

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 348**

51 Int. Cl.:

A23J 1/00 (2006.01)
A23J 1/10 (2006.01)
A23J 3/04 (2006.01)
A23K 1/10 (2006.01)
A23K 1/14 (2006.01)
A23K 1/16 (2006.01)
A23K 1/18 (2006.01)
A23J 3/14 (2006.01)
A23J 3/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2005 E 05758102 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2012 EP 1750521**

54 Título: **Método y sistema para solubilizar proteína**

30 Prioridad:

01.06.2004 US 576180 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

30.04.2013

73 Titular/es:

**THE TEXAS A&M UNIVERSITY SYSTEM
(100.0%)
TECHNOLOGY LICENSING OFFICE 3369 - TAMU
COLLEGE STATION, TEXAS 77843, US**

72 Inventor/es:

**HOLTZAPPLE, MARK, T.;
DAVISON, RICHARD;
GRANDA, CESAR y
NOYES, GARY, P.**

74 Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

ES 2 402 348 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

MÉTODO Y SISTEMA PARA SOLUBILIZAR PROTEÍNA

Descripción

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 [0001] La presente invención hace referencia a un proceso para solubilizar proteína, concretamente proteína de fuentes en las cuales la proteína no se solubiliza de inmediato. Algunos modos de realización presentan un proceso para destrozarse priones en una proteína solubilizada.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 [0002] La creciente población mundial ha aumentado las necesidades alimentarias de forma drástica durante las últimas décadas, llevando a una mayor demanda de fuentes de proteínas para animales domesticados. El aumento de población también genera un aumento en la cantidad de residuos que pueden ser una fuente valiosa para producir pienso para animales.

15 [0003] Los procesos para la solubilización de proteína a partir de fuentes biológicas son útiles para convertir la proteína de residuos en fuentes de proteína valiosas. Por consiguiente, se ha desarrollado anteriormente un buen número de tales procesos. Algunos procesos funcionan solo con proteínas que se solubilizan fácilmente. Otros han sido diseñados para mejorar la solubilización de proteína a partir de fuentes en las
20 que la proteína no se solubiliza fácilmente, tal como plumas de pollo.

[0004] Los tratamientos termoquímicos fomentan la hidrólisis de materiales ricos en proteínas, separando polímeros complejos en moléculas más pequeñas, mejorando su digestibilidad y generando productos que permiten que los animales puedan cumplir sus necesidades de mantenimiento, crecimiento y producción con menos pienso en
25 total.

[0005] Un proceso anterior para la solubilización de proteína en plumas de pollo conlleva un tratamiento con vapor. En este proceso las plumas se tratan con vapor para hacer harina de plumas. El proceso solo aumenta ligeramente la solubilidad o digestibilidad de la proteína en las plumas.

30 [0006] Otro proceso anterior conlleva un tratamiento ácido de fuentes de proteína. El tratamiento hidroliza los aminoácidos, pero las condiciones son normalmente tan duras que muchos aminoácidos se destruyen. Las condiciones ácidas también estimulan la formación de enlaces disulfuro en lugar de la destrucción de dichos enlaces, lo que ayudaría a la solubilidad.

35 [0007] Además, las condiciones en sistemas previos pueden no ser adecuadas para

la destrucción de priones en la fuente de proteína original.

[0008] WO2004/043159A1 describe un proceso para solubilizar proteína que incluye la aplicación de un álcali, tal como cal, y el calentamiento. El proceso puede conllevar también la recuperación de la cal y puede conseguirse en una única fase o en dos
5 fases para separar la proteína solubilizada de las fuentes lábiles y recalcitrantes. También participan sistemas y dispositivos para usarse en un proceso como tal, que incluyen un reactor continuo de tanque agitado y un reactor de flujo de pistón. WO89/11797A1 describe un método y un sistema para la hidrólisis continua de material queratinoso. El sistema incorpora un depósito alargado para hidrólisis bajo la
10 presión y temperatura adecuadas que se establece por inyección de vapor directa a través de las válvulas de inyección, por las que la masa del producto se calienta, se fluidiza y se agita de una vez y a la vez.

[0009] De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención se presenta un método para solubilizar proteína que consiste en:

- 15 aplicar un álcali a una fuente de proteína para formar una suspensión;
- calentar la suspensión a una temperatura suficiente para permitir la hidrólisis de la proteína en la fuente de proteína con el fin de obtener un líquido de reacción;
- mantener el líquido de reacción a una temperatura elevada que varía entre 75 y 250 °C durante un periodo de tiempo que varía entre 1 segundo y 5 horas para
20 destruir todos o casi todos los priones en el líquido de reacción;
- separar los sólidos del líquido de reacción;
- neutralizar el líquido de reacción con ácido o una fuente de ácido para producir un líquido neutralizado;
- concentrar el líquido neutralizado para producir líquido concentrado y agua; y
25 devolver el agua a la suspensión antes o durante el paso de calentamiento.

[0010] De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención se presenta un sistema para solubilizar proteína que comprende:

- un medio de reacción operativo para hacer reaccionar una fuente de proteína y un álcali para producir un líquido de reacción;
- 30 un medio de retención operativo para retener el líquido de reacción a una temperatura elevada que varía entre los 75 y los 250 °C durante un periodo de tiempo que varía entre 1 segundo y 5 horas para destruir todos o casi todos los priones en el líquido de reacción;
- un medio de separación sólido/líquido operativo para separar sólidos del líquido
35 de reacción;

un medio de neutralización operativo para permitir la adición de ácido al líquido de reacción y producir un líquido neutralizado;

un medio de concentración operativo para concentrar el líquido neutralizado y para producir un líquido concentrado y agua;

5 un medio operativo para pasar agua desde el medio de concentración al medio de reacción; y

al menos un medio de intercambio de calor operativo para intercambiar el calor de proceso.

[0011] La presente invención incluye un proceso innovador para la solubilización de proteínas. El proceso generalmente conlleva suministrar un álcali, como la cal, a una
10 fuente biológica para producir una suspensión. La proteína en la suspensión se hidroliza para producir un producto líquido. La suspensión puede calentarse para ayudar en el proceso de hidrólisis. Puede resultar un residuo sólido. Este residuo puede ser sometido a otros procesos de la presente invención.

[0012] De acuerdo con un modo de realización específico, la invención incluye un
15 método para solubilizar proteína. El método puede incluir aplicar un álcali a una fuente de proteína para formar una suspensión; calentar la suspensión a una temperatura suficiente para permitir la hidrólisis de la proteína en la fuente de proteína con el fin de obtener un líquido de reacción; separar los sólidos del líquido de reacción; neutralizar
20 el líquido de reacción con ácido o una fuente de ácido para producir un líquido neutralizado; concentrar el líquido neutralizado para producir líquido concentrado y agua; y devolver el agua a la suspensión antes o durante el paso de calentamiento.

[0013] De acuerdo con otro modo de realización específico, la invención incluye un sistema para solubilizar proteína. El sistema puede incluir un reactor calentado capaz
25 de hacer reaccionar una fuente de proteína y un álcali para producir un líquido de reacción. El sistema puede también incluir un separador líquido/sólido capaz de separar sólidos del líquido de reacción. El sistema también puede incluir un tanque de neutralización capaz de permitir la adición de ácido al líquido de reacción para producir un líquido neutralizado y un tanque de concentración capaz de concentrar el líquido
30 neutralizado y producir un líquido concentrado y agua. El sistema puede además incluir un conducto capaz de pasar agua desde el tanque de concentración al reactor calentado y al menos un intercambiador de calor capaz de intercambiar el calor de proceso.

[0014] Ventajas adicionales de algunos modos de realización de la invención
35 incluyen:

Las mezclas de proteínas lábiles y recalcitrantes pueden ser procesadas de forma simultánea.

Pueden usarse los reactores de flujo de pistón ya existentes.

La reducción de residuos se une a la producción de suplemento proteínico o alimentario.

La digestibilidad de la proteína aumenta de forma significativa cuando se solubiliza.

El proceso es simple y permite la recuperación de algunos componentes y del calor.

Se mejora la seguridad de los alimentos si los priones se destruyen.

La trituración aumenta la velocidad de reacción de la asimilación de la proteína, permitiendo una concentración del producto incrementada y una degradación del producto reducida.

Los componentes no reactivos pueden eliminarse.

El producto proteínico puede concentrarse y secarse. Los microorganismos pueden destruirse.

La invención también incluye un sistema de reactores adecuado para procesos internos de la presente invención.

[0015] Para una mejor comprensión de la invención y sus ventajas, puede hacerse referencia a la siguiente descripción de modos de realización ilustrativos y a los dibujos adjuntos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0016] Las siguientes figuras hacen referencia a modos de realización seleccionados de la presente invención.

La FIGURA 1 muestra un diagrama escalonado para la hidrólisis de material rico en proteínas bajo condiciones alcalinas.

La FIGURA 2 es un gráfico que muestra la hidrólisis de plumas de pollo y pelo animal. Cada punto representa la media de tres valores +/- 2 desviaciones estándar.

La FIGURA 3 es un gráfico que muestra la velocidad de reacción frente a la conversión para pelo animal y plumas de pollo.

La FIGURA 4 es un gráfico que muestra la conversión frente al tiempo para la hidrólisis de la proteína de despojos de pollo y cabezas de gamba.

La FIGURA 5 es un gráfico que muestra la conversión frente al tiempo para la

hidrólisis de la proteína de heno de soja y heno de alfalfa.

La FIGURA 6 ilustra un proceso de solubilización de una sola etapa sin recuperación del calcio de acuerdo con un modo de realización de la presente invención.

5 La FIGURA 7 ilustra un proceso de solubilización de dos etapas sin recuperación del calcio de acuerdo con un modo de realización de la presente invención.

La FIGURA 8 ilustra un proceso de solubilización de una sola etapa con recuperación del calcio de acuerdo con un modo de realización de la presente invención.

10 La FIGURA 9 ilustra un proceso de solubilización de dos etapas con recuperación del calcio de acuerdo con un modo de realización de la presente invención.

La FIGURA 10 ilustra un reactor de una etapa de acuerdo con un modo de realización de la presente invención.

15 La FIGURA 11 ilustra un reactor con múltiples etapas con un flujo a contracorriente de acuerdo con un modo de realización de la presente invención.

La FIGURA 12 ilustra un reactor con múltiples etapas con un flujo paralelo de acuerdo con un modo de realización de la presente invención.

La FIGURA 13 ilustra un reactor con múltiples etapas con un flujo cruzado de acuerdo con un modo de realización de la presente invención.

20 La FIGURA 14 ilustra un reactor de flujo de pistón con un mezclador unificado y un transportador sin fin de salida de acuerdo con un modo de realización de la presente invención.

La FIGURA 15 ilustra un reactor de flujo de pistón con un mezclador separado y un transportador sin fin de salida de acuerdo con un modo de realización de la presente invención.

25

La FIGURA 16 ilustra un reactor de flujo de pistón con una tolva de bloqueo de acuerdo con un modo de realización de la presente invención.

La FIGURA 17 ilustra una organización experimental para estudios de hidrólisis de la proteína.

30

La FIGURA 18 es un gráfico que ilustra el efecto de la temperatura en la solubilización de proteína del heno de alfalfa.

La FIGURA 19 es un gráfico que ilustra el efecto de la carga de cal en la solubilización de proteína en heno de alfalfa.

La FIGURA 20 es un gráfico que ilustra el efecto de la concentración de heno de alfalfa en la solubilización de proteína.

35

La FIGURA 21 es un gráfico que ilustra un análisis de la repetibilidad de los resultados para la solubilización de proteína del heno de soja usando cal.

La FIGURA 22 es un gráfico que ilustra el efecto de la temperatura en la solubilización de proteína del heno de soja.

5 La FIGURA 23 es un gráfico que ilustra el efecto de la carga de cal en la solubilización de proteína del heno de soja.

La FIGURA 24 es un gráfico que ilustra el efecto de la concentración de heno de soja en la solubilización de proteína.

10 La FIGURA 25 es un gráfico que ilustra la reproducibilidad de estudios de despojos. Se llevaron a cabo tres secuencias con condiciones de funcionamiento idénticas.

La FIGURA 26 es un gráfico que ilustra una comparación de la conversión con tres concentraciones de despojos diferentes.

15 La FIGURA 27 es un gráfico que ilustra una comparación de la conversión con tres cargas de cal diferentes.

La FIGURA 28 es un gráfico que ilustra una comparación de la conversión con dos temperaturas diferentes.

La FIGURA 29 es un gráfico que ilustra el contenido de aminoácidos del producto líquido sin tratamiento adicional y con tratamiento con 6N HCl.

20 La FIGURA 30 es un gráfico que ilustra una comparación de los aminoácidos presentes en la materia prima y en los sólidos secos tratados. Debido a que el sólido tratado estaba muy húmedo (80% humedad) cuando se retiró del reactor, algunos de los aminoácidos muestran que se derivan de productos líquidos residuales.

25 La FIGURA 31 es un gráfico que ilustra una comparación de los aminoácidos presentes en la fase líquida tras 30 minutos y tras 2 horas en un experimento a 75 °C, 0,075 g cal/g despojos secos, y 60 g despojos secos/l suspensión.

30 La FIGURA 32 es un gráfico que ilustra una comparación de los aminoácidos presentes en la fase líquida tras 30 minutos y tras 2 horas en un experimento a 75 °C, 0,075 g cal/g despojos secos, y 80 g despojos secos/l suspensión.

La FIGURA 33 es un gráfico que ilustra una comparación de los aminoácidos en la fase líquida centrifugada tras 30 minutos con tres concentraciones de despojos iniciales diferentes (g despojos secos/l suspensión) a 75 °C y 0,075 g cal/g despojos secos.

35 La FIGURA 34 es un gráfico que ilustra una comparación de los aminoácidos

presentes en la fase líquida centrifugada con tiempos diferentes a 75 °C, 0,075 g cal/g despojos secos y 40 g despojos secos/l suspensión.

La FIGURA 35 ilustra una organización para generar productos de plumas ricos en aminoácidos usando plumas y despojos como materia prima. 1 es un líquido no centrifugado. 2 es el líquido centrifugado después de un tratamiento con cal. 3 son los residuos sólidos después del tratamiento con cal. 4 es el líquido centrifugado después del burbujeo con dióxido de carbono. 5 es el producto final.

La FIGURA 36 es un gráfico que ilustra la concentración de calcio en función del pH durante la precipitación a través del burbujeo con dióxido de carbono (alto pH inicial).

La FIGURA 37 es un gráfico que ilustra la concentración de calcio en función del pH durante la precipitación con burbujeo de dióxido de carbono (pH inicial más bajo).

La FIGURA 38 es un gráfico que ilustra el efecto de la concentración de pelo secado al aire sobre la solubilización de proteína.

La FIGURA 39 es un gráfico que ilustra el efecto de la carga de cal en la solubilización de proteína de pelo secado al aire.

La FIGURA 40 es un gráfico que ilustra el efecto de la carga de cal sobre la solubilización de proteína de pelo secado al aire en tratamientos a largo plazo.

La FIGURA 41 es un gráfico que ilustra la concentración estimada de nitrógeno proteico, amoniaco y nitrógeno total Kjeldhal en función del tiempo en el experimento A1.

La FIGURA 42 es un gráfico que ilustra la concentración estimada de nitrógeno proteico, amoniaco y nitrógeno total Kjeldhal en función del tiempo en el experimento A2.

La FIGURA 43 es un gráfico que ilustra la concentración estimada de nitrógeno proteico, amoniaco y nitrógeno total Kjeldhal en función del tiempo en el experimento A3.

La FIGURA 44 es un gráfico que ilustra la concentración de aminoácidos libres en función del tiempo en el experimento A2.

La FIGURA 45 es un gráfico que ilustra la concentración de aminoácidos totales en función del tiempo en el experimento A2.

La FIGURA 46 es un gráfico que ilustra la concentración de aminoácidos libres en función del tiempo en el experimento A3.

La FIGURA 47 es un gráfico que ilustra la concentración de aminoácidos totales

en función del tiempo en el experimento A3.

La FIGURA 48 es un gráfico que ilustra el porcentaje de conversión de proteína a la fase líquida en función del tiempo para la hidrólisis de pelo con dos pasos en series.

5 La FIGURA 49 muestra el balance de materia de los procesos de tratamiento con cal de dos pasos y de un paso.

La FIGURA 50 es un gráfico que ilustra la repetitibilidad de la solubilización de proteína de desechos de cabezas de gamba.

10 La FIGURA 51 es un gráfico que ilustra el efecto de la temperatura en la solubilización de proteína de desechos de cabezas de gamba.

La FIGURA 52 es un gráfico que ilustra el efecto de la carga de cal en la solubilización de proteína de desechos de cabezas de gamba.

La FIGURA 53 ilustra un proceso de solubilización de una sola etapa de acuerdo con un modo de realización de la presente invención.

15

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0017] La presente invención hace referencia a un proceso para solubilizar proteína a partir de una fuente biológica a través de la hidrólisis. También hace referencia a dispositivos para su uso en dicha solubilización y a un sistema de solubilización.

20 **[0018]** Los modos de realización específicos descritos de aquí en adelante hacen referencia a la solubilización de proteína de tres grupos diferentes de fuentes biológicas. El primer grupo incluye fuentes de proteína recalcitrantes o queratinosas tal como plumas de pollo y pelo animal. El segundo grupo incluye fuentes de proteína lábiles o de tejido animal tal como despojos de pollo y cabezas de gamba. El tercer grupo incluye fuentes de proteína vegetales tal como el heno de soja y alfalfa. Grupos
25 adicionales de fuentes de proteína y ejemplos dentro de los tres grupos anteriores serán obvios para los expertos en la técnica.

[0019] El proceso generalmente implica la aplicación de un álcali como la cal (Ca(OH)₂ o hidróxido de calcio) a la fuente de proteína a una temperatura concreta. Se
30 obtiene un producto líquido con algo de residuo sólido. En modos de realización específicos descritos a continuación en la tabla 1, se proporcionan las condiciones de proceso adecuadas para cada uno de los tres grupos de fuentes.

Tabla 1. Condiciones de tratamiento adecuadas para la solubilización de proteína

Fuente de proteína	Recalcitrante	Lábil	Vegetal
Temperatura (°C)	100	75	100

Tiempo (h)	4-8 (plumas) 16 (pelo)	0,25	2,5
Carga de cal (g Ca(OH) ₂ /g material)	0,1 (plumas) 0,25 (pelo)	0,075	0,05 - 0,075
Concentración (g material/L suspensión)	100	60-80	60

[0020] En determinados modos de realización de la invención, se usa un reactor de agitación bien aislado para llevar a cabo la hidrólisis de la proteína (solubilización) durante diferentes periodos de tiempo, con el fin de obtener un producto líquido rico en aminoácidos.

[0021] Aunque la cal se usa en algunos modos de realización de la presente invención, pueden usarse en la presente invención álcalis alternativos como óxido de magnesio, hidróxido de magnesio, hidróxido de sodio, carbonato de sodio, hidróxido de potasio y amoníaco. Sin embargo, la mayoría de estos álcalis pueden no ser recuperados por carbonación.

[0022] La cal también presenta beneficios por encima de otros álcalis porque no se disuelve fácilmente en agua. Debido a su baja solubilidad, la cal mantiene un pH relativamente constante (~12) para una solución acuosa, siempre que exista suficiente cal en suspensión en la solución. Esto asegura un pH constante durante el tratamiento termoquímico y unas condiciones de hidrólisis relativamente más débiles (comparado con el hidróxido de sodio y otras bases fuertes), lo que puede reducir la degradación de aminoácidos susceptibles.

[0023] El tratamiento termoquímico de materiales altos en proteínas genera una mezcla de pequeños péptidos y aminoácidos libres. Durante el tratamiento, los extremos de los recién generados ácidos carboxílicos de péptidos o aminoácidos reaccionan en un medio alcalino para generar iones carboxilato, que consumen cal u otros álcalis en el proceso.

[0024] Durante la hidrólisis de la proteína, se dan diversas reacciones secundarias. La FIGURA 1 muestra un diagrama escalonado para la hidrólisis del material rico en proteína bajo condiciones alcalinas. Se genera amoníaco como un subproducto durante la degradación del aminoácido (p.ej., desamidación de asparagina y glutamina, generando aspartato y glutamato como productos). En algunos modos de realización, este amoníaco puede capturarse y neutralizarse con un ácido, tal como el ácido sulfúrico, para producir sales de amonio. Estas sales pueden usarse después como fertilizantes o con otros fines.

[0025] La arginina, la treonina o la serina también pueden ser susceptibles de degradación bajo condiciones alcalinas. La susceptibilidad de la arginina y la treonina a la degradación es de importancia nutritiva porque ambos son aminoácidos esenciales. Reducir el tiempo de contacto entre los aminoácidos y los péptidos solubles con el medio alcalino disminuye la degradación y aumenta la calidad nutricional del producto final. El uso de bajas temperaturas (~100 °C) puede también reducir la degradación.

[0026] Puede usarse un tratamiento escalonado de materiales ricos en proteínas cuando se requieren tiempos de tratamiento a largo plazo para altos rendimientos de solubilización (pelo animal y plumas de pollo). Se obtiene un producto inicial de mejor calidad durante un tratamiento inicial, mientras que posteriormente se genera un producto de menor calidad. Por ejemplo, puede usarse una serie de tratamientos con cal para obtener productos con diferentes características cuando los desechos iniciales son una mezcla. Por ejemplo, en una mezcla de despojos + plumas, un tratamiento inicial podría conseguir la hidrólisis de los despojos de pollo, usando bajas temperaturas y tiempos cortos, mientras que un segundo tratamiento con cal (tiempos mayores y temperatura más elevada) podría digerir las plumas.

[0027] La tabla 2 resume las condiciones adecuadas y los efectos de las diferentes variables del tratamiento (temperatura, concentración, carga de cal y tiempo) en la hidrólisis de la proteína para diferentes materiales.

Tabla 2. Condiciones adecuadas para un tratamiento termoquímico de los materiales estudiados

Material	Notas	Condiciones recomendadas
Heno de alfalfa (15,8% proteína)	La hidrólisis aumenta con la temperatura y la concentración de heno de alfalfa (hasta 60 g/L). La carga de cal tiene el menor efecto significativo pero se necesita para convertir la proteína en pequeños péptidos y aminoácidos libres. Adecuado para rumiantes.	0,075 g Ca(OH) ₂ /g alfalfa, 100°C, 60 min, 60 g/L.
Heno de soja (19% proteína)	La hidrólisis aumenta con la carga de cal y la temperatura (hasta 100°C), recomendado 100°C por los requisitos de baja energía. La concentración de heno de soja no tiene un efecto significativo. El experimento sin cal proporciona conversiones de hidrólisis significativamente menores. Adecuado para rumiantes.	0,05 g Ca(OH) ₂ /g soja, 100 °C, 150 min.
Deshechos de cabezas de gamba	La reacción se completa tras 30 minutos. La temperatura no tiene un efecto significativo. La hidrólisis aumenta con la carga de cal (hasta 0,05 g Ca(OH) ₂ /g gambas secas).	0,05 Ca(OH) ₂ /g gamba seca, al menos 75 °C, al menos 15 min.

	Adecuado para monogástricos.	
Despojos (15% proteína)	No hay cambios significativos en la conversión tras 30 min. La concentración de despojos no tiene efecto significativo. La hidrólisis aumenta con la carga de cal (hasta 0,1 g Ca(OH) ₂ /g despojos secos). Adecuado para monogástricos.	0,075 g Ca(OH) ₂ /g despojos secos, 75°C, al menos 15 min.
Despojos + plumas	Se estudió un proceso con dos pasos: El paso 1 se centra en la hidrólisis de despojos y genera una mezcla de aminoácidos de alta calidad. El paso 2 se centra en la hidrólisis de plumas y genera pienso para rumiantes.	Paso 1: 0,075 g Ca(OH) ₂ /g despojos secos, 50-100 °C, 30 min. Paso 2: ~0,05 g Ca(OH) ₂ /g plumas, 100 °C, 2-4 h.
Plumas (96% proteína)	La hidrólisis tiene lugar más rápido que con pelo, se consigue un 70 % de la conversión tras 6 h. Adecuado para rumiantes.	0,1 g Ca(OH) ₂ /g plumas, 100 °C, 4-8 h.
Pelo (92% proteína)	Se requiere un tratamiento a largo plazo para hidrólisis de alta proteína. Proceso de dos pasos recomendado para reducir la degradación de los aminoácidos. Adecuado para rumiantes.	Paso 1: 0,25 g Ca(OH) ₂ /g pelo, 100°C, 8 h Paso 2: ~0,25 g Ca(OH) ₂ /g pelo, 100°C, 8 h.

[0028] El uso del hidróxido de calcio como el material alcalino en un proceso de la presente invención produce una concentración de calcio relativamente alta en el producto líquido que se obtiene de la reacción (también llamado “solución centrifugada” en algunos modos de realización”). Ya que algunas sales cálcicas tienen baja solubilidad, el calcio puede recuperarse precipitándolo como CaCO₃, Ca(HCO₃)₂ o CaSO₄. Puede preferirse el carbonato de calcio debido a su baja solubilidad (0,0093 g/l, la solubilidad del producto para CaCO₃ es 8,7 x 10⁻⁹). Por el contrario, la solubilidad de CaSO₄ es 1,06 g/l, con una solubilidad del producto de 6,1 x 10⁻⁵, y la solubilidad de Ca(HCO₃)₂ es 166 g/l, con una solubilidad del producto de 1,08. También es más fácil regenerar Ca(OH)₂ a partir de CaCO₃ que a partir de CaSO₄.

[0029] La precipitación del carbonato de calcio haciendo burbujear CO₂ dentro del producto líquido de la reacción tiene como resultado una recuperación de calcio entre el 50 y el 70%. Se recomienda un pH alto en el producto líquido de la reacción antes de la recuperación del calcio (>10) para que durante el proceso se forme carbonato de calcio y no bicarbonato de calcio. En algunos modos de realización un pH de 9 puede ser también suficiente. Un pH final después de la recuperación será entre -8,8 y 9,0.

[0030] Las proteínas resultantes del proceso de la presente invención pueden tener muchos usos, incluyendo el uso de pienso animal. Como norma general, la proteína soluble de fuentes recalcitrantes y vegetales no tiene un perfil bien equilibrado de aminoácidos. Por lo tanto, estas proteínas se usan mejor como pienso rumiante. En las proteínas lábiles, los perfiles de aminoácidos están bien equilibrados, por lo que la

proteína solubilizada puede también usarse como pienso para animales monogástricos. Así, los usos específicos de las proteínas solubilizadas por el presente proceso pueden venir indicados por la fuente original de dichas proteínas. Un beneficio adicional en los usos como pienso animal puede ser la falta de priones en la proteína producida por algunos procesos de la presente invención. Las condiciones de tratamiento con cal son lo suficientemente severas en muchos procesos para destruir considerablemente los priones, y mejorar así la seguridad de cualquier alimento producido usando proteínas solubilizadas.

[0031] Además, en algunos modos de realización la invención puede incluir un paso de retención en el que el líquido de la reacción se calienta a una temperatura elevada durante un periodo de tiempo determinado para destruir todos o una cantidad importante de priones que pueden estar presentes en el líquido. Por ejemplo, el líquido puede calentarse a una temperatura entre 125-250 °C entre 1 segundo y 5 horas.

[0032] Los materiales ricos en proteínas que normalmente se encuentran en los residuos puede ser subdivididos en tres categorías: materiales queratinosos, de tejido animal y vegetales, cada uno con diferentes características.

[0033] El pelo animal y las plumas de pollo tienen un alto contenido en proteínas (~92% y ~96% respectivamente), con algunos contaminantes como minerales, sangre y lípidos del proceso de matanza. El principal componente en el pelo animal y en las plumas de pollo es la queratina. La queratina es una proteína duradera mecánicamente y no reactiva químicamente, consistente con el papel fisiológico que juega: proporcionar una matriz fibrosa y resistente para los tejidos en los que se encuentra. En el pelo, pezuñas, cuernos y lana de los mamíferos, la queratina está presente como α -queratina; y en las plumas de los pájaros está presente como β -queratina. La queratina tiene un valor nutricional muy bajo; contiene grandes cantidades de cisteína y tiene una estructura muy estable que hace que sea difícil de digerir por la mayoría de las enzimas proteolíticas.

[0034] El comportamiento de las plumas de pollo y del pelo animal durante el tratamiento termoquímico procesado de la presente invención se presenta en las FIGURAS 2 y 3. La FIGURA 22 muestra una velocidad de hidrólisis mayor para plumas de pollo que para pelo animal, y una conversión final a proteína digestible más alta. Esta diferencia puede explicarse por una accesibilidad más fácil de la cal a una conformación más extensa en la β -queratina, o por la diferente macroestructura presente en el pelo animal al compararse con las plumas de pollo (estructura fibrilar, porosidad, etc.). Se recomiendan al menos 8 horas para una alta conversión del pelo a

100 °C con 0,1 g Ca(OH)₂/g materia seca carga de cal, pero en el caso de las plumas, se puede conseguir un 70% de conversión en -4 horas.

5 **[0035]** Se halla una relación lineal entre la velocidad de reacción y conversión para ambos materiales (FIGURA 3), indicando un primer orden de velocidad de reacción para la hidrólisis alcalina de la proteína. En altas conversiones se halla un pseudoequilibrio entre hidrólisis y degradación.

10 **[0036]** El tejido animal ofrece menos retos digestivos que los materiales queratinosos. Las células en los tejidos animales contienen núcleos y otros orgánulos en una matriz fluida (citoplasma) unida a una simple membrana plasmática. La membrana plasmática se rompe fácilmente y libera glicógeno, proteína y otros componentes para la digestión por parte de las enzimas o sustancias químicas.

15 **[0037]** Los tejidos animales (despojos y cabezas de gamba) hidrolizan bien en menos de 15 minutos (FIGURA 4) y no necesitan condiciones fuertes de tratamiento; una baja temperatura, una baja carga de cal y tiempos cortos son adecuados. Los lípidos y otros materiales presentes en el tejido animal consumen cal de forma más rápida a través de las reacciones secundarias tal como la saponificación del lípido, lo que resulta en un pH del producto líquido inferior al final del proceso y hace que el producto líquido sea sensible a la fermentación.

20 **[0038]** Tanto las cabezas de gamba como los despojos de pollo son subproductos de proteína animal de la industria alimentaria. Puesto que son tejidos animales, se espera que la distribución de los aminoácidos del producto líquido sea similar a las necesidades animales, aunque la calidad puede variar ya que los materiales varían de un lote a otro. La histidina puede ser el aminoácido limitante en el producto líquido.

25 **[0039]** Otro uso específico para el presente proceso implica la eliminación de desechos de aves muertas en la industria avícola. Por ejemplo, aproximadamente el 5 % de los pollos mueren antes de llegar al matadero. Sin embargo, un típico gallinero no tiene suficientes aves muertas para procesar allí mismo, por lo que se necesita un método para almacenar las aves muertas mientras esperan ser recogidas para su proceso. Al usar un proceso de la presente invención, las aves muertas se pueden pulverizar con un equipo adecuado como un molino de martillos y se le puede añadir cal para aumentar el pH de las aves y evitar su desperdicio. La concentración de cal puede ser aproximadamente de 0,1 g Ca(OH)₂/ g ave muerta seca. Cuando las aves tratadas con cal se recogen y se llevan a la planta central de transformación, pueden calentarse para completar el proceso de solubilización de proteína.

35 **[0040]** Por último, las plantas contienen una matriz lignocelulósica difícil de digerir en

las complejas paredes celulares, lo que hace que sean más difíciles de digerir que el tejido animal. Sin embargo, la presencia de componentes altamente solubles en agua tiene como resultado una alta conversión inicial de la proteína en un líquido durante algunos procesos de la presente invención. La FIGURA 5 compara la velocidad de hidrólisis de la proteína para el heno de alfalfa y soja. Muestra una fracción soluble más alta para el heno de soja que para el heno de alfalfa y una velocidad de hidrólisis similar para ambos materiales.

[0041] El tratamiento con cal de estos materiales vegetales genera un producto pobre en lisina y treonina, lo que hará disminuir el valor nutricional del producto líquido para animales monogástricos.

[0042] En algunos modos de realización de la invención en los que se usa el proceso para solubilizar proteína de las plantas, la fibra resultante en el residuo sólido es también más digestible porque se eliminan los grupos de lignina y acetilo. El tratamiento con cal de los materiales vegetales puede generar dos productos, un producto líquido que es rico en proteína (pequeños péptidos y aminoácidos de la hidrólisis alcalina) y un residuo sólido rico en holocelulosa que puede ser tratado para reducir su cristalinidad y aumentar su degradabilidad. Por lo tanto, se da un efecto sinérgico inesperado cuando algunos procesos de la presente invención se combinan con procesos de digestión vegetales.

[0043] La FIGURA 6 muestra un proceso para la solubilización de proteína en materiales que contienen proteínas. El proceso no incluye la recuperación de la cal. En el proceso, el material que contiene proteínas y la cal se añaden al reactor. En un modo de realización específico, se añade la cal viva (CaO) para que el calor de su reacción cree la forma hidratada, la lima apagada (Ca(OH)₂) reduce la necesidad de calor adicional de la reacción. Los sólidos sin reaccionar pueden lavarse a contracorriente para recuperar la proteína solubilizada atrapada en los sólidos sin reaccionar. El producto líquido que sale del reactor contiene la proteína solubilizada. Un evaporador concentra la proteína solubilizada al retirar casi toda el agua. Preferiblemente debe quedar agua suficiente para que la proteína concentrada aún sea bombeable.

[0044] Los evaporadores adecuados incluyen evaporadores con múltiples efectos y evaporadores por comprensión de vapor. La compresión del vapor puede conseguirse usando ya sea compresores mecánicos o eyectores de chorro. Puesto que el pH es alcalino, cualquier amoníaco que resulte de la degradación de la proteína se volatilizará y entrará en el agua devuelta al reactor. Al final, los niveles de amoníaco

pueden aumentar a niveles inaceptables. En ese momento, puede usarse un vapor de purga para eliminar el exceso de amoníaco. El amoníaco purgado puede neutralizarse usando un ácido. Si se usa un ácido carboxílico, (p. ej., ácido acético, propiónico o butírico) entonces el amoníaco neutralizado puede darse a rumiantes como una fuente de nitrógeno no proteico. Si se añade ácido mineral, el amoníaco neutralizado puede usarse como fertilizante.

[0045] La suspensión de proteína concentrada que sale del evaporador puede ser carbonatada para hacer reaccionar el exceso de cal. En algunas aplicaciones, esta suspensión concentrada puede añadirse directamente a los piensos siempre que las distancias de transporte sean cortas. Sin embargo, si las distancias de transporte son largas y se necesita un producto no perecedero, la suspensión concentrada neutralizada puede secarse por pulverización para dar lugar a un producto seco. Este producto seco contiene una alta concentración de calcio. Puesto que muchos animales necesitan calcio en su dieta, el calcio en la proteína solubilizada puede ser un método útil para cubrir sus necesidades de calcio.

[0046] Haciendo referencia ahora a la FIGURA 7, se ilustra un proceso similar dividido en dos etapas. Este proceso es adecuado para materiales que contienen proteínas que tienen una mezcla de proteínas adecuadas para piensos de rumiantes y monogástricos.

[0047] Por ejemplo, las aves muertas contienen plumas (adecuadas para rumiantes) y despojos (adecuados para monogástricos). La primera etapa del proceso emplea condiciones suaves que solubilizan las proteínas lábiles, que después se concentrarán, neutralizarán y secarán. Estas proteínas se pueden dar a monogástricos. La segunda etapa utiliza condiciones más severas que solubilizan las proteínas recalitrantes, que pueden concentrarse, neutralizarse y secarse. Estas proteínas se pueden dar a rumiantes.

[0048] La FIGURA 8 ilustra un proceso similar al de la FIGURA 6, con un paso adicional de recuperación de calcio para producir un producto bajo en calcio. Para recuperar el calcio, la etapa de evaporación tiene lugar en dos pasos. En el primer evaporador, las proteínas en la corriente existente permanecen en la solución. Se añade dióxido de carbono para precipitar el carbonato de calcio. Durante este paso, el pH es preferiblemente 9 aproximadamente. Añadir demasiado dióxido de carbono tiene como resultado una caída del pH lo que favorece la formación de bicarbonato de calcio. Dado que el bicarbonato de calcio es mucho más soluble que el carbonato de calcio, si esto ocurre se reduce la recuperación de calcio. El carbonato de calcio se

recupera por medio de un filtro. El carbonato de calcio puede lavarse a contracorriente para recuperar la proteína soluble. Después, el segundo evaporador elimina la mayoría del agua restante. Puede dejarse agua suficiente para que la suspensión saliente sea bombeable. Finalmente, la suspensión puede secarse por pulverización para formar un producto no perecedero.

[0049] La FIGURA 9 muestra la versión con dos etapas de la FIGURA 8 que puede usarse para procesar fuentes de proteína que tienen una mezcla de proteínas lábiles y recalcitrantes. La primera etapa solubiliza las proteínas lábiles que son adecuadas para los monogástricos y la segunda etapa solubiliza las proteínas que son adecuadas para rumiantes.

[0050] La FIGURA 10 muestra un reactor continuo de tanque agitado (RCTA) con una sola etapa que es adecuado para procesar proteínas lábiles. Los sólidos salen del reactor a través de un transportador sin fin que exprime el líquido de los sólidos.

[0051] La FIGURA 11 muestra los RCTA con múltiples funciones. Se muestran cuatro etapas, que se aproximan a un reactor de flujo de pistón. Este tipo de reactor es adecuado para usarse con fuentes de proteína vegetales y recalcitrantes. El comportamiento del flujo de pistón minimiza la cantidad de pienso reaccionado que sale con los sólidos gastados. En este modo de realización, el flujo líquido va a contracorriente del flujo del sólido.

[0052] La FIGURA 12 muestra los RCTA en los que el flujo líquido es paralelo al flujo de los sólidos.

[0053] La FIGURA 13 muestra los RCTA en los que el flujo líquido va cruzado al flujo de los sólidos.

[0054] La FIGURA 14 muestra un verdadero reactor de flujo de pistón que es adecuado para fuentes de proteína vegetales y recalcitrantes. La proteína se suministra en el reactor a través de un equipo de sólidos apropiado, tal como un transportador sin fin como se muestra en la FIGURA 14 o una bomba V-ram, que no se muestra. El reactor contiene un eje central que gira "lengüetas" que agitan el contenido. Las "lengüetas" inmóviles están sujetas a la pared del reactor para impedir que el contenido del reactor gire de forma improductiva. El agua pasa a contracorriente del líquido de los sólidos. El agua que sale por encima del reactor contiene un producto proteínico solubilizado. Sale a través de una pantalla para bloquear los sólidos. La naturaleza fibrosa de algunas fuentes de proteína tal como las plumas de pollo, el pelo y las plantas hacen que su filtración sea fácil. Los sólidos sin reaccionar en el fondo del reactor se eliminan usando un transportador sin fin que exprime los

líquidos de los sólidos. En este modo de realización, el líquido exprimido fluye de nuevo hacia el reactor en lugar de hacerlo a través de la pantalla en el lado del transportador sin fin. El objeto de tal disposición es tener la salida de los sólidos como un tapón ajustado para que el agua añadida al fondo del reactor fluya preferiblemente hacia arriba en lugar de hacia abajo. Dado que los sólidos salientes entraron en contacto con el agua que entraba en el reactor justo antes de salir, no se necesita lavar a contracorriente estos sólidos.

[0055] La FIGURA 15 muestra un reactor de flujo de pistón similar al mostrado en la FIGURA 14, con la excepción de que el transportador sin fin no está conectado al eje central del reactor. Esto permite que la velocidad de mezcla y la velocidad del transportador se controlen de forma independiente.

[0056] La FIGURA 16 muestra un reactor de flujo de pistón similar al mostrado en la FIGURA 14, con la excepción de que los sólidos salen a través de una tolva de bloqueo en lugar de un transportador sin fin. Para evitar que entre aire en el reactor, la tolva de bloqueo puede evacuarse entre ciclos.

[0057] La FIGURA 53 muestra un proceso para la solubilización de proteína en materiales que contienen proteínas. Primero, en un paso de trituración opcional, la fuente de proteína se tritura para aumentar su área de superficie. Esto aumenta la velocidad de reacción en el paso de reacción. Una vez la proteína se solubiliza en un reactor, comienza a degradarse, por lo que un paso de reacción más rápido puede reducir la cantidad de degradación. Una velocidad de reacción más rápida puede aumentar la concentración del producto de la reacción, lo que hace más fácil recuperarlo. Si se emplea un paso de trituración, puede conseguirse con molinos de martillos, homogeneizadores en línea, u otro equipo adecuado.

[0058] A continuación se hace reaccionar la proteína con un álcali con un pH y una temperatura elevada. El pH puede caer entre más o menos 10 y 13, puede ser, por ejemplo, 12 aproximadamente. Puede usarse cualquier base en este paso de la reacción, pero en modos de realización seleccionados la base es óxido de calcio, hidróxido de calcio, óxido de magnesio, hidróxido de magnesio, hidróxido de sodio, carbonato de sodio, hidróxido de potasio o amoníaco. El óxido de calcio y el hidróxido de calcio no se disuelven en agua fácilmente y por tanto pueden recuperarse más fácilmente. También amortiguan el pH hasta aproximadamente 12. Además, el calcio es un nutriente dietético y necesita ser eliminado del producto proteínico final. Otros álcalis nutrientes pueden también dejarse en el producto proteínico final. Las condiciones de reacción generales pueden ser tal y como se describen aquí, por

ejemplo, para diferentes fuentes de proteína.

[0059] El reactor puede ser un tanque agitado. Puede hacerse operar a 1 atm, aunque también puede usarse una presión aumentada, especialmente con temperaturas más altas, para conseguir velocidades de reacción más rápidas. El vapor de otras partes del proceso puede usarse para mantener la temperatura del reactor, por ejemplo purgándolo directamente en el reactor.

[0060] Durante la reacción, algunos aminoácidos se descomponen en amoníaco. Este amoníaco normalmente entrará en la fase de gas. Puede neutralizarse con un ácido adecuado, tal como ácido sulfúrico, con el fin de formar sales de amoníaco. Estas sales de amoníaco pueden usarse después como fertilizante o con otras aplicaciones.

[0061] A continuación se separan los sólidos y los líquidos en una corriente que sale de la reacción. Esto puede conseguirse usando un separador sólido/líquido. Los sólidos que se recuperan pueden contener tanto sólidos reactivos, tal como proteínas no solubilizadas, como sólidos inertes, tal como huesos y piedras. La mayoría de los sólidos inertes tienen una mayor densidad que los sólidos reactivos y esa propiedad puede explotarse para ayudar en la separación. Este paso permite un reciclaje repetitivo de los sólidos reactivos, lo que mejora en general el rendimiento del proceso. También permite la extracción de sólidos inertes cuya presencia puede disminuir la eficacia del paso de reacción y el proceso en general.

[0062] Los separadores de densidad que pueden usarse para separar sólidos reactivos e inertes incluyen decantadores e hidrociclones

[0063] A continuación puede tener lugar un paso de retención opcional. En este paso, el líquido del paso de reacción que contiene la proteína solubilizada puede calentarse a una temperatura elevada durante un determinado periodo de tiempo, y después enfriarse. Es posible que el líquido contenga priones intactos después del paso de reacción. Estos priones pueden presentar un problema de salud a algunos animales que luego consumen las proteínas solubilizadas y también a los humanos. Sin embargo, el calentamiento durante el paso de retención puede ser suficiente para destruir todos o una parte importante de cualquiera de los priones presentes en el líquido. Este proceso de retención puede ser similar a la pasteurización. Para diferentes tipos de priones, la temperatura adecuada y los tiempos de retención pueden variar. En la mayoría de los casos existirá una variedad de combinaciones de tiempos de retención y temperatura suficientes para conseguir la destrucción de los priones. En modos de realización específicos, las condiciones del paso de retención pueden elegirse para conseguir un nivel de destrucción de priones deseado, pero

también para limitar de forma simultánea la degradación de los aminoácidos. Por ejemplo, la temperatura del paso de retención puede ser entre 125-250 °C. El tiempo de retención puede ser entre 1 segundo y 5 horas. Para elegir las condiciones más adecuadas en el paso de retención, deben identificarse previamente los priones que podrían darse en la fuente de proteína.

[0064] El paso de retención puede calentarse por vapor. El sistema puede incluir un elemento de intercambio de calor para permitir que el calor del líquido que deja el paso de retención se use para ayudar a calentar el líquido que entra.

[0065] Después el líquido puede neutralizarse con un ácido para reducir el pH a entre 2 y 9. El ácido usado para este paso puede ser casi cualquier ácido o fuente de ácido. En modos de realización específicos, puede ser dióxido de carbono, ácido fosfórico, ácidos carboxílicos, como el ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico, ácido láctico, ácido sulfúrico, ácido nítrico y ácido hidrocloreídrico.

[0066] El dióxido de carbono puede usarse como una fuente de ácido especialmente cuando el álcali contenía calcio. El dióxido de carbono es barato y crea bicarbonato y carbonato de calcio, dependiendo del pH, durante la neutralización del líquido de la reacción que contiene calcio. Tanto el bicarbonato como el carbonato de calcio pueden convertirse de nuevo en cal usando un horno de cal. Esta cal puede reutilizarse en el paso de reacción.

[0067] Debido a que el dióxido de carbono es un gas, puede hacer que el líquido haga espuma durante la neutralización. Para evitar este problema, el dióxido de carbono puede transferirse a la fase líquida usando una membrana microporosa e hidrofóbica, tal como una membrana hecha por Celgard LLC (Carolina del Norte).

[0068] El ácido fosfórico se usa en otro modo de realización específico cuando el líquido de la reacción contiene calcio porque el fosfato de calcio formado es un mineral importante en la formación de los huesos. Por lo tanto, es una adición útil al producto proteínico definitivo.

[0069] En otro modo de realización, los ácidos orgánicos como los ácidos carboxílicos y el ácido láctico pueden usarse para neutralizar el líquido que contiene cualquier álcali. Los ácidos orgánicos son una adición útil al producto proteínico final porque son una fuente de energía para animales.

[0070] Después de la neutralización, puede darse una separación sólido/líquido opcional. Este paso puede ser más útil cuando la neutralización del ácido produce una sal insoluble, como el carbonato de calcio, bicarbonato de calcio, sulfato de calcio o fosfato de calcio. Aunque puede que se deseen algunos de estos materiales en el

producto final, puede que otros no se necesiten o puede que sea necesario reducir su concentración en el producto final. Puede usarse un separador de sólidos/líquidos para eliminar todos los sólidos o parte de ellos del líquido neutralizado. Los separadores de sólidos/líquidos adecuados pueden incluir una prensa filtradora, un filtro con tambor rotativo y un hidrociclón.

[0071] En un modo de realización concreto, tiene lugar la neutralización del líquido de la reacción que contiene calcio a través de la carbonatación con un pH de aproximadamente 9. Esto permite una extracción considerable de calcio en forma de carbonato de calcio altamente insoluble a través de un separador sólido/líquido. Tras eliminarse una cantidad significativa de carbonato de calcio, la carbonatación u otra neutralización puede continuar después para reducir más el pH.

[0072] Después de la neutralización y la separación de sólidos opcional, el líquido neutralizado puede concentrarse. El líquido de la reacción tiene normalmente entre un 2-6% de proteína solubilizada. Esta concentración se ve afectada aunque no de forma significativa por los pasos de retención, neutralización y recuperación de sólidos. Después de la concentración, el líquido concentrado puede tener entre un 35-65% de proteína solubilizada.

[0073] La concentración se puede conseguir por evaporación. Por ejemplo, puede usarse una evaporación por compresión de vapor mecánica con múltiples efectos y una compresión de vapor por eyector de chorro para eliminar el agua del líquido neutralizado. En general, las soluciones de proteínas diluidas tienen a hacer espuma mientras que las concentradas no lo hacen. Como resultado, si los evaporadores se hacen funcionar usando un líquido que contiene al menos un 15% de proteína solubilizada, se reduce la espuma. Además, especialmente para líquidos más diluidos, se puede añadir al líquido un agente antiespumante. Los aceites vegetales son eficaces agentes antiespumantes y añaden un componente de energía al producto proteínico final.

[0074] También puede usarse la filtración para concentrar el líquido neutralizado. Concretamente, puede concentrarse una solución diluida con permeación por agua a través de una membrana adecuada, tal como una membrana de ósmosis inversa o de nanofiltración tensa. Con el fin de minimizar la polarización de la concentración, puede usarse un filtro de disco oscilatorio (p. ej. VESP) para conseguir una alta velocidad de permeación y unas altas concentraciones del producto.

[0075] El líquido neutralizado también puede concentrarse por congelación. Como se forman cristales de hielo, la proteína se excluye en gran parte, lo que tiene como

resultado una separación de agua helada casi pura y una solución de concentración de una solución de aminoácidos/polipéptidos. Los cristales de hielo pueden lavarse, por ejemplo, a contracorriente, para eliminar el producto concentrado de su superficie.

5 **[0076]** El agua también puede extraerse del líquido neutralizado usando varias aminas inmiscibles, como isopropilamina, trimetilamina, metildietilamina y otras aminas.

[0077] El agua extraída durante el paso de concentración puede devolverse al paso de reacción. Puede calentarse antes de su retorno a través de intercambio de calor con el vapor de proceso u otro fluido caliente de otras partes del proceso. Si el agua
10 del paso de concentración está demasiado caliente para el paso de reacción, puede también intercambiarse el calor con un fluido más frío para conseguir una temperatura adecuada antes de añadirse a la reacción.

[0078] El líquido concentrado puede secarse de forma opcional. El secado puede conseguirse usando un equipamiento estándar como secadores por pulverización o
15 secadores de tambor raspador. Los secadores de tambor raspador pueden producir un sólido final con una alta densidad de la carga. Además, el vapor de estos secadores puede recuperarse y usarse para el calor de proceso, tal como el calentamiento del reactor.

[0079] Por lo tanto, el proceso de la FIGURA 53 puede llevarse a cabo en un sistema
20 que tiene un triturador opcional, un reactor, un colector de amoniaco, un separador sólido/líquido, un separador de densidad opcional, un tanque de retención opcional, un tanque de neutralización, otro separador sólido/líquido opcional, un tanque de concentración y un secador opcional. Estos componentes pueden conectarse entre ellos para permitir el procesamiento de la fuente de proteína a un concentrado líquido
25 o un producto seco. Pueden incluirse bucles de retorno para permitir otro procesamiento y/o reutilización según se necesite. También pueden incluirse intercambiadores de calor para regular la temperatura y permitir la reutilización del calor de proceso.

[0080] Se entenderá de inmediato que las condiciones, la maquinaria y otros
30 componentes de los sistemas y procesos de la presente invención pueden intercambiarse entre ellos para producir diferentes procesos y sistemas de solubilización de proteína. Por ejemplo, los componentes descritos para un sistema o proceso pueden usarse con otro para digerir una proteína concreta, conseguir una composición del producto deseada, favorecer el reciclaje y la recuperación de calor, y
35 facilitar la intercambiabilidad entre los diferentes sistemas.

EJEMPLOS

[0081] Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar y describir más a fondo los modos de realización seleccionados de la presente invención. No se pretende que representen de forma literal la envergadura total de la invención. Las variaciones sobre estos ejemplos serán obvias para los expertos en la técnica y también se abarcan con la presente invención.

[0082] En estos ejemplos, los números de experimentos y ecuaciones están destinados a hacer referencia a ecuaciones y experimentos dentro del ejemplo indicado únicamente. Las ecuaciones y los experimentos no están numerados de forma consecutiva o similar entre los diferentes ejemplos.

Ejemplo 1: Equipo y métodos generales

[0083] Se usaron las siguientes ecuaciones y métodos generales en los ejemplos presentes:

[0084] La concentración de los diferentes compuestos en el producto líquido y en las materias primas se determinó por medio de dos procedimientos diferentes: la composición de aminoácidos se determinó por mediciones de HPLC (llevadas a cabo por el Laboratory of Protein Chemistry of Texas A&M University); la determinación de los minerales y el nitrógeno total Kjeldhal se llevó a cabo por parte de Extension Soil, Water and Forage Testing Laboratory of Texas A&M University usando metodologías estándar.

[0085] La medición de la digestibilidad del material lignocelulósico se realizó mediante el test de digestibilidad 3-d usando el método DNS. La biomasa se trituró hasta alcanzar un tamaño adecuado si fuera necesario. Se usó un molino Thomas-Wiley con diferentes tamaños de cedazos situado en el Forest Science Research Center.

[0086] El contenido de humedad, lignina, celulosa, hemicelulosa (holocelulosa) y ceniza de los materiales se determinó usando los métodos del NREL (National Renewable Energy Laboratory).

[0087] Se usaron baños María y baños con agitación por aire con termopares para la medición de la temperatura y el mantenimiento cuando fue necesario. El calentamiento también se consiguió con calentadores de banda y cintas. Los baños de hielo y agua se usaron como sistemas de refrigeración.

[0088] En general, los experimentos en estos ejemplos se llevaron a cabo en un reactor autoclave de 1 litro con un controlador de temperatura y un mezclador alimentado por un motor de velocidad variable (FIGURA 17). Este reactor se presurizó

con N₂ para obtener muestras a través del orificio para toma de muestras. Se usó una alta velocidad de mezcla (~1000 rpm) para provocar un buen contacto entre los sólidos suspendidos y el líquido.

[0089] Las condiciones de tratamiento (para varios materiales orgánicos) se variaron de forma sistemática para explorar el efecto de las variables del proceso –temperatura, tiempo, concentración de materia prima (g material seco/L), y la carga de hidróxido de calcio (g Ca(OH)₂/g material seco)– en la hidrólisis de la proteína. Se tomaron muestras del reactor en momentos diferentes y se centrifugó para separar la fase líquida del material sólido residual.

[0090] En la ecuación 1 se usó la conversión de la muestra centrifugada, basada en el nitrógeno total Kjeldhal inicial (NTK) del material orgánico:

$$Conv_1 = \frac{V_{\text{agua}} \times NTK_{\text{líquido centrifugado}}}{m_{\text{seca}}^{\text{muestra}} \times NTK_{\text{seca}}^{\text{muestra}}} \quad (1)$$

[0091] El producto líquido se analizó usando métodos diferentes con el fin de obtener las concentraciones de aminoácidos y la conversión de la reacción. El primer método determinó el contenido de nitrógeno total de la muestra líquida usando el método modificado de micro-Kjeldhal. La multiplicación del contenido de nitrógeno (NTK) por 6,25 estima el contenido de proteína cruda. El segundo método usó una HPLC para obtener la concentración de aminoácidos individuales presentes en la muestra. En este procedimiento, se trató la muestra con ácido clorídico (150 °C, 1,5 h o 100 °C, 24 h) para convertir proteínas y polipéptidos en aminoácidos; esta medición se conoce como composición de aminoácidos totales. La determinación de la HPLC sin la hidrólisis inicial con HCl determina la composición de aminoácidos libres.

[0092] Otras medidas adicionales incluían: pH final del producto líquido, masa de la materia soluble en el líquido centrifugado tras evaporar el agua a 45 °C y masa del sólido residual tras secar a 105 °C. Esta medición final, la masa de los sólidos residuales, se determinó filtrando la mezcla final a través de una pantalla sin lavarlo de nuevo con agua. Los sólidos retenidos se secaron a 105 °C. El peso en seco incluía no sólo los sólidos insolubles, sino también los sólidos solubles que se retuvieron sin disolver en los sólidos residuales.

Ejemplo 2: Solubilización de proteína en heno de alfalfa

[0093] El heno de alfalfa se usa comúnmente en la nutrición rumiante. Una alta

digestibilidad del pienso asegura que las necesidades del animal se cumplan con menos pienso. El tratamiento del heno de alfalfa genera dos productos separados: una fracción soluble altamente digestible encontrada en el producto líquido y un sólido residual deslignificado.

- 5 **[0094]** El heno de alfalfa se trató con hidróxido de calcio, la base más barata del mercado. En la tabla 3, se resume la composición de alfalfa en diferentes estados.

Tabla 3. Composición de alfalfa en sus diferentes estados (McDonald *et al.*, 1995)

Alfalfa (% de masa seca)	Soluble	Proteína cruda	Lignina	Celulosa	Hemicelulosa
Floración temprana	60	19	7	23	2,9
Floración media	54	18,3	9	26	2,6
Floración completa	48	14	10	27	2,1
Heno, secado al sol, floración temprana	58	18	8	24	2,7
Floración media	54	17	9	26	2,6
Floración tardía	48	14	12	26	2,2
Floración madura	42	12,9	14	29	2,2

- 10 **[0095]** El heno de alfalfa secado al sol se obtuvo de Producers Cooperative en Bryan, Texas; después se trituró con un molino Thomas-Wiley (Arthur H. Thomas Company, Philadelphia, PA) y se coló con una pantalla de malla 40. El contenido de humedad, el nitrógeno total Kjeldhal (estimación de la fracción proteica), y el contenido de aminoácidos se determinaron para caracterizar el material inicial.

- 15 **[0096]** El heno de alfalfa cruda era 89,92 % de material seco y 10,08 % de humedad (tabla 4). El NTK era un 2,534 % correspondiente a una concentración de proteína cruda en alfalfa seca de aproximadamente un 15,84 % (tabla 5). El 84,16 % restante corresponde a fibra, azúcares, minerales y otros. La composición de aminoácidos para heno de alfalfa cruda se da en la tabla 6. El material inicial contenía un contenido relativamente bien equilibrado de aminoácidos (tabla 6) con niveles bajos de tirosina.

20

Tabla 4. Contenido de humedad de heno de alfalfa cruda

Muestra	Sólido (g)	Sólido seco (g)	Sólido seco (%)
1	7,1436	6,4248	89,94
2	5,9935	5,3884	89,90
		Media	89,92

Tabla 5. Contenido de proteína y mineral de heno de alfalfa cruda

Muestra	TKN (%)	P (%)	K (%)	Ca (%)	Mg (%)	Na (ppm)	Zn (ppm)	Fe (ppm)	Cu (ppm)	Mn (ppm)
1	2,5492	0,2	227	1,8383	0,4591	6508	16	90	6	45
2	2,5181	0,2	2,16	17,865	0,4321	6176	16	94	5	42
Mean	2,5336	0,2	2,215	1,8124	0,4456	6342	16	92	5,5	43,5

Tabla 6. Composición de aminoácidos del heno de alfalfa secado al aire

Aminoácidos	Medido	Aminoácidos	Medido
ASP	14,44	TYR	2,94
GLU	11,85	VAL	5,61
SER	6,13	MET	1,01
HIS	1,39	PHE	5,59
GLY	5,30	ILE	4,40
THR	4,95	LEU	10,06
ALA	5,63	LYS	5,77
CYS	ND	TRP	ND
ARG	5,58	PRO	9,35

ND: No determinado Valores en g AA/100 g aminoácidos totales

Experimento 1. Efecto de la temperatura

[0097] Para determinar el efecto de la temperatura al solubilizar proteína en el heno de alfalfa, se llevaron a cabo experimentos con diferentes temperatura manteniendo la carga de cal y la concentración de alfalfa constantes (0,075 g cal/g alfalfa y 60 g alfalfa seca/L respectivamente). Las condiciones experimentales estudiadas y las variables medidas se resumen en la tabla 7.

Tabla 7. Condiciones experimentales y variables medidas para determinar el efecto de la temperatura en la solubilización de proteína del heno de alfalfa

Temperatura (°C)	50	75	90	100	115
Masa de alfalfa (g)	56,7	53,4	56,7	56,7	56,7
Volumen de agua (mL)	850	800	850	850	850
Masa de cal (g)	4,3	4,0	4,3	4,3	4,3
Temperatura inicial (°C)	50,3	73,2	94,1	93,1	105
pH final	11,1	11,3	10,7	9,9	9,85
Sólido residual (g)	39,5	34,9	37	36,8	35
Sólidos disueltos en 100 mL (g)	2,6024	3,549	3,4995	3,6248	3,1551
Proteína in 100 mL (g)	0,346	0,390	0,355	0,338	0,328
Concentración de proteína (%)	13,3	11,0	10,1	9,3	10,4

10

[0098] La tabla 8 muestra el contenido de nitrógeno total en las muestras líquidas centrifugadas en función del tiempo para las diferentes temperaturas. Sobre la base de

la media de NTK para alfalfa seca (2,53 %), se estimaron las conversiones de hidrólisis de la proteína (tabla 9).

Tabla 8. Contenido de nitrógeno total Kjeldhal en la fase líquida centrifugada en función del tiempo para el experimento 1 (heno de alfalfa)

Tiempo (min)	Temperatura				
	50° C	75° C	90° C	100° C	115° C
0	0,0506	0,0503	0,0526	0,0576	0,0474
5	0,0520	0,0669	0,0609	0,0641	0,0620
10	—	0,0640	—	—	—
15	0,0609	0,0653	0,0637	0,0713	0,0756
30	0,0665	0,0655	0,0679	0,0813	0,0813
45	0,0692	0,0771	0,0719	0,0958	0,0955
60	0,0679	0,0771	0,0761	0,1039	0,0927
120	—	0,0778	—	—	—
150	0,0554	—	0,0568	0,0540	0,0525
180	—	0,0624	—	—	—

NTK en g nitrógeno/100 g muestra líquida

Tabla 9. Porcentaje de conversión del NTK total a NTK soluble para el experimento 1 (heno de alfalfa)

Tiempo (min)	Temperatura				
	50° C	75° C	90° C	100° C	115° C
0	33,5	33,3	34,8	38,2	31,4
5	34,4	44,3	40,3	42,5	41,1
10	—	42,4	—	—	—
15	0,3	43,2	42,2	47,2	50,1
30	44,0	43,4	45,0	53,9	53,9
45	45,8	51,0	47,6	63,5	63,3
60	45,0	51,0	50,4	68,8	61,4
120	—	51,5	—	—	—
150	36,7	—	37,6	35,8	34,8
180	—	41,3	—	—	—

5

[0099] El producto final de la hidrólisis de la proteína son aminoácidos individuales, que reaccionan con el hidroxilo, consumen la cal y disminuyen el pH. Esto explica el pH más bajo obtenido para conversiones altas de proteína (tablas 7 y 9).

[0100] La conversión inicial parecida para todas las temperaturas puede explicarse por la alta fracción de componentes solubles en la alfalfa (aproximadamente 50 %, ver tabla 3). La conversión final, más baja que el resto, se explica por los diferentes métodos de toma de muestras. Todas las muestras tempranas se tomaron del reactor por medio del orificio para toma de muestras con la temperatura interna. Para la

muestra final, se enfrió el fluido hasta 35 °C, la presión del nitrógeno se liberó y los sólidos se filtraron antes de que se tomara la muestra. El procedimiento para la toma de muestras de la muestra final se alteró para medir más variables. Se siguió este mismo procedimiento para los otros experimentos.

5 **[0101]** Los componentes de alfalfa altamente solubles están presentes en los sólidos disueltos. La tabla 7 muestra que a 75 °C, la concentración de proteína en el sólido que queda después de la evaporación del líquido es de aproximadamente del 11 %. Aunque esto es en realidad más bajo que el contenido de proteína en la alfalfa cruda, los pasos del procesamiento convierten la proteína en aminoácidos altamente
10 digestibles, y estos aminoácidos se mezclan con otros componentes de la alfalfa altamente digestibles aumentando el valor nutricional del producto final.

[0102] La FIGURA 18 presenta la hidrólisis de la proteína (porcentaje de conversión) en función del tiempo para las diferentes temperaturas estudiadas. La conversión aumenta con temperaturas más altas. La conversión para 100 °C es similar a la que se
15 obtiene a 115 °C; por lo tanto, se prefiere una temperatura más baja porque los aminoácidos deberían degradarse menos, la energía necesaria es menor y la presión de trabajo es más baja.

Experimento 2. Efecto de la carga de cal

20 **[0103]** Para determinar el efecto de la carga de cal en la solubilización de proteína del heno de alfalfa, se llevaron a cabo experimentos con diferentes relaciones cal/alfalfa manteniendo la temperatura y la concentración de alfalfa constantes (75 °C y 40 g alfalfa seca/l respectivamente). Las condiciones experimentales estudiadas y las variables medidas se resumen en la tabla 10.

25

Tabla 10. Condiciones experimentales y variables medidas para determinar el efecto de la carga de cal en la solubilización de proteína del heno de alfalfa						
Carga de cal (g cal/g alfalfa)	0	0,05	0,075	0,1	0,2	0,4
Masa de alfalfa (g)	37,8	37,8	37,8	37,8	37,8	37,8
Volumen de agua (mL)	850	850	850	850	850	850
Masa de cal (g)	0	1,9	2,9	3,8	7,6	15,2
Temperatura (°C)	75	75	75	75	75	75
Temperatura inicial (°C)	78,1	71,2	78,2	58,3	80,3	81,5
pH final	5,7	10	10,7	---	11,4	11,2
Sólido residual (g)	23,5	24,1	22,8	0,3	23,7	29,5
Sólidos disueltos en 100 mL (g)	1,3489	1,8645	2,0201	1,9289	1,9215	2,1651
Proteína en 100 mL (g)	0,286	0,249	0,231	0,267	0,264	0,251

[0104] La tabla 11 muestra el contenido de nitrógeno total en las muestras líquidas centrifugadas en función del tiempo para diferentes temperaturas.

Tabla 11. Contenido de nitrógeno total Kjeldhal en la fase líquida centrifugada en función del tiempo para el experimento 2 (heno de alfalfa)						
Carga de cal						
Tiempo (min)	0 g/g	0.05 g/g	0.075 g/g	0.1 g/g	0.2 g/g	0.4 g/g
0	0,0360	0,0364	0,0353	0,0370	0,0319	0,0345
5	0,0401	0,0394	0,0370	0,0392	0,0394	0,0373
15	0,0457	0,0423	0,0377	0,0427	0,0423	0,0401
30	0,0457	0,0452	0,0451	0,0441	0,0423	0,0450
45	0,0485	0,0466	0,0488	0,0462	0,0481	0,0457
60	0,0485	0,0511	0,0510	0,0478	0,0481	0,0498
150	0,0457	0,0394	0,0370	0,0427	0,0554	0,0401

NTK en g nitrógeno/100 g muestra líquida

- 5 **[0105]** Sobre la base de la media de NTK para el heno de alfalfa seca (2,53 %), se estimaron las conversiones de hidrólisis de la proteína y se detallan en la tabla 12.

Tabla 12. Porcentaje de conversión del NTK total a NTK soluble para el experimento 2 (heno de alfalfa)						
Carga de cal						
Tiempo (min)	0 g/g	0,05 g/g	0,075 g/g	0,1 g/g	0,2 g/g	0,4 g/g
0	35,7	36,1	35,0	36,7	31,6	34,2
5	39,8	39,1	36,7	38,9	39,1	37,0
15	45,3	41,9	37,4	42,3	41,9	39,8
30	45,3	44,8	44,7	43,7	41,9	44,6
45	48,1	46,2	48,4	45,8	47,7	45,3
60	48,1	50,7	50,6	47,4	47,7	49,4
150	45,3	39,1	36,7	42,3	54,9	39,8

- 10 **[0106]** De nuevo, las conversiones iniciales son similares para todas las cargas de cal debido a los componentes altamente solubles presentes en la alfalfa (aproximadamente 50 %, ver tabla 3). La conversión final (150 min) para el experimento con 0,2 g cal/g alfalfa era diferente a las otras porque aumentó mientras que las otras disminuyeron. En el caso de los 0,2 g cal/g alfalfa, se tomó la muestra final por medio del orificio para toma de muestras, mientras que la muestra final para 15 las otras cargas se tomó abriendo el reactor y extrayendo la muestra.

- 20 **[0107]** La FIGURA 19 presenta la proteína solubilizada (porcentaje de conversión) en función del tiempo para las diferentes cargas de cal estudiadas. La conversión es similar para todas las cargas de cal, incluso para el experimento sin cal. Este comportamiento está relacionado con el contenido altamente soluble en el heno de alfalfa.

[0108] En el experimento sin cal, existe proteína soluble presente en la fase del agua; sin embargo, los grupos de hidroxilo se diluyen por lo que no tiene lugar ninguna reacción en la fase sólida o en la interfaz sólido/líquido. Una cantidad más pequeña de aminoácidos libres estaba presente porque la reacción de la hidrólisis tiende a ser más

5 lenta bajo estas condiciones. El pH final fue 5,7; probablemente, el pH se volvió más ácido por los ácidos (p. ej. grupos de acetilo) que se liberaron de la biomasa y de los aminoácidos liberados de las proteínas. Al no usarse cal alguna, la concentración de sólidos disueltos era menor. En el resto de los casos, en la tabla 10, la cal era parte de los sólidos disueltos.

10 **[0109]** La FIGURA 19 muestra que la carga de cal no tiene efecto significativo en la solubilización de proteína del heno de alfalfa. Podría recomendarse una carga de cal mínima para evitar una hidrólisis ácida de la proteína, que tiende a ser más dañina que la hidrólisis alcalina. Esta carga de cal tendría como resultado una concentración más alta de aminoácidos libres en el producto líquido.

15

Experimento 3. Efecto de la concentración de alfalfa

[0110] Para determinar el efecto de la concentración de alfalfa inicial en la solubilización de proteína del heno de alfalfa, se llevaron a cabo experimentos con diferentes concentraciones de alfalfa manteniendo la temperatura y la carga de cal

20 constantes (75 °C y 0,075 g cal/g alfalfa respectivamente). Las condiciones experimentales estudiadas y las variables medidas se resumen en la tabla 13.

Tabla 13. Condiciones experimentales y variables medidas para determinar el efecto de la concentración de alfalfa inicial en la solubilización de proteína

Concentración de alfalfa (g alfalfa seca/L)	20	40	60	80
Masa de alfalfa (g)	18,9	37,8	53,4	75,6
Volumen de agua (mL)	850	850	800	850
Masa de cal (g)	1,5	2,9	4,0	5,7
Temperatura (°C)	75	75	75	75
Temperatura inicial (°C)	78,1	78,2	73,2	82,1
pH final	10,7	10,7	11,3	11
Sólido residual (g)	9,7	22,8	34,9	53,3
Sólidos disueltos en 100 mL (g)	1,0072	2,0201	3,549	4,1349
Proteína en 100 mL(g)	0,154	0,231	0,390	0,450

[0111] La tabla 14 muestra el contenido de nitrógeno total en las muestras líquidas

25 centrifugadas en función del tiempo para diferentes concentraciones de alfalfa. Sobre

la base de la media de NTK para alfalfa seca (2,53 %), se estimaron las conversiones de hidrólisis de la proteína y se presentan en la tabla 15.

Tabla 14. Contenido de nitrógeno total Kjeldhal en la fase líquida centrifugada en función del tiempo para el experimento 3 (heno de alfalfa)

Tiempo (min)	Concentración de alfalfa			
	20 g/L	40 g/L	60 g/L	80 g/L
0	0,0175	0,0353	0,0503	0,0514
5	0,0182	0,0370	0,0669	0,0571
10	---	---	0,0640	---
15	0,0204	0,0377	0,0653	0,0770
30	0,0211	0,0451	0,0655	0,0727
45	0,0218	0,0488	0,0771	0,0946
60	0,0218	0,0510	0,0771	0,0883
120	---	---	0,0778	---
150	0,0247	0,0370	---	0,0720
180	---	---	0,0624	---

Tabla 15. Porcentaje de conversión del NTK total a NTK soluble para el experimento 3 (heno de alfalfa)

Tiempo (min)	Concentración de alfalfa			
	20 g/L	40 g/L	60 g/L	80 g/L
0	34,6	35,0	33,3	25,6
5	36,0	36,7	44,3	28,4
10	---	---	42,4	---
15	40,4	37,4	43,2	38,3
30	41,8	44,7	43,4	36,2
45	43,1	48,4	51,0	47,1
60	43,1	50,6	51,0	44,0
120	---	---	51,5	---
150	48,9	36,7	---	35,8
180	---	---	41,3	---

NTK en g nitrógeno/100 g muestra líquida

5

[0112] La conversión final (150 minutos) para el experimento con 20 g alfalfa/L era diferente a las otras porque aumentó mientras que las otras disminuyeron. En el caso de los 20 g alfalfa/L, la muestra final se tomó por medio de un orificio para toma de muestras, mientras que la muestra final para las otras concentraciones se tomó abriendo el reactor y extrayendo la muestra.

10

[0113] La FIGURA 20 presenta la solubilización de proteína (porcentaje de conversión) en función del tiempo para las diferentes concentraciones de alfalfa estudiadas. La conversión aumenta al tiempo que aumenta la concentración de alfalfa,

hasta que alcanza un máximo entre 60 y 80 g/L; en este punto, debido a que la masa de cal y alfalfa es muy alta, era difícil que la alfalfa entrara en contacto con la fase líquida, lo que disminuyó la conversión. Las conversiones para 80 g/L son similares a las obtenidas para 20 g/L. También las conversiones para 40 y 60 g/L son similares.

5 Como muestra la tabla 13, los sólidos disueltos son mayores con una mayor concentración de alfalfa.

Experimento 4. Análisis estadístico

10 **[0114]** Para determinar si existen relaciones entre las variables estudiadas en la solubilización de proteína del heno de alfalfa, se realizó un experimento factorial 2³ adicional, usando temperatura, carga de cal y carga de alfalfa como variables, y la solubilización del NTK (conversión) a 60 minutos como variable de respuesta. Las condiciones estudiadas se resumen en la tabla 16, así como la conversión obtenida para cada experimento.

15

Condición	Var 1 Temperatura (°C)	Var 2 Carga de cal (g cal/g sólido)	Var 3 Concentración de alfalfa (g/L)	Y Conversión (%)
1	75	0,075	40	50,6
2	100	0,075	40	53,9
3	75	0,1	40	47,4
4	100	0,1	40	58,6
5	75	0,075	60	51,0
6	100	0,075	60	68,8
7	75	0,1	60	60,4
8	100	0,1	60	67,3

20 **[0115]** Usando la variable de respuesta, el algoritmo de Yates se llevó a cabo con los valores de conversión para obtener la media, el efecto variable y la interacción entre las variables estudiadas. Esta información se resume en la tabla 17. Para determinar la variabilidad de la medición, las condiciones 1 y 5 se repitieron por triplicado (tabla 18).

Tabla 17. Resultados algoritmo de Yates (Milton and Arnold, 1990)

Columna 1	Columna 2	Columna 3	Resultados Yates	Interpretación de los resultados de Yates
104,49	210,48	458,00	57,25	Media
105,98	247,52	39,32	9,83	E1 (Efecto de Variable 1)
119,87	14,58	9,27	2,32	E2 (Efecto de Variable 2)

127,65	24,74	-3,00	-0,75	I12 (Interacción de Variables 1 y 2)
3,37	1,49	37,04	9,26	E3 (Efecto de Variable 3)
11,20	7,78	10,16	2,54	I13 (Interacción de Variables 1 y 3)
17,79	7,83	6,29	1,57	I23 (Interacción de Variables 2 y 3)
6,96	-10,83	-18,66	-4,67	I 123 (Interacción de Variables 1,2 y 3)

Tabla 18. Cálculos de la desviación estándar y resultados

Condición	Primera rep.	Segunda rep.	Tercera rep.	Media
5	54,68	47,66	51,04	51,13
1	51,95	50,56	55,12	52,55
	s^2	8,891	s_E	1,491

[0116] En la tabla 18, la varianza (S^2) se calculó como la varianza media de ambas condiciones estudiadas. Después, S_E , la desviación estándar de los efectos variables, se estimó con la varianza media para cuatro valores (el efecto y las interacciones en un factorial 2^3 son el valor medio de cuatro cálculos). Con cuatro grados de libertad y 99 % de confianza, el valor t de Student es 3,747. Después, multiplicar este valor t por S_E (1,491) da los límites de los efectos no significativos en la columna de resultados de Yates (-5,59 y 5,59)

[0117] De la tabla 17, los únicos efectos significativos son los de la variable 1 (temperatura, $E1 = 9,83 > 5,59$) y la variable 3 (concentración de alfalfa, $E3 = 9,26 > 5,59$). Esto es congruente con las observaciones hechas en los experimentos 1 y 3. De los valores obtenidos en el diseño factorial, la presencia de interacciones variables no significativas implica que el efecto de la temperatura y la concentración de alfalfa son aditivos, dando la mayor conversión cuando ambas variables son altas. Este análisis no puede extrapolarse fácilmente a altas temperaturas y concentraciones (como se ve a partir del experimento 3), porque los diferentes fenómenos tienen lugar con condiciones diferentes.

[0118] No existe efecto significativo de la carga de cal en la solubilización de proteína del heno del alfalfa ($E2 = 2,32 < 5,59$), y esta variable no interactúa con las otras variables (I12 y I23 $< 5,59$); por lo tanto, la carga de cal puede basarse únicamente en impedir la hidrólisis ácida de la proteína en aminoácidos, en lugar de la solubilización de proteína. La conversión solo representa la presencia de nitrógeno (proteico) en el producto líquido, no en los aminoácidos hidrolizados individuales.

[0119] Una comparación entre las composiciones de materia prima y el sólido residual proporciona información sobre la efectividad del tratamiento con cal en alfalfa para la solubilización de proteína. La composición de ambos materiales se muestra en la tabla

19. Estos resultados se obtuvieron por la condición 5 del diseño factorial (75 °C, 0,075 g cal/g alfalfa y 60 g alfalfa/L).

Tabla 19. Comparación del contenido de proteína y minerales presente en el heno de alfalfa crudo y el sólido residual tras el tratamiento con cal

Muestra	TKN (%)	P (%)	K (%)	Ca (%)	Mg (%)	Na (%)	Zn (%)	Fe (%)	Cu (%)	Mn (%)
Alfalfa seca	2,5336	0,20	2,21	1,8124	0,4456	5342	16	92	5,5	43,5
Sólido residual	2,2383	0,18	1,42	3,3554	0,4166	3969	71	137	17	37

5 **[0120]** La tabla 19 muestra que la concentración de calcio de los sólidos residuales es mayor que en la alfalfa cruda. Este valor aumenta debido a la cal añadida para el tratamiento, que no es completamente soluble en agua. Los valores para potasio y sodio disminuyen durante el tratamiento con cal debido a la alta solubilidad de estas sales. El nitrógeno presente en el sólido residual es similar al valor obtenido por la materia prima antes del tratamiento con cal. Esto implica que la concentración de nitrógeno en los solubles es similar a la concentración en la materia prima.

[0121] La fracción de alfalfa que se solubilizó en la condición 5 se calculó como se muestra a continuación:

$$\text{fracción soluble} = 1 - \left\{ \frac{32,5 \text{ g sólidos residuales} - [(3,55 \text{ g sólidos disueltos} / 100 \text{ ml líquido}) * 200 \text{ ml humedad}]}{53,4 \text{ g alfalfa inicial}} \right\} = 0,524 \text{ g solubilizados/g de alfalfa.}$$

15 **[0122]** Este cálculo corrige los sólidos disueltos contenidos en 200 ml de líquido. Este valor (0,524 g solubilizados/g alfalfa) se presenta en la tabla 20.

Tabla 20. Variables medidas para la condición 5

Masa de alfalfa (g)	53,4	pH final	11,3
Volumen de agua (mL)	800	Sólido residual (g)	32,5
Masa de cal (g)	4,0	Sólidos disueltos en 100 mL (g)	3,55
Temperatura (°C)	75	Fracción soluble de alfalfa	0,524

Experimento 5. Análisis de aminoácidos

20 **[0123]** El heno de alfalfa se trató con cal durante 60 min y 24 h con las condiciones recomendadas: 100 °C, 0,075 g cal/g alfalfa y 60 g alfalfa/L. El análisis de aminoácidos se llevó a cabo de tres formas diferentes:

- 1) *Análisis aminoácidos libres-producto líquido centrifugado.* El análisis se realizó sin una hidrólisis extra con HCl de la muestra. No se destruyeron aminoácidos

por el procedimiento analítico, pero se perdieron polipéptidos solubles en el análisis.

2) *Análisis aminoácidos totales-producto líquido centrifugado.* El análisis se realizó con una hidrólisis de 24 horas con HCl de la muestra líquida. Se destruyeron algunos aminoácidos por el procedimiento analítico o se convirtieron en otros aminoácidos; se midieron polipéptidos solubles en el análisis.

3) *Producto seco después de evaporar el agua del líquido centrifugado.* Puesto que esta muestra era sólida, era necesaria una hidrólisis con HCl. Se destruyeron algunos aminoácidos (asparagina, glutamina y triptófano) por el ácido y no pudieron medirse.

[0124] Las tablas 21 y 22 muestran la concentración de aminoácidos libres y aminoácidos totales para alfalfa tratada con cal durante 60 min y 24 h respectivamente. La tabla 23 muestra el contenido de proteína y mineral para ambas muestras.

Tabla 21. Concentración de aminoácidos libres y totales para el producto líquido centrifugado de heno de alfalfa hidrolizada con cal durante 60 min

Aminoácido	Aminoácidos libres no hidrolizados		Aminoácidos totales hidrolizados	
	Concentración (mg/L)	Porcentaje (%)	Concentración (mg/L)	Porcentaje (%)
ASN	165,87	17,17	0,00	0,00
GLN	0,00	0,00	0,00	0,00
ASP	54,30	5,62	334,81	23,04
GLU	109,11	11,29	155,35	10,69
SER	44,87	4,64	78,72	5,42
HIS	0,00	0,00	0,00	0,00
GLY	44,50	4,61	86,83	5,98
THR	18,97	1,96	43,65	3,00
ALA	37,34	3,87	76,42	5,26
ARG	77,27	8,00	110,28	7,59
TYR	0,00	0,00	18,68	1,29
CYS	36,57	3,79	ND	0,00
VAL	39,31	4,07	71,03	4,89
MET	4,68	0,48	0,00	0,00
PHE	9,20	0,95	47,82	3,29
ILE	22,62	2,34	39,62	2,73
LEU	27,35	2,83	64,06	4,41
LYS	5,58	0,58	31,22	2,15
TRP	18,81	1,95	ND	0,00
PRO	24978	25,85	294,47	20,27
Total	966,15	100	1452,95	100

Tabla 22. Concentración de aminoácidos libres y totales para el producto líquido centrifugado de heno de alfalfa hidrolizada con cal durante 24 h

Aminoácido	Aminoácidos libres no hidrolizados		Aminoácidos totales hidrolizados	
	Concentración (mg/L)	Porcentaje (%)	Concentración (mg/L)	Porcentaje (%)
ASN	76,10	8,07	0,00	0,00
GLN	0,00	0,00	0,00	0,00
ASP	7026	7,45	239,79	17,51
GLU	116,33	12,33	157,16	11,47
SER	38,93	4,13	76,64	5,59
HIS	0,00	0,00	0,00	0,00
GLY	96,01	10,18	141,65	10,34
THR	9,48	1,00	3728	2,72
ALA	37,19	3,94	74,06	5,41
ARG	75,25	7,98	93,55	6,83
TYR	0,00	0,00	8,43	0,62
CYS	35,66	3,78	ND	0,00
VAL	38,89	4,12	66,17	4,83
MET	0,00	0,00	0,00	0,00
PHE	10,48	1,11	48,45	3,54
ILE	21,90	2,32	39,84	2,91
LEU	25,95	2,75	60,90	4,45
LYS	0,00	0,00	26,76	1,95
TRP	17,56	1,86	ND	0,00
PRO	273,28	28,97	299,16	21,84
Total	943,24	100,00	1369,82	100,00

Tabla 23. Comparación del contenido de proteína y minerales presente en el líquido centrifugado del heno de alfalfa con tratamiento de cal

Muestra	TKN (%)	P (%)	K (%)	Ca (%)	Mg (%)	Na (ppm)	Zn (ppm)	Fe (ppm)	Cu (ppm)	Mn (ppm)
60 min	0,0742	0,0062	0,149	0,2342	0,027	538	2	4	0	2
24 h	0,0926	0,0082	0,155	0,2342	0,031	518	2	6	0	2

[0125] Para todos los experimentos, el líquido centrifugado contenía una concentración muy alta de materia particulada suspendida que podría medirse en la determinación Kjeldhal pero no en el análisis de aminoácidos. Esto explica la diferencia entre la determinación de aminoácidos y la concentración estimada de proteína usando el análisis Kjeldhal (1,45 frente a 4,64 y 1,37 frente a 5,79 g proteína/L)

[0126] Una comparación de las tablas 21-23 muestra que aunque la concentración de nitrógeno aumenta de 60 minutos a 24 h, la concentración total amínica se mantiene relativamente constante, por lo que no existe la necesidad de un tratamiento largo en

la hidrólisis del heno de alfalfa.

[0127] Finalmente, la composición de aminoácidos de los productos se comparó con los aminoácidos esenciales necesarios de varios animales domésticos.

[0128] La tabla 24 muestra la composición de aminoácidos del producto seco y el producto líquido (tanto de aminoácidos libres como de aminoácidos totales – tabla 21). La composición de aminoácidos del heno de alfalfa hidrolizada con cal durante 60 minutos no está equilibrada en cuando a las necesidades de aminoácidos esenciales de los diferentes animales domésticos monogástricos. Existen valores especialmente bajos para histidina, treonina, metionina y lisina; otros aminoácidos son suficientes para la mayoría de animales pero no todos (treonina, tirosina). La hidrólisis con cal del heno de alfalfa genera un producto que es muy alto en prolina y asparagina, pero estos no son aminoácidos esenciales en la dieta de los animales domésticos.

Tabla 24. Análisis de aminoácidos del producto y necesidades de aminoácidos esenciales para varios animales domésticos (heno de alfalfa)

Aminoácido	Siluro	Perros	Gatos	Pollos	Cerdos	Producto seco	Líquido (AAL)	Alfalfa cruda
ASN							17,17	
GLN							0,00	
ASP						7,52	5,62	14,44
GLU						11,40	11,29	11,85
SER						5,32	4,64	6,13
HIS	1,31	1,00	1,03	1,40	1,25	0,71	0,00	1,39
GLY						6,50	4,61	5,30
THR	1,75	2,64	2,43	3,50	2,50	2,53	1,96	4,95
ALA						4,55	3,87	5,63
ARG	3,75	2,82	4,17	5,50	0,00	6,36	8,00	5,58
VAL	2,63	2,18	2,07	4,15	2,67	9,00	4,07	5,61
CYS	2,00*	2,41*	3,67*	4,00*	1,92*	6,36	3,79	ND
MET	2,00*	2,41*	2,07	2,25	1,92*	0,95	0,48	1,01
TYR	4,38 ⁺	4,05 ⁺	2,93 ⁺	5,85 ⁺	3,75 ⁺	2,78	0,00	2,94
PHE	4,38 ⁺	4,05 ⁺	1,40	3,15	3,75 ⁺	5,53	0,95	5,59
ILE	2,28	2,05	1,73	3,65	2,50	5,54	2,34	4,40
LEU	3,06	3,27	4,17	5,25	2,50	10,77	2,83	10,06
LYS	4,47	3,50	4,00	5,75	3,58	1,49	0,58	5,77
TRP	0,44	0,91	0,83	1,05	0,75	ND	1,95	ND
PRO						12,70	25,85	9,35

*Cisteína + Metionina

⁺Tirosina + Fenilalanina

AAL Aminoácidos libres Todos los valores están en g aminoácido/100 g proteína.

[0129] Las diferencias entre las dos muestras líquidas (aminoácidos totales frente a los libres) pueden explicarse por la degradación ácida de algunos aminoácidos (especialmente triptófano, asparagina y glutamina) en la determinación de los aminoácidos totales. También puede que algunas proteínas en el líquido centrifugado no hayan sido hidrolizadas por la cal y pueden estar presentes como polipéptidos solubles que no fueron detectados por el análisis HPLC. La diferencia entre los aminoácidos totales en la muestra líquida y el producto seco se explica por la alta concentración de materia suspendida presente en la muestra líquida (centrifugación a 3500 rpm durante 5 min). Esta materia suspendida no se determinó durante la medición de los aminoácidos totales porque el primer paso antes de la hidrólisis con HCl es la centrifugación a 15000 rpm. La materia suspendida forma una parte importante del producto seco y esto explica el resultado tan diferente para la composición de aminoácidos.

[0130] La solubilización de proteína más alta para alfalfa (68%) se consiguió usando 60 minutos, 0,075 g $\text{Ca(OH)}_2/\text{g}$ alfalfa, 100 °C y 60 g alfalfa seca/L. La solubilización de proteína aumenta con la temperatura; una mayor concentración de alfalfa inicial aumenta la conversación hasta un límite entre 60 y 80 g alfalfa/L.

[0131] Debido a la alta solubilidad de los componentes de la alfalfa, la proteína solubilizada era alta y no cambió dramáticamente para todos los casos estudiados (43% a 68%). La carga de cal tiene el menor efecto de las cuatro variables estudiadas, pero se necesita algo de cal para impedir que los ácidos que están presentes de forma natural en la alfalfa dañen los aminoácidos y para obtener una relación más alta de aminoácidos libres en el producto final.

[0132] Finalmente, la composición de aminoácidos del producto se compara pésimamente con las necesidades de aminoácidos esenciales para varios animales domésticos monogástricos. El producto es bajo en histidina (subestimado en el análisis), treonina, metionina y lisina. Es especialmente rico en asparagina y prolina, pero estos no son necesarios en las dietas animales. El producto proteínico es más adecuado para rumiantes.

[0133] El tratamiento con cal aumenta la digestibilidad de la fracción holocelulosa (Chang *et al.*, 1998) lo que proporciona un valor añadido al sólido residual a partir del tratamiento termoquímico. El uso de ambos productos como pienso para rumiantes asegura una digestión más eficaz cuando se compara con el material inicial.

Ejemplo 3: Solubilización de proteína en heno de soja

[0134] La soja se cosecha normalmente para generar varios productos alimentarios.

Durante el proceso de cosecha, se genera en grandes cantidades un producto de desecho sin usar.

[0135] Además, algunas condiciones meteorológicas especiales (p. ej. larga temporada de sequía, larga temporada de lluvias) dificultan el crecimiento de la soja.

5 Un bajo rendimiento de la cosecha dirige la cosecha de soja a la generación de pienso animal (heno de soja), en lugar de a la industria alimentaria.

[0136] El tratamiento del heno de soja generará dos productos separados: una fracción soluble altamente digestible y un sólido residual deslignificado. Una mayor digestibilidad del pienso asegura que las necesidades del animal quedarán cubiertas
10 con menos pienso.

[0137] El heno de soja secado al sol (es decir, hojas, tallos y habas de plantas de soja segadas) se obtuvo de Terrabon Company; después se trituró usando un molino Thomas-Wiley (Arthur H. Thomas Company, Philadelphia, PA) y se coló con una pantalla de malla 40. El contenido de humedad, el nitrógeno total (estimación de la
15 fracción proteica), y el contenido de aminoácidos se determinaron para caracterizar el material inicial.

[0138] En la tabla 25, se resume la composición de soja en sus diferentes estados.

Tabla 25. Composición de soja en sus diferentes estados (McDonald *et al.*, 1995)

Soja	Fibra cruda (g/kg)	Proteína cruda (g/kg)	Proteína cruda digestible (g/kg)	Almidón y azúcar
Harina de soja	58	503	-	124
Harina de soja, grasa total	48	415	-	91
Heno, secado al sol	366	156	101	-

20 **[0139]** El heno de soja era 91,31 % material seco y 8,69 % humedad (tabla 26). El NTK era 3,02 % correspondiente a una concentración de proteína cruda en heno de soja seca de aproximadamente 19% (tabla 27). El 81 % restante corresponde a fibra, azúcares, minerales y otros. La composición de aminoácidos para el heno de soja cruda se da en la tabla 28.

25

Tabla 26. Contenido de humedad del heno de soja secado al aire

Muestra	Sólido (g)	Sólido seco (g)	Sólido seco (%)
1	5,1781	4,7297	91,34
2	5,5824	5,0967	91,30
3	5,4826	5,0048	91,29
		Media	91,31

Tabla 27. Contenido de proteína y mineral del heno de soja secado al aire

Muestra	TKN (%)	P (%)	K (%)	Ca (%)	Mg (%)	Na (ppm)	Zn (ppm)	Fe (ppm)	Cu (ppm)	Mn (ppm)
Soja cruda	3,0183	0,37	2,24	1,6477	0,3606	1399	34	280	13	53

Tabla 28. Composición de aminoácidos del heno de soja secado al aire

Aminoácido	Medido	Aminoácido	Medido
ASP	16,79	TYR	2,82
GLU	15,10	VAL	4,85
SER	5,65	MET	0,88
HIS	2,55	PHE	5,36
GLY	4,46	ILE	4,27
THR	4,23	LEU	9,32
ALA	4,82	LYS	5,93
CYS	ND	TRP	ND
ARG	7,75	PRO	5,21

ND: No determinado Valores en g AA/100 g aminoácidos totales.

Experimento 1. Repetibilidad de los resultados

- [0140]** Para determinar la repetibilidad de los resultados al solubilizar proteína en el heno de soja, se realizaron experimentos con las mismas condiciones: temperatura, carga de cal y concentración de heno de soja (100 °C, 0,05 g cal/g heno soja y 60 g heno soja seca/L respectivamente). Las condiciones experimentales estudiadas y las variables medidas se resumen en la tabla 29.

Tabla 29. Condiciones experimentales y variables medidas para determinar la repetibilidad de los resultados en la solubilización de proteína del heno de soja

Experimento	B	E	J	K
Masa de heno de soja (g)	55,9	55,9	55,9	55,9
Volumen de agua (mL)	850	850	850	850
Masa de cal (g)	2,8	2,8	2,8	2,8
Temperatura inicial (°C)	93	93,5	105	98,1
pH final	8,6	8,9	8,6	8,9
Sólido residual (g)	35,3	36,8	37	35,4
Sólidos disueltos in 100 mL (g)	2,5706	23927	2,7449	2,7116
Proteína en 100 mL (g)	0,770	0,799	0,837	0,779

10

- [0141]** La tabla 30 muestra el contenido de nitrógeno total en las muestras líquidas centrifugadas en función del tiempo para las mismas condiciones de temperatura,

carga de cal y concentración de heno de soja. Sobre la base de la media de NTK para heno de soja seco (3,02 %), se estimaron las conversiones de hidrólisis de la proteína (tabla 31).

Tabla 30. Contenido de nitrógeno total Kjeldhal en la fase líquida centrifugada en función del tiempo para el experimento 1 (heno de soja)

Tiempo (min)	B	E	J	K
0	0,0808	0,0741	0,0799	0,0831
5	0,0768	0,0837	0,0837	0,0876
15	0,0916	0,0876	0,0965	0,0996
30	0,1002	0,0939	0,1028	0,1078
45	0,1068	0,0977	0,1084	0,1203
60	0,1008	0,1009	0,1239	0,1222
150	0,1231	0,1277	0,1338	0,1246

NTK en g nitrógeno/100 g muestra líquida

Tabla 31. Porcentaje de conversión del NTK total a NTK soluble para el experimento 1 (heno de soja)

Tiempo (min)	B	E	J	K	Media
0	44,6	40,9	44,1	45,8	43,8
5	42,4	46,2	46,2	48,3	45,8
15	50,5	48,3	53,2	55,0	51,8
30	55,3	51,8	56,7	59,5	55,8
45	58,9	53,9	59,8	66,4	59,8
60	55,6	55,7	68,4	67,4	61,8
150	67,9	70,5	73,8	68,7	70,2

5

[0142] La FIGURA 21 presenta la hidrólisis de la proteína del heno de soja en función del tiempo para cuatro secuencias diferentes con las mismas condiciones experimentales. Existe una variabilidad relativamente pequeña de un caso a otro; la varianza tiende a aumentar en los valores medios y es más pequeña en los extremos.

10 A partir del comportamiento del tiempo, los valores a 150 min están cercanos a la conversión máxima porque la velocidad de cambio es relativamente pequeña para todos los casos.

Experimento 2. Efecto de la temperatura

15 **[0143]** Para determinar el efecto de temperatura al solubilizar proteína en el heno de soja, se realizaron experimentos con diferentes temperaturas manteniendo la carga de cal y la concentración de heno de soja constantes (0,05 g cal/g heno de soja y 60 g

heno de soja seca/L, respectivamente). Las condiciones experimentales estudiadas y las variables medidas se resumen en la tabla 32.

Temperatura (°C)	75	100	115
Masa de heno de soja (g)	55,9	55,9	55,9
Volumen de agua (mL)	850	850	850
Masa de cal (g)	2,8	2,8	2,8
Temperatura inicial (°C)	75,3	93	100,2
PH final	9,5	8,6	8
Sólido residual (g)	36,2	35,3	34,6
Sólidos disueltos en 100 mL (g)	2,7593	2,5706	2,6568
Proteína en 100 mL (g)	0,647	0,770	0,823

- 5 **[0144]** La tabla 33 muestra el contenido de nitrógeno total en las muestras líquidas centrifugadas en función del tiempo para diferentes temperaturas. Sobre la base de la media del NTK para el heno de soja seco (3,02 %), se estimaron las conversiones de hidrólisis de la proteína (tabla 34).

Tiempo (min)	Temperatura		
	75°C	100°C *	115°C
0	0,0822	0,0795	0,0781
5	0,0869	0,0830	0,0856
15	0,0889	0,0938	0,093
30	0,0916	0,1012	0,1008
45	0,0969	0,1083	0,1094
60	0,0982	0,1120	0,1140
150	0,1035	0,1273	0,13115

*Media de las cuatro secuencias experimentales.
NTK en g nitrógeno/100 g muestra líquida.

Tiempo (min)	Temperatura		
	75°C	100°C *	115°C
0	45,4	43,8	43,1
5	47,9	45,8	47,2
15	49,0	51,8	51,3

30	50,5	55,8	55,6
45	53,5	59,8	60,4
60	54,2	61,8	62,9
150	57,1	70,2	72,6

*Media de las cuatro secuencias experimentales.

[0145] La FIGURA 22 presenta la hidrólisis de la proteína (porcentaje de conversión) en función del tiempo para las diferentes temperaturas estudiadas. La conversión aumenta con mayores temperaturas. La conversión para 100 °C es similar a la que se obtiene a 115 °C; por lo tanto, se prefiere la temperatura más baja porque los aminoácidos deberían degradarse menos, la energía necesaria es menos y la presión de trabajo es menor.

[0146] Un análisis de la tabla 32 muestra de nuevo que el pH disminuyó cuando la solubilización de proteína aumentó porque más cal reacciona con los productos aminoácidos y porque el porcentaje de proteína del producto aumenta al tiempo que aumenta la conversión.

[0147] Las conversiones a 75 °C son estadísticamente diferentes de las de 100 y 115 °C. En todos los casos, las velocidades de reacción tienden a disminuir con 150 min.

15 *Experimento 3. Efecto de la carga de cal*

[0148] Para determinar el efecto de la carga de cal en la solubilización de proteína del heno de soja, se realizaron experimentos con diferentes relaciones de cal/heno de soja manteniendo la temperatura y la concentración de heno de soja constantes (100 °C y 60 g heno de soja seca/L respectivamente). Las condiciones experimentales estudiadas y las variables medidas se resumen en la tabla 35.

Tabla 35. Condiciones experimentales y variables medidas para determinar el efecto de la carga de cal en la solubilización de proteína del heno de soja

Carga de cal (g cal/g heno de soja)	0	0,05	0,1
Masa de heno de soja (g)	55,9	55,9	55,9
Volumen de agua (mL)	850	850	850
Masa de cal (g)	0	2,8	5,6
Temperatura (°C)	100	100	100
Temperatura inicial (°C)	93,5	98,1	90,5
pH final	5,9	8,9	10,8
Sólido residual (g)	36,1	35,4	34,4
Sólidos disueltos en 100 mL(g)	2,1803	2,7116	3,4937
Proteína en 100 mL (g)	0,560	0,779	0,906

[0149] La tabla 36 muestra el contenido de nitrógeno total en las muestras líquidas

centrifugadas en función del tiempo para diferentes cargas de cal. Sobre la base de la media de NTK para el heno de soja seca (3,02 %), se estimaron las conversiones de hidrólisis de la proteína y se proporcionan en la tabla 37.

[0150] Las conversiones iniciales son similares para todas las cargas de cal por los componentes solubles presentes en el heno de soja.

Tabla 36. Contenido de nitrógeno total Kjeldhal en la fase líquida centrifugada en función del tiempo para el experimento 3 (heno de soja)

Tiempo (min)	Carga de cal		
	0(g/g)	0,05 (g/g)*	0,1 (g/g)
0	0,0787	0,0795	0,0761
5	0,0850	0,0830	0,0811
15	0,0908	0,0938	0,1147
30	0,0895	0,1012	0,0965
45	0,0914	0,1083	0,1128
60	0,0888	0,1120	0,1178
150	0,0895	0,1273	0,1448

*Media de las cuatro secuencias experimentales.
NTK en g nitrógeno/100 g muestra líquida.

Tabla 37. Porcentaje de conversión del NTK total a NTK soluble para el experimento 3 (heno de soja)

Tiempo (min)	Carga de cal		
	0 (g/g)	0,05 (g/g)*	0,1 (g/g)
0	43,4	43,8	42,0
5	46,9	45,8	44,7
15	50,1	51,8	63,3
30	49,4	55,8	53,2
45	50,4	59,8	62,2
60	49,0	61,8	65,0
150	49,4	70,2	79,9

*Media de las cuatro secuencias experimentales.

[0151] La FIGURA 23 presenta la proteína solubilizada (porcentaje de conversión) en función del tiempo para diferentes cargas de cal estudiadas. La conversión aumenta al tiempo que aumenta la carga de cal, proporcionando el efecto máximo cuando se cambia del experimento sin cal al de 0,05 g/g carga de cal. El “equilibrio” se consigue en el caso sin cal con 15 min y un tratamiento más a 100 °C no genera una solubilización de proteína adicional. Por lo tanto, se requiere una carga de cal mínima para una solubilización de proteína eficaz en el heno de soja. La diferente entre 0,05 y 0,1 g/g de carga de cal es estadísticamente significativa solo para los 150 min.

[0152] En el experimento sin cal, el pH final era 5,9. De forma similar, el pH se volvió ácido por los ácidos (p. ej. grupos de acetilo) liberados de la biomasa y por los aminoácidos liberados de las proteínas. Puesto que no se usó cal, la concentración de sólidos disueltos era más baja. En todos los otros casos presentados en la tabla 35, la cal era una parte de los sólidos disueltos.

Experimento 4. Efecto de la concentración de heno de soja

[0153] Para determinar el efecto de la concentración de heno de soja inicial en la solubilización de proteína, se realizaron experimentos con diferentes concentraciones de heno de soja manteniendo la temperatura y la carga de cal constantes (100 °C y 0,05 g cal/g heno de soja, respectivamente). Las condiciones experimentales estudiadas y las variables medidas se resumen en la tabla 38.

Concentración de heno de soja (g heno de soja seca/L)	40	60	80
Masa de heno de soja (g)	37,8	53,4	75,6
Volumen de agua (mL)	850	800	850
Masa de cal (g)	2,9	4,0	5,7
Temperatura (°C)	75	75	75
Temperatura inicial (°C)	78,2	73,2	82,1
pH final	10,7	11,3	11
Sólido residual (g)	22,8	34,9	53,3
Sólidos disueltos en 100 mL (g)	2,0201	3,549	4,1349
Proteína en 100 mL (g)	0,231	0,390	0,450

[0154] La tabla 39 muestra el contenido de nitrógeno total en las muestras líquidas centrifugadas en función del tiempo para las diferentes concentraciones de heno de soja. Sobre la base de la media de NTK para el heno de soja seca (3,02 %), se estimaron las conversiones de la hidrólisis de la proteína y se proporcionan en la tabla 40.

Tiempo (min)	Concentración de heno de soja		
	40 g/L	60 g/L	80 g/L
0	0,0531	0,0741	0,1065
5	0,0503	0,0837	0,1215

15	0,0592	0,0876	0,1264
30	0,0639	0,0939	0,1399
45	0,0681	0,0977	0,1514
60	0,0701	0,1009	0,1472
150	0,1028	0,1277	0,1221

NTK en g nitrógeno/100 g muestra líquida.

Tabla 40. Porcentaje de conversión del NTK total a NTK soluble para el experimento 4 (heno de soja)

Tiempo (min)	Concentración de heno de soja		
	40 g/L	60 g/L	80 g/L
0	44,0	43,8	44,1
5	41,7	45,8	50,3
15	49,1	51,8	52,3
30	53,0	55,8	57,9
45	56,5	59,8	62,7
60	58,1	61,8	60,9
150	85,2	70,2	50,5

[0155] La FIGURA 24 presenta la solubilización de proteína (porcentaje de conversión) en función del tiempo para las diferentes concentraciones de heno de soja estudiadas. Muestra que la solubilización de proteína no varía con una concentración de heno de soja con tiempos menores de 60 min. Los valores con 150 min probablemente tienen algunos problemas de muestreo porque los resultados no son comparables con los valores previos. De la tabla 38, los sólidos disueltos y la proteína presentes en el producto final aumentan cuando la concentración de heno de soja aumenta.

[0156] Una comparación entre las composiciones de materia prima y el sólido residual proporciona información sobre la efectividad del heno de soja tratado con cal para la solubilización de proteína. La composición para ambos materiales se muestra en la tabla 41. Estos resultados se obtuvieron con 100 °C, 0,05 g cal/g heno de soja y 60 g heno de soja/L.

Tabla 41. Comparación del contenido de proteína y mineral presente en el heno de soja cruda con el sólido residual y el líquido centrifugado tras el tratamiento con cal

Muestra	TKN (%)	P (%)	K (%)	Ca (%)	Mg (%)	Na (ppm)	Zn (ppm)	Fe (ppm)	Cu (ppm)	Mn (ppm)
Soja cruda	3,0183	0,37	224	1,6477	0,3606	1399	34	280	13	53
Sólido residual	1,9824	0,33	0,78	3,1171	0,1845	1326	19	158	9	35

Líquido										
centrif.	0,1176	0,0104	0,155	0,2114	0,0146	104	2	10	0	2
*Durante 150 min.										

[0157] La tabla 41 muestra que la concentración de calcio del sólido residual es mayor que en el heno de soja cruda. Este valor aumenta debido a la cal añadida para el tratamiento, la cual no es soluble en agua completamente. Los valores para otros

5 minerales disminuyen durante el tratamiento de cal debido a la alta solubilidad de estas sales. El nitrógeno presente en el sólido residual es un 33 % menor que el valor obtenido para la materia prima antes del tratamiento con cal.

[0158] El líquido centrifugado tiene una concentración de calcio muy alta, debido a la cal, y esto implica que la concentración de calcio en el producto final (tras la

10 evaporación del agua del líquido centrifugado) será más alta que el contenido de nitrógeno. La relación entre proteína y calcio en el producto final es:

$$\text{relación} = (0.1176 \times 6.25) / 0.2114 = 3.48 \text{ g proteína / g Ca.}$$

[0159] La fracción de heno de soja que se solubilizó se calcula como se muestra a continuación:

15

$$\text{fracción soluble} = 1 - \{26,2 \text{ g sólidos residuales} - [(15,6 \text{ g sólidos disueltos} / 572 \text{ ml líquido}) * 200 \text{ ml humedad}]\} / 55,9 \text{ g heno de soja inicial} = 0,450 \text{ g solubilizados/g de heno de soja.}$$

20 [0160] Este cálculo corrige los sólidos disueltos contenidos en los 200 ml de líquido. Los sólidos no se lavaron, por lo que el líquido retenido incluye sólidos disueltos. Este valor (0,450 g solubilizados/g heno de soja) se presenta en la tabla 42.

Tabla 42. Variables medidas para 100 °C, 0,05 g cal/g heno de soja y 60 g heno de soja/L			
Masa de heno de soja (g)	55,9	pH final	9,7
Volumen de agua (mL)	850	Sólido residual (g)	36,2
Masa de cal (g)	2,8	Sólidos disueltos en 572 mL (g)	15,6
Temperatura (°C)	100	Fracción soluble de heno de soja	0,45

25 *Experimento 5. Análisis de aminoácidos*

[0161] El heno de soja se trató con cal durante 150 min y 24 h con las condiciones recomendadas: 100 °C, 0,05 g cal/g heno de soja y 60 g heno de soja/L. El análisis de aminoácidos se llevó a cabo de tres formas diferentes:

- 1) *Análisis aminoácidos libres-producto líquido centrifugado.* El análisis se realizó sin hidrólisis de la muestra extra con HCl. No se destruyeron aminoácidos por el procedimiento analítico, pero pueden perderse polipéptidos solubles en el análisis.
- 5 2) *Análisis aminoácidos totales-producto líquido centrifugado.* El análisis se realizó con una hidrólisis de 24 horas con HCl de la muestra. Se destruyeron algunos aminoácidos por el procedimiento analítico o se convirtieron en otros aminoácidos; en el análisis se miden los polipéptidos solubles.
- 10 3) *Producto seco después de evaporar el agua del líquido centrifugado.* Puesto que esta muestra era sólida, era necesaria una hidrólisis con HCl. Se destruyeron algunos aminoácidos (asparagina, glutamina y triptófano) por el ácido y no pudieron medirse.

[0162] La tabla 43 y la tabla 44 muestran la concentración de aminoácidos libres y de aminoácidos totales para el heno de soja tratado con cal durante 150 min y 24 h, respectivamente. La tabla 45 muestra el contenido de proteína y mineral para ambas muestras.

Tabla 43. Concentración de aminoácidos libres y totales para el producto líquido centrifugado del heno de soja en 150 min

Aminoácido	Aminoácidos libres no hidrolizados		Aminoácidos totales hidrolizados	
	Concentración (mg/L)	Porcentaje (%)	Concentración (mg/L)	Porcentaje (%)
ASN	213,48	30,64	0,00	0,00
GLN	0,00	0,00	0,00	0,00
ASP	69,49	9,97	447,76	33,01
GLU	46,46	6,67	172,72	12,73
SER	9,12	1,31	52,72	3,89
HIS	14,51	2,08	35,29	2,60
GLY	61,58	8,84	106,68	7,87
THR	6,36	0,91	37,01	2,73
ALA	20,63	2,96	58,07	4,28
ARG	97,44	13,98	142,70	10,52
TYR	0,00	0,00	16,78	1,24
CYS	36,45	5,23	0,00	0,00
VAL	20,71	2,97	4820	3,55
MET	0,00	0,00	0,00	0,00
PHE	25,63	3,68	55,38	4,08
ILE	10,35	1,48	34,89	2,57
LE U	13,21	1,90	54,62	4,03
LYS	0,00	0,00	37,77	2,78

TRP	25,86	3,71	0,00	0,00
PRO	25,58	3,67	55,72	4,11
Total	696,85	100	1356,33	100

Tabla 44. Concentración de aminoácidos libres y totales para el producto líquido centrifugado de heno de soja con 24 min

Aminoácido	Aminoácidos libres no hidrolizados		Aminoácidos totales hidrolizados	
	Concentración (mg/L)	Porcentaje (%)	Concentración (mg/L)	Porcentaje (%)
ASN	98,37	17,04	0,00	0,00
GLN	0,00	0,00	0,00	0,00
ASP	82,54	14,30	336,84	25,65
GLU	45,62	7,90	196,13	14,93
SER	6,44	1,12	52,93	4,03
HIS	0,00	0,00	25,71	1,96
GLY	97,90	16,96	150,13	11,43
THR	0,00	0,00	33,85	2,58
ALA	26,50	4,59	69,22	5,27
ARG	81,84	14,18	122,09	9,30
TYR	0,00	0,00	20,91	1,59
CYS	34,26	5,94	0,00	0,00
VAL	19,19	3,33	50,05	3,81
MET	0,00	0,00	0,00	0,00
PHE	21,72	3,76	54,20	4,13
ILE	10,79	1,87	37,79	2,88
LEU	7,83	1,36	60,64	4,62
LYS	0,00	0,00	35,50	2,70
TRP	23,27	4,03	0,00	0,00
PRO	20,88	3,62	67,49	5,14
Total	577,16	100	1313,48	100

Tabla 45. Comparación del contenido de proteína y minerales presentes en el líquido centrifugado de heno de soja tratado con cal

Muestra	TKN (%)	P (%)	K (%)	Ca (%)	Mg (%)	Na (ppm)	Zn (ppm)	Fe (ppm)	Cu (ppm)	Mn (ppm)
150 min	0,1176	0,0104	0,155	0,2114	0,0146	104	2	10	0	2
24 h	0,1562	0,0146	0,149	0,2716	0,0186	104	2	16	0	2

5 **[0163]** En ambos casos, la concentración de aminoácidos totales es animal. La proteína dobla la concentración de aminoácidos libres. Esto muestra que el 50% de los aminoácidos están presentes en forma de pequeños péptidos.

[0164] En todos los experimentos, el líquido centrifugado contenía una concentración muy alta de materia particulada suspendida que podría medirse en la determinación

Kjeldhal pero no en el análisis de aminoácidos. Esto explica la diferencia entre la determinación de aminoácidos y la concentración estimada de proteína del análisis Kjeldhal (1,36 frente a 7,35 y 1,31 frente a 9,76 g proteína/L).

5 **[0165]** Una comparación de las tablas 43-45 muestra que aunque la concentración de nitrógeno aumenta de 150 min a 24 h, la concentración amínica total permanece relativamente constante, por lo que no existe necesidad de un tratamiento largo en la hidrólisis del heno de soja.

10 **[0166]** Finalmente, la composición de aminoácidos del producto proteínico se compara con las necesidades de aminoácidos esenciales de varios animales domésticos.

15 **[0167]** La tabla 46 muestra que el producto de aminoácidos de la hidrólisis del heno de soja no está equilibrado con respecto a las necesidades de los diferentes animales domésticos monogástricos. Existen valores especialmente bajos para histidina, treonina, metionina y lisina; otros aminoácidos (tirosina, valina) son suficientes para la mayoría de los animales, pero no todos. La hidrólisis de cal del heno de soja genera un producto que es muy rico en asparagina, la cual no es esencial en la dieta de los animales. El producto proteínico es más adecuado para rumiantes.

Tabla 46. Análisis de aminoácidos del producto y las necesidades de aminoácidos esenciales para varios animales domésticos (heno de soja)

Aminoácido	Siluro	Perros	Gatos	Pollos	Cerdos	Producto seco	Líquido (AAL)	Materia prima
ASN							30,64	
GLN							0,00	
ASP						6,68	9,97	16,79
GLU						9,56	6,67	15,10
SER						7,11	1,31	7,84
HIS	1,31	1,00	1,03	1,40	1,25	0,00	2,08	2,55
GLY						10,69	8,84	4,46
THR	1,75	2,64	2,43	3,50	2,50	1,80	0,91	4,23
ALA						5,05	2,96	4,82
ARG	3,75	2,82	4,17	5,50	0,00	6,19	13,98	7,75
VAL	2,63	2,18	2,07	4,15	2,67	7,08	2,97	4,85
CYS	2,00*	2,41*	3,67*	4,00*	1,92*	9,22	5,23	ND
MET	2,00*	2,41*	2,07	2,25	1,92*	0,87	0,00	0,88
TYR	4,38 ⁺	4,05 ⁺	2,93 ⁺	5,85 ⁺	3,75 ⁺	2,71	0,00	2,82
PHE	4,38 ⁺	4,05 ⁺	1,40	3,15	3,75 ⁺	5,26	3,68	5,90
ILE	2,28	2,05	1,73	3,65	2,50	5,15	1,48	4,27
LEU	3,06	3,27	4,17	5,25	2,50	9,81	1,90	9,32
LYS	4,47	3,50	4,00	5,75	3,58	1,10	0,00	5,93
TRP	0,44	0,91	0,83	1,05	0,75	ND	3,71	ND

PRO	11,70	3,67	5,21
*Cisteína + Metionina + Tirosina + Fenilalanina AAL Aminoácidos libres Todos los valores están en g aminoácido/100 g proteína.			

[0168] Las diferencias entre las dos muestras líquidas (aminoácidos libres frente a los totales – tablas 43 y 45) pueden explicarse por la degradación ácida de algunos aminoácidos (especialmente triptófano, asparagina y glutamina) en la determinación de aminoácidos totales. También puede que algunas proteínas en el líquido centrifugado no hayan sido hidrolizadas por la cal y pueden estar presentes como polipéptidos solubles que no fueron detectados por el análisis HPLC. La diferencia entre los aminoácidos totales en la muestra líquida y el producto seco se explica por la alta concentración de materia suspendida presente en la muestra líquida (centrifugación a 3500 rpm durante 5 min). Esta materia suspendida no se determinó durante la medición de los aminoácidos totales porque el primer paso antes de la hidrólisis con HCl es la centrifugación a 15000 rpm. La materia suspendida forma una parte importante del producto seco y esto explica el resultado tan diferente para la composición de aminoácidos.

[0169] La solubilización de proteína más alta (85%) se consiguió usando 0,05 g Ca(OH)_2 /g heno de soja, 150 minutos, 100 °C y 40 g heno de soja seca/L. El efecto de las variables estudiadas en este experimento puede resumirse como:

[0170] La solubilización de proteína aumenta con la temperatura, donde 100 °C tienen los mismos resultados que 115 °C. La temperatura recomendada es 100 °C porque las necesidades de energía son menores y no se necesita un depósito bajo presión. La concentración inicial de heno de soja no tiene un efecto importante en la solubilización de proteína en tiempos menores a 60 min. Se necesita una carga de cal mínima (al menos 0,05 g Ca(OH)_2 /g heno de soja) para solubilizar proteína de forma eficaz. En todos los casos, la solubilización de proteína aumenta con el tiempo y los valores máximos obtenidos son con 150 min. La concentración de heno de soja tiene el efecto menos significativo de las cuatro variables estudiadas.

[0171] Una comparación del análisis de aminoácidos para el producto de hidrólisis y las necesidades de aminoácidos esenciales para varios animales domésticos monogástricos muestra que no se trata de un producto bien equilibrado. Tiene una alta concentración de asparagina, un aminoácido no esencial.

[0172] Como en el caso del heno de alfalfa, el producto proteínico es más adecuado para rumiantes. El tratamiento con cal aumenta la digestibilidad de la fracción holocelulosa (Chan *et al.*, 1998), proporcionando un valor añadido al sólido residual a

partir del tratamiento termoquímico. El uso de ambos productos como pienso para rumiantes asegura una digestión más eficaz cuando se compara con el material inicial.

Ejemplo 4: Solubilización de proteína en despojos de pollo

5 [0173] Los despojos de pollo se obtuvieron de Texas A&M Poultry Science Department. Aunque en general, los despojos pueden contener huesos, cabezas, picos y patas, en este caso solo tenían los órganos internos (p. ej. corazón, pulmones, intestino, hígado). Los despojos se mezclaron durante 10 min en un mezclador industrial, se recogieron en botellas de plástico y finalmente se congelaron a -4 °C
10 para un uso posterior. Las muestras de este material mezclado se usaron para obtener el contenido de humedad, el nitrógeno total (estimación de la fracción proteica), la ceniza (fracción mineral) y el contenido de aminoácidos para caracterizar el material inicial.

[0174] La ecuación 1 define la conversión de la muestra centrifugada basada en el
15 nitrógeno total Kjeldhal (NTK) inicial de los despojos:

$$Conv_1 = \frac{V_{\text{agua}} \times NTK_{\text{líquido centrifugado}}}{m_{\text{despojos secos}} \times NTK_{\text{despojos secos}}} \quad (1).$$

[0175] La ecuación 2 define la conversión de la muestra no centrifugada basada en el nitrógeno total Kjeldhal (NTK) inicial de los despojos:

$$Conv_2 = \frac{V_{\text{agua}} \times NTK_{\text{líquido no centrifugado}}}{m_{\text{despojos secos}} \times NTK_{\text{despojos secos}}} \quad (2).$$

20

[0176] La ecuación 3 estima la pérdida fraccional de NTK del nitrógeno inicial de los despojos, usando un balance de materia:

$$L_{NTK} = 1 - \frac{V_{\text{agua}} \times NTK_{\text{líquido no centrifugado}}}{m_{\text{despojos secos}} \times NTK_{\text{despojos secos}}} \quad (3).$$

[0177] Los despojos crudos eran un 33,3 % de material seco y 66,7 % de humedad
25 (ver tabla 47). La concentración de proteína cruda de los despojos secos era aproximadamente un 45 % y el contenido de ceniza era aproximadamente un 1 %; el 54 % restante era fibra y grasa.

Crisol	Despojos (g)	Materia seca (g)	% Peso seco
J	32,2197	10,6402	33,024
A	30,8807	10,4548	33,855
4	28,6961	9,512	33,147
		Media	33,342

Materia seca (horno a 105°C).

Experimento 1. Efecto de las variables de proceso

[0178] El experimento 1 incluía ocho secuencias catalogadas de la A a la H. Las secuencias A, B y C se probaron a 100 °C, con 20 g de despojos secos/L y 0,1 g Ca(OH)₂/g despojos secos. Estas condiciones se obtuvieron a partir de los resultados óptimos de un experimento previo que estudiaba el mismo tipo de reacción para plumas de pollo (Chang and Holtzaple, 1999). Las secuencias restantes (de la D a la H) se llevaron a cabo con diferentes condiciones de funcionamiento, como se muestra en la tabla 48.

10

Sec.	Temperatura (°C)	Masa de Ca(OH) ₂ (g)	Masa de despojos húmedos (g)	Volumen de agua (mL)	Carga Ca(OH) ₂ (g/g despojos secos)	Conc. de despojos secos (g/L)	pH Final
A	100	1,70	51,5	850	0,099	20,20	9,50
B	100	1,70	51,2	850	0,100	20,08	9,65
C	100	1,70	51,5	850	0,099	20,20	9,50
D	100	3,40	102,3	850	0,100	40,13	9,55
E	100	5,10	153,3	850	0,100	60,13	9,50
F	100	2,55	102,5	850	0,075	40,21	8,90
G	100	1,70	102,4	850	0,050	40,17	9,10
H	75	3,40	102,4	850	0,100	40,17	10,10

[0179] La tabla 49 muestra el contenido de nitrógeno total en las muestras líquidas centrifugadas en función del tiempo para las ocho secuencias. Sobre la base de la media de NTK para despojos secos (7,132 %), se estimaron las conversiones de hidrólisis de la proteína y se proporcionan en la tabla 50. Las conversiones en la tabla 50 se presentan de forma gráfica en las FIGURAS 25-28 V.4.

15

Tabla 49. Contenido de nitrógeno total Kjeldhal en la fase líquida centrifugada en función del tiempo para el experimento 1 (despojos de pollo)

Experimento								
Tiempo(min)	A	B	C	D	E	F	G	H
5	0,0698	0,0520	0,0635	0,1332	0,2112	0,1438	0,0862	0,1191
10	0,0721	0,0543	0,0658	0,1354	0,2112	0,1461	0,0851	0,1191
15	0,0721	0,0543	0,0647	0,1366	0,2134	0,1473	0,0851	0,1213
25	0,0721	0,0554	0,0658	0,1388	0,2156	0,1495	0,0874	0,1179
35	0,0721	0,0566	0,0647	0,1388	0,2145	0,1517	0,0874	0,1191
45	0,0721	0,0554	0,0635	0,1388	0,2168	0,1495	0,0874	0,1179
60	0,0721	0,0600	0,0658	0,1399	0,2156	-	-	-
90	0,0721	0,0600	0,0669	0,1445	0,2156	-	-	-
120	0,0721	0,0589	0,0669	0,1433	0,2168	0,1507	0,0918	0,1202
180	0,0765	0,0623	0,0681	0,1433	0,2179	-	-	-

[0180] NTK en g nitrógeno/100 g muestra líquida

Tabla 50. Conversión fraccional del NTK total a NTK soluble para el experimento 1 (despojos de pollo – ecuación 1)

Experimento								
Tiempo(min)	A	B	C	D	E	F	G	H
5	0,467	0,350	0,425	0,466	0,511	0,502	0,301	0,416
10	0,482	0,365	0,440	0,473	0,511	0,510	0,297	0,416
15	0,482	0,365	0,433	0,478	0,516	0,514	0,297	0,424
25	0,482	0,373	0,440	0,485	0,522	0,522	0,305	0,412
35	0,482	0,381	0,433	0,485	0,519	0,529	0,305	0,416
45	0,482	0,373	0,425	0,485	0,525	0,522	0,305	0,412
60	0,482	0,404	0,440	0,489	0,522	---	---	---
90	0,482	0,404	0,447	0,505	0,522	---	---	---
120	0,482	0,396	0,447	0,501	0,525	0,526	0,321	0,420
180	0,512	0,419	0,456	0,501	0,527	---	---	---

- 5 **[0181]** Las FIGURAS 25-28 muestran que con estas condiciones, la conversión del nitrógeno en la fase sólida a la fase líquida no era eficaz (entre el 45 y 55 %). Esto implica que una buena parte de la proteína de la fase sólida no reacciona con el hidróxido o que los aminoácidos formados se precipitan de nuevo a la fase sólida. Otra consideración es la presencia de grasas en la materia prima que consume hidróxido y
- 10 por lo tanto retrasa la hidrólisis de la proteína.

[0182] Las FIGURAS 25-28 muestran que la reacción tiene lugar durante los primeros 10-15 min del tiempo de contacto y después la conversión (concentración) se mantiene constante.

[0183] La FIGURA 25 muestra que los resultados de diferentes secuencias que

emplean las mismas condiciones experimentales proporcionan conversiones comparables. La FIGURA 26 muestra que las conversiones son similares para diferentes concentraciones de materia prima iniciales. Esto significa que la concentración de aminoácidos en la fase líquida será más alta para una concentración de despojos inicial más alta.

[0184] La figura 27 muestra que las cargas de cal bajas tienen conversiones bajas; por lo tanto, la reacción necesita una carga mínima. Ya que se obtienen resultados similares con una carga de cal de 0,075 y 0,1, se usará el mínimo de 0,075 g $\text{Ca(OH)}_2/\text{g}$ despojos secos. La FIGURA 28 muestra que con 75 °C, la reacción es casi tan rápida como lo es a 100 °C. Se prefiere una temperatura más baja porque los aminoácidos se degradarán menos.

Experimento 2. Optimización del proceso

[0185] En el experimento 2, el objetivo era encontrar condiciones en las que la conversión es más alta (más eficaz). El experimento 2 incluía un total de ocho secuencias clasificadas de la I a la P. Ya que la reacción es rápida y la conversión es constante tras 15 min, solo se necesita una muestra para obtener una condición representativa de la reacción. La tabla 51 muestra las condiciones experimentales y la concentración de NTK en las muestras líquidas.

20

Tabla 51. Condiciones experimentales y resultados para el experimento 2 (despojos de pollo – dos muestras para cada secuencia)							
Sec.	Temperatura (°C)	Conc. de Ca(OH)_2 (g/g drv offal)	Conc. de despojos secos (g(L))	pH final	Tiempo de la muestra	NTK	NTK
I	50	0,100	40	8,35	1,5 h	0,2067	0,2067
J	100	0,075	40	8,45	30 min	0,169	0,2209(a)
K	100	0,075	40	8,45	2 h	0,1722	0,2296(a)
L	75	0,075	40	-	30 min	0,2046	0,234(a)
M	75	0,075	40		2 h	0,2231	0,2318(a)
N	100	0,400	40	12,05	1 h	0,1116	0,1094
O	100	0,300	40	12,0	1-2 h	0,1203	0,1289
P	75	0,300	40	12,0	1-2 h	0,143	0,1463

(a) Muestra líquida no centrifugada. NTK en g nitrógeno/100 g muestra líquida.

[0186] La tabla 52 muestra que para las secuencias de la I a la M, la conversión varía entre 63 % y 84 % usando la ecuación 1 (es decir, NTK líquido por NTK añadido en los

sólidos). Para las secuencias de la J a la M, la conversión varía entre 83 % y 84 % usando la ecuación 2 (es decir, NTK líquido en una muestra no centrifugada por NTK añadido en los sólidos. La ecuación 3, para las secuencias de la J a la M, muestra una pérdida del 13 % del nitrógeno inicial de los despojos a 75 °C y una pérdida del 15 % del nitrógeno inicial de los despojos a 100 °C. No está claro a dónde va el nitrógeno perdido. Quizás se pierde en la fase gaseosa, o quizás se adhiere a las superficies metálicas en el reactor. La tabla 51 y la tabla 52 muestran que para las secuencias con las conversiones más altas, el pH final es más bajo que el que se obtiene en el experimento 1 y en las otras secuencias en el experimento 2. A partir del experimento 10 2, se puede recomendar una temperatura de 75 °C, con una carga de cal de 0,075 g Ca(OH)₂/g despojos secos.

Tabla 52. Conversión fraccional del NTK total a NTK soluble para el experimento 2 (despojos de pollo)

Sec.	Conversión Muestra 1	Conversión Muestra 2	Pérdida fraccional de NTK
I	0,781(1)	0,781(1)	
J	0,634(1)	0,829(2)	0,171(3)
K	0,646(1)	0,861(2)	0,139(3)
L	0,768(1)	0,879(2)	0,121(3)
M	0,838(1)	0,870(2)	0,130(3)
N	0,436(1)	0,411(1)	
O	0,452(1)	0,484(1)	
P	0,536(1)	0,548(1)	

(1) Conversión calculada usando la ecuación 1.

(2) Conversión calculada usando la ecuación 2.

(3) Nitrógeno perdido calculado usando la ecuación 3.

Experimento 3. Análisis de producto final

15 **[0187]** La FIGURA 29 muestra el espectro de los aminoácidos para dos muestras líquidas centrifugadas obtenidas bajo las condiciones del experimento 2 (carga de cal 0,075 g Ca(OH)₂/g despojos secos, temperatura de 75 °C, concentración de despojos de 40 g despojos secos/L y tiempo de 1 h). Primero, la composición de aminoácidos en la muestra líquida centrifugada cruda sin tratamiento adicional se determinó por el análisis HPLC. En segundo lugar, la muestra líquida centrifugada se trató con 6-N HCl 20 durante 1 h, lo que hidrolizó la proteína en sus correspondientes aminoácidos. Al comparar ambos resultados, se puede concluir que la cal hidroliza los despojos de pollo en aminoácidos individuales; los resultados de ambos supuestos son prácticamente idénticos.

[0188] La FIGURA 30 compara el espectro de los aminoácidos para despojos crudos y para el residuo sólido que queda después del tratamiento con cal. Para hacer esto, se secaron los sólidos residuales a 105 °C durante 24 h y se tomó una muestra para la medición de la proteína. Puesto que el contenido de agua de este residuo sólido era
5 aproximadamente un 80%, la proteína medida venía tanto de la fase líquida como de la sólida. El contenido de aminoácidos en los sólidos residuales es mucho menor que en los despojos crudos porque los aminoácidos se han disuelto en la fase líquida.

[0189] Al usar los balances de materia y los datos mostrados en la Figura V.6, la cantidad de cada aminoácido “extraído” de la materia prima varía entre el 50 % y el 75
10 %. Sin embargo, esto incluye la proteína en el líquido que se adhiere a los sólidos. Si se sustrae la proteína disuelta en el líquido adherido, la extracción para cada aminoácido varía entre un 52% y un 76% de la proteína cruda, lo cual es similar a los resultados obtenidos en el experimento 2.

[0190] Otro aspecto importante es determinar la degradación de los aminoácidos
15 individuales en las condiciones de funcionamiento del reactor. Con el fin de determinar esto, se necesita obtener la concentración de aminoácidos con dos tiempos diferentes. La FIGURA 31 muestra que los aminoácidos presentes en la fase líquida centrifugada con 30 min son casi idénticos a los de 2 h; esto implica que los aminoácidos son estables en condiciones de funcionamiento. La FIGURA 32 muestra que con una
20 concentración inicial diferente de despojos, los aminoácidos, de nuevo, tienen la misma concentración con 30 min y con 2 h.

[0191] La FIGURA 33 compara los resultados de tres concentraciones de despojos
iniciales diferentes, con el mismo tiempo, temperatura y carga de cal. Estos resultados muestran que la concentración de aminoácidos en la fase líquida centrifugada es más
25 alta para una concentración inicial más alta de materia prima, como se esperaba.

[0192] La FIGURA 34 examina la concentración de aminoácidos en función del
tiempo para los primeros 10 min de reacción. La concentración estabiliza los aminoácidos tras 10 min, y los valores de 30 min son también comparables. Esto
implica que la reacción tiene lugar durante los primeros 10 a 30 minutos de contacto,
30 como se concluía en el experimento 1.

[0193] A partir de los experimentos llevados a cabo usando métodos Kjeldhal y HPLC, el contenido del nitrógeno era comparable en ambos casos (ver tabla 53). Estos resultados implican que la principal contribución al contenido de nitrógeno total es de los aminoácidos (es decir, el contenido de la proteína de los despojos de pollo).

Tabla 53. Comparación de los resultados para el contenido de nitrógeno (g nitrógeno/100 g muestra líquida) con métodos Kjeldhal y HPLC para los experimentos en la Figura V.10

	2 min	3 min	5 min	10 min
HPLC	0,065	0,072	0,211	0,216
Kjeldhal	0,11	0,11	0,18	0,17

[0194] La tabla 54 compara las distintas necesidades de aminoácidos esenciales con las necesidades de los distintos animales domésticos, que se presentan en la tabla 55.

La tabla 56 indica las composiciones de varios piensos animales comunes y puede también compararse con la tabla 54.

Tabla 54. Comparación de los aminoácidos presentes en la fase líquida de los dos experimentos: (a) a 75°, 0,075 g Ca(OH)₂/g despojos secos, 60 g despojos secos/L, y 30 min; y (b) a 50°C, 0,100 g Ca(OH)₂/g despojos secos, 40 g despojos secos/L, y 90 min con las necesidades dietéticas de los diferentes animales

Aminoácido	Siluro	Perros	Gatos	Pollos	Cerdos	Despojos solubilizados (a)	Despojos solubilizados (b)
ASN						2,14	0,82
ASP						3,62	6,36
GLU						10,56	8,70
SER						4,54	7,21
HIS	1,31	1,00	1,03	1,40	1,25	2,92	223
GLY						4,89	5,35
THR	1,75	2,64	2,43	3,50	2,50	5,74	6,47
ALA						8,47	6,66
ARG	3,75	2,82	4,17	5,50	0,00	7,95	5,22
VAL	2,63	2,18	2,07	4,15	2,67	7,53	6,60
CYS	2,00*	2,41*	3,67*	4,00*	1,92*	0,7	ND
MET	2,00*	2,41*	2,07	2,25	1,92*	3,83	4,23
TYR	4,38 ⁺	4,05 ⁺	2,93 ⁺	5,85 ⁺	3,75 ⁺	1,68	4,36
PHE	4,38 ⁺	4,05 ⁺	1,40	3,15	3,75 ⁺	5,42	4,65
ILE	2,28	2,05	1,73	3,65	2,50	6,36	5,19
LE U	3,06	327	4,17	525	2,50	10,91	9,37
LYS	4,47	3,50	4,00	5,75	3,58	3,27	7,42
TRP	0,44	0,91	0,83	1,05	0,75	2,26	ND
PRO						6,11	6,98

*Cisteína + Metionina

⁺Tirosina + Fenilalanina

ND No determinado

Valores expresados como g aminoácido individual por 100 g aminoácidos totales.

Tabla 55. Necesidades nutricionales para animales domésticos durante la fase de crecimiento (Pond *et al.*, 1995)

	Siluro	Perros	Gatos	Pollo Broiler	Cerdos
Proteína cruda (%)	32,0	22,0	30,0	20,0	12,0
Arginina (%)	1,20	0,62	1,25	1,10	0,00
Metionina (%)	0,64*	0,53*	0,62	0,45	0,23*
Cisteína (%)	0,64*	0,53*	1,10*	0,80*	0,23*
Histidina (%)	0,42	0,22	0,31	0,28	0,15
Isoleucina (%)	0,73	0,45	0,52	0,73	0,30
Leucina (%)	0,98	0,72	1,25	1,05	0,30
Lisina (%)	1,43	0,77	1,20	1,15	0,43
Tirosina (%)	1,40**	0,89**	0,88**	1,17**	0,45**
Fenilalanina (%)	1,40**	0,89**	0,42	0,63	0,45**
Treonina (%)	0,56	0,58	0,73	0,70	0,30
Triptófano (%)	0,14	0,20	0,25	0,21	0,09
Valina (%)	0,84	0,48	0,62	0,83	0,32

Notas: 1)* Cisteína + Metionina 2) ** Tirosina + Fenilalanina 3) Todos los valores se expresan como porcentaje de la dieta total (g /100 g pienso).

Tabla 56 Composición de diferentes piensos usados en la dieta de animales domésticos (Pond *et al.*, 1995)

	Harina de sangre	Harina de pescado**	Harina de soja	Harina de gluten	Harina de maíz	Sorgo	Harina de carne y huesos	Harina de plumas
Materia seca (%)	91,0	92,0	89	91,0	93,0	89,0	94	91,0
Fibra cruda (%)	1,0	0,9	6,0	4,0	12,0	2,0	2,4	4,7
Proteína cruda (%)	79,9	61,2	45,8	42,9	18,0	11,0	50,9	85,4
Digestibilidad (%)*	62,3	56,4	41,7	35,7	14,8	7,8	45,0	60,2
Arginina (%)	3,50	3,74	3,20	1,40	120	0,36	3,05	5,33
Cisteína (%)	1,40	0,58	0,67	0,60	0,32	0,18	0,46	3,21
Glicina (%)	3,40	-	2,10	1,50	-	0,40	-	-
Histidina (%)	420	,44	1,10	1,00	-	0,27	0,96	0,47
Isoleucina (%)	1,00	2,85	2,50	2,30	-	0,53	1,47	3,51
Leucina (%)	10,30	4,48	3,40	7,60	1,70	1,42	3,02	0,42
Lisina (%)	6,90	4,74	2,90	0,80	0,90	0,27	2,89	1,67
Metionina (%)	0,90	1,75	0,60	1,00	0,35	0,09	0,08	0,54
Fenilalanina (%)	6,10	2,46	220	2,90	0,80	0,45	1,65	3,59
Treonina (%)	3,70	2,51	1,70	1,40	0,90	0,27	1,60	3,63
Triptófano (%)	1,10	0,65	0,60	0,20	0,30	0,09	0,28	0,52
Tirosina (%)	1,80	1,93	1,40	1,00	1,50	0,36	0,79	2,35
Valina (%)	6,50	3,19	2,40	2,20	1,30	0,53	2,14	5,85

Notas: 1) *Base alimentaria para rumiantes. 2) **Hay tres tipos de harina de pescado: anchoa, lacha tirana y arenque. Los valores presentados son para lacha tirana. 3) Los valores de los aminoácidos son en porcentaje a la base alimentaria (g aminoácido/100 g pienso).

[0195] Los resultados tabulados implican que la proteína solubilizada cumple, o excede, las necesidades de aminoácidos esenciales de los animales durante su fase de crecimiento para la secuencia a 50 °C. Por otro lado, a 75 °C (condiciones de conversión óptimas), los valores para tirosina y lisina son más bajos de lo necesario.

5 **[0196]** Los despojos de pollo, que contienen un 15 % de proteína (base húmeda) o un 45% de proteína (base seca), pueden usarse para obtener un producto rico en aminoácidos tratándolos con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ a temperaturas inferiores a 100 °C. Un simple depósito sin presurización puede usarse para el proceso anterior debido a la baja temperatura necesaria.

10 **[0197]** Para todas las condiciones de temperatura, carga de cal y concentración de despojos que se estudiaron, no tuvo lugar cambio significativo alguno en la conversión tras 30 minutos de reacción.

[0198] Las condiciones óptimas para maximizar la conversión de proteína (hasta un 80%) son 0,075 g $\text{Ca}(\text{OH})_2/\text{g}$ despojos secos procesados a 75 °C durante al menos 15
15 min. La concentración de despojos inicial no tuvo efecto significativo ni en la conversión ni en el espectro de los aminoácidos del producto.

[0199] Sin embargo, se recomienda una alta concentración de despojos para obtener un producto altamente concentrado, reduciendo así las necesidades de energía para concentrar el producto final.

20 **[0200]** Se observó una pequeña degradación de los aminoácidos en todos los experimentos realizados por debajo de los 100 °C y hasta 2 horas. Por lo tanto, debería darse algo de degradación al evaporar el producto líquido a temperaturas alrededor de los 100 °C.

[0201] A 50 °C, el espectro de los aminoácidos esenciales obtenido cumple o excede
25 las necesidades para muchos animales domésticos durante su etapa de crecimiento. Por lo tanto, el producto sólido rico en aminoácidos obtenido por el tratamiento con cal de los despojos de pollo podría servir como suplemento proteínico para estos animales. El producto obtenido a 75 °C tiene una cantidad menor de lisina y tirosina de la necesaria y por lo tanto no sería tan eficaz.

30

Ejemplo 5: Solubilización de proteína en despojos de pollo y plumas

[0202] El desecho de órganos animales por parte de la industria de la carnicería es un problema medioambiental importante. La industria avícola genera una gran cantidad de residuos (despojos, plumas y sangre) centralizada en los mataderos en volúmenes
35 que son lo suficientemente grandes para desarrollar técnicas con el fin de procesar

estos residuos. Si los residuos se recogen de forma separada, pueden procesarse como harina de sangre (sangre secada con calor usada como un suplemento alimentario), harina de plumas hidrolizada, harina de aves y grasa.

- 5 **[0203]** Un cinco por ciento del peso corporal de las aves son plumas. Debido a su alto contenido en proteína (89,7 % peso seco, tabla 57), las plumas son una potencial fuente proteínica para el alimento, pero es necesaria la completa destrucción de la estructura de queratina rígida (Dalev, 1994).

Tabla 57. Composición de los despojos de aves y plumas de pollo (Wisman *et al.*, 1957, and Dalev, 1994)

% peso total	Despojos frescos	Materia seca	Plumas (materia seca)
Humedad	69,5	-	-
Proteína cruda	17,2	6,5	9,7
Extracto etéreo (grasa)	8,0	26,2	1,4
Fibra cruda	0,1	0,4	ND
Ceniza	3,7	12,1	6,3
Extracto de nitrógeno libre	1,5	4,8	ND
Calcio (Ca)	0,5	1,7	0,35
Fósforo (P)	0,6	2,0	0,13
Sodio (Na)	ND	-	0,4
Potasio (K)	ND	-	0,9

- 10 **[0204]** Los despojos de aves contienen mucha más histidina, isoleucina, lisina y metionina que las plumas de pollo (características de las plumas y los despojos de pollo se muestran en las tablas 57 a la 59). Por lo tanto, la harina de plumas y despojos de aves juntos tendrían un mejor equilibrio de aminoácidos (El Boushy y Van der Poel, 1994). Un proceso de plumas/despojos puede facilitar el hecho de que las
- 15 plumas son más fáciles de descomponer o hidrolizar que los despojos.

Tabla 58. Cantidad de microorganismos viables en los despojos de aves (Acker *et al.*, 1959)

	Sin lavar	Lavado	Agar usado
Aerobios totales	280000	90000	Soja tripticasa
Anaerobios totales	98000	28000	Caldo tioglicolato
Espora que forma anaerobios (<i>Clostridium botulinum</i>)	4500	2000	Caldo tioglicolato
Coliformes (<i>Salmonella</i>)	20000	9000	Bilis rojo violeta
Lactobacilos	270000	97000	Zumo de tomate
Levaduras	28000	26000	Bilis de buey de Littman
Mohos algodonosos	< 100	< 100	Bilis de buey de Littman
Suma/g peso húmedo.			

Tabla 59. Composición de despojos de aves (Acker <i>et al.</i> , 1959)			
	Sin lavar	Lavado	Unidades
Proteína cruda	20,5	17,7	g/100 g materia húmeda
Proteína digestible	91,2	91,5	g/100 g proteína
Extracto etéreo	8,4	7,6	g/100 g materia húmeda
Fibra cruda	1,1	1,0	g/100 g materia húmeda
Humedad	68,5	72,1	g/100 g materia húmeda
Ceniza	4,0	4,3	g/100 g materia húmeda
Pérdida de ignición	27,5	23,5	g/100 g materia seca
Calcio	1,4	1,8	g/100 g materia húmeda
Fósforo	1,1	1,3	g/100 g materia húmeda
Riboflavina	3,8	3,1	mg/100 g materia seca
Niacina	4,8	6,3	mg/100 g materia seca
Pantotenato Ca	2,3	1,1	mg/100 g materia seca
Piridoxina	0,11	0,09	mg/100 g materia seca
B ₁₂	52,6	9,5	µg/100 g materia seca
Vitamina A	806,8	1163,9	Unidades USP /100 g materia seca
Caroteno	356,2	656,8	Unidades int./100 g materia seca
Vit. A Total	1163,0	1820,7	Unidades int./100 g materia seca
Vit. C Total	47,9	26,9	mg/100 g materia seca
Vitamina E	3,4	7,7	Unidades int./100 g materia seca
Inositol	218,1	131,5	mg/100 g materia seca
Tiamina	0,13	0,07	mg/100 g materia seca
Ácido Fólico	0,11	0,04	mg/100 g materia seca
Arginina	6,6	7,1	g/100 g proteína
Histidina	1,2	1,4	g/100 g proteína
Isoleucina	10,5	11,0	g/100 g proteína
Leucina	8,9	10,0	g/100 g proteína
Lisina	13,3	13,6	g/100 g proteína
Metionina	2,7	2,8	g/100 g proteína
Fenilalanina	5,5	5,0	g/100 g proteína
Treonina	2,5	3,2	g/100 g proteína
Triptófano	0,9	0,7	g/100 g proteína
Valina	2,9	3,4	g/100 g proteína

[0205] Debido a que la adición de heces a una dieta animal podría afectar de forma negativa el crecimiento (Acker *et al.*, 1959) y por consideraciones de salud pública, los despojos usados con fines alimentarios pueden tratarse para reducir la carga bacteriana (tabla 58). Existen altos niveles de contenido de ceniza (calcio y fósforo) y vitaminas presentes en los despojos (tabla 59). Parece que los despojos de aves son una fuente significativa de vitaminas, minerales y posiblemente factores de crecimiento no identificados (Acker *et al.*, 1959).

[0206] Una forma de tratar los subproductos avícolas es mediante *reconversión*, la

cual incluye cinco fases:

- Almacenamiento de materias primas
- Cocción y secado (esterilización)
- Condensación
- 5 • Extracción de la grasa
- Manipulación de la harina

[0207] La sangre de aves, plumas y despojos, residuos del criadero y pájaros muertos llegan al reactor (cocedero) de formas diferentes. La hidrólisis y esterilización tiene lugar en el cocedero donde se calientan los materiales con una presión y temperatura
 10 establecida para un tiempo determinado. Después, se seca el material con la temperatura más baja posible para mantener la calidad del producto. Es necesaria la condensación de los vapores de acuerdo a regulaciones medioambientales. El producto final tras el secado se tritura y se cuela. Finalmente, el producto preparado de esta forma puede tener un contenido graso mayor del 16 %; por lo tanto, es
 15 necesario llevar a cabo la extracción de la grasa (p. ej. la manteca se drena por el falso fondo perforado hacia un tanque adyacente) para asegurar un contenido graso por debajo del 10-12 %. La grasa extraída puede usarse como una adición para el pienso y con otros fines (El Boushy and Van der Poel, 1994).

[0208] La esterilización tiene lugar durante la cocción. El secado se consigue en un
 20 secador separado. Se han usado dos tipos diferentes de secadores: el secador de disco y el secador instantáneo. El secador instantáneo es el más común con beneficios tales como una menor superficie cubierta, calentamiento por aceite o gas y un producto final de alta calidad (El Boushy y Van der Poel, 1994).

[0209] El proceso de reconversión puede usarse para tratar diferentes residuos o
 25 generar diferentes productos como:

- Harina de plumas (HP), usando solo plumas de pollo.
- Harina de subproductos avícolas o harina de despojos, a partir de despojos (vísceras, cabezas, patas y sangre).
- Harina de mezcla de subproductos avícolas (HSA), a partir de la mezcla de los
 30 despojos de ave y las plumas de pollo.

[0210] La composición y el valor nutricional para las harinas de plumas y las harinas de subproductos avícolas usando diferentes condiciones de procesamiento se muestran en tablas 60-63.

35

Tabla 60. Composición de harina de subproductos avícolas

% Peso total	Fresco	Materia seca
Humedad	6,1	--
Proteína cruda	54,6	58,1
Extracto etéreo	14,9	15,9
Fibra cruda	0,8	0,9
Ceniza	17,0	18,1
Extracto libre de nitrógeno	6,6	7,0
Calcio	8,0	8,5
Fósforo	3,0	3,2

Tabla 61. Harinas de despojos usando un proceso de reconversión en diferentes plantas industriales (McNaughton *et al.*, 1977)

	Planta 1	Planta 2	Planta 3
Proteína cruda	53,99	53,10	54,01
Grasa cruda	25,34	25,20	24,70
Ceniza	5,52	5,96	6,06
Humedad	11,15	11,01	9,98
Fibra cruda	4,00	4,73	5,25
Calcio	1,46	1,65	1,78
Fósforo	1,00	1,08	1,10

Valores en porcentaje del peso total

Tabla 62. Contenido de aminoácidos del pienso de diferentes procesos de desechos avícolas (El Boushy and Van der Poel, 1994)

Aminoácido	HP (por lotes)	HP (continuo)	HSA (por lotes)	HSA (continuo)
ASP	5,90	5,75	5,20	5,17
THR	4,05	4,35	2,40	2,33
SER	7,50	9,25	2,70	2,70
GLU	10,10	10,35	9,83	9,70
PRO	9,55	8,85	6,43	6,50
GLY	6,75	6,85	7,87	7,40
ALA	5,35	4,75	4,43	4,93
VAL	5,40	5,80	2,87	3,03
CYS	2,60	3,00	0,63	0,60
MET	0,50	0,40	1,07	1,43
ILE	4,15	4,25	2,23	2,30
LEU	7,00	7,25	4,20	4,37
TYR	2,35	2,40	1,80	2,00
PHE	4,30	4,10	2,40	2,53
LYS	1,80	1,90	3,70	3,80
HIS	0,60	0,55	1,10	1,20
ARG	6,65	6,60	4,77	4,77
Proteína cruda	84,55	86,40	63,63	64,76

HP Harina de plumas (por lotes) 30-60 min, 207-690 kPa, ~150°C
 (continuo) 6-15 min, 483-690 kPa, ~150°C HSA Harina de subproductos
 avícolas (sangre, plumas y despojos), por lotes o continuo, 30-40 min, 380
 kPa, 142°C.

Tabla 63. Contenido de aminoácidos y disponibilidad de diferentes desechos avícolas (El Boushy and Van der Poel, 1994)

	HP	Disponibilidad	HSA	Disponibilidad
ASP	5,02	56	5,46	67
GLU	7,96	62	8,00	77
SER	6,73	64	6,09	81
HIS	0,55	59	1,08	72
GLY	4,47	--	6,59	--
THR	3,36	62	3,22	76
ALA	4,85	78	4,35	78
ARG	5,44	77	5,45	84
TYR	2,23	65	2,52	77
VAL	6,41	75	4,81	77
MET	0,79	65	1,14	77
PHE	3,89	77	3,63	79
ILE	4,15	78	3,25	79
LEU	6,19	73	5,78	78
LYS	1,57	64	2,81	77
PRO	9,39	71	6,13	77
CYS	4,26	65	2,43	62

[0211] La harina de plumas contiene aproximadamente un 85 % de proteína cruda; es rica en cisteína, treonina y arginina, pero escasa en metionina, lisina, histidina y triptófano (El Boushy and Roodbeen, 1980). El hecho de añadir aminoácidos sintéticos u otros materiales ricos en estos últimos aminoácidos mejoraría la calidad del producto. Con altas presiones, las alas de pollo tienen a “apelmazarse” dando lugar a una harina no fluida.

[0212] Los despojos y las plumas se obtuvieron de Texas A&M Poultry Science Department. Los despojos usados contienen huesos, cabezas, picos, patas y órganos internos (p. ej., corazón, pulmones, intestino, hígado). Los despojos se mezclaron durante 10 min en un mezclador industrial, se recogieron en botellas de plástico y finalmente se congelaron a -4 °C para un uso posterior. Las muestras de este material mezclado se usaron para obtener el contenido de humedad, el nitrógeno total (estimación de la fracción proteica) y el contenido de aminoácidos para caracterizar el material inicial. Las plumas se lavaron varias veces con agua, se secaron al aire a una temperatura ambiente, se secaron a 105 °C y finalmente se trituró usando un molino

Thomas-Wiley (Arthur H. Thomas Company, Philadelphia, PA), y se coló con una pantalla de malla 40.

[0213] Los experimentos se llevaron a cabo en dos reactores autoclave (12-L y 1-L) con un controlador de temperatura y un mezclador alimentado por un motor de velocidad variable. Las condiciones estudiadas se establecieron a partir de experimentos previos tanto con plumas de pollo como con despojos de pollo. Las condiciones del tratamiento incluyen temperatura, concentración de materia prima (plumas + despojos secos /L), carga de hidróxido de calcio (g Ca(OH)₂/g plumas + despojos secos) y tiempo. Las muestras se tomaron del reactor en momentos diferentes y después se centrifugaron para separar la fase líquida del material sólido residual.

[0214] Se siguió una serie de pasos de tal forma que se tomaron datos de los diferentes productos intermedios para el proceso mostrado en la FIGURA 35.

[0215] Los despojos crudos eran un 33,4 % de material seco y un 66,6 % de humedad. La concentración de proteína cruda de los despojos secos era -34 % (NTK de despojos 5,40 %) y el contenido de ceniza era -10 %; el 56% restante era fibra y grasas. El análisis de aminoácidos (tabla 64) de los despojos crudos sólidos muestra un buen equilibrio para todos los aminoácidos. El contenido de proteína total del análisis de aminoácidos es 26 g proteína/100 g despojos secos (tabla 65). Si se considera que se destruyeron algunos aminoácidos durante la hidrólisis ácida usada en la determinación HPLC y que los valores de Kjeldhal (NTK) se aproximan al contenido de proteína, estos dos valores son similares.

Aminoácido	Concentración (mg/L)	Porcentaje (g aminoácido/ 100 g proteína)
ASP	29,565	9,900
GLU	50,559	16,930
SER	12,453	4,170
HIS	5,826	1,951
GLY	22,557	7,553
THR	12,409	4,155
ALA	20,943	7,013
ARG	22,753	7,619
TYR	10,015	3,354
VAL	15,172	5,080
MET	6,894	2,309
PHE	13,456	4,506
ISLE	13,100	4,387

LEU	28,257	9,462
LYS	20,266	6,786
PRO	14,409	4,825

Tabla 65. Determinación del contenido de aminoácidos para una muestra de despojos crudos secos

Variable	Valor
Concentración de aminoácidos totales (mg/L)	298,63
Masa total de aminoácidos en muestra sólida (mg)	23,89
Masa de muestra sólida para análisis (mg)	92
Percentil de aminoácidos en muestra seca	26

[0216] Las plumas de pollo eran un 92 % de material seco y un 8 % de humedad. La concentración de proteína cruda de las plumas secas era aproximadamente un 95,7 % (NTK de plumas 15,3 %); el 4,3 % restante era fibra y ceniza.

Experimento 1. Hidrólisis de los despojos enteros

[0217] El experimento 1 compara la solubilización de proteína de la muestra de despojos completos (huesos, cabezas, picos, patas y órganos internos) con una muestra que solo usa los órganos internos, que se llevó a cabo previamente (capítulo V). Las condiciones usadas en el experimento 1 eran 75 °C, 0,10 g cal/g despojos y 40 g despojos secos/L. Las condiciones experimentales estudiadas y las variables medidas se resumen en la Tabla 66.

Tabla 66. Condiciones experimentales y variables medidas para determinar la solubilización de proteína de la muestra de despojos con huesos, cabezas, picos, patas y órganos internos

Variable	Valor
Temperatura (°C)	75
Masa de Ca(OH) ₂ (g)	3,5
Masa de despojos (g)	102,1
Volumen de agua (mL)	850
Carga de cal (g Ca(OH) ₂ /g despojos secos)	0,103
Concentración despojos secos (g despojos secos/L)	40,05
Sólido residual (g)	14,2

[0218] La tabla 67 muestra el contenido de nitrógeno total en las muestras de líquido centrifugado en función del tiempo para este experimento. Sobre la base de la media de NTK para despojos secos (5,40 %), se estimaron las conversiones de hidrólisis de la proteína y se proporcionan en la tabla 68.

Tabla 67. Contenido de proteína y mineral de productos y despojos crudos tras la hidrólisis de cal

Condición	TKN (%)	P (%)	K (%)	Ca (%)	Mg (%)	Na (ppm)	Zn (ppm)	Fe (ppm)	Cu (ppm)	Mn (ppm)
Despojos secos	5,3995	0,6269	0,9181	0,3845	0,0622	3150	59	493	46	10
Líquido 30 min	0,1189	0,0041	0,0311	0,0539	0,001	104	0	11	0	0
Líquido 90 min (*)	0,1925	0,0187	0,0321	0,2	0,0031	104	2	9	2	0
Líquido 90 min	0,1145	0,0041	0,0311	0,0487	0,001	104	0	3	0	0
Sólido residual seco	2,5867	0,5606	0,1005	4,1793	0,1078	560	97	187	58	15

(*) Muestra no centrifugada

Tabla 68. Porcentaje de conversión del NTK total a NTK soluble

Muestra	Conversión
Líquido centrifugado 30 min	59,4
Líquido no centrifugado 90 min	96,2
Líquido centrifugado 90 min	57,2

[0219] Con la condición estudiada, la conversión de nitrógeno en la fase sólida a la fase líquida era un 60 % eficaz. Este valor es más bajo que el obtenido con las mismas condiciones en el ejemplo previo pero esto puede explicarse por la presencia de huesos, cabezas, picos y patas, que antes no estaban presentes. Estas partes contienen un porcentaje mayor de ceniza, minerales y componentes no solubles que reducen la eficacia del proceso de hidrólisis. La hidrólisis de la proteína no cambió entre los 30 min y 90 min (tabla 68), similar a resultados previos; 30 min es el tiempo recomendado para evitar una posible degradación de los aminoácidos sensibles al calor. No tuvo lugar una pérdida importante de nitrógeno durante la hidrólisis (96,2 % se ha considerado para la muestra no centrifugada).

[0220] Se consigue una reducción importante (aproximadamente un 50 %) de la proteína en el sólido, que va desde el 33,7 % en los despojos crudos al 16,2 % (similar al valor de 13,3 % obtenido del análisis de aminoácidos, tabla 69) en el sólido residual tras el tratamiento con cal. También existe un 58 % en la reducción del peso del sólido seco debido a la solubilización de aminoácidos y otros componentes solubles presentes en los despojos crudos. Este sólido residual es estable, sin olores fuertes y tiene un contenido de aminoácidos bien equilibrado (tabla 70) que cumple, o excede,

las necesidades de aminoácidos esenciales de los animales durante su fase de crecimiento.

Tabla 69. Determinación del contenido de aminoácidos para el sólido residual después del tratamiento con cal

Variable	Valor
Concentración de aminoácidos totales (mg/L)	180,50
Masa total de aminoácidos en muestra sólida (mg)	13,54
Masa de muestra sólida para análisis (mg)	102
Percentil de aminoácidos en la muestra seca	13,27

Tabla 70. Análisis de aminoácidos para el sólido residual después del tratamiento con cal

Aminoácido	Concentración (mg/L)	Porcentaje (g aminoácido/ 100 g proteína)
ASP	19,289	10,686
GLU	25,776	14,280
SER	8,512	4,716
HIS	4,314	2,390
GLY	9,178	5,085
THR	8,314	4,606
ALA	10,392	5,757
ARG	12,771	7,075
TYR	7,805	4,324
VAL	10,546	5,843
MET	4,967	2,752
PHE	10,376	5,749
ILE	9,545	5,288
LEU	20,762	11,502
LYS	9,858	5,462
PRO	8,096	4,485

5

[0221] El tratamiento de los despojos de pollo con cal hidroliza la proteína presente en pequeños péptidos y aminoácidos libres, que son solubles en agua. Por lo tanto, el 60 % de la conversión de NTK de la fase sólida a la fase líquida representa la eficacia de la recuperación de proteína en la fase líquida. La tabla 71 muestra el equilibrio de aminoácidos para este líquido centrifugado.

10

Tabla 71. Análisis de aminoácidos para la muestra líquida centrifugada (30 min)

Aminoácido	Concentración (mg/L)	Porcentaje (g aminoácido/ 100 g proteína)
ASP	69,983	3,530
GLU	129,448	6,529
ASN	3,937	0,199
SER	98,378	4,962
GLN	26,346	1,329

HIS	25,379	1,280
GLY	69,551	3,508
THR	73,033	3,684
CIT	54,309	2,739
B-ALA	4,170	0,210
ALA	147,275	7,428
TAU	200,813	10,129
ARG	162,465	8,195
TYR	93,992	4,741
CYS-CYS	102,601	5,175
VAL	80,385	4,055
MET	51,049	2,575
TRP	36,910	1,862
PHE	86,256	4,351
ILE	74,689	3,767
LEU	179,141	9,036
LYS	136,399	6,880
PRO	76,073	3,837

Concentración total de aminoácidos 1982,6 mg/L

[0222] Una comparación del contenido de aminoácidos de los despojos crudos, el producto líquido centrifugado y el sólido residual (tabla 72) muestra que los contenidos de aminoácidos en el líquido centrifugado y el sólido residual son comparables a los despojos crudos. Esto implica que la solubilización de los aminoácidos tiene lugar a una velocidad similar y que existe poca destrucción de los aminoácidos específicos para las condiciones estudiadas.

Tabla 72. Comparación del contenido de aminoácidos para los diferentes materiales durante el tratamiento con cal de los despojos de pollo

Aminoácido	Despojos	Sólido residual	Líquido centrifugado*
ASP	9,90	10,69	4,50
GLU	16,93	14,28	8,33
SER	4,17	4,72	6,33
HIS	1,95	2,39	1,63
GLY	7,55	5,08	4,48
THR	4,16	4,61	4,70
ALA	7,01	5,76	9,48
ARG	7,62	7,08	10,46
TYR	3,35	4,32	6,05
VAL	5,08	5,84	5,17
MET	2,31	2,75	3,29
PHE	4,51	5,75	5,55
ILE	4,39	5,29	4,81
LEU	9,46	11,50	11,53

LYS	6,79	5,46	8,78
PRO	4,83	4,49	4,90

*Se consideran solo los aminoácidos presentes en el análisis sólido

[0223] El tratamiento de los despojos de pollo con cal a una temperatura y tiempo medios reduce la cantidad de microorganismos presentes en la fase líquida. Una rápida evaporación del líquido es esencial porque el medio líquido contiene todos los requisitos nutricionales para el crecimiento bacteriano.

[0224] El análisis de aminoácidos de las muestras (tabla 73) muestra de nuevo un producto muy bien equilibrado que cumple, o excede, las necesidades de aminoácidos esenciales de los animales durante su fase de crecimiento. Se obtiene un valor ligeramente bajo para histidina.

Tabla 73. Análisis de aminoácidos de productos y material crudo, comparado con las necesidades de aminoácidos esenciales para varios animales domésticos (despojos enteros)

Aminoácido	Siluro	Perros	Gatos	Pollos	Cerdos	Líquido centrifugado	Despojos sólidos	Sólido residual
ASN						0,20		
GLN						1,33		
ASP						3,53	9,90	10,69
GLU						6,53	16,93	14,28
SER						4,96	4,17	4,72
HIS	1,31	1,00	1,03	1,40	125	1,28	1,95	2,39
GLY						3,51	7,55	5,08
THR	1,75	2,64	2,43	3,50	2,50	3,68	4,16	4,61
ALA						7,43	7,01	5,76
ARG	3,75	2,82	4,17	5,50	0,00	8,19	7,62	7,08
VAL	2,63	2,18	2,07	4,15	2,67	4,05	5,08	5,84
CYS	2,00 ⁺	2,41 ⁺	3,67 ⁺	4,00 ⁺	1,92 ⁺	5,18	ND	ND
MET	2,00 ⁺	2,41 ⁺	2,07	2,25	1,92 ⁺	2,57	2,31	2,75
TYR	4,38*	4,05*	2,93*	5,85*	3,75*	4,74	3,35	4,32
PHE	4,38*	4,05*	1,40	3,15	3,75*	4,35	4,51	5,75
ILE	2,28	2,05	1,73	3,65	2,50	3,77	4,39	5,29
LEU	3,06	3,27	4,17	525	2,50	9,04	9,46	11,50
LYS	4,47	3,50	4,00	5,75	3,58	6,88	6,79	5,46
TRIP	0,44	0,91	0,83	1,05	0,75	1,86	ND	ND
PRO						3,84	4,83	4,49

*Cisteína + Metionina ⁺Tirosina + Fenilalanina ND No determinado

Valores expresados como g aminoácido individual por 100 g aminoácidos totales.

Experimento 2. Procesamiento de plumas y despojos

[0225] Los despojos y las plumas de pollo tienen composiciones diferentes y sus principales componentes se comportan de forma diferente durante la hidrólisis de la proteína con cal. La proteína queratina es más difícil de hidrolizar que las proteínas en los despojos, ya que requiere tiempos más largos o concentraciones de cal y temperaturas más altas. Los desechos residuales de los mataderos contienen normalmente mezclas de despojos y plumas lo que convierte al tratamiento de esta mezcla en una posibilidad para obtener un producto rico en proteína. Podrían generarse dos productos: uno con un contenido de aminoácidos bien equilibrado que podría cumplir las necesidades de aminoácidos para varios animales domésticos monogástricos (de los despojos), y un segundo para rumiantes (de las plumas).

[0226] Se estudió la hidrólisis de una mezcla de despojos/plumas de pollo usando el proceso mostrado en la FIGURA 35. El tratamiento inicial de la mezcla se realizó para hidrolizar principalmente la proteína presente en los despojos con el fin de obtener un producto líquido y un sólido residual. Haciendo burbujear el producto líquido con CO₂ precipitaba CaCO₃ (que puede convertirse de nuevo en cal) y reducía la concentración de Ca en la fase líquida. La evaporación final de este líquido da lugar al primer producto sólido rico en aminoácidos.

[0227] El sólido residual de la fase 1 se devolvió al reactor para tratarlo de nuevo con cal durante tiempos más largos (condiciones diferentes) con el fin de promover la hidrólisis de la proteína de las plumas de pollo. Se seguirán pasos similares a la fase 1 para obtener el segundo producto.

[0228] Los experimentos A1, B1 y C1 usaron la condición 1 mientras que los experimentos A2, B2 y C2 usaron la condición 2.

[0229] Las condiciones experimentales estudiadas y las variables medidas durante el experimento 2 se resumen en la tabla 74. Se usó una relación de 17,5 g despojos húmedos/7 g plumas húmedas porque es un valor normal en la generación de desechos de un matadero.

Tabla 74. Condiciones experimentales y variables medidas para determinar la solubilización de proteína de la mezcla despojos/plumas

Variable	Exp. A1	Exp. A2	Exp. B1	Exp. B2	Exp. C1	Exp. C2
Temperatura (°C)	50	75	75	75	75	100
Masa de Ca(OH) ₂ (g)	36	41,4	20,7	20,7	4,8	2,7
Masa de despojos (g)	685		343		91,3	
Masa de plumas (g)	274	410	137	211,8	36,5	48,7
Volumen de agua (mL)	6000	3000	3000	2000	800	800

Ca(OH) ₂ (g/despojos secos)	0,075	0,101	0,086	0,098	0,075	0,055
Materia seca (g/L)	80,08	136,53	80,13	105,79	80,02	60,81
Despojos secos (g/L)	38,06		38,12		38,05	
NTK total (g)	50,94		25,48		6,79	
NTK (%)	10,60		10,60		10,60	

[0230] La tabla 75 muestra el contenido de nitrógeno total en las muestras líquidas centrifugadas en función del tiempo para este experimento. La media de NTK para despojos secos (5,40 %) y las plumas de pollo (15,3 %) dio una mezcla de NTK inicial de 10,6 %. Se estimaron las conversiones de hidrólisis de la proteína y se proporcionaron en la tabla 76 y la tabla 77. La tabla 76 considera la conversión con respecto a los despojos primero (condición 1) y las plumas en segundo lugar (condición 2), mientras que la tabla 77 proporciona la conversión con respecto al NTK inicial de la mezcla. Con las condiciones estudiadas, la conversión más alta de nitrógeno en la fase sólida a la fase líquida fue del 60 %.

Tabla 75. Contenido de nitrógeno total Kjeldhal en la fase líquida centrifugada en función del tiempo para el experimento 2 (mezcla despojos/plumas)

Tiempo (min)	Exp. A1	Exp. A2	Exp. B1	Exp. B2	Exp. C1	Exp. C2
5	0,1126	0,1015	---	0,1183	---	---
10	0,1210	---	0,1109	---	---	---
15	0,1154	0,0973	0,1238	0,1262	---	---
30	0,1182	0,1126	0,1182	0,1431	---	---
60	---	0,1514	0,1349	0,1723	0,2300	---
120	---	0,2188	---	0,2299	---	0,2600

NTK en g nitrógeno/100 g muestra líquida.

Tabla 76. Porcentaje de conversión del NTK total a NTK soluble para el experimento 2, con respecto al NTK de los despojos (A1, B1 y C1) y de las plumas (A2, B2 y C2) respectivamente

Tiempo (min)	Exp. A1	Exp. A2	Exp. B1	Exp. B2	Exp. C1	Exp. C2
5	59,2	7,9	---	12,3	---	---
10	63,6	---	58,2	---	---	---
15	60,6	7,6	64,9	13,1	---	---
30	62,1	8,7	62,0	14,8	---	---
60	---	11,8	70,8	17,9	120,9	---
120	---	17,0	---	23,8	---	26,9

Tabla 77. Porcentaje de conversión del NTK total a NTK soluble para el experimento 2 (mezcla despojos/plumas)

Tiempo (min)	Exp. A1	Exp. A2	Exp. B1	Exp. B2	Exp. C1	Exp. C2
5	14,3	6,0	---	9,3	---	---
10	15,4	---	14,1	---	---	---
15	14,7	5,7	15,7	9,9	---	---
30	15,0	6,6	15,0	11,2	---	---
60	---	8,9	17,2	13,5	29,3	---
120	---	12,9	---	18,0	---	30,7
Total		27,9		35,2		60

[0231] Basados en los datos de la tabla 76, no tiene lugar ningún efecto significativo en la conversión cuando la temperatura cambia de 50 a 75 °C. Los resultados de los experimentos A1 y B1 muestran una conversión más alta con 60 min comparado con los 30 min; esto se espera porque la proteína de queratina hidroliza de forma más lenta y sigue reaccionando al entrar en contacto con la cal. Además, al comparar la tabla 68 y la tabla 76, se obtienen resultados similares para la conversión de la mezcla de despojos/plumas de pollo que para los despojos solos; por lo tanto, los despojos presentes en la mezcla hidrolizan a la misma velocidad que los despojos solos. Con las temperaturas estudiadas en los experimentos A1 y B1, la hidrólisis de las plumas de pollo es relativamente lenta comparada con la de los despojos. La hidrólisis de la proteína aumenta de forma significativa al cambiar la temperatura de 75 a 100 °C (experimento C1) para la condición 1. Este resultado se explica por la conversión más alta esperada para las plumas de pollo con esta condición, un 60 % para la hidrólisis de las plumas de pollo con 2 h (Chang y Holtzaple, 1999).

[0232] Los resultados de los experimentos A2 y B2 muestran que el “pretratamiento” inicial de las plumas de pollo en una mezcla con los despojos de pollo aumenta ligeramente la conversión de la hidrólisis para las plumas (17 % a 23,8 %) y que se necesitan temperaturas más altas o tiempos más largos para hidrolizar completamente las plumas de pollo. Los resultados del experimento C2 muestran una conversión más alta a 100 °C comparado con los 75 °C. A partir del estudio de Chang y Holtzaple, incluso podría usarse una temperatura más alta o un tiempo de reacción más largo para aumentar aún más la hidrólisis de la proteína.

[0233] Las tablas 78-80 muestran el contenido de nitrógeno total y mineral de las muestras a partir de los diferentes pasos del proceso de tratamiento con cal de la mezcla de despojos/plumas. Se obtiene una ligera reducción del contenido de calcio (8 %) tras hacer burbujear el líquido con CO₂ hasta que se consigue un pH de ~6. Esta

reducción viene acompañada de una reducción similar del contenido de nitrógeno (tabla 78). Estos resultados muestran que la precipitación del calcio con CO₂ es un proceso muy ineficaz para las condiciones estudiadas.

Tabla 78. Contenido de proteína y mineral de los productos tras la hidrólisis con cal para los experimentos A1 y A2

	TKN (%)	P (%)	K (%)	Ca (%)	Mg (%)	Na (ppm)	Zn (ppm)	Fe (ppm)	Cu (ppm)	Mn (ppm)
Con sólidos (30 min)	0,4257									
Líquido 1 (30 min)	0,1182	0,0093	0,0404	0,0746	0,001	259	0	3	1	0
Tras el burbujeo	0,1098	0,0083	0,0352	0,0684	0	207	0	2	1	0
Con sólidos (2 h)	0,5420									
Líquido 2 (2 h)	0,2188	0,0041	0,0197	0,1523	0	155	1	6	1	0
Tras el burbujeo	0,2108	0,0031	0,0176	0,1503	0	145	1	2	1	0
Sólido residual 1	9,0254	0,571	0,3119	4,0974	0,0756	3264	104	210	35	13
Sólido residual 2	7,9002	0,2974	0,1492	5,6684	0,1109	2694	104	301	31	16

5

Tabla 79. Contenido de proteína y mineral de los productos tras la hidrólisis con cal para los experimentos B1 y B2

	TKN (%)	P (%)	K (%)	Ca (%)	Mg (%)	Na (ppm)	Zn (ppm)	Fe (ppm)	Cu (ppm)	Mn (ppm)
Con sólidos (60 min)	0,4257									
Líquido 1 (60 min)	0,1349	0,0104	0,0383	0,0984	0,001	259	1	5	1	0
Con sólidos (2 h)	0,5926									
Líquido 2 (2 h)	0,2299	0,0031	0,0166	0,1668	0	135	1	2	1	0
Sólido residual 1	8,7163									
Sólido residual 2	8,0355	0,313	0,0705	5,9482	0,0839	2518	77	166	20	9

Tabla 80. Contenido de proteína y mineral de los productos tras la hidrólisis con cal para los experimentos C1 y C2

	TKN (%)	P (%)	K (%)	Ca (%)	Mg (%)	Na (ppm)	Zn (ppm)	Fe (ppm)	Cu (ppm)	Mn (ppm)
Líquido 1 (60 min)	0,23	0	0,04	0,1	0	228	2	1	0	0
Líquido 2 (2 h)	0,26	0	0,01	0,14	0	83	1	1	0	0
Sólido residual 1	12,79	0,3	0,32	2,92	0,05	1617	73	152	19	5
Sólido residual 2	9,77	0,53	0,09	4,29	0,09	819	95	269	24	9
Producto final	11,71	0,12	0,55	5,17	0,01	2912	38	21	11	8

[0234] La tabla 79 muestra que tras el segundo tratamiento con cal, el contenido de proteína en el sólido va de 10,6 % (NTK) en la mezcla cruda a 7,9 % (NTK) en el sólido residual final, aproximadamente una reducción del 25 %. Además, existe una reducción del 35 % aproximadamente en el peso húmedo total (materia soluble). Este sólido residual es estable, sin olores fuertes, una concentración relativamente alta de calcio (~6 % para todos los casos) y un contenido de aminoácidos pobre en varios aminoácidos que son necesarios para el crecimiento animal; similar al residual obtenido para las plumas de pollo solo.

[0235] Puesto que la concentración de calcio es alta en el sólido residual 1, para todos los casos, se podría añadir una cantidad baja de cal al segundo tratamiento con un resultado similar para la conversión de hidrólisis de la proteína.

[0236] Se compararon las concentraciones de todos los minerales para todos los casos estudiados (tablas 78-80). El contenido de nitrógeno en el líquido centrifugado 1 y 2 aumenta con la temperatura más alta. El contenido mineral (fósforo, potasio y sodio) disminuye del líquido 1 al líquido 2 ya que se solubilizan más sales con la temperatura y la cal.

[0237] Las tablas 81-83 muestran el contenido de aminoácidos para los diferentes productos líquidos obtenidos con las condiciones estudiadas. Para los experimentos A2 y B2 las muestras se hidrolizaron con HCl durante 24 h antes del análisis de aminoácidos para determinar la concentración de aminoácidos totales a partir de la hidrólisis de las plumas de pollo. En el experimento C2 no se llevó a cabo ninguna hidrólisis con fines comparativos.

Tabla 81. Análisis de aminoácidos para la muestra líquida centrifugada en los experimentos A1 y A2

Aminoácido	Experimento A1		Experimento A2	
	Concentración (mg/L)	Porcentaje (g aminoácido/100 g proteína)	Concentración (mg/L)	Porcentaje (g aminoácido/100 g proteína)
ASP	205,70	5,12	41220	7,50
GLU	454,38	11,30	649,67	11,81
ASN	9,92	0,25	40,51	0,74
SER	235,14	5,85	351,29	6,39
GLN	0,00	0,00	0,00	0,00
HIS	50,93	1,27	0,00	0,00
GLY	170,00	4,23	365,21	6,64
THR	149,34	3,72	131,27	2,39
CIT	53,03	1,32	99,38	1,81
B-ALA	6,44	0,16	4,72	0,09
ALA	276,72	6,88	443,72	8,07
TAU	389,12	9,68	106,69	1,94
ARG	298,98	7,44	256,01	4,66
TYR	178,99	4,45	378,28	6,88
CYS-CYS	109,61	2,73	127,71	2,32
VAL	164,71	4,10	490,55	8,92
MET	110,56	2,75	99,93	1,82
TRP	68,81	1,71	46,19	0,84
PHE	162,55	4,04	236,89	4,31
ILE	141,70	3,52	33424	6,08
LEU	351,04	8,73	578,80	10,53
LYS	305,46	7,60	283,56	5,16
PRO	126,91	3,16	62,32	1,13
Conc. Total	4020,04		5499,14	

Tabla 82. Análisis de aminoácidos para la muestra líquida centrifugada en los experimentos B1 y B2

Aminoácido	Experimento B1		Experimento B2	
	Concentración (mg/L)	Porcentaje (g aminoácido/100 g proteína)	Concentración (mg/L)	Porcentaje (g aminoácido/100 g proteína)
ASP	208,38	4,88	606,53	8,23
GLU	455,89	10,69	788,25	10,70
ASN	9,39	0,22	0,00	0,00
SER	245,38	5,75	943,75	12,81
GLN	20,55	0,48	0,00	0,00
HIS	51,98	1,22	0,00	0,00
GLY	194,49	4,56	956,65	12,98
THR	161,33	3,78	166,24	226

ES 2 402 348 T3

CIT	67,51	1,58	0,00	0,00
B-ALA	9,57	0,22	0,00	0,00
ALA	300,78	7,05	387,08	5,25
TAU	391,07	9,17	0,00	0,00
ARG	32920	7,72	546,22	7,41
TYR	204,69	4,80	274,13	3,72
CYS-CYS	74,44	1,74	0,00	0,00
VAL	171,31	4,02	401,03	5,44
MET	118,50	2,78	102,84	1,40
TRP	41,72	0,98	0,00	0,00
PHE	161,73	3,79	370,28	5,03
ILE	138,92	3,26	330,31	4,48
LEU	363,99	8,53	684,05	9,28
LYS	345,67	8,10	106,63	1,45
PRO	199,60	4,68	704,17	9,56
Conc.Total	4266,10		7368,15	

Tabla 83. Análisis de aminoácidos para la muestra líquida centrifugada en los experimentos C1 y C2

Aminoácido	Experimento C1		Experimento C2	
	Concentración m/L	Porcentaje (g aminoácido/ 100 g proteína)	Concentración m /L	Porcentaje (g aminoácido/ 100 g proteína)
ASP	280,42	4,81	73,39	6,95
GLU	675,71	11,59	148,71	14,08
ASN	14,89	0,26	0,88	0,08
SER	244,52	4,20	99,68	9,44
GLN	0,00	0,00	0,00	0,00
HIS	80,50	1,38	0,00	0,00
GLY	249,11	4,27	91,98	8,71
THR	227,13	3,90	6,41	0,61
CIT	238,91	4,10	75,04	7,10
B-ALA	6,61	0,11	0,00	0,00
ALA	438,12	7,52	106,95	10,12
TAU	199,22	3,42	22,59	2,14
ARG	262,88	4,51	39,32	3,72
TYR	97,79	1,68	13,70	1,30
CYS-CYS	181,57	3,12	47,73	4,52
VAL	293,99	5,04	56,11	5,31
MET	148,91	2,55	14,41	1,36
TRP	113,75	1,95	0,00	0,00
PHE	258,51	4,44	48,00	4,54
ILE	270,12	4,63	54,45	5,15
LEU	599,13	10,28	107,36	10,16
LYS	408,43	7,01	25,54	2,42

PRO	537,85	9,23	24,20	2,29
Conc.Total	5828,07		1056,46	

[0238] A partir de las tablas 81-83, una comparación de los resultados de los experimentos A1, B1 y C1 muestra contenidos similares de aminoácidos para todos los casos; por lo tanto, el efecto de la temperatura en la velocidad de hidrólisis es similar para los diferentes aminoácidos individuales. La temperatura aumenta la conversión de hidrólisis (100 °C frente a 75 °C, tabla 76 y tabla 77) pero no afecta al contenido de aminoácidos en el tratamiento con cal de la mezcla de plumas de pollo/despojos.

[0239] Si se comparan los experimentos A1, B1 y C1 con el contenido de aminoácidos de los despojos de pollo solos (tabla 71), se obtienen resultados similares en todos los casos. El contenido de aminoácidos y la hidrólisis de la proteína de los despojos de pollo no se ven afectados por la presencia de plumas de pollo en la mezcla y la hidrólisis de estas plumas es relativamente pequeña con las condiciones estudiadas. El aumento de prolina con una mayor temperatura puede explicarse por la hidrólisis del tejido conectivo y los huesos (en los despojos) que probablemente requiere una mayor temperatura.

[0240] Una comparación de los resultados de los experimentos A2, B2 y C2 muestra mayores diferencias en el contenido de aminoácidos que en los experimentos A1, B1 y C1. Las diferentes cantidades de despojos no hidrolizados que permanecen en el sólido residual 1 para las diferentes temperaturas estudiadas puede explicar estas diferencias.

[0241] La tabla 84 y la tabla 85 comparan las necesidades de aminoácidos esenciales para varios animales domésticos con los diferentes productos.

Tabla 84. Análisis de aminoácidos de productos y materia prima, comparado con las necesidades de aminoácidos esenciales para varios animales domésticos (mezcla despojos/plumas Condición 1)

Aminoácido	Siluro	Perros	Gatos	Pollos	Cerdos	Exp A1	Exp B1	Exp C1
ASN						0,25	0,22	0,26
GLN						0,00	0,48	0,00
ASP						5,12	4,88	4,81
GLU						11,30	10,69	11,59
SER						5,85	5,75	4,20
HIS	1,31	1,00	1,03	1,40	1,25	1,27	1,22	1,38
GLY						4,23	4,56	4,27
THR	1,75	2,64	2,43	3,50	2,50	3,72	3,78	3,90

ES 2 402 348 T3

ALA						6,88	7,05	7,52
ARG	3,75	2,82	4,17	5,50	0,00	7,44	7,72	4,51
VAL	2,63	2,18	2,07	4,15	2,67	4,10	4,02	5,04
CYS	2,00 ⁺	2,41 ⁺	3,67 ⁺	4,00 ⁺	1,92 ⁺	2,73	1,74	3,12
MET	2,00 ⁺	2,41 ⁺	2,07	2,25	1,92 ⁺	2,75	2,78	2,55
TYR	4,38 [*]	4,05 [*]	2,93 [*]	5,85 [*]	3,75 [*]	4,45	4,80	1,68
PHE	4,38 [*]	4,05 [*]	1,40	3,15	3,75 [*]	4,04	3,79	4,44
ILE	2,28	2,05	1,73	3,65	2,50	3,52	3,26	4,63
LEU	3,06	3,27	4,17	5,25	2,50	8,73	8,53	10,28
LYS	4,47	3,50	4,00	5,75	3,58	7,60	8,10	7,01
TRP	0,44	0,91	0,83	1,05	0,75	1,71	0,98	1,95
PRO						3,16	4,68	9,23

*Fenilalanina + Tirosina ⁺Cisteína + Metionina

Todos los valores están en g aminoácido/100 g proteína.

Table 85. Análisis de aminoácidos de productos y materia prima, comparado con las necesidades de aminoácidos esenciales para varios animales domésticos (mezcla despojos/plumas Condición 2)

Aminoácido	Siluro	Perros	Gatos	Pollos	Cerdos	Exp A2	Exp B2	Exp C2
ASN						0,74	0,00	0,08
GLN						0,00	0,00	0,00
ASP						7,50	823	6,95
GLU						11,81	10,70	14,08
SER						6,39	12,81	9,44
HIS	1,31	1,00	1,03	1,40	1,25	0,00	0,00	0,00
GLY						6,64	12,98	8,71
THR	1,75	2,64	2,43	3,50	2,50	2,39	2,26	0,61
ALA						8,07	5,25	10,12
ARG	3,75	2,82	4,17	5,50	0,00	4,66	7,41	3,72
VAL	2,63	2,18	2,07	4,15	2,67	8,92	5,44	5,31
CYS	2,00 ⁺	2,41 ⁺	3,67 ⁺	4,00 ⁺	1,92 ⁺	2,32	0,00	4,52
MET	2,00 ⁺	2,41 ⁺	2,07	2,25	1,92 ⁺	1,82	1,40	1,36
TYR	4,38 [*]	4,05 [*]	2,93 [*]	5,85 [*]	3,75 [*]	6,88	3,72	1,30
PHE	4,38 [*]	4,05 [*]	1,40	3,15	3,75 [*]	431	5,03	4,54
ILE	2,28	2,05	1,73	3,65	2,50	6,08	4,48	5,15
LEU	3,06	3,27	4,17	525	2,50	10,53	928	10,16
LYS	4,47	3,50	4,00	5,75	3,58	5,16	1,45	2,42
TRP	0,44	0,91	0,83	1,05	0,75	0,84	0,00	0,00
PRO						1,13	9,56	2,29

*Fenilalanina + Tirosina ⁺Cisteína + Metionina

Todos los valores están en g aminoácido/100 g proteína.

[0242] Para el producto líquido obtenido tras la primera hidrólisis de la mezcla de plumas de pollo/despojos, los resultados tabulados implican que la proteína

solubilizada cumple, o excede, con las necesidades de aminoácidos esenciales de los animales durante su fase de crecimiento. La histidina será el aminoácido limitante para este producto.

5 **[0243]** Por otro lado, en el producto tras la segunda hidrólisis (plumas), los valores para treonina, cisteína + metionina, triptófano y especialmente lisina e histidina son más bajos de lo necesario lo que lo convierte en un producto pobre para la nutrición de animales monogástricos. Sin embargo, es adecuado para rumiantes.

Experimento 3. Recuperación del calcio y reciclaje

10 **[0244]** El uso del hidróxido de calcio como el material alcalino produce una concentración de calcio relativamente alta en la solución líquida centrifugada. Puesto que algunas sales cálcicas tienen una baja solubilidad, el calcio puede recuperarse si se precipita como carbonato de calcio, bicarbonato de calcio o sulfato de calcio (yeso).

15 **[0245]** Se prefiere el carbonato de calcio debido a su baja solubilidad (0,0093 g/L, producto de solubilidad para CaCO_3 es $8,7 \times 10^{-9}$). Por el contrario, la solubilidad de CaSO_4 es 1,06 g/L, con un producto de solubilidad de $6,1 \times 10^{-5}$. Además, es más fácil regenerar Ca(OH)_2 a partir del carbonato de calcio que a partir del sulfato de calcio. Puesto que CaSO_4 es un material más soluble y el yeso es más difícil de reciclar, el uso de CaCO_3 como el precipitado es un proceso más eficiente.

20 **[0246]** Cuando el CO_2 se hace burbujear en la solución centrifugada, se forma ácido carbónico (H_2CO_3). El ácido carbónico es un ácido diprótico débil con $\text{pKa}_1 = 6,37$ y $\text{pKa}_2 = 10,25$. Se genera un equilibrio entre H_2CO_3 , HCO_3^- y CO_3^{2-} y la fracción de cada componente en la mezcla es una función del pH. Puesto que el $\text{Ca(HCO}_3)_2$ es soluble en agua (166 g/L de agua, producto de solubilidad 1,08), la eficacia de precipitación del proceso es también una función del pH.

25 **[0247]** Con el fin de medir y estudiar la recuperación de calcio por el burbujeo de CO_2 , los productos líquidos centrifugados del proceso de hidrólisis de las plumas de pollo y los despojos se recogieron en botellas de plástico y se guardaron a 4 °C para un uso posterior. Un volumen conocido de material líquido centrifugado (400 ml) se colocó en un matraz Erlenmeyer con una barra de agitación magnética (agitación constante) y se hizo burbujear CO_2 a partir de un recipiente presurizado. Cuando el pH disminuyó, se recogieron las muestras líquidas (~10 mL) y se centrifugaron. Se midió el nitrógeno total y el contenido de calcio en el líquido clarificado. Las muestras con un pH inicial diferente se usaron para estudiar cómo afecta este parámetro a la eficacia de la precipitación.

35

[0248] La FIGURA 36 muestra el contenido de calcio y nitrógeno total en función del pH para dos muestras diferentes: una de la hidrólisis de despojos de pollo (C1) y la otra de la hidrólisis de plumas de pollo (C2). En ambos casos, la concentración de NTK permanece constante, lo que implica que no se pierde nitrógeno durante la precipitación del calcio.

[0249] La FIGURA 36 también muestra que la concentración de calcio disminuye al mínimo con un pH -9 (recuperación de calcio entre 50 y 70 %) y aumenta con pH menores. Se espera el aumento en la concentración de calcio debido a la alta solubilidad del bicarbonato de calcio y la conversión del carbonato a bicarbonato y ácido carbónico con un pH bajo (8 y menor). El pH inicial para el líquido centrifugado mostrado en la FIGURA 36 es relativamente alto (10,2 y 11,1 respectivamente); en ambos casos el equilibrio entre las especies carbónicas está en una zona con una concentración de carbonato relativamente alta ($pK_{a2} = 10,25$).

[0250] Por otro lado, la FIGURA 37 muestra el contenido de calcio y el nitrógeno total de las muestras con un pH inicial relativamente bajo (~9,2). Puesto que las muestras recogidas se encontraban dentro de la zona de equilibrio entre el ácido carbónico y el bicarbonato, no se pudo recuperar calcio alguno como un precipitado (solubilidad del bicarbonato de calcio).

Experimento 4. Conservación de los desechos de pollo bajo condiciones alcalinas

[0251] Los despojos de pollo y plumas descritos anteriormente en este ejemplo se usaron como materias primas para otra serie de experimentos. Se realizaron los experimentos en matraces Erlenmeyer de 1-L a temperatura ambiente y sin mezclar; para evitar olores desagradables, los matraces se colocaron dentro de la campana. La carga de hidróxido de calcio ($\text{g Ca(OH)}_2/\text{g plumas} + \text{despojos secos}$) se varió, para determinar la cal necesaria con el fin de mantener esta mezcla de materiales de desecho. La generación de malos olores fuertes (productos de fermentación) se considera como el punto final del estudio.

[0252] Se realizaron experimentos duplicados bajo las mismas condiciones. Las muestras se tomaron del reactor con diferentes tiempos y se centrifugaron para separar la fase líquida del material sólido. El contenido de nitrógeno total y el pH se midieron en las muestras líquidas centrifugadas.

[0253] Con el fin de determinar la cal necesaria para la conservación de la mezcla de desechos de pollo y estudiar la solubilización de proteína del material de desecho, se realizaron diversos experimentos con diferentes cargas de cal, a temperatura ambiente

y sin mezclar. Las condiciones experimentales estudiadas y las variables medidas se resumen en la tabla 86.

Tabla 86. Condiciones experimentales durante el estudio de conservación de la mezcla de despojos y plumas de pollo

	Exp. G1	Exp. G2	Exp. H1	Exp. H2	Exp. I1	Exp. I2
Temperatura (°C)	25	25	25	25	25	25
Masa de Ca(OH) ₂ (g)	3,3	3,3	6,6	6,6	9,9	9,9
Masa de despojos (g)	91,3	91,3	91,3	91,3	91,3	91,3
Masa de plumas (g)	36,5	36,5	36,5	36,5	36,5	36,5
Volumen de agua (ml)	800	800	800	800	800	800
Ca(OH) ₂ (g/g materia seca)	0,052	0,052	0,103	0,103	0,155	0,155
Materia seca (g/L)	80,02	80,02	80,02	80,02	80,02	80,02
Despojos secos (g/L)	38,05	38,05	38,05	38,05	38,05	38,05
NTK total (g)	6,79	6,79	6,79	6,79	6,79	6,79
NTK total (%)	10,60	10,60	10,60	10,60	10,60	10,60

- 5 **[0254]** La tabla 87 muestra la variación de pH en función del tiempo mientras que la tabla 88 muestra el contenido de nitrógeno total del líquido centrifugado.

Tabla 87. pH en función del tiempo durante el estudio de conservación de la mezcla de plumas y despojos de pollo

Tiempo (d)	Exp. G1	Exp. G2	Exp. H1	Exp. H2	Exp. I1	Exp. I2
0	9,01	9,12	12,1	12,14	12,1	12,15
1	---	---	11,52	11,56	12,14	12,17
2	---	---	11,16	11,25	12,08	12,14
4	---	---	10,82	11,03	12,03	12,06
7	---	---	10,65	10,85	12,05	12,06
11	---	---	9,05	10,1	12,06	12,09
14	---	---	---	---	12,06	12,1
17	---	---	---	---	12,04	12,07

Tabla 88. Contenido de nitrógeno total Kjeldhal en función del tiempo durante el estudio de conservación de la mezcla de plumas y despojos de pollo

Tiempo (d)	Exp. G1	Exp. G2	Exp. H1	Exp. H2	Exp. I1	Exp. I2
0	0,1438	0,1427	0,1002	0,1103	0,0924	0,0991
1	---	---	0,1248	0,1314	0,1325	0,1381
2	---	---	0,1337	0,1337	0,1460	0,1472
4	---	---	0,1348	0,1337	0,1596	0,1630
7	---	---	0,1371	0,1416	0,1835	0,1824
11	---	---	0,1472	0,1427	0,2099	0,2020
14	---	---	---	---	0,2239	0,2251
17	---	---	---	---	0,2297	0,2297

NTK en g nitrógeno/100 g muestra líquida.

[0255] Se estimaron las conversiones de hidrólisis de la proteína y se presentan en la tabla 89 y la tabla 90. La tabla 89 considera la conversión con respecto al contenido de nitrógeno en los despojos mientras que la tabla 90 presenta la conversión con respecto al NTK inicial de la mezcla. Con las condiciones estudiadas, la conversión más alta de nitrógeno en la fase sólida a la fase líquida fue del ~30 %.

Tabla 89. Percentil de conversión en la fase líquida con respecto a los despojos en función del tiempo (experimento de conservación)

Tiempo (d)	Exp. G1	Exp. G2	Exp. H1	Exp. H2	Exp. I1	Exp. I2
0	75,5692	74,9911	52,6567	57,9644	48,5577	52,0786
1	---	---	65,5844	69,0528	69,6309	72,5738
2	---	---	70,2615	70,2615	76,7253	77,3560
4	---	---	70,8396	70,2615	83,8724	85,6591
7	---	---	72,0482	74,4131	96,4322	95,8541
11	---	---	77,3560	74,9911	110,3058	106,1542
14	---	---	---	---	117,6630	118,2937
17	---	---	---	---	120,7110	120,7110

Tabla 90. Percentil de conversión en la fase líquida con respecto al nitrógeno total en función del tiempo (experimento de conservación)

Tiempo (d)	Exp. G1	Exp. G2	Exp. H1	Exp. H2	Exp. I1	Exp. I2
0	18,3018	18,1618	12,7527	14,0382	11,7600	12,6127
1	---	---	15,8836	16,7236	16,8636	17,5764
2	---	---	17,0164	17,0164	18,5818	18,7345
4	---	---	17,1564	17,0164	20,3127	20,7454
7	---	---	17,4491	18,0218	23,3545	23,2145
11	---	---	18,7345	18,1618	26,7145	25,7091
14	---	---	---	---	28,4963	28,6491
17	---	---	---	---	29,2345	29,2345

[0256] En la tabla 89, los valores más altos del 100 % implican la solubilización de proteína de las alas de pollo para el estudio de conservación a largo plazo. Además, una comparación entre los experimentos H e I correlacionan una alta hidrólisis de la proteína con un pH alto. La reducción del pH durante el proceso de hidrólisis (tabla 87) se relaciona con la generación de nuevos valores de aminoácidos libres cercanos a 9 que se midieron el día anterior a la producción de un fuerte olor.

[0257] Una alternativa viable para mantener un solución estable (no fermentativa) es monitorizar el pH durante la conservación de la mezcla de desechos de pollo. Basados en los resultados obtenidos, un valor pH de 10,5 podría usarse como el límite más bajo para la adición de cal extra para evitar el crecimiento bacteriano.

[0258] La cal es una base relativamente insoluble en agua y debido a su baja

solubilidad, genera condiciones alcalinas suaves (pH~12) en la mezcla sólido-líquido. El relativo pH bajo reduce la posibilidad de reacciones de degradación no deseadas, cuando se compara con bases fuertes (p. ej. hidróxido de sodio). La cal también promueve la digestión de proteína y la solubilización en la fase líquida (tabla 90),
 5 mientras que se conserva la mezcla de desechos de pollo.

[0259] Los despojos de pollo y las plumas pueden usarse para obtener un producto rico en aminoácidos al tratar con Ca(OH)_2 a temperaturas menores de 100 °C. Un simple depósito sin presurización puede usarse para el proceso anterior debido a los bajos requisitos de temperatura.

10 **[0260]** La mezcla de despojos/alas de pollo puede usarse para obtener dos productos ricos en aminoácidos, uno que está bien equilibrado (despojos) y un segundo deficiente en algunos aminoácidos pero con un alto contenido de proteína y mineral.

[0261] Para el primer tratamiento de la mezcla con cal (secuencias a 50-100 °C) el espectro de los aminoácidos esenciales que se obtiene a partir de los experimentos
 15 cumple o excede las necesidades para muchos animales domésticos durante su periodo de crecimiento. Por lo tanto, el producto sólido rico en aminoácidos obtenido por el tratamiento con cal de los despojos de pollo podría utilizarse como un suplemento proteínico para estos animales.

[0262] Para el segundo tratamiento con cal de la mezcla (secuencias a 75-100 °C) el espectro de los aminoácidos esenciales que se obtiene a partir de los experimentos es
 20 deficiente en algunos aminoácidos. Por lo tanto, el producto sólido rico en aminoácidos obtenido por el segundo tratamiento con cal de la mezcla de despojos/plumas de pollo podría usarse como una fuente de nitrógeno y minerales para animales rumiantes.

[0263] La precipitación del carbonato de calcio haciendo burbujear CO_2 en el producto
 25 líquido centrifugado proporciona una recuperación de calcio entre el 50 y el 70 %. Se recomienda un alto pH inicial (>10), para que se forme carbonato de calcio y no bicarbonato de calcio durante el proceso; mientras que un pH final ~8,8-9,0 asegura una alta recuperación de calcio para la regeneración de cal. Dado que el CaSO_4 es un material más soluble y el yeso es más difícil de reciclar, el uso de CaCO_3 como el
 30 precipitado es un proceso más eficaz. Finalmente, las soluciones de cal hidrolizaron y conservaron los desechos del procesamiento del pollo, incluyendo el material queratinoso en las plumas de pollo. La ausencia de olores putrefactos, la hidrólisis de la proteína continua en la fase líquida y la posibilidad de una monitorización continua del pH durante la conservación de la mezcla de desechos de pollo hacen el proceso
 35 una alternativa factible para mantener una solución estable (no fermentativa) y

conservar las carcasas durante el almacenamiento en la granja.

Ejemplo 6: Solubilización de proteína en pelo de vaca

- [0264]** De acuerdo con el USDA (Departamento de agricultura de los Estados Unidos), se consumen 188 lb de carne roja y aves de corral por persona cada año en los Estados Unidos, de los que ~116 lb son ternera y cerdo. La matanza del animal genera grandes cantidades de desechos y el pelo animal representa entre un 3 y 7 % del peso total. Existe la necesidad y el deseo de hacer un mejor uso de residuos y convertirlos en productos útiles.
- 10 **[0265]** El pelo de vaca húmedo se obtuvo de Terrabon Company y después se secó al aire. Para caracterizar el material inicial, se determinó el contenido de humedad, el nitrógeno total (estimación de la fracción proteica) y el contenido de aminoácidos.
- [0266]** El pelo secado al aire se usó como el material inicial para estos experimentos. Su contenido de materia seca, composición química y el equilibrio de aminoácidos se
- 15 presentan en la tabla 91, tabla 92 y tabla 93, respectivamente.

Tabla 91. Contenido de materia seca de pelo de vaca secado al aire

Muestra	Sólido húmedo (g)	Sólido seco (g)	Materia seca (%)
1	4,0883	3,8350	93,80
2	3,7447	3,5163	93,90
		Media	93,85

Tabla 92. Contenido de proteína y mineral de pelo de vaca secado al aire

Muestra	TKN (%)	P (%)	K (%)	Ca (%)	Mg (%)	Na (ppm)	Zn (ppm)	Fe (ppm)	Cu (ppm)	Mn (ppm)
Pelo	14,73	0,0508	0,0197	0,1658	0,029	5244	58	185	50	37

Tabla 93. Composición de aminoácidos de pelo de vaca secado al aire

Aminoácido	Medido	Literatura	Aminoácido	Medido	Literatura
ASP	6,63	3,0	TYR	2,44	3,4
GLU	14,47	12,2	VAL	6,80	5,5
SER	8,91	7,2	MET	0,71	0,6
HIS	1,29	0,7	PHE	3,09	3,0
GLY	5,52	10,8	ILE	4,20	4,4
THR	7,48	6,6	LEU	9,77	7,7
ALA	4,50	1,0	LYS	5,53	2,1
CYS	ND	13,9	TRP	ND	1,4
ARG	10,98	7,7	PRO	7,68	8,5

ND: No determinado Valores en g AA/100 g aminoácidos totales.

[0267] El material inicial contiene un contenido de aminoácidos relativamente bien equilibrado, con niveles bajos de histidina, metionina, tirosina y fenilalanina. El contenido de ceniza es muy bajo (~1 %) y el contenido de proteína cruda es alto (~92,1 %). El contenido de humedad inicial es 6,15 %.

5

Experimento 1. Efecto de la concentración de pelo

[0268] Con el fin de determinar el efecto de la concentración de pelo inicial en la solubilización de proteína, se realizaron experimentos con diferentes concentraciones manteniendo la temperatura y la carga de cal constantes (100 °C y 0,10 g cal/g pelo secado al aire, respectivamente). Las condiciones experimentales estudiadas y las variables medidas se resumen en la tabla 94.

Tabla 94. Condiciones experimentales y variables medidas para determinar el efecto de la concentración de pelo inicial en la solubilización de proteína de pelo de vaca.

Concentración de pelo (g pelo /L)	40	60
Masa de pelo (g)	34	51
Volumen de agua (mL)	850	850
Masa de cal (g)	3,4	5,1
Temperatura (°C)	100	100
Temperatura inicial (°C)	101,4	87,1
pH final	9,2	9,8
Sólido residual (g)	28,8	44,9
Sólidos disueltos en 100 mL (g)	1,18	1,92
Proteína en 100 mL (g)	0,81	1,04

[0269] La tabla 95 muestra el contenido de nitrógeno total en las muestras líquidas centrifugadas en función del tiempo para las diferentes concentraciones de pelo. Sobre la base de la media del NTK para el pelo secado al aire (14,73 %), se estimaron las conversiones de hidrólisis de la proteína y se presentan en la tabla 96.

Tabla 95. Contenido de nitrógeno total Kjeldhal en la fase líquida centrifugada en función del tiempo para el experimento 1 (pelo de vaca)

Tiempo (h)	Concentración de pelo secado al aire	
	40 g/L	60 g/L
0	0,0160	0,0327
0,5	0,0185	0,0497
1	0,0435	0,0699
2	0,0718	0,1000
3	0,0754	0,1194

4	0,0868	0,1368
6	0,1088	0,1629
8	0,1298	0,1662
NTK en g nitrógeno/100 g muestra líquida.		

Tabla 96. Porcentaje de conversión del NTK total a NTK soluble para el experimento 1 (pelo de vaca)

Tiempo (h)	Concentración de pelo secado al aire	
	40 g/L	60 g/L
0	2,72	3,70
0,5	3,14	5,62
1	7,38	7,91
2	12,19	11,31
3	12,80	13,51
4	14,73	15,48
6	18,47	18,43
8	22,03	18,81

[0270] La FIGURA 38 presenta la solubilización de proteína (porcentaje de conversión) en función del tiempo para las diferentes concentraciones de pelo estudiadas. Muestra que la concentración de pelo no tiene un efecto importante en la hidrólisis de la proteína (conversión) y que se necesitan cargas de cal más altas o un periodo de tratamiento más largo para conseguir conversiones del orden del 70 %, que puede conseguirse con plumas de pollo, otro material queratinoso.

[0271] Como muestra la tabla 94, los sólidos disueltos son más altos para la concentración de pelo más alta, como se esperaba. El pH final para ambos casos es más bajo que el inicial 12,0, lo que implica que la cal se consumió durante la hidrólisis y que la cal no estaba presente como un sólido en la mezcla final.

Experimento 2. Efecto de la carga de cal

[0272] Para determinar el efecto de la carga de cal en la solubilización de proteína del pelo secado al aire, se realizaron experimentos con diferentes relaciones de cal/pelo manteniendo la temperatura y la concentración de pelo constantes (100 °C y 40 g pelo secado al aire/L, respectivamente). Las condiciones experimentales estudiadas y las variables medidas se resumen en la tabla 97.

Tabla 97. Condiciones experimentales y variables medidas para determinar el efecto de la carga de cal en la solubilización de proteína del pelo de vaca				
Carga de cal (g cal/g pelo)	0,10	0,20	0,25	0,35
Masa de pelo (g)	34	34	34	34

Volumen de agua (mL)	850	850	850	850
Masa de cal (g)	3,4	6,8	8,5	11,9
Temperatura (°C)	100	100	100	100
Temperatura inicial (°C)	101,4	102,3	75,6	90,2
pH final	9,2	10,3	11,4	11,2
Sólido residual (g)	28,8	17,44(*)	22,6	22,9
Sólidos disueltos en 100 mL (g)	1,18	2,92(*)	2,96	2,99
Proteína en 100 mL (g)	0,81	1,77	2,18	2,40

(*) Medido tras 48 horas y no 8 horas como las otras tres condiciones.

- [0273]** La tabla 98 muestra el contenido de nitrógeno total en las muestras líquidas centrifugadas en función del tiempo para las diferentes cargas de cal. Sobre la base de la media del NTK para el pelo secado al aire (14,73 %), se estimaron las conversiones de hidrólisis de la proteína y se presentan en la tabla 99.

Tabla 98. Contenido de nitrógeno total Kjeldhal en la fase líquida centrifugada en función del tiempo para el experimento 2 (pelo de vaca)

Tiempo (min)	Carga de cal			
	0,10 g/g	0,20 g/g	0,25 g/g	0,35 g/g
0	0,0160	0,0144	0,0241	0,0133
0,5	0,0185	---	0,0454	0,0637
1	0,0435	0,0845	0,0922	0,0822
2	0,0718	0,1425	0,1350	0,1438
3	0,0754	---	0,1549	0,1792
4	0,0868	0,2145	0,1951	0,2023
6	0,1088	---	0,2699	0,2999
8	0,1298	0,2832	0,3487	0,3837

NTK en g nitrógeno/100 g muestra líquida.

Tabla 99. Porcentaje de conversión del NTK total a NTK soluble para el experimento 2 (pelo de vaca)

Tiempo (min)	Carga de cal			
	0,10 g/g	0,20 g/g	0,25 g/g	0,35 g/g
0	2,72	2,44	4,09	2,26
0,5	3,14	---	7,71	10,81
1	7,38	14,34	15,65	13,95
2	12,19	24,19	22,91	24,41
3	12,80	---	26,29	30,41
4	14,73	36,41	33,11	34,33
6	18,47	---	45,81	50,90
8	22,03	48,07	59,18	65,12

- [0274]** La FIGURA 39 presenta la proteína solubilizada (porcentaje de conversión) en

función del tiempo para las diferentes cargas de cal estudiadas. Muestra que la conversión es similar para todas las cargas de cal, excepto para 0,1 g cal/g pelo secado al aire. La FIGURA 38 muestra que las conversiones difieren más con tiempos más largos y que la reacción no se ralentiza con 8 h para ninguna de las cargas de cal estudiadas. Por lo tanto, un periodo de tratamiento más largo puede aumentar la conversión y la carga de cal mínima necesaria para el que el proceso sea eficaz.

[0275] Como muestra la tabla 97, los sólidos disueltos son más elevados con cargas de cal más elevadas como se esperaba (sales cálcicas más altas en soluciones y una conversión más alta). El pH final aumenta al tiempo que aumenta la carga de cal, y es inferior a 12,0 en todos los casos, lo que implica de nuevo el consumo de cal durante la hidrólisis y que la concentración final de OH (pH) puede estar relacionada de nuevo con la eficacia del tratamiento.

[0276] El comportamiento mostrado en la FIGURA 39 puede hacer referencia a la necesidad del grupo hidroxilo como catalizador para la reacción de hidrólisis. La baja solubilidad de la cal mantiene una concentración de cal “constante” en todos los tratamientos (0,2 a 0,35 g cal/g pelo secado al aire), pero su consumo durante el proceso hace que la reacción de la carga de cal menor se ralentice o se establezca más rápido.

Experimento 3. Efecto del tratamiento a mayor largo plazo

[0277] Para establecer el efecto de un tratamiento a largo plazo en la solubilización de proteína, se realizaron experimentos con dos condiciones diferentes: 100 °C, 0,2 g cal/g pelo secado al aire con 40 g pelo secado al aire/L; y 100 °C, 0,35 g cal/pelo secado al aire con 40 g pelo secado al aire/L respectivamente. Las condiciones experimentales estudiadas y las variables medidas se resumen en la tabla 100.

Tabla 100. Condiciones experimentales y variables medidas para determinar el efecto de un periodo de tratamiento más largo en la solubilización de proteína de pelo de vaca

Carga de cal (g cal/g pelo secado al aire)	0,2	0,35
Masa de pelo (g)	34	34
Volumen de agua (mL)	850	850
Masa de cal (g)	6,8	11,9
Temperatura (°C)	100	100
pH final	10,3	11,99
Sólido residual (g)	17,44	10,74
Sólidos disueltos en 100 mL (g)	2,92	4,01
Proteína en 100 mL (g) con 48 h	2,25	2,63

[0278] La tabla 101 muestra el contenido de nitrógeno total de las muestras líquidas centrifugadas en función del tiempo para las diferentes cargas de cal. Sobre la base de la media de NTK para pelo secado al aire (14,73 %), se estimaron las conversiones de hidrólisis de la proteína y se proporcionan en la tabla 102.

5

Tabla 101. Contenido de nitrógeno total Kjeldhal en la fase líquida centrifugada en función del tiempo para el experimento 3 (pelo de vaca)		
Carga de cal		
Tiempo (h)	0,20 g/g	0,35 g/g
0	0,0144	0,0133
1	0,0845	---
2	0,1425	---
4	0,2145	0,2088
8	0,2832	0,2832
12	0,3089	---
24	0,3319	0,3988
36	0,3617	0,4265
48	0,3597	0,4210

NTK en g nitrógeno/100 g muestra líquida

Tabla 102. Porcentaje de conversión del NTK total a NTK soluble para el experimento 3 (pelo de vaca)		
Carga de cal		
Tiempo (h)	0,20 g/g	0,35 g/g
0	2,44	2,26
1	14,34	---
2	24,19	---
4	36,41	35,44
8	48,07	48,07
12	52,43	---
24	56,33	67,68
36	61,39	72,39
48	61,05	71,45

[0279] La FIGURA 40 presenta la solubilización de proteína (porcentaje de conversión) en función del tiempo para dos condiciones diferentes estudiadas. Muestra que las conversiones difieren con tratamientos más largos y que la reacción alcanza la conversión más alta entre 24 y 26 horas de tratamiento. La relación entre la disponibilidad de cal y la conversión es más perceptible en este estudio de tratamiento a largo plazo.

[0280] Existe un olor bastante perceptible de amoníaco, que empieza con 24 horas,

que sugiere una degradación de aminoácidos en periodos más largos. Una manera de reducir este problema es recuperar los aminoácidos que ya se han hidrolizado a la fase líquida con separación de residuos sólidos para otra hidrólisis alcalina en los siguientes pasos de tratamiento.

5

Experimento 4. Mediciones de amoniaco durante la hidrólisis alcalina de pelo de vaca secado al aire (degradación de aminoácidos)

[0281] El efecto de un tratamiento a largo plazo en la solubilización de proteína y la degradación de aminoácidos solubles se determinó con mediciones de amoniaco. La concentración de amoniaco se determinó en función del tiempo para las dos condiciones experimentales del experimento 3 y para una secuencia adicional que usó el líquido centrifugado de un experimento llevado a cabo con 100 °C, 0,2 g cal/g pelo secado al aire con 40 g pelo secado al aire/L durante 5 horas. Las condiciones experimentales estudiadas y las variables medidas se resumen en la tabla 103.

15

Tabla 103. Condiciones experimentales y variables medidas para determinar el efecto de un periodo de tratamiento más largo en la degradación de aminoácidos

Carga de cal (g cal/g pelo secado al aire)	0,2 (Exp. A1)	0,5 (Exp. A2)	0,35 (Exp. A3)
Masa de pelo (g)	34	34	**
Volumen de agua (mL)	850	850	850
Masa de cal (g)	6,8	11,9	8,5
Temperatura (°C)	100	100	100
Temperatura inicial (°C)	102,3	98,8	96,6
pH final	10,3	11,99	12,08
Sólido residual (g)	17,44	10,74	8,28
Sólidos disueltos en 100 mL (g)	2,92	4,01	2,50
Proteína en 100 mL (g) 48 h	2,25	2,63	1,41

** No se usó material sólido, solo el líquido centrifugado de un experimento previo.

[0282] Las tablas 104-106 y las FIGURAS 41-43 muestran el contenido total de nitrógeno y la concentración amoniaco libre en las muestras líquidas centrifugadas en función del tiempo para diferentes condiciones experimentales.

20

Tabla 104. Contenido de nitrógeno total Kjeldhal, concentración de amoniaco y nitrógeno proteico estimado en la fase líquida centrifugada en función del tiempo para el experimento A1 (pelo de vaca)

Tiempo (h)	[Amoniaco] (ppm)	NTK (%)	NTK (ppm)	N proteico (ppm)
0	34	0,0144	144	110
1	33	0,0845	845	812
2	41	0,1425	1425	1384
4	76	0,2145	2145	2069
8	175	0,2832	2832	2657
12	236	0,3089	3089	2853
24	274	0,3319	3319	3045
36	327	0,3617	3617	3290
48	316	0,3597	3597	3281

NTK en g nitrógeno/100 g muestra líquida.

Tabla 105. Contenido de nitrógeno total Kjeldhal, concentración de amoniaco y nitrógeno proteico estimado en la fase líquida centrifugada en función del tiempo para el experimento A2 (pelo de vaca)

Tiempo (h)	[Amoniaco] (ppm)	NTK (%)	NTK (ppm)	N proteico (ppm)
0	0	0	0	0
4	85	0,2088	2088	2003
8	115	0,2832	2832	2717
24	111	0,3988	3988	3877
36	141	0,4265	4265	4124
48	110	0,4210	4210	4100

NTK en g nitrógeno/100 g muestra líquida.

Tabla 106. Contenido de nitrógeno total Kjeldhal, concentración de amoniaco y nitrógeno proteico estimado en la fase líquida centrifugada en función del tiempo para el experimento A3 (pelo de vaca)

Tiempo (h)	[Amoniaco] (ppm)	NTK (%)	NTK (ppm)	N proteico (PPM)
0	50	0,2332	2332	2282
1	50	0,2426	2426	2376
2	51	0,2449	2449	2398
4	60	0,2449	2449	2389
8	90	0,2382	2382	2292
12	106	0,2393	2393	2287
24	86	0,2326	2326	2240
48	87	0,2248	2248	2161

La concentración de amoniaco en el líquido centrifugado se determina por el método Kjeldhal pero sin hidrólisis inicial de la muestra. NTK en g nitrógeno/100 g muestra líquida.

[0283] Las FIGURAS 41 y 42 muestran que la concentración de nitrógeno proteico

total aumenta en función del tiempo hasta que alcanza un máximo entre 24 y 36 h de tratamiento. La concentración de amoníaco libre también aumenta en función del tiempo, lo que sugiere la degradación de aminoácidos. En los experimentos A1 y A2, la hidrólisis adicional de pelo en el líquido excede la degradación de aminoácidos, lo que proporciona una mejora neta del N proteico hasta el periodo de 24-36 h.

[0284] En el experimento A3 el pelo sólido no está presente, por lo que no existe una fuente de proteína que no sea la proteína solubilizada anteriormente. En este caso, la reducción del N proteico tuvo lugar tras 4 h y continuó con 48 h, lo que implica que hay varios aminoácidos que son susceptibles a la degradación con las condiciones estudiadas.

Experimento 4A. Estudio de la degradación de los aminoácidos

[0285] Para los experimentos A2 y A3, se analizó la composición de aminoácidos de las muestras líquidas para determinar la estabilidad de los aminoácidos individuales en el hidrolizado proteico.

[0286] Se llevaron a cabo dos análisis de aminoácidos diferentes del pelo de vaca hidrolizado con cal:

1) *Aminoácidos libres en el líquido centrifugado.* El análisis se realizó sin hidrólisis con HCl extra de la muestra. No se destruyeron aminoácidos por el procedimiento analítico, pero se perdieron polipéptidos solubles en el análisis.

2) *Aminoácidos totales en el líquido centrifugado.* La hidrólisis con HCl se realizó antes de la determinación HPLC. Se destruyeron algunos aminoácidos (asparagina, glutamina, cisteína y triptófano) por el ácido y no se pudieron medir.

[0287] La tabla 107 y la tabla 108 comparan los aminoácidos totales (hidrólisis con HCl), los aminoácidos libres y los aminoácidos estimados usando valores NTK. Estas tablas muestran que la proteína del pelo se hidroliza principalmente en pequeños péptidos solubles en lugar de en aminoácidos libres (si se comparan las columnas de aminoácidos libres con los aminoácidos totales).

Tabla 107. Comparación de concentraciones de proteína para el experimento A2 (pelo de vaca)

Tiempo (h)	NTK (%)	Proteína (mg/L)	AA libres (mq/L)	AA totales (mg/L)
4	0,2088	13050,0	330,4	4783,5
8	0,2832	17700,0	684,5	9300,4
24	0,3988	24925,0	1454,9	12208,4

36	0,4265	26656,3	1699,2	13680,1
48	0,4210	26312,5	1742,6	13989,6

Tabla 108. Comparación de concentraciones de proteína para el experimento A3 (pelo de vaca)

Tiempo (h)	NTK (%)	Proteína (mg/L)	AA libres (mg/L)	AA totales (mg/L)
0	0,2332	14575,0	413,6	7373,0
1	0,2426	15162,5	816,6	9490,6
2	0,2449	15306,3	989,4	11075,4
4	0,2449	15306,3	1154,7	12040,4
8	0,2382	14887,5	1393,9	10549,1
12	0,2393	14956,3	1571,9	9988,4
24	0,2326	14537,5	2266,9	8464,8
48	0,2248	14050,0	2236,9	8782,3

[0288] La tabla 108 también muestra un aumento en la concentración de aminoácidos totales entre 0 y 4 h. Puesto que este experimento (A3) se llevó a cabo solo con líquido centrifugado (sin pelo sólido), el valor aumentado puede explicarse por la presencia de partículas polipéptidas suspendidas en la solución que se hidrolizan además en el líquido. El líquido se centrifugó a 3500 rpm en la separación sólida, mientras que se usan 15000 rpm antes del análisis HPLC.

[0289] La tabla 108 muestra un buen acuerdo entre la proteína estimada (NTK) y la concentración de aminoácidos totales con 4 h. Con este tiempo, existe relativamente poca degradación de aminoácidos y una conversión muy alta del “material suspendido” en la fase líquida. En la tabla 107, la diferencia puede explicarse por la presencia de este material suspendido, que no se responde en el análisis de aminoácidos.

[0290] Para el experimento A2, la FIGURA 44 muestra la concentración de aminoácidos libres individuales presentes en el líquido centrifugado en función del tiempo, mientras que la FIGURA 45 muestra la concentración total de aminoácidos individuales en función del tiempo. Las concentraciones de histidina no se pudieron medir o se subestimaron porque eluyó justo antes una muy alta concentración de glicina; por lo tanto, los picos no pudieron separarse.

[0291] La FIGURA 45 muestra un aumento en la concentración de todos los aminoácidos hasta 36 h, excepto para arginina, treonina y serina. La FIGURA 44 muestra un comportamiento similar, con la excepción de que las concentraciones son más bajas, especialmente para la arginina y treonina. Con 36 horas las concentraciones de aminoácidos se estabilizan (excepto para la arginina, treonina y

serina), lo que sugiere un equilibrio entre los procesos de degradación y solubilización.

[0292] Para el experimento A3 (sin pelo sólido añadido, solo líquido centrifugado), la FIGURA 45 muestra la concentración de aminoácidos libres individuales presentes en el líquido centrifugado en función del tiempo, mientras que la FIGURA 46 muestra la

5 concentración total de aminoácidos individuales en función del tiempo.

[0293] En la FIGURA 46, la concentración de aminoácidos aumenta hasta 24 h que es cuando se estabiliza. De nuevo, las excepciones son arginina, treonina y serina, con concentraciones muy bajas de los dos primeros como aminoácidos libres.

[0294] La FIGURA 47 muestra un aumento en la concentración de aminoácidos

10 individuales entre 0 y 4 h. Esto implica de nuevo la presencia de partículas suspendidas en el líquido centrifugado inicial que se hidrolizan a la fase líquida entre 0 y 4 h. Tras esta tendencia inicial, las concentraciones de todos los aminoácidos disminuyen con el tiempo, lo que sugiere la degradación de todos los aminoácidos bajo la condición estudiada para tratamientos a largo plazo. La arginina (16 % de la

15 concentración obtenida con 4 h está presente con 48 h), treonina (31 %) y serina (31 %) disminuyen más que los otros aminoácidos.

[0295] Las concentraciones crecientes de ornitina y citrulina, ambas ausentes en cantidades perceptibles en el pelo, las presentan como posibles productos de degradación.

20 **[0296]** La tabla 109 muestra el porcentaje del peso de cada aminoácido en función del tiempo para el experimento A2. Contenidos similares están presentes para la mayoría de los aminoácidos, exceptuando la arginina, treonina y serina. Algunos porcentajes de aminoácidos aumentan debido a su mayor resistencia a la degradación y la disminución de otros.

25

Tabla 109. Aminoácido individual presente en el experimento A2 en función del tiempo comparado con el material inicial

Aminoácido	Tiempo (h)					Pelo
	4	8	24	36	48	
ASP	6,76	6,90	7,03	6,96	6,77	6,63
GLU	13,31	14,64	15,96	16,42	16,37	14,47
SER	6,68	3,76	1,53	1,11	1,00	8,91
HIS	1,11	0,00	0,00	0,00	0,00	1,29
G LY	9,33	9,48	8,50	8,25	8,29	5,52
THR	2,40	1,66	0,85	0,66	0,54	7,48
CIT	0,91	0,95	1,56	1,68	1,68	0,00
ALA	5,40	6,50	8,63	9,47	9,27	4,50
ARG	9,22	7,79	4,38	2,89	2,11	10,98

TYR	5,35	5,43	5,78	5,87	5,74	2,44
VAL	6,74	7,13	7,45	7,40	7,25	6,80
MET	0,80	0,90	1,05	1,00	1,09	0,71
PHE	3,17	3,05	3,13	3,17	3,15	3,09
ILE	4,04	4,19	4,52	4,62	4,55	4,20
LEU	8,81	9,66	10,92	11,21	11,25	9,77
LYS	2,09	2,71	3,89	4,08	4,14	5,53
PRO	13,77	15,07	14,60	15,02	16,60	7,68

Valores en g AA/100 g aminoácidos totales.

Experimento 5. Tratamiento del material en dos pasos

[0297] La degradación de los aminoácidos observada en los experimentos previos afecta la eficacia general del proceso de hidrólisis. Una forma de afrontar este problema es separar la proteína ya hidrolizada con la subsecuente solubilización de proteína (sólidos residuales) en una serie de pasos de tratamiento. En este experimento, se estudiaron dos condiciones para determinar el efecto de un proceso de dos pasos en la eficacia de la hidrólisis y la degradación de aminoácidos de proteína en pelo secado al aire. Las condiciones experimentales y las variables medidas se resumen en la tabla 110.

Tabla 110. Condiciones experimentales y variables medidas para determinar el efecto de la carga de cal en la solubilización de proteína (pelo de vaca – tratamiento de dos pasos)

Experimento	Exp. C1	Exp. C2	Exp. D1	Exp. D2
Masa de pelo (g)	34	20	34	20
Volumen de agua (mL)	850	850	850	850
Masa de cal (g)	8,5	5	11,9	5
Temperatura (°C)	100	100	100	100
Temperatura inicial (°C)	75,6	96,5	90,2	105
pH final	11,4	11,2	11,2	11,2
Sólido residual (g) con 8 h	22,6	12,7	22,9	12,4
Sólidos disueltos en 100 mL (g)	2,96	1,15	2,99	1,17
Proteína en 100 mL (g) con 8 h	1,80	0,91	1,78	0,86

[0298] La tabla 111 muestra el contenido de nitrógeno total en la muestra líquida centrifugada en función del tiempo para las diferentes condiciones experimentales. Sobre la base de la media del NTK para pelo secado al aire (14,73 %), se estimaron las conversiones de hidrólisis de la proteína y se presentan en la tabla 112. La FIGURA 48 muestra la conversión total para el proceso (Paso 1 + Paso 2) en función del tiempo.

Tabla 111. Contenido de nitrógeno total Kjeldhal en la fase líquida centrifugada en función del tiempo para el experimento 5 (pelo de vaca)

Tiempo (h)	Exp. C1	Exp. C2	Exp. D1	Exp. D2
0	0,0241	0,0363	0,0133	0,0365
0,5	0,0454	0,0553	0,0637	0,0481
1	0,0922	0,0560	0,0822	0,0571
2	0,1350	0,0620	0,1438	0,0631
3	0,1549	0,0756	0,1792	0,0704
4	0,1951	0,0745	0,2023	0,0798
6	0,2299	0,1135	0,2269	0,1042
8	0,2887	0,1450	0,2837	0,1383

NTK en g nitrógeno/100 g muestra líquida.

Tabla 112. Porcentaje de conversión del NTK total a NTK soluble para el experimento 5 (pelo de vaca)

Tiempo (h)	Exp. C1	Exp. C2	Exp. D1	Exp. D2
0	4,09	6,16	2,26	6,19
0.5	7,71	9,39	10,81	8,16
1	15,65	9,50	13,95	9,69
2	22,91	10,52	24,41	10,71
3	26,29	12,83	30,41	11,95
4	33,11	12,64	34,33	18,54
6	39,02	19,26	38,51	17,68
8	49,00	24,61	48,15	23,47

- 5 **[0299]** La FIGURA 48 muestra una conversión similar para las dos condiciones estudiadas. Con 16 h de tratamiento, se recupera un total del 70 % del nitrógeno inicial en la fase líquida. La conversión total aumenta durante el segundo tratamiento y existe una concentración más baja de amoniaco comparada con el tratamiento de un paso (tabla 113), lo que sugiere una menor degradación de aminoácidos. Por lo tanto, un
- 10 tratamiento adicional del sólido residual con cal hidroliza más pelo, pero la concentración de nitrógeno (proteína/aminoácidos) en el segundo paso es solo un 40 % del obtenido en el tratamiento inicial, lo que aumenta la energía requerida para la evaporación del agua. Puesto que la concentración inicial de pelo no tiene un efecto importante en la conversión, una concentración del producto más alta podría
- 15 obtenerse con una reacción semisólida.

Tabla 113. Concentración de amoníaco y nitrógeno total Kjeldhal para los procesos de dos pasos y un paso

	Paso 1 (8 h)	Paso 2 (8 h)	Paso único(16 h)
NTK	0,2984	0,1154	0,3525
Amoníaco	87	39	363

[0300] La separación del líquido inicial con 8 h asegura concentraciones relativamente altas para los aminoácidos susceptibles (arginina, treonina y serina) con aproximadamente un 50 % de conversión de la proteína inicial. El segundo paso proporciona una conversión total más alta con concentraciones más bajas de estos aminoácidos.

[0301] El sólido residual sin reaccionar tras el paso 2 (aproximadamente un 30 % del pelo inicial con 7 g nitrógeno/100 g sólido seco) podría tratarse de forma adicional para proporcionar un total de recuperación de proteína del 80 % en la fase líquida. Este paso requerirá probablemente entre 24 y 36 horas.

Experimento 6. Composición de aminoácidos de productos y proceso de balance de materia

[0302] Esta sección presenta el balance de materia total y la composición de aminoácidos de los productos obtenidos con el proceso sugerido de dos pasos de 8 h y el tratamiento de un paso de 16 h.

[0303] La tabla 113 compara la concentración de amoníaco y el nitrógeno total Kjeldhal para los tres productos líquidos centrifugados. La tabla 114 muestra la composición sólida (nitrógeno y minerales) para los tres sólidos residuales. La FIGURA 49 muestra el balance de materia para el proceso de dos pasos y el proceso de un único paso. La no homogeneidad en sólidos produce una variación muy alta en las concentraciones.

Tabla 114. Contenido de proteína y mineral de pelo secado al aire y sólidos residuales del proceso

Muestra	NTK (%)	P (%)	K (%)	Ca (%)	Mg (%)	Na (ppm)	Zn (ppm)	Fe (ppm)	Cu (ppm)	Mn (ppm)
Pelo	14,73	0,0508	0,0197	0,1658	0,029	5244	58	185	50	37
SR1 8h	10,234	0,0622	0,0176	7,0083	0,1233	3005	108	457	61	17
SR2 8h	6,974	0,0725	0,0155	10,1003	0,1938	2301	117	702	62	22
SR3 16h	5,803	0,0642	0,0228	9,7181	0,1617	2404	79	472	56	18

[0304] La tabla 115 compara la composición de aminoácidos para los tres productos

diferentes y el pelo. Como se esperaba por experimentos previos, el paso 1 proporciona valores más altos para treonina, arginina y serina. Con la excepción de los aminoácidos antes mencionados, la concentración del producto del paso 1, paso 2 y el proceso de un único paso son muy similares.

5

Tabla 115. Aminoácido individual presente en los productos sólidos y el material inicial

Aminoácido	Paso 1 (8h)	Paso 2 (8 h)	Paso único (16 h)	Pelo
ASP	8,19	8,68	7,85	6,63
GLU	17,46	19,30	17,51	14,47
SER	3,01	1,10	1,57	8,91
HIS	1,06	0,83	0,94	1,29
GLY	10,00	6,97	9,84	5,52
THR	1,32	0,83	0,76	7,48
ALA	7,34	7,80	8,64	4,50
ARG	7,95	4,94	5,25	10,98
TYR	1,75	2,14	2,59	2,44
VAL	7,82	8,99	8,20	6,80
MET	0,73	0,99	0,75	0,71
PHE	3,37	3,39	3,38	3,09
ILE	4,62	5,21	4,82	4,20
LEU	11,01	13,04	11,52	9,77
LYS	2,77	4,82	3,91	5,53
PRO	11,62	10,94	12,45	7,68

Valores en g AA/100 g aminoácidos totales.

[0305] Finalmente, en la tabla 116, se comparó la composición de aminoácidos de los productos con los aminoácidos esenciales necesarios de varios animales domésticos monogástricos.

10

Tabla 116. Análisis de aminoácidos del producto y necesidades de aminoácidos esenciales para varios animales domésticos

Aminoácido	Paso 1 (8h)	Paso 2 (8h)	Paso único 16h	Pelo	Siluro	Perros	Gatos	Pollos	Cerdos
ASP	8,19	8,68	7,85	6,63					
GLU	17,46	19,30	17,51	14,47					
SER	3,01	1,10	1,57	8,91					
HIS	1,06	0,83	0,94	1,29	1,31	1	1,03	1,4	1,25

ES 2 402 348 T3

GLY	10,00	6,97	9,84	5,52					
THR	1,32	0,83	0,76	7,48	1,75	2,64	2,43	3,5	2,5
ALA	7,34	7,80	8,64	4,50					
ARG	7,95	4,94	5,25	10,98	3,75	2,82	4,17	5,5	0
VAL	7,82	8,99	8,20	6,80	2,63	2,18	2,07	4,15	2,67
CYS	ND	ND	ND	ND	2 ⁺	2,41 ⁺	3,67 ⁺	4 ⁺	1,92 ⁺
MET	0,73	0,99	0,75	0,71	2 ⁺	2,41 ⁺	2,07	2,25	1,92 ⁺
TYR	1,75	2,14	2,59	2,44	4,38 [*]	4,05 [*]	2,93 [*]	5,85 [*]	3,75 [*]
PHE	3,37	3,39	3,38	3,09	4,38 [*]	4,05 [*]	1,4	3,15	3,75 [*]
ILE	4,62	5,21	4,82	4,20	2,28	2,05	1,73	3,65	2,5
LEU	11,01	13,04	11,52	9,77	3,06	3,27	4,17	5,25	2,5
LYS	2,77	4,82	3,91	5,53	4,47	3,5	4	5,75	3,58
TRP	ND	ND	ND	ND	0,44	0,91	0,83	1,05	0,75
PRO	11,62	10,94	12,45	7,68					

⁺ Cisteína + metionina *Tirosina + fenilalanina ND No determinado
 Todos los valores están en g aminoácido/100 g proteína.

[0306] Como se muestra en la tabla 116, la composición de aminoácidos del pelo de vaca hidrolizado con cal no está equilibrada con respecto a las necesidades de aminoácidos esenciales de diferentes animales domésticos monogástricos. Existen valores especialmente bajos para histidina (subestimados en el análisis), treonina, metionina y lisina; otros aminoácidos son suficientes para la mayoría de los animales, pero no todos (tirosina, fenilalanina). La hidrólisis de cal de pelo de vaca genera un producto que es muy rico en prolina y glutamina+glutamato, pero estos no son aminoácidos esenciales en la dieta de animales domésticos monogástricos. El producto de aminoácidos puede usarse para rumiantes.

[0307] Podría obtenerse una concentración más alta de serina y treonina al reducir el tiempo en el paso 1.

[0308] El pelo de vaca secado al aire, que contiene un 92 % de proteína (base húmeda), puede usarse para obtener un producto rico en aminoácidos al tratarlo con Ca(OH)₂ a 100 °C. Puede usarse un depósito sin presurización para el proceso anterior debido a los bajos requisitos de temperatura.

[0309] La concentración de pelo no tiene un efecto importante en la hidrólisis de la proteína, mientras que se necesitan altas cargas de cal (mayores de 0,1 g Ca(OH)₂/g pelo) y largos periodos de tratamiento (t > 8 h) para obtener conversiones de un 70 % aproximadamente, que también pueden obtenerse con plumas de pollo, otro material queratinoso.

[0310] La solubilización de proteína varía con la carga de cal solo para el tratamiento a largo plazo, lo que muestra que se necesita el grupo hidroxilo como catalizador para la reacción de la hidrólisis, pero su consumo durante el proceso hace que la reacción de la carga de cal más baja se ralentice o se estabilice más rápido.

5 **[0311]** Las condiciones óptimas para maximizar la conversión de proteína (hasta un 70 %) son 0,35 g Ca(OH)₂/g pelo secado al aire procesado a 100 °C durante al menos 24 horas. Un olor de amoníaco bastante perceptible, que comienza con 24 horas, sugiere la degradación de aminoácidos. La arginina, treonina y serina son los aminoácidos más susceptibles bajos la hidrólisis alcalina.

10 **[0312]** La degradación de aminoácidos puede minimizarse recuperando los aminoácidos ya hidrolizados en la fase líquida, con separación de sólidos residuales para una hidrólisis alcalina adicional en los subsecuentes pasos de tratamiento. La separación del líquido inicial (paso 1) con 8 h asegura concentraciones relativamente altas para los aminoácidos susceptibles (arginina, treonina y serina) con
15 aproximadamente una conversión del 50 % de la proteína inicial. El segundo paso de 8 horas proporciona una conversión total más alta (aproximadamente un 70 %) con concentraciones más bajas de estos aminoácidos.

[0313] La concentración de nitrógeno (proteína/aminoácidos) en el paso 2 es solo un 40 % del obtenido en el tratamiento inicial, lo que aumenta la energía necesaria para la
20 evaporación del agua. Puesto que la concentración inicial de pelo no tiene un efecto importante en la conversión, podría obtenerse una concentración del producto más alta con una reacción semisólida.

[0314] La composición de aminoácidos del producto se compara pésimamente con las necesidades de aminoácidos esenciales para varios animales domésticos
25 monogástricos. El producto está bajo de treonina, histidina, metionina y lisina. Es especialmente rico en asparagina y prolina, pero estos no se necesitan en las dietas animales. Los productos obtenidos por este proceso son útiles como pienso para rumiantes, tienen una digestibilidad muy alta, un alto contenido en nitrógeno y son altamente solubles en agua.

30

Ejemplo 7: Solubilización de proteína en cabezas de gamba

[0315] Cantidades considerables de subproductos de procesamiento de gambas se desechan cada año. En el procesamiento de gambas comercial aproximadamente un
35 25 % (m/m) de la gamba viva se recupera como carne. Los residuos sólidos contienen aproximadamente un 30-35 % de proteína en el tejido; el carbonato de calcio y la

quitina son las otras fracciones importantes. La producción de quitosano y quitina se basa actualmente en residuos del procesamiento crustáceo. Durante la producción de quitosano, para cada kg de quitosano producido, se desechan aproximadamente 3 kg de proteína (Gildberg y Stenberg, 2001).

5 **[0316]** La quitina es un amino polisacárido naturalmente abundante, ampliamente distribuido, insoluble en agua, álcali y solventes orgánicos, y ligeramente soluble en ácidos fuertes. La quitina es un componente estructural en los exoesqueletos crustáceos, que son un ~15-20 % de quitina por el peso seco. La quitina es similar a la celulosa tanto por la estructura química como por la función biológica como polímero
10 estructural (Kumar, 2000)

[0317] Actualmente, los materiales que contienen quitina (caparazón del cangrejo, desechos de gambas, etc.) se tratan en hidróxido de sodio acuoso hirviendo (4 % m/m) durante 1-3 h seguido por la descalcificación (eliminación del carbonato de calcio) en ácido clorhídrico diluido (1-2 N HCL) durante 8-10 h. Después, la quitina se
15 desacetila para convertirse en quitosano en hidróxido de sodio concentrado (40-50 % m/m) bajo temperatura hirviendo.

[0318] Se obtuvieron gambas blancas enteras, grandes y congeladas del supermercado. Se retiraron las colas de gamba y se mezclaron los desechos residuales (cabezas, antenas, etc.) durante 10 min en un mezclador industrial, se
20 recogieron en botellas de plástico y finalmente se congelaron a -4 °C para un uso posterior. Se usaron las muestras de este material mezclado para obtener el contenido de humedad, el nitrógeno total (estimación de la proteína ~16 % + fracción de quitina ~16,4 % del peso total es nitrógeno), la ceniza (fracción mineral) y el contenido de aminoácidos para caracterizar el material inicial.

25 **[0319]** Los desechos de cabezas de gamba era 21,46 % material seco y 17,2 g ceniza/100 g peso seco (tabla 117 y tabla 118). El NTK era 10,25 % correspondiente a una proteína cruda y una fracción quitina de aproximadamente 64,1 % (tabla 119). El 18 % restante corresponde a los lípidos y otros componentes. La composición de aminoácidos de los desechos de cabezas de gamba se presenta en la tabla 120.

30

Tabla 117. Contenido de humedad en los desechos de cabezas de gamba

Muestra	Sólido (g)	Sólido seco (g)	Sólido seco (%)
1	64,1091	13,7745	21,49
2	58,5237	12,5662	21,47
3	61,7193	13,2126	21,41
		Media	21,46

Tabla 118. Contenido de ceniza en los desechos de cabezas de gamba

Muestra	Sólido (g)	Sólido seco (g)	Sólido seco (%)
1	3,2902	0,5859	17,81
2	3,068	0,5148	16,78
3	3,0486	0,5196	17,04
		Media	17,21

Tabla 119. Contenido de proteína y mineral en los desechos de cabezas de gamba

Muestra	NTK (%)	P (%)	K (%)	Ca (%)	Mg (%)	Na (ppm)	Zn (ppm)	Fe (ppm)	Cu (ppm)	Mn (ppm)
1	10,2	1,34	1,07	4,5430	0,3896	12090	90	355	160	10
2	10,3	1,21	1,02	4,7162	0,3586	11550	90	167	155	9
Media	10,25	1,27	1,045	4,6296	0,3781	11820	90	261	157,5	95

Tabla 120. Composición de aminoácidos de desechos de cabezas de gamba

Aminoácido	Medido	Aminoácido	Medido
ASP	11,13	TYR	3,15
GLU	15,83	VAL	5,77
SER	4,08	MET	1,84
HIS	1,78	PHE	4,93
GLY	6,94	ILE	4,54
THR	4,06	LIEU	8,30
ALA	6,83	LYS	5,63
OYS	ND	TRIP	ND
ARG	7,25	PRO	7,96

ND: No determinado Valores en g AA/100 g aminoácidos totales.

- 5 **[0320]** El material inicial contiene un contenido de aminoácidos bien equilibrado (tabla 120) con niveles relativamente bajos de histidina y metionina. Los altos niveles de fósforo, calcio, potasio convierten el material en una fuente valiosa de minerales en las dietas animales.

Experimento 1. Repetibilidad

- 10 **[0321]** Para determinar la repetibilidad del proceso de solubilización de proteína en desechos de cabezas de gamba, se realizaron dos experimentos bajo las mismas condiciones (100 °C, 40 g gambas secas/L y 0,10 g cal/g gambas secas respectivamente). Las condiciones experimentales y las variables medidas se resumen

en la tabla 121.

Tabla 121. Condiciones experimentales y variables medidas para determinar la repetibilidad en la solubilización de desechos de cabezas de gamba

Experimento	A	B
Masa de desechos de cabezas de gamba (g)	149	149
Volumen de agua (mL)	750	750
Masa de cal (g)	3,2	3,2
Temperatura inicial (°C)	97	87
pH final	10,64	10,2
Sólido residual húmedo (g)	137,19	182,7
Sólido residual seco (g)	17,24	19,74
Sólidos disueltos en 100 mL (g)	2,3757	2,4322

5 [0322] La tabla 122 muestra el contenido de nitrógeno total en las muestras líquidas centrifugadas en función del tiempo para las dos secuencias diferentes. Sobre la base de la media del NTK para desechos de cabezas de gama (10,25 %), se estimaron las conversiones de hidrólisis de la proteína y se presentan en la tabla 123. La desviación estándar media para los valores de conversión es 1,13 o 1,5 % del resultado medio (conversión 79,3 %).

10

Tabla 122. Contenido de nitrógeno total Kjeldhal en la fase líquida centrifugada en función del tiempo para el experimento 1 (desechos de cabezas de gamba)

Tiempo (min)	A	B
0	0,2837	0,2934
10	0,3005	0,3017
20	0,3053	0,2981
30	0,3029	0,3005
60	0,3053	0,2969
120	0,3077	0,3005

Tabla 123. Porcentaje de conversión del NTK total a NTK soluble para el experimento 1 (desechos de cabezas de gamba)

Tiempo (min)	A	B
0	75,1	77,6
10	79,5	79,8
20	80,8	78,9
30	80,1	79,5
60	80,8	78,6
120	81,4	79,5

NTK en g nitrógeno/100 g muestra líquida.

[0323] La FIGURA 49 presenta la solubilización de proteína (porcentaje de conversión) en función del tiempo para las dos secuencias diferentes. Muestra que la conversión permanece constante tras los 5-10 min iniciales, y que el proceso de la hidrólisis de la proteína es bastante repetible bajo las condiciones estudiadas. Para la muestra con el tiempo 0 min, que se toma una vez el reactor se ha cerrado y presurizado, este proceso lleva entre 8 y 12 min.

Experimento 2. Efecto de la temperatura

[0324] Para determinar el efecto de la temperatura al solubilizar la proteína en desechos de cabezas de gamba, se realizaron experimentos con diferentes temperaturas manteniendo la carga de cal y la concentración del material constante (0,10 g cal/g gambas y 40 g gambas secas/L respectivamente). Las condiciones experimentales y las variables medidas se resumen en la tabla 124.

Tabla 124. Condiciones experimentales y variables medidas para determinar el efecto de la temperatura en la solubilización de proteína en desechos de cabezas de gamba

Temperatura (°C)	75	100	125
Masa de gambas (g)	149	149	149
Volumen de agua (mL)	750	750	750
Masa de cal (g)	3,2	3,2	3,2
Temperatura inicial (°C)	78,5	97	108
pH final	10,1	10,64	9,88
Sólido residual húmedo (g)	133,04	137,19	130,58
Sólido residual seco (g)	16,06	17,24	17,42
Sólidos disueltos en 100 mL (g)	2,6439	2,3757	2,6808

15

[0325] La tabla 125 muestra el contenido de nitrógeno total en las muestras de líquido centrifugadas en función del tiempo para las diferentes temperaturas. Sobre la base de la media de NTK para desechos de cabezas de gamba secas (10,25 %), se estimaron las conversiones de hidrólisis de la proteína y se presentan en la tabla 126.

20

Tabla 125. Contenido de nitrógeno total Kjeldhal en la fase líquida centrifugada en función del tiempo para el experimento 2 (desechos de cabezas de gamba)

Tiempo (min)	Temperatura		
	75°C	100°C	125°C
0	0,3160	0,2837	0,3053
10	0,3196	0,3005	0,3101

20	0,3101	0,3053	0,3101
30	0,3101	0,3029	0,3112
60	0,3101	0,3053	0,3101
120	0,3172	0,3077	0,3101

Tabla 126. Porcentaje de conversión de NTK total a NTK soluble para el experimento 2 (desechos de cabezas de gamba)

Tiempo (min)	Temperatura		
	75°C	100°C	125°C
0	83,6	75,1	80,8
10	84,6	79,5	82,1
20	82,1	80,8	82,1
30	82,1	80,1	82,3
60	82,1	80,8	82,1
120	83,9	81,4	82,1

NTK en g nitrógeno/100 g muestra líquida.

[0326] La FIGURA 51 presenta la hidrólisis de la proteína (porcentaje de conversión) en función del tiempo para las diferentes temperaturas estudiadas. La conversión no depende de la temperatura (estadísticamente el mismo valor). Se prefiere una temperatura más baja porque los aminoácidos se degradarían menos y la energía necesaria para mantener el proceso a esta temperatura es también menor.

Experimento 3. Efecto de la carga de cal

[0327] Para determinar el efecto de carga de cal en la solubilización de proteína de desechos de cabezas de gamba, se realizaron experimentos con diferentes relaciones de cal/gamba manteniendo la temperatura y la concentración de gamba constante (100 °C y 40 g gamba seca/L respectivamente). Las condiciones experimentales y las variables medidas se resumen en la tabla 127.

15

Tabla 127. Condiciones experimentales y variables medidas para determinar el efecto de la carga de cal en la solubilización de proteína de los desechos de cabezas de gamba

Carga de cal (g cal/g gamba)	0	0,05	0,1	0,2
Masa de desechos de cabezas de gamba (g)	149	149	149	149
Volumen de agua (mL)	750	750	750	750
Masa de cal (g)	0	1,6	32	6,4
Temperatura inicial (°C)	96	95	97	103
pH final	8,1	9,20	10,64	12
Sólido residual húmedo (g)	179,4	148,8	137,2	122,5

Sólido residual seco (g)	17,72	16,5	1724	18,28
Sólidos disueltos en 100 mL (g)	2,3576	2,5146	2,3757	2,4516

[0328] La tabla 128 muestra el contenido de nitrógeno total en las muestras líquidas centrifugadas en función del tiempo para las diferentes cargas de cal. Sobre la base de la media de NTK para desechos de cabezas de gamba (10,25 %), se estimaron las conversiones de hidrólisis de la proteína (tabla 129).

Tabla 128. Contenido de nitrógeno total Kjeldhal en la fase líquida centrifugada en función del tiempo para el experimento 3 (desechos de cabezas de gamba)

Tiempo (min)	Carga de cal			
	0 g/g	0,05 g/g	0,1 g/g	0,2 g/g
0	0,2477	0,2890	0,2837	0,2573
10	0,2452	0,2978	0,3005	0,2573
20	0,244	0,3035	0,3053	0,2621
30	0,2488	0,3035	0,3029	0,2669
60	0,2452	0,3051	0,3053	0,2766
120	0,2513	0,3035	0,3077	0,2897

NTK en g nitrógeno/100 g muestra líquida.

Tabla 129. Porcentaje de conversión del NTK total a NTK soluble para el experimento 3 (desechos de cabezas de gamba)

Tiempo (min)	Carga de cal			
	0 g/g	0,05 g/g	0,1 g/g	0,2 g/g
0	65,5	76,5	76,4	68,1
10	64,9	78,8	79,7	68,1
20	64,6	80,3	79,8	69,4
30	65,8	80,3	79,8	70,6
60	64,9	80,7	79,7	73,2
120	66,5	80,3	80,5	76,7

[0329] La FIGURA 52 presenta la proteína solubilizada (porcentaje de conversión) en función del tiempo para las diferentes cargas de cal estudiadas. Muestra que la conversión es similar para todas las cargas de cal, excepto para el experimento sin cal (estadísticamente diferente).

[0330] En el experimento sin cal, existe proteína soluble presente en la fase del agua; sin embargo, los grupos hidroxilo están diluidos, lo que hace que la reacción de la hidrólisis y la rotura celular se ralenticen. El pH final para el experimento sin cal fue 8,1. Probablemente, el pH alcalino se produce por el carbonato de calcio y el bicarbonato liberados de los desechos de gamba.

[0331] Se requiere la adición de cal para asegurar una hidrólisis de la proteína rápida en la fase líquida, y probablemente generaría una fracción más alta de aminoácidos libres en el producto. Además, puesto que el tratamiento con cal se considera como un paso preliminar para generar quitina y quitosano, una alta recuperación de proteína está relacionada con reducir las sustancias químicas necesarios para los siguientes pasos durante el procesamiento y un producto de quitina o quitosano de mayor calidad.

[0332] La recuperación de carotenoides (astaxantina) de los sólidos suspendidos podría tenerse en cuenta para generar un producto valioso adicional a partir del proceso. Puesto que el carbonato de calcio y la quitina son componentes estructurales en el crustáceo, filtrar la mezcla y centrifugar los sólidos suspendidos podría recuperar los carotenoides (Gildberg y Stenberg, 2001).

Experimento 4. Análisis de los aminoácidos

[0333] La tabla 130 muestra la composición de aminoácidos totales del hidrolizado para las diferentes condiciones de proceso. Con la excepción de la serina y la treonina en el experimento con alta carga de cal y una variación relativamente alta en el contenido de cisteína, la composición del producto final no varía con las condiciones del tratamiento. Como se muestra en resultados anteriores, el experimento sin cal produce una concentración de proteína más baja en el hidrolizado.

Tabla 130. Composición de aminoácidos totales con diferentes condiciones de proceso para la hidrólisis de la proteína de desechos de cabezas de gamba

Condiciones	100°C	100°C	100°C	100°C	75C	125°C
	60 min	120 min	120 min	120 min	120 min	120 min
	0,1 cal	0,2 cal	0,1 cal	Sin cal	0,1 cal	0,1 cal
ASP	9,66	10,19	9,27	9,78	9,46	9,40
GLU	15,68	15,85	15,50	15,68	15,03	15,20
SER	4,57	3,92*	4,33	4,46	4,41	4,38
HIS	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
GLY	7,77	8,31	7,32	7,26	7,05	7,42
THR	3,57	2,30*	4,01	4,46	4,40	3,77
ALA	7,15	7,53	7,28	7,20	6,69	7,17
TAU	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
ARG	7,00	6,47	7,59	4,90*	7,94	6,60
TYR	3,82	4,27	3,78	3,94	3,83	4,13
CYS-CYS	0,67	0,48	0,82	1,42	1,09	0,74
VAL	5,79	6,13	6,08	6,17	6,24	6,30
MET	2,19	2,15	2,21	2,25	2,15	2,14

ES 2 402 348 T3

TRP	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PHE	4,43	4,90	4,43	4,67	4,57	4,81
ILE	4,01	4,32	4,31	4,30	4,33	4,51
LEU	8,60	8,94	8,75	9,02	8,83	8,97
LYS	7,79	7,31	7,34	7,52	7,53	7,59
PRO	7,30	6,92	6,97	6,97	6,45	6,85

ND: No determinado Valores en g AA/100 g aminoácidos totales.

[0334] La tabla 131 muestra la composición de aminoácidos libres del hidrolizado para las diferentes condiciones de proceso. La variabilidad de la composición es más alta que en el caso de los aminoácidos totales. Las condiciones de tratamiento afectan a los aminoácidos susceptibles; unas condiciones más fuertes (p. ej., tiempos más largos, temperaturas más altas o mayores cargas de cal) aceleran las reacciones de degradación y generan diferentes composiciones, especialmente en la determinación de los aminoácidos libres.

[0335] El triptófano representa aproximadamente un 2 % de la composición de aminoácidos libres, mientras que la taurina está cerca del 4 %. Estos valores pueden usarse como estimaciones para sus concentraciones en la composición de aminoácidos totales.

Tabla 131. Composición de aminoácidos libres con diferentes condiciones de proceso para la hidrólisis de la proteína de desechos de cabezas de gamba

Condiciones	100°C 60 min 0,1 cal	100°C 120 min 0,2 cal	100°C 120 min 0,1 cal	100°C 120 min Sin cal	75°C 120 min 0,1 cal	125°C 120 min 0,1 cal
ASP	1,61	3,85	2,09	2,93	216	2,75
GLU	3,49	5,54	3,86	4,46	4,08	420
ASN	1,87	0,83	2,15	2,40	2,53	2,12
SER	3,01	4,15	3,17	3,37	3,20	3,59
GLN	1,67	0,00	2,05	2,69	3,29	0,18
HIS	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
GLY	8,51	8,61	6,55	6,54	5,80	6,59
THR	2,44	1,38	3,00	3,38	3,25	2,91
CIT	0,52	1,13	0,58	0,38	0,67	0,36
B-ALA	0,50	0,25	0,09	0,02	0,00	0,15
ALA	8,71	9,21	8,41	8,45	7,85	8,98
TAU	6,51	5,63	4,31	3,84	3,48	3,95
ARG	11,45	9,37	11,63	6,53	11,46	9,51
TYR	3,93	4,35	4,72	5,40	5,06	5,25
CYS-CYS	ND	ND	ND	ND	ND	ND
VAL	4,10	4,61	4,84	4,87	4,85	5,50

ES 2 402 348 T3

MET	2,78	3,22	3,22	3,36	3,01	2,89
TRP	2,78	2,57	2,32	2,17	2,16	1,86
PHE	4,55	4,74	5,17	6,15	5,87	5,56
ILE	3,86	3,92	4,82	4,32	4,45	5,72
LEU	7,63	8,15	8,90	9,82	9,60	9,75
LYS	10,31	9,39	9,82	10,98	9,32	9,82
PRO	9,78	9,10	8,28	7,95	7,91	8,37

ND: No determinado Valores en g AA/100 g aminoácidos totales.

[0336] Una media del 40 % de los aminoácidos totales está presente como aminoácidos libres. Se obtiene una fracción relativamente alta con tiempos más largos o condiciones más fuertes.

- 5 [0337] El tratamiento termoquímico de los desechos de gamba produce una mezcla de aminoácidos libres y pequeños péptidos solubles lo que lo convierte en un potencial producto nutritivo. El producto hidrolizado contiene una alta fracción de aminoácidos esenciales lo que lo convierte en una fuente de alta calidad nutricional para animales monogástricos. La tabla 132 muestra una comparación entre la composición de
- 10 aminoácidos totales y las necesidades para varios animales domésticos. Puesto que la histidina se subestimó durante el análisis y usando el valor 1,78 g/100 g calculado para el material de desechos crudo, se genera un suplemento proteínico de alta calidad que cumple o excede las necesidades de aminoácidos esenciales de los animales durante su fase de crecimiento.

15

Tabla 132. Análisis de aminoácidos del producto y necesidades de aminoácidos esenciales para varios animales domésticos (desechos de cabezas de gamba)

Aminoácido	Siluro	Perros	Gatos	Pollos	Cerdos	Líquido (AAT)	Líquido (AAL)
ASN							2,15
GLN							2,05
ASP						9,27	2,09
GLU						15,50	3,86
SER						4,33	3,17
HIS	1,31	1,00	1,03	1,40	1,26	0,00	0,00
GLY						7,32	6,55
THR	1,75	2,64	2,43	3,50	2,50	4,01	3,00
ALA						7,28	8,41
ARG	3,75	2,82	4,17	5,50	0,00	7,59	11,63
VAL	2,63	2,18	2,07	4,15	2,67	6,08	4,48
CYS	2,00*	2,41*	3,67*	4,00*	1,92*	0,82	ND
MET	2,00*	2,41*	2,07	225	1,92*	2,21	3,22

TYR	4,38 ⁺	4,05 ⁺	2,93 ⁺	5,85 ⁺	3,75 ⁺	3,78	4,72
PHE	4,38 ⁺	4,05 ⁺	1,40	3,15	3,75 ⁺	4,43	5,17
ILE	2,28	2,05	1,73	3,65	2,50	4,31	4,82
LEU	3,06	3,27	4,17	5,25	2,50	8,75	8,90
LYS	4,47	3,50	4,00	5,75	3,58	7,34	9,92
TRP	0,44	0,91	0,83	1,05	0,75	ND	2,32
PRO						6,97	8,28

*Cisteína + Metionina ⁺Tirosina + Fenilalanina ND No determinado Todos los valores están en g aminoácido/100 g proteína.

[0338] Además del ~20 % de ceniza, los desechos de cabezas de gamba contienen un 64 % de proteína más quitina, los cuales pueden usarse para generar varios productos valiosos. El tratamiento termoquímico de estos desechos con cal genera un material rico en proteína con un contenido de aminoácidos bien equilibrado que puede usarse como un suplemento alimentario para animales. Si se filtra la mezcla tratada y se centrifuga el producto líquido se pueden recuperar los carotenoides. Finalmente, el sólido residual rico en carbonato de calcio y quitina puede también usarse para generar quitina y quitosano a través de conocidos procesos.

5 **[0339]** Con todas las condiciones de temperatura, carga de cal y tiempo que se estudiaron, no tuvo lugar ningún cambio significativo en la conversión tras 30 minutos de reacción. Se observó una pequeña degradación de aminoácidos con todas estas condiciones y hasta 2 h de tratamiento.

15 **[0340]** Se necesita añadir cal durante el tratamiento para obtener una conversión de nitrógeno más alta a la fase líquida. Esto también reducirá las sustancias químicas necesarias para un tratamiento adicional del sólido residual para la producción de quitina y quitosano.

20 **[0341]** El producto obtenido por tratamiento con cal del material de desechos de gamba, cumple o excede las necesidades de aminoácidos esenciales para animales monogástricos lo que lo convierte en un suplemento proteínico adecuado.

[0342] Aunque solo se describen anteriormente y de forma específica modos de realización ejemplares de la invención, se entenderá que pueden existir modificaciones y variaciones de la invención sin alejarse de la esencia y el alcance previsto de la invención.

25

Reivindicaciones

1. Un método para solubilizar proteína que consiste en:
 - aplicar un álcali a una fuente de proteína para formar una suspensión;
 - calentar la suspensión a una temperatura suficiente para permitir la hidrólisis de la proteína en la fuente de proteína con el fin de obtener un líquido de reacción;
 - 5 mantener el líquido de reacción a una temperatura elevada que varía entre 75 y 250 °C durante un periodo de tiempo que varía entre 1 segundo y 5 horas para destruir todos o casi todos los priones en el líquido de reacción;
 - separar los sólidos del líquido de reacción:
 - 10 neutralizar el líquido de reacción con ácido o una fuente de ácido para producir líquido neutralizado;
 - concentrar el líquido neutralizado para producir líquido concentrado y agua;
 - y
 - devolver el agua a la suspensión antes o durante el paso del calentamiento.
 - 15
2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además triturar la fuente de proteína.
3. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el álcali comprende óxido de calcio o hidróxido de calcio.
- 20 4. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el álcali comprende un compuesto elegido de entre el grupo consistente en: óxido de magnesio, hidróxido de magnesio, hidróxido de sodio, carbonato de sodio, hidróxido de potasio, amoníaco y cualquier combinación de las mismas.
5. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el calentamiento produce amoníaco, que comprende además neutralizar el amoníaco con un ácido.
- 25 6. Método de acuerdo con la reivindicación 1, que consiste además en devolver los sólidos separados a la fuente de proteína.
7. Método de acuerdo con la reivindicación 1, que consiste además en separar los sólidos reactivos de los sólidos inertes en los sólidos separados.
- 30 8. Método de acuerdo con la reivindicación 1, que consiste además en separar los sólidos del líquido neutralizado.
9. Método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que los sólidos separados comprenden el álcali, que consiste además en añadir los sólidos separados a la fuente de proteína.
- 35 10. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que concentrar el líquido

neutralizado comprende además evaporar el líquido neutralizado.

11. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que concentrar el líquido neutralizado comprende además filtrar el líquido neutralizado.
12. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que concentrar el líquido neutralizado comprende además congelar el líquido neutralizado.
13. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que concentrar el líquido neutralizado comprende además añadir una amina inmisible.
14. Método de acuerdo con la reivindicación 1, que consiste además en secar el líquido concentrado.
15. Método de acuerdo con la reivindicación 1, que consiste además en producir calor de proceso y reutilizar el calor de proceso.
16. Un sistema para solubilizar proteína que comprende:
- un medio de reacción operativo para hacer reaccionar una fuente de proteína y un álcali con el fin de producir un líquido de reacción;
 - un medio de retención operativo para retener el líquido de reacción a una temperatura elevada que varía entre los 75 y los 250 °C durante un periodo de tiempo que varía entre 1 segundo y 5 horas con el fin de destruir todos o casi todos los priones en el líquido de reacción:
 - un medio de separación de sólido/líquido operativo para separar sólidos del líquido de reacción;
 - un medio de neutralización operativo para permitir la adición de un ácido al líquido de reacción con el fin de producir un líquido neutralizado;
 - un medio de concentración operativo para concentrar el líquido neutralizado y producir un líquido concentrado y agua;
 - un medio operativo para pasar agua desde el medio de concentración al medio de reacción; y
 - al menos un medio de intercambio de calor operativo para intercambiar calor de proceso.
17. Sistema de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el medio de reacción es un reactor calentado;
- el medio de retención es un tanque de retención;
 - el medio de separación sólido/líquido es un separador sólido/líquido;
 - el medio de neutralización es un tanque de neutralización;
 - el medio de concentración es un tanque de concentración;
 - el medio operativo para pasar agua desde el medio de concentración al medio de

reacción es un conducto operativo para pasar agua desde el tanque de concentración al reactor calentado y

el al menos un medio de intercambio de calor es al menos un intercambiador de calor.

- 5 **18.** Sistema de acuerdo con la reivindicación 17, en el que el reactor calentado comprende un tanque agitado.
- 19.** Sistema de acuerdo con la reivindicación 16, que comprende además un medio de colección operativo para recoger amoníaco del medio de reacción y permitir su neutralización con un ácido.
- 10 **20.** Sistema de acuerdo con la reivindicación 17, en el que el tanque de concentración comprende además un componente elegido de un grupo que consiste en: un evaporador con múltiples efectos, un evaporador de compresión mecánica de vapor, un evaporador de compresión de vapor por eyector de chorro, una membrana de ósmosis inversa, una membrana de nanofiltración tensa, un
15 congelador, un sistema de recuperación de amina y cualquier combinación de los mismos.

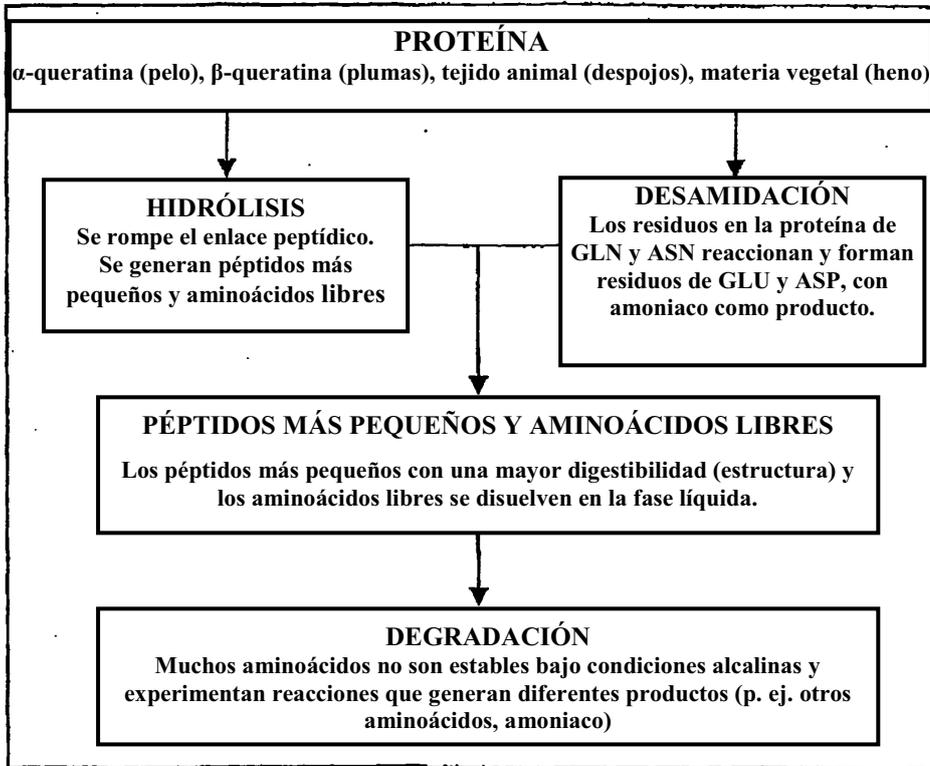


FIGURA 1

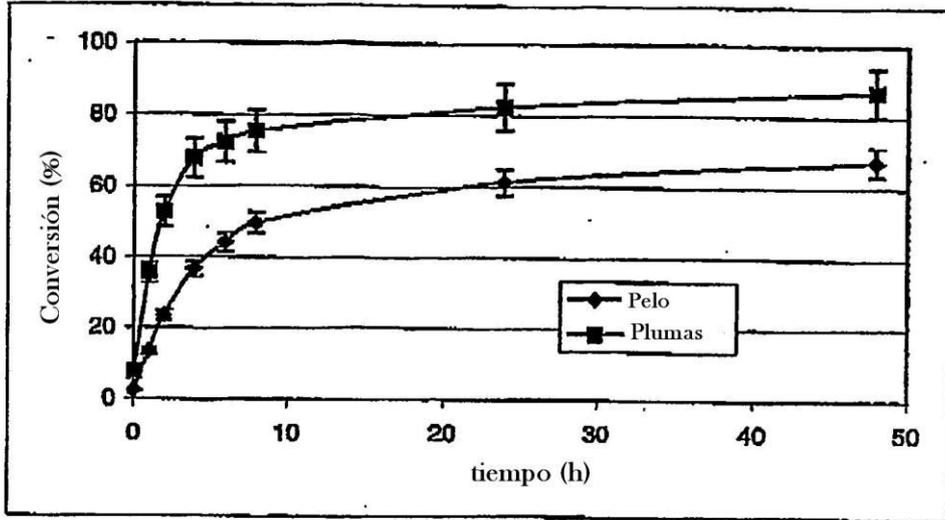


FIGURA 2

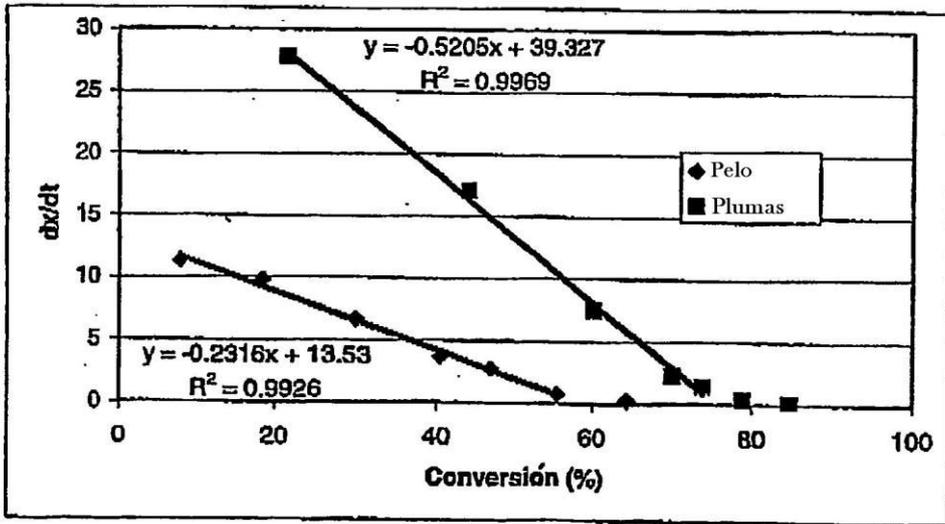


FIGURA 3

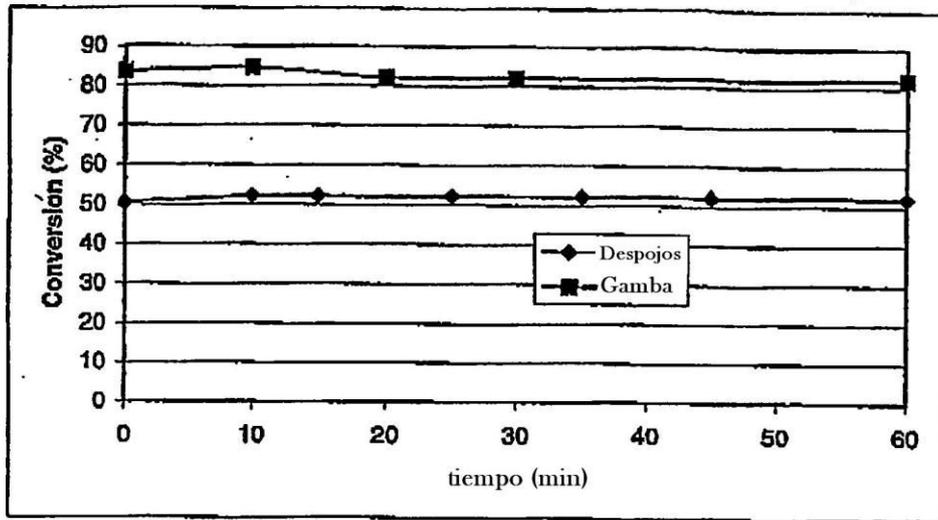


FIGURA 4

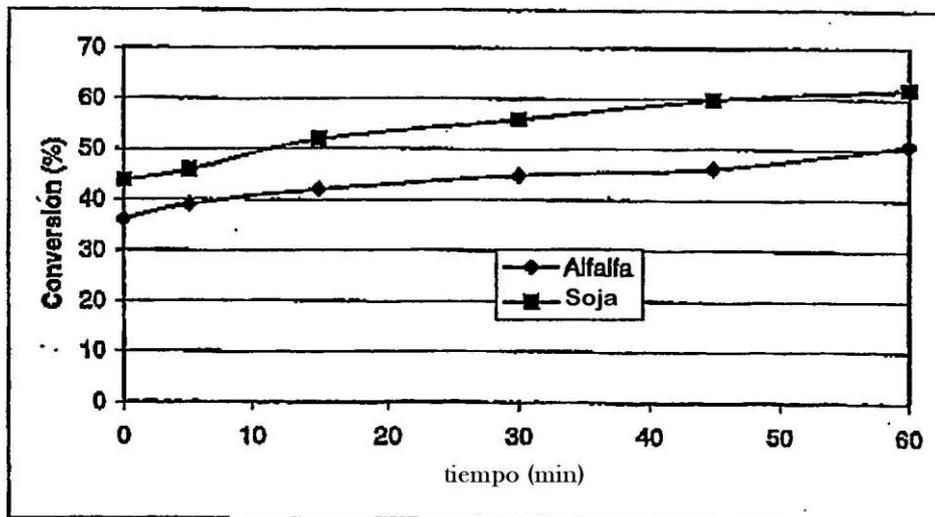


FIGURA 5

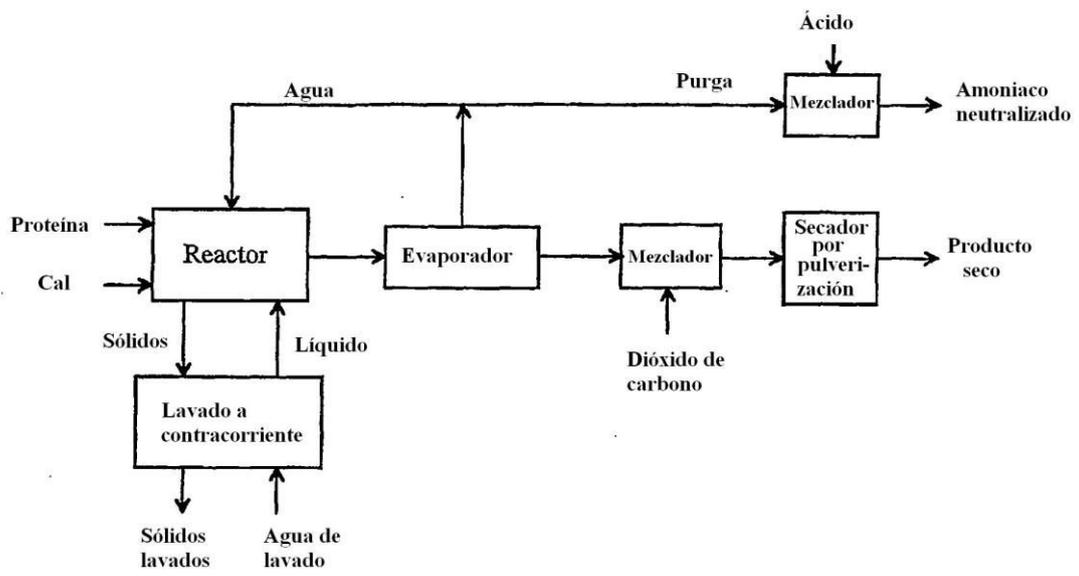


FIGURA 6

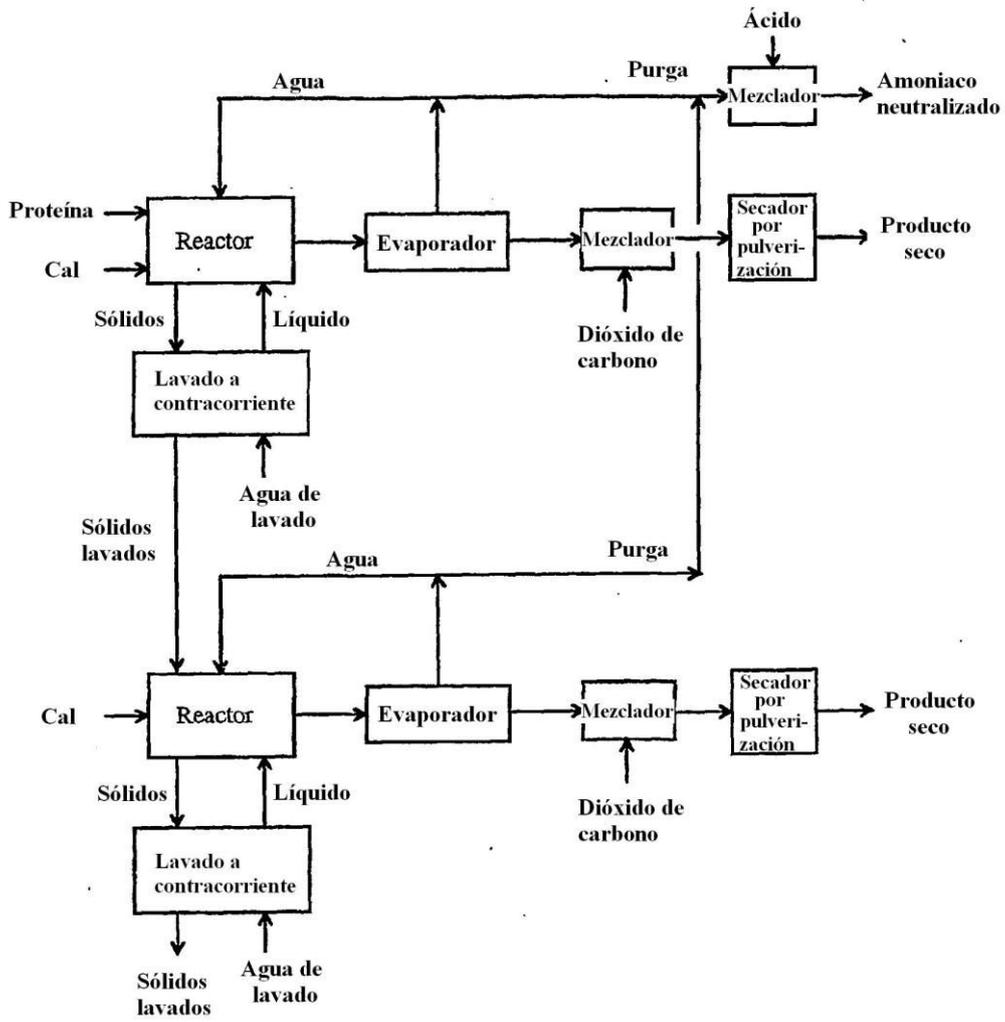


FIGURA 7

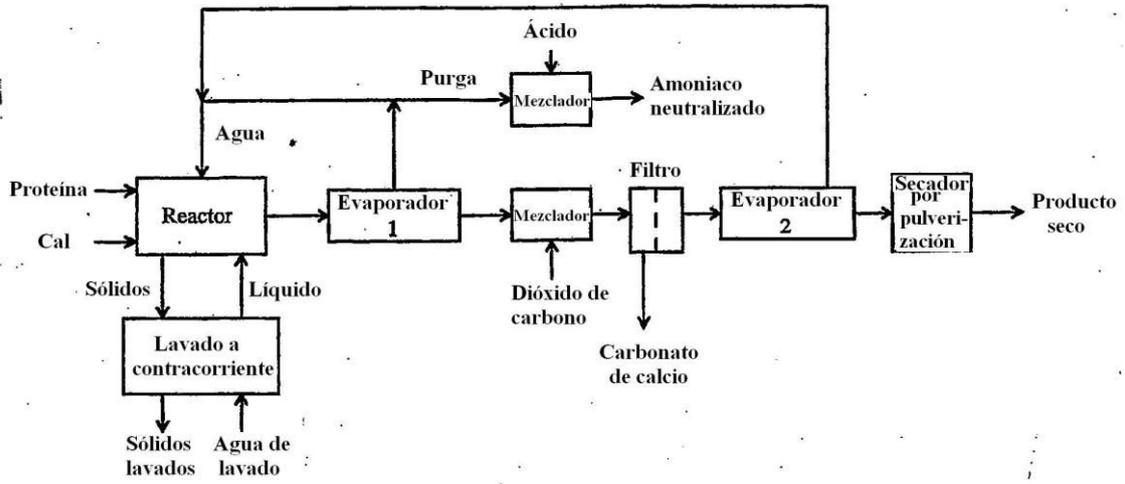


FIGURA 8

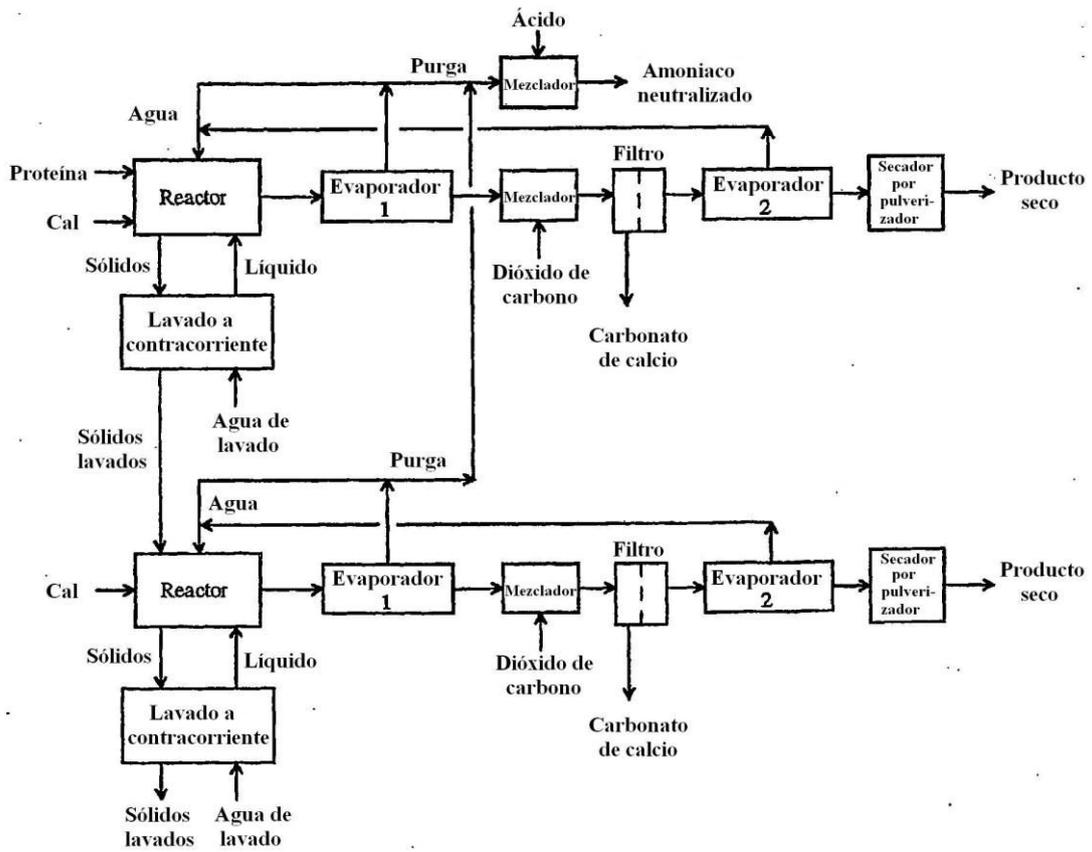


FIGURA 9

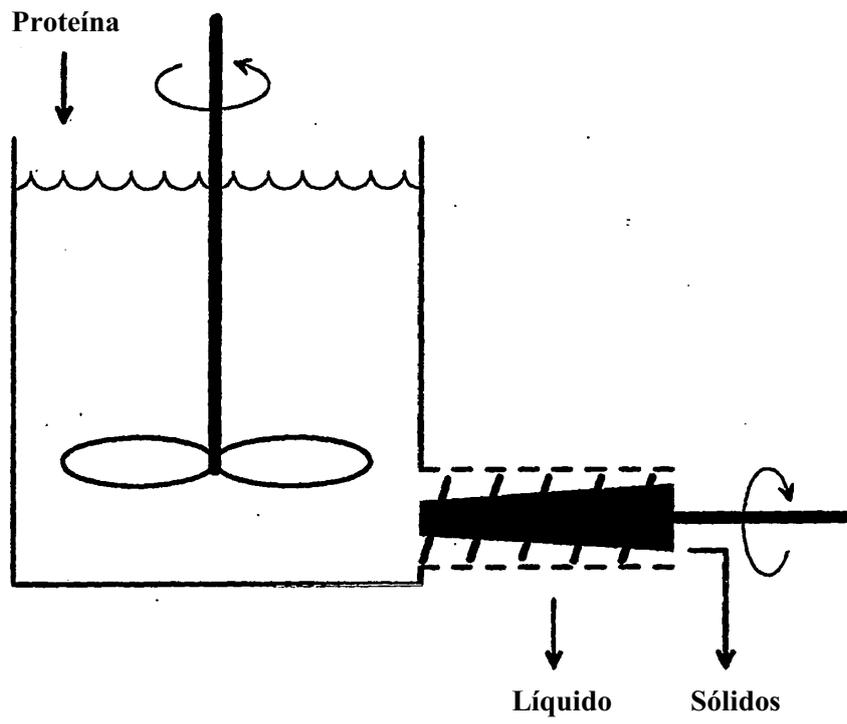


FIGURA 10

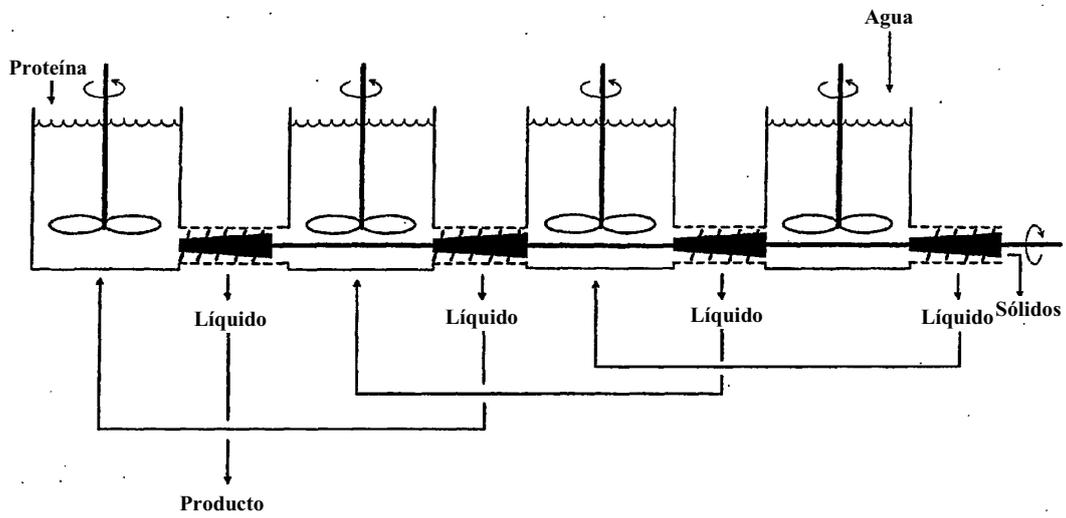


FIGURA 11

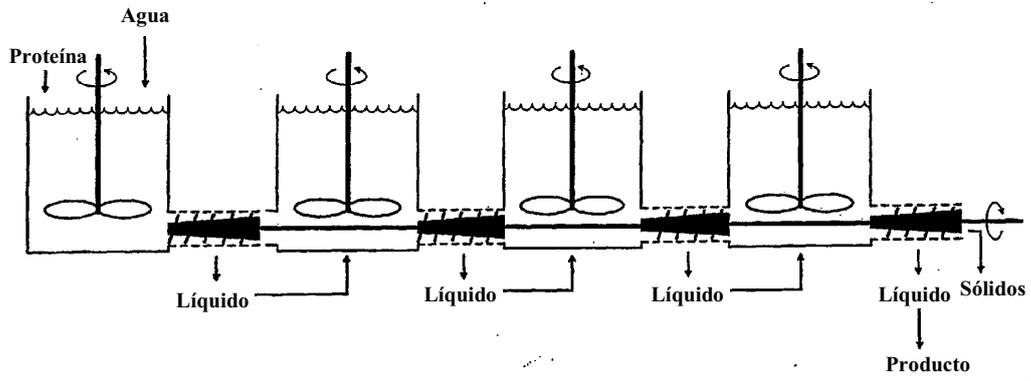


FIGURA 12

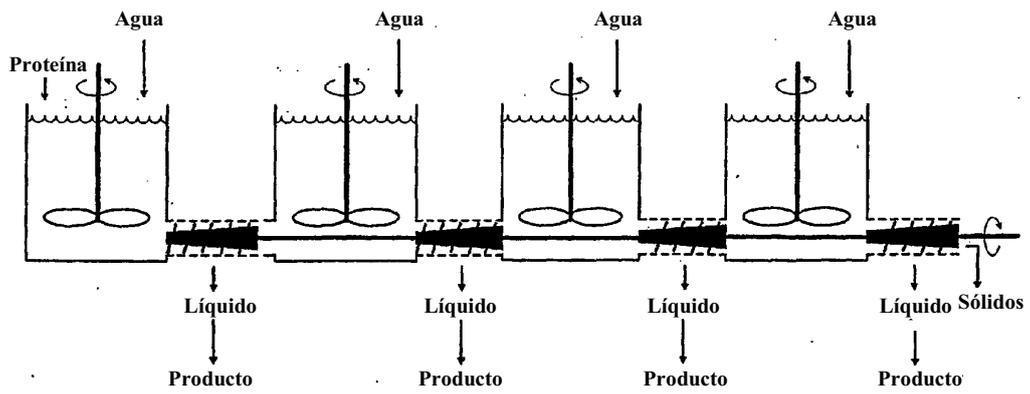


FIGURA 13

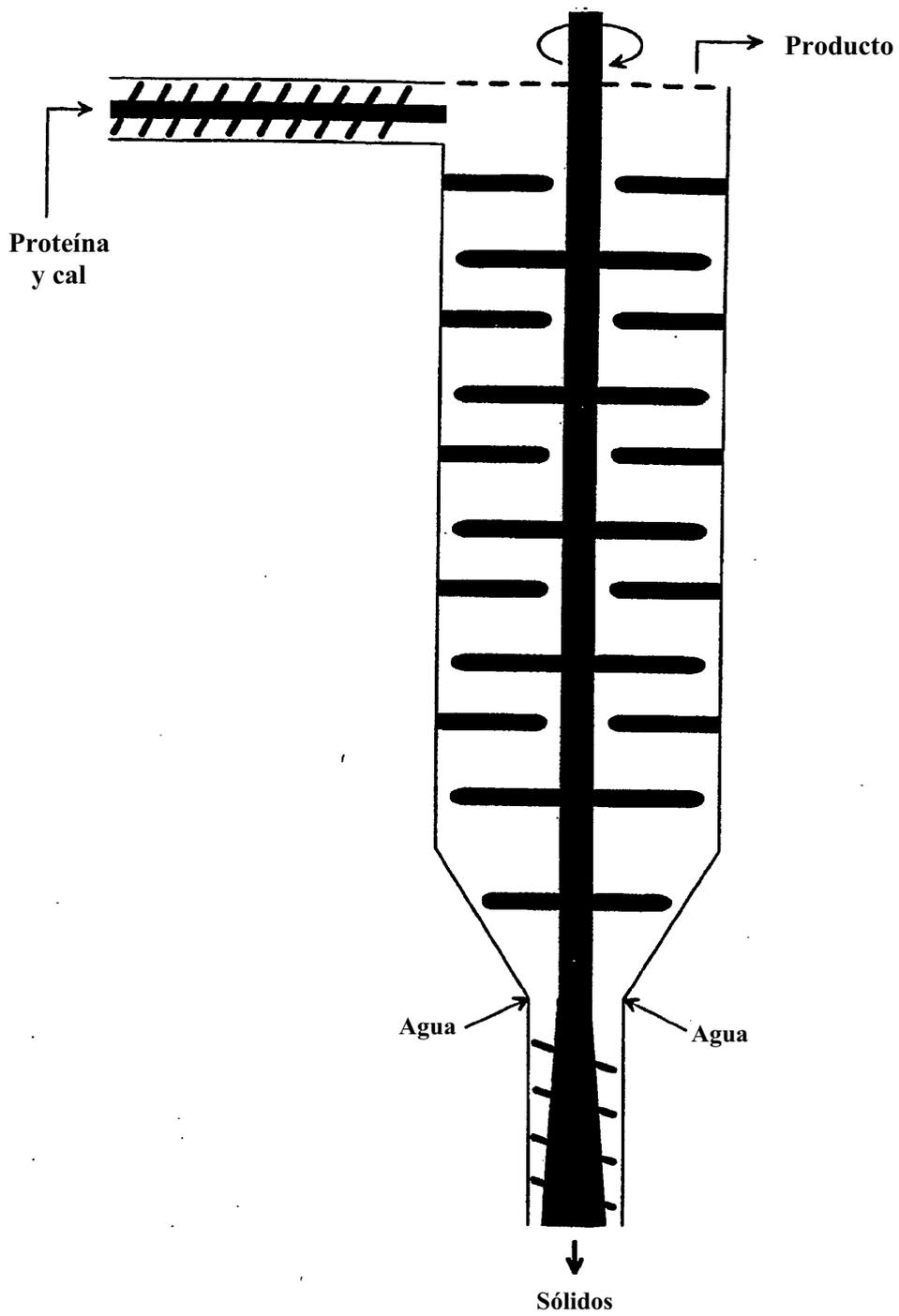


FIGURA 14

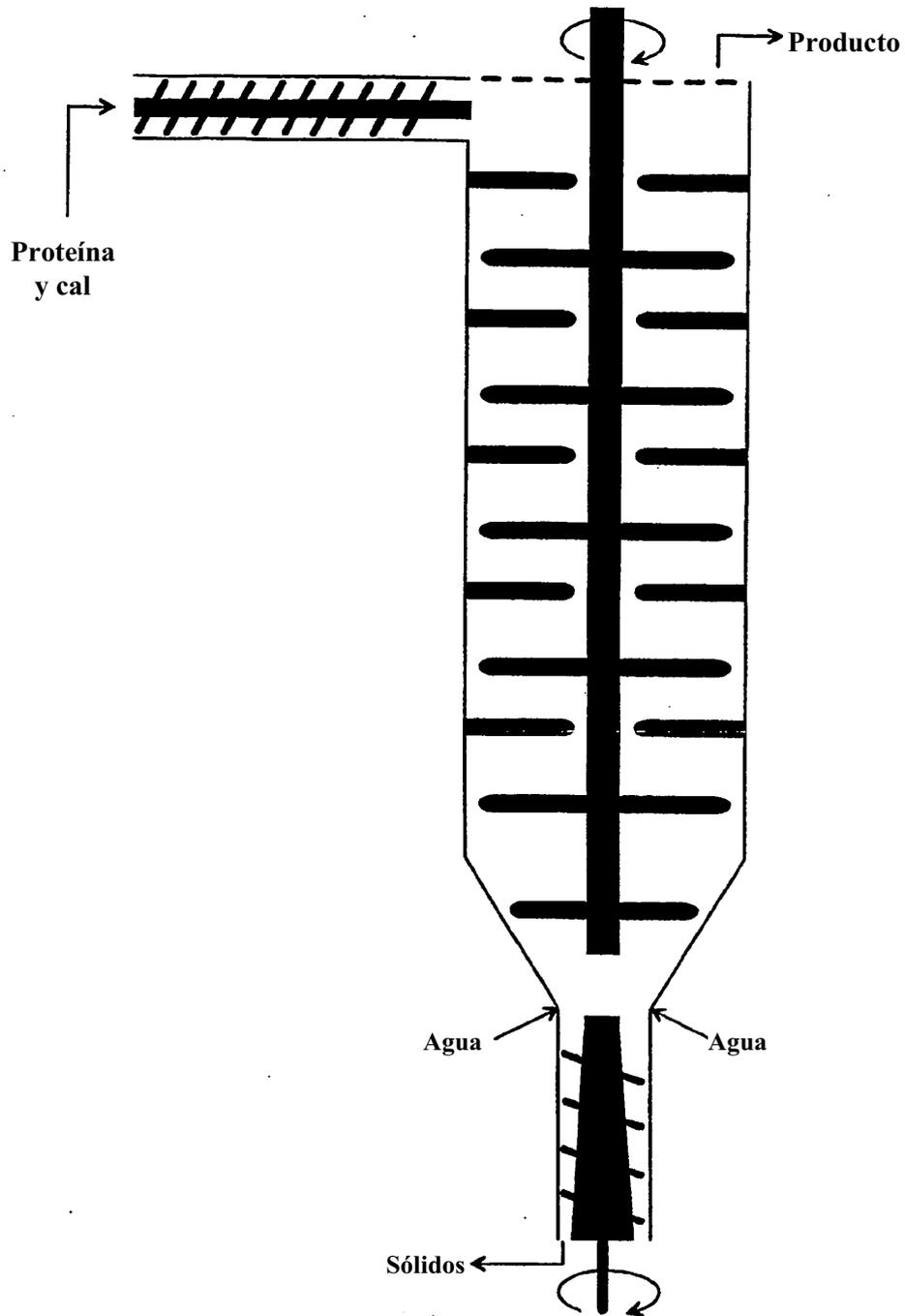


FIGURA 15

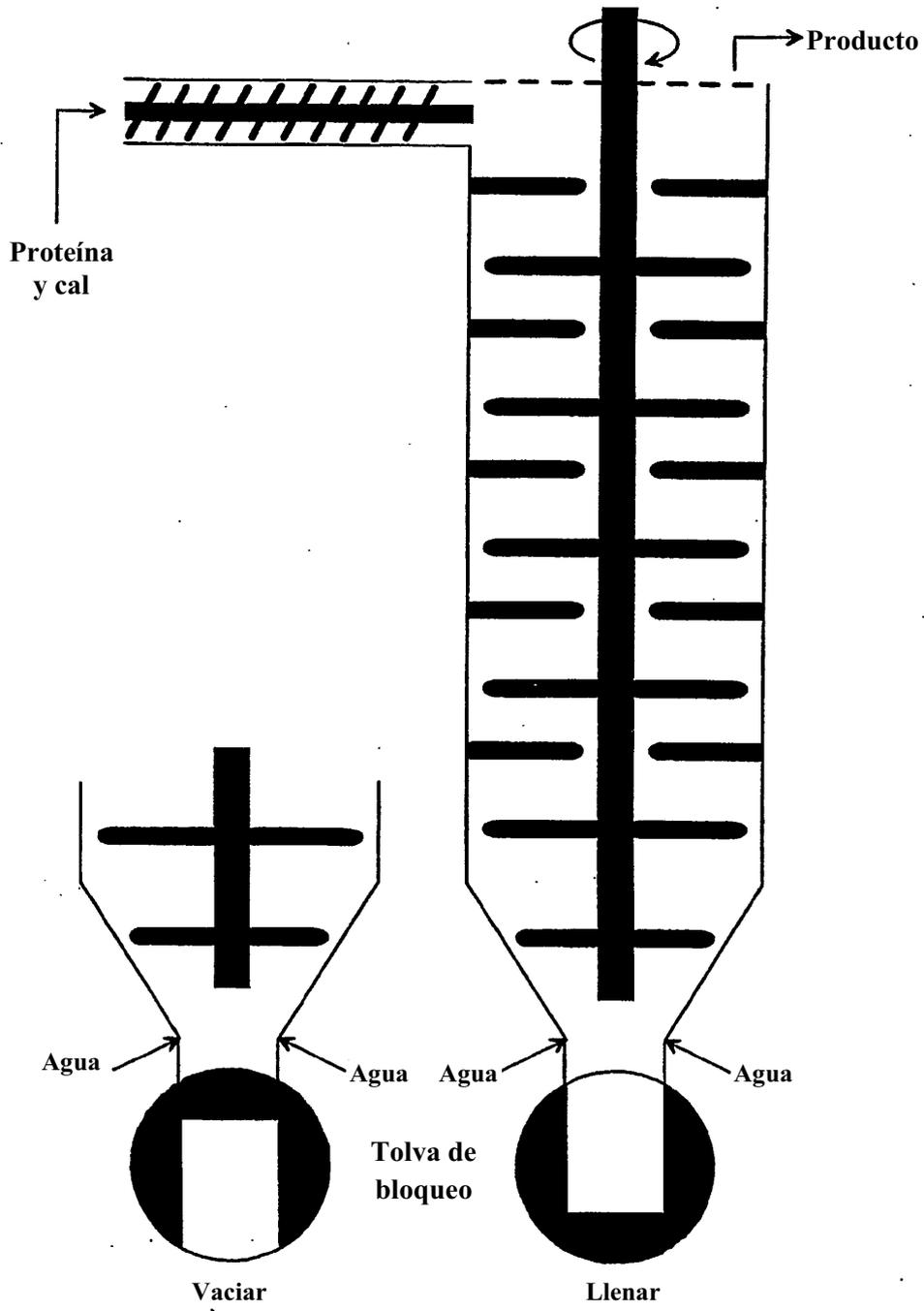


FIGURA 16

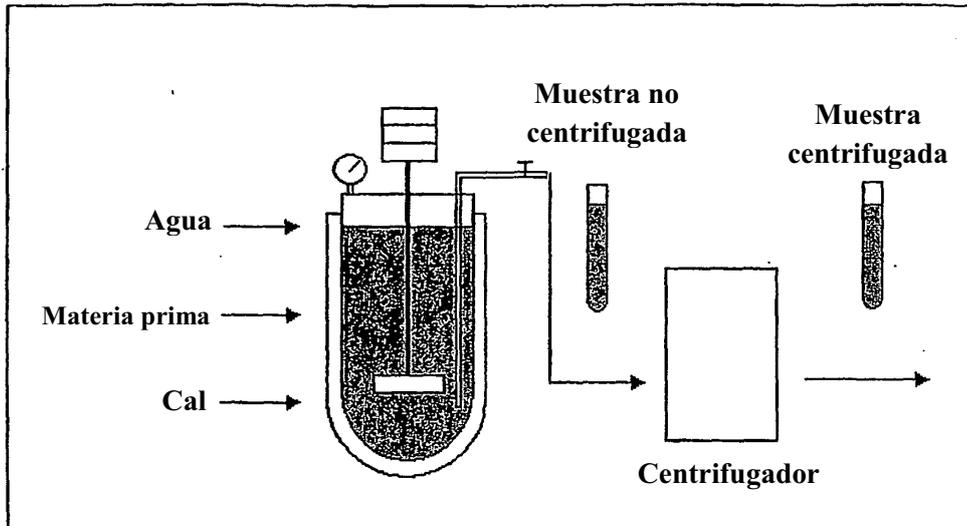


FIGURA 17

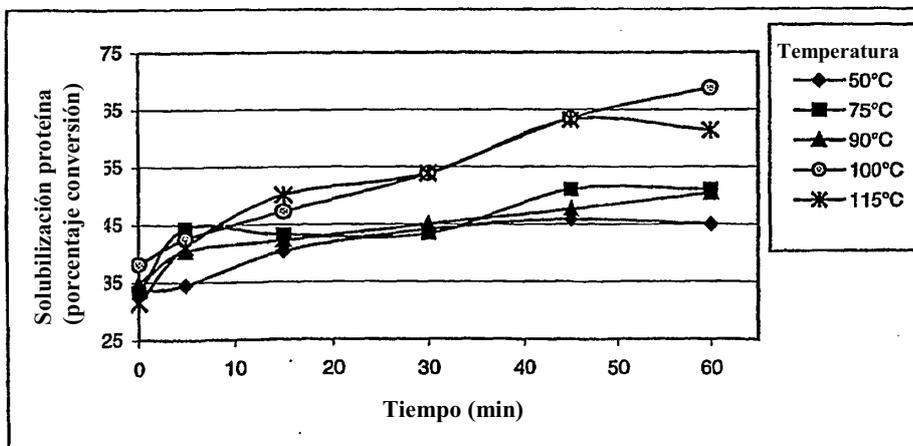


FIGURA 18

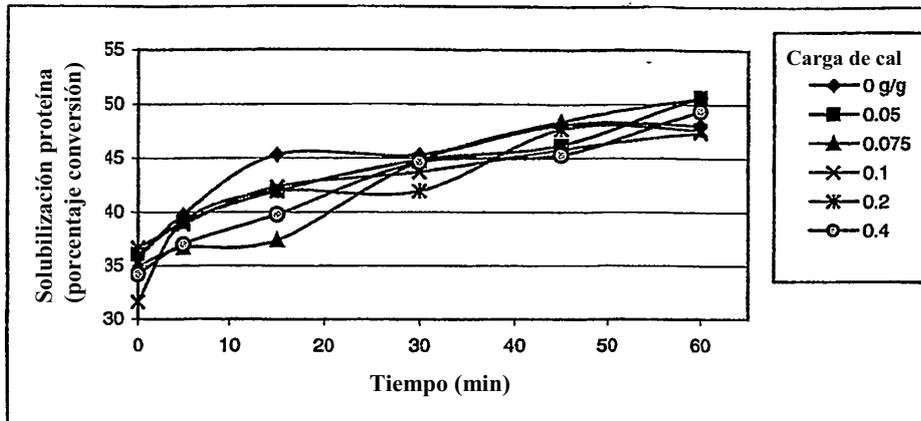


FIGURA 19

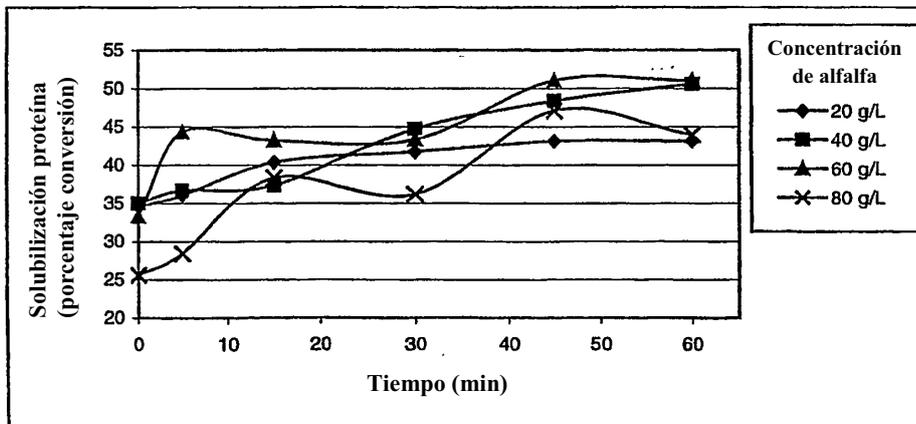


FIGURA 20

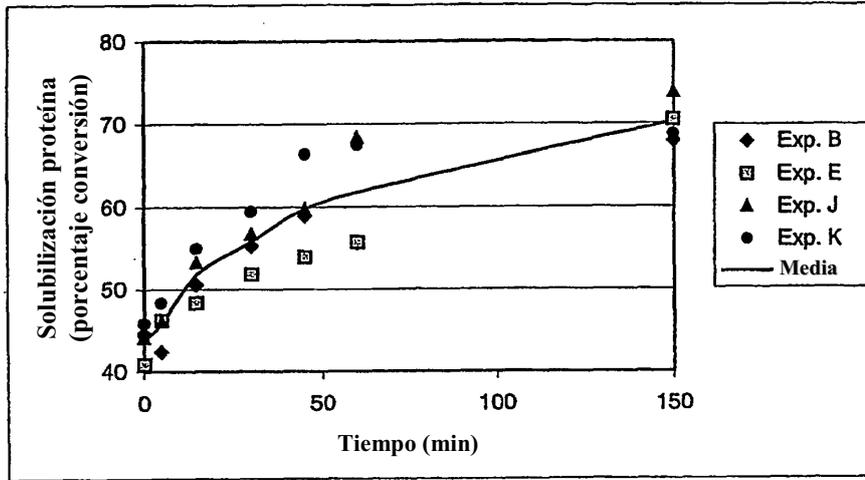


FIGURA 21

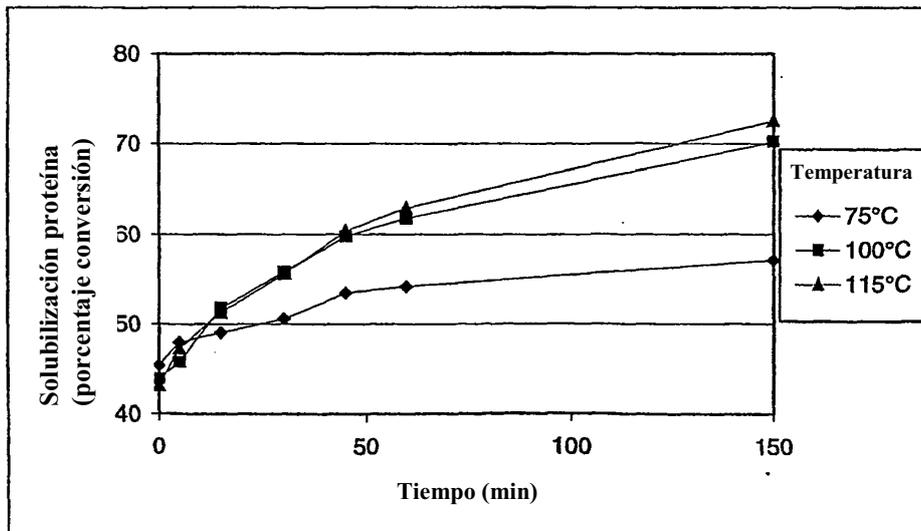


FIGURA 22

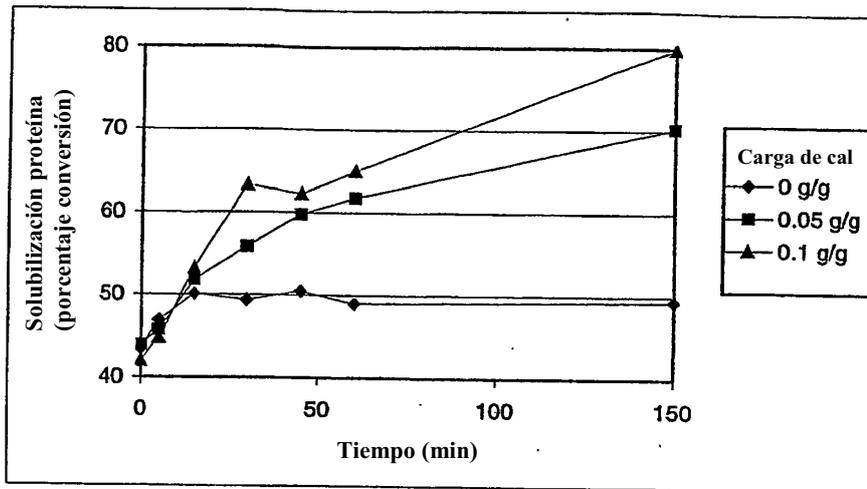


FIGURA 23

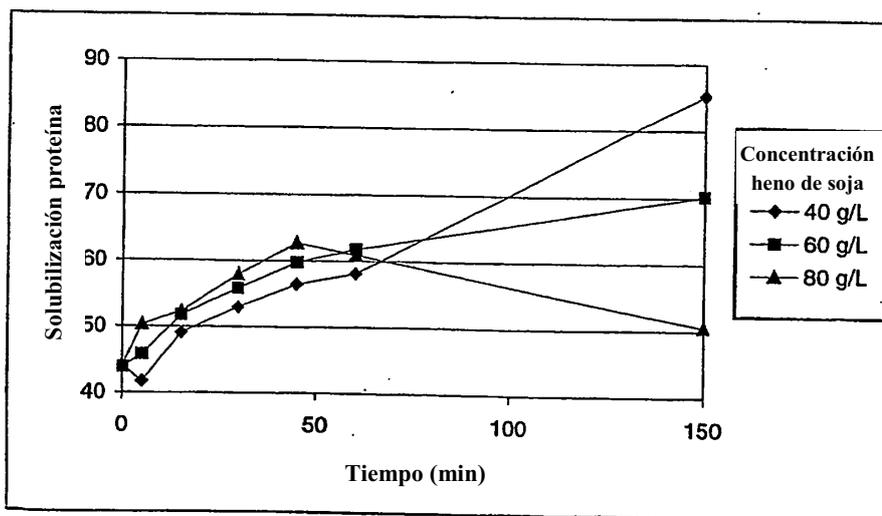


FIGURA 24

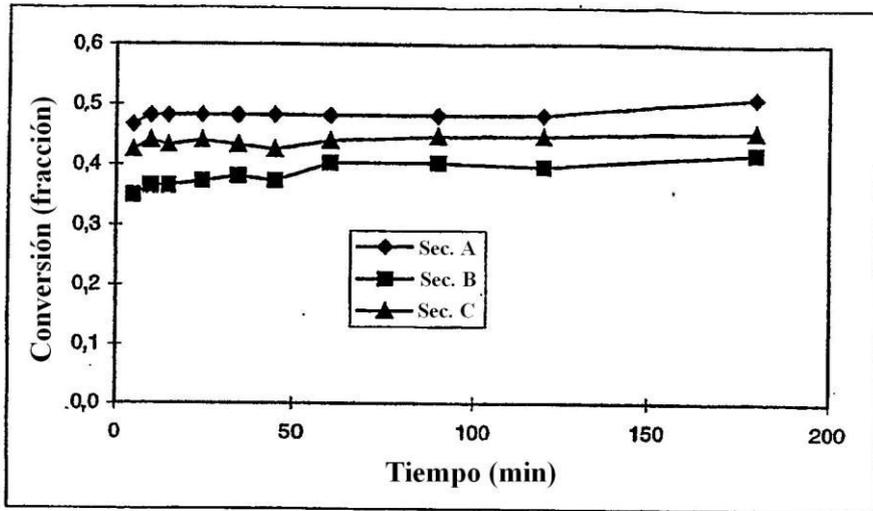


FIGURA 25

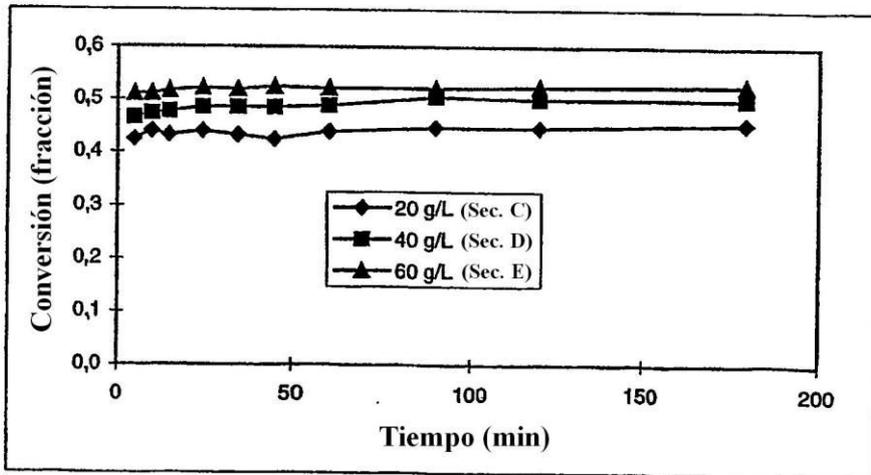


FIGURA 26

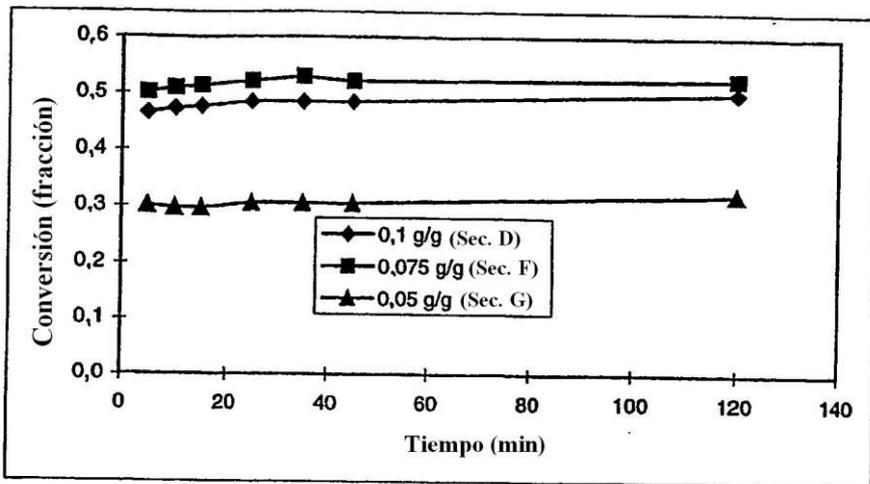


FIGURA 27

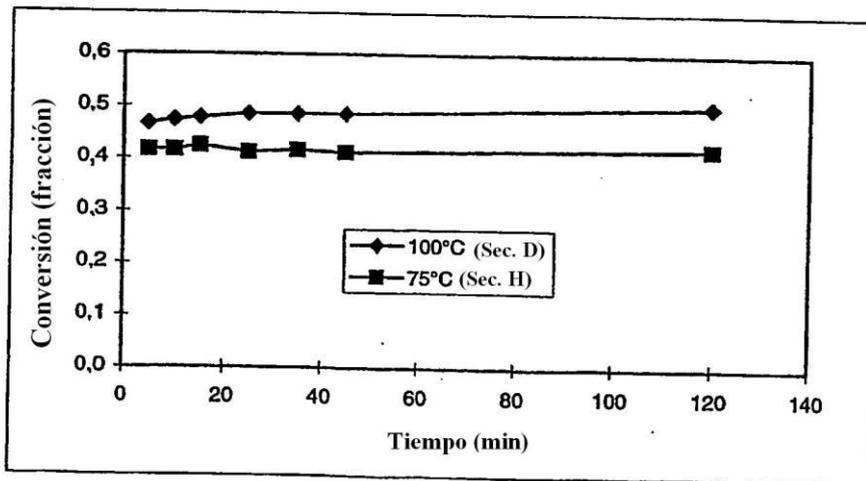


FIGURA 28

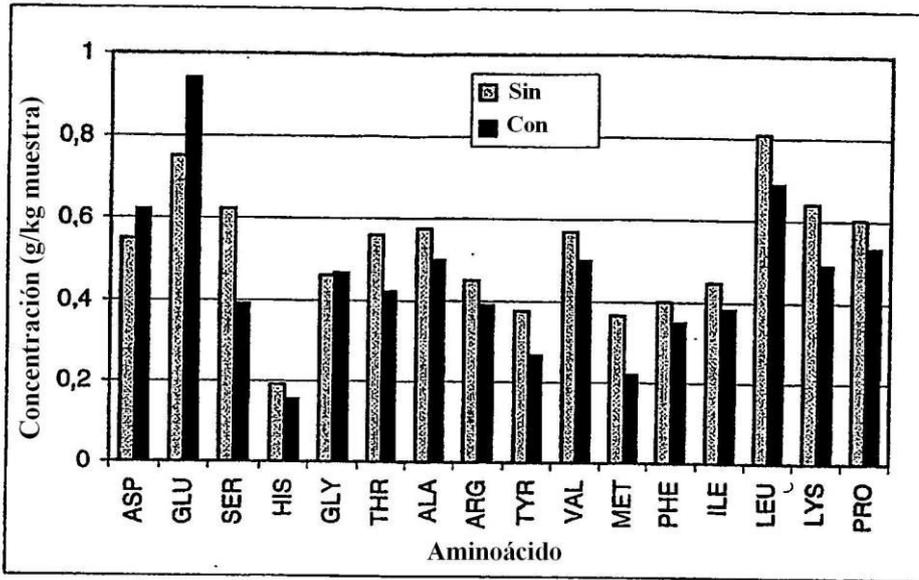


FIGURA 29

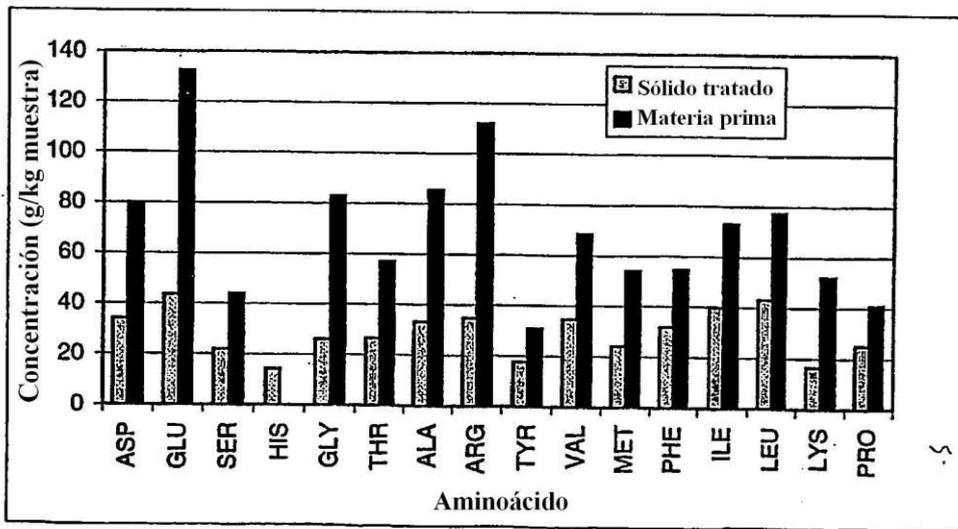


FIGURA 30

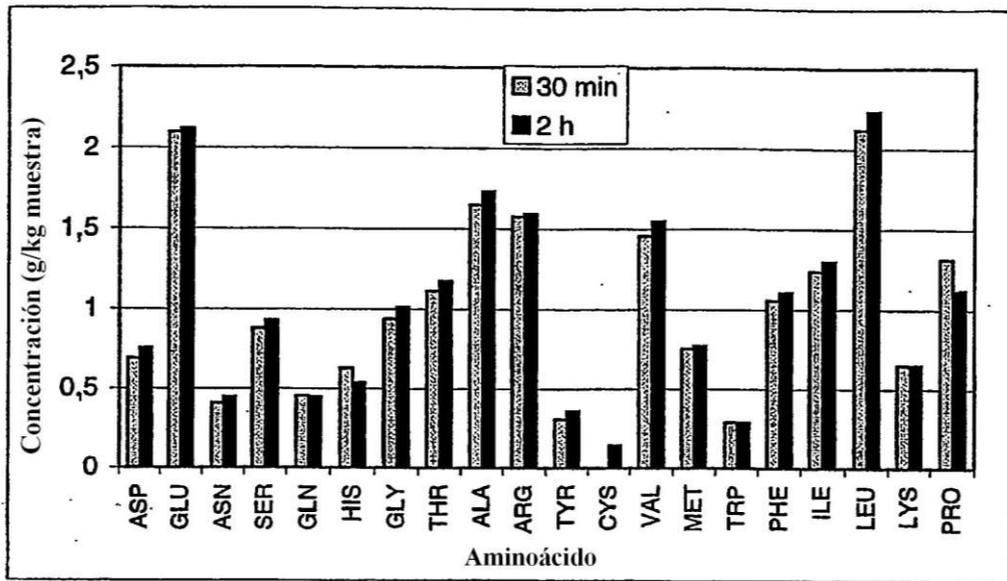


FIGURA 31

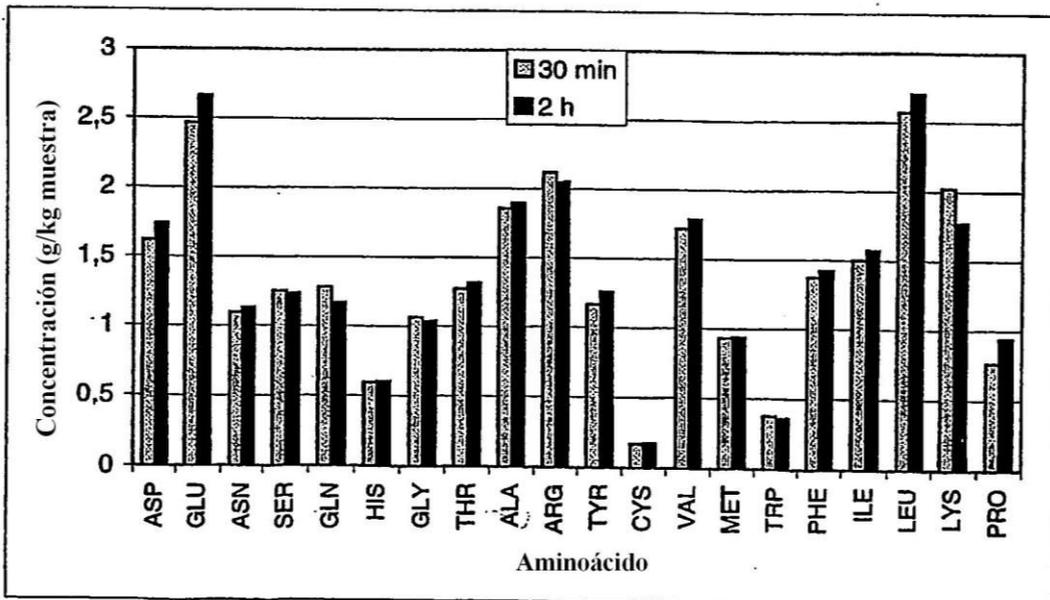


FIGURA 32

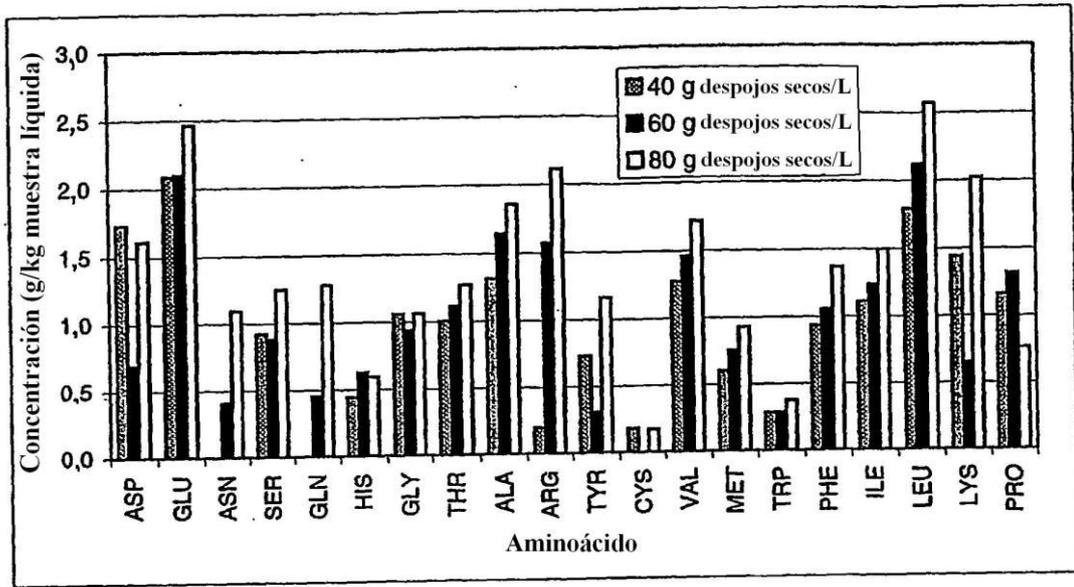


FIGURA 33

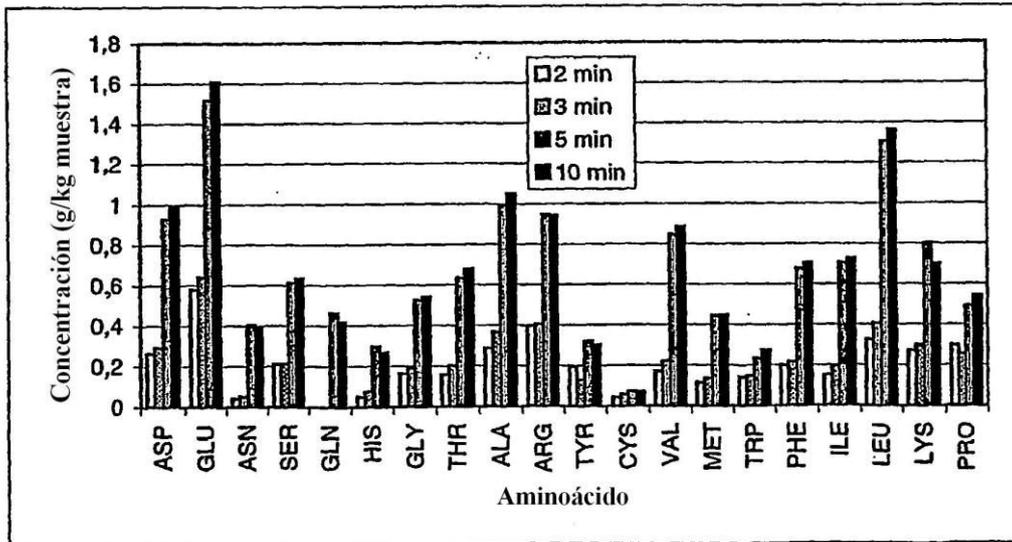


FIGURA 34

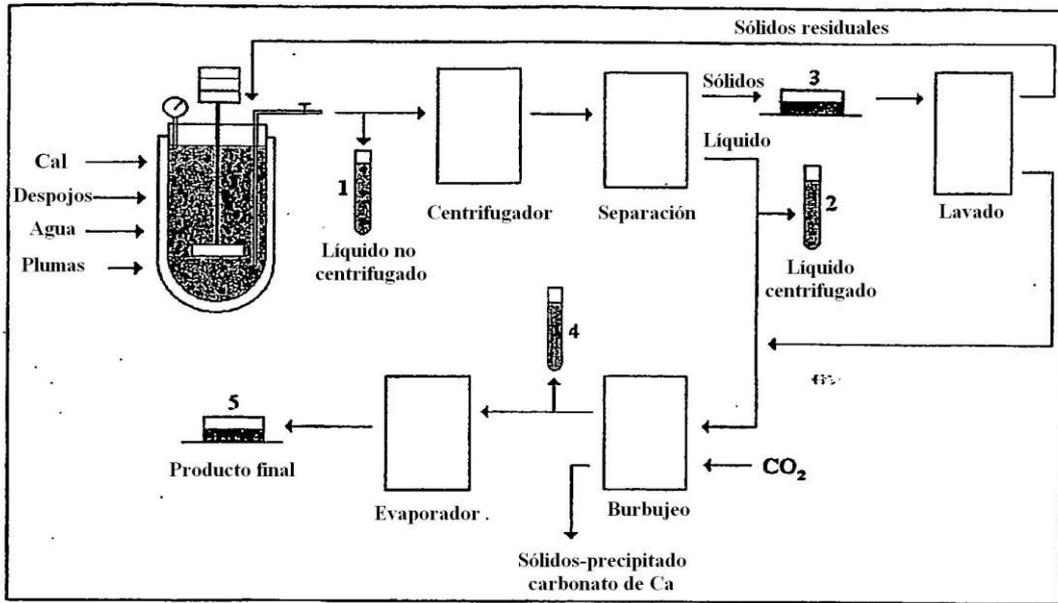


FIGURA 35

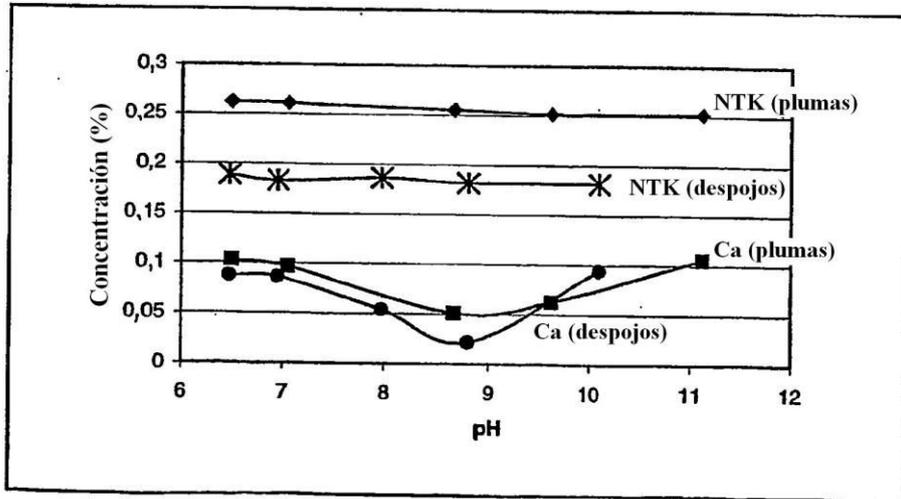


FIGURA 36

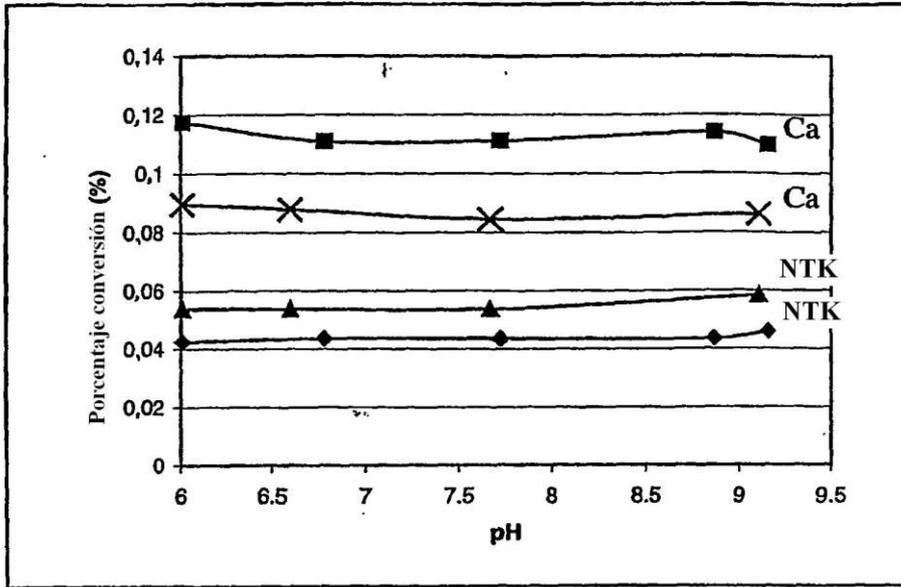


FIGURA 37

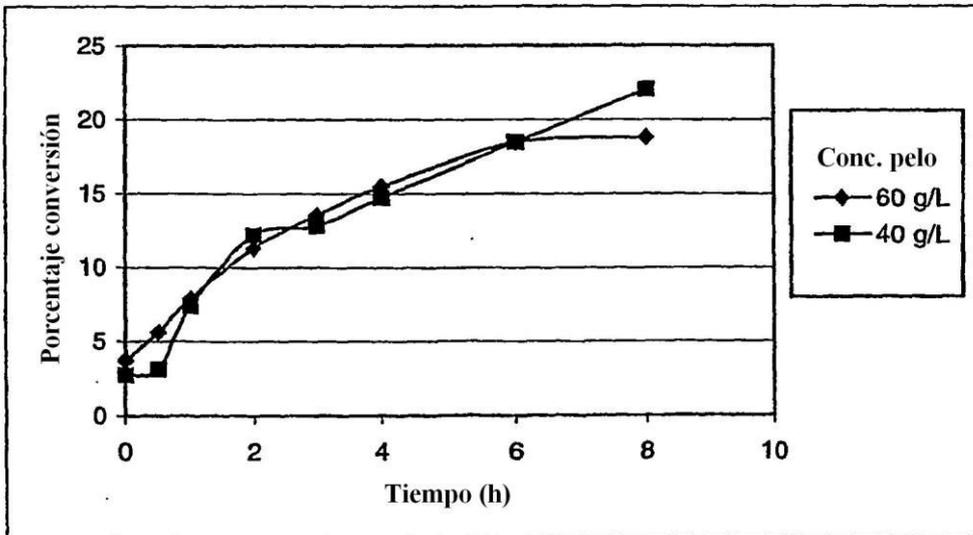


FIGURA 38

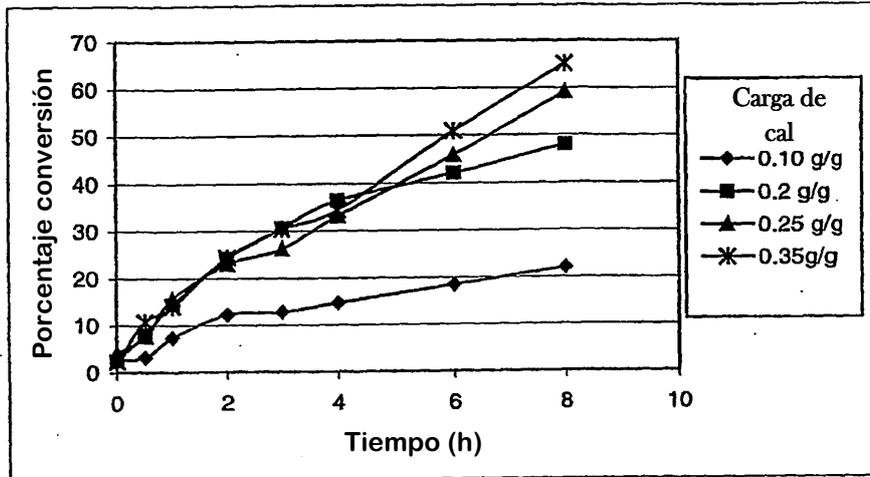


FIGURA 39

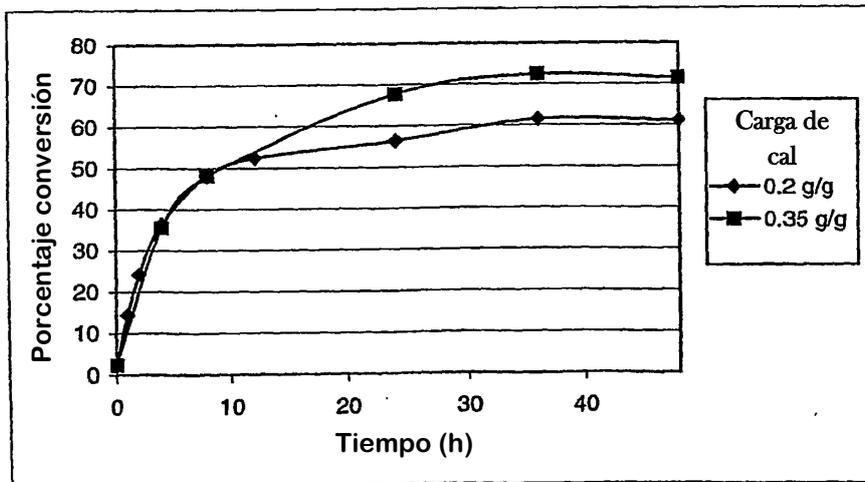


FIGURA 40

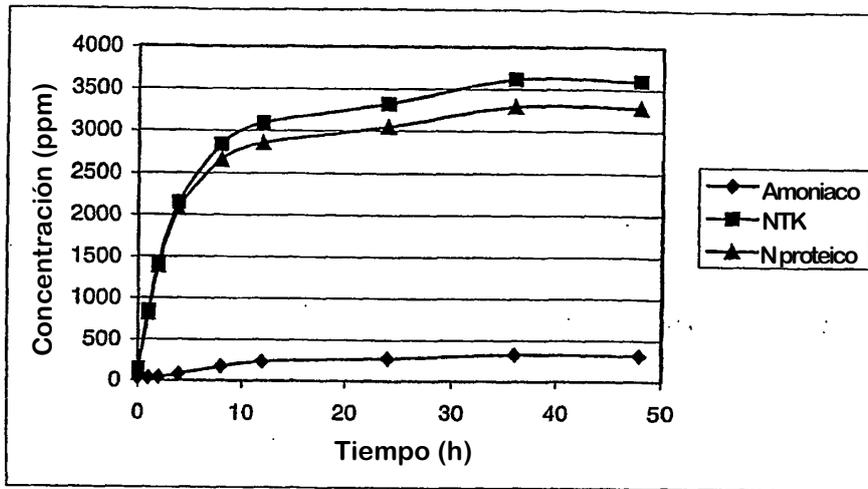


FIGURA 41

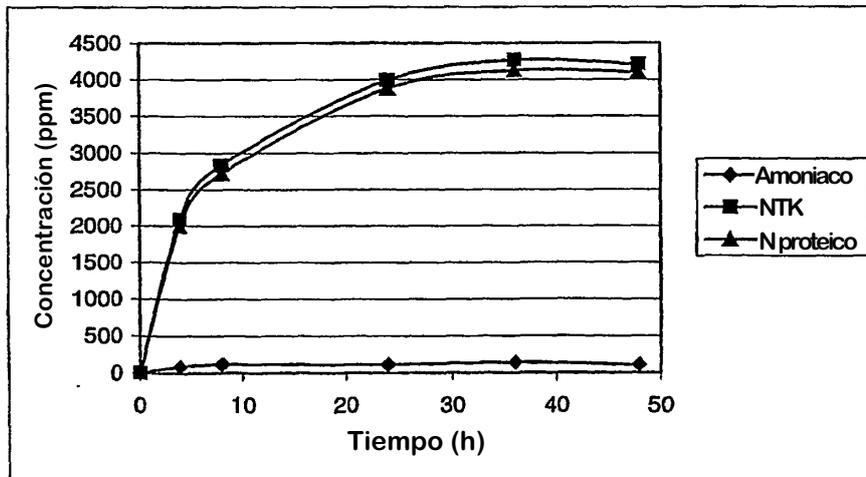


FIGURA 42

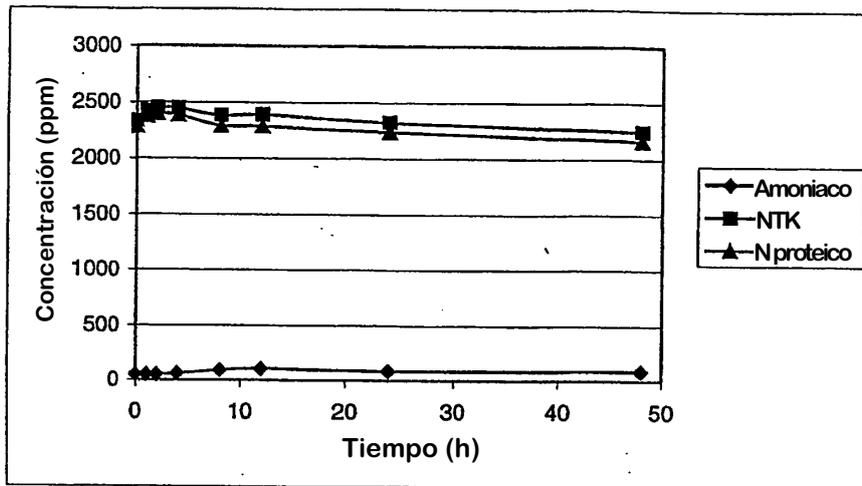


FIGURA 43

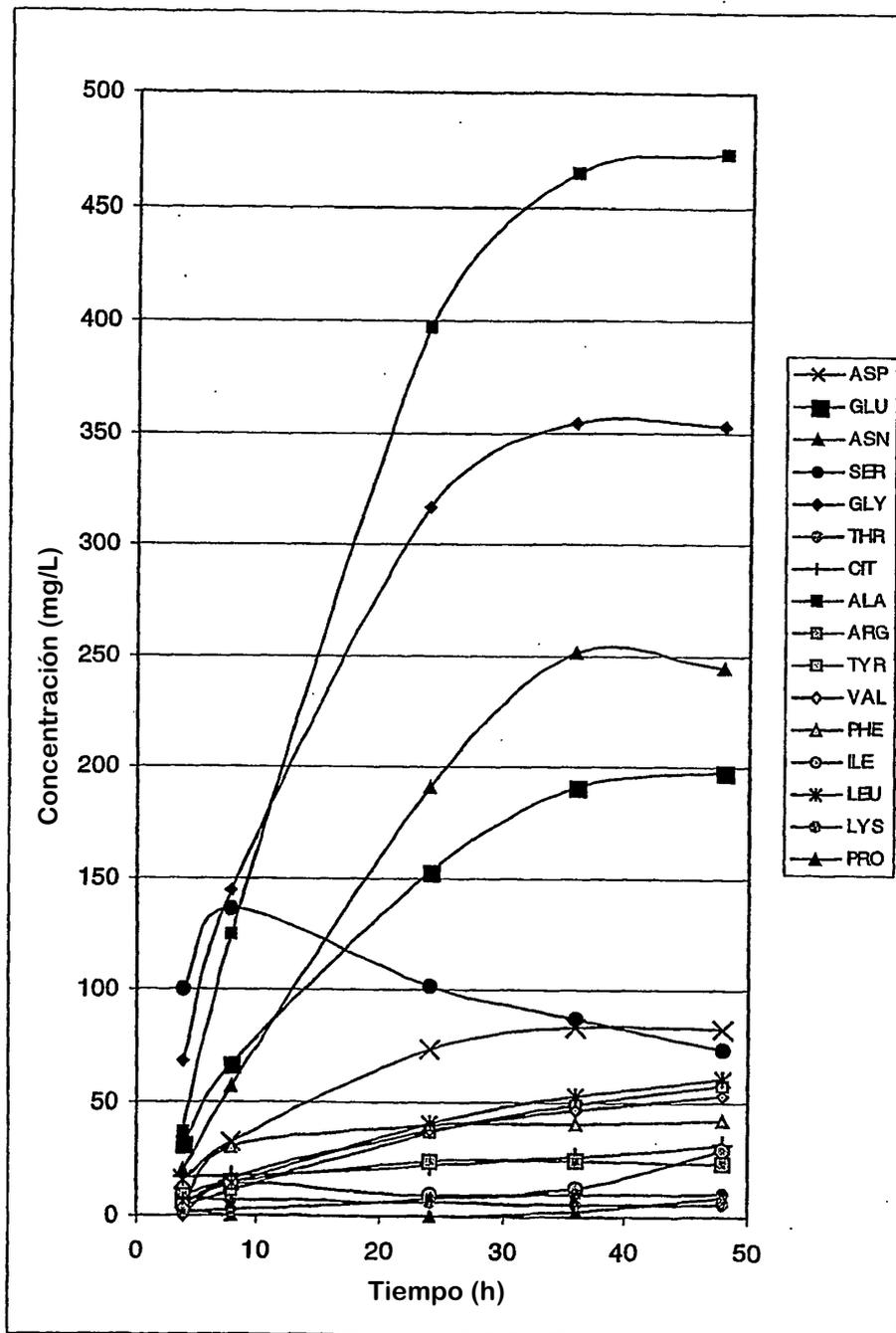


FIGURA 44

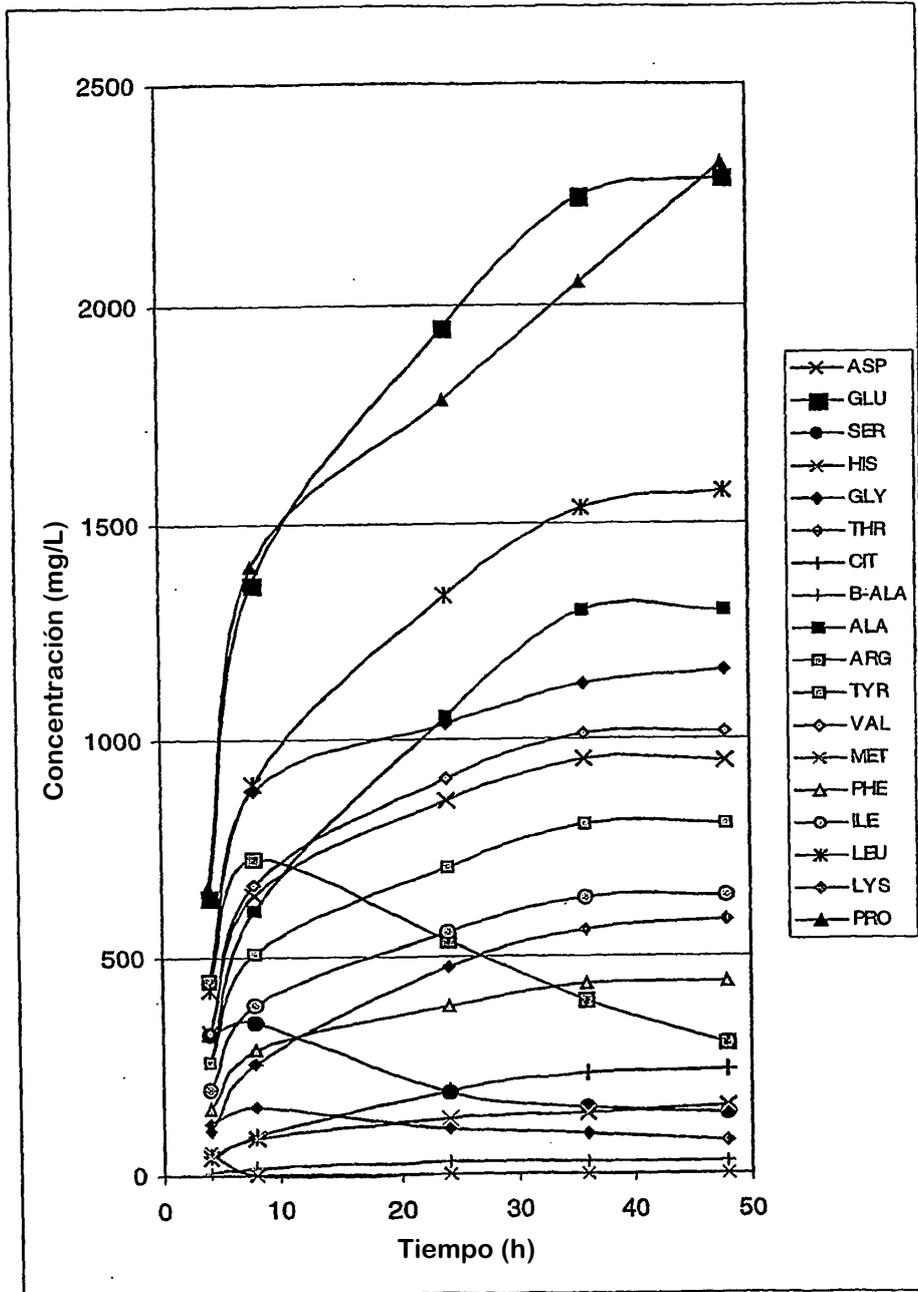


FIGURA 45

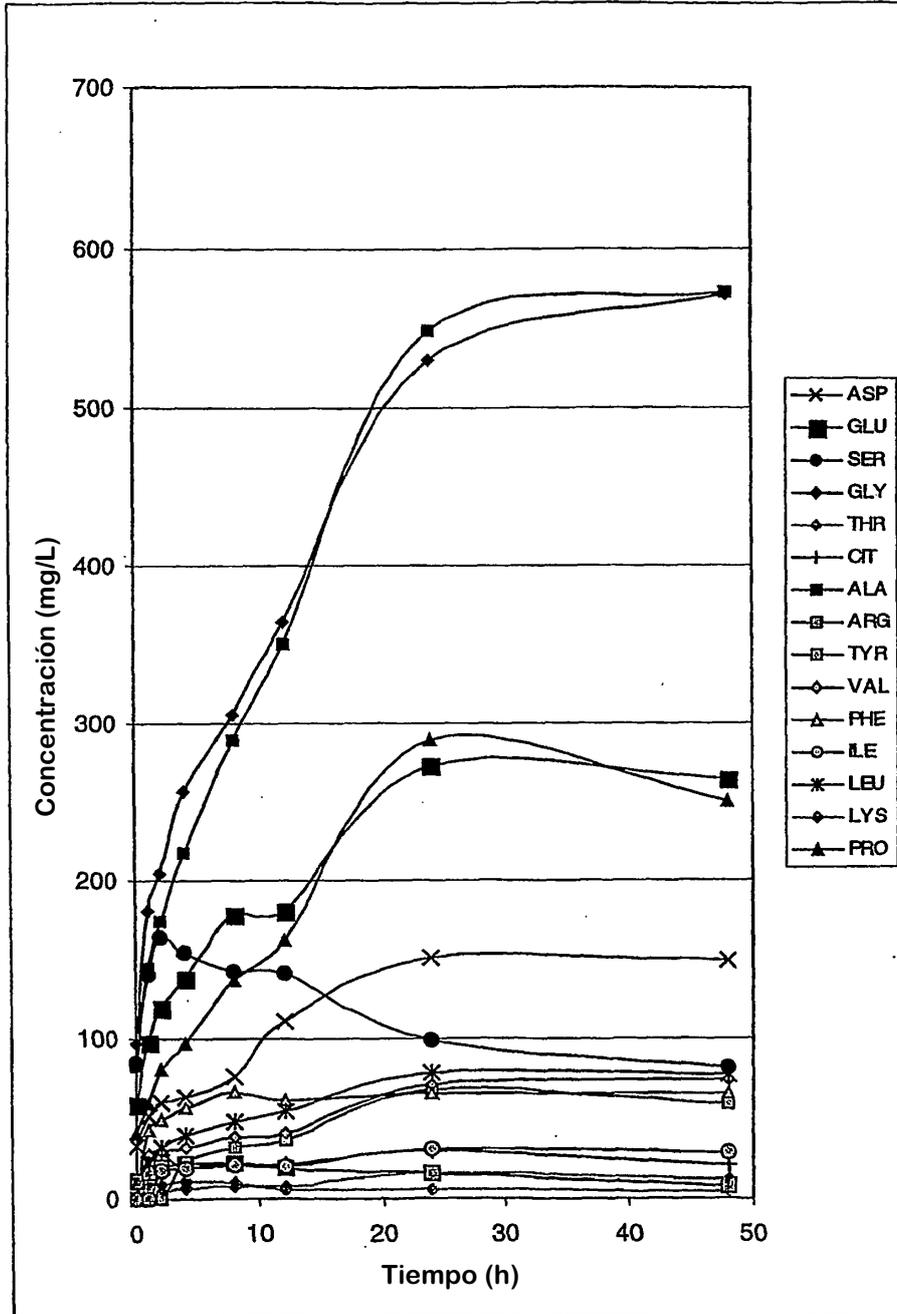


FIGURA 46

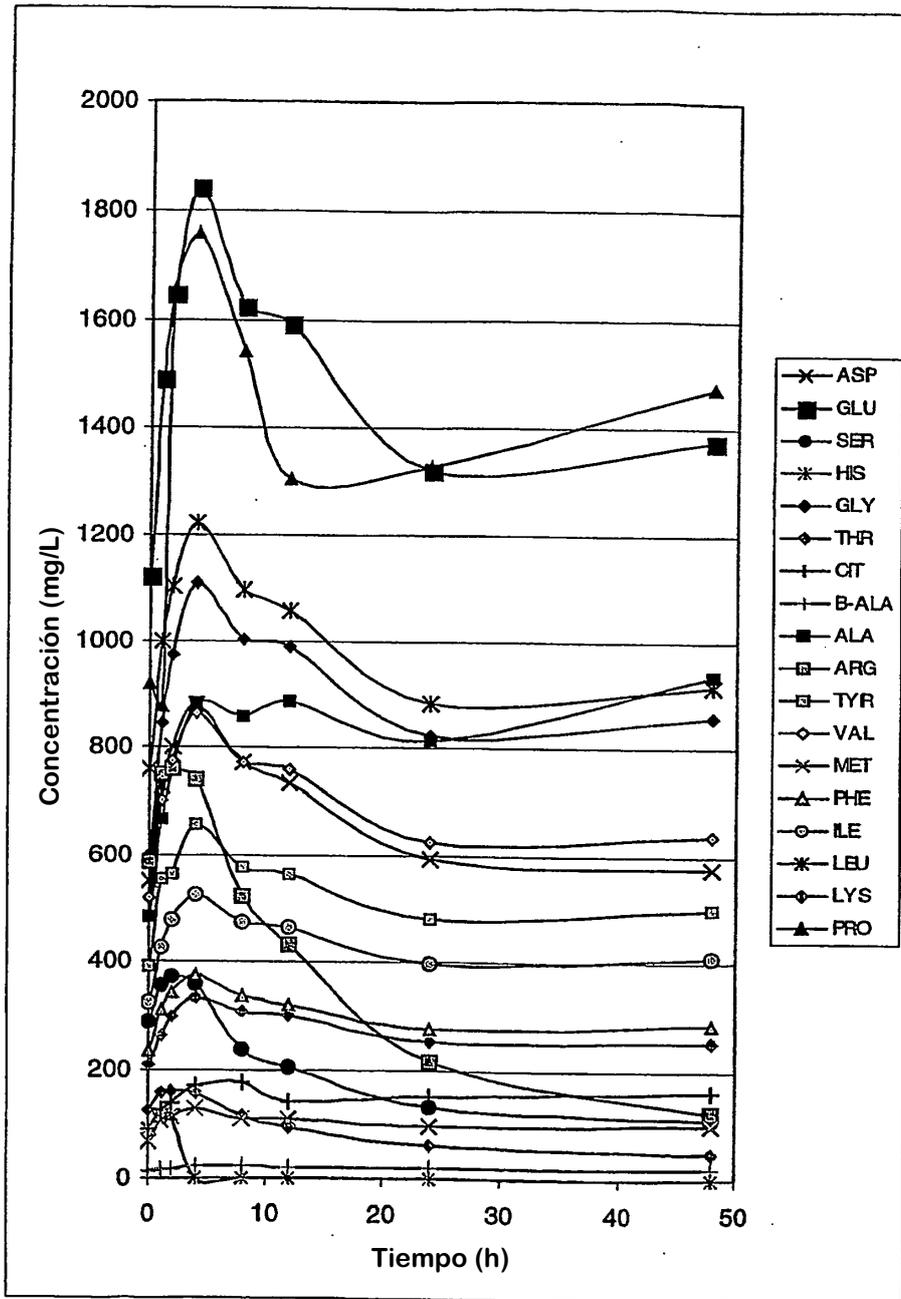


FIGURA 47

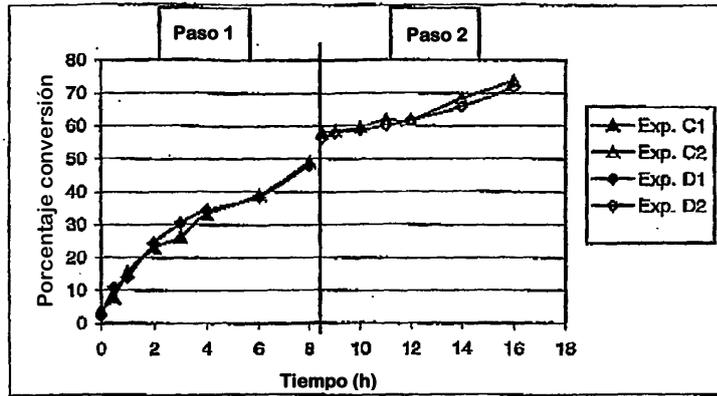


FIGURA 48

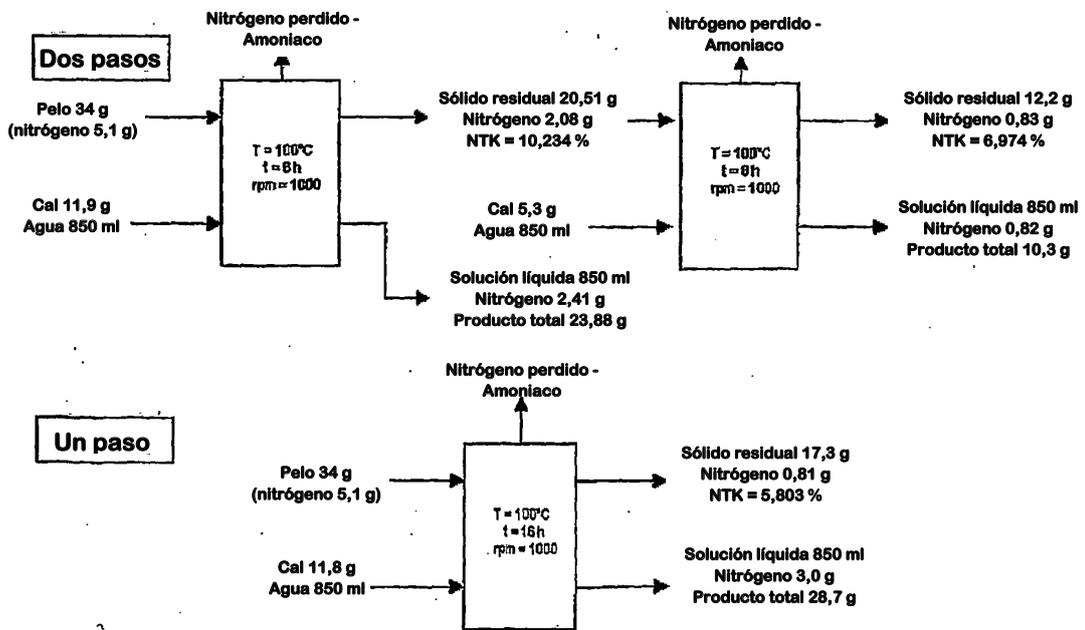


FIGURA 49

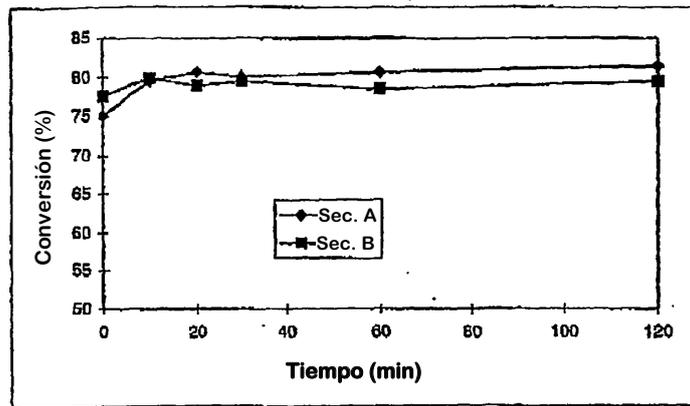


FIGURA 50

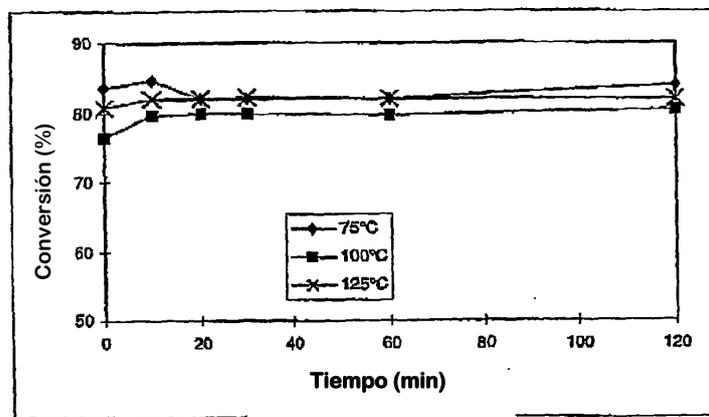


FIGURA 51

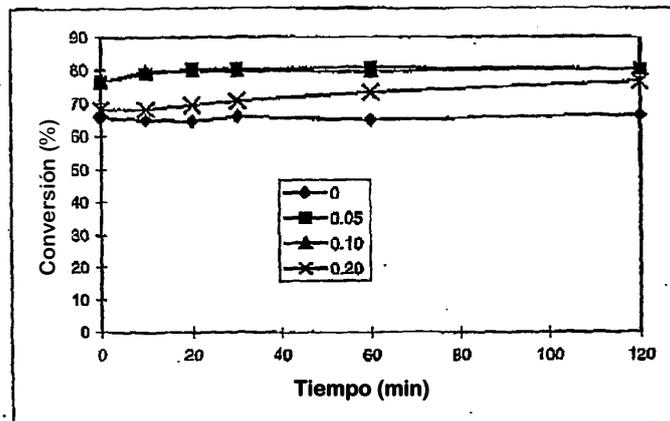


FIGURA 52

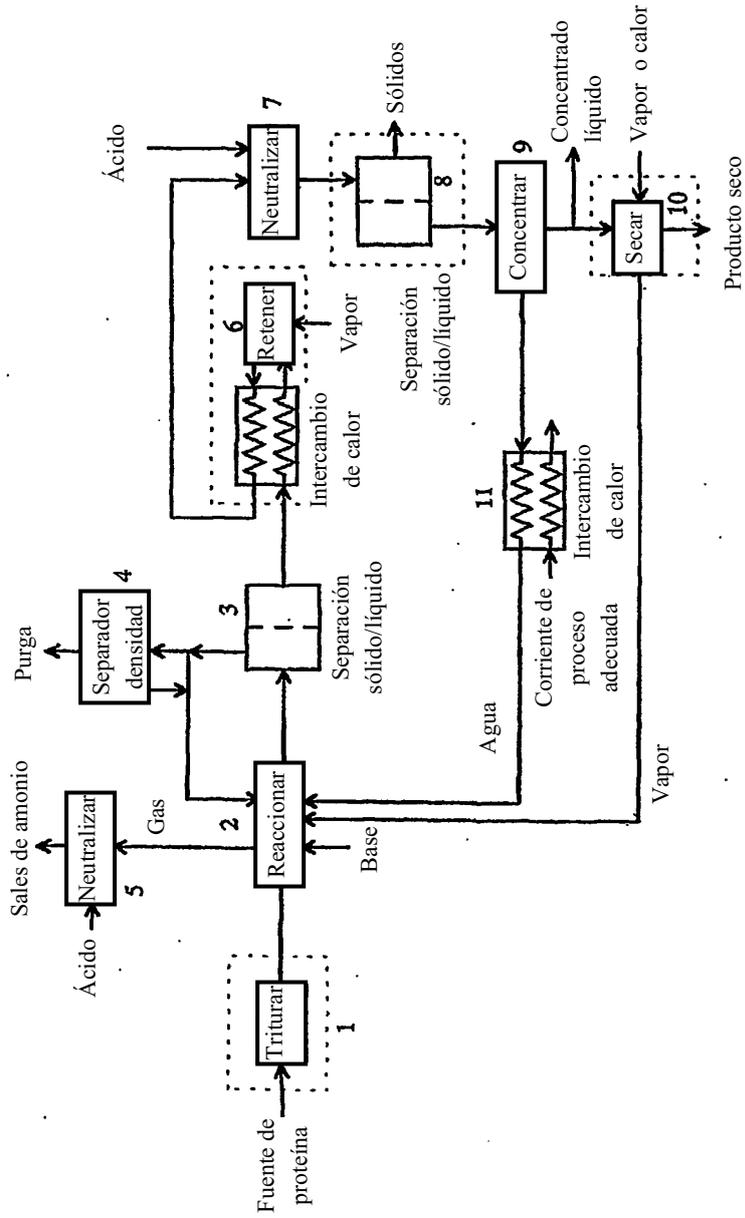


FIGURA 53