

ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AGROINDUSTRIA

EFFECTO DE UN PRETRATAMIENTO ALCALINO-TÉRMICO Y DE IRRADIACIÓN CON ELECTRONES ACELERADOS EN LA OBTENCIÓN ENZIMÁTICA DE QUERATINA HIDROLIZADA

PROYECTO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA AGROINDUSTRIAL

SAMANTHA RAFAELA CEVALLOS CORONEL

DIRECTOR: ING. MARCO SINCHE SERRA, M.Sc.

Quito, noviembre 2021

© Escuela Politécnica Nacional (2021)
Reservados todos los derechos de reproducción

DECLARACIÓN

Yo, Samantha Rafaela Cevallos Coronel, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

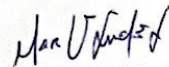
La Escuela Politécnica Nacional puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.



Samantha Rafaela Cevallos Coronel

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por Samantha Rafaela Cevallos Coronel, bajo mi supervisión.



M.Sc. Marco Vinicio Sinche Serra
DIRECTOR DE PROYECTO

Efecto de un Pretratamiento Alcalino-Térmico y de Irradiación con Electrones Acelerados en la Obtención Enzimática de Queratina Hidrolizada

Cevallos, Samantha¹

¹Escuela Politécnica Nacional, Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria, Quito, Ecuador

Resumen: El 90 % de las plumas corresponde a queratina, una proteína que, en forma hidrosoluble, tiene numerosas aplicaciones. En este trabajo, se estableció un proceso enzimático para obtener queratina hidrolizada a partir de plumas de pollo y se estudió el efecto de dos tipos de pretratamiento sobre la cantidad de proteína obtenida. Las plumas fueron lavadas, secadas, molidas e irradiadas con una dosis de 25 kGy. La harina resultante fue sumergida en una solución 0,5 M de NaOH y colocada en autoclave durante 2 min, a 95 °C. Después de centrifugar, se cuantificó la proteína en el sobrenadante por el método de Biuret y se empleó la fracción sólida para hidrólisis con alcalasa, tripsina o bromelina. Se seleccionó la enzima que permitió recuperar la mayor cantidad de proteína para la evaluación de los pretratamientos, la cual consistió en realizar la hidrólisis, a partir de harinas de plumas sin ningún pretratamiento (SIN), solo con irradiación (IR), solo con el pretratamiento alcalino-térmico (AT) y con ambos procesos (IRAT). Finalmente, se realizaron análisis Raman en las harinas de plumas irradiada y sin irradiar y en la muestra acuosa correspondiente al mejor tratamiento. Los mejores resultados se obtuvieron con alcalasa ($p \leq 0,05$) y los menores valores con bromelina. El rendimiento global del tratamiento IRAT seguido de la hidrólisis enzimática fue del 90,71 %. En los espectros Raman se observaron bandas correspondientes a grupos característicos de la estructura de la queratina, tanto en las harinas de plumas, como en la muestra acuosa.

Palabras clave: alcalasa, hidrólisis enzimática, plumas de pollo, radiación ionizante.

Effect of a Thermal Alkaline Pretreatment and Accelerated Electron Irradiation on the Enzymatic Obtaining of Hydrolyzed Keratin

Abstract: Around 90 % of feathers correspond to keratin, a protein that, in water-soluble form, has many applications. In this study, an enzymatic process was established to obtain hydrolyzed keratin from chicken feathers; also, the effect of two types of pretreatments on the amount of the recovered protein was studied. The feathers were washed, dried, ground, and irradiated with a dose of 25 kGy. The feather meal was immersed in a 0.5 M NaOH solution and autoclaved for 2 min, at 95 °C. After centrifuging, the protein in the supernatant was quantified through the Biuret method, and the solid fraction was used in the hydrolysis with alcalase, trypsin, or bromelain. The enzyme that allowed the recovery of the highest amount of protein was selected for the evaluation of the effect of the pretreatments, which consisted of the hydrolysis with the chosen enzyme from feather meal without any pretreatment (SIN), with irradiation only (IR), with the alkaline-thermal pretreatment only (AT), and with both processes (IRAT). Finally, Raman analyzes were done on the irradiated and non-irradiated feather meals, and on the aqueous sample corresponding to the best treatment. The highest amount of protein ($p \leq 0.05$) was achieved with alcalase, and the lowest values were obtained with bromelain. The global yield of the IRAT treatment followed by the enzymatic hydrolysis was 90.71 %. In the Raman spectra, bands corresponding to characteristic groups of the keratin structure were observed in both feather meals and in the soluble protein sample.

Keywords: alcalase, enzymatic hydrolysis, chicken feathers, ionizing radiation.

1. INTRODUCCIÓN

A escala mundial, millones de toneladas de plumas son generadas anualmente como subproducto del faenamiento en la industria avícola (Kumar y Shardendu, 2020). En Ecuador,

según los datos estadísticos de la CONAVE (Corporación Nacional de Avicultores del Ecuador), en el 2019 se comercializaron 281 millones de pollos (CONAVE, 2021).

Dado que las plumas representan un 5 % del peso total del pollo y que el peso promedio de un pollo listo para faenar es de 2 kg (Mokrejs, Svoboda, Hrnčirik, Janacova y Vasek, 2011), en el 2019 se habría producido un mínimo de 25 000 toneladas de plumas.

Las plumas resultantes del proceso de faenamiento representan una gran problemática ambiental puesto que, generalmente, suelen ser desechadas, incineradas (Nuutinen et al., 2019) o dispuestas en rellenos sanitarios. La incineración requiere un elevado gasto energético e involucra la liberación de grandes cantidades de dióxido de carbono (CO₂), que repercuten negativamente en el ambiente (Prasanthi, Bhargavi, Machiraju y Professor, 2007). La descomposición, por su parte, produce sustancias tóxicas como amoníaco (NH₃) y ácido sulfhídrico (H₂S) (Kumar y Shardendu, 2020).

Las plumas de pollo pueden ser una fuente de proteína de bajo costo debido a que, aproximadamente, el 90 % de su composición corresponde a queratina (Cheong, Lee, Ahmad, Ooi y Phang, 2018). La queratina es una proteína estructural compuesta por 19 aminoácidos, entre los que destacan la glicina, prolina, alanina, cisteína y, en mayor cantidad, la serina (Qiu, Wilkens, Barrett y Meyer, 2020). Esta proteína se encuentra conformada por cadenas polipeptídicas que pueden enrollarse en forma de hélices (conformación hélice α) o unirse una al lado de la otra en forma de láminas plegadas (conformación lámina β) (McKittrick et al., 2012).

En forma hidrosoluble, tiene distintas aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética, textil, biomédica y alimenticia (Nuutinen et al., 2019; Pourjavaheri et al., 2019). Como ejemplo, se puede mencionar el desarrollo de plásticos biodegradables, productos para tratamientos capilares, alimento para animales de granja, películas de uso médico, entre otros (Khumalo y Ramjugernath, 2019).

Las plumas pueden ser una fuente abundante y renovable de queratina para el Ecuador. La queratina hidrolizada se importa principalmente de Brasil, Colombia, México y Argentina (Suárez, 2017). En Colombia el valor comercial de queratina hidrolizada es de aproximadamente 28 USD/kg (LyF LTDA, 2021); mientras que en el Ecuador se oferta a 73 USD/kg (La Casa de los Químicos, 2021).

Los procesos de obtención de queratina hidrolizada a partir de plumas de pollo involucran varias etapas, lo cual se debe principalmente a que es una proteína fibrosa y resistente; por lo tanto, difícil de degradar (Mokrejs et al., 2011). Diferentes métodos de extracción han resultado efectivos en la obtención de queratina a partir de plumas; estos pueden ser categorizados como tratamientos físicos (térmicos, radiaciones de microondas), químicos (ácidos, básicos) o biotecnológicos (microbiológicos o enzimáticos) (Cheong et al., 2018).

Los procesos químicos que emplean agentes reductores son los más comunes, debido a su alta eficiencia. El uso de Na₂S logra un alto rendimiento en la obtención de queratina hidrolizada, sin embargo, en el proceso se genera (H₂S), un gas que en altas

concentraciones puede ser tóxico y difícil de manipular (Zhao, Biggs y Xian, 2014).

Por otra parte, el uso de soluciones alcalinas preparadas con NaOH o KOH junto con un incremento de temperatura, han sido utilizados para promover su solubilización (Al-Souti, Gallardo, Claereboudt y Gaafar, 2018; Lee, Phang, Ahmad y Ooi, 2016; Mokrejs et al., 2011). A su vez, Cheong et al. (2018) y Mokrejs et al. (2011) demostraron que un tratamiento alcalino-térmico en las plumas de pollo previo a una hidrólisis enzimática, resulta en la obtención de hidrolizados con una alta concentración de proteína.

En la etapa de extracción, se han implementado procesos enzimáticos que puedan reemplazar parcial o totalmente a los métodos químicos más comúnmente empleados en la industria (Khardenavis, Kapley y Purohit, 2009), para evitar la generación de subproductos tóxicos (Cheong et al., 2018; Machuca Loja, Madrid Celi, SanMartín Galvan y Perez Rodriguez, 2016; Pourjavaheri et al., 2019). El uso de proteasas ha resultado satisfactorio en la obtención de queratina hidrolizada, en especial si se combina con un pretratamiento de las plumas (Viloria Sierra, Azabache Zarta, Agudelo Valencia y Hernández Fernández, 2019).

Los procesos biotecnológicos permiten recuperar la queratina presente en las plumas de una manera más eco-amigable, puesto que se requieren condiciones moderadas de reacción y permiten alcanzar eficiencias de aproximadamente el 90 % (Mokrejs et al., 2011). Se emplean queratinasas, enzimas especializadas que catalizan la hidrólisis de la queratina, son producidas por bacterias, actinomicetos y hongos (Karthikeyan, Blaji y Sehgal, 2007) y pertenecen a la familia de las serino- y metalo-proteasas (Qiu et al., 2020).

La alcalasa y la tripsina tienen serina en el sitio activo (MEROPS, 2021) y presentan actividad proteolítica sobre la queratina (Riffel y Brandelli, 2006; Sangali y Brandelli, 2000). Estas enzimas también han sido utilizadas satisfactoriamente en la obtención de hidrolizados proteicos a partir de residuos agroindustriales de la palma (Chee, Ling y Ayob, 2012), el palmiste y el lactosuero (Delgado, 2019). Además, la alcalasa ha sido ampliamente usada en la extracción de proteína a partir de subproductos de la industria pesquera (Edison, Dewita, Karnila y Yoswaty, 2020; Muzaifa, Safriani y Zakaria, 2012; Vázquez et al., 2020); se han obtenido hidrolizados de proteína con rendimientos de hasta el 83 % (Muzaifa et al., 2012).

Por su parte, la bromelina ha sido empleada por años en el ablandamiento de carne (Yoshida-Yamamoto, Nishimura, Okuno, Rakuman y Takii, 2010) y la hidrólisis de colágeno y leche (Nanda, Bahar, Syukri, Thu y Kasim, 2020), lo que sugiere que también puede hidrolizar a la queratina.

Por otro lado, la irradiación es una tecnología que ha despertado el interés en distintos campos de la investigación, entre los que se encuentra la obtención de hidrolizados proteicos para la alimentación animal (Deocarís, De Vera, Ellana y Asaad, 2003). Uno de los efectos de la radiación sobre las proteínas es la ruptura de los enlaces peptídicos (Shawarang et al., 2006); por ello, puede emplearse como un

tratamiento previo a la hidrólisis enzimática, con el objetivo de incrementar la cantidad de proteína recuperada.

Por las razones expuestas, el presente trabajo de investigación tuvo como objetivo establecer un proceso enzimático con bromelina, tripsina o alcalasa para la obtención de queratina hidrolizada a partir de plumas de pollo, como una forma de valorizar este residuo catalogado muchas veces como desecho de las industrias avícolas. También se evaluó el efecto de un pretratamiento alcalino-térmico, un pretratamiento con radiaciones ionizantes y la combinación de ellos sobre la cantidad de queratina soluble obtenida.

2. METODOLOGÍA

2.1. Preparación de la materia prima

Las plumas fueron obtenidas de un plantel avícola ubicado en el norte de Quito, y llevadas al Laboratorio de Química Orgánica de la Escuela Politécnica Nacional. Allí, se lavaron, secaron, molieron e irradiaron conforme con la metodología propuesta por Castillo, Mendieta y Sinche (2016). El lavado se realizó 4 veces con agua a 30 °C y jabón líquido aniónico. Posteriormente, las plumas se secaron a temperatura ambiente por aproximadamente 48 h. Luego, fueron molidas con un molino de cuchillas y tamizadas con una malla de 2 mm. Por último, la harina de plumas obtenida de la molienda fue dividida en porciones de 25 g, las cuales fueron colocadas en bolsas plásticas de HDPE con cierre hermético, para su irradiación en el Acelerador de Electrones, con una dosis de 25 kGy.

2.2. Pretratamiento alcalino-térmico

Para el pretratamiento alcalino-térmico, se colocaron 6 g de harina de plumas irradiada y 300 mL de NaOH 0,5 M en un matraz, el cual se calentó en un autoclave ISOLAB 601.02.024, durante 2 min, a 95 °C. Al finalizar, la suspensión se centrifugó a $2\ 826 \times g$ por 15 min, en una centrífuga LABEC M-SCEN 206. En el sobrenadante se cuantificó la cantidad de proteína, mientras que, la fracción sólida se empleó para el proceso de hidrólisis enzimática, después de ser lavada con agua destilada para eliminar residuos alcalinos

2.3. Obtención enzimática de queratina hidrolizada

2.3.1. Determinación de la actividad enzimática

Se determinó la actividad enzimática de la bromelina (SUMMER, 2 400 GDU/g), la alcalasa (Merck, 0,75 UA/mL) y la tripsina (GIBCO, 348-404 mU/mL) mediante el método de Anson modificado (Anson, 1938; Unapanta, 2018), en el cual se empleó caseína como sustrato.

Se utilizó tampón fosfato de sodio 50 mM a pH 7,6 para preparar las soluciones de caseína, bromelina (20,5 kDa), alcalasa (27,0 kDa) y tripsina (23,3 kDa), en concentraciones de 10,0; 5,0; 7,0 y 6,0 mg/mL, respectivamente. Se empleó TCA en agua destilada al 5 % (p/v) para detener la reacción enzimática.

En tubos de ensayo, se agregaron 100 uL de la solución enzimática correspondiente y 1 100 uL de caseína, los cuales se incubaron a 37 °C por 20 min. Una vez transcurrido este tiempo, se añadieron 1 800 uL de TCA al 5 %. Los blancos se prepararon con la adición consecutiva de 100 uL de la solución enzimática, 1 800 uL de TCA 5 % y 1 100 uL de caseína; se dejaron incubar bajo las mismas condiciones.

Los blancos y las muestras fueron centrifugados a $2\ 100 \times g$ por 15 min. Por último, se midió la absorbancia a 280 nm en el espectrofotómetro UV-VIS HITACHI U-1900 y se determinó la actividad enzimática mediante la Ecuación (1) (Félix, Sinche, Muñoz y Castillo, 2010). El ensayo se realizó por triplicado para cada enzima.

$$AE = \frac{DO_{280}}{(0,1)^2} \quad (1)$$

Donde, AE representa la actividad enzimática, en unidades enzimáticas por mL de solución de enzima (U/mL) y DO_{280} corresponde a la densidad óptica de la muestra medida a 280 nm.

2.3.2. Selección de la mejor enzima

Los ensayos de hidrólisis enzimática fueron llevados a cabo con 1 g de la fracción sólida resultante de la centrifugación tras el pretratamiento alcalino-térmico de la harina de plumas irradiada. Esta se resuspendió en 10 mL de tampón fosfato y se realizó la hidrólisis según las condiciones óptimas de temperatura y pH para cada enzima, que son: 40 °C y 7,0; 50 °C y 8,0; 37 °C y 7,8 para la bromelina, la alcalasa y la tripsina, respectivamente (Chelulei Cheison, Brand, Leeb y Kulozik, 2011; Edison et al., 2020; Molina y Wagner, 2002; Muzaifa et al., 2012).

Se agregó cada solución enzimática, en una proporción del 2,6 % (v/v) de la mezcla de reacción y, después de 4 h en las que se mantuvo en agitación a 300 rpm, se inactivó térmicamente a las enzimas a 92 °C, durante 10 min (Ávila, 2011). La mezcla final se enfrió y centrifugó por 10 min a $2\ 826 \times g$. Finalmente, se determinó la cantidad de proteína en el sobrenadante, con el método espectrofotométrico de Biuret (Fernández y Galván, 2004). Se realizaron tres réplicas, cada una con su duplicado.

Se seleccionó la enzima que permitió obtener la mayor concentración de proteína soluble, para lo cual se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de rangos múltiples por el método de Fisher o LSD, con un nivel de confianza del 95 %, en el programa Statgraphics Centurion 18.

2.3.3. Determinación de los efectos del pretratamiento alcalino-térmico y la irradiación

Para determinar los efectos del pretratamiento alcalino-térmico y de la irradiación sobre la cantidad de queratina soluble recuperada, se realizó una hidrólisis enzimática bajo las condiciones óptimas de temperatura y pH de la enzima seleccionada en el punto anterior, a partir de 0,2 g de harina de plumas sin ningún pretratamiento (SIN), solo con irradiación

(IR), solo con el pretratamiento alcalino-térmico (AT) y con ambos procesos (IRAT).

Para los tratamientos IRAT y AT, se aplicó el pretratamiento alcalino-térmico a 3 g de harina de plumas irradiada y sin irradiar, respectivamente. Después de centrifugar, en el sobrenadante se cuantificó la cantidad de proteína por el método de Biuret, y la fracción sólida se lavó y secó en una campana de secado durante 24 h. Se pesaron 0,2 g de la fracción sólida seca para la posterior hidrólisis enzimática.

Las harinas de plumas de los tratamientos SIN e IR y las fracciones sólidas secas de los tratamientos IRAT y AT se resuspendieron en 10 mL de tampón fosfato con pH ajustado al valor óptimo de la enzima seleccionada. Posteriormente, se añadió la solución de la enzima en una proporción del 2,6 % (v/v) de la mezcla, y se dejó reaccionar por 4 h, con agitación de 300 rpm. Una vez transcurrido este tiempo, se procedió a inactivar térmicamente la enzima y se centrifugaron las muestras por 15 min a $2\ 826 \times g$. La cantidad de queratina soluble se cuantificó por el método de Biuret.

El diseño experimental correspondió a un diseño multifactorial categórico con dos factores: la irradiación con 25 kGy (con o sin) y el pretratamiento alcalino-térmico (con o sin). Se realizaron 4 réplicas para cada tratamiento.

Los resultados fueron analizados en el programa Statgraphics Centurion 18, a través de un ANOVA y una prueba de rangos múltiples por el método de Fisher o LSD, con un nivel de confianza del 95 %.

2.3.4 Determinación del efecto del secado en la hidrólisis enzimática

A partir de la fracción sólida seca obtenida de los tratamientos IRAT y AT en la sección 2.3.3, se calculó el porcentaje promedio de humedad de las muestras, por gravimetría. Posteriormente, se realizó una hidrólisis enzimática con alcalasa (7,0 mg/mL) a partir de 1 g de la fracción sólida húmeda, obtenida del pretratamiento alcalino-térmico de los tratamientos IRAT y AT, bajo las mismas condiciones de hidrólisis previamente mencionadas. La cantidad de proteína soluble se cuantificó por el método de Biuret.

Por último, se estimó el rendimiento del proceso a partir de la cantidad inicial de muestra en base seca y se comparó con el rendimiento de la hidrólisis enzimática que se realizó en la sección anterior a partir de 0,2 g de la fracción sólida seca de los tratamientos IRAT y AT.

2.4. Análisis Raman

Los espectros Raman en la harina de plumas irradiada, sin irradiar y en la muestra acuosa del mejor tratamiento después de la hidrólisis con alcalasa, se realizaron con la ayuda de un espectrómetro Raman portátil (Rigaku Analytical Devices, Wilmington, USA) equipado con un láser Nd:YAG 1064-nm. El tiempo total de exposición del espectro Raman fue 3 y 7 s; con un enfoque de 1,5 y 0,5 y una potencia del láser de 280 y

290 kW, para las harinas de plumas y la muestra acuosa, respectivamente. Se realizaron 5 mediciones por muestra. El promedio de los espectros Raman de cada muestra se utilizó para su comparación con espectros Raman de queratina, los cuales se obtuvieron de bibliografía.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Selección de la mejor enzima

Se verificó que la bromelina (20,5 kDa), alcalasa (27,0 kDa) y tripsina (23,3 kDa) en concentraciones de 5,0; 7,0 y 6,0 mg/mL, equivalentes a 243; 259 y 257 $\mu\text{mol/L}$, presentaron actividad proteolítica frente a la caseína. En la Tabla 1 se muestra la actividad determinada para cada una mediante el método de Anson modificado.

Este ensayo permitió verificar que las enzimas seleccionadas para el estudio sí presentaban actividad proteolítica. La bromelina presentó la más baja actividad sobre caseína, mientras que la tripsina mostró el nivel de actividad más alto con dicho sustrato.

En la siguiente etapa, se encontró que el tipo de enzima sí tuvo un efecto significativo ($p \leq 0,05$) sobre la cantidad de queratina soluble obtenida a partir de la harina de plumas que había sido irradiada con una dosis de 25 kGy, con electrones acelerados, y sometida al pretratamiento alcalino-térmico.

En la Figura 1 se presenta el gráfico de medias de la cantidad de proteína soluble recuperada durante la hidrólisis, con cada una de las enzimas. Con la bromelina se obtuvieron $0,0146 \pm 0,0011$ g de queratina; con la alcalasa, $0,0275 \pm 0,0003$ g y con la tripsina, $0,0233 \pm 0,0051$ g.

Se observa que la alcalasa permitió conseguir los mejores resultados, seguida de la tripsina, mientras que, con la bromelina se obtuvo el menor valor. Entre otras razones, esto puede deberse a que las dos primeras son serino-proteasas, al igual que las queratinasas; es decir, tienen en el sitio catalítico un residuo de serina. En cambio, la bromelina contiene uno de cisteína en su centro activo (MEROPS, 2021).

Sangali y Brandelli (2000) determinaron que la tripsina y la alcalasa presentan actividad queratinolítica frente a la azoqueratina. Además, sugirieron que las serino- y cisteíno-proteasas podrían estar involucradas en la degradación de la queratina, lo cual explicaría que la bromelina también tuvo actividad proteolítica sobre la queratina, aunque en un menor valor. No obstante, Yamamura, Morita, Hasan, Yokoyama y Tamiya (2002) y Nanda et al. (2020) mencionaron que las enzimas digestivas como la tripsina y proteasas comunes como la bromelina no son tan efectivas en la degradación de esta proteína, como lo son las queratinasas.

Tabla 1. Actividad caseinolítica de la bromelina, tripsina y alcalasa

Enzima	Concentración ($\mu\text{mol/mL}$)	AE (U/mL)
Bromelina	243	$18,84 \pm 1,21$
Alcalasa	259	$36,95 \pm 2,09$
Tripsina	257	$54,50 \pm 0,32$

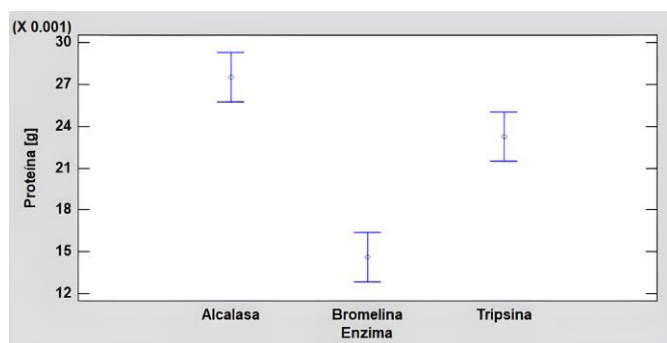


Figura 1. Gráfico de medias de la proteína soluble obtenida con cada enzima (LSD, 95 % de confianza)

Yoshida-Yamamoto et al. (2010) investigaron el potencial de la bromelina en la degradación de queratina y concluyeron que esta presentó baja actividad hidrolítica sobre esta proteína, comparable con la que se obtuvo en el presente trabajo.

Varios estudios, en los que se investigó la hidrólisis enzimática de residuos avícolas con diferentes enzimas, comprobaron que la alcalasa resulta más efectiva y apropiada para la obtención de hidrolizados proteicos (Nchienzia, Morawicki y Gadang, 2010; Rossi, Flôres, Heck, Antônio y Ayub, 2009). Esto ha sido atribuido a que la alcalasa, que es producida por la bacteria *Bacillus licheniformis* es una serino endopeptidasa y pertenece a la familia S8, al igual que algunas queratinasas (Kothari, Rani y Goyal, 2017).

Doucet, Otter, Gauthier y Foegeding (2003) también establecieron que se consigue un mayor grado de hidrólisis con la alcalasa, en comparación con otras enzimas como la quimotripsina o la pepsina. Argumentan que, al ser un coctel formado por varias proteasas, es capaz de reconocer más aminoácidos e hidrolizar sus enlaces peptídicos, de acuerdo con la especificidad de cada enzima que la compone. Esto no sucede con la tripsina y la bromelina, pues estas corresponden a enzimas aisladas y purificadas.

En el estudio realizado por Guo et al. (2020), se determinó que la alcalasa tuvo un rendimiento notablemente mejor que la papaína, la neutrasa y la pepsina en la hidrólisis de plumas de pollo pretratadas con el proceso de explosión instantánea con vapor de alta densidad o HDSF por sus siglas en inglés (*high-density steam flash-explosion*). Además, se encontró que la alcalasa posee una alta especificidad para cortar en aminoácidos hidrofóbicos (metionina, valina, leucina y alanina) e hidrofílicos (histidina y glicina), de los cuales, la valina, prolina, leucina, alanina, glicina y serina se encuentran entre los más abundantes en la queratina (Qiu et al., 2020).

Por su parte, la tripsina es más afín a reconocer e hidrolizar aminoácidos básicos como la lisina y arginina (Ma, Tang y Lai, 2005), los cuales se presentan en menor cantidad en la queratina (Qiu et al., 2020). Esto también explica que con la tripsina se recuperó una menor cantidad de proteína hidrolizada que con la alcalasa (Figura 1).

Por lo anterior, se escogió a la alcalasa, en concentración de 7,0 mg/mL para evaluar el efecto de la irradiación y del

pretratamiento alcalino-térmico sobre la obtención de queratina hidrolizada a partir de harina de plumas de pollo.

3.2. Determinación del efecto del pretratamiento e irradiación

En la Tabla 2 se muestra la cantidad total de proteína soluble recuperada después de aplicar el pretratamiento alcalino-térmico a 3 g de harina de plumas irradiada y sin irradiar, seguido de la hidrólisis enzimática de la fracción sólida seca obtenida del pretratamiento.

Si se considera que el 90 % de la harina de plumas corresponde a queratina (Sinkiewicz, Staroszczyk y Kołodziejaska, 2016), el tratamiento IRAT, en el cual se sometió la harina de plumas a irradiación, al pretratamiento alcalino-térmico y a la posterior hidrólisis con alcalasa, permitió recuperar un 90,71 % de la proteína, en forma soluble.

En la Tabla 3 se presenta la cantidad de proteína soluble recuperada solamente en el proceso de hidrólisis con alcalasa, a partir de 0,2 g de harina de plumas sin ningún pretratamiento (SIN), solo irradiada (IR), solo con el pretratamiento alcalino-térmico (AT) y con ambos pretratamientos (IRAT). Se usaron las condiciones óptimas de temperatura y pH de la enzima.

Se observa que la cantidad de proteína soluble recuperada fue mayor al partir de harina de plumas irradiada, frente a harina sin irradiar; sin embargo, los mejores resultados correspondieron a los tratamientos en los que se sometió la harina de plumas al pretratamiento alcalino-térmico, sin importar si esta fue irradiada o no.

En el tratamiento en el que únicamente se realizó la hidrólisis enzimática, se obtuvo la menor cantidad de proteína, con un rendimiento de 5,16 %. Este resultado indica que las plumas de pollo son difícilmente degradadas sólo por acción enzimática, como lo mencionan Cheong et al. (2018), en cuya investigación se degradó tan solo un 21 % de las plumas de pollo. No obstante, al aplicar un pretratamiento térmico o de radiación microondas, en condiciones alcalinas, el porcentaje de degradación incrementó a 80 y 88 %, respectivamente. Se concluyó que las enzimas por sí solas tienen un bajo rendimiento de degradación, por lo cual un pretratamiento térmico, alcalino o con microondas, pueden preceder a la hidrólisis enzimática para lograr mejores resultados.

Tabla 2. Proteína soluble total recuperada con el pretratamiento alcalino-térmico seguido de la hidrólisis enzimática

Tratamiento	Proteína (g)	Rendimiento (%)
IRAT	2,4491 ± 0,0600 a	90,71 ± 2,22 a
AT	2,3579 ± 0,0568 a	87,33 ± 2,10 a

Letras iguales en la misma columna indican ausencia de diferencias significativas (LSD, 95 %)

Tabla 3. Proteína soluble recuperada de la hidrólisis con alcalasa de harina de plumas con distintos pretratamientos

Tratamiento	Proteína (g)	Rendimiento (%)
IRAT	0,0214 ± 0,0010 a	11,88 ± 0,56 a
AT	0,0201 ± 0,0015 a	11,16 ± 0,86 a
IR	0,0122 ± 0,0010 b	6,77 ± 0,53 b
SIN	0,0093 ± 0,0020 c	5,16 ± 0,88 c

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas (LSD, 95 %)

Por su parte, Lee et al. (2016) señalaron que el NaOH y un incremento de la temperatura tienen un papel importante en la ruptura de los puentes disulfuro de la queratina y su posterior solubilización. Por lo tanto, al aplicar este pretratamiento alcalino-térmico se justifica que se haya obtenido una mayor cantidad de proteína soluble a partir de la harina de plumas pretratada (IRAT y AT) en comparación con la harina de plumas sin ningún pretratamiento (SIN).

El bajo rendimiento de la hidrólisis enzimática de la harina de plumas sin un pretratamiento puede deberse a la presencia de fuertes puentes disulfuro en la queratina, los cuales dificultan la unión con el sitio activo de la enzima (Mokrejs et al., 2011). Además, la elevada reticulación y entrecruzamiento de la estructura de la queratina, la vuelve altamente resistente y poco susceptible a la acción enzimática (Sinkiewicz et al., 2016).

La exposición de la harina de plumas a radiación ionizante, a condiciones alcalinas y a temperaturas y presiones relativamente altas mejoró el rendimiento de proteína soluble obtenido en una consecutiva hidrólisis enzimática.

Al ser una base fuerte, el NaOH puede desnaturalizar la queratina (Lee et al. 2016) y, consecuentemente, facilitar el proceso de unión enzima-sustrato en más sitios de dicha proteína, lo cual pudo resultar en una mayor cantidad de proteína soluble recuperada por la hidrólisis con alcalasa, en los tratamientos IRAT y AT.

Cheong et al. (2018) y Łaba y Szczekała (2013) probaron que la adición de NaOH, seguida de un tratamiento térmico en autoclave mejoró la degradación de las plumas de pollo y resultó en una mayor recuperación de proteína cuando se aplicó una posterior hidrólisis enzimática con la enzima savinasa o la bacteria *Bacillus cereus*, respectivamente. De igual forma, Al-Souti et al. (2018) demostraron que, al someter las plumas de pollo a una solución de NaOH en autoclave por 30 min a 121 °C, se logró recuperar una mayor cantidad de proteína e incrementar su digestibilidad *in vitro* por la pepsina, en comparación con plumas sin ningún pretratamiento.

El pretratamiento alcalino-térmico, al igual que la irradiación, presentaron un efecto significativo ($p \leq 0,05$) sobre la obtención de proteína mediante la hidrólisis enzimática, mientras que su interacción no fue significativa. En la Figura 2 se observa que se obtuvo una mayor cantidad de proteína a partir de la harina de plumas irradiada (IR), en comparación con la harina de plumas sin irradiar (SIN), cuando no se aplicó el pretratamiento alcalino-térmico. No obstante, este incremento se vio opacado cuando se aplicó el pretratamiento alcalino-térmico, ya que los tratamientos IRAT y AT no muestran diferencia significativa entre sí.

La irradiación de la harina de plumas (IR) con electrones acelerados incrementó la recuperación de queratina soluble en un 31,18 % con respecto a la harina de plumas sin irradiar (SIN). Sin embargo, este efecto no fue significativo cuando la hidrólisis enzimática se realizó a partir de harina de plumas de pollo que fue previamente sometida al pretratamiento alcalino-térmico (IRAT y AT).

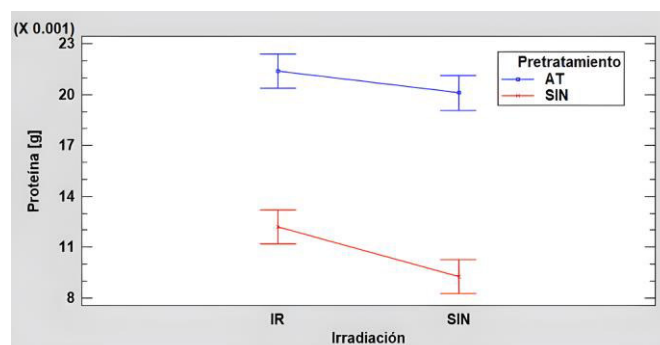


Figura 2. Gráfico de interacción entre el pretratamiento alcalino-térmico y la irradiación, con respecto a la proteína soluble recuperada

Estos resultados indican que la combinación de ambos pretratamientos (irradiación y pretratamiento alcalino-térmico) no presenta una diferencia estadísticamente significativa sobre la cantidad de proteína soluble recuperada en una subsiguiente hidrólisis enzimática.

El incremento de la cantidad de proteína recuperada con el tratamiento IR con respecto al tratamiento SIN, estaría relacionado con que la irradiación podría inducir el desplegamiento de la proteína, lo cual resulta en una mayor exposición de aminoácidos, especialmente hidrofóbicos, que están involucrados con el sitio activo de la alcalasa (Hassan, Mahmoud, Elmamoun, Adiamo y Mohamed Ahmed, 2018; Qiu et al., 2020). Además, podría causar la ruptura de los puentes disulfuro, lo cual resulta en una pérdida conformacional de la estructura y en una mayor exposición de los sitios donde ocurre la proteólisis (Koppelman et al., 2005). En consecuencia, la enzima puede actuar con mayor facilidad y permitir una mayor recuperación de queratina soluble.

Bajo las mejores condiciones estudiadas, Castillo et al. (2019) recuperaron el 92,80 % de queratina a partir de harina de plumas de pollo irradiada; sin embargo, emplearon Na₂S como agente reductor, el cual, como ya se indicó, genera gas sulfhídrico durante el proceso. El proceso que se propone en este trabajo podría ser una buena alternativa, pues se recuperó un 90,71 % de la proteína presente en las plumas.

3.3 Efecto del secado previo a la hidrólisis enzimática

En la Tabla 4 se presenta el porcentaje de humedad promedio de la fracción sólida obtenida después de la aplicación del pretratamiento alcalino-térmico.

En la Tabla 5 se muestra el rendimiento de la hidrólisis con alcalasa a partir de la fracción sólida húmeda y seca de los tratamientos IRAT y AT.

Se observa que el rendimiento fue mayor cuando la hidrólisis enzimática se realizó a partir de las muestras que no se sometieron a un proceso de secado.

Tabla 4. Porcentaje de humedad de la fracción sólida de los tratamientos IRAT y AT

Tratamiento	Humedad (%)
IRAT	88,23 ± 0,48
AT	86,74 ± 3,14

Tabla 5. Rendimiento de la hidrólisis enzimática a partir de la fracción húmeda y seca de los tratamientos IRAT y AT

Tratamiento	Rendimiento fracción sólida húmeda (%)	Rendimiento fracción sólida seca (%)
IRAT	22,27 ± 2,24 a	11,88 ± 0,56 c
AT	19,56 ± 2,29 b	11,16 ± 0,86 c

Letras iguales en la misma columna indican ausencia de diferencias significativas (LSD, 95 %)

Butré, Wierenga y Gruppen (2014) estudiaron la influencia de la disponibilidad de agua en la hidrólisis enzimática de las proteínas y mencionan que el proceso de hidrólisis enzimática llevado a cabo en muestras con un contenido limitado de agua ocasiona bajas tasas de hidrólisis. Esto podría explicar por qué se obtuvieron menores rendimientos a partir de la fracción sólida seca en comparación con la fracción húmeda, la cual contenía una humedad inicial de 88,23 y 86,74 % para las muestras IRAT y AT, respectivamente. Además, sugieren que la reducción en la actividad de agua resulta en una disminución de la actividad enzimática.

Por otro lado, en la Tabla 5, se señala que existe una diferencia significativa entre los tratamientos IRAT y AT cuando la hidrólisis se realizó a partir de la fracción sólida húmeda. Estos resultados corroboran el efecto de la irradiación que, como previamente se mencionó, mejora la hidrólisis de la queratina, lo cual resulta en una mayor cantidad de proteína soluble. Sin embargo, este efecto no se reflejó en la hidrólisis enzimática a partir de la fracción sólida seca.

3.4 Espectroscopia Raman

En las Figuras 3 y 4 se muestran los espectros Raman de las harinas de plumas sin irradiar e irradiada, mientras que en la Figura 5 se observa el espectro Raman de la muestra de queratina soluble obtenida con el tratamiento IRAT, después de realizar la hidrólisis enzimática con alcalasa.

Las bandas en 852 y 1 174 cm^{-1} estarían relacionadas con el aminoácido tirosina (Wang, Li, Ma, Jian y Che, 2016); mientras que, la región comprendida entre 900 y 1 680 cm^{-1} se debe a la presencia de amidas primarias I, secundarias II y terciarias III (Martínez-Hernández, Velasco-Santos, M. de Icaza y Castaño, 2005).

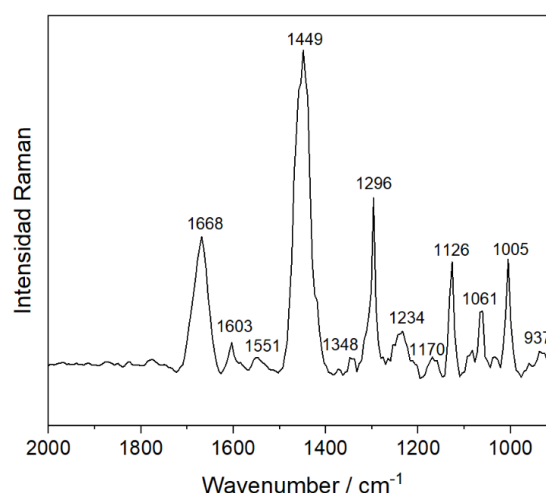
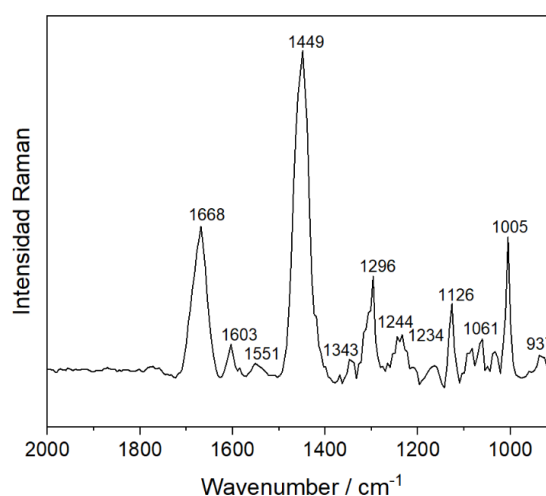
Las bandas más altas en las harinas de plumas sin irradiar e irradiada aparecen en 1 668, 1 449, 1 296, 1 126 y 1 005 cm^{-1} . La banda fuertemente pronunciada, ubicada en 1 449 cm^{-1} puede ser atribuida a los grupos CH_2/CH_3 , mientras que, la banda en 1 126 cm^{-1} puede asignarse a los enlaces C-C del esqueleto de la queratina (Martínez-Hernández et al., 2005) o a un estiramiento del enlace C-N, propio de una amida primaria (Hans-Ulrich y Bing, 2001; Kuzuhara, 2005).

Por otro lado, la banda en 1 668 cm^{-1} podría estar relacionada a la vibración del enlace C=O de una amida primaria I, encontrado en las láminas β (Martínez-Hernández et al., 2005). La banda en 1 296 cm^{-1} podría asignarse a la amida terciaria III de la estructura hélice α (Panaylotou, 2018). Por último, la banda en 1 005 cm^{-1} puede conferirse a un estiramiento simétrico del anillo del aminoácido fenilalanina (Kuzuhara, 2005; Wang et al., 2016).

Con respecto al espectro Raman de la queratina soluble, la banda pronunciada en 994 cm^{-1} puede otorgarse a un estiramiento del enlace C-C, el cual podría corresponder a una conformación estructural hélice α de la proteína (Wang et al., 2016). La banda localizada entre 1 641 y 1 659 cm^{-1} puede asignarse al enlace C=O de una amida primaria I, el cual también demostraría una conformación estructural hélice α (Martínez-Hernández et al., 2005).

La presencia de señales atribuibles a la queratina en la solución confirma que es posible la obtención de queratina hidrolizada a partir de un proceso que incluya irradiación, un pretratamiento alcalino-térmico y una posterior hidrólisis enzimática.

Las variaciones en la intensidad de las bandas se podrían deber a incrementos o disminuciones en el número de los grupos funcionales correspondientes, debidos al procesamiento de la harina de plumas para obtener la queratina soluble. Por otro lado, los cambios en la posición de las bandas podrían estar asociados con modificaciones del tamaño de los péptidos que conforman la queratina; estas se deberían principalmente a la hidrólisis de los enlaces peptídicos.

**Figura 3.** Espectro Raman de harina de plumas de pollo sin irradiar**Figura 4.** Espectro Raman de harina de plumas de pollo irradiada

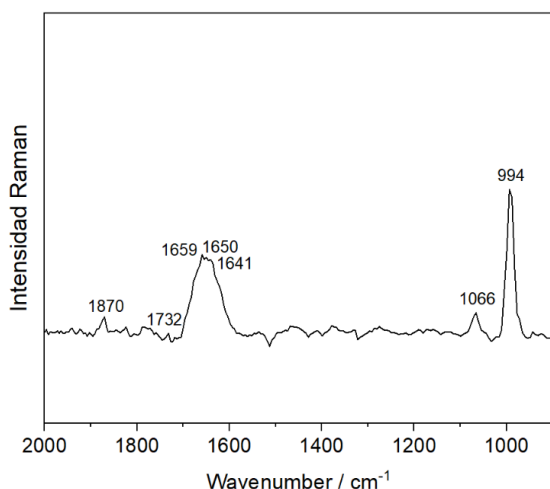


Figura 5. Espectro Raman de queratina soluble obtenida del tratamiento IRAT con una consecutiva hidrólisis con alcalasa

4. CONCLUSIONES

La alcalasa permitió recuperar una mayor cantidad de proteína soluble a partir de la harina de plumas irradiada sometida al pretratamiento térmico-alcalino, en comparación con la bromelina y la tripsina.

Se pudo recuperar un 90,71 % de queratina soluble en el tratamiento IRAT a partir de 3 g de harina de plumas de pollo irradiada y sometida al pretratamiento alcalino térmico, seguido de una hidrólisis con alcalasa.

El pretratamiento de la harina de plumas irradiada y sin irradiar (IRAT, AT) con una solución 0,5 M de NaOH y calentamiento en autoclave, durante 2 min, a 95 °C, incrementó la recuperación de queratina en un 75,41% y en un 116,13% en la hidrólisis enzimática con alcalasa, con relación a los tratamientos que no lo tuvieron (IR y SIN), respectivamente.

El tratamiento de la harina de plumas con electrones acelerados (IR) mejoró el rendimiento del proceso en un 31,18 % frente al control (harina de plumas sin ningún pretratamiento, SIN), pero este incremento se vio opacado cuando las plumas fueron sometidas al proceso alcalino-térmico y a posterior secado.

La irradiación no presentó efecto significativo sobre la hidrólisis enzimática a partir de harina de plumas que fue previamente sometida al pretratamiento alcalino-térmico y a un proceso de secado. No obstante, sí presentó un efecto significativo en la hidrólisis enzimática a partir de harina de plumas sometida a un pretratamiento alcalino-térmico sin un posterior secado.

El secado de la fracción sólida resultó en una menor obtención de proteína soluble, con un rendimiento de 11,88 % y 11,16 % para los tratamientos IRAT y AT; mientras que, a partir de la fracción sólida húmeda este fue de 22,27 % y 19,56 % para los tratamientos IRAT y AT, respectivamente.

El espectro Raman permitió confirmar la presencia de grupos característicos de la queratina, tanto en la harina de plumas

irradiada y sin irradiar, como en la queratina soluble obtenida con el mejor pretratamiento (IRAT), seguido de la hidrólisis con alcalasa.

Con el espectro Raman se ratificó que es viable obtener queratina hidrolizada a través de un proceso enzimático que se combine con irradiación y un pretratamiento alcalino-térmico. Sin embargo, para obtener resultados más concluyentes es necesario que trabajos futuros se enfoquen en la determinación de las propiedades y características de la queratina hidrolizada.

REFERENCIAS

- Al-Souti, A., Gallardo, W. G., Claereboudt, M., y Gaafar, O. (2018). Effects of autoclaving, addition of sodium hydroxide and their combination on protein content and in vitro digestibility of chicken feathers. *International Journal of Poultry Science*, 17(8), 356–361. <https://doi.org/10.3923/IJPS.2018.356.361>
- Anson, M. (1938). The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J Gen. Physiol*, 22(1), 79–89.
- Ávila, C. (2011). *Determinación de las propiedades físico-químicas y funcionales del aislado e hidrolizado enzimático de la proteína de soya a escala piloto, para la aplicación en alimentos* (Proyecto de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.
- Butré, C. I., Wierenga, P. A., y Gruppen, H. (2014). Influence of water availability on the enzymatic hydrolysis of proteins. *Process Biochemistry*, 49(11), 1903–1912.
- Castillo, J., Mendieta, G. y Sinche, M. (2019). *Obtención de queratina hidrolizada a partir de plumas irradiadas con un haz de electrones acelerados*. No. PI-2019-011. Ecuador: Servicio Nacional de Derechos Intelectuales.
- Chee, K. L., Ling, H. K., y Ayob, M. K. (2012). Optimization of trypsin-assisted extraction, physico-chemical characterization, nutritional qualities and functionalities of palm kernel cake protein. *LWT - Food Science and Technology*, 46(2), 419–427. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.12.006>
- Chelulei Cheison, S., Brand, J., Leeb, E., y Kulozik, U. (2011). Analysis of the effect of temperature changes combined with different alkaline pH on the β -lactoglobulin trypsin hydrolysis pattern using MALDI-TOF-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(5), 1572–1581. <https://doi.org/10.1021/jf1039876>
- Cheong, C. W., Lee, Y. S., Ahmad, S. A., Ooi, P. T., y Phang, L. Y. (2018). Chicken feather valorization by thermal alkaline pretreatment followed by enzymatic hydrolysis for protein-rich hydrolysate production. *Waste Management*, 79, 658–666. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.08.029>
- CONAVE. (2021). Corporación nacional de avicultores del Ecuador. Recuperado de: <https://www.conave.org/informacion-sector-avicola-publico/> (Mayo, 2021)
- Delgado, A. (2019). *Estudio de la efectividad y estabilidad de un cebo para el control de mosca de la fruta, elaborado a partir de proteína hidrolizada de torta de palmiste o suero de leche* (Proyecto de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial no publicado). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.
- Deocarís, C., De Vera, A., Ellana, M. y Asaad, C. (2003). In vitro gas production tests on irradiated-chicken feathers to estimate its nutritive value as feed for ruminants. *Philippine journal of science*, 132(2), 83–87.
- Doucet, D., Otter, D. E., Gauthier, S. F., y Foegeding, E. A. (2003). Enzyme-Induced Gelation of Extensively Hydrolyzed Whey Proteins by Alcalase: Peptide Identification and Determination of Enzyme Specificity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(21), 6300–6308. <https://doi.org/10.1021/jf026242v>

- Edison, E., Dewita, D., Karnila, R., y Yoswaty, D. (2020). The Hydrolysis of Fish Protein from Giant Mudskipper (*Periophthalmodon Schlosseri*) using Alcalase Enzyme. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, 8(3), 1056–1063. <https://doi.org/10.12944/crnfsj.8.3.32>
- Félix, R., Sinche, M., Muñoz, R., y Castillo, P. (2010). Aislamiento, purificación y caracterización parciales de las proteasas obtenidas de hierba mora (*Solanum nigrum*) e higuierón (*Ficus apollinaris*). *Revista Politécnica*, 31(1), 75–83.
- Fernández, E., y Galván, A. (2006). *Métodos para la cuantificación de proteínas*. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Rabanales. Córdoba, España Recuperado de: <https://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica> (Octubre, 2021)
- Guo, L., Lu, L., Yin, M., Yang, R., Zhang, Z., y Zhao, W. (2020). Valorization of refractory keratinous waste using a new and sustainable bio-catalysis. *Chemical Engineering Journal*, 397, 125420. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2020.125420>
- Hans-Ulrich, G., y Bing, Y. (2001). *Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials*, New York, USA: Marcel Dekker, Inc.
- Hassan, A. B., Mahmoud, N. S., Elmagoun, K., Adiamo, O. Q., y Mohamed Ahmed, I. A. (2018). Effects of gamma irradiation on the protein characteristics and functional properties of sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds. *Radiation Physics and Chemistry*, 144, 85–91. <https://doi.org/10.1016/J.RADPHYSICHEM.2017.11.020>
- Karthikeyan, R., Blaji, S. y Sehgal P. (2007). Industrial applications of keratins-A review. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 66, 710- 715.
- Khardenavis, A. A., Kapley, A., y Purohit, H. J. (2009). Processing of poultry feathers by alkaline keratin hydrolyzing enzyme from *Serratia* sp. HPC 1383. *Waste Management*, 29(4), 1409–1415. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2008.10.009>
- Khumalo M, y Ramjugernath D. (2019). Possible Beneficiation of Waste Chicken Feathers Via Conversion into Biomedical Applications. *International Journal of Chemical Sciences Review*], 17(1), 1–20. <https://doi.org/10.21767/0972-768X.1000298>
- Koppelman, S. J., Nieuwenhuizen, W. F., Gaspari, M., Knippels, L. M. J., Penninks, A. Ä. H., Knol, E. F., Hefle, S. L., y De Jongh, H. H. J. (2005). Reversible Denaturation of Brazil Nut 2S Albumin (Ber e1) and Implication of Structural Destabilization on Digestion by Pepsin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(1), 123-131. <https://doi.org/10.1021/jf0491355>
- Kothari, D., Rani, A., y Goyal, A. (2017). Keratinases. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, 447–469. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63662-1.00019-1>
- Kumar, N., y Shardendu. (2020). Extraction of keratin protein from white chicken feathers and their nutritional application in social welfare. *International Journal of Scientific Research*, 9(1), 72–74.
- Kuzuhara, A. (2005). Analysis of structural change in keratin fibers resulting from chemical treatments using Raman spectroscopy. *Biopolymers*, 77(6), 335–344. <https://doi.org/10.1002/BIP.20221>
- Łaba, W., y Szczekała, K. (2013). Keratinolytic Proteases in Biodegradation of Pretreated Feathers. *Polish Journal of Environmental Studies*, 22(4), 1101–1109.
- La casa de los químicos. (2021). La casa de los químicos. Recuperado de: <http://lacasadelosquimicos.com.ec/> (Mayo, 2021)
- Lee, Y. S., Phang, L.-Y., Ahmad, A., y Ooi, T. (2016). Microwave-Alkali Treatment of Chicken Feathers for Protein Hydrolysate Production. *Waste and Biomass Valorization*, 7(5), 1147–1157. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9483-7>
- LyF Ltda. (2021). LyF Ltda. Recuperado de: <http://lyfltda.amawebs.com/> (Mayo, 2021)
- Ma, W., Tang, C., y Lai, L. (2005). Specificity of Trypsin and Chymotrypsin: Loop-Motion-Controlled Dynamic Correlation as a Determinant. *Biophysical Journal*, 89(2), 1183–1193. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.057158>
- Machuca Loja, G., Madrid Celi, B. A., SanMartin Galvan, D., y Perez Rodriguez, J. (2016). Queratina a partir de la hidrólisis enzimática de harina de plumas de pollo, utilizando queratinasas producidas por *Bacillus subtilis* /Getting keratin from feather meal using keratinases produced by *Bacillus subtilis*. *Ciencia Unemi*, 9(20), 50. <https://doi.org/10.29076/issn.2528-7737vol9iss20.2016pp50-58p>
- McKittrick, J., Chen, P.-Y., Bodde, S. G., Yang, W., Novitskaya, E. E., y Meyers, M. A. (2012). *The Structure, Functions, and Mechanical Properties of Keratin*. *JOM*, 64(4), 449–468. doi:10.1007/s11837-012-0302-8
- Martínez-Hernández, A. L., Velasco-Santos, C., De Icaza, M., y Castaño, V. M. (2005). Microstructural characterisation of keratin fibres from chicken feathers. *International Journal of Environment and Pollution*, 23(2), 162–178. <https://doi.org/10.1504/IJEP.2005.006858>
- MEROPS, 2021. The peptidase database. Recuperado de: <https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/namesearch.pl> (Junio, 2021)
- Mokrejs, P., Svoboda, P., Hrnčirik, J., Janacova, D., y Vasek, V. (2011). Processing poultry feathers into keratin hydrolysate through alkaline-enzymatic hydrolysis. *Waste Management and Research*, 29(3), 260–267. <https://doi.org/10.1177/0734242X10370378>
- Molina, S. y Wagner, J. (2002). Hydrolysates of native modified soy protein isolates: structural characteristics, solubility and foaming properties. *Food Research International*, 35(6), 511-518. doi: [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00149-1](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00149-1)
- Muzaifa, M., Safriani, N., y Zakaria, F. (2012). Production of protein hydrolysates from fish by-product prepared by enzymatic hydrolysis. *International Journal of the Bioflux Society*, 5, 36–39.
- Nanda, R. F., Bahar, R., Syukri, D., Thu, N. N. A., y Kasim, A. (2020). A review: Application of Bromelain Enzymes in Animal Food Products. *Andalasian International Journal of Agricultural and Natural Sciences (AIJANS)*, 1(01), 33–44. <https://doi.org/10.25077/aijans.v1i01.33-44.2020>
- Nchienzia, H. A., Morawicki, R. O., y Gadang, V. P. (2010). Enzymatic hydrolysis of poultry meal with endo-and exopeptidases. *Poultry Science*, 89, 2273–2280. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00558>
- Nuutinen, E. M., Willberg-Keyriläinen, P., Virtanen, T., Mija, A., Kuutti, L., Lantto, R., y Jääskeläinen, A. S. (2019). Green process to regenerate keratin from feathers with an aqueous deep eutectic solvent. *RSC Advances*, 9(34), 19720–19728. <https://doi.org/10.1039/c9ra03305j>
- Panaylotou, H. (2018). *Vibrational Spectroscopy of Keratin Fibres - A Forensic Approach* (Doctor of Philosophy Thesis Examination). Queensland University of Technology, Brisbane, Australia.
- Pourjavaheri, F., Ostovar Pour, S., Jones, O. A. H., Smooker, P. M., Brkljača, R., Sherkat, F., Blanch, E. W., Gupta, A., y Shanks, R. A. (2019). Extraction of keratin from waste chicken feathers using sodium sulfide and L-cysteine. *Process Biochemistry*, 82, 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.04.010>
- Prasanthi, N., Bhargavi, S., Machiraju, P. V. S., y Professor, A. (2007). Chicken Feather Waste-A Threat to the Environment. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 3297(9). <https://doi.org/10.15680/IJRSET.2016.0509188>
- Qiu, J., Wilkens, C., Barrett, K., y Meyer, A. S. (2020). Microbial enzymes catalyzing keratin degradation: Classification, structure, function. *Biotechnology Advances*, 44, 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107607>
- Riffel, A., y Brandelli, A. (2006). Keratinolytic bacteria isolated from feather waste. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(3), 395–399. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000300036>
- Rossi, D. M., Flôres, S. H., Heck, X., Antônio, M., y Ayub, Z. (2009).

Production of High-protein Hydrolysate from Poultry Industry Residue and their Molecular Profiles. *Food Biotechnology*, 23(3), 229–242. <https://doi.org/10.1080/08905430903102828>

Sangali, S., y Brandelli, A. (2000). Isolation and characterization of a novel feather-degrading bacterial strain. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, 87(1), 17–24. <https://doi.org/10.1385/ABAB:87:1:17>

Shawarang, P., Nikkhah, A., Zare, A., Sadeghi, A., Raisali, G. y Moradi, M. (2006). Effects of gamma irradiation on protein degradation of soybean meal in the rumen. *Animal feed science and technology*, 134, 140-151. doi: 10.1016/j.anifeeds.2006.05.019

Sinkiewicz, I., Staroszczyk, H., y Kołodziejska, I. (2016). Alternative Methods of Preparation of Soluble Keratin from Chicken Feathers. *Waste and Biomass Valorization*, 8(4), 1043–1048. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9678-y>

Suárez, O. (2017). *Obtención de queratina a partir de cabello humano para la formulación de un producto cosmético* (Proyecto de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero Químico). Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.

Unapanta, A. (2018). *Diseño de un Sistema de Purificación de Inhibidores de Carboxipeptidasa A, provenientes de Semillas de Leguminosas y Cereales seleccionadas, que emplee Cromatografía de Afinidad*. (Proyecto de titulación previo a la obtención del título del Ingeniero Agroindustrial no publicado). Escuela Politécnica Nacional. Quito, Ecuador.

Vázquez, J. A., Rodríguez-Amado, I., Sotelo, C. G., Sanz, N., Pérez-Martín, R. I., y Valcárcel, J. (2020). Production, characterization, and bioactivity of fish protein hydrolysates from aquaculture turbot (*Scophthalmus maximus*) wastes. *Biomolecules*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/biom10020310>

Viloria Sierra, L., Azabache Zarta, M. P., Agudelo Valencia, R. N., y Hernández Fernández, J. A. (2019). Evaluación de la Hidrólisis enzimática de plumas de pollo para la obtención de Queratina. *Revista Politécnica*, 15(30), 17–24. <https://doi.org/10.33571/rpolitec.v15n30a2>

Wang, K., Li, R., Ma, J. H., Jian, Y. K., y Che, J. N. (2016). Extracting keratin from wool by using L-cysteine. *Green Chemistry*, 18(2), 476–481. <https://doi.org/10.1039/C5GC01254F>

Yamamura, S., Morita, Y., Hasan, Q., Yokoyama, K., y Tamiya, E. (2002). Keratin degradation: a cooperative action of two enzymes from *Stenotrophomonas* sp. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294, 1138–1143.

Yoshida-Yamamoto, S., Nishimura, S., Okuno, T., Rakuman, M., y Takii, Y. (2010). Efficient DNA Extraction from Nail Clippings Using the Protease Solution from Cucumis melo. *Molecular Biotechnology*, 46(1), 41–48. <https://doi.org/10.1007/s12033-010-9273-6>

Zhao, Y., Biggs, T. D., y Xian, M. (2014). Hydrogen sulfide (H₂S) releasing agents: Chemistry and biological applications. *Chemical Communications*, 50(80), 11788–11805. <https://doi.org/10.1039/c4cc00968a>