasa residual sea analizada gravimétricamente (Anexo 2). El análisis de éste parámetro es importante, ya que, las concentraciones mayores al 3% impiden la reacción, gracias a que hidrofoban la superficie del sustrato (Gómez y Zapata, 2017, p.48).

De la misma muestra, se realizó también la determinación de proteína, donde se utilizó el método de Nitrógeno Total Kjeldahl (AOAC 2001.11). El laboratorio obtuvo el resultado mediante un factor de 6.25 para la transformación de nitrógeno a proteína, el cual finalmente demuestra la cantidad de material proteico hidrolizable (Anexo 3).

3.3. Preparación de la queratina

3.3.1. Preparación de materia prima

La preparación de la materia prima fue fundamental para el trabajo de investigación, ya que, abarca el lavado y secado de las plumas para eliminar los excesos de materia orgánica que se desecharon junto a éstas al final del proceso de faenamiento. Éste proceso da paso a la preparación de la queratina.

- a) Lavado de materia prima:

Las plumas que fueron obtenidas del montón muestreado fueron lavadas a una temperatura de 30°C en agua corriente con detergente. Este proceso permitió la limpieza de la materia orgánica, sangre y otros residuos no deseados.

b) Secado de la materia prima

Posterior al lavado de las plumas, se procedió a secarlas en la estufa a 90°C durante 24 horas, para luego tratarlas.

3.3.2. Tratamiento con Sulfuro de Sodio y Metabisulfito de Sodio

Una vez secas las plumas, se inició la realización de las pruebas para la determinación de la relación Sulfuro de Sodio: Metabisulfito de Sodio en 20 g de pluma seca.

Las pruebas con Sulfuro de Sodio (Na_2S) se realizaron con las distintas concentraciones establecidas en el diseño experimental, se agitaron a 600 rpm durante una hora y posteriormente se las dejó reposar durante 24 horas para que se complete la reacción y se realizó una agitación final de 30 minutos. Una vez completado el tiempo de agitación, se añadió el Metabisulfito de Sodio ($2NaHSO_3$) con agitación constante de 600 rpm durante 30 minutos hasta alcanzar el pH de 7, que es el óptimo en el que actúa la enzima y para la eliminación de sulfuro residual.

Se partió de una relación establecida de 1:1.5 para los compuestos y se realizaron tres repeticiones de la prueba.

Tabla 4.

Tratamientos de preparación de proteína

Sulfuro de sodio (g)	Metabisulfito de Sodio (g)	REPETICIONES
4	6	3
8	12	3
12	20	3
16	26	3
20	30	3

3.4. Hidrólisis enzimática

Posteriormente al proceso previo de preparación de la materia prima, y de la queratina, una vez alcanzado el pH de 7, se efectuó el proceso de hidrólisis enzimática.

3.4.1. Proceso de hidrólisis enzimática

Para el proceso de hidrólisis enzimática, se utilizó la enzima KINGZYME VP, descrita anteriormente. Ésta, se añadió a distintas concentraciones, junto con la solución previamente obtenida en la preparación de la materia prima, durante tiempos establecidos. En total se realizaron 16 tratamientos, con tres repeticiones cada uno, los cuales involucraban todas las combinaciones de las variables, teniendo como un factor constante los valores obtenidos del tratamiento de la materia prima.

Tabla 5.

Diseño experimental de hidrólisis enzimática

Tiempo de reacción (h)	Porcentaje de enzima (%)	Concentración de base (L) – 0.1 M	Trat.	# Tratamientos	Repeticiones
2 (X_1)	0.025 (Y_1)	1 (Z_1)	$X_1Y_1Z_1$	1	3
			$X_1Y_2Z_1$	2	3
			$X_1Y_3Z_1$	3	3
			$X_1Y_4Z_1$	4	3
4 (X_2)	0.05 (Y_2)		$X_2Y_1Z_1$	5	3
			$X_2Y_2Z_1$	6	3
			$X_2Y_3Z_1$	7	3
			$X_2Y_4Z_1$	8	3
6 (X_3)	0.075 (Y_3)		$X_3Y_1Z_1$	9	3
			$X_3Y_2Z_1$	10	3
			$X_3Y_3Z_1$	11	3
			$X_3Y_4Z_1$	12	3
8 (X_4)	0.01 (Y_4)		$X_4Y_1Z_1$	13	3
			$X_4Y_2Z_1$	14	3
			$X_4Y_3Z_1$	15	3
			$X_4Y_4Z_1$	16	3

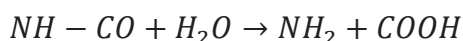
Para poder proceder con el proceso de hidrólisis enzimática, se realizó una marcha, en la cual se indican los tiempos de toma de muestra y reposo. El análisis de grado de hidrólisis se lo realizó posteriormente a cada una de las horas establecidas en el diseño experimental.

La marcha presenta paso por paso la secuencia para las pruebas de hidrólisis, la cual inició con la toma de muestra inicial sin enzima (hora 0) y determinación de grado de hidrólisis de la misma mediante reposo y titulación, esto continuó con la toma de muestra de la prueba uno y la determinación de grado de hidrólisis

de la misma. Éste proceso se lo realizó de igual forma con el resto de las pruebas; se presenta ésta marcha en el Anexo 4.

3.4.2. Determinación de grado de hidrólisis

La determinación del grado de hidrólisis se realizó mediante el método de microdifusión de aminos libres con Celdas de Conway: para su determinación se tiene una reacción general que se produce durante la hidrólisis, la cual permite el cálculo de los aminos libres (NH_2). La reacción se presenta a continuación.



Para la determinación de aminos libres se requirió de la preparación de cuatro reactivos: indicador mixto, Ácido Bórico, solución concentrada de Hidróxido de Potasio y solución de Ácido Clorhídrico al 0.01 N. (Anexo 5).

El procedimiento se realizó añadiendo 1 ml de la mezcla de ácido Bórico con el indicador mixto en la casilla interior de la celda, posteriormente se agregó 0,5 ml de la muestra en la casilla exterior, dando paso a la adición de 1 ml de la solución de KOH. Una vez cerrada la celda, se la agitó ligeramente para lograr una mezcla entre la solución de KOH y la muestra, finalmente se dejó reposar por dos horas. Una vez finiquitado el tiempo de reposo, se procedió a titular con HCL al 0.01 N.

Para poder determinar la cantidad de material hidrolizado, se realizaron cálculos, donde se consideró que:

$$1 \text{ ml de HCl } 0.01 \text{ N} = \frac{0.16009 \text{ mg } NH_2 \text{ libres}}{1 \text{ ml de HCL } 0.01 \text{ N}}$$

Este valor se utilizó para el cálculo de aminos libres de las pruebas realizadas, resultado, que posteriormente se lo transformó a porcentaje. Una vez transformados, se tomaron los resultados obtenidos para calcular el grado de hidrólisis mediante la concentración de aminos libres y la evaluación del total de aminos libres que se pueden liberar de la proteína. Se puede visualizar en el Anexo 7, el proceso que se realizó para obtener la fórmula final, siendo ésta la siguiente mostrada.

$$^{\circ}H = \frac{C \left[\frac{gr NH_2 \text{ libres}}{gr \text{ pluma seca}} \right]}{0.137929 \frac{gr NH_2 \text{ totales}}{gr \text{ pluma seca}}} * 100$$

Donde,

$^{\circ}H$ = Grado de hidrólisis

C = Concentración de aminos libres

Así mismo, en el Anexo 8 se presenta un ejemplo de los cálculos realizados, para un mejor entendimiento del proceso de determinación del grado de hidrólisis.

4. Resultados y Análisis

4.1. Caracterización de la materia prima

Como se mencionó, se realizó una caracterización de la materia prima sin ningún tratamiento previo, para determinar los siguientes parámetros: aceites, grasas, y proteína. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 6, en la cual se

indica, además, los métodos empleados y las unidades respectivas, presentándose un valor de 75.43% de proteína en la muestra cruda analizada por el laboratorio.

Tabla 6.

Resultados de caracterización de la materia prima

Parámetro	Método	Unidades	Resultado
Aceites y grasas	AOAC 2003.05	% p/p	3.88
Proteína	POE: 5.4.91 AOAC 2001.11	% p/p	75.43

Para la determinación de la proteína, el factor de conversión utilizado fue 6.25. Éstos resultados se presentan en el Anexo 6.

4.2. Preparación de la materia prima

Los resultados obtenidos dentro de éste proceso, se determinaron para el tratamiento de Sulfuro de Sodio y Metabisulfito de Sodio en 20 g de pluma seca, llevado a cabo tal como se indicó en la metodología. El tratamiento óptimo se lo determinó a partir de la medición del grado de hidrólisis; resultados que se presentan como gasto de ml de HCl en la tabla 7 y como porcentaje en la tabla 8. Se establecieron cinco distintas pruebas, las cuales indican la relación entre los dos compuestos.

Tabla 7.

Resultados de preparación de materia prima, gasto ml de HCl

	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 4	Prueba 5
Réplica 1	0.130	0.330	0.560	0.480	0.310
Réplica 2	0.100	0.340	0.550	0.560	0.520

Réplica 3	0.110	0.320	0.530	0.540	0.520
------------------	-------	-------	-------	-------	-------

Nota. Las pruebas muestran la relación $Na_2S:2NaHSO_3$. Prueba 1, 4:6; Prueba 2, 8:14, Prueba 3, 12:20, Prueba 4, 16:27, Prueba 5, 20:33, por 20 g de pluma seca.

Los resultados presentaron un mayor gasto de HCl en la prueba 3, la cual pertenece a la relación de 12 g de Na_2S y 20 g de $2NaHSO_3$ por 20 g de pluma seca, teniendo valores que van desde 0.530 ml hasta 0.560 ml en las repeticiones que se realizaron. Estos valores sirvieron como base para la determinación del grado de hidrólisis, mismos que establecieron las mejores condiciones de la materia prima.

Tabla 8.

Resultados preparación de la materia prima, porcentaje

	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 4	Prueba 5
Réplica 1	0.377	0.958	1.625	1.393	0.900
Réplica 2	0.290	0.987	1.596	1.625	1.509
Réplica 3	0.319	0.929	1.538	1.567	1.508

Nota. Las pruebas muestran la relación $Na_2S:2NaHSO_3$. Prueba 1, 4:6; Prueba 2, 8:14, Prueba 3, 12:20, Prueba 4, 16:27, Prueba 5, 20:33, por 20 g de pluma seca.

Los resultados de éste proceso, indicaron que la relación óptima de Na_2S y $2NaHSO_3$ es de 12:20 g por 20 g de pluma seca, dando los porcentajes más altos en las tres réplicas realizadas. En la figura 11, se presenta el promedio de las réplicas realizadas de las concentraciones establecidas, donde 1.586% es el valor de la relación óptima determinada en este proceso.

Por otro lado, los datos obtenidos de la prueba dos, determinada mediante estudios previos en hidrólisis alcalina, con una relación de 8 g de Na_2S : 14 g de $2NaHSO_3$ por 20 g de pluma seca (Orjuela-Palacio, Lanari y Zaritzky, 2015,

p.504), no fueron los óptimos, ya que presentaron porcentajes bajos de grado de hidrólisis.

Mediante la curva indicada en la figura 11, se puede visualizar que a pesar de utilizar concentraciones más altas de Na_2S en las últimas dos pruebas, no existe más liberación de grupos amino.

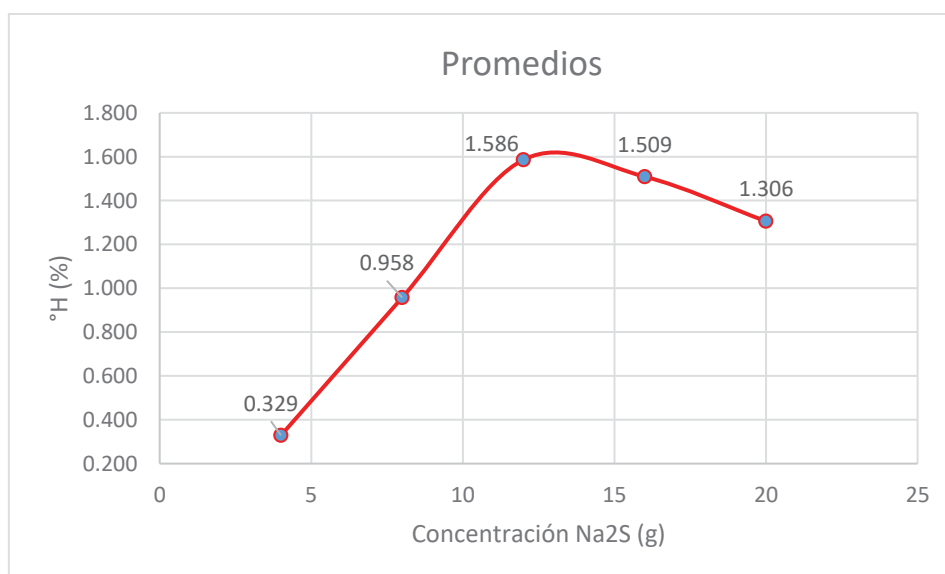


Figura 11. Valores promedio, preparación de la materia prima

Los pH alcanzados inicialmente con el compuesto de Na_2S variaron entre 12 y 14, sin embargo al añadir el $2NaHSO_3$, se obtuvo un pH de 7 en cada uno de los tratamientos, lo cual fue óptimo para la activación de la enzima utilizada en el procedimiento de hidrólisis enzimática.

Los cálculos para la obtención de porcentaje de grado de hidrólisis, se presentan en los anexos mencionados anteriormente dentro de la metodología, junto con un ejemplo de dichos cálculos.

4.2.1. Análisis de Varianza (ANOVA)

Se realizó un Análisis de Varianza para la ratificar los resultados obtenidos en la preparación de la materia prima.

Tabla 9.

ANOVA para la preparación de la materia prima

Factor	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Medias Cuadráticas	Valor F	Significancia
<i>Na₂S</i>	4	3.161	0.790	28.51	0.000
Error	10	0.277	0.027		
Total	14	3.438			

El Análisis de Varianza (ANOVA) indicó dos hipótesis:

- H_0 : Los tratamientos producen el mismo efecto
- H_A : Al menos uno de los tratamientos produce un efecto distinto.

Al obtener valores menores a 0.05 se aceptó la hipótesis alternativa.

Para poder determinar cuál de los tratamientos produjo un efecto óptimo, se realizó una prueba de comparación múltiple Fisher/LSD, la cual se presenta a continuación.

Se indican agrupaciones de las medias mediante letras, aquellas que comparten la misma letra son significativamente iguales

Tabla 10.

LSD de preparación de la materia prima

Na_2S	Media	Agrupación
12	1.586	A
16	1.508	A
20	1.305	A
8	0.957	B
4	0.328	C

Los resultados presentaron medias significativamente iguales en los tratamientos que contenían 12, 16 y 20 g de Na_2S , teniendo las medias más altas. Sin embargo, el tratamiento que presentó la media más alta correspondía al de 12 g de Na_2S , por lo cual se le consideró como el mejor tratamiento.

Una vez determinada la dosis óptima con Na_2S y $2NaHSO_3$, con ésta, se prepara la materia prima para el proceso de hidrólisis enzimática.

4.3. Hidrólisis enzimática

Al terminar con el procedimiento de preparación de la materia prima y obtener la concentración óptima del mismo, se procedió con la hidrólisis enzimática, que, como se explicó previamente, se realizó variando el tiempo y la concentración de enzima. En éste procedimiento se realizaron cuatro pruebas, correspondientes a las concentraciones de enzima estudiadas, con variación del tiempo de proceso para cada concentración. En las siguientes tablas, se presentan los resultados obtenidos por concentración de enzima, tanto en gasto de ml de HCl, como en porcentaje de grado de hidrólisis.

Tabla 11.

Resultados de hidrólisis enzimática Prueba 1 (0.025% enzima).

Prueba 1 (0.025%)						
Horas	ml de HCl			°H		
	<i>Réplica</i>	<i>Réplica</i>	<i>Réplica</i>	<i>Réplica 1</i>	<i>Réplica 2</i>	<i>Réplica 3</i>
	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>			
0	0.630	0.450	0.490	1.828	1.305	1.421
2	0.680	0.630	0.680	1.973	1.828	1.973
4	0.820	0.700	0.700	2.379	2.031	2.031
6	0.860	0.830	0.830	2.495	2.408	2.408
8	0.800	0.800	0.780	2.321	2.321	2.263

En los resultados obtenidos de la concentración de 0.025%, se obtuvo un mayor porcentaje de aminos libres a las 6 horas de tiempo de reacción, siendo la primera réplica la de valor más alto con 2.49%, sin embargo, las réplicas restantes presentaron porcentajes cercanos a éste con 2.40%.

Tabla 12.

Resultados de hidrólisis enzimática Prueba 2 (0.050% enzima).

Prueba 2 (0.050%)						
Horas	ml de HCl			°H		
	<i>Réplica</i>	<i>Réplica</i>	<i>Réplica</i>	<i>Réplica 1</i>	<i>Réplica 2</i>	<i>Réplica 3</i>
	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>			
0	0.450	0.500	0.440	1.305	1.450	1.276
2	0.670	0.670	0.850	1.944	1.944	2.466
4	0.920	0.890	0.910	2.669	2.582	2.640
6	0.950	0.870	1.010	2.756	2.524	2.930
8	0.810	0.770	0.970	2.350	2.234	2.814

Los resultados de la prueba dos, correspondiente a la concentración de enzima a 0.050%, indicaron que el mayor porcentaje de obtención de queratina

hidrolizada, corresponde a las 6 horas de tratamiento, dando un valor de 2.93% de proteína hidrolizada.

Tabla 13.

Resultados de hidrólisis enzimática Prueba 3 (0.075% enzima)

Horas	Prueba 3 (0.075%)					
	ml de HCl			°H		
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
0	0.550	0.450	0.450	1.595	1.305	1.305
2	0.740	0.760	1.010	2.147	2.205	2.930
4	0.980	0.970	0.950	2.843	2.814	2.756
6	1.060	1.020	0.920	3.075	2.959	2.669
8	0.950	1.010	1.010	2.756	2.930	2.930

Se puede visualizar en los resultados de la concentración de enzima al 0.075%, que los valores indicados a las 6 y 8 horas de tratamiento, no tienen una variabilidad grande; sin embargo, el mayor valor de queratina hidrolizada obtenida es a las 6 horas con un 3.0%.

Tabla 14.

Resultados de hidrólisis enzimática Prueba 4 (0.1% enzima)

Horas	Prueba 4 (0.1%)					
	ml de HCl			°H		
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
0	0.590	0.520	0.400	1.712	1.508	1.160
2	0.780	0.870	0.810	2.263	2.524	2.350
4	0.970	1.050	1.070	2.814	3.046	3.104
6	1.020	1.030	1.030	2.959	2.988	2.988

8	1.100	1.100	1.080	3.191	3.191	3.133
----------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Los resultados para la concentración de enzima de 0.1%, indicaron una mayor obtención de proteína hidrolizada a las 8 horas de tratamiento, con un 3.1%. A diferencia de las concentraciones anteriores, se puede visualizar que los resultados obtenidos a las cuatro horas de tratamiento, fueron valores similares a los de 8 horas. En la tabla 13, se presentan los promedios de las pruebas de las distintas concentraciones.

Tabla 15.

Promedio de resultados de concentraciones de enzima (%).

Horas	Porcentaje de enzima			
	0.025%	0.050%	0.075%	0.1%
0	1.518	1.344	1.402	1.460
2	1.924	2.118	2.427	2.379
4	2.147	2.630	2.805	2.988
6	2.437	2.737	2.901	2.979
8	2.302	2.466	2.872	3.172

Los resultados presentaron un valor mayor en la concentración de 0.1% con 3.1%; sin embargo, existieron valores similares en a las 6 horas de tratamiento entre ésta prueba y la correspondiente a 0.075%. Así mismo, a las 8 horas de tratamiento, se pudo determinar una pequeña diferencia de resultados entre las concentraciones de 0.025% y 0.050%, las cuales, presentaron un leve ascenso constante hasta las 6 horas, para posteriormente a la octava hora indicar una pequeña disminución en los valores de queratina hidrolizada.

Las figuras 12 y 13 presentan las curvas de resultados promediados con respecto a tiempo y a concentración de enzima, respectivamente. Se pudo

determinar en las dos figuras que el valor más alto fue a las 8 horas en la concentración 0.1%, ratificando los resultados mencionados anteriormente.

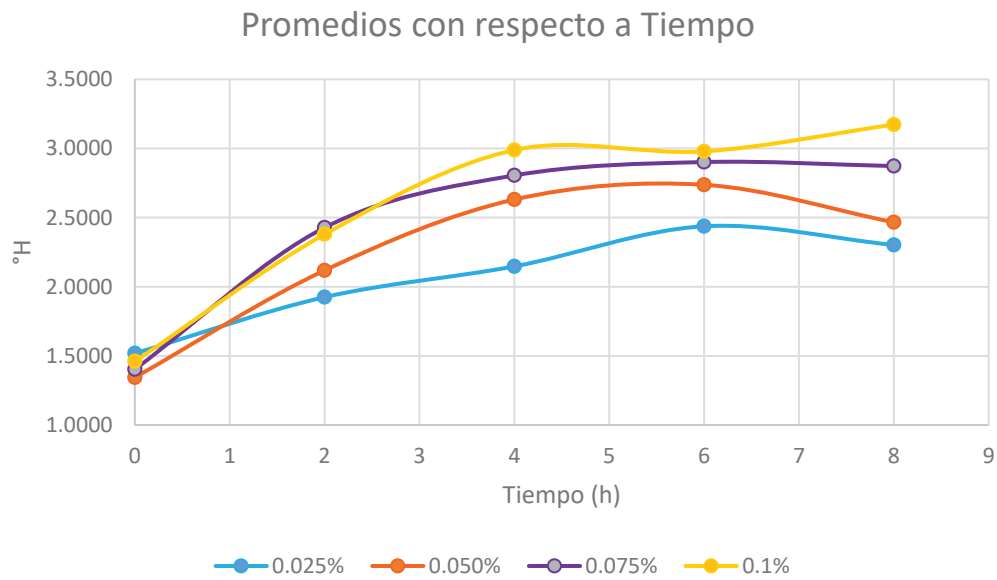


Figura 12. Concentraciones de enzima con respecto al tiempo.

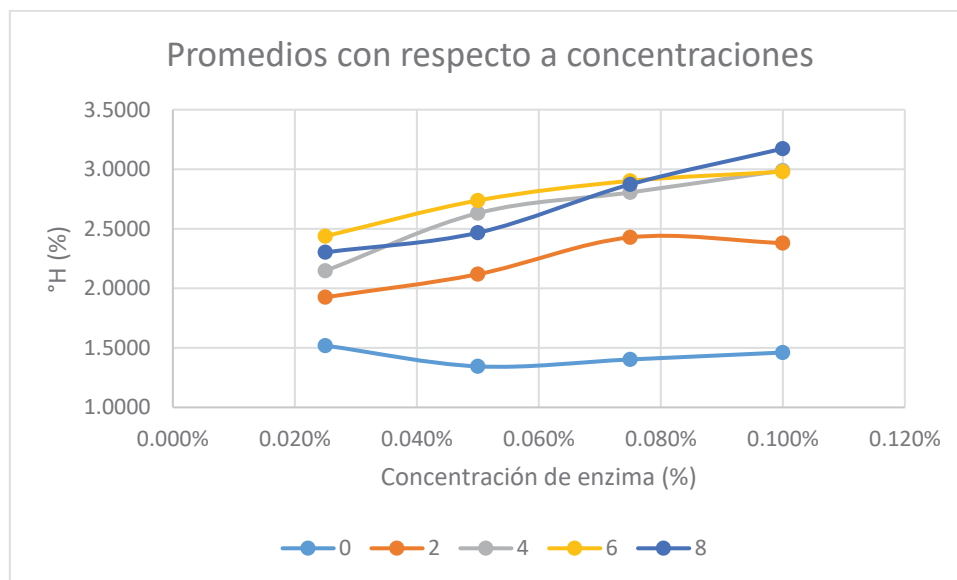


Figura 13. Tiempos con respecto a las concentraciones de enzima

4.3.1. Análisis estadístico

Para proceder con el análisis estadístico de los resultados, se trabajó con el programa Minitab, versión 17.

Se realizó un resumen de los valores estadísticos con respecto a los factores empleados y sus niveles. Se consideraron tres factores en el diseño experimental: concentración de enzima, y tiempo de reacción, cuyos valores ya se explicaron en el capítulo de metodología.

Las medias y desviaciones estándar de los niveles de los factores de concentración de enzima y de tiempo de reacción se presentan en las siguientes tablas.

Tabla 16.

Medias y desviaciones estándar de hidrólisis según tiempo

Tiempo (h)	Media	Desviación estándar
0	1.431	0.197
2	2.212	0.317
4	2.642	0.345
6	2.763	0.251
8	2.703	0.383
Promedio	2.350	0.298

Tabla 17.

Medias y desviaciones estándar de hidrólisis según concentración

Concentración de enzima (%)	Media	Desviación estándar
0,025	2.066	0.359
0,050	2.259	0.553
0,075	2.482	0.618
0,1	2.596	0.663
Promedio	2.350	0.548

En el análisis individual se determinó que el mejor valor de concentración de enzima es de 0.1%, mostrando una media de 2.59.

Los resultados indicaron una media global de concentración de enzima y de tiempo de reacción de 2.35.

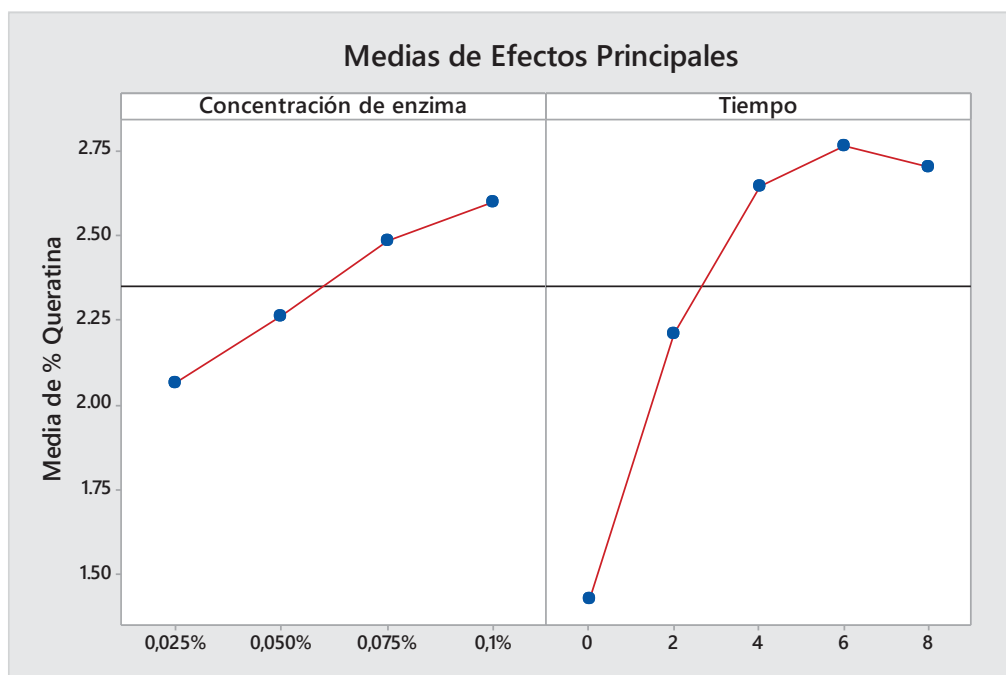


Figura 14. Medias de hidrólisis según concentración de enzima y tiempo

La media, según la concentración de enzima, presenta un ascenso constante, determinando que, mientras mayor es la cantidad de enzima utilizada, mayor es el grado de hidrólisis. Con respecto al tiempo, se determinó mediante el estudio de las medias que la mayor cantidad de queratina hidrolizada se la obtiene a las 6 horas de tratamiento.

4.3.1.1. Análisis de Varianza y Pruebas de Comparación múltiple

Para verificar los valores obtenidos se realizó un Análisis de Varianza de los factores estudiados, mediante la prueba ANOVA de dos factores, para la determinación de la variabilidad y significancia entre las medias de las combinaciones de los niveles. En la tabla 16, se presentan los resultados del análisis de varianza, indicando los grados de libertad, suma de cuadrados y significancia. Se tomaron en cuenta dentro de éste análisis, los factores independientes, combinados y el error.

Tabla 18.

Análisis de Varianza de dos factores para hidrólisis enzimática

Factor	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Medias Cuadráticas	Valor F	Significancia
Concentración de enzima	3	2.502	0.833	21.99	0.000
Tiempo	4	14.934	3.733	98.43	0.000
Concentración de enzima * tiempo	12	1.137	0.094	2.50	0.015
Error	40	1.517	0.037		
Total	59	20.090			

El Análisis de Varianza (ANOVA) indicó dos hipótesis:

- H_0 : Los tratamientos producen el mismo grado de hidrólisis
- H_A : Al menos uno de los tratamientos produce un grado de hidrólisis distinto.

Al obtener valores menores a 0.05 se aceptó la hipótesis alternativa.

Para determinar cuáles son los tratamientos que fueron significativos, se realizaron pruebas de comparación múltiple de Fisher/LSD, tanto para cada uno de los factores individualmente, como combinados entre ellos.

En las tablas 17, 18 y 19 se presentan las medias de los niveles de cada factor y la agrupación de las mismas, mediante letras. Fisher/LSD, indica que, aquellas medias que no comparten la misma letra son significativamente distintas.

Tabla 19.

LSD para concentración de enzima

Concentración de enzima	Media	Agrupación
0.1%	2.596	A
0.075%	2.481	A
0.050%	2.259	B
0.025%	1.065	C

Los resultados obtenidos en la prueba de comparación múltiple, presentaron que, las concentraciones de enzima de 0.075% y 0.1% son significativamente iguales, sin embargo, ésta última, presentó la media más alta.

En la figura 15, se presenta gráficamente la diferencia de medias entre las concentraciones de enzima, indicando que, aquellos valores que no se interponen, son significativamente distintos. Los resultados mostraron que, la media de 0.1% - 0.025% es estadísticamente distinta a las de 0.1% - 0.075% y 0.050% - 0.025%, dando valores mayores a 0.0, indicando así, que la concentración 0.1% fue la que presentaba mayor cantidad de queratina hidrolizada.

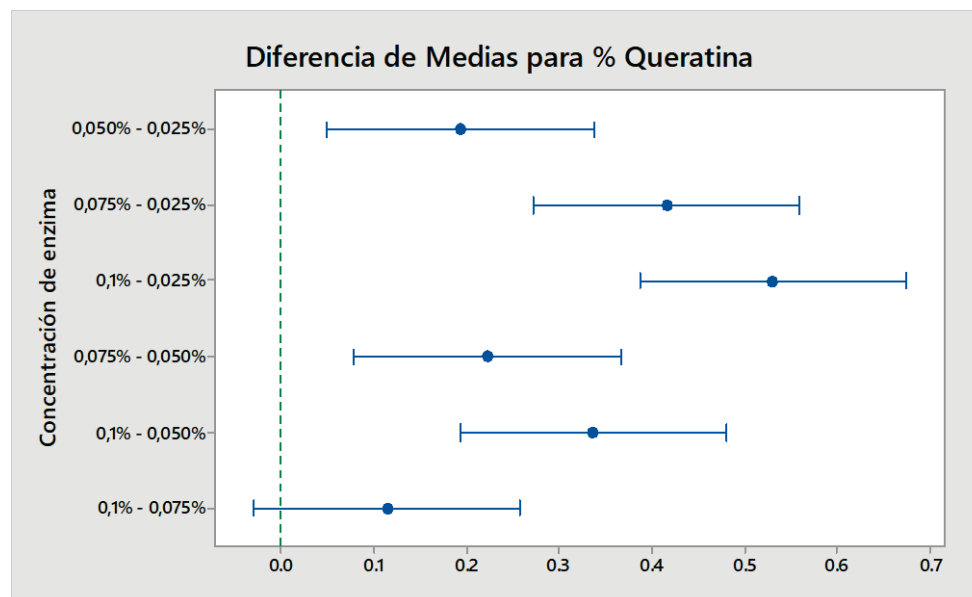


Figura 15. Diferencia de medias LSD con respecto a la concentración de enzima

Tabla 20.

LSD para Tiempo de reacción

Tiempo	Media	Agrupación
6	2.763	A
8	2.703	A
4	2.642	A
2	2.212	B
0	1.431	C

En cuanto a los resultados obtenidos para el tiempo de reacción, la prueba LSD, indicó medias significativamente iguales en las horas 4,6 y 8. Sin embargo, la sexta hora presentó la media más alta, ratificando los resultados que se presentaron en la figura 14.

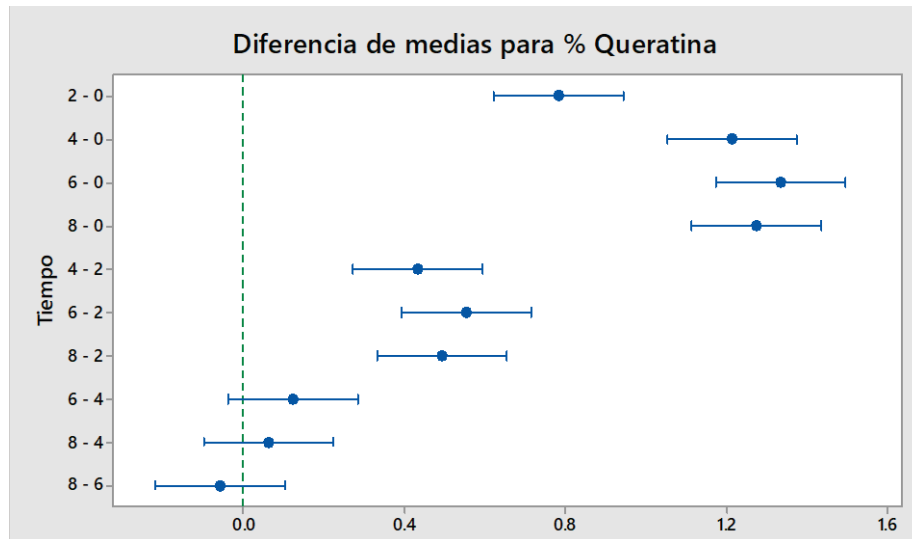


Figura 16. Diferencia de medias LSD con respecto al tiempo

Al igual que la prueba de Fisher/LSD de concentración de enzima, en la figura 16 se presenta la diferencia de medias entre los tiempos estudiados; aquellos valores que no se interponen son significativamente distintos. Los resultados presentaron los siguiente:

- Las medias de 2 – 0 horas, son significativamente iguales a las de 6 - 2 horas y 8 – 2 horas.
- Las medias de las horas 4,6,8 – 0 son significativamente iguales entre ellas, presentando valores mayores a 0.0, indicando que la hora 0 tiene menor efecto en la obtención de queratina hidrolizada.
- Las medias de los tiempos 4,6,8 – 2 son significativamente iguales entre ellas, presentando valores mayores a 0.0, señalando así que, la hora 2 tiene menor efecto que las otras en la obtención de queratina hidrolizada.
- Las medias de los tiempos 6 – 4, 8 – 4 y 8 – 6, son significativamente iguales entre ellas.
- La media del tratamiento 8 – 6, presenta un valor menor a 0.0, lo que quiere decir, que, la hora 6 tiene mejor efecto en la obtención de queratina hidrolizada.

Tabla 21.

LSD para combinado, Concentración de enzima por Tiempo

Combinados	Media	Agrupación			
0.1% y 8h	3.172	A			
0.1% y 4h	2.988	A	B		
0.1% y 6h	2.979	A	B		
0.075% y 6h	2.901	A	B	C	
0.075% y 8h	2.872	A	B	C	
0.075% y 4h	2.804		B	C	
0.050% y 6h	2.737		B	C	D
0.050% y 4h	2.630		C	D	E
0.050% y 8h	2.466			D	E F
0.025% y 6h	2.437			D	E F G
0.075% y 2h	2.427			D	E F G
0.1% y 2h	2.379			E	F G
0.025% y 8h	2.301				F G
0.025% y 4h	2.147				F G H
0.050% y 2h	2.118				G H
0.025% y 2h	1.924				H
0.025% y 0h	1.518				I
0.1% y 0h	1.460				I
0.075% y 0h	1.402				I
0.050% y 0h	1.344				I

Al igual que en las otras pruebas de comparación múltiple, para los tratamientos combinados, se determinó que aquellos que indican medias significativamente iguales, se encuentran dentro de la misma agrupación de letras. A pesar de ello, existen combinaciones que presentaron medias significativamente iguales con varios tratamientos, encontrándose dentro de varias agrupaciones, de ésta manera, se pudo determinar que:

- La combinación que presento una media mayor, siendo aquel que obtuvo mayor porcentaje grado de hidrólisis, es de 0.1% de concentración de enzima a las 8 horas. Sin embargo, éste es significativamente igual a los tratamientos de 0.1% - 4 y 6 horas y de 0.075% - 6 y 8 horas. Por otro lado, los tratamientos 0.1% - 4 y 6 horas, presentan una igualdad de medias con aquellos que se encuentran dentro de la agrupación B.

- Las combinaciones de 0.075% a las 6 y 8 horas presentaron medias significativas con los tratamientos que se encuentran dentro de las agrupaciones A, B y C.
- Aquellos tratamientos que se encuentran dentro de la agrupación E, fueron significativamente diferentes a los que se encuentran dentro de las agrupaciones A y B.
- Los tratamientos con las combinaciones 0.025% - 6 horas y 0.075% - 2 horas, presento una media significativamente igual a aquellos que se encuentran dentro de las agrupaciones D, E, F y G.
- Los tratamientos a las 0 horas, presentaron las medias más bajas, presentando una diferencia significativa con el resto, sin embargo, presentan medias significativamente iguales entre ellos.

4.3.1.2. Correlación

El coeficiente de correlación mide el alcance en el cual las variables o factores tienden a cambiar juntos, con un rango de valor de -1 a +1.

Si el valor obtenido es negativo, indica que una de las variables tiende a disminuir, por otro lado, si se presentan solo valores positivos, las dos variables tienden a incrementar.

Tabla 22.

Resultados de correlación

	Tiempo	Concentración de enzima
Concentración de enzima	0.000	
	1.000	
% Queratina	0.765	0.350

	0.000	0.006
--	-------	-------

Nota. Las celdas contienen en la parte superior los valores de coeficiente de correlación y en el parte inferior los valores p.

Los resultados de correlación indicaron que, el valor entre tiempo y porcentaje de queratina es 0.765, señalando que, mientras mayor es la cantidad de tiempo, el porcentaje de queratina hidrolizada incrementará. Así mismo, el valor obtenido entre concentración de enzima y porcentaje de queratina, presento que, mientras la concentración de enzima aumente, el porcentaje de proteína hidrolizada lo hará también.

4.3.1.3. Covarianza

El análisis de covarianza mide la relación lineal que existe entre las variables y suele ser utilizada para determinar la dirección en la que se presenta dicha relación. Al igual que en el análisis de correlación, cuando las dos variables tienden a incrementar, el valor obtenido es positivo y cuando al menos una de las variables tiende a disminuir, el valor obtenido es negativo.

Tabla 23.

Resultados de covarianza

	Tiempo	Concentración de enzima	% Queratina
Tiempo	8.135		
Concentración de enzima	0.000	0.000	
% Queratina	1.259	0.005	0.340

Los resultados del análisis de covarianza, presentaron resultados positivos, por lo que se puede determinar que:

- Con mayor tiempo, el porcentaje de proteína incremento, ratificando los resultados presentados en el análisis de correlación.
- Cuando la concentración de enzima tiende a incrementar, el porcentaje de queratina lo hace de igual manera.

4.3.1.4. Verificación del supuesto de normalidad

Para poder validar los resultados obtenidos mediante el análisis de varianza se realizó un análisis de cumplimiento del supuesto de normalidad, el cual indica si los tratamientos se distribuyen de una manera normal. Para poder determinar éste supuesto, se utilizaron los datos residuales de los tratamientos, mediante la prueba de Shapiro-Wilks.

Se determinó el supuesto con base de un valor α : 0.01. Se sabe que, si los datos de residuos, se presentan de una forma alineada, siguen una distribución normal, por lo tanto, si éstos no tienden a quedar alineados en una línea recta, éste supuesto no se cumple. La verificación se realiza mediante las siguientes hipótesis:

- H_0 : Los valores provienen de una distribución normal
- H_A : Los valores no provienen de una distribución normal

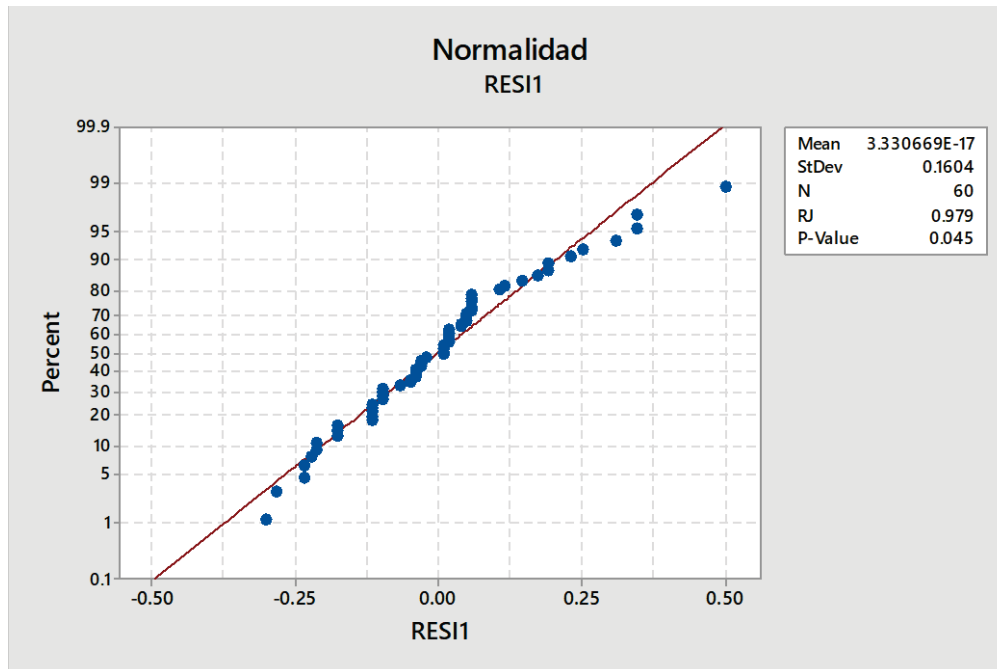


Figura 17. Supuesto de normalidad

En la figura 17 se presenta el análisis del supuesto de normalidad, en el cual, se obtuvo un valor p de 0.045, siendo mayor a la significancia $\alpha = 0.01$. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula, la cual indica que los valores proceden de una distribución normal, es decir, se cumple el supuesto de normalidad y se verifican los datos obtenidos en el análisis de varianza.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Es fundamental el análisis de los parámetros de aceites y grasas, ya que, una cantidad mayor al 3% puede perjudicar los resultados, interfiriendo en el proceso de hidrólisis enzimática. Pese a que, en la caracterización realizada se presentó un valor de 3.88%, la dilución de la materia prima en el proceso de preparación de la materia prima, permitió bajar las concentraciones de aceites y grasas, siendo esto, constatado en los resultados obtenidos de hidrólisis enzimática, ya que, presentaron avances sin ningún impedimento al paso del tiempo de análisis.

Dentro del procedimiento de preparación de la materia prima, es estrictamente necesario realizar el lavado y el secado de las plumas, para retirar los residuos adicionales del proceso de faenamiento, siendo piel, sangre y vísceras. Éstos pueden generar alteraciones en los tratamientos con la base de hidrólisis enzimática, ya que, se componen de proteínas como globulinas, elastinas y colágeno, que son igualmente susceptibles a ser degradadas mediante una acción enzimática.

La preparación de la materia prima con Sulfuro de Sodio y Metabisulfito de Sodio, como tratamiento previo al procedimiento de hidrólisis enzimática, es efectiva para romper los enlaces disulfuro, dado que logra liberar la cadena proteica, que son resultado de los enlaces entre grupos amino y carboxílicos, sobre los cuales actuará la enzima. Adicionalmente, el carácter alcalino de la solución de la materia prima, indica una fase inicial de hidrólisis alcalina, la cual fue verificada mediante la liberación de grupos amino. Logrando, de ésta manera, una mejor degradación del residuo. Los mejores porcentajes y pH obtenidos durante éste procedimiento fueron de 12 g de Na_2S y 20 g de $2NaHSO_3$ en 20 g de pluma seca, con un promedio de queratina hidrolizada de 1.58% y pH 7.

A pesar de que las concentraciones de enzima 0.075% y 0.1%, dieron resultados significativamente iguales, por beneficio de costos, se toma como mejor valor la concentración de 0.075%. En cuanto al parámetro de tiempo, las horas de 4, 6 y 8, presentan resultados significativamente iguales, sin embargo, al tener el valor más alto, se toman las 6 horas como el tiempo óptimo de tratamiento para hidrólisis enzimática.

El porcentaje de queratina hidrolizada obtenida indicó un 2.9% que, comparándola con la extracción de hidrolizados de otras proteínas es alto, pudiéndose alcanzar un promedio de 0.025 moles de NH_2 libres. Dando así, resultados que pueden dar paso a estudios posteriores sobre el tema, junto con una ejecución a nivel industrial.

Los tratamientos correspondientes a la hora 0, u hora inicial, presentaron los valores más bajos de los tratamientos, siendo estadísticamente iguales y verificando que dentro del proceso, una hidrólisis alcalina no es suficiente, requiriéndose de una enzima queratinasa como tratamiento complementario para incrementar el grado de hidrólisis.

El grado de hidrólisis obtenido, permite que el producto pueda ser purificado para utilizarlo como materia prima para distintas finalidades, reduciendo el impacto ambiental producido, pudiendo generar así, ingresos económicos.

5.2. Recomendaciones

Se aconseja añadir al lavado de las plumas, alcohol, junto con el detergente, ya que, de ésta manera se puede lograr una mejor limpieza de los residuos no

deseados y la reducción del parámetro de aceites y grasas, evitando así, interferencias de los mismos durante el proceso de hidrólisis.

Realizar un análisis de caracterización con los parámetros de aceites y grasas después de que el residuo haya sido lavado y secado, para de ésta manera obtener la cantidad de aceites y grasas que han sido removidos, y así, poder evitar alteraciones dentro del proceso de hidrólisis enzimática.

Se recomienda controlar el tiempo de agitación y reposo durante la preparación de la materia prima de una manera rigurosa para evitar una reacción no deseada, es decir, falta de la misma para que se facilite el proceso de hidrólisis enzimática.

Realizar estudios piloto para la verificación de la eficiencia de la investigación, mediante control de los parámetros establecidos y determinar las condiciones óptimas para su implementación a nivel industrial.

Desarrollar un estudio económico para la confirmación de los resultados obtenidos en la presente investigación. Dicho estudio recomendado debe reflejar gastos de inversión y ganancias de las empresas avícolas de mediana y pequeña escala.

Así mismo, se recomienda ejecutar estudios del uso para la proteína hidrolizada obtenida, tales como, materia prima para polímeros o biopolímeros, tratamientos cosméticos capilares, procesos de curtiembre, teñido de textiles y medicina, determinando el mejor uso para la reutilización de las plumas y beneficio de las empresas avícolas.

REFERENCIAS

- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2006). *Introducción a la biología celular* (2da ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana. Recuperado el 03 de noviembre del 2017 de https://books.google.com.ec/books?id=qrrYZJhrRm4C&pg=PA143&lpg=PA143&dq=enlaces+disulfuro&source=bl&ots=6Rt88PSvV2&sig=jbdCuB_GyKDjDcZM1zebD5FhMrg&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwilkPKk3qHXAhUJ7iYKHUGNCt84ChDoAQguMAI#v=onepage&q=enlaces+disulfuro&f=false
- Alonso, A., De la Fuente, J. R., Flores, J., García, L., Garza, T., Nava, H. y Soberon, G. (1995). *La Ciencia Es Para Todos*. México D.F.: Fondo de Cultura Económica. Recuperado el 04 de noviembre del 2017 de http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/138/htm/sec_8.htm
- Armendaris, G. (2002). Enzimas, hormonas y vitaminas. En X. Guevara (Ed.), *Química Orgánica 3* (pp. 228–231). Quito: DIMAXI S.A.
- Arshad, M., Bano, I., Khan, N., Shahzad, M., Younus, M., Abbas, M. y Iqbal, M. (2017). Electricity generation from biogas of poultry waste: An assessment of potential and feasibility in Pakistan. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 81, 1241–1246. Recuperado el 10 de octubre del 2017. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2017.09.007>.
- Barioglio, C. F. (2013). *Diccionario de las ciencias agropecuarias*. (Editorial Brujas, Ed.). Bueno Aires.
- Berg, J., Tymoczko, J., Gatto, G. J. y Stryer, L. (2015). *Biochemistry*. (W.H. Freeman and Company, Ed.) (8th Editio). New York: Kate Ahr Parker.
- Berg, J., Tymoczko, J. y Stryer, L. (2008). *Bioquímica*. (W.H. Freeman and Company, Ed.) (6ta ed.). España: Reverté. Recuperado el 27 de octubre del 2017 de

<https://books.google.com.ec/books?id=HRr4MNH2YssC&pg=PA45&dq=queratina&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjDxuqPyqHXAhUCVyYKHQ5oBxIQ6AEIJDA#v=onepage&q=queratina&f=false>

- Bernal, C., Cairó, J. y Coello, N. (2006). Purification and characterization of a novel exocellular keratinase from *Kocuria rosea*. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(1–2), 49–54. Recuperado el 08 de noviembre del 2017. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.02.021>.
- Brandelli, A., Sala, L. y Juliano, S. (2015). Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into added-value products. *Food Research International*, 73, 3–12. Recuperado el 27 de octubre del 2017. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2015.01.015>
- Bremner, A. S. (1981). *Higiene e inspección de carne de aves*. Londres: Bailliére Tindall.
- Calderón, M. (2000). *Efecto de tres tiempos de hidrolizado sobre el contenido de proteína y digestibilidad de la harina de pluma y sangre*. Recuperado el 20 de agosto del 2017 de <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/2892/1/T1131.pdf>
- Castaños, E. (2015). Niveles de organización de las proteínas. Recuperado el 30 de octubre de 2017 de <https://lidiakonlaquimica.wordpress.com/2015/07/04/niveles-de-organizacion-de-las-proteinas/>
- Castells, X. (2000). *Reciclaje de residuos industriales*. Madrid: Díaz de Santos. Recuperado el 11 de noviembre del 2017 de <https://books.google.com.ec/books?id=oA7ndthNMYQC&pg=PA73&dq=hidrólisis&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwicuvvxj7fXAhVLziYKHQyqD8UQ6AEILjAC#v=onepage&q=hidrólisis&f=false>
- Cavello, I. (2013). *Queratinasas microbianas: microorganismos, producción y caracterización*. Universidad Nacional de La Plata. Recuperado el 08 de noviembre del 2017 de http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/32430/Documento_c

ompleto__.pdf?sequence=1

- Chandra Barman, N., Tuj, F., Chandra Das, K., Golam, M., Akhter Banu, N., Salimullah, M. y Hashem, A. (2017). Production, partial optimization and characterization of keratinase enzyme by *Arthrobacter* sp. NFH5 isolated from soil samples. *AMB Express*, 7(181), 2–8. Recuperado el 17 de noviembre del 2017. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0462-6>
- Constitución de la República del Ecuador. (2008). Registro oficial 449 del 20 de octubre del 2008.
- Dai, L., Li, C., Zhang, J. y Cheng, F. (2018). Preparation and characterization of starch nanocrystals combining ball milling with acid hydrolysis. *Carbohydrate Polymers*, 180, 122–127. Recuperado el 12 de noviembre del 2017. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2017.10.015>
- Deis, F., Gerber, N., Gumpert, R. y Koeppe, R. (2016). *Biochemistry: A short course*. (W.H. Freeman and Company, Ed.) (3th Editio). New York.
- Faenamamiento artesanal de aves en el Ecuador. (2017). *Maxi*, (1390–145), 28.
- Ferreira, A., Kunh, S. S., Cremonez, P. A., Dieter, J., Teleken, J. G., Sampaio, S. C. y Kunh, P. D. (2017). Brazilian poultry activity waste: Destinations and energetic potential. *Renewable and Sustainable Energy reviews*. Recuperado el 22 de octubre del 2017. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.08.078>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2016). Aves de corral. Recuperado el 30 de agosto de 2017 de <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/poultry/home.html>
- Gacén Guillén, J. (1964). Aspectos químicos del blanqueo de la lana con peróxido de hidrógeno: Modificación química de la queratina. *Instituto de Investigación Textil y Cooperación Industrial*, 39, 43–70. Recuperado el 02 de noviembre del 2017 de

<https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099/5909/Article02.pdf?sequence=1>

- Galarza, B., Cavello, I., Garro, L., Gortari, C., Hours, R. y Cantera, C. (2012). Evaluación del incremento en la producción de enzimas queratinolíticas. *AQEIC*, 63(3), 70–76. Recuperado el 22 de octubre del 2017 de <http://www.eei.upc.es/3web/catA3/journal/repo/2012/V63N3/esp/04.pdf>
- Galarza Vinueza, S. X. (2011). *DISEÑO DE UN PLAN DE IMPLEMENTACIÓN DE BUENAS PRÁCTICAS DE MANUFACTURA PARA UNA PLANTA FAENADORA DE AVES*. Escuela Politécnica Nacional. Recuperado el 08 de noviembre del 2017 de <http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/2633/1/CD-3317.pdf>
- García, F. (2008). El pollo desde la granja al plato. Recuperado el 24 de octubre de 2017 de <http://www.cadenaavicola.com.ar/index.asp?id=114&ver=2>
- Gil Cano, F. (2010). *ANATOMÍA ESPECÍFICA DE AVES: ASPECTOS FUNCIONALES* Y. Murcia. Recuperado el 25 de octubre del 2017 de <https://www.um.es/anatvet/interactividad/aaves/anatomia-aves-10.pdf>
- Gómez, L. J. y Zapata, J. E. (2017). Efecto del Nivel de Grasa y Velocidad de Agitación en la Hidrolisis Enzimática de Vísceras de Tilapia Roja (*Oreochromis* sp.). *Información tecnológica*, 28(4), 47–56.
- Gousterova, A., Braikova, D., Goshev, I., Christov, P., Tishinov, K., Vasileva, E., Hertlé, T. y Nedkov, P. (2004). Degradation of keratin and collagen containing wastes by newly isolated thermoactinomycetes or by alkaline hydrolysis. *Letters in Applied Microbiology*, 40, 335–340.
- Gupta, A., Kamarudin, N., Gek, C. y Bin, R. (2012). Extraction of Keratin Protein from Chicken Feather. *J. Chem. Chemical Engineering*, 6, 732–737.

- Gupta, R., Tiwary, E., Sharma, R., Rajput, R. y Nair, N. (2013). Microbial Keratinases: Diversity and Applications 33.1 Sources of Microbial Keratinases. *Biotechnology of Thermophiles*, 881–904. Recuperado el 30 de octubre del 2017. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5899-5_33
- Hilpmann, G., Becher, N., Pahner, F. A., Kusema, B., Maki-Arvela, P., Lange, R., Murcin, D. y Salmi, T. (2016). Acid hydrolysis of xylan. *Catalysis Today*, 259, 376–380. Recuperado el 12 de noviembre del 2017. <https://doi.org/10.1016/J.CATTOD.2015.04.044>
- Hou, Y., Wu, Z., Dai, Z., Wang, G. y Wu, G. (2017). Protein hydrolysates in animal nutrition: Industrial production, bioactive peptides, and functional significance. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 24(8), 2–13. Recuperado el 17 de noviembre del 2017. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0153-9>
- Jin, S. Y., Kim, M. H., Jeong, Y. G., Yoon, Y. y Park, W. H. (2017). Effect of alkaline hydrolysis on cyclization reaction of PAN nanofibers. *Materials & Design*, 124, 69–77. Recuperado el 17 de noviembre del 2017. <https://doi.org/10.1016/J.MATDES.2017.03.066>
- Leeson, S., Summers, J., y Diaz, G. (2000). *Nutrición Aviar Comercial* (1ra Edición). Bogotá: Le'Print Club Express Ltda.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M. y Zipursky, S. L. (2006). *Biología celular y molecular*. (W.H. Freeman and Company, Ed.) (5ta ed.). Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana. Recuperado el 03 de noviembre del 2017 de [https://books.google.com.ec/books?id=YdyMSxY2LjMC&pg=PA675&lpg=PA675&dq=enlaces+disulfuro&source=bl&ots=tFLlbnATVo&sig=0UdmDK9PQKkvHjuQeSq-c_Gxzoo&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwilkPKk3qHXAhUJ7iYKHUGN Ct84ChDoAQg1MAQ#v=onepage&q=enlaces disulfuro&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=YdyMSxY2LjMC&pg=PA675&lpg=PA675&dq=enlaces+disulfuro&source=bl&ots=tFLlbnATVo&sig=0UdmDK9PQKkvHjuQeSq-c_Gxzoo&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwilkPKk3qHXAhUJ7iYKHUGN Ct84ChDoAQg1MAQ#v=onepage&q=enlaces%20disulfuro&f=false)
- Lon-Wo, E. (2003). La producción avícola y la contaminación ambiental. En *VIII*

encuentro de nutrición y producción de animales monogástricos (pp. 29–34). La Habana: Instituto de Ciencia Ambiental. Recuperado el 21 de agosto del 2017 de http://avpa.ula.ve/eventos/viii_encuentro_monogastricos/memorias/conferencia-5.pdf

López Fandiño, R. (2014). *Las proteínas de los alimentos*. (CSIC, Ed.). Madrid: Catarata.

Mejía, J. (2013). BIENESTAR ANIMAL FAENAMIENTO DE ANIMALES DE PRODUCCIÓN. Quito: AGROCALIDAD. Recuperado el 19 de octubre del 2017 de <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/pdf/sanidad-animal/bienestar-animal/faenamamiento.pdf>

Mendieta Orellana, G. E. (2016). *Estudio del efecto del proceso de irradiación de plumas pollo, con electrones acelerados, sobre la extracción de queratina hidrolizada*. Escuela Politécnica Nacional. Recuperado el 20 de agosto del 2017 de <http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/16653/1/CD-7266.pdf>

Menon, G. K. y Menon, J. (2000). Avian Epidermal Lipids: Functional Considerations and Relationship to Feathering. *American Zoologist*, 40(4), 540–552. Recuperado el 25 de octubre del 2017. [https://doi.org/https://doi.org/10.1668/0003-1569\(2000\)040\[0540:AELFCA\]2.0.CO;2](https://doi.org/https://doi.org/10.1668/0003-1569(2000)040[0540:AELFCA]2.0.CO;2)

Mokrejs, P., Svoboda, P., Hrnčirik, J., Janacova, D. y Vasek, V. (2010). Processing poultry feathers into keratin hydrolysate through alkaline-enzymatic hydrolysis. *Waste Mangment & Research*, 1–8. Rrecuperado el 24 de septiembre del 2017. <https://doi.org/10.1177/0734242X10370378>

Nam, G., Lee, D., Lee, H., Lee, N., Kim, B. Choe, E., Suhartono, M. y Pyun, Y. (2002). Native-feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase-producing thermophilic anaerobe.

Archives of Microbiology, 178, 538–547. Recuperado el 08 de noviembre del 2017. <https://doi.org/10.1007/s00203-002-0489-0>

Navarro, S., García, A. L. y Sanchez, J. (2009). Aspectos del proceso hidrolítico ácido de proteínas. *Universidad De Murcia*. Recuperado el 11 de noviembre del 2017 de <http://revistas.um.es/analesumciencias/article/viewFile/102701/97671>

Orellana Jarrín, J. (2015). Análisis de la Avicultura. *El Agro*. Recuperado el 05 de septiembre del 2017 de <http://www.revistaelagro.com/analisis-de-la-avicultura-en-ecuador/>

Orjuela-Palacio, J., Lanari, M. y Zaritzky, N. (2015). *Desarrollo de productos a base de queratina a partir de residuos de la industria avícola*. La Plata. Recuperado el 20 de septiembre del 2017 de http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/47852/Documento_completo.pdf?sequence=1

Prakash, P., Jayalakshmi, S. K. y Sreeramulu, K. (2010). Purification and characterization of extreme alkaline, thermostable keratinase, and keratin disulfide reductase produced by *Bacillus halodurans* PPKS-2. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 625–633. Recuperado el 08 de noviembre del 2017. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2499-1>

QuimiNet. (2013). Los principales tipos de queratina, su estructura y componentes. Recuperado el 17 de mayo de 2017 de <http://www.quiminet.com/articulos/los-principales-tipos-de-queratina-su-estructura-y-componentes-3444320.htm>

Ricci, O. E. (2012). Harina de Sangre. Recuperado el 25 de octubre de 2017 de <https://www.engormix.com/avicultura/articulos/harina-de-sangre-t29408.htm>

Robbins, C. R. (2012). Chemical Composition of Different Hair Types. En *Chemical and Physical Behavior of Human Hair* (5th ed., pp. 105–176). Berlin: Springer Berlin Heidelberg. Recuperado el 12 de

noviembre del 2017. https://doi.org/10.1007/978-3-642-25611-0_2

Rodríguez, Á. (2013). Selección del plumaje de razas inglesas pesadas. Recuperado el 25 de octubre de 2017 de <http://razascanariospostura.blogspot.com/2013/09/seleccion-del-plumajeen-inglesas.html>

Rodríguez Saldaña, D. (2011). La carne de pollo (Procesamiento). En *AVITECNIA Manual de las aves domésticas más comunes* (p. 19). Trillas.

Roldán, J. C., Pardo, N., Durán Naranjo, L. F., Martínez, H. y Durán Ramírez, F. (2004). Manual de explotación de aves de corral. En *Volvamos al campo* (pp. 59-65-240). Bogotá.

Sabow, A. B., Nakyinsige, K., Adeyemi, K. D., Sazili, A. Q., Johnson, C. B., Webster, J. y Farouk, M. M. (2017). High frequency pre-slaughter electrical stunning in ruminants and poultry for halal meat production: A review. *Livestock Science*, 202, 124–134. Recuperado el 22 de octubre del 2017. <https://doi.org/10.1016/J.LIVSCI.2017.05.021>

Sakurai, K. (2000). HDT 17 : Método sencillo del análisis de residuos sólidos. Recuperado el 01 de septiembre de 2017 de <http://www.bvsde.paho.org/eswww/proyecto/repidisc/publica/hdt/hdt017.html>

Salas, E. y Arenas, R. (2001). Biología Molecular en micología médica. *Dermatología Venezolana* , 39(1), 7–10. Recuperado el 17 de noviembre del 2017 de https://www.researchgate.net/profile/Roberto_Arenas/publication/237741652_BIOLOGIA_MOLECULAR_EN_MICOLOGIA_MEDICA/links/550861ef0cf27e990e0abb22/BIOLOGIA-MOLECULAR-EN-MICOLOGIA-MEDICA.pdf

Salazar Cedillo, M. V. (2013). *Determinación del método de obtención de queratina cosmética a partir de plumas gallináceas*. Universidad Central del Ecuador. Recuperado el 21 de agosto del 2017 de

<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/1088/1/T-UCE-0008-10.pdf>

Sánchez, A. J. (2011). Química con estilo. Recuperado el 03 de noviembre del 2017 de <http://www.cvatocha.com/documentos/quimica/Quimicaconestilo.pdf>

Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo, SENPLADES. (2017). Plan Nacional para el Buen Vivir 2017-2021. Quito. Recuperado 13 de octubre del 2017 de <http://www.planificacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2017/07/Plan-Nacional-para-el-Buen-Vivir-2017-2021.pdf>

Sinkiewicz, I., Sliwinska, A., Staroszczyk, H. y Kołodziejska, I. (2017). Alternative Methods of Preparation of Soluble Keratin from Chicken Feathers. *Waste Biomass Valor*, 8, 1043–1048. Recuperado el 18 de noviembre del 2017. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9678-y>

Teijón, J. M. y Garrido, A. (2009). *Aprovechamiento de biomasa lignocelulósica, algunas experiencias de investigación en Colombia*. (Tebar, Ed.). Madrid. Recuperado el 29 de septiembre del 2017 de <http://www.digitaliapublishing.com/visor/10355>

Thieme, O., Babafunso, E., Rota, A., Alders, R., Abdul, M. y De'Besi, G. (2014). *Family Poultry Development* (No. 12). *Animal Production and Health*. Roma. Recuperado el 19 de octubre del 2017 de <http://www.fao.org/docrep/019/i3595e/i3595e.pdf>

Tombolato, L., Novitskaya, E. E., Chen, P.-Y., Sheppard, F. A. y Mckittrick, J. (2009). Microstructure, elastic properties and deformation mechanisms of horn keratin. *Acta Biomaterialia*, 6, 319–330. Recuperado el 02 de noviembre del 2017. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.06.033>

Vizcaíno, D., Vargas Estrella, J. y Santiana Jara, I. (2013). *PROGRAMA NACIONAL SANITARIO AVICOLA*. Quito. Recuperado 05 de septiembre del 2017 de <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp->

content/uploads/2016/08/Resolución-071.-Programa-Nacional-Sanitario-Avícola-PNSA.pdf

- Wang, B., Yang, W., Mckittrick, J. y Meyers, M. A. (2016). Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. *Progress in Materials Science*, 76, 229–318. Recuperado el 03 de noviembre del 2017. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2015.06.001>
- Wang, J., Su, Y., Jia, F. y Jin, H. (2013). Characterization of casein hydrolysates derived from enzymatic hydrolysis. *Chemistry Central Journal* , 62(7), 1–8. Recuperado el 17 de noviembre del 2017. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-62>
- Wang, T., Wu, J., Yi, Y. y Qui, J. (2016). Optimization of Process Conditions for Infected Animal Tissues by Alkaline Hydrolysis Technology. *Procedia Environmental Sciences*, 31, 366–374. Recuperado el 12 de noviembre del 2017. <https://doi.org/10.1016/J.PROENV.2016.02.049>
- Why Wool? (2008). Recuperado de <http://itech.dickinson.edu/chemistry/?p=381#more-381>
- Yoon, Y., Kim, S., Oh, S., y Kim, C. (2014). Potential of anaerobic digestion for material recovery and energy production in waste biomass from a poultry slaughterhouse. *Waste Management*, 34, 204–209. Recuperado el 22 de octubre del 2017. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.09.020>

ANEXOS

Anexo 1. Ficha Técnica de KYGZYME VP

Product Information

KINGZYME VP *An Innovative Keratinase*

Description

Kingzyme VP is a keratinase enzyme preparation developed according to characteristics of animal by-product raw materials and their different processing methods. Kingzyme VP mainly composed of endonuclease, exonuclease and other components. It can hydrolyse feather keratin, decomposition of macromolecule proteins into required peptide, small peptide, amino acid products, to improve product yield, Solubility, flavor, taste. It can be widely used to make high quality food ingredients, biochemical pharmaceutical, and feed.

Specification: with activity not less than 100,000U/g

Application

- Hydrolysis poultry feather, swine and cattle hair produce animal protein feed.
- Feather powder hydrolysis produce high level protein feed.
- Hydrolysis animal hair produce compound amino acids.

Advantages

- High hydrolysis yields
- Good taste and palatability of final product
- Improve product digestibility and absorption rate.
- Green and safe.

Caution

This product may cause dermal and respiratory irritation and/or sensitivity. Appropriate protective equipment must be worn during handling.

Packing

25 kg/bag

Storage

The product should be stored in a cool dry environment without exposure to direct sunlight. Shelf life is minimum 12months from production date, can be extended in original package stored under 25℃.

Quality

The manufacturing plant has been authorized by the China authority for food, feed additive production, and has been certified of GMP+, ISO 9001:2008, ISO22000-2006 (HACCP), to control the quality through the whole production procedure.

Technical Service

Vland Biotech Group is happy to assist our customers with the use of our products for applications development.



QINGDAO VLAND BIOTECH GROUP CO., LTD.
Rm.12A05, No.29 Miaoling Road, Qingdao, China
+86 532 8896 9585 | <http://www.vlandgroup.com>

Anexo 2. Procedimiento de análisis de aceites y grasas

AOAC Official Method 2003.05

Crude Fat in Feeds, Cereal Grains, and Forages

First Action 2003

Final Action 2006

A. Principle

The Randall modification of the standard Soxhlet extraction submerges the test portion in boiling solvent, reducing the time needed for extraction. The solvent dissolves fats, oils, pigments, and other soluble substances, collectively termed "crude fat".

A 2-step process extracts a dried, ground test portion; in the first step, the thimble containing the test portion is immersed into the boiling solvent. The intermixing of matrix with hot solvent ensures rapid solubilization of extractables. The thimble is then raised above the solvent and the test portion is further extracted by a continuous flow of condensed solvent. The solvent is evaporated and recovered by condensation. The resulting crude fat residue is determined gravimetrically after drying.

The solubility characteristics of different solvents may result in slight differences in crude fat results. For this reason, the report should reflect the solvent used. Example: % Crude Fat, Ether Extraction

B. Apparatus

(a) *Solvent Extraction system.* – Multiple position, extraction unit conducting 2-stage Randall extraction process with solvent recovery cycle, with Viton or Teflon seals compatible with ether.

(b) *Thimbles and stand.* – Cellulose thimbles and stand to hold thimbles.

(c) *Extraction cups.* – Aluminium or glass. (Extraction temperature settings may differ; consult manufacturer’s operating instructions.)

Items (a) – (c) are available as Soxtec systems from Foos or other Randall-type extraction systems.

C. Reagents

(a) *Anhydrous diethylether.* – Purified for fat extraction, Fisher E492 labeled “For Fat Extraction” is also stabilized, or E134-4, or equivalent. To prevent ether from absorbing water, purchase it in small containers tightly closed. Petroleum ether cannot be substituted for diethylether because it does not dissolve all of the plant lipid material.

(b) *Cotton.*- Defatted. Soak medical grade cotton in diethylether or hexanes for 24 h, agitating several times during this period. Remove and air dry.

(c) *Sand.*- Ashed (for ignition boats)

D. Preparation of Analysis Sample

Reduce particle size of samples to fineness of 0.75 – 1 mm.

E. Determination

Weight 1-5 g test portions containing ca 100-200 mg fat directly into tared cellulose thimbles. According to the following scheme:

Crude Fat %	Test portion weight (g).
<2	5
5	2-4
10	1-2
>20	1

Record weight to nearest 0.1 mg (S) and thimble number.

Note: If test sample contains large amounts of urea salts (>5%) or soluble carbohydrates (>15%), glycerol, lactic acid, amino acid salts (>10%) or other water –soluble components, remove by water extraction. Weight test portion onto filter paper, extract with five 20 ml portions of water, allowing each portion to drain. Place filter paper containing washed test portion into thimble and dry at

102 – 2°C for 2 h. To facilitate filtration, add 1-2 g ashed, acid-washed sand, or Celite to bottom of filter or mix in with test portion before water extraction.

If dry test portions will not be extracted immediately, store in desiccator. Both solvent and test materials must be free of moisture to avoid extraction of water-soluble components such as carbohydrates, urea, lactic acid, and glycerol, which will result in false high values.

An absorbent, such as diatomaceous earth can be added to the test portion when high fat materials, which melt through the thimble during the predry step, are present. Alternatively, defatted cotton can be added before the predry step to absorb the melted fat. If the material melts at 102°C, place a pretared extraction cup under the thimble during the drying step to catch any melted fat that was unabsorbed and escaped the thimble.

Place defatted cotton plug on top of the test portion to keep material immersed during the boiling step and prevent any loss of test portion from top of the thimble.

Remove extraction cups from the extractor and place in operating fume hood to finish evaporating solvent at low temperature. Dry extraction at 102°C oven for 30 minutes to remove moisture. Excessive drying may oxidize fat and give high results. Cool in desiccator to room temperature and weight to nearest 0.1 mg.

F. Calculations

$$\% \text{ Crude fat, diethylether extract} = \frac{F * T}{S} * 100$$

Where, F= weight cup of cup + fat residue, g; T= weight of empty cup, g; S= test portion weight, g.

Anexo 3. Procedimiento de Nitrógeno Total

Nitrogen (Total) in Fertilizers

Kjeldahl Method

First Action 1955

Final Action

A. Reagents

- (a) *Sulfuric acid.* – 93 – 98% H_2SO_4 , N-free
- (b) *Mercuric oxide or metallic mercury.* – HgO or Hg, reagent grade, N-free
- (c) *Potassium Sulfate.*- Reagent grade, N-free
- (d) *Salicylic acid.*- Reagent grade, N-free
- (e) *Sulfide or thiosulfate solution.*- Dissolve 40 g commercial K, S in 1 L of H_2O
- (f) *Sodium hydroxide.* - Pellets or solution, N-free. For solution, dissolve ca 450 g solid NaOH in H_2O , cool, and dilute in 1 L.
- (g) *Zinc granules.* - Reagent grade
- (h) *Zinc dust.* – Impalpable powder
- (i) *Methyl red indicator.* – Dissolve 1 g methyl red in 200 ml alcohol
- (j) *Hydrochloric standard solution.* – 0,5 or 0,1 M when amount of N is small or (sulfuric acid – 0,25 or 0,05 M when amount of N is small)
- (k) *Sodium Hydroxide standard solution.* – 0,1 M

Standardize each standard solution with primary standard and check one against the other. Test reagents before use by blank determination with 2 f sugar, which ensure partial reduction of any nitrates present.

B. Apparatus

- (a) *For digestion.* – Use Kjeldahl flasks or hard, moderately thick, well-annealed glass with total capacity ca 500-800 ml. Conduct digestion over

heating device adjusted to bring 250 ml H_2O at $25^\circ C$ to rolling boil in ca 5 minutes or other time as specified in method.

- (b) *For distillation.* – Use 500-800 ml. Kjeldahl or other suitable flasks, fitted with rubber stopper through which passes lower end of efficient scrubber bulb or trap to prevent mechanical carryover of NaOH during distillation. Connect upper end of bulb tube to condenser tube by rubber tubing. Trap outlet of condenser in such way as to ensure complete absorption of NH_3 distilling over into acid in receiver.

C. Improved Method for Nitrate-Free Materials

Place weighted test portion in digestion flask. Add 0.7 g H_2O , 15 g powdered K_2SO_4 or anhydrous Na_2SO_4 and 25 ml H_2SO_4 . Place flask in inclined position and heat gently until frothing ceases; boil briskly until solution clears and then 30 minute longer. Cool, add ca 200 ml H_2O , cool $<25^\circ C$, add 25 ml of the sulfide or thiosulfate solution, and mix to precipitate Hg. Add few Zn granules to prevent bumping, tilt flask, and add layer of NaOH without agitation. Immediately connect flask to distilling bulb on condenser, and with tip of condenser immersed in standard acid and 5-7 drops indicator in receiver, rotate flasks to mix contents thoroughly, then, heat until all NH_3 has distilled. Correct for blank determination on reagents.

When standard HCl is used:

$$\begin{aligned} \text{Percent } N &= (\text{ml standard acid} * \text{molarity acid}) \\ &- (\text{ml standard NaOH} * \text{molarity NaOH}) * \frac{1.4007}{\text{g test portion}} \end{aligned}$$

When standard H_2SO_4 is used:

$$\begin{aligned} \text{Percent } N &= (\text{ml standard acid} * 2 * \text{molarity acid}) \\ &- (\text{ml standard NaOH} * \text{molarity NaOH}) * \frac{1.4007}{\text{g test portion}} \end{aligned}$$

D. Improved Method for Nitrate-Containing Materials

Place weighted test portion in digestion flask. Add 40 ml H_2SO_4 containing 2 g salicylic acid. Shake until thoroughly mixed and let stand, with occasional shaking. >30 minutes; then, add 5 g of $Na_2S_2O_3$. Shake and let stand 5 minutes; then heat over low flame until frothing ceases. Turn off heat, add 0.7 g HgO and 15 g powdered K_2SO_4 , and boil briskly until solution clears, then > 30 minutes longer.

Anexo 4. Secuencia para la prueba de hidrólisis enzimática

Secuencia para pruebas de hidrólisis enzimática de queratina

Tiempo (minutos)	Acción a ejecutar
-10	Tomar la muestra inicial e iniciar el análisis de grupos amino libres
0	Iniciar la agitación y colocar la enzima
110	Titular con HCl la muestra inicial para el análisis de grupos amino libres
120	Parar la agitación, medir el pH, tomar la muestra 1 e iniciar el análisis de grupos amino libres
130	Reiniciar la agitación
240	Titular con HCl la muestra 1 para el análisis de grupos amino libres
250	Parar la agitación, medir el pH, tomar la muestra 2 e iniciar el análisis de grupos amino libres
260	Reiniciar la agitación
370	Titular con HCl la muestra 2 para el análisis de grupos amino libres
380	Parar la agitación, medir el pH, tomar la muestra 3 e iniciar el análisis de grupos amino libres
390	Reiniciar la agitación
500	Titular con HCl la muestra 3 para el análisis de grupos amino libres
510	Parar la agitación, medir el pH, tomar la muestra 4 e iniciar el análisis de grupos amino libres
630	Titular con HCl la muestra 4 para el análisis de grupos amino libres

Anexo 5. Preparación de reactivos para pruebas de Conway

- A) *Indicador mixto*: pesar 0.033 g del indicador Verde de Bromocresol en un matraz volumétrico de 100 ml. Añadir 0.066 g de Rojo de Metilo y diluir la mezcla en Etanol al 95%. Finalmente aforar la mezcla con etanol al 95%.
- B) *Ácido Bórico*: en un matraz volumétrico de 1L pesar 10 g de ácido bórico y diluir en 700 ml de agua destilada. Agregar a la mezcla 200 ml de Etanol al 95% y 10 ml de la solución de indicador mixto anteriormente preparado. Finalmente aforar a 1L con agua destilada.



- C) *Hidróxido de Potasio*. en 200 ml de agua destilada disolver 100 g de Hidróxido de Potasio (KOH). Se debe evitar la absorción de CO_2 .
- D) *Ácido Clorhídrico a 0.01 N*: en un matraz aforado de 1L, añadir 0.83 ml de Ácido Clorhídrico concentrado y posteriormente aforar con agua destilada.

Anexo 6. Resultados de Caracterización de Materia Prima



CENTRO DE SOLUCIONES ANALITICAS INTEGRALES
CENTROCESAL Cía. Ltda.

CENTROCESAL Cía. Ltda.

ÁREA QUÍMICA

INFORME DE ENSAYO No.: 22519-01-18-08-17-Q

Cliente:	María Belén Valencia	
Representante:	María Belén Valencia	
Dirección:	Carcelén	
Teléfono:	3444040/09926030	FAX:
Identificación de la Muestra:	PLUMAS DE POLLO	
Descripción de la Muestra:	Sólido heterogéneo de color blanco	
Contenido declarado:	300 g	
No. Lote o código	ND	
Fecha de elaboración:	ND	FAX:
Fecha de caducidad:	ND	
Conservación de la Muestra:	Ambiente	
Muestreo:	Por el cliente	Fecha de toma de muestra: ND
		Fecha de recepción: 18-ago.-2017
		Fecha de ensayo: 29 al 30- ago-2017
		Fecha de reporte: 30-ago.-2017

Resultados analíticos:

Pag.: 1 de 1

PARAMETRO	METODO	UNIDADES	RESULTADO
Aceites y Grasas	AOAC 2003.05	% p/p	3.88
Nitrógeno Total (N)	POE 5.4.47 AOAC 955.04	% p/p	6.67

AOAC: Official Method Analysis
POE: Procedimiento interno

Ing. BQ. Paul Veintimilla

[Signature]
CENTROCESAL Cía. Ltda.

RESPONSABLE DE ANALISIS

Q.F. Andrea Cumba A.

[Signature]
CENTROCESAL Cía. Ltda.

RESPONSABLE DE SUPERVISION

NOTA 1: Los resultados reportados son válidos solo para las muestras analizadas en este reporte.

NOTA 2: Las condiciones ambientales de temperatura y humedad no influyen en este análisis

NOTA 3: Muestras recibidas en el Laboratorio, CENTROCESAL Cía. Ltda. se responsabiliza únicamente de los análisis.

NOTA 4: La declaración sobre la incertidumbre de medición, se puede solicitar al laboratorio y será información cuando el cliente lo requiera o cuando afecte a los límites de una especificación.

NOTA 5: Las opiniones/interpretaciones/etc., que se puedan indicar, están FUERA del alcance de acreditación del SAE

NOTA 6: El tiempo de permanencia de las muestras en el laboratorio, corresponde a perecibles: 48 horas y no perecibles: 30 días contados desde que se entrega el resultado.



CENTRO DE SOLUCIONES ANALITICAS INTEGRALES
CENTROCESAL Cía. Ltda.

ÁREA QUÍMICA

INFORME DE ENSAYO No.: 22844-01-19-09-17-Q

Ciente:	María Belén Valencia		
Representante:	María Belén Valencia		
Dirección:	Carcelén		
Teléfono:	3444040/09926030	FAX:	
Identificación de la Muestra:	PLUMA		
Descripción de la Muestra:	Sólido heterogéneo de color blanco		
Contenido declarado:	300 g		
No. Lote o código	ND		
Fecha de elaboración:	ND		
Fecha de caducidad:	ND		
Conservación de la Muestra:	Ambiente		
Muestreo:	Por el cliente	Fecha de toma de muestra:	ND
		Fecha de recepción:	19-sep.-2017
		Fecha de ensayo:	28-sep.-2017
		Fecha de reporte:	29-sep.-2017

Resultados analíticos:

Pag.: 1 de 1

PARAMETRO	METODO	UNIDADES	RESULTADO
*Proteína	POE: 5.4.91 AOAC 2001.11	% p/p	75.43

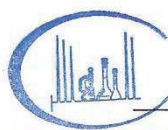
Factor de conversión: 6.25

AOAC: Official Method Analysis
POE: Procedimiento interno

Ing. BQ. Paul Veintimilla

CENTROCESAL Cía. Ltda.

RESPONSABLE DE ANALISIS



CENTROCESAL Cía. Ltda.

BQ.F. Raquel Rosas R.
CENTROCESAL Cía. Ltda.

RESPONSABLE DE SUPERVISION

- NOTA 1: Los resultados reportados son válidos solo para las muestras analizadas de este reporte.
 NOTA 2: Las condiciones ambientales de temperatura y humedad no influyen en este análisis
 NOTA 3: Muestras recibidas en el Laboratorio, CENTROCESAL Cía. Ltda. se responsabiliza únicamente de los análisis.
 NOTA 4: La declaración sobre la incertidumbre de medición, se puede solicitar al laboratorio y será información cuando el cliente lo requiera o cuando afecte a los límites de una especificación.
 NOTA 5: Las opiniones/interpretaciones/etc., que se puedan indicar, están FUERA del alcance de acreditación del SAE
 NOTA 6: El tiempo de permanencia de las muestras en el laboratorio, corresponde a perecibles: 48 horas y no perecibles: 30 días contados desde que se entrega el resultado.

Anexo 7. Secuencia de cálculos de grado de hidrólisis

1. Transformar el número de [*mg de NH₂ libres/ml de hidrolizado*], producto de la hidrólisis, a [*g de NH₂ libres/ml de hidrolizado*].

$$x \left[\frac{g \text{ NH}_2 \text{ libres}}{ml \text{ hidrolizado}} \right] = y \left[\frac{mg \text{ NH}_2 \text{ libres}}{ml \text{ hidrolizado}} \right] * 0.001 \left[\frac{g \text{ NH}_2}{mg \text{ NH}_2} \right]$$

2. A partir del valor calculado de [*g de NH₂ libres/ml de hidrolizado*], se calcula la concentración de grupos amino libres, con respecto a la cantidad de pluma seca:

$$C \left[\frac{g \text{ NH}_2 \text{ libres}}{g \text{ pluma seca}} \right] = x \left[\frac{g \text{ NH}_2 \text{ libres}}{ml \text{ hidrolizado}} \right] * \frac{V \text{ [ml solución para hidrólisis]}}{P \text{ [g plumas secas]}}$$

3. Se calcula la cantidad total de grupos amino que pueden liberarse en la proteína, para lo cual se parte del análisis de proteína realizado en la caracterización de la materia prima, mismo que corresponde a:

$$75,43\% \text{ p/p} \equiv 0,7543 \frac{g \text{ proteína}}{g \text{ pluma seca}}$$

tomando en cuenta que, de acuerdo al método de caracterización de la proteína, la cantidad de proteína corresponde a la cantidad de nitrógeno proteico por el factor de conversión de 6,25; entonces:

$$N \text{ proteico total} = \frac{0,7543 \frac{g \text{ proteína}}{g \text{ pluma seca}}}{6,25} = 0,120688 \frac{g \text{ N proteico total}}{g \text{ pluma seca}}$$

Asumiendo que el nitrógeno proteico proviene enteramente de los grupos amino de la proteína, existen 14 g N proteico en 16 g NH₂ ; por lo tanto en la pluma seca existe un total de:

$$0,120688 \frac{g \text{ N proteico total}}{g \text{ pluma seca}} \frac{16 g \text{ NH}_2}{14 g \text{ N proteico}} = 0,137929 \frac{g \text{ NH}_2 \text{ totales}}{g \text{ pluma seca}}$$

4. Se calcula el grado de hidrólisis, en porcentaje, dividiendo la concentración de grupo amino libres resultado de la hidrólisis, para la cantidad de amino libres totales:

$$^{\circ}H = \frac{C \left[\frac{g \text{ NH}_2 \text{ libres}}{g \text{ pluma seca}} \right]}{0,137929 \frac{g \text{ NH}_2 \text{ totales}}{g \text{ pluma seca}}} * 100$$

Anexo 8. Ejemplo de cálculo de grado de hidrólisis

1. Gasto de HCl: 590 μ l \rightarrow 0.59 ml

$$mg = 0.59 \text{ ml de HCl } 0.01N * \frac{0.16009 \text{ mg NH}_2 \text{ Libres}}{1 \text{ ml HCl } 0.01N} = 0.0945 \text{ mg NH}_2 \text{ libres}$$

$$g = 0.0945 \text{ mg NH}_2 \text{ libres} * 0.001 \frac{g \text{ NH}_2 \text{ libres}}{mg \text{ NH}_2 \text{ libres}} = 0.0000945 \text{ g NH}_2 \text{ libres}$$

$$C = \frac{0.0000945 \text{ g NH}_2 \text{ libres}}{\text{ml hidrolizado}} * \frac{500 \text{ ml solución}}{20 \text{ g plumas secas}} = 0.002362 \frac{g \text{ NH}_2 \text{ libres}}{g \text{ plumas secas}}$$

2. Cantidad total de grupo amino liberados: $0.137929 \frac{g \text{ NH}_2 \text{ totales}}{g \text{ pluma seca}}$

$$^{\circ}H = \frac{0.002362 \frac{g \text{ NH}_2 \text{ libres}}{g \text{ plumas secas}}}{0.137929 \frac{g \text{ NH}_2 \text{ libres}}{g \text{ plumas secas}}} * 100 = \mathbf{1.712}$$

Anexo 9. Método de cuarteo de la muestra**Anexo 10. Celdas de Conway sin titular.****Anexo 11. Celdas de Conway tituladas**

Anexo 12. Prueba de preparación de materia prima: Sulfuro de Sodio + Metabisulfito de Sodio



Anexo 13. Pruebas de hidrólisis enzimática



Anexo 14. Pruebas hidrolizadas



Anexo 15. Pruebas hidrolizadas, sedimentadas.



Anexo 16. Lavado de plumas



Anexo 17. Secado de plumas



Anexo 18. Plumas secas

