

Método alternativo de obtención de queratina empleando sulfuro de sodio, sin diálisis, para la reconversión de biomasa de la industria avícola

Orjuela-Palacio, Juliana M.¹, Sciammaro Leonardo¹, Zaritzky Noemí E.^{1,2}

¹Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos- CIDCA (CONICET-UNLP-CIC), La Plata, CP: 1900, Argentina.

²Depto. de Ingeniería Química- Facultad de Ingeniería UNLP, La Plata, CP: 1900, Argentina.
juliana.orjuela@ing.unlp.edu.ar

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 [8], dificultando la utilización de la proteína en diferente proceso.

El uso de agentes químicos que contienen tioles actúan como reductores y pueden disminuir la estabilidad de la proteína por su acción de rompimiento de los enlaces disulfuro (S-S), los puentes de hidrógeno y los puentes salinos [6], logrando la solubilización de la biomasa y la extracción de la queratina.

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), ya que presentan altos rendimientos de extracción de queratina; son tioles que proveen su grupo funcional (-SH) para la escisión de los enlaces disulfuro sin dañar la cadena principal de la proteína de queratina [13], sin embargo, su uso se restringió en el tiempo debido a su alta toxicidad y su costo es elevado.

El mecanismo de reacción de extracción de queratina por reducción empleando tioles, consiste en dos reacciones reversibles de desplazamiento nucleofílico. Bajo condiciones básicas, el anión tiol se forma y reduce los enlaces disulfuro de la cisteína favoreciendo una doble sustitución nucleofílica y solubilizando los compuestos de queratina [10]. Los grupos tioles del material queratinoso reducido se oxidan fácilmente en presencia del aire para formar grupos disulfuro, es por esta razón que los tioles son usualmente bloqueados por una alquilación inmediata tras el proceso de reducción [10].

Schrooyen y col., [3] optimizaron el proceso de reducción con 2-mercaptoetanol al aumentar el pH con urea; utilizaron en la etapa de solubilización concentraciones de 0,125 M de 2-mercaptoetanol, 8 M de Urea y 0,25 M de Tris-HCl a pH 7-9 y 60 °C, obteniendo rendimientos superiores al 75 %. En un estudio posterior, Sinkiewicz y col., [9] reportaron una etapa de solubilización que incluía el uso de 2-mercaptoetanol y DTT a 50 °C por 2 h.

El objetivo del presente trabajo fue aplicar y comparar la efectividad de diferentes metodologías de solubilización de plumas que no impliquen etapa de diálisis, para la obtención de queratina utilizando un reactivo menos contaminante que los tioles convencionales como el sulfuro de sodio (Na₂S), variando la concentración de dicho reactivo, tiempo y temperatura del proceso, con el fin de generar procesos viables para la revalorización de residuos de la cadena de producción avícola.

Materiales y métodos

Adecuación de las plumas de pollo

Las plumas utilizadas son de pollos parrilleros líneas COBB y ROSS provistas por Domvil SA - Frigorífico Aveguay de Entre Ríos, Argentina. El proceso de adecuación se inicia con una etapa de lavado con agua corriente y detergente común con agitación constante, retirando el material extraño (piedras, restos de tejidos animal, picos, fibras, etc.), se enjuagan con abundante agua hasta retirar el detergente; a continuación, se sumergieron en una mezcla de

agua destilada-etanol 96 % (50:50). Las plumas lavadas se filtraron, escurrieron y se secaron a 35 °C en estufa con convección forzada por 24 h. Las plumas secas 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 se secaron a 30°C por 24 h.

Se determinó el contenido de humedad y de proteína total mediante el método de Kjeldahl [1], usando un factor de conversión de 5.71 [2;9].

Metodologías de solubilización

La solubilización de las plumas se realizó mediante procesos de reducción aplicando como agente reductor sulfuro de sodio (Na_2S), este reactivo puede ser tan efectivo como el 2-mercaptoetanol (2-MEC) y el DTT, además de ser menos tóxico y más económico [4]. Cuando el Na_2S se disuelve en agua reacciona para formar hidrógeno sulfuro de sodio (NaHS) e iones de hidroxilo (Reacción 1), incrementando el pH de la solución a valores alcalinos ($\text{pH}>9$) [3].



Reacción 1. Formación de Hidrógeno sulfuro de Sodio en medio alcalino a partir de la disolución de Sulfuro de sodio.



Figura 1. Reducción de los enlaces disulfuro de la cistina mediante un NaHS como agente reductor (K= Queratina).

El sulfuro de sodio favorece la degradación de la queratina a través de una hidrólisis alcalina rompiendo los enlaces disulfuro intra e intermoleculares de la proteína (Figura 1). De esta manera quedan mayoritariamente grupos $-\text{SH}$ libres de residuos de cisteína (Schrooyen y col., 2007).

Se aplicaron dos metodologías de solubilización:

- **Q(a):** Las plumas previamente adecuadas fueron solubilizadas adicionando una solución de Na_2S $C_{\text{sol}} = 7,8 \text{ g/L}$, la mezcla se calentó a 60°C y se agitó durante 1 h, la relación extracción entre biomasa y agente reductor fue de 5 g de plumas adecuadas / g de Na_2S , la concentración de la solución de Na_2S fue de 7,8 g/L, 60°C y 1 h.
- **Q(b):** En esta metodología las plumas fueron tratadas con una solución de concentración $C_{\text{so}} = 10 \text{ g/L}$ y calentadas a 30°C a 3, 6 y 24 h, manteniendo la relación de 10 g de plumas/ g de Na_2S [3].

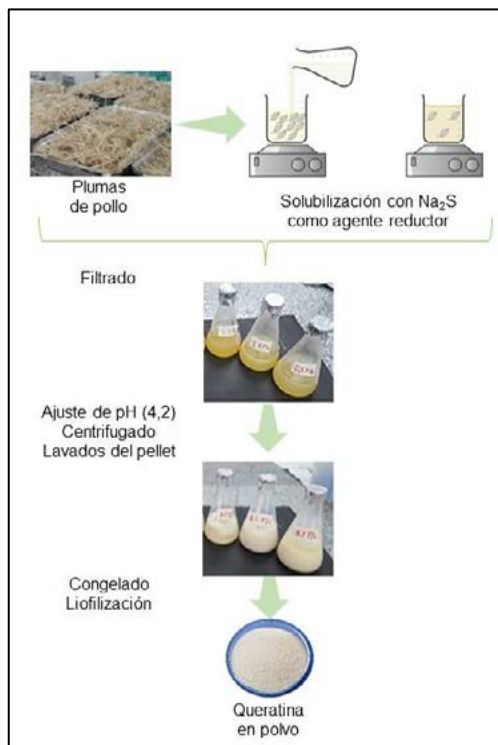


Figura 2. Esquema de la metodología de obtención de queratina de plumas de pollo.

Las dispersiones obtenidas se filtraron para retirar los restos de plumas sin disolver y se ajustó el pH a 4,2 (valor del punto isoeléctrico) para precipitar la proteína; se centrifugó (3000 rpm, 10 min, 10°C) y los pellets se lavaron con abundante agua destilada, se congelaron a -40°C y liofilizaron en un equipo HETO Modelo FD 4. La queratina liofilizada se almacenó a 6 °C en un desecador hermético hasta su caracterización (Figura 2).

Es importante destacar que en estos procedimientos no se incluye diálisis, etapa que eleva los costos de producción y dificulta el escalado del proceso a nivel industrial. Para ello, se reemplazó por repeticiones en la etapa de centrifugación y lavado.

2.3 Caracterización de hidrolizados de queratina

2.3.1 Rendimiento de solubilización

Se calculó 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.

Determinación de proteína soluble

La concentración de proteína soluble se determinó mediante el ensayo espectrofotométrico de Biuret. Se tomó 0,3 mL de cada disolución de queratina previamente centrifugado (10 min, 13000 rpm, 25°C, microcentrifuga 5415D Benchtop, Eppendorf) 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.

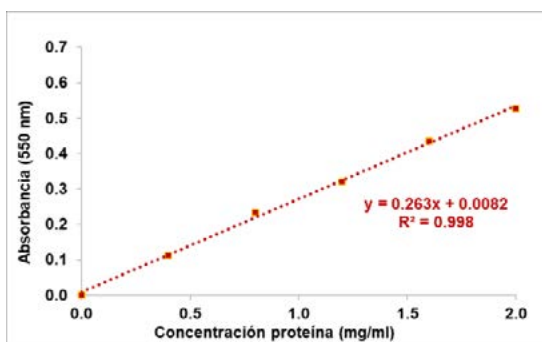


Figura 3. Curva de calibración Reactivo de Biuret; Patrón Albumina.

Se obtuvo la curva de calibración del método para el rango de 0-2 mg de proteína / mL solución, usando como estándar Albumina (Aldrich). La absorbancia se leyó en un espectrofotómetro UV mini-1240 UV-Vis (HACH DR-2800) a una longitud de onda $\lambda = 550$ nm. (Figura 3).

Determinación del peso molecular:

La determinación del peso molecular de los derivados de queratina se evaluó mediante el protocolo de electroforesis en gel de Tricina/SDS-PAGE de acuerdo con Schagger y Jagow [7]. La queratina se incubó en condiciones reductoras usando el Buffer muestra (4x) con adición de DTT (1% p/v) durante 3 min a 95 °C. La electroforesis se llevó a cabo en un gel

discontinuo de poliácridamida, con un gel espaciador (stacking) de 4 % y gel (spacer) 10 % y de separación de 16 %. Se usaron patrones de muy bajo peso molecular (VLMW= 26,6-1,4 kDa; BIO-RAD) y de bajo peso molecular (LMW= 97-14,4 kDa; GE Health Care).

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 de queratina liofilizados, 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.

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 la prueba de Tukey usando un nivel de significancia $\alpha = 0,05$.

Resultados y discusión

Las plumas de pollo empleadas en el presente trabajo presentaron un contenido de humedad de $3,46 \pm 0,12$ g de agua / 100 g pluma adecuada y $91,30 \pm 0,5$ g de proteína / 100 g pluma adecuada. Se analizó el rendimiento de solubilización de las plumas de pollo y el contenido de proteína soluble en las soluciones de queratina obtenidas mediante las metodologías aplicadas Q(a) y Q(b). El rendimiento de solubilización se calculó mediante la ec. 1 (***Sol_{pluma}***), que vincula la cantidad en gramos de las plumas disueltas y de las plumas que no se disolvieron; el contenido de proteína soluble medido por el método de Biuret se expresó en g proteína soluble/ g de pluma.

En la Tabla 1 se presentan los resultados de rendimiento de solubilización de plumas de pollo y proteína soluble.

Tabla 1. Rendimiento de solubilización de plumas y proteína soluble en dispersiones de queratina obtenidas por reducción con Na_2S .

Metodología	Condiciones			Pluma solubilizada (%)*	g proteína soluble/ g de pluma *
	Temp. (°C)	Tiempo (h)	Ratio		
Q(a)	60	1	5:1	$89,21 \pm 0,68^a$	$0,253 \pm 0,01^a$
Q(b)3h	30	3	10:1	$49,78 \pm 0,47^d$	$0,181 \pm 0,02^d$
Q(b)12h	30	12	10:1	$57,50 \pm 0,37^c$	$0,205 \pm 0,02^c$
Q(b)24h	30	24	10:1	$66,12 \pm 0,27^b$	$0,222 \pm 0,02^b$

*Resultados expresados como el promedio \pm desviación estándar de triplicados. Para cada columna valores con superíndices distintos difieren significativamente según la prueba de Tuckey ($p < 0,05$).

La aplicación del método Q(a) permitió lograr el mayor rendimiento de solubilización de la biomasa, representando un 89 % y a su vez el contenido más alto de proteína soluble (0,25 g proteína soluble/g pluma); por otra parte, el método Q(b) condujo a menores rendimientos, y se observó que después de 3 h se solubilizó un 50 % la biomasa de partida; aumentando del tiempo de reacción a 24 h se logró hasta un 66 % de solubilización y 0,22 g proteína soluble/g pluma. Estos resultados concuerdan con los reportados por Sharma y col., (2018) con rendimientos de extracción superiores al 80 % cuando aplicaron Na_2S [500 mM] a 50 °C.

Varios autores han reportado el eficiente uso del método de reducción empleando como agente reductor al Sulfuro de sodio (Na_2S) en condiciones alcalinas.

Wrześniewska-Tosik y Adamiec [11] solubilizaron las plumas de pollo y extrajeron queratina aplicando la reducción con Na_2S 0,1M, variando la temperatura entre 40 y 60 °C con un tiempo de reacción de 1 h. Sharma y col., [6] usaron Na_2S [500 mM] a 50 °C y durante 6 h, reportando rendimientos de extracción superiores al 80 %. En comparación con la metodología convencional con 2-MEC con una eficiencia del 75 % [3] y un 83 % [9] en la solubilización de plumas de pollo, las metodologías podrían ser empleadas como una opción viable más económica y segura en el reemplazo de la metodología convencional con el uso de 2-MEC.

Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

Se utilizó la metodología de análisis por FTIR-ATR para analizar la estructura química de las plumas de pollo y de la queratina mediante reducción con Na_2S .

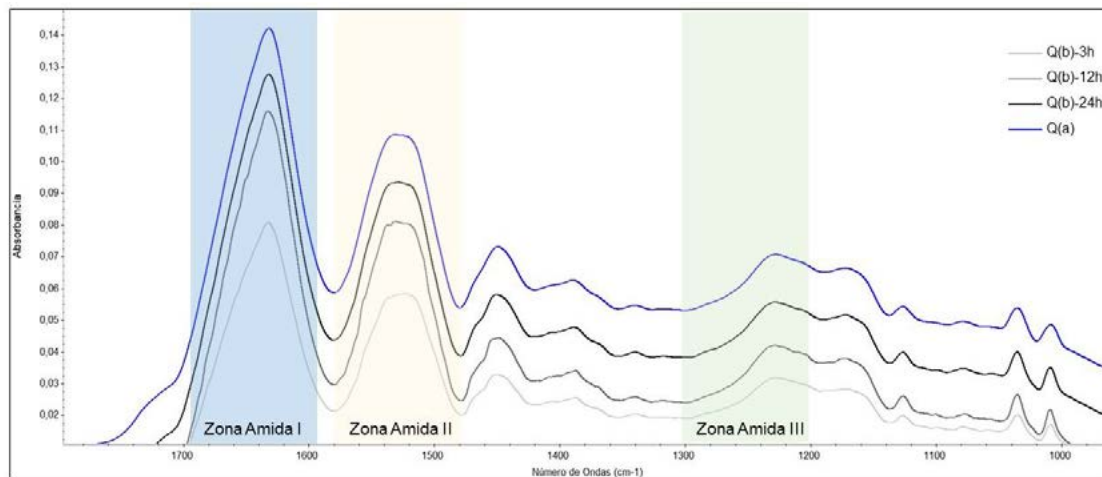


Figura 4. Espectros FTIR-ATR de queratina liofilizada obtenida mediante reducción en medio alcalino con sulfuro de sodio (Na_2S).

En la Figura 4 se presentan los espectros FTIR-ATR de los productos obtenidos mediante las metodologías Q(a) y Q(b) que confirman la presencia de bandas en la región 1700 a 400 cm^{-1} correspondientes a los enlaces peptídicos identificados como Amida I (1600-1690 cm^{-1} ; combinación de las estructuras α -hélice y hoja β -plana y está relacionada con las vibraciones de $\nu(\text{C}=\text{O})$), Amida II (1580-1480 cm^{-1} ; relacionada con la flexión del $\delta(\text{N-H})$ y el estiramiento del enlace $\nu(\text{C-H})$) y Amida III (1300 y 1220 cm^{-1} ; se deriva del estiramiento simétrico $\nu(\text{C-N})$ y la flexión de $\delta(\text{CH})$) [8]. Estas bandas proporcionan información importante sobre la conformación de la estructura de la queratina presente en las plumas de pollo e indican que para los procesos estudiados se conserva la estructura de la queratina sin degradarla por completo.

Determinación del peso molecular:

El análisis de las masas moleculares (MM) de los hidrolizados se realizó mediante la electroforesis en gel de Tricina/SDS-PAGE. Las muestras se incubaron a 100°C por 3 min en condiciones reductoras (DTT 1%p/v). Se identificaron dos fracciones de 66 y 14,4 kDa en todas las muestras. En Q(a) predominó la fracción 14,4 kDa (monómero) sobre la fracción 66 kDa; mientras que en Q(b) la fracción monomérica fue menos notoria, con algún daño en la cadena.

La ausencia de fracciones por debajo de 14,4 kDa sugiere que la cadena primaria de la

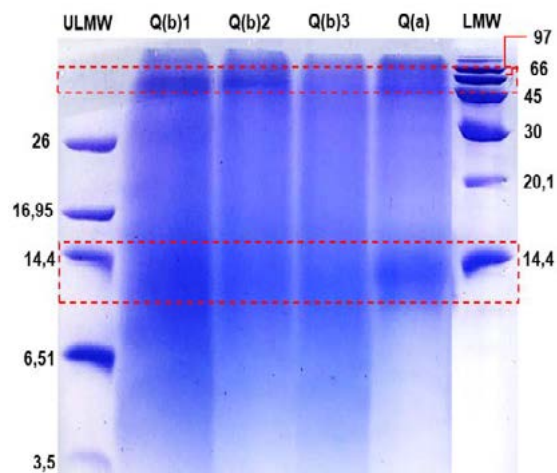


Figura 5. Gel Tricina/SDS-PAGE de la queratina obtenida por reducción con Na_2S . Los carriles de los extremos corresponden a los marcadores de peso

queratina se mantuvo intacta a tiempos cortos de procesamiento según Q(a) y Q(b).

Conclusiones

Se evaluaron diferentes condiciones del proceso de obtención de queratina a partir de las plumas de pollo mediante la reducción con sulfuro de sodio Na_2S , identificando que el rendimiento del proceso depende de las condiciones como la concentración de los reactivos, la temperatura y el tiempo de reacción. La queratina se puede extraer de manera eficiente a partir de las plumas usando Na_2S sin diálisis, aplicar 60°C por 1 h puede aumentar el rendimiento de extracción conservando la estructura de la proteína.

El análisis FTIR-ATR de la queratina obtenida, confirmó la presencia de las 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.

La metodología propuesta permite reemplazar los agentes reductores tradicionales por uno menos contaminante y más económico, y además elimina la etapa de diálisis, constituyendo una alternativa viable para la obtención de queratina a nivel industrial y la revalorización de la biomasa generada por la industria avícola.

Referencias

- [1] AOAC (2010). In Helrich, K. (ed.) Official methods of analysis. Virginia: Association of Official Analytical Chemists
- [2] 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.* 1261, 135–144
- [3] Poole, A. J., Lyons, R. E., & Church, J. S. (2011). Dissolving feather keratin using sodium sulfide for bio-polymer applications. *Journal of Polymers and the Environment*, 19, 995-1004.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] Sharma, S., Gupta, A., Kumar, A., Kee, C. G., Kamyab, H., & Saufi, S. M. (2018). An efficient conversion of waste feather keratin into ecofriendly bioplastic film. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 20(10), 2157-2167.
- [7] Schägger, H., & Von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry*, 166(2), 368-379.
- [8] 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.
- [9] Sinkiewicz, I., Śliwińska, A., Staroszczyk, H., & Kołodziejaska, I. (2016). Alternative Methods of Preparation of Soluble Keratin from Chicken Feathers. *Waste and Biomass Valorization*, 8(4), 1043–1048.
- [10] Vineis C., Varesano A., Varchi G., Aluigi A. (2019) Extraction and Characterization of Keratin from Different Biomasses. In: Sharma S., Kumar A. (eds) *Keratin as a Protein Biopolymer*. Springer Series on Polymer and Composite Materials. Springer, Cham.
- [11] 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.
- [12] 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)

[13] Zhou, L. T., Yang, G., Yang, X. X., Cao, Z. J., & Zhou, M. H. (2014). Preparation of regenerated keratin sponge from waste feathers by a simple method and its potential use for oil adsorption. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(8), 5730-5736.