

Evaluación de las condiciones del proceso de extracción de queratina mediante hidrólisis alcalina con hidróxido de sodio

Orjuela-Palacio, Juliana M.¹, Zaritzky Noemí E.^{1,2}

¹Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos- CIDCA (CONICET, Facultad de Ciencias Exactas UNLP, CIC-PBA, Argentina), La Plata- Buenos Aires, CP: 1900, Argentina. ²Depto. de Ingeniería Química- Facultad de Ingeniería (Universidad Nacional de La Plata, Argentina), Calle 1 y 47 La Plata Buenos Aires, CP: 1900, Argentina. julianaorjuela11@gmail.com

Palabras Claves: plumas de pollo, queratina, hidróxido de sodio, proteína soluble

1. Introducción

La queratina es una proteína de alto valor presente en las plumas, que constituyen un residuo de la industria avícola de difícil disposición. La misma es altamente insoluble en solventes polares, debido en gran parte al alto contenido de los grupos cistina, los cuales mantienen las cadenas polipeptídicas en una estructura tridimensional (Shavandi y col., 2017), dificultando la utilización de la proteína en diferentes procesos. Para lograr la solubilización es necesario la modificación de la estructura rompiendo las uniones intramoleculares como los puentes disulfuro y enlaces de menor energía como los puentes de hidrógeno, sin afectar los enlaces peptídicos. Existen diversos métodos de obtención y extracción de las queratinas a partir de las diferentes biomásas. La extracción implica al menos la escisión de los enlaces disulfuro (S-S), rompiendo las microfibrillas para proporcionar las moléculas de queratina separadas (Schrooyen y col., 2007). La reducción de los puentes disulfuro puede hacerse de diversas formas, dependiendo del agente reductor empleado, algunos de los agentes reductores convencionales más aplicados han sido el 2-mercaptoetanol (2-MEC), Ditiotreitól (DTT), altamente contaminantes y agresivos para el operador. El hidróxido de sodio (NaOH) es un reactivo alternativo menos tóxico y económico, su empleo en conjunto con moderadas a altas temperaturas para tratar biomásas ricas en queratina, provoca la hidrólisis de las moléculas de cistina dando lugar a aminoácidos libres modificados solubles en agua (Nagai y col., 1970) (Figura 1).

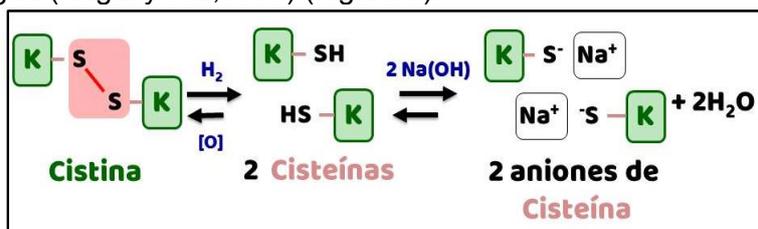


Figura. 1. Hidrólisis de la molécula de cistina en medio alcalino con NaOH.

El hidróxido de sodio puede ser considerado como un potente agente solubilizante de las plumas de pollo, sin embargo, los procesos suelen usar altas concentraciones y requieren una posterior etapa de neutralización; por otra parte la queratina puede ser degradada en condiciones alcalinas (pH>9), altas concentraciones y elevadas temperaturas, produciendo la hidrólisis irreversible de dichas moléculas (Shavandi y col., 2017).

El objetivo del presente trabajo fue aplicar y comparar diferentes condiciones del proceso de solubilización de plumas (temperatura, tiempo, concentración de los agentes reductores/oxidantes, entre otros) utilizando hidróxido de sodio (NaOH), un reactivo, menos tóxico para el manipulador, que los tradicionalmente empleados en los procesos de reducción de queratina.

2. Materiales y métodos

Se utilizaron plumas de pollos parrilleros líneas COBB y ROSS producidos por reproductoras pesadas, las cuales fueron provistas por Domvil SA - Frigorífico Aveguay de Entre Ríos, Argentina.

2.1 Adecuación de las plumas de pollo

Las plumas de pollo se lavaron con agua corriente y detergente común con agitación constante, retirando el material extraño (piedras, restos de tejidos, picos, fibras, etc.); se retiró el exceso de detergente y se continuó con una inmersión de las plumas en una mezcla de agua destilada-etanol 96 % (50:50). Las plumas lavadas se filtraron retirando la mayor cantidad de agua posible y se secaron en estufa por 24 h a 30 °C. Las plumas secas se molieron en un molino tipo ciclón y se desengrasaron con éter de petróleo (10 mL / g de pluma seca) por 4 h con agitación constante. Se filtró y removió el exceso de solvente y las plumas se secaron a 30°C por 24 h.

El contenido de humedad de las plumas molidas y desengrasadas se determinó de acuerdo al método de la AOAC (2010) y el contenido de proteína total mediante el método de Kjeldahl AOAC (2010), usando un factor de conversión de 5.71 (Grazziotin y col., 2006; Sinkiewicz y col., 2017).

2.2 Solubilización de plumas de pollo mediante hidrólisis alcalina

La solubilización de plumas de pollo se realizó mediante la hidrólisis alcalina con hidróxido de sodio. Se disolvieron 5 g de plumas de pollo previamente acondicionadas en 100 mL de solución de NaOH con diferentes concentraciones (0,5, 1, 2, 3, 4 y 5 % m/v) y pH entre 11 y 12. La solubilización se llevó a cabo aplicando diferentes condiciones temperatura/tiempo: a) 60 °C y 1 h; b) 40 °C y 2 h; c) 30 °C y 6 h; d) 20 °C y 24 h. Las dispersiones obtenidas en cada caso se filtraron con lienzo con el fin de retirar los residuos de pluma sin disolver. Las plumas no disueltas se secaron a 105 ± 0,1 °C en una estufa con circulación forzada de aire (Sanjor serie SL DB; Buenos Aires, Argentina).

2.3 Obtención de queratina en polvo

El pH de las dispersiones de queratina obtenidas se ajustó a 4,2 usando ácido clorhídrico (HCl; 2 N) con el fin de precipitarla; dicho pH correspondiente al punto isoeléctrico de la proteína, (Schrooyen y col., 2007; Wrzesniewska-Tosik, 2007). Las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 10 °C a 3000 rpm durante 10 minutos usando una centrífuga Rolco CM 2036 (Buenos Aires, Argentina). El sobrenadante se retiró y los pellets obtenidos se lavaron con agua destilada y se almacenaron a – 40 °C hasta el secado por liofilización en un equipo HETO Modelo FD 4. La queratina liofilizada se almacenó a 20 °C en un desecador hermético hasta su caracterización.

2.4 Caracterización de hidrolizados de queratina

2.4.1 Rendimiento de extracción

Se determinó el rendimiento de solubilización de las plumas de pollo para las diferentes condiciones de proceso evaluadas. El porcentaje de pluma solubilizada (Sol_{pluma} , % p/p) se calculó a través de la ecuación 1.

$$Sol_{pluma} (\%) = ((P_p - P_s) / P_p) * 100 \quad \text{Ec. 1}$$

Donde P_s el peso del residuo seco y P_p el peso de las plumas acondicionadas.

2.4.2 Medición del pH

El pH de las dispersiones de queratina se midió con un pHmetro S-610L pH meter (PEAK INSTRUMENTS INC, USA) a 25°C. Las mediciones se hicieron por duplicado.

2.4.3 Determinación de proteína soluble

Se determinó la concentración de proteína soluble mediante el ensayo espectrofotométrico de Biuret (cita). Para la reacción con los derivados de queratina, se centrifugaron 1 mL de muestra durante 10 min a 13000 rpm y 25 °C en una microcentrifuga (5415D Benchtop, Eppendorf). Se tomó 0,3 mL del sobrenadante y se traspasó a un tubo de ensayo al cual se adicionó 0,2 mL de agua destilada y 2 mL del Reactivo de Biuret (NaOH [10 % p/v]). La reacción se incubó a 25 °C durante 30 minutos. La absorbancia se leyó en un espectrofotómetro UV mini-1240 UV-Vis (HACH DR-2800) a una longitud de onda $\lambda = 550$ nm.

2.4.4 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) con Reflectancia total atenuada (ATR)

Los espectros infrarrojos de transformada de Fourier (FTIR) con reflectancia total atenuada (ATR) de los derivados liofilizados de queratina y de las plumas de pollo, se obtuvieron con un espectrómetro Nicolet IS10 (Thermo- Scientific) (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA) con accesorio de ATR (diamante). Se trabajó en un rango de números de onda desde 4000 a 400 cm^{-1} . Para cada muestra se colectaron 60 barridos con una resolución de 4 cm^{-1} que fueron acumulados. Los datos obtenidos se procesaron utilizando el software OMNIC TM de Thermo ScientificTM.

2.5 Análisis estadístico

Se realizó el correspondiente análisis estadístico de varianza mediante ANOVAS con el software Infostat v. 2013 (Grupo InfoStat, FCA, Argentina), las diferencias se compararon mediante el test de Tukey usando un nivel de significancia $\alpha = 0.05$.

3. Resultados y discusión

Las plumas de pollo empleadas en el presente trabajo presentaron un contenido de humedad de $3,46 \pm 0,12$ % p/p (base húmeda) y un contenido de proteína total de $89,09 \pm 0,4$ %.

La queratina presente en las plumas de pollo presenta un alto contenido de enlaces disulfuro y de aminoácidos hidrófobos, siendo insoluble en agua. Mediante el proceso de solubilización por hidrólisis alcalina con NaOH, se logró disolver las plumas de pollo y obtener dispersiones de queratina (Figura 2).

La aplicación de hidrólisis química ya sea ácida o básica, conlleva a la destrucción de la estructura nativa de la queratina y las plumas se vuelven más solubles en agua. La hidrólisis ácida es más eficiente, pero causa pérdida de algunos aminoácidos como el triptófano (Zhang y col., 2013), mientras que la hidrólisis alcalina es más lenta y suele ser incompleta, proporcionando una menor pérdida de aminoácidos.

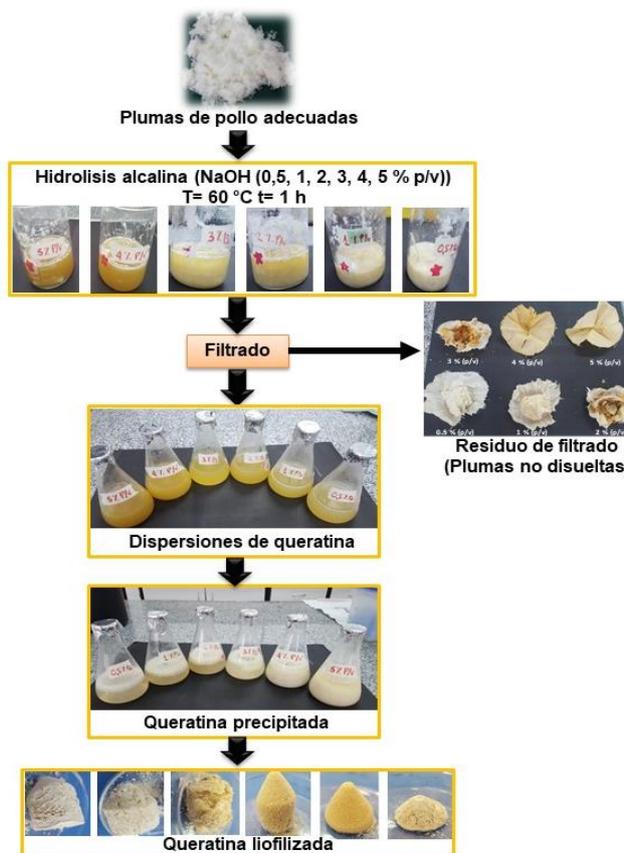
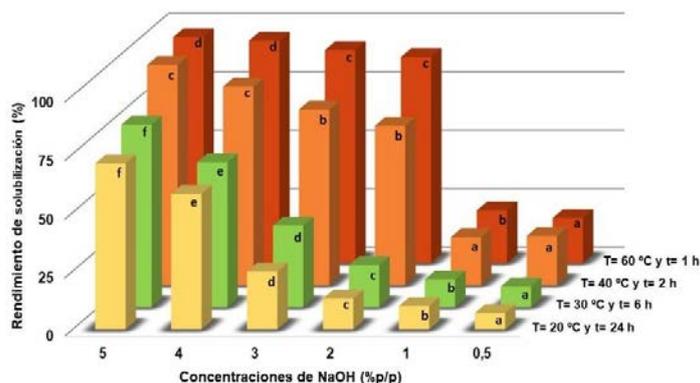


Figura 2. Esquema del proceso de obtención de queratina mediante hidrólisis alcalina.

3.1 Rendimiento del proceso de extracción de queratina

Se analizó el rendimiento de solubilización de las plumas de pollo mediante hidrólisis con NaOH y las diferentes condiciones de proceso aplicadas. Los valores más altos de % Sol_{pluma} se obtuvieron cuando se aplicó mayor temperatura y menor tiempo de reacción (a) 60 °C y 1 h y (b) 40 °C y 2 h). En el caso (a) con concentraciones de NaOH de 4-5 %p/p el rendimiento fue de 95-96 % ($p>0,05$), para NaOH 2-3 %p/p fue de 88 y 91 % Sol_{pluma} respectivamente ($p>0,05$) y se observó un descenso significativo ($p<0,05$) del 68 % en el rendimiento del proceso cuando se emplean concentraciones inferiores al 2 % NaOH.



Para cada tratamiento, las columnas con letras (a,b,c,d) distintas difieren significativamente según la prueba de Tuckey ($p<0,05$).

Figura 3. Rendimiento de solubilización de plumas de pollo mediante hidrólisis alcalina. a) 60 °C y 1 h; b) 40 °C y 2 h; c) 30 °C y 6 h; d) 20 °C y 24 h

Una tendencia similar se presentó en los otros casos, indicando que el efecto de la concentración del reactivo fue preponderante sobre la modificación de temperatura y tiempo de reacción aplicadas (Figura 3). Estos resultados concuerdan con los reportados por Sinkiewicz y col., (2017), quienes indicaron un descenso del rendimiento de 93 a 29 % con la disminución de la concentración de NaOH (2,5-1,0 % p/p) a 70°C y 75 min. La disminución de la temperatura del proceso y el correspondiente aumento en el tiempo de reacción condujo al descenso en los rendimientos de solubilización, siendo significativo ($p<0,05$) cuando el proceso de extracción se lleva a cabo a (c) 30 °C y 6 h o d) 20 °C y 24 h. Schrooyen y col., (2000), reportaron para la solubilización de plumas con 2-MEC valores de solubilización de 75 %; Sinkiewicz y col., (2017) reportaron un rendimiento del 83 % para extracciones de queratina de plumas de pollo usando 2-MEC, 82,4 % con bisulfito de sodio y 77,6 % con DTT cuando se aplican condiciones de proceso de 50°C y 2 h.

Por otra parte, se analizó la variación del contenido de proteína soluble en las dispersiones de queratina obtenidas (figura 3).

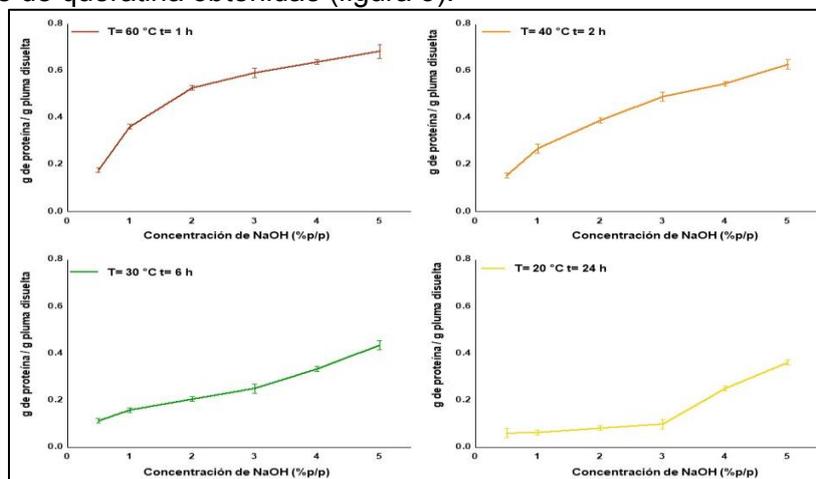


Figura 4. Proteína soluble de las dispersiones de queratina obtenidas mediante hidrólisis alcalina con diferentes relaciones de temperatura y tiempo de reacción.

El incremento en el contenido de proteína soluble presente en las dispersiones de queratina como ya se mencionó está directamente vinculado con el aumento de la concentración del NaOH (Figura 4); asimismo, dichos valores fueron significativamente ($p < 0,05$) mayores para procesos que aplican temperaturas más altas y tiempos menores de reacción. Estos resultados se corresponden con el rendimiento de solubilización (Figura 3), pero además indican que las condiciones aplicadas no generan la formación de agregados proteicos. El uso de NaOH es una alternativa al proceso de obtención de queratina soluble, siendo un reactivo más económico y un proceso más amigable con el ambiente ya que posteriormente se neutraliza con ácido clorhídrico en la etapa de precipitación, alcanzándose un rendimiento del 96 % y 0,68 g de queratina/g de pluma en 1 h de proceso cuando se aplica la 60 °C y 5-4 % NaOH %p/p. También se destaca que en este procedimiento no se incluye ninguna etapa de diálisis

3.4 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

Con el fin de analizar la estructura química de las plumas de pollo y de la queratina en polvo obtenida mediante hidrólisis alcalina con NaOH, se utilizó la metodología de análisis por FTIR-ATR. En la figura 5 A se presenta el espectro FTIR-ATR de las plumas de pollo adecuadas y en la Fig 5B los de queratina liofilizada obtenida mediante hidrólisis alcalina.

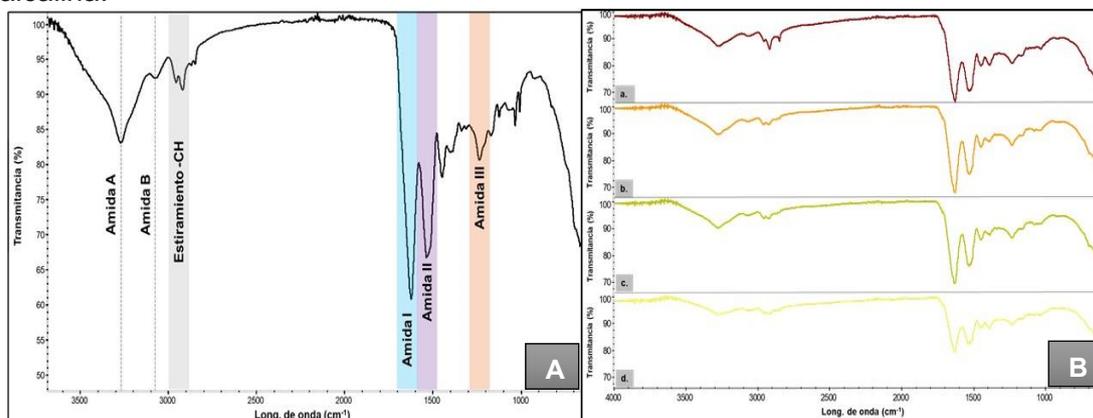


Figura 5. Espectros FTIR-ATR **A.** de plumas de pollo adecuadas. **B.** de queratina liofilizada obtenida mediante hidrólisis alcalina: **a)** NaOH (5 % p/v) a 60 °C, 1 h; **b)** NaOH (5 % p/v) a 40 °C, 3 h; **c)** NaOH (5 % p/v) a 30 °C, 6 h, **d)** NaOH (5 % p/v) a 20 °C, 24 h.

En la figura 5A se observa la banda Amida A (3312 cm^{-1}) que ha sido asociada con las regiones ordenadas en la estructura alfa hélice de la proteína y corresponde al modo de vibración simétrico $\nu(\text{NH})$ (Tefsaye y col., 2017). El pico presente en las longitudes onda $3080\text{-}3075 \text{ cm}^{-1}$ correspondiente a la banda de Amida B (Martínez-Hernández y col., 2005). En el rango $3100\text{-}2700 \text{ cm}^{-1}$ ha sido asociado a los aminoácidos iónicos dipolares $\text{RCH}(\text{NH}_3^+)\text{COO}^-$ (Tefsaye y col., 2017), el catión NH_3^+ corresponde a varias bandas para dicho rango con modos vibracionales de estiramiento simétricos ($\nu(\text{NH})$) y asimétricos ($\nu_a(\text{NH})$) (Martínez-Hernández y Velasco-Santos, 2005). El hombro observado a 2960 cm^{-1} corresponde a la vibración asimétrica ($\nu_a(\text{CH}_3)$) (Tefsaye y col., 2017). En la región $1700 \text{ a } 400 \text{ cm}^{-1}$ se encontraron las bandas correspondientes a los enlaces peptídicos identificados como las Amidias I, II y III, en las longitudes de onda de 1632 , 1530 y 1239 cm^{-1} respectivamente (Figura 5A). Estas bandas proporcionan información importante sobre la conformación de la estructura de la queratina presente en las plumas de pollo. La Amida I ($1600 \text{ a } 1690 \text{ cm}^{-1}$) es una combinación de las estructuras α -hélice y hoja β -plana y está relacionada con las vibraciones de $\nu(\text{C}=\text{O})$. La Amida II ($1580\text{-}1480 \text{ cm}^{-1}$) está relacionada con la flexión del $\delta(\text{N-H})$ y el estiramiento del enlace $\nu(\text{C-H})$ (Martínez-Hernández y Velasco-Santos, 2005; Sharma y col., 2017). La Amida III (1300 y 1220 cm^{-1}) se deriva del estiramiento simétrico $\nu(\text{C-N})$ y la flexión de $\delta(\text{CH})$, la región entre $1230\text{-}1240 \text{ cm}^{-1}$ puede ser asignada a la estructura de hoja β -plana de la Amida III (Martínez-Hernández y Velasco-Santos 2005). En la figura 5B, se

presentan los espectros FTIR-ATR de la queratina liofilizada obtenida mediante hidrólisis alcalina en los casos: **a)** NaOH (5 % p/v) a 60 °C, 1 h; **b)** NaOH (5 % p/v) a 40 °C, 3 h; **c)** NaOH (5 % p/v) a 30 °C, 6 h y **d)** NaOH (5 % p/v) a 20 °C, 24 h. En dichos espectros, se observa la presencia de la banda Amida A en la longitud de onda 3275 cm^{-1} , la Amida B a 3073 cm^{-1} , así como las señales correspondientes al estiramiento del grupo $-\text{CH}$ (2960 – 2920 cm^{-1}). La Amida I se observó a 1638 cm^{-1} , la Amida II se presentó a 1533-1535 cm^{-1} y la Amida III se presentó a 1236 cm^{-1} . En los espectros **5B(a-d)** se evidencia la presencia de las bandas representativas correspondientes a la queratina presente en las plumas de pollo, confirmando que para las condiciones de proceso evaluadas se obtienen derivados de queratina que conservan la estructura de la proteína.

5. Conclusiones

Se evaluaron diferentes condiciones del proceso de obtención de queratina a partir de las plumas de pollo mediante la hidrólisis con NaOH, identificando que el rendimiento del proceso dependerá de las condiciones como la concentración de los reactivos, la temperatura y el tiempo de reacción. Los porcentajes más altos de rendimiento se lograron cuando se aplicaron altas concentraciones del reactivo en conjunto con las mayores temperaturas y menores tiempos de reacción (3 a 5 % NaOH, 60 °C y 1 h); obteniendo a la vez dispersiones con altos contenidos de queratina soluble. El análisis FTIR-ATR de la queratina obtenida, confirmó la presencia de los señales características de la proteína en su forma nativa (pluma) como la Amida A, I, II, III asociados a la fracción de α -hélice y hoja β -plana, indicando que en las condiciones aplicadas se logró extraer queratina sin degradarla totalmente.

Esta metodología que puede reemplazar los agentes reductores tradicionales por uno menos contaminante y más económico, es una alternativa viable para la obtención de queratina a nivel industrial.

Referencias

- AOAC. In Helrich, K. (ed.) Official methods of analysis. Virginia: Association of Official Analytical Chemists (2010)
- Grazziotin, A., Pimentel, F.A., De Jong, E.V., Brandelli, A. (2006). Nutritional improvement of feather protein by treatment with microbial keratinase. *Anim. Feed Sci. Technol.* 126(1), 135–144
- Martínez-Hernández, A.L.; Velsco-Santos de Icaza, M. y Castaño, V.M. (2005). Microstructural characterisation of keratin fibres from chicken feathers. *International Journal of Environment and Pollution*, 23 (2), 162-177.
- Nagai, Y., & Nishikawa, T. (1970). Alkali Solubilization of Chicken Feather Keratin. *Agricultural and Biological Chemistry*, 34(1), 16–22
- Schrooyen, P. M. M., Dijkstra, P. J., Oberthür, R. G., Bantjes, A., & Feijen, J. (2000). Partially carboxymethylated feather keratins. 1. Properties in aqueous systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 4326–4334. <https://doi.org/10.1021/jf9913155>
- Schrooyen, P.M. y Oberthür, R. (2007). Keratin-based products and methods for their productions. Netherlands, Stichting Nederlands Instituut voor Zuivelonderzoek. Patent No.: US 7169896 B2.
- Schrooyen, P.M., Dijkstra, P, Oberthür, R Bantjes, A y Feijen, J. (2001). Partially carboxymethylated feather keratins. 2. Thermal and mechanical properties of the films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49, 221-230
- Sharma, S., y Gupta, A. (2016). Sustainable Management of Keratin Waste Biomass: Applications and Future Perspectives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 59, 1–14.
- Shavandi, A., Silva, T. H., Bekhit, A. A., y Bekhit, A. E.-D. A. (2017). Keratin: dissolution, extraction and biomedical application. *Biomaterials Science*, 5(9), 1699–1735.
- Sinkiewicz, I., Śliwińska, A., Staroszczyk, H., & Kołodziejka, I. (2016). Alternative Methods of Preparation of Soluble Keratin from Chicken Feathers. *Waste and Biomass Valorization*, 8(4), 1043–1048.
- Wrzesniwska-Tosik, K. y Adamiek, J. (2007). Biocomposites with a content of keratin from chicken feathers. *Fibers and textiles in Eastern Europe*. Vol 15 N° 1(60) 106.
- Zhang, J., Li, Y., Li, J., Zhao, Z., Liu, X., Li, Z., Han, Y., Hu, J., Chen, A. (2013). Isolation and characterization of biofunctional keratin particles extracted from wool wastes. *Powder Technol.* 246, 356–362 (2013)