



Estudio del proceso de extracción de queratina mediante hidrólisis enzimática en tres tipos de aves (Plumas), Pollo Campero, Pollo Cobb y Pollo Ross a partir de distintas concentraciones de queratinasas producidas por *Bacillus* sp., para la elaboración de bioplástico.

Autoras: Hermoza Aguilar, Diana Estefania
Macias Zambrano, Diana Katherine

Tutor: Ing. Juan Alejandro Neira Mosquera, PhD.

Santo Domingo, Ecuador
2023



INTRODUCCIÓN



- Desechos avícolas
- 90 % de materia prima proteica



Queratina

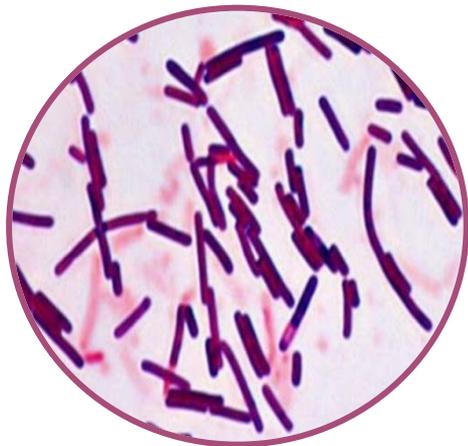
- Hidrofílica
- Biodegradable
- Diversas Aplicaciones



- Alternativa sustentable
- Sustituto de plásticos de fuente fósil
- Minimizar contaminación ambiental.

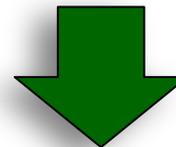


INTRODUCCIÓN



- Proteasas queratolíticas
- Desechos agroindustriales
- Bioconversión de materiales ricos en queratina
- Bacterias y *Bacillus* spp. principales productores de queratinasa

Queratinasas



- Aplicaciones potenciales en varios sectores
- Degrada la queratina para el reciclaje sostenible de proteínas y aminoácidos



OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar el proceso de extracción de queratina mediante hidrólisis enzimática en tres tipos de aves (Plumas), Pollo Campero, Pollo Cobb y Pollo Ross a partir de distintas concentraciones de queratinasas producidas por *Bacillus sp.*, para la elaboración de bioplástico.

Objetivos Específicos

Evaluar las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas de las queratinas considerando tres tipos de aves (Plumas), Pollo Campero, Pollo Cobb y Pollo Ross.

Analizar la incidencia de distintas concentraciones de queratinas producidas por *Bacillus sp.*, para la elaboración de bioplástico.

Establecer el efecto de dos tipos de espesantes (Glicerina y urea), para la elaboración de bioplástico a partir de queratinas obtenidas de tres tipos de aves (Plumas), Pollo Campero, Pollo Cobb y Pollo Ross.

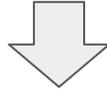
Determinar mediante análisis fisicoquímicos las características del bioplástico obtenido.



HIPÓTESIS

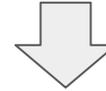
Queratina

Hipótesis Nula



- Las especies de pollos como fuente de plumas no influye la obtención de queratina
- El tipo de medio de fermentación no influye
- El tiempo de fermentación no influye
- La interacción entre el tipo de plumas de pollos, tipo de medio de cultivo y el tiempo de fermentación no influye

Hipótesis Alternativa



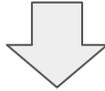
- Las especies de pollos como fuente de plumas influye en la obtención de queratina
- El tipo de medio de fermentación influye
- El tiempo de fermentación influye
- La interacción entre el tipo de plumas de pollos, tipo de medio de cultivo y el tiempo de fermentación influye.



HIPÓTESIS

Bioplástico

Hipótesis Nula



- La queratina dependiendo la fuente de plumas no influye en la calidad del bioplástico.
- La concentración de queratina no influye en la elaboración del bioplástico.
- La aplicación de distintos tipos de espesantes no influye en la elaboración de bioplástico.
- La interacción entre el tipo de plumas de pollos, Concentración de queratina y tipo de espesante no influye en el bioplástico obtenido.

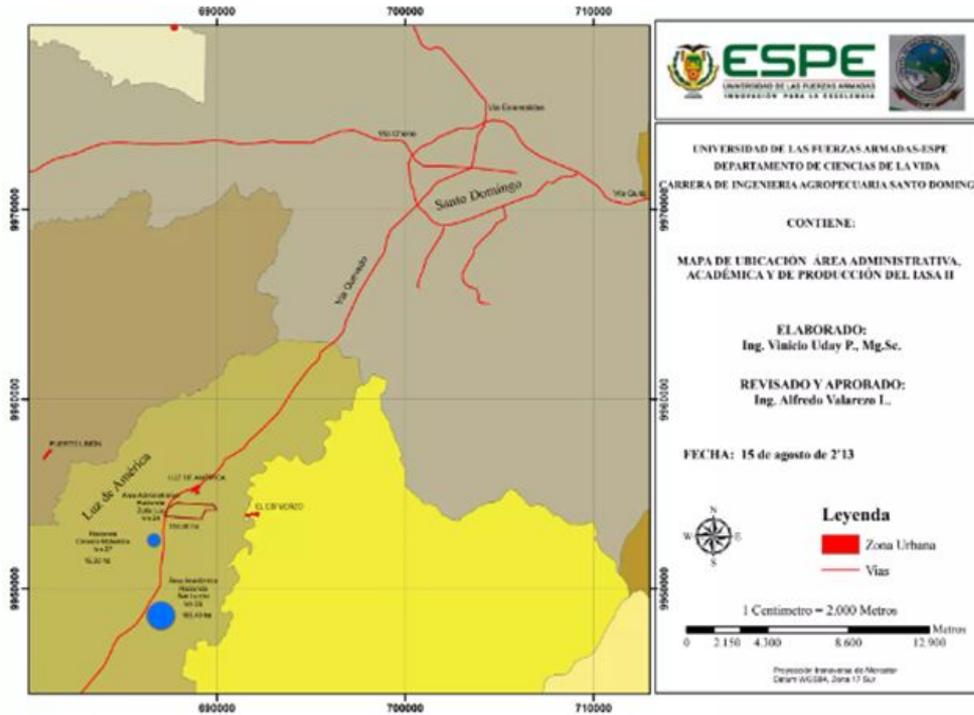
Hipótesis Alternativa



- La queratina dependiendo la fuente de plumas influye en la calidad del bioplástico.
- La concentración de queratina influye en la elaboración del bioplástico.
- La aplicación de distintos tipos de espesantes influye en la elaboración de bioplástico.
- La interacción entre el tipo de plumas de pollos, Concentración de queratina y tipo de espesante no influye en el bioplástico obtenido.



MATERIALES Y MÉTODOS



Ubicación política

País	:	Ecuador
Provincia	:	Santo Domingo de los Tsáchilas
Cantón	:	Santo Domingo de los Colorados
Parroquia	:	Luz de América
Dirección	:	Santo Domingo-Vía Quevedo km 24 margen izquierdo

Ubicación ecológica

Zona de Vida	:	Bosque húmedo tropical
Altitud	:	224 msnm
Precipitación	:	2860 mm año
Humedad relativa	:	85%

MATERIALES Y MÉTODOS

- **Diseño experimental, para la obtención de queratina**

Factores	Simbología	Niveles
Plumas de Pollos (A)	a0	Campero
	a1	Cobb
	a2	Ross
Medios de fermentación (B)	b0	Medio 1 (Solución de sal mineral + extracto de levadura 0,1%)
	b1	Medio 2(Solución de sal mineral + extracto de levadura 0,5%)
Tiempo de fermentación (C)	c0	7 días
	c1	14 días

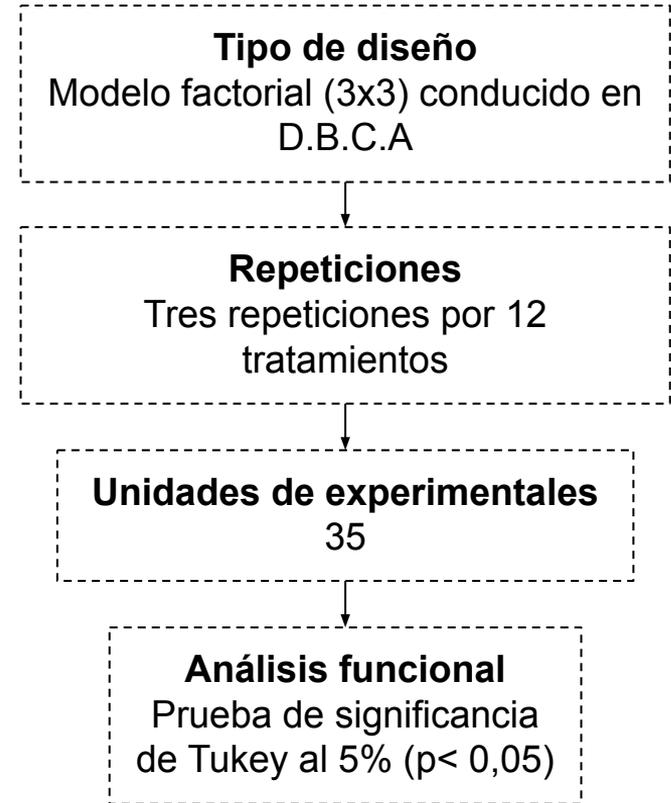
Diseño **AXBXC**

Absorbancia
pH
Densidad
Proteína total



MATERIALES Y MÉTODOS

N°	Interacciones	Unidades experimentales
T1	a0b0c0	Campero + Medio 1 + 7 días
T2	a0b0c1	Campero + Medio 1 + 14 días
T3	a0b1c0	Campero + Medio 2 + 7 días
T4	a0b1c1	Campero + Medio 2 + 14 días
T5	a1b0c0	Cobb + Medio 1 + 7 días
T6	a1b0c1	Cobb + Medio 1 + 14 días
T7	a1b1c0	Cobb + Medio 2 + 7 días
T8	a1b1c1	Cobb + Medio 2 + 14 días
T9	a2b0c0	Ross + Medio 1 + 7 días
T10	a2b0c1	Ross + Medio 1 + 14 días
T11	a2b1c0	Ross + Medio 2 + 7 días
T12	a2b1c1	Ross + Medio 2 + 14 días



MATERIALES Y MÉTODOS

- Diseño experimental, para la obtención de bioplástico

Factores	Simbología	Niveles
Plumas de pollos (A)	a0	Campero
	a1	Cobb
	a2	Ross
Concentración de queratina (B)	b0	8,33%
	b1	16,6%
Espesante (C)	c0	Glicerina
	c1	Urea

Diseño **AXBXC**

Ceniza
Humedad
Elasticidad
Biodegradabilidad



MATERIALES Y MÉTODOS

N°	Interacciones	Unidades experimentales	N°	Interacciones	Unidades experimentales
T1	a0b0c0	Campero + 8.33% queratina + + Glicerina	T7	a1b1c0	Cobb 17% queratina + Glicerina
T2	a0b0c1	Campero+ 8.33% queratina + + Urea	T8	a1b1c1	Cobb 17% queratina + Urea
T3	a0b1c0	Campero + 17% queratina + Glicerina	T9	a2b0c0	Ross + 8.33% queratina + Glicerina
T4	a0b1c1	Campero + 17% queratina + Urea	T10	a2b0c1	Ross + 8.33% queratina + Urea
T5	a1b0c0	Cobb + 8.33% queratina + Glicerina	T11	a2b1c0	Ross 17% queratina + Glicerina
T6	a1b0c1	Cobb + 17% queratina + Urea	T12	a2b1c1	Ross 17% queratina + Urea

Tipo de diseño
Modelo factorial (3x3)
conducido en D.B.C.A

Repeticiones
Tres repeticiones
por 12 tratamientos

**Unidades de
experimentales**
35

Análisis funcional
Prueba de significancia
de Tukey al 5% ($p < 0,05$)



MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y acondicionamiento de las plumas de pollo

Recolección de las plumas



Limpieza de las plumas



Deslipidación

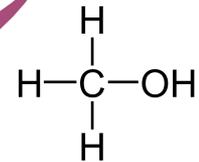
Cloroformo:metanol
(1:1, v/v)



Molido



Secado



MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción de queratina

1. Dilución del vial y siembra de *Bacillus* sp.



2. Preparación de la solución bacteriana



3. Fermentación Sumergida



4. Filtrado



5. Incubado



9. Densidad



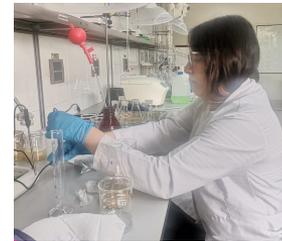
8. Aumento del pH y solubilizado



7. Filtrado 2



6. Precipitado



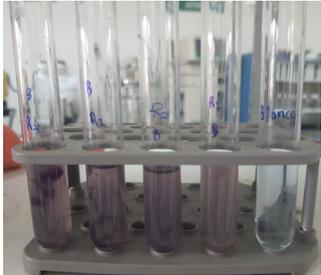
MATERIALES Y MÉTODOS

Pruebas de identificación (Queratina extraída)

1. Prueba cualitativa por color

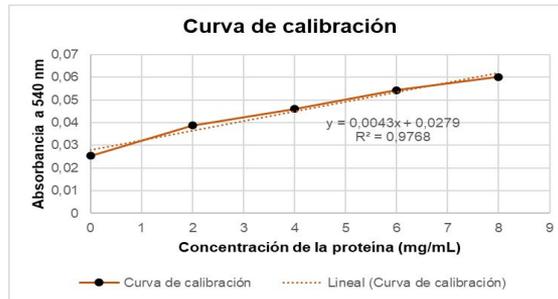
Biuret

Ninhidrina

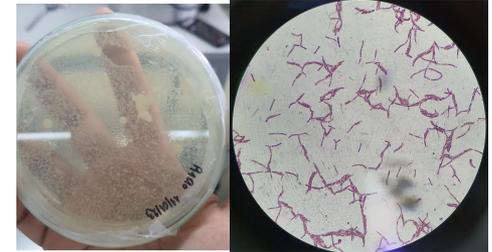


2. Proteína total (Biuret)

Usando una curva de calibración con caseína, y midiendo en el espectrofotómetro a 540 nm



3..
Caracterización
microbiológica



MATERIALES Y MÉTODOS

Bioplástico

1. Almidón de yuca + agua destilada



2. espesante (glicerina o urea)



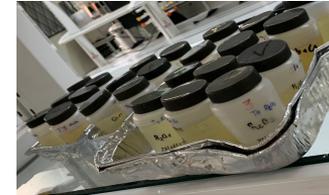
3. Ácido acético a 0,1 M



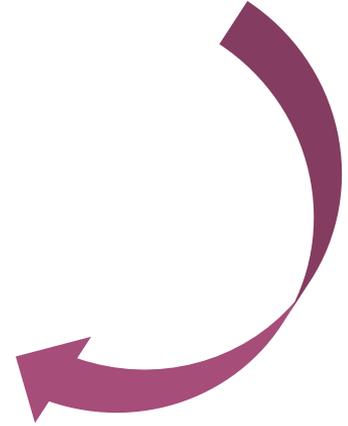
4. Queratina (8,33% o 17%)



5. Hidróxido de sodio a 0,1 M



Secado en la estufa a 40°C



MATERIALES Y MÉTODOS

Pruebas (Bioplástico)

Humedad



Ceniza



Elasticidad



Biodegradabilidad



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

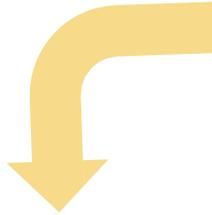
Identificación de proteínas

Vázquez-Jorge et al. (2014) menciona que la prueba de proteína Biuret “se torna de color violeta al reaccionar con la muestra, debido a que reconoce uniones peptídicas, correspondiente a la formación de complejos de coordinación entre los cationes cúpricos en un medio alcalino con las uniones peptídicas”.

Prueba de Biuret	
Muestras	Resultados
<p>Plumas de Pollo Campero</p> 	 Positivo
<p>Plumas de Pollo Cobb</p> 	 Positivo
<p>Plumas de Pollo Ross</p> 	 Positivo

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de proteínas



Según Vázquez-Jorge et al. (2014) ante la prueba de ninhidrina actúa con al menos un grupo amino y uno carboxilo libre, manifestándose como resultado positivo la aparición de un color violeta o amarillo,

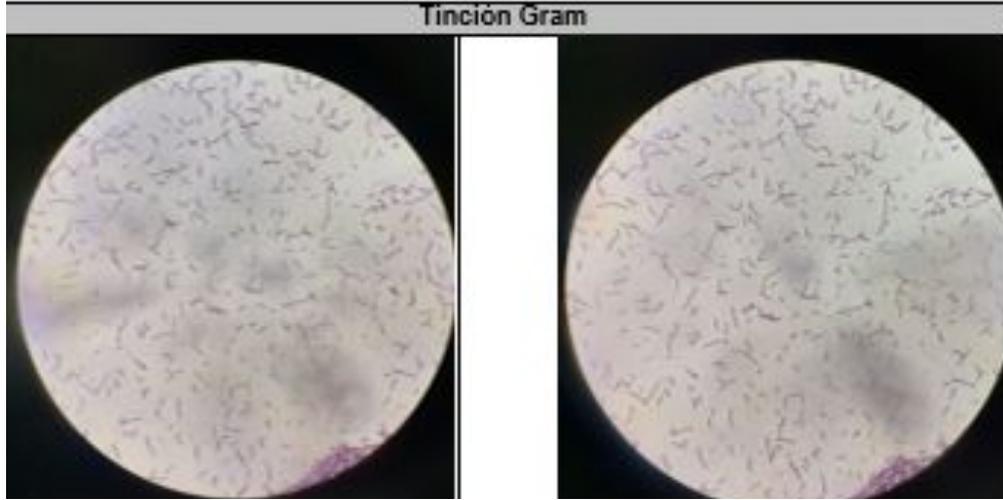
Prueba de Ninhidrina	
Muestras	Resultados
<p>Plumas de Pollo Campero</p> 	 Positivo
<p>Plumas de Pollo Cobb</p> 	 Positivo
<p>Plumas de Pollo Ross</p> 	 Positivo



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización microbiológica de queratina

Tinción Gram

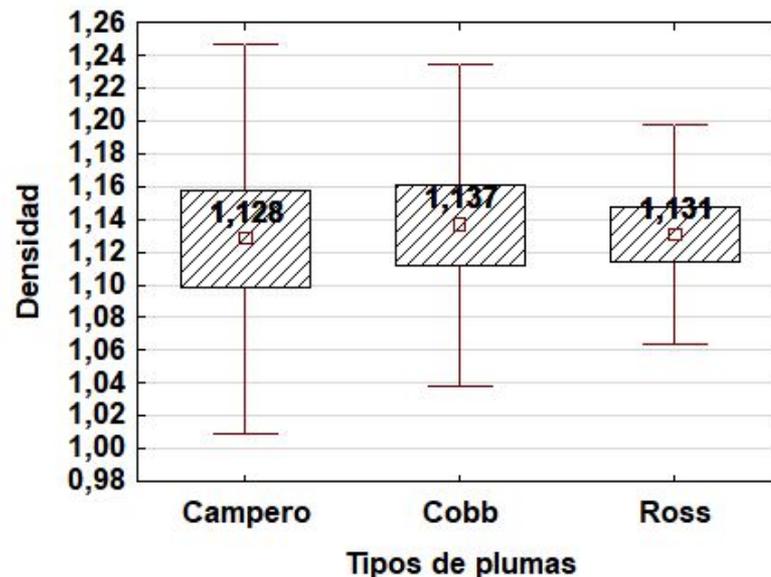
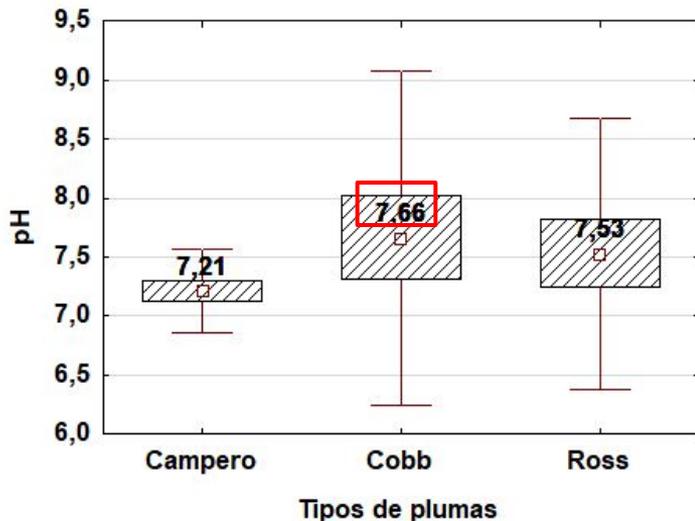


Daroit & Brandelli (2014), Qiu et al. (2020), mencionan que “ Las queratinasas, son proteasas obtenidas principalmente por enzimas queratinolíticas producidas tanto por bacterias como por hongos”.

- ***Bacillus* sp.** tienen la capacidad de producirlas.
- Las queratinasas alteran la estructura de queratina.



Tipos de plumas (Factor A)



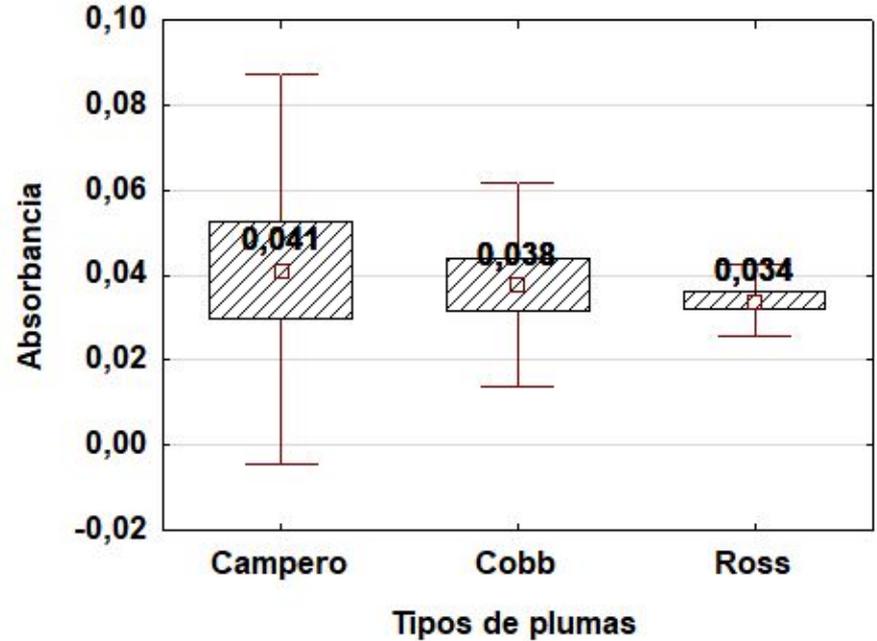
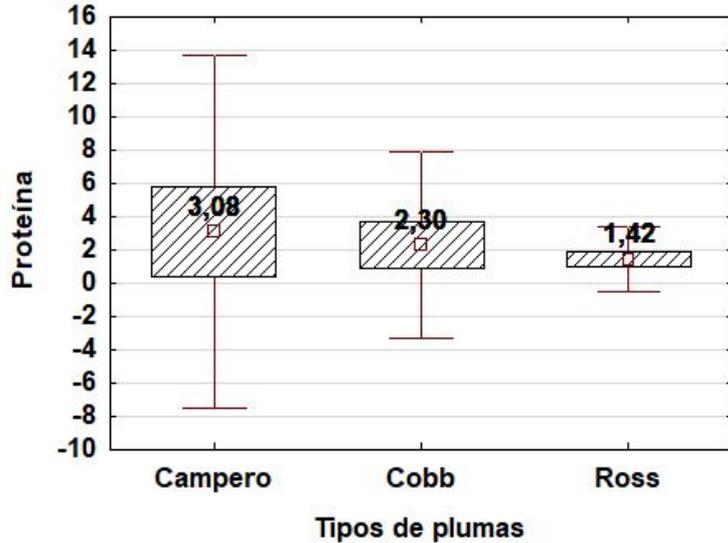
El crecimiento bacteriano con *Bacillus velezensis* en las plumas genera un cambio en el pH de 7 a 9,5, al momento de realizarse la hidrólisis enzimática (Sharma et al., 2022).

Concuera con los resultados de pH entre 7,21 – 7,53.al usar *Bacillus* sp.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Queratina

Tipos de plumas (Factor A)

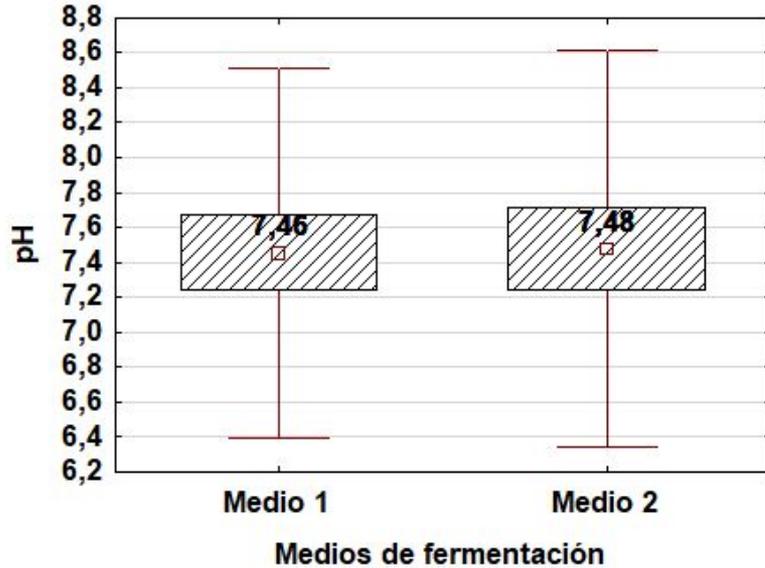


Las plumas del pollo cobb tuvo mayor pH (7,66); mientras que la raza Ross mayor absorbancia con 0,041 y campero mayor cantidad de proteína con 3,09.

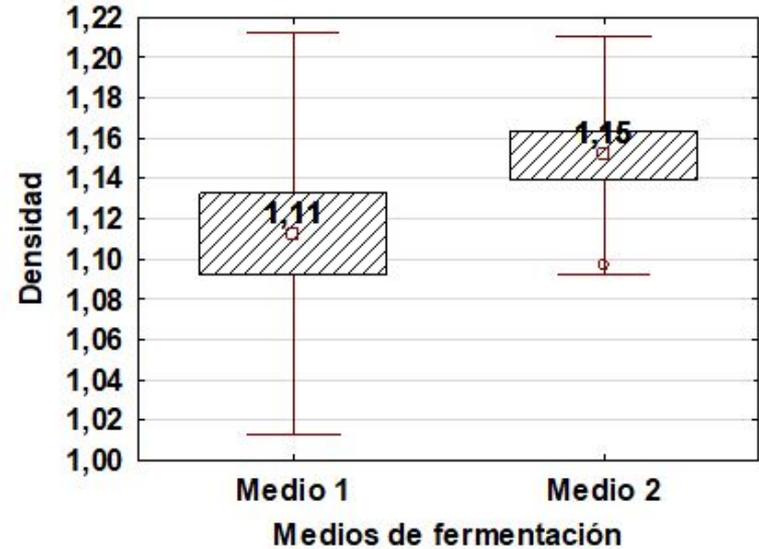
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Queratina

Medios de fermentación (Factor B)



Catalina & Zorro (2018), mencionan que en un procedimiento queratinolítico, el pH se encuentra por encima de 7, debido a que este permite aumentar la producción de enzimas queratinasas.



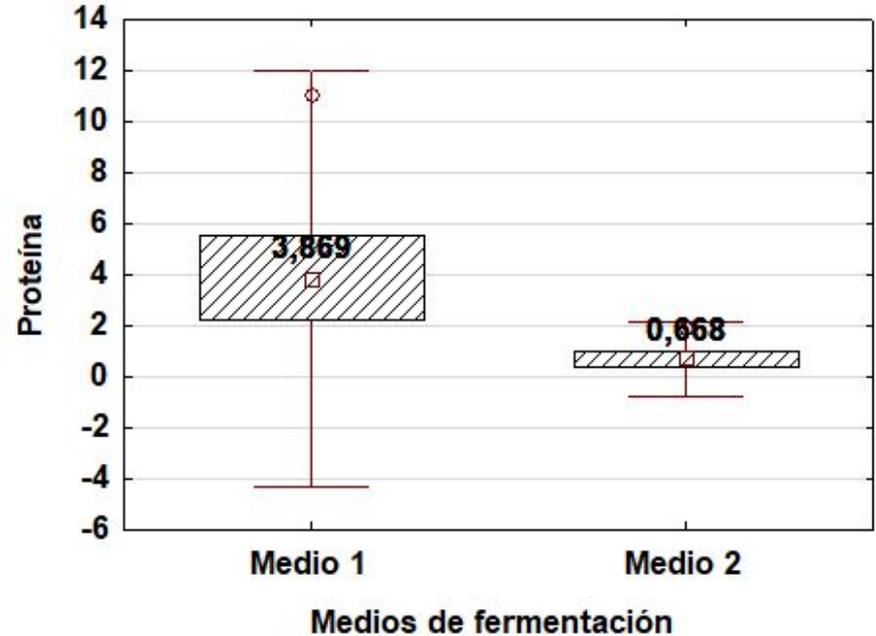
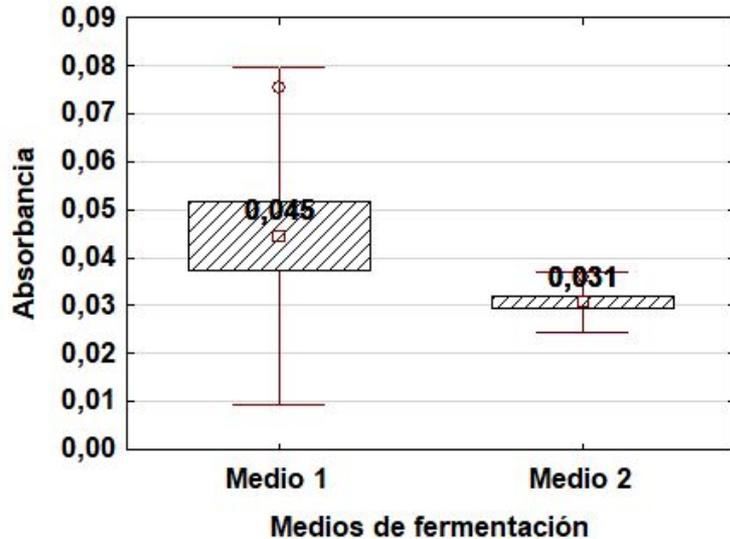
Según NEOGEN (2019) el extracto de levadura estimula el crecimiento bacteriano, debido a que es una fuente de nitrógeno orgánico.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Queratina

Medios de fermentación (Factor B)



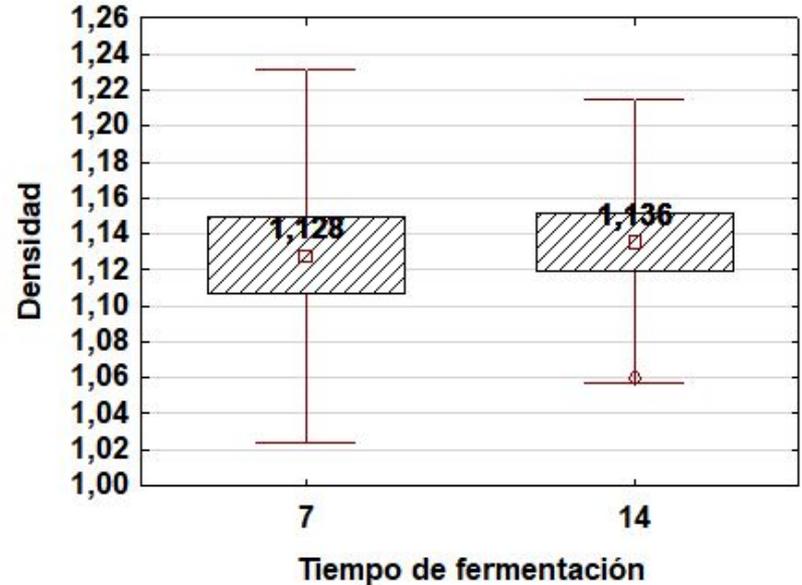
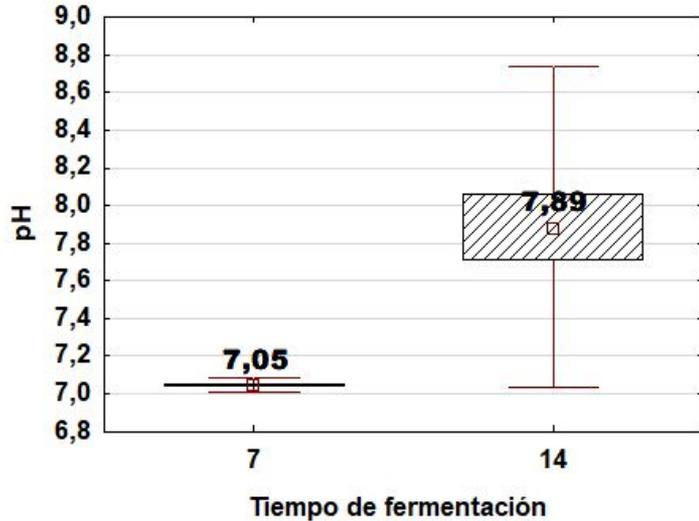
El medio 1 tuvo mayor absorbancia y cantidad de proteína; es decir obtuvo una concentración de 3,87 mg/m L.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Queratina

Tiempo de fermentación (Factor C)



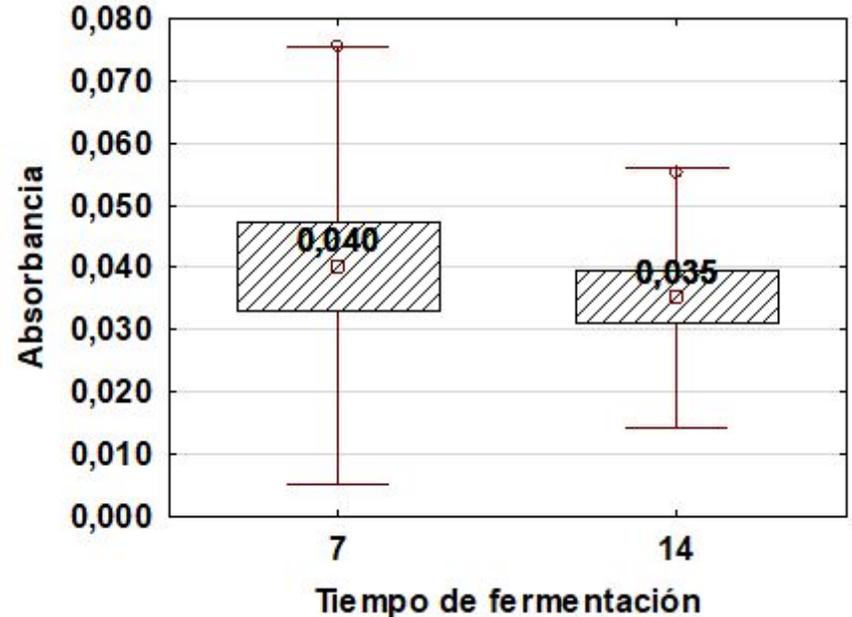
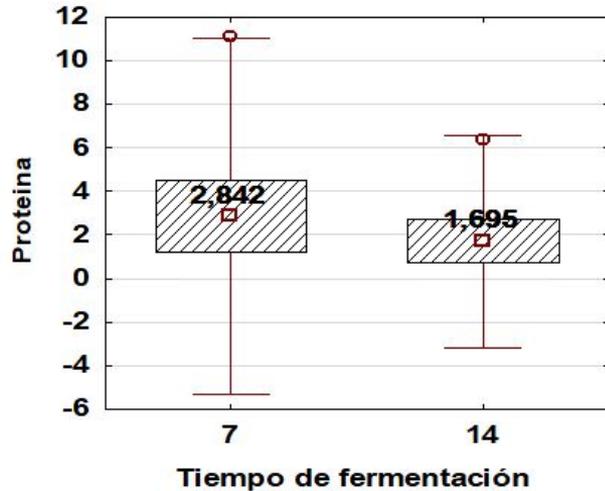
Según Catalina & Zorro (2018), mencionan que, el tiempo de fermentación, para este caso realizado por algunos días, dependerá de la eficacia del microorganismo para producir la enzima.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Queratina

Tiempo de fermentación (Factor C)



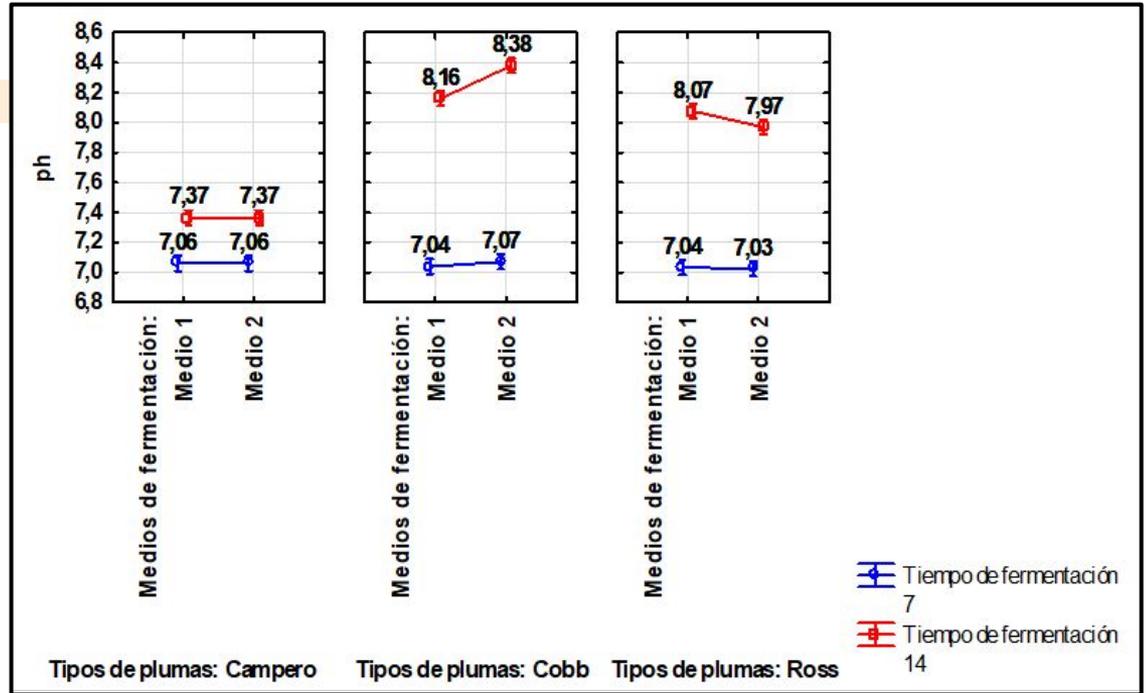
En este caso, se apreció que la fermentación en el día 14 tuvo menores concentraciones de proteínas, con un total de 1,7 mg/mL; mientras que, en el día 7, tuvo un total de 2,84 mg/mL.



Interacciones (ABC)

pH

En los resultados obtenidos en el pH los grupos D y CD, obtuvieron valores de pH dentro del rango adecuado es decir de 7 a 9.

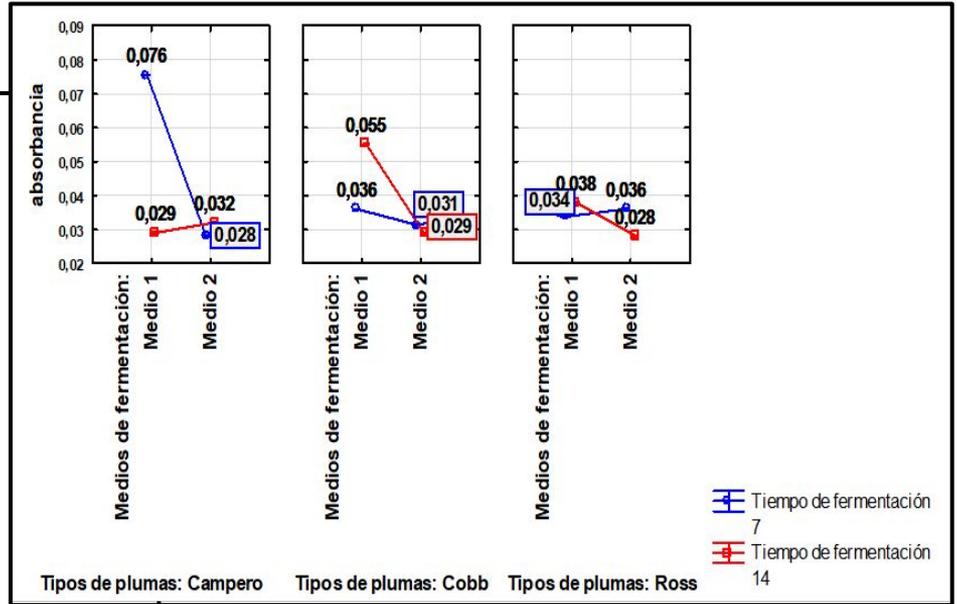
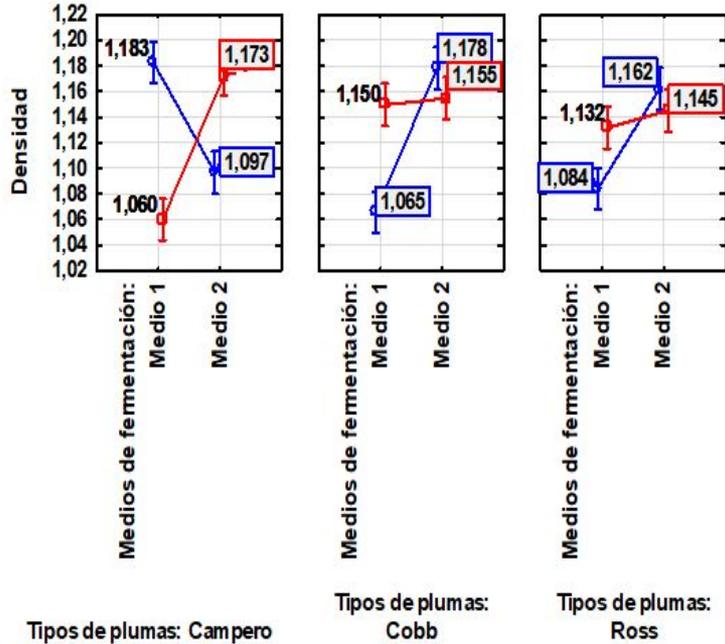


RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Queratina

Interacciones (ABC)

Densidad



Absorbancia



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

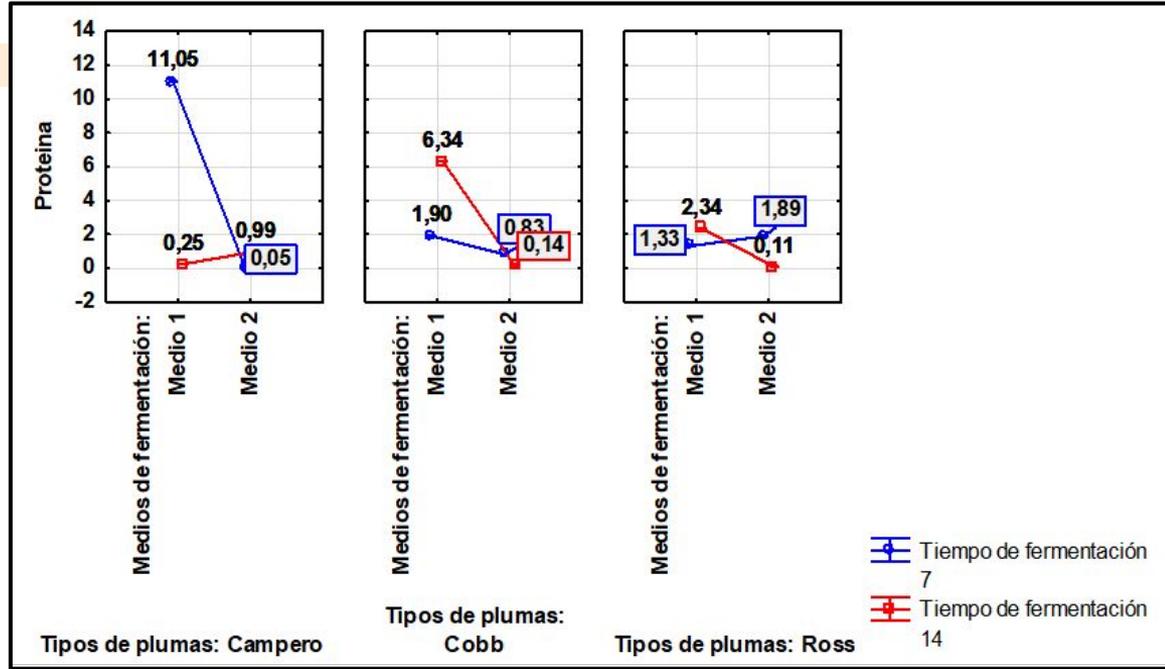
Queratina

Interacciones (Factor ABC)

Proteína

Sharma et al. (2022) mediante Bradford a 570 nm, obtuvo mayor cantidad de proteína soluble entre los días 3 – 4 de fermentación, siendo de 83,985 mg/mL.

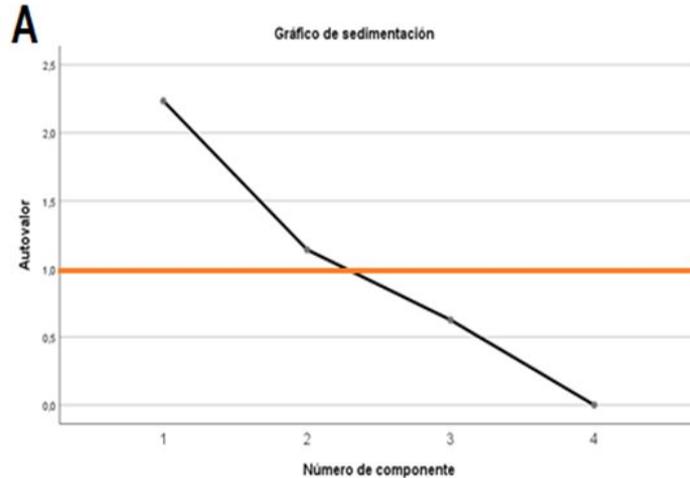
A comparación, la concentración de proteína obtenida a través de la prueba de Biuret a 540 nm, fue de 11,05 mg/mL, correspondiente a la iteración del tratamiento de plumas de pollo campero+ en medio 1 + 7 días.



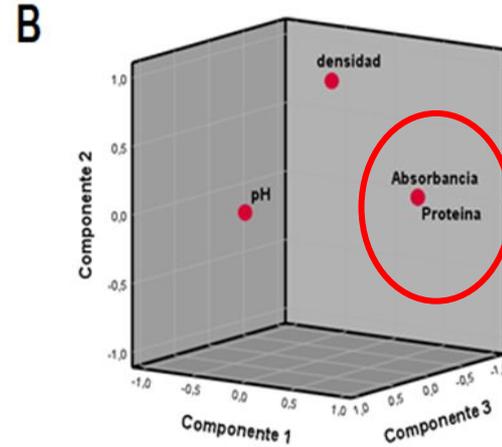
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Queratina

Criterios de representación gráfica del análisis de componentes principales para la queratina



A) Gráfico de sedimentación.



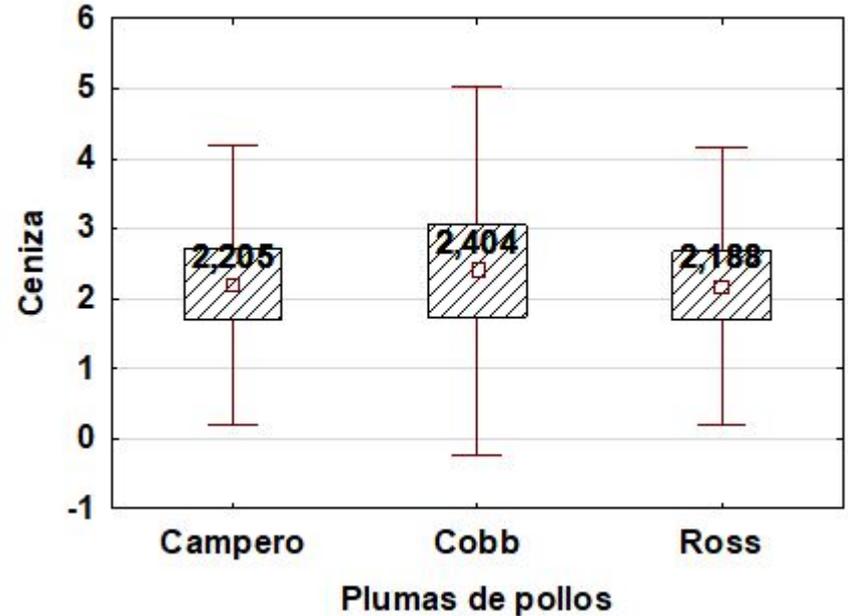
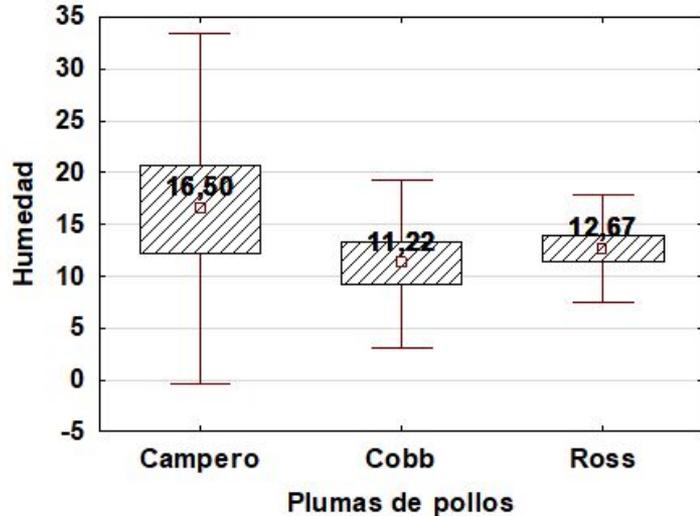
A) Gráfico de espacio rotado



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bioplástico

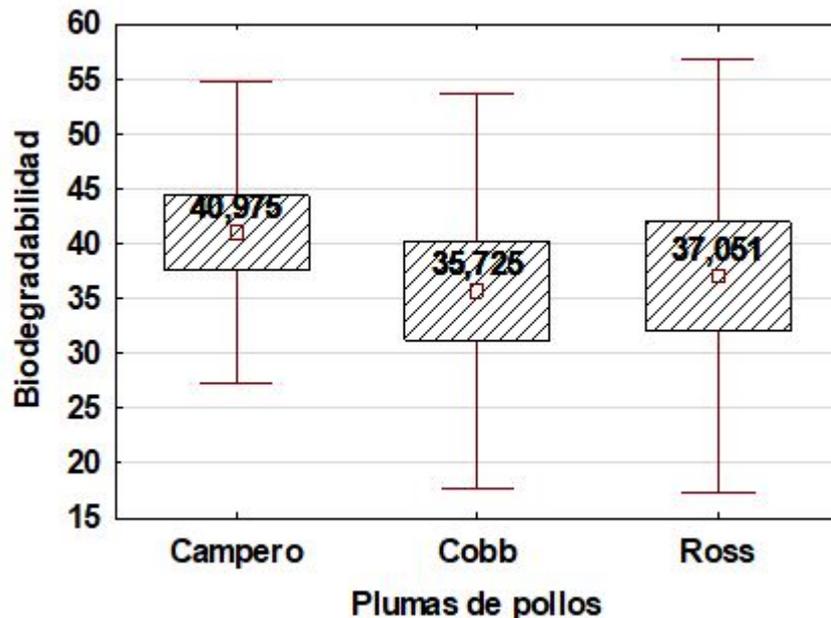
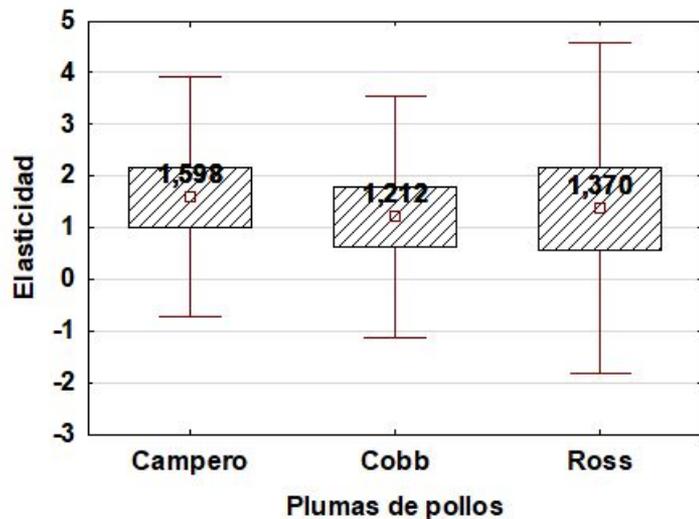
Tipos de plumas (Factor A)



De acuerdo con Abril (2020), las queratinas de plumas de aves de corral obtenidas por hidrólisis como método de obtención, forman una solución líquida, siendo este un material idóneo para la elaboración de bioplástico.

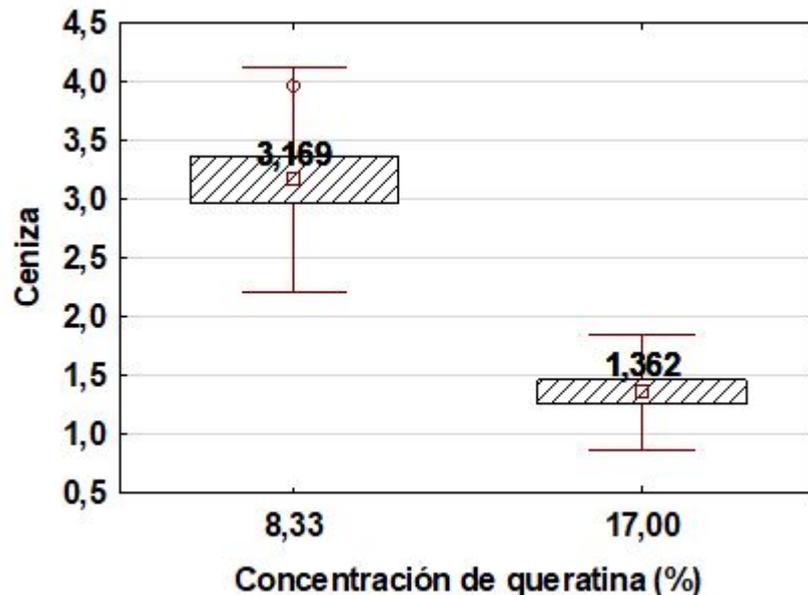
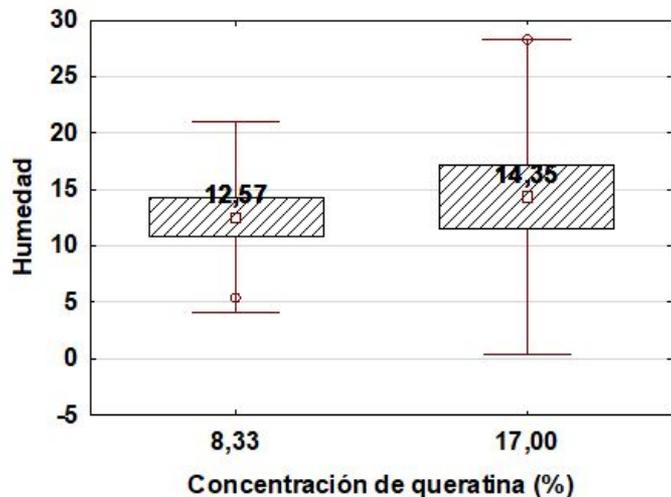


Tipos de plumas (Factor A)



Humedad, elasticidad y biodegradabilidad tuvo valores altos con las plumas de campero, presentando un porcentaje de humedad del 16,50%, elasticidad del 1,60% y biodegradabilidad del 40,98%; mientras que en el grupo del pollo Cobb tuvo el valor más alto de 2,40%.

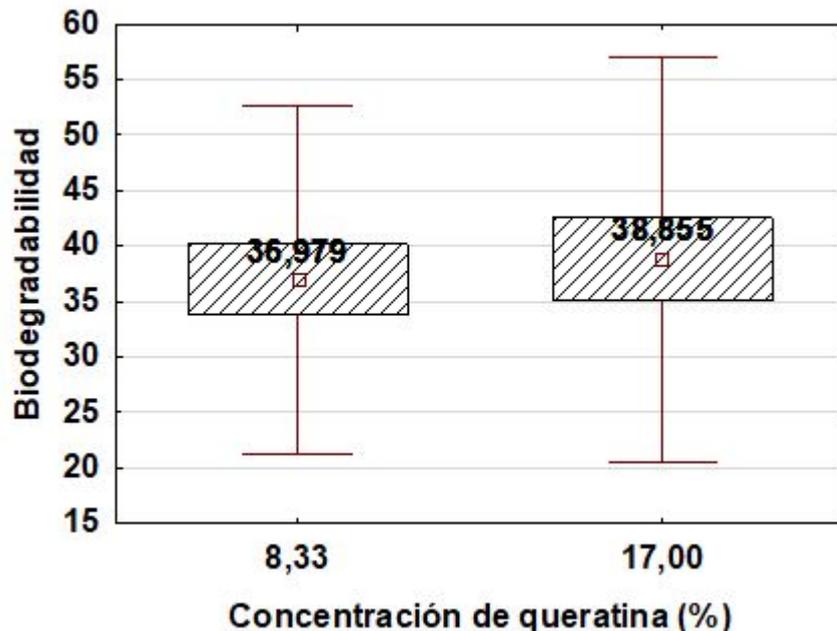
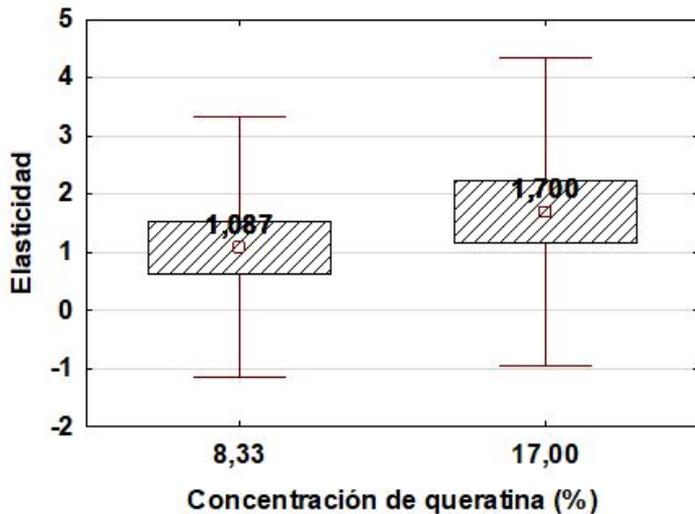
Concentración de queratina (Factor B)



De acuerdo con Mokrejš et al. (2017), al añadir 2% de hidrolizado de queratina, aumenta el 23% de la hidratación.

En el bioplástico la concentración de queratina de 8,33% tuvo 12,57% de humedad y a una concentración de 17% la humedad es de 14,35%.

Concentración de queratina (Factor B)

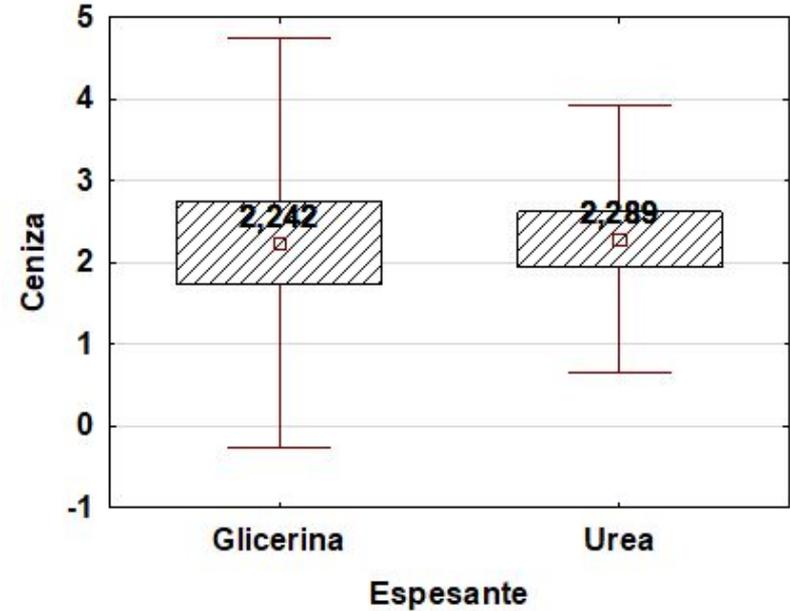
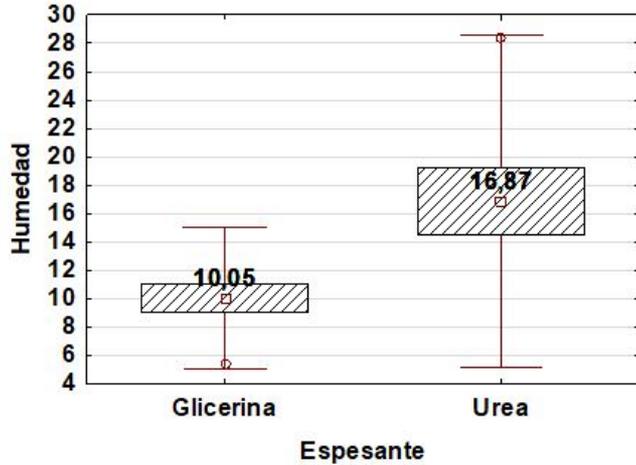


Con la concentración de 17% de queratinas, se obtuvo valores mayores en las variables de humedad (14,35), elasticidad (1,70) y biodegradabilidad (38,86); mientras que con 8,33% de queratinas comprendió valores mayores en la variable de ceniza (3,17).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bioplástico

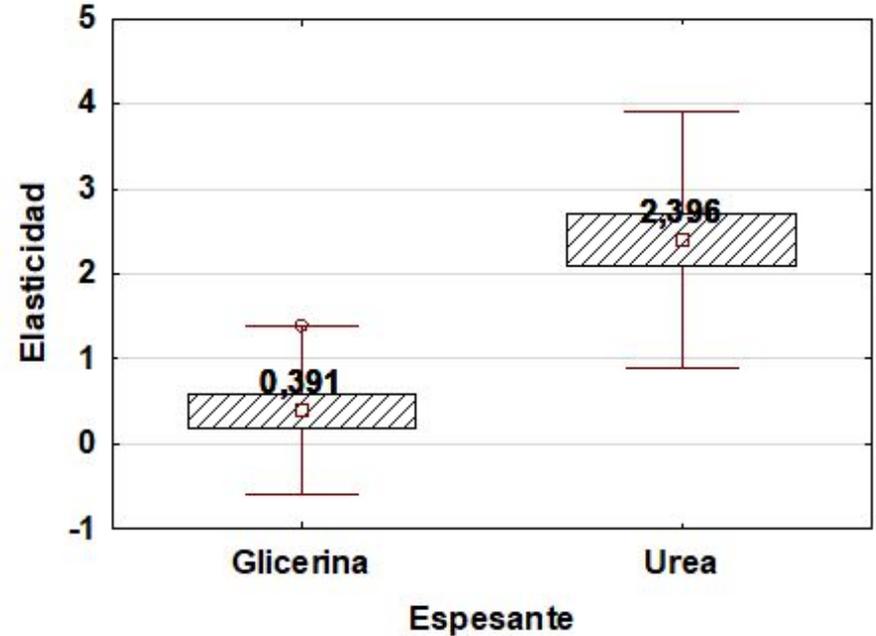
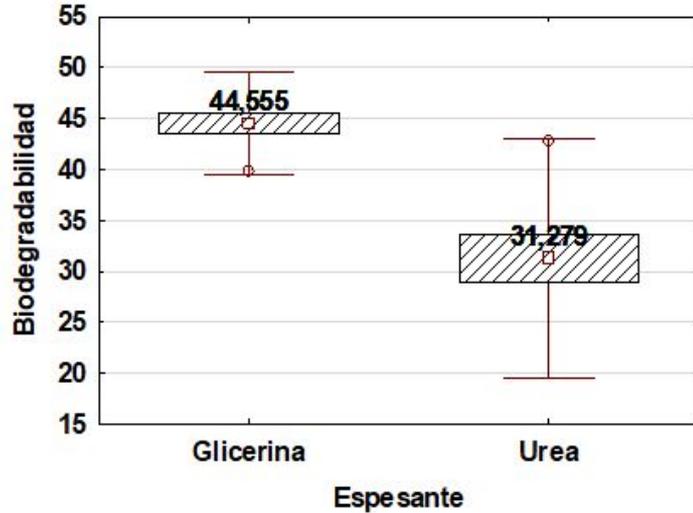
Tiempo de fermentación (Factor C)



Se obtuvo una humedad de 10,05% con glicerina como espesante y 16,87% con urea. A comparación de los resultados de Surya et al. (2021), obtuvieron $1,4 \pm 0,33$ % de contenido de humedad, al aplicar glicerina como espesante



Tiempo de fermentación (Factor C)



Las muestras con Urea abarcan valores mayores en las variables de humedad, elasticidad y ceniza; mientras que con Glicerina se presentó mayor valor en la biodegradabilidad (44,56)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

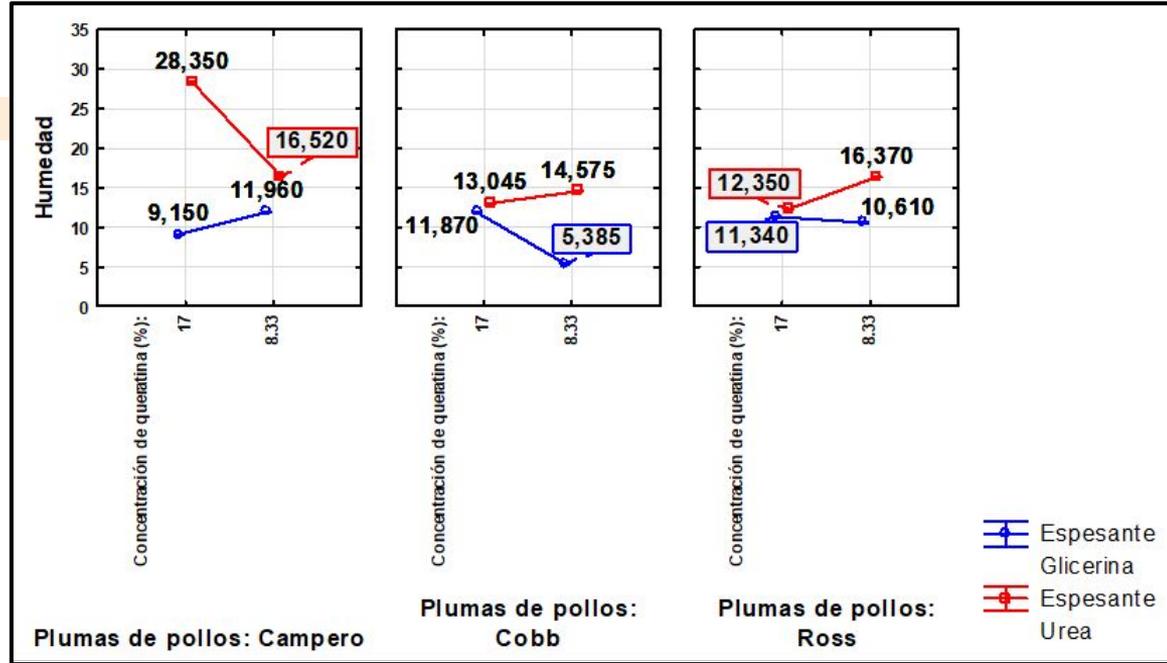
Bioplástico

Interacciones (ABC)

Humedad

Shavandi et al. (2017), la urea, como desnaturalizante de proteínas, se ha utilizado para aumentar la solubilidad de la queratina en agua.

La interacción de Cobb + 8,33% + Glicerina (5,39%) tuvo el resultado más eficiente.



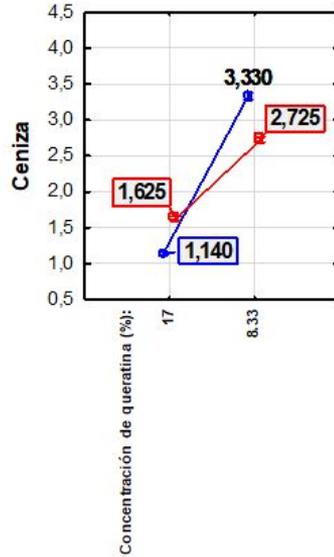
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bioplástico

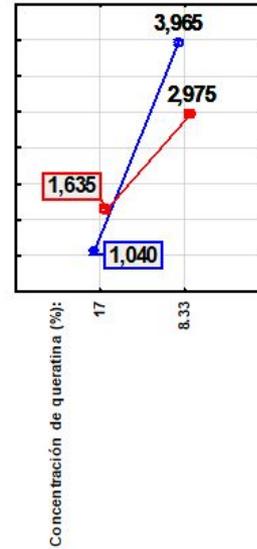
Interacciones (ABC)

Ceniza

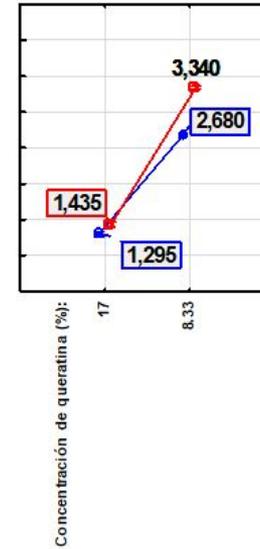
Mayor % de ceniza en: Cobb + 8,33% + Glicerina (3,97%).



Plumas de pollos: Campero



Plumas de pollos: Cobb



Plumas de pollos: Ross

■ Espesante
■ Glicerina
■ Espesante Urea



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

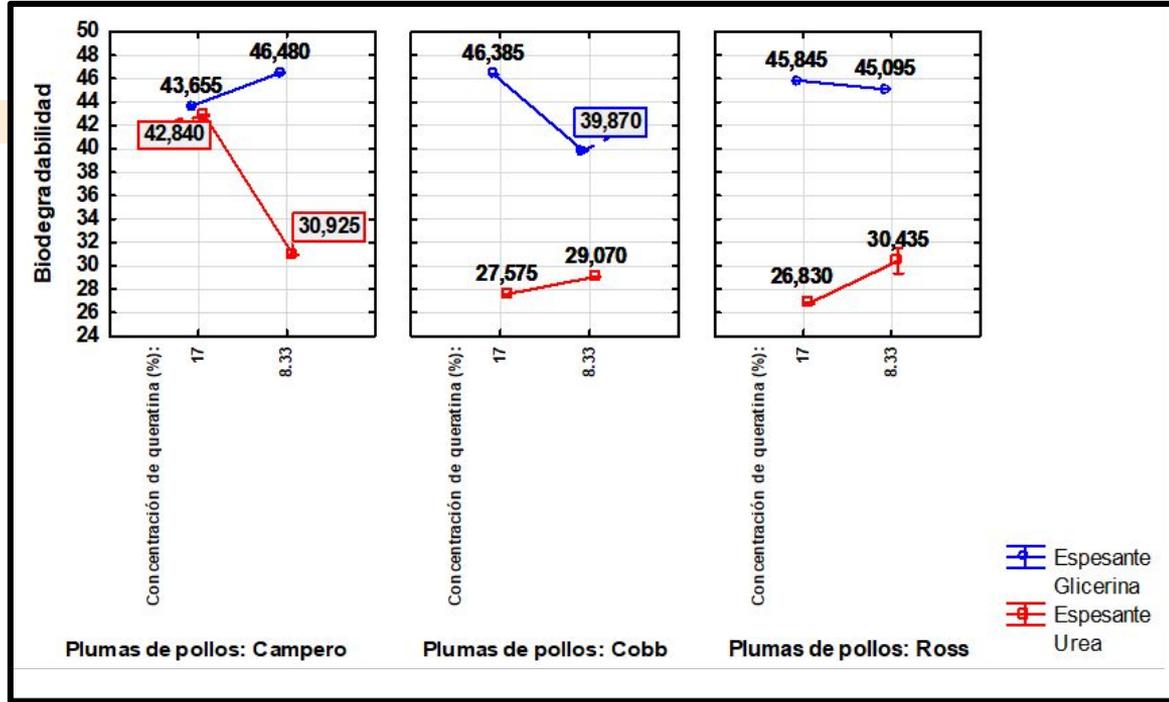
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bioplástico

Interacciones (ABC)

Biodegradabilidad

En el caso de la biodegradabilidad, la interacción de los tratamientos campero + 8,33% + glicerina con un valor de 46,48% y Cobb + 17% de queratina + glicerina con 46,39%



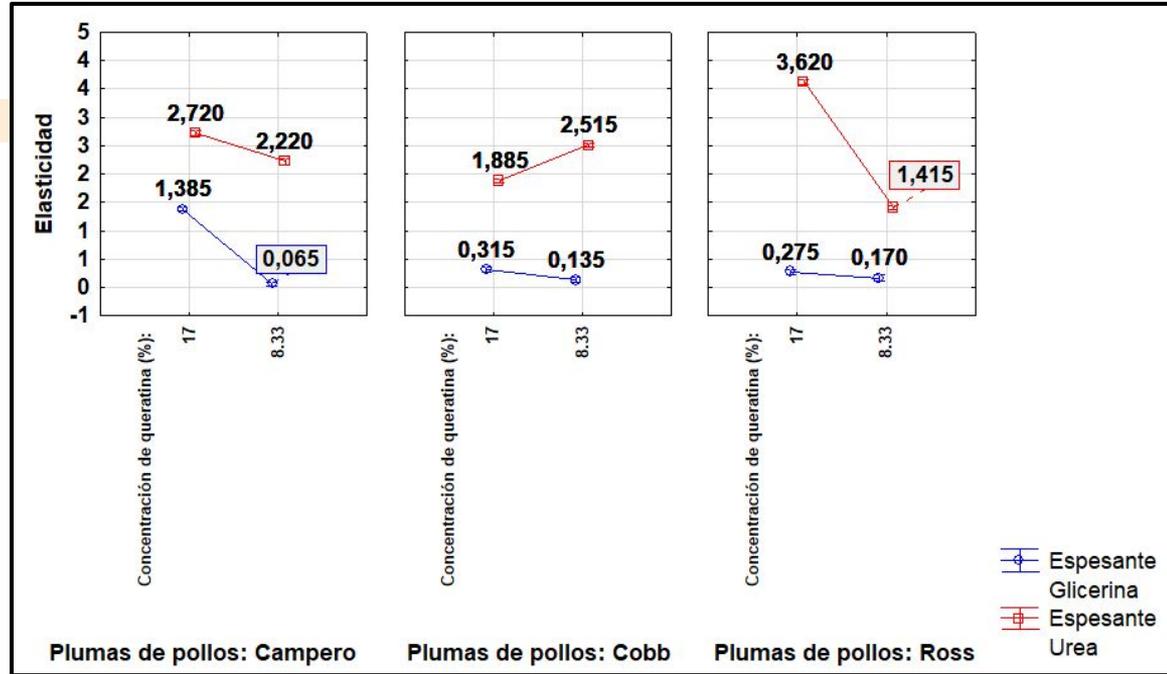
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bioplástico

Interacciones (ABC)

Elasticidad

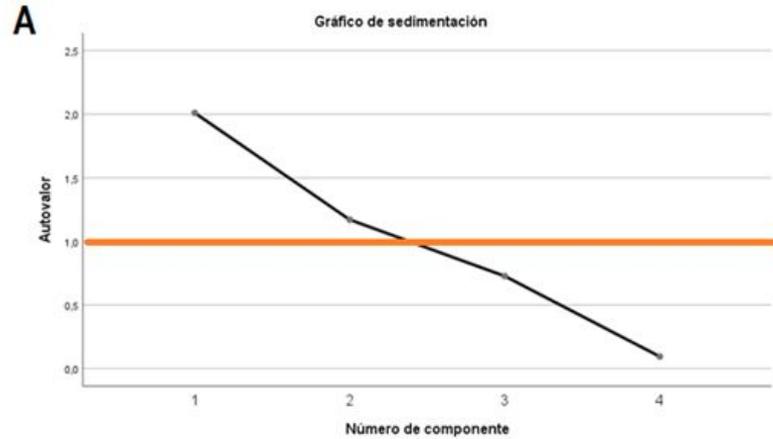
En el caso de elasticidad la interacción (Ross + 17% de queratina + urea) obtuvo un valor mayor de elasticidad de 3,62%



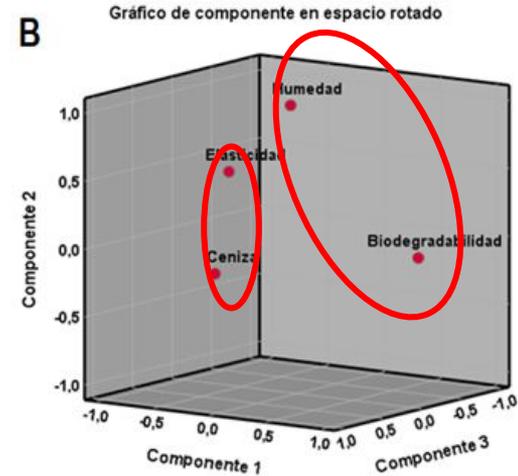
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bioplástico

Criterios de representación gráfica del análisis de componentes principales para el bioplástico



A) Gráfico de sedimentación.



A) Gráfico de espacio rotado

CONCLUSIONES

Diseño A x B X C



Queratina hidrolizada

Factor A
(Tipos de plumas)

El tipo de pluma de pollo empleado como base para la obtención de queratina influye en la cantidad de queratina hidrolizada en el proceso de fermentación enzimática, al aplicar las variables del pH, absorbancia y cantidad de proteína en los tres tipos de plumas se comprobó diferencias entre sí, siendo el tipo de pluma Cobb el que presenta valores más alto de proteína (3,09%)

Factor B
(Medios de fermentación)

Se determina que el medio de fermentación 2 a base de Solución de sal mineral + extracto de levadura 0,5% es el más eficiente en cuanto a la cantidad de queratina obtenida.



CONCLUSIONES

Diseño A x B X C



Queratina hidrolizada

Factor C
(Tiempo de fermentación)

La fermentación de 7 días presenta un pH menos básico (7.05), una mayor absorbancia (0.040) y una mayor cantidad de proteína obtenida (2.84 %) siendo resultados favorables para el estudio.

Interacción AxBxC

En la variable de absorbancia y cantidad de proteína se presentaron ocho grupos significativos entre los tratamientos aplicados, siendo el grupo J el que presenta mayor absorbancia y cantidad de proteína con valores de 0.076 y 11.05% respectivamente, ambos correspondientes al primer tratamiento (interacción: Campero + Medio 1 + 7 días).



CONCLUSIONES

Diseño A x B X C



Bioplástico

Factor A
(Tipos de plumas)

Se determinó que la pluma de raza Cobb la que presentó menor humedad (11,22%), en cuanto a cenizas, la pluma de raza Ross obtuvo menor cantidad de cenizas con un valor de 2,19%, mientras que para los parámetros de elasticidad y biodegradabilidad se obtuvieron los valores más altos con la pluma de raza Campero con 1,60 y 40,98 respectivamente.

Factor B
(Concentración de queratina)

La concentración de queratina óptima para la elaboración de bioplástico es emplear un agregado de 17% de queratina dado que fue el % de queratina que obtuvo mejores resultados en cuanto a elasticidad (1,70) y biodegradabilidad (38,86), así mismo se obtuvo mayor cantidad de humedad (14,35), pero se diferenció en tener menor cantidad de ceniza (1,36).



CONCLUSIONES

Diseño A x B X C



Bioplástico

Factor C
(Espesante)

La aplicación de urea como espesante presentó mejor elasticidad (2,40) en el bioplástico, sin embargo, la adición de glicerina presentó mayor biodegradabilidad (44,56) del bioplástico. En cuanto a los parámetros de humedad y ceniza, la glicerina obtuvo los valores más bajos 10,55% y 2,24% respectivamente

Interacción AxBxC

En la variable de elasticidad se presentaron 9 grupos significativos, siendo el mejor tratamiento la combinación de pluma de raza Ross con 17% de proteína y adición de urea ya que presentó una elasticidad de 3,62. En cuanto a la variable de biodegradabilidad los mejores tratamientos se presentaron con las combinaciones de Campero + 8,33% + Glicerina y Cobb + 17% + Glicerina obteniéndose 46,48% y 46,36% respectivamente.



RECOMENDACIONES

Emplear las plumas de pollo de raza campero dado que se determinó que esta raza posee un alto rendimiento de producción de proteína.



Emplear Solución de sal mineral + extracto de levadura 0,5%, puesto que esta formulación de medio fue la más eficiente en cuanto a la cantidad de queratina obtenida.



Realizar la fermentación en 7 días, ya que el aumentar el tiempo de este proceso no produce resultados favorables en cuanto al rendimiento.



Emplear un agregado de 17% de queratina dado que fue el % de queratina que obtuvo mejores resultados en cuanto a propiedades de elasticidad (1,70) y biodegradabilidad (38,86),



**Gracias por su
atención**



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA