



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Evaluación de diferentes cepas queratinolíticas en la hidrólisis de plumas de pollo

Paula Catalina Rey Zorro

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Agroindustria
Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos
Bogotá, Colombia

2018

Evaluación de diferentes cepas queratinolíticas en la hidrólisis de plumas de pollo

Paula Catalina Rey Zorro

Tesis investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Director:

Ph.D., Héctor Suarez Mahecha

Codirector (a):

Ph.D., Jairo Humberto López Vargas

Línea de Investigación:

Calidad de los alimentos

Grupos de Investigación:

Ciencia y Tecnología de Productos Cárnicos y Acuícolas

Aseguramiento de la Calidad de Alimentos y Desarrollo de Nuevos Productos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Agroindustria

Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos

Bogotá, Colombia

2018

A Dios.

*Su voluntad es perfecta y sus caminos los acertados.
Siempre está conmigo y me lleva de la mano por senderos
que no podría imaginar*

A mis padres.

*Quienes han dado todo por mí. Son la pieza fundamental de
mi existir, y quienes me han permitido superarme cada día.
Gracias a ellos es que este trabajo es posible.*

A mi Tío

*Por ser mi ejemplo a seguir, por estar siempre presente en
cada paso que doy y apoyarme incondicionalmente en mi
formación.*

A Camilo.

*Por todo el apoyo incondicional, por enseñarme a no
rendirme nunca, a seguir adelante a pesar de las
adversidades y por empujarme a aprovechar cada una de las
oportunidades que me da la vida*

*A todos ustedes que hicieron parte de esta linda
aventura ¡Gracias!*

Agradecimientos

A Dios por abrirme las puertas para lograr esta gran meta en mi ida

A mis queridos padres, mi hermana, mi tío y mis abuelos y por su incondicionalidad y apoyarme en cada paso que doy.

A Camilo por estar siempre apoyándome incondicionalmente dándome fuerza y ánimo, por animarme cada día a ser imparable.

A mi director Profesor Héctor Suarez Mahecha, por toda su comprensión paciencia y apoyo y por que sin el este trabajo no hubiera podido ser posible.

A mi Co-director Profesor Jairo Humberto López Vargas por el cual pude tener la experiencia de ser Joven Investigadora y llevar a cabo este lindo proyecto de tesis.

Al profesor Adriano Brandelli, Christian Barreto y a la Universidad Federal de Rio Grande del Sur quienes me permitieron desarrollar no solo mis habilidades científicas en mi trabajo de tesis, sino también porque me aportaron innumerables experiencias de vida que nunca olvidare

A mis colegas y amigos que aportaron su granito de arena para que este proyecto fuera cada día mejor

A la Universidad Nacional de Colombia que me abrió sus puertas y me brindo esta maravillosa oportunidad de poder seguir por el sendero de la ciencia y la tecnología, cosa que me apasiona

Y a todas aquellas personas que de alguna manera aportaron e hicieron posible el desarrollo de este proyecto

Resumen

La búsqueda de microorganismos que tengan la habilidad de degradar sub-productos de la industria considerados de difícil tratamiento, como las plumas de pollo representa una alternativa amigable con el medio ambiente y proporciona valor agregado no solo con la bioconversión del sub-producto parcialmente aprovechado, sino también abriendo la posibilidad de nuevas aplicaciones y producción de diferentes compuestos con potencial bioactivo. Los microorganismos *Bacillus circulans* BL32, *Microbacterium. sp* KR10 y *Bacillus subtilis* FTCO2PRO2 cepa probiótica demostraron ser eficientes en la degradación de plumas de pollo. Fue comprobado el potencial antioxidante de hidrolizados de plumas utilizando los tres microorganismos por medio de análisis según radical ABTS, DPPH, poder reductor de hierro y actividad quelante de hierro. Los resultados demuestran alta actividad antioxidante excepto para la prueba DPPH. El hidrolizado producido por *Bacillus subtilis* FTCO2PRO2 cepa probiótica fue parcialmente purificado en columna Sephadex® G-50 (Pharmacia Biotech, Sweden) y se identificaron dos péptidos SDIMNMTP y IVSLAPEVL con potencial antioxidante mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem. Es la primera vez que se identifica hidrolizados de plumas con actividad antioxidante por parte de un microorganismo probiótico, lo que sigue abriendo la brecha a la búsqueda de más microorganismos queratinolíticos que puedan dar valor agregado a sub-productos de difícil degradación como las plumas de aves y con producción de potenciales compuestos bioactivos.

Palabras clave: Queratina, compuestos bioactivos, cepa probiótica, hidrólisis.

Abstract

The search for microorganisms that have the ability to degrade industry by-products considered difficult to treat, such as chicken feathers represents an environmentally friendly alternative and provides added value not only with the bioconversion of the partially exploited by-product, but also opening the possibility of new applications and production of different compounds with bioactive potential. The microorganisms *Bacillus circulans* BL32, *Microbacterium*. sp KR10 and *Bacillus subtilis* FTCO2PRO2 probiotic strain proved to be efficient in the degradation of chicken feathers. The antioxidant potential of hydrolysates of feathers was verified using the three microorganisms by means of analysis according to radical ABTS, DPPH, iron reducing power and iron chelating activity. The results demonstrate high antioxidant activity except for the DPPH test. The hydrolysate produced by *Bacillus subtilis* FTCO2PRO2 probiotic strain was partially purified in Sephadex® G-50 column (Pharmacia Biotech, Sweden) and two SDIMNMTP and IVSLAPEVL peptides with antioxidant potential were identified by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. It is the first time that hydrolysates of feathers with antioxidant activity have been identified by a probiotic microorganism, which continues to open the way to the search for more keratinolytic microorganisms that can give added value to by-products of difficult degradation such as bird feathers and with production of potential bioactive compounds.

Keywords: Keratin, bioactive compounds, probiotic strain, hydrolysis

Contenido

| | Pág. |
|---|-------------|
| | Pág. |
| Lista de figuras..... | XIII |
| Lista de tablas..... | XIV |
| Lista de Símbolos y abreviaturas..... | XV |
| Introducción | 1 |
| 1. Posibles aplicaciones biotecnológicas en subproductos de la industria avícola: aprovechamiento de plumas como fuente de proteína y otros compuestos: A review ..3 | |
| Resumen..... | 3 |
| 1.1 Introducción..... | 4 |
| 1.2 Microorganismos con actividad queratinolítica | 7 |
| 1.3 Cepas fúngicas..... | 7 |
| 1.4 Cepas bacterianas | 9 |
| 1.5 Cultivo..... | 11 |
| 1.7 Enzimas microbianas..... | 12 |
| 1.8 Componentes bioactivos | 13 |
| 1.9 Conclusiones | 15 |
| 1.10Referencias | 16 |
| 2. Potencial producción de hidrolizados de plumas con alta actividad antioxidante | |
| 23 | |
| Resumen | 23 |
| 2.1 Introducción | 24 |
| 2.2 Materiales y métodos | 26 |
| 2.2.1 Microorganismos y preparación del Inóculo y el cultivo | 26 |
| Porcentaje de degradación..... | 26 |
| Cepas Bacterianas..... | 26 |
| Preparación del inóculo y cultivo | 27 |
| Porcentaje de degradación..... | 27 |
| 2.2.2 Métodos analíticos | 27 |
| Determinación de proteína soluble y aminoácidos libres..... | 27 |
| 2.2.3 Actividad antioxidante..... | 28 |

| | |
|--|-----------|
| Radical ABTS•+ (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)..... | 28 |
| Poder reductor de hierro | 28 |
| Actividad quelante de hierro..... | 28 |
| Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) | 28 |
| 2.2.4 Identificación de péptidos..... | 29 |
| Fraccionamiento de proteínas en columna | 29 |
| Determinación de péptidos por cromatografía líquida y análisis de espectrometría de masas en tándem..... | 29 |
| 2.3 Resultados y discusión | 30 |
| 2.3.1 Degradación de las plumas de pollo | 30 |
| 2.3.2 Actividad antioxidante..... | 33 |
| 2.3.3 Identificación de péptidos potencialmente antioxidantes de <i>Bacillus subtilis</i> FTCO2PRO2 cepa probiótica..... | 44 |
| 2.4 Conclusiones | 46 |
| 2.5 Referencias | 47 |
| 3. Conclusiones y recomendaciones | 49 |

Lista de figuras

| | Pág. |
|--|------|
| | |
| <i>Figura 2-1: Plumas antes de la hidrolisis (A) y después de la hidrolisis con bacterias. BL32 (C), KR10 (D), FTCO2PRO2 (E), y el cultivo control sin inoculación de microorganismos (B)</i> | 30 |
| <i>Figura 2-2. Proteína soluble liberada (mg/ml) a las 24, 48 y 72 horas de cultivo</i> | 32 |
| <i>Figura 2-3: Aminoácidos Libres (mg leucina/mL a las 24, 48 y 72 horas de cultivo</i> | 32 |
| <i>Figura 2-4: Actividad antioxidante radical ABTS (miliequivalentes de Trolox/mL) monitorizada a las 24, 48 y 72 horas de cultivo</i> | 34 |
| <i>Figura 2-5: Poder Reductor de Hierro expresado en Absorbancia a 700 nm, A las 24, 48 y 72 horas de cultivo</i> | 36 |
| <i>Figura 2-6: Actividad Quelante de Hierro expresada en % de Actividad, a las 24, 48 y 72 horas de cultivo</i> | 37 |
| <i>Figura 2-7: PCA loading plot, relación entre las variables a través del tiempo de estudio de los hidrolizados de plumas por los tres microorganismos.....</i> | 39 |
| <i>Figura 2-8: Dendograma relación entre variables medidas del hidrolizado de plumas por la cepa Bacillus circulans BL32</i> | 39 |
| <i>Figura 2-9: : Dendograma, relación entre las variables medidas del hidrolizado de plumas por la cepa Microbacterium sp KR10</i> | 41 |
| <i>Figura 2-10: Dendograma, relación entre variables medidas del hidrolizado de plumas por la cepa probiótica de Bacillus subtilis FTCO2PRO2</i> | 42 |
| <i>Figura 2-11: PCA Score Plot, comparación del comportamiento de las cepas a las 24, 48 y 72 horas de cultivo. C: Control; B: Bacillus circulans BL32; K: Microbacterium. sp KR10; F: Bacillus subtilis FTCO2PRO2 cepa probiótica</i> | 43 |
| <i>Figura 2-12: Grafico de utilidad y conveniencia en los hidrolizados de plumas por los microorganismos B: Bacillus circulans BL32, K: Microbacterium. sp KR10, y F: Bacillus subtilis FTCO2PRO2 cepa probiótica</i> | 44 |

Lista de tablas

| | Pág. |
|--|------|
| Tabla 1-1.1: Bacterias reportadas con actividad queratinolítica en plumas de aves de corral. | 10 |
| <i>Tabla 2-1: Biomasa del inóculo y biomasa del cultivo a las 72 horas en medio mineral con plumas</i> | 31 |
| <i>Tabla 2-2: Proteína soluble liberada (mg/ml) a las 24, 48 y 72 horas de cultivo</i> | 31 |
| <i>Tabla 2-3: Aminoácidos Libres (mg leucina/mL a las 24, 48 y 72 horas de cultivo</i> | 33 |
| <i>Tabla 2-4: Actividad antioxidante radical ABTS (meqTrolox/mL) monitorizada a las 24, 48 y 72 horas de cultivo</i> | 34 |
| <i>Tabla 2-5: Poder Reductor de Hierro expresado en Absorbancia a 700 nm, A las 24, 48 y 72 horas de cultivo</i> | 35 |
| <i>Tabla 2-6: Actividad Quelante de Hierro expresada % de Actividad, a las 24, 48 y 72 horas de cultivo</i> | 37 |
| <i>Tabla 2-7: Correlaciones de las variables estudiadas en los hidrolizados de plumas de Bacillus circulans BL32, según el ranquin total</i> | 40 |
| <i>Tabla 2-8: Correlaciones de las variables estudiadas en los hidrolizados de plumas de Microbacterium. sp KR10, según el ranquin total</i> | 41 |
| <i>Tabla 2-9: Correlaciones de las variables estudiadas en los hidrolizados de plumas de Bacillus subtilis FTCO2PRO2 cepa probiótica, según el ranquin total</i> | 42 |
| <i>Tabla 2-10: Secuencias de los péptidos identificados del hidrolizado de plumas por el microorganismo Bacillus subtilis FTCO2PRO2 cepa probiótica</i> | 45 |

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

| Abreviatura | Término |
|-------------|--|
| B2 | Cultivo de <i>Bacillus circulans</i> a las 24 horas |
| B4 | Cultivo de <i>Bacillus circulans</i> a las 48 horas |
| B7 | Cultivo de <i>Bacillus circulans</i> a las 72 horas |
| BL32 | <i>Bacillus circulans</i> |
| CIA | Poder Quelante de Hierro |
| F2 | Cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> cepa probiótica a las 24 horas |
| F4 | Cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> cepa probiótica a las 48 horas |
| F7 | Cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> cepa probiótica a las 72 horas |
| FAR | Aminoácidos Libres |
| FTCO2PRO2 | <i>Bacillus subtilis</i> cepa probiótica |
| K2 | Cultivo de <i>Microbacterium. sp</i> a las 24 horas |
| K4 | Cultivo de <i>Microbacterium. sp</i> a las 48 horas |
| K7 | Cultivo de <i>Microbacterium. sp</i> a las 72 horas |
| KR10 | <i>Microbacterium. sp</i> |
| RIP | Poder Reductor de Hierro |
| SPR | Proteína Soluble |

Introducción

Según estudios realizados por la Federación Nacional de Avicultores (2013), Colombia es el quinto productor avícola en Latinoamérica y en la actualidad constituye una de las cadenas productivas más importante del país, dado que potencia la economía del sector agropecuario, y a la par consolida la cadena agroindustrial, la cual necesita darle valor agregado a los grandes volúmenes de subproductos o residuos que se están desperdiciando en las plantas de sacrificio. Es por eso que se hace necesario utilizar los productos que dejan de lado procesos de industrialización, los cuales pueden brindar una alternativa económica y amigable con el ambiente (Reddy, 2015). El desarrollo de sub-productos es una alternativa que se está estudiando bastante, debido a las condiciones económicas, sociales, ambientales etc. a las cuales se enfrenta el mundo en la actualidad y se requiere generar la conciencia del ahorro. Debido a sus interesantes propiedades, este recurso se ha desarrollado, siendo así utilizado por la industria cosmética, farmacéutica, alimentaria, textil, etc. (Reddy, 2015).

En principio las hidrólisis de plumas de pollo se han llevado a cabo mediante el uso de altas temperaturas y presiones, o por hidrólisis química con sales básicas. Los productos obtenidos por estos procesos resultan ser de muy baja calidad nutricional, además que el coste energético de estos es bastante alto.

Debido que, aunque las plumas de pollo son muchas veces consideradas desechos y pueden causar problemas ambientales, el hecho que no se acumulen en el ambiente llamó la atención de diferentes investigadores, los cuales se dieron cuenta que había microorganismos que eran capaces de degradarlas. La búsqueda de microorganismos queratinolíticos ha venido creciendo debido a que se ha demostrado que la hidrólisis de plumas con éstos, generan hidrolizados proteicos de mejor calidad nutricional, con una tasa de digestibilidad mayor, además que el coste energético que hay que imprimirles no es tan alto como los métodos manejados anteriormente descritos. Además de eso, se ha encontrado que los microorganismos pueden aprovechar muy bien los sustratos de queratina, entre

estos las plumas, hidrolizando gran parte de su estructura y produciendo en el proceso de la hidrolisis con las enzimas queratinasas, hidrolizados de plumas con compuestos bioactivos muy importantes para la industria.

Este trabajo presenta una revisión bibliográfica de microorganismos aislados de suelo y de plumaje de aves, con actividad queratinolítica, métodos de cultivo, además de compuestos bioactivos producto de hidrolisis microbiológica y enzimática de plumas. También se presenta un estudio con tres cepas bacterianas queratinolíticas, una de ellas probiótica, con las cuales se realizaron hidrolisis de plumas de pollo sin ningún pretratamiento, dando buenos resultados en materia de degradación del sustrato, como en la producción de hidrolizados con potencial actividad antioxidante. También se estimó la correlación que tenía la actividad antioxidante medida por diferentes métodos con la liberación de aminoácidos y proteína al medio de cultivo. La cepa probiótica *Bacillus subtilis* FTCO2PRO2 fue seleccionada para análisis de identificación de péptidos involucrados en la actividad antioxidante, debido a su excelente rendimiento en la hidrolisis de plumas, además de presentar hidrolizados con alto potencial antioxidante.

El hallazgo de microorganismos con actividad queratinolítica para la hidrólisis de sustratos queratinosos, es un tema que va en ascenso debido a la utilidad que presentan estos microorganismos para dar valor agregado a sub-productos de la industria que se están desechando proporcionando alternativas amigables con el medio ambiente, y obteniendo productos con gran potencial de aplicación en la industria.

1. Posibles aplicaciones biotecnológicas en subproductos de la industria avícola: aprovechamiento de plumas como fuente de proteína y otros compuestos: A review

Resumen

Debido a la problemática ambiental que representan los desechos industriales, se hace necesario buscar soluciones amigables con el medio ambiente, para estos desperdicios o subproductos. Diferentes avances biotecnológicos han logrado dar valor agregado a productos que, por su composición, son de difícil degradación, como es el caso de las plumas de aves de corral. Las plumas representan alrededor del 10% del peso de un ave, y están conformadas por 90% de queratina, pero al ser consideradas un desecho, no son tratadas de manera adecuada, lo que causa problemas medioambientales por su difícil degradación. Este sub-producto, comparado con otros desechos de la industria agrícola, resulta ser uno de los menos costosos, por el gran consumo de aves de corral en todo el mundo, pero con métodos de hidrólisis química, o con altas temperaturas y presiones, la calidad nutricional que presentan los hidrolizados es muy baja. Diversos estudios concuerdan con que el uso de microorganismos con actividad queratinolítica y enzimas derivadas de estos, podrían ser una buena alternativa no solo para aumentar el valor biológico de los hidrolizados de plumas, mejorando el balance de aminoácidos y la digestibilidad de estos, sino también para la obtención de sustancias potencialmente bioactivas muy importantes para la industria a partir de una matriz tan económica como las plumas de aves de corral. Esta revisión proporciona visión general de los microorganismos más utilizados en la hidrólisis de plumas y de los diferentes avances obtenidos.

Palabras clave: Queratina, Hidrólisis, Cepas proteolíticas, Compuestos bioactivos.

Abstract

Due to the environmental issues that the industrial waste represents, it becomes necessary to look for environmentally-friendly solutions with these wastes. Different biotechnological advances have managed to give value added to products that are of difficult degradation like poultry feathers. Feathers represent 10 % of the weight of a bird, and are shaped by 90 % of keratin, but on having been a waste, are not treated as a suitable way, which causes environmental problems for difficult degradation. This by-product compared with other waste of the poultry industry, turns out to be one of the least expensive, for the high consumption of barnyard fowl in the entire world, but using chemical methods or conducting hydrolysis with elevated temperatures and pressures, the hydrolysates nutritional quality is very low. Diverse studies agree that the use of microorganisms with keratolytic activity and enzymes derived from them, might be a suitable alternative that not only increase the biological value of the feather hydrolysates, improving the balance assessment of amino acids and the digestibility, but also to obtain bioactive compounds very important for the industry from an inexpensive matrix. This review provides general vision of the most used microorganisms in feathers hydrolysis and of the different biotechnological developments obtained so far.

Key words: Keratin, Hydrolysis, Proteolytic strains, Bioactive compounds

1.1 Introducción

Con la problemática ambiental por la cual pasa el mundo hoy en día, se hace necesario buscar alternativas renovables y sostenibles que puedan mitigar y/o prevenir también el daño ambiental que deja la industria y la explotación de los recursos naturales. El desarrollo del quehacer investigativo apunta a la exploración del manejo de desechos que quedan después de un proceso industrial, para reducir la explotación de diferentes recursos que causan un gran impacto ambiental (Reddy 2015). La obtención de ingredientes a partir de sub-productos es una alternativa económica y amigable con el ambiente, además que es un tema que se está estudiando bastante, debido a las condiciones económicas, sociales, ambientales

entre otras, que se enfrenta el mundo en la actualidad donde se requiere generar la conciencia del ahorro (Brandelliet al. 2015; Lange et al. 2016).

Diferentes desechos de la industria avícola y en especial las plumas, tienen una disponibilidad muy alta en todo el mundo (Wang et al. 2016), y son ricos en queratina, la cual es una proteína resistente a la degradación por enzimas proteolíticas (Brandelliet al. 2015; Wang et al. 2016). Debido a que estas estructuras son producto de la adaptación del animal al medio en el que vive, tienen como función la protección del ave frente a depredadores, protección a condiciones ambientales entre otras. La queratina es una de las proteínas más importantes para los animales y se encuentra en mayor cantidad en las plumas, la epidermis, pelo, cuernos, pezuñas, uñas, picos y escamas (Ferraro et al. 2016; Wang et al. 2016). Es una proteína de la familia de las proteínas filamentosas y está formada por α -queratina y β -queratina (conformaciones α -hélice y β -plegada, respectivamente), es resistente a factores ambientales (físicos o químicos), a proteínas proteolíticas como la pepsina y la tripsina, por el alto contenido de enlaces disulfuro presentes en la cistina, haciéndola resistente a la lisis enzimática. Además de ser insoluble en agua, solventes orgánicos, ácidos y bases débiles (Wang et al. 2016). Según la cantidad de enlaces disulfuro que pueda tener la queratina, se puede separar en dos grandes grupos que son: queratina suave y queratina dura (Wang et al. 2016). La queratina suave posee un contenido de cisteína del 2% lo cual la hace poco resistente al daño químico, esta se puede encontrar en la epidermis y en pelo, mientras que las queratinas duras, pueden tener entre 10 a 22%, la cual se encuentra en estructuras como cuernos, uñas y plumas las cuales poseen alrededor de 8% de cisteína en su conformación (Ferrareze et al. 2016).

Las plumas representan alrededor del 10% del peso de un ave y están compuestas por un 90% de queratina (Tiwary y Gupta 2012). Comparado con otros subproductos de la industria agrícola, este resulta ser uno de los menos costosos, al ser considerado un producto ubicuo (Reddy 2015). El alto contenido de cisteína es el principal responsable de la rigidez de la pluma por la formación de puentes de disulfuro, además por ser un compuesto hidrófobo, la hacen un material muy fuerte y resistente a la degradación proteica (Wang et al. 2016).

Las plumas, como sub-producto, son consideradas el material con mayor cantidad de queratina de la naturaleza y ha sido ampliamente utilizado debido a sus interesantes propiedades (Reddy 2015). Este recurso se ha estudiado y desarrollado, siendo así utilizado por la industria, en aplicaciones eléctricas y electrónicas, biofertilizantes, producción de biogas (Reddy 2015; Tesfaye et al. 2017), biotermoplásticos (Reddy, Chen, and Yang 2013) e incluso en la ingeniería de tejidos (Wang et al. 2016). En algunos casos, se ha recuperado este material para la incorporación en la alimentación de animales (Toldrá et al. 2012; Martínez-Alvarez, Chamorro, and Brenes 2015). Expertos en alimentación animal, ven potencial en la utilización de este producto, ya que representa una fuente muy económica de proteína para suplementar concentrados de dietas animales (Toldrá et al. 2012; Brotzge et al. 2014; Mazotto et al. 2017), pero al ser altamente resistente a las enzimas digestivas, no presenta un alto valor biológico. Aunque se realicen hidrólisis con altas temperaturas o con compuestos químicos se obtiene un producto muy bajo en aminoácidos como metionina, histidina, lisina y triptófano (Onifade et al. 1998), además de ser una alternativa costosa, el desbalance de aminoácidos y la baja digestibilidad presentan un gran reto para la industria alimentaria (Grazziotin et al. 2006; Lange et al. 2016; Mazotto et al. 2017). Es aquí donde los microorganismos, con la producción de enzimas, presentan una nueva alternativa frente al aumento del bajo valor biológico que tienen los sub-productos de plumas (Brandelliet al. 2015). Diferentes estudios han demostrado que la hidrólisis de sustratos de queratina no solo podrían aumentar el valor biológico (Ferraro et al. 2016; Kornilłowicz-Kowalska y Bohacz 2011; Fakhfakh et al. 2011), si no también se pueden obtener diferentes compuestos considerados bioactivos de gran importancia en la industria farmacéutica, a partir de una matriz muy económica y de alta disponibilidad en el mundo (Ohba et al. 2003; Lasekan et al. 2013). Se han reportado en la literatura infinidad de hongos y bacterias que pueden utilizar la queratina de las plumas como fuente de carbono y nitrógeno, y pueden degradar este material exitosamente (Lange et al. 2011).

El objetivo de esta revisión es la exploración bibliográfica de diferentes avances biotecnológicos encaminados a la hidrólisis de plumas de aves de corral en cuanto a la tendencia de microorganismos más usados actualmente para la degradación de queratina y los diferentes compuestos que se pueden obtener a partir de la hidrólisis.

1.2 Microorganismos con actividad queratinolítica

Uno de los desechos más abundantes de la industria avícola son las plumas (Reddy 2015), y para el aprovechamiento de este recurso, es necesario hacerlo pasar por diferentes tratamientos de hidrólisis debido a la estructura rígida que presenta (Wang et al. 2016). En primer lugar, se encuentra la hidrólisis con ácidos fuertes o bases muy alcalinas a altas temperaturas, la cual puede deteriorar la composición de los aminoácidos extraídos (Coward-Kelly et al. 2006), obteniendo resultados desfavorables al incorporarlos en un producto alimentario, es aquí donde la introducción de microorganismos capaces de degradar este material representa un cambio importante, no solo para la incorporación en alimentos, ya que también extiende el potencial que tiene reutilizar plumas de aves de corral en diferentes sectores de la industria (Brandelli et al. 2015; Lange et al. 2016).

El hecho que las plumas sean un material tan resistente, pero que no se acumule en la naturaleza, resulta ser algo contradictorio, pero aquí realmente empezó la investigación en el desarrollo biotecnológico que se ha estado desencadenando los últimos años (Riffel and Brandelli 2006). Microorganismos presentes en el plumaje de las aves, o simplemente saprofitos del suelo (Bach et al. 2011), además de la observación de diferentes patologías en el plumaje de las aves, causadas por microorganismos, serían el punto de partida para hallar el por qué este material no se acumula en el ambiente (Brandelli 2008).

1.3 Cepas fúngicas

Algunos hongos se caracterizan por tener capacidad de parasitar tejidos queratinizados, es el caso de los hongos dermatofitos (Lange et al. 2016), los cuales, por su actividad queratinolítica, fueron estudiados como alternativa biotecnológica para degradar proteína de plumas de aves de corral (Korniłowicz-Kowalska y Bohacz 2011; Błyskal 2009). Además de los dermatofitos existen muchas otras especies de hongos que pueden degradar la queratina utilizando plumas de aves como fuente de carbono y nitrógeno, las especies más representativas han sido aisladas tanto de plumajes de aves como del ambiente (Lange et al. 2016).

Los dermatofitos son un grupo de hongos muy conocidos por su excelente habilidad para degradar la queratina, la mayoría son patógenos de animales y humanos, pero algunos tienen su hábitat en el suelo (Korniłowicz-Kowalska y Bohacz 2011). Entre los dermatofitos geofílicos más importantes se encuentran géneros como *Microsporum sp* y *Trichophyton sp*, estos géneros pueden causar patologías como tinea corporis y tinea capitis. Entre los géneros de hongos no dermatofitos que pueden utilizar la queratina como fuente de carbono se encuentran *Chrysosporium* y *Myceliophthora* los cuales son hongos que ocasionalmente causan patología en humanos, y pueden causar patología en animales, además son cepas que pueden producir enzimas termoestables, lo que resulta ser muy interesante en la industria (Korniłowicz-Kowalska y Bohacz 2011; Lange et al. 2016).

Se han reportado infinidad de cepas fúngicas que tienen la habilidad para degradar materiales ricos en queratina, aunque la mayoría de estos hongos no la utilizan como única fuente de carbono, existen algunos géneros que son únicamente afines a este tipo de materiales, como el caso de *Chytridiomycota*, el cual sólo crece y se alimenta a partir de este tipo de materiales (Błyskal 2009).

Diferentes mohos como *Aspergillus sp*, *Penicilium sp*, *Scopulariopsis sp*, *Paecilomyces sp* entre otros, se han reportado como queratinolíticos (Mazotto et al. 2013; Lange et al. 2016), pero comparados con la acción queratinolítica de los hongos dermatofitos, no son muy eficientes, ya que estos últimos pueden solubilizar completamente algunos materiales ricos en queratina, mientras que estos mohos solo alcanzan a degradar entre un 20-40% del material (Błyskal 2009).

Las especies fúngicas son muy eficientes a la hora de degradar materiales ricos en queratina, pero la mayoría son patógenos de diferentes animales y del hombre, lo que por seguridad, hace difícil el manejo de estos microorganismos dentro de un proceso biotecnológico, y más si el producto es destinado para uso humano o animal (Lange et al 2016)

1.4 Cepas bacterianas

El primer aislamiento de una bacteria capaz de degradar la queratina fue reportado por Molyneux 1959, a partir de lesiones en ovejas, que causaban patología en la piel, los ensayos in vivo e in vitro, usando lana como fuente de carbono y nitrógeno, evidenció que la bacteria del género *Bacillus sp.* era la responsable de la degradación queratinolítica de la lana.

La búsqueda de microorganismos con actividad queratinolítica se ha hecho de manera creciente en los últimos años, donde se encuentran géneros de bacterias Gram negativas, como es el caso de *Vibrio sp.*, que produjo hidrolizados de plumas de ave con bajo valor biológico, pero con mejor tasa de digestibilidad (Grazziotin et al. 2006), *Serratia sp.* produce altas concentraciones de proteína soluble además de grupos tioles en los hidrolizados (Bach et al. 2012; Brandelli et al. 2015), y *Chryseobacterium sp.* que es capaz de hidrolizar plumas sin ningún pretratamiento, por lo que es considerada de alta actividad queratinolítica (Riffel et al. 2003). Entre los géneros de bacterias Gram positivas se encuentran *Actinomyces sp* y *Bacillus sp*, que son las más comúnmente aisladas de plumaje de aves (Demir et al. 2015; Lange et al. 2016), y son capaces de solubilizar totalmente la queratina dura (presente en uñas pelo y plumas) (Fakhfakh et al. 2011; Okoroma et al. 2012; Ferrareze, Correa, and Brandelli 2016).

Entre el género *Bacillus* las especies más reportadas como queratinolíticas con frecuencia son: *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. cereus*, *B. megaterium* y *B. thuringiensis* (Lange et al. 2016; Fakhfakh et al. 2011; Tiwary y Gupta 2012). Este género bacteriano es el que más se destaca por las enzimas queratinolíticas que producen, las cuales logran degradar totalmente la queratina presente en las plumas incluyendo el raquis, como en el caso de *B. licheniformis* y *B. pumilus* (Fakhfakh et al. 2011; Tesfaye et al. 2017).

Recientemente se reportó una cepa probiótica de *Bacillus subtilis* con actividad queratinolítica, que lograba también solubilizar la queratina presente en plumas de aves de corral. La cepa *Bacillus subtilis* FTC02PR1, la cual es comercializada para adicionar en alimentos de rumiantes (Ferrareze et al. 2016), es la primera cepa probiótica reportada con esta habilidad, lo que abre las puertas para la investigación de más cepas probióticas con

esta característica, especialmente del género *Bacillus sp.*, ya que estos microorganismos pueden soportar condiciones extremas de almacenamiento, son aisladas tanto del mismo plumaje de las aves como del ambiente (suelo), soportan diferentes condiciones de pH y temperatura, que lo hacen un microorganismo interesante y de fácil manejo en procesos biotecnológicos por la habilidad de formar endospora, además de ser uno de los microorganismos más estudiados en los últimos años (Lange et al. 2016; Paul et al. 2016). En la Tabla 1 se pueden encontrar algunos de los microorganismos reportados en la literatura capaces de degradar queratina a partir de plumas de aves de corral. Estos microorganismos han sido aislados de plumaje de las aves, de suelo (saprofitos del ambiente) o de desechos queratinosos. Según lo reportado en estas investigaciones, se destaca la presencia de bacterias del género *Bacillus* y son descritas como muy buenas degradadoras de material queratinoso, además son las principales bacterias usadas por la industria para producir queratinasas comerciales. (Ferrareze et al. 2016; Paul et al. 2016; Lange et al. 2016)

Tabla 1-1.1: Bacterias reportadas con actividad queratinolítica en plumas de aves de corral.

| Cepa Bacteriana | Enzima | Autores |
|--|---------------------------------|---|
| Bacterias Gram Negativas | | |
| <i>Flavobacterium sp.</i> | ----- | (Riffel and Brandelli 2002) |
| <i>Serratia sp.</i> HPC 1383 | Serinproteasa Metaloproteasa | (Khardenavis, Kapley, and Purohit 2009) |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R13 | Serinproteasa | (Jeong et al. 2010) |
| <i>Vibrio sp.</i> cepa kr2 | ----- | (Grazziotin et al. 2006) |
| <i>Xanthomonas sp.</i> P5 | ----- | (Jeong et al. 2010) |
| <i>Chryseobacterium sp.</i> | Metaloproteasa | (Riffel et al. 2007) |
| Bacterias Gram Positivas | | |
| <i>Bacillus sp.</i> P7 | ----- | (Corrêa, Daroit, and Brandelli 2010) |
| <i>Bacillus sp.</i> MG-MASC-BT | ----- | (Govarthanan et al. 2015) |
| <i>Bacillus sp.</i> P45 | ----- | (Corrêa, Daroit, and Brandelli 2010) |
| <i>Bacillus cereus</i> Wu2 | ----- | (Lo, Too, and Wu 2012) |
| <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 21415 | ----- | (Rodríguez-Morgado et al. 2015; Rodríguez-Morgado et al. 2015) |
| <i>Bacillus licheniformis</i> N22 | ----- | (Okoroma et al. 2012) |
| <i>Bacillus licheniformis</i> S60 | ----- | (Gang et al. 2013) |
| <i>Bacillus licheniformis</i> ER-15 | Serinproteasa | (Tiwary and Gupta 2012) |
| <i>Bacillus licheniformis</i> PWD-1 | ----- | (Lin et al. 1992) |
| <i>Bacillus licheniformis</i> ER-15 | ----- | (Tiwary and Gupta 2012) |
| <i>Bacillus megaterium</i> | ----- | (Agrahari and Wadhwa 2010) |

| | | |
|---|---------------------------------|---|
| <i>Bacillus megaterium</i> F7-1 | ----- | (Park and Son 2009) |
| <i>Bacillus pumilus</i> | ----- | (Agrahari and Wadhwa 2010) |
| <i>Bacillus pumilus</i> A1 | ----- | (Fakhfakh et al. 2011) |
| <i>Bacillus subtilis</i> | ----- | (Zaghloul, Embaby, and Elmahdy 2011) |
| <i>Bacillus subtilis</i> cepa RM-01 | Serinproteasa Metaloproteasa | (Rai, Konwarh, and Mukherjee 2009) |
| <i>Bacillus subtilis</i> cepas mutantes | ----- | (Zhang et al. 2014) |
| <i>Bacillus subtilis</i> FTC02PR1 | Serinproteasa | (Ferrareze, Correa, and Brandelli 2016) |
| <i>Bacillus subtilis</i> DP1 | Serinproteasa | (Sanghvi et al. 2016) |
| <i>Bacillus subtilis</i> S4-5 | ----- | (Chukeatirote et al. 2015) |
| <i>Bacillus subtilis</i> P13 | Serinproteasa | (Pillai, Mandge, and Archana 2011) |
| <i>Bacillus thuringiensis</i> S2-3 | Serinproteasa | (Chukeatirote et al. 2015) |
| <i>Bacillus thuringiensis</i> AD-12 | Serinproteasa | (Gegeckas, Gudiukaitė, and Citavicius 2014) |
| <i>Brevibacillus sp.</i> cepa AS-S10-II | ----- | (Mukherjee, Rai, and Bordoloi 2011) |
| <i>Streptomyces sp.</i> 2M21 | ----- | (Demir et al. 2015) |
| <i>Streptomyces sp.</i> cepa AB1 | Serinproteasa | (Jaouadi et al. 2010) |
| <i>Kocuria rosea</i> LPB 3 | Serinproteasa | (Bertsch and Coello 2005) |
| <i>Microbacterium sp.</i> Kr10 | Metaloproteasa | (Thys et al. 2004) |

1.5 Cultivo

En el diseño de procesos que involucran microorganismos el medio de cultivo y las condiciones de este son clave a la hora examinar los rendimientos. En este caso la mayoría de los microorganismos queratinolíticos usados para degradar plumas reportados han sido principalmente bacterias aisladas de suelo o del plumaje de las aves, las cuales tienen comportamientos mesófilos y algunas termófilos. Hablando de pH, se ha reportado que lo deseable en un proceso queratinolítico es que se encuentre en pH entre 7 y 10, debido a que el proceso en pH por encima de 7.0 aumenta la producción de enzimas queratinasas al menos seis veces comparados con cultivos a pH por debajo de 7.0 (Rai et al. 2009:01). La temperatura de cultivo está sujeta a la naturaleza de la bacteria y a sus necesidades intrínsecas, igualmente que el tiempo de incubación, ya que este dependerá también de la eficacia del microorganismo para producir la o las enzimas.

Diferentes investigaciones en hidrólisis de plumas con microorganismos o enzimas microbianas reportan que para obtener buenos resultados en términos y obtención de proteína y producción de enzimas queratinolíticas, los medios de cultivo más adecuados son

medios ricos en sales como NH_4Cl , NaCl , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , MgCl y CaCO , con adición de plumas como única fuente de carbono y nitrógeno (Demir et al. 2015; Ferrareze et al. 2016). La adición de metales como Ca^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} , permiten la óptima liberación de enzimas queratinasas por parte de los microorganismos (Riffel et al. 2007). Algunos autores reporta que la adición de carbohidratos como glucosa, fructosa, galactosa, maltosa, sacarosa, lactosa y almidón, no tienen un efecto positivo en la producción de queratinasas por géneros *Bacillus sp*, ya que se cree que la presencia de carbohidratos disminuyen la actividad enzimática de las bacterias (Rai et al. 2009; Daroit et al. 2011). La adición de compuestos nitrogenados como: NH_4Cl , NaNO_3 , extracto de levadura, peptona, extracto de carne y caseína, podrían tener un efecto en la producción de enzimas en el medio mineral de plumas, pero esta reacción se encuentra sujeta a la preferencia del microorganismo por el uso de los sustratos. Mientras para la cepa de *Bacillus sp. P45* la adición de NH_4Cl tuvo un efecto positivo en la producción de enzima y proteína (Corrêa et al. 2010), para el cultivo con *B. subtilis MR-01* no presento aumento en la producción de enzimas queratinolíticas (Rai et al. 2009),

1.7 Enzimas microbianas

El desarrollo, la comercialización y el uso de productos a base de enzimas, actualmente se está investigando por su amplia implementación en la industria (Paul et al. 2016). El uso de enzimas no solo puede ser de ayuda para mejorar u optimizar un proceso, también es una alternativa amigable con el medio ambiente, ya que las enzimas pueden sustituir innumerables aditivos químicos que causan daños irreparables al medio ambiente (Brandelli et al. 2015; Lange et al. 2016).

Las enzimas proteolíticas representan un reto para el desarrollo y la comercialización, ya que se buscan proteínas que provengan de microorganismos mesófilos preferiblemente, ya que no se necesitaría de un gran coste energético para poder extraerlas y activarlas (Paul et al. 2016; Lange et al. 2016). Los géneros *Bacillus*, son capaces de producir enzimas altamente resistentes a la temperatura y condiciones de pH, lo que los hace unos microorganismos bastante atractivos para el desarrollo de enzimas sin tener que invertir

muchos recursos en la extracción y podrían sobrevivir las condiciones de almacenamiento hasta que puedan ser utilizadas por el consumidor final (Paul et al. 2016).

Las queratinasas son un grupo de proteasas muy potentes que tienen la capacidad para degradar específicamente queratina (Paul et al. 2016). Estas enzimas pueden ser producidas por diferentes tipos de microorganismos como hongos y bacterias, generalmente aisladas de suelos o de sub-productos queratinosos (Zaraï Jaouadi et al. 2015; Lange, Huang, and Busk 2016). Estas proteasas se pueden dividir en dos grupos, las serinproteasas y metaloproteasas las cuales son capaces de degradar la proteína insoluble que forma muchas estructuras queratinosas en animales (Zaraï Jaouadi et al. 2015). Las serinproteasas son el tipo de queratinasa más comúnmente aislada de bacterias Gram positivas y las metaloproteasas de bacterias Gram negativas. Sin embargo, se ha reportado que existen algunas bacterias Gram negativas que producen queratinasa de tipo serinproteasa, como lo reportado por otros autores con *Serratia sp* cepa HPC1383, la cual puede producir queratinasa de naturaleza metaloproteasa (Khardenavis et al. 2009).

1.8 Componentes bioactivos

La bioconversión de residuos queratinosos como las plumas de aves de corral es una tendencia hoy en día, debido a que representa una alternativa amigable con el medio ambiente y muy económica por la cual se pueden obtener sub-productos que pueden ser empleados en muchas áreas de la industria, ya que la cantidad de proteína que estos contienen y a las enzimas aisladas de estos procesos (Wang et al. 2016). Sin embargo, esta no es la única ventaja de obtener hidrolizados de plumas, ya que recientes estudios han encontrado que, inmerso en el proceso de hidrólisis de este material, se pueden producir diferentes compuestos potencialmente bioactivos muy importantes y que son objeto de estudio hoy en día. Diferentes compuestos con potencial bioactivo han sido reportados, como resultado de diferentes cultivos con plumas de aves de corral, siendo el caso de bacterias del género *Bacillus* las cuales producen hidrolizados con alto poder antioxidante (Lemes et al. 2016), e incluso se reportó una cepa probiótica de este género, con la misma capacidad (Ferrareze et al. 2016). Es de resaltar que la queratina por ser una proteína rica en

aminoácidos como cisteína tiene gran potencial a la hora de emplear los hidrolizados en la búsqueda de componentes bioactivos con alto potencial antioxidante (Ohba et al. 2003).

Debido a la creciente investigación alrededor del aprovechamiento de residuos como las plumas, se ha encontrado que aparte de poder obtener hidrolizados con capacidad antioxidante, se pueden obtener diferentes compuestos con posible acción bioactiva como es el caso de enzimas como: la enzima convertidora de la angiotensina I e inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV, compuestos que son de gran importancia en la industria farmacéutica, ya que son utilizados en tratamientos de enfermedades como la hipertensión arterial y la diabetes tipo II, estas enzimas fueron encontradas en hidrolizados de plumas con *Chryseobacterium. sp. kr6*, que también posee una potente enzima queratinasa. En un estudio realizado por Ohba et al. 2003 con una cepa de *Bacillus subtilis*, donde se hidrolizaron dos matrices ricas en queratina las cuales fueron plumas de aves y una mezcla de cuernos y pesuñas, se encontró la presencia de enzima convertidora de la angiotensina I únicamente en los hidrolizados a partir de plumas de pollo, y explican los autores que esto puede ser debido a una mayor presencia de hidroxiprolina, ya que comparado con hidrolizados con matrices ricas en colágeno se pudo observar una presencia mayor de esta enzima.

Según estos hallazgos se puede pensar en la idea de biorrefinería (Lemes et al. 2016), usando tecnologías de bajo impacto ambiental lo que podría definirse como química amigable con el medio ambiente o “Green Chemistry” la cual se enfoca en la abolición del uso de sustancias nocivas para el medio ambiente (Cherubini 2010) en la cual el uso de sub-productos como las plumas, en la síntesis de diferentes compuestos, encaja muy bien con este concepto permitiendo no solo ser una alternativa amigable con el medio ambiente, sino también aportando productos con alto valor a partir de un material muy económico y con alta disponibilidad en todo el mundo por la alta demanda de aves de corral en la alimentación.

1.9 Conclusiones

El uso de diferentes desechos de la industria avícola, como las plumas de aves de corral es una tendencia en materia de investigación, debido a que es un material rico en proteína que junto con procesos de hidrolisis microbiana, se pueden obtener diversidad de sub-productos amigables con el medio ambiente bajando los costos de producción lo que crea una gran estrategia para mitigar el daño ambiental por el que pasa el planeta hoy en día, pudiendo brindar nuevas alternativas de ingredientes económicos y con alto valor biológico. La creciente investigación enfocada a microorganismos capaces de degradar este material ha llevado a pensar en procesos de biorrefinería, debido al hallazgo de diferentes enzimas con gran potencial comercial y de compuestos con potencial bioactivo muy importantes para la industria, que además resultan ser económicamente atractivos.

1.10 Referencias

- Agrahari, Sarita, and Neeraj Wadhwa
2010 Degradation of Chicken Feather a Poultry Waste Product by Keratinolytic Bacteria Isolated from Dumping Site at Ghazipur Poultry Processing Plant. *International Journal of Poultry Science* 9(5): 482–489.
- Awika, Joseph M., Lloyd W. Rooney, Xianli Wu, Ronald L. Prior, and Luis Cisneros-Zevallos
2003 Screening Methods To Measure Antioxidant Activity of Sorghum (*Sorghum Bicolor*) and Sorghum Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(23): 6657–6662.
- Bach, Evelise, Fabiana S. Cannavan, Fábio R. S. Duarte, et al.
2011 Characterization of Feather-Degrading Bacteria from Brazilian Soils. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65(1): 102–107.
- Bach, Evelise, Voltaire Sant’Anna, Daniel Joner Daroit, et al.
2012 Production, One-Step Purification, and Characterization of a Keratinolytic Protease from *Serratia Marcescens* P3. *Process Biochemistry* 47(12): 2455–2462.
- Bertsch, A., and N. Coello
2005 A Biotechnological Process for Treatment and Recycling Poultry Feathers as a Feed Ingredient. *Bioresource Technology* 96(15): 1703–1708.
- Błyskal, Barbara
2009 Fungi Utilizing Keratinous Substrates. *International Biodeterioration & Biodegradation* 63(6): 631–653.
- Brandelli, Adriano
2008 Bacterial Keratinases: Useful Enzymes for Bioprocessing Agroindustrial Wastes and Beyond. *Food and Bioprocess Technology* 1(2): 105–116.
- Brandelli, Adriano, Luisa Sala, and Susana Juliano Kalil
2015 Microbial Enzymes for Bioconversion of Poultry Waste into Added-Value Products. *Food Research International* 73(Supplement C). *Byproducts from Agri-Food Industry: New Strategies for Their Revalorization*: 3–12.
- Brand-Williams, W., M. E. Cuvelier, and C. Berset
1995 Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT - Food Science and Technology* 28(1): 25–30.
- Brereton, Richard G.
2007 *Applied Chemometrics for Scientists*. John Wiley & Sons.
- Brotzge, S. D., L. I. Chiba, C. K. Adhikari, et al.
2014 Complete Replacement of Soybean Meal in Pig Diets with Hydrolyzed Feather Meal with Blood by Amino Acid Supplementation Based on Standardized Ileal Amino Acid Digestibility. *Livestock Science* 163(Supplement C): 85–93.
- Callegaro, Kelly, Nicolay Welter, and Daniel Joner Daroit

2018 Feathers as Bioresource: Microbial Conversion into Bioactive Protein Hydrolysates. *Process Biochemistry*. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511318308213>, accessed October 26, 2018.

Cherubini, Francesco
2010 The Biorefinery Concept: Using Biomass Instead of Oil for Producing Energy and Chemicals. *Energy Conversion and Management* 51(7): 1412–1421.

Chukeatirote, Ekachai, Novi Arfarita, Piyanuch Niamsup, and Anittaya Kanghae
2015 Phenotypic and Genetic Characterization of *Bacillus* Species Exhibiting Strong Proteolytic Activity Isolated from Terasi, An Indonesian Fermented Seafood Product. *Journal of Northeast Agricultural University (English Edition)* 22(4): 15–22.

Corrêa, Ana Paula F., Daniel J. Daroit, and Adriano Brandelli
2010 Characterization of a Keratinase Produced by *Bacillus* Sp. P7 Isolated from an Amazonian Environment. *International Biodeterioration & Biodegradation* 64(1): 1–6.

Coward-Kelly, Guillermo, Vincent S. Chang, Frank K. Agbogbo, and Mark T. Holtzaple
2006 Lime Treatment of Keratinous Materials for the Generation of Highly Digestible Animal Feed: 1. Chicken Feathers. *Bioresource Technology* 97(11): 1337–1343.

Daroit, Daniel J., Ana Paula F. Corrêa, and Adriano Brandelli
2011 Production of Keratinolytic Proteases through Bioconversion of Feather Meal by the Amazonian Bacterium *Bacillus* Sp. P45. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65(1): 45–51.

Demir, Tuğçe, E. Esin Hameş, Suphi S. Öncel, and Fazilet Vardar-Sukan
2015 An Optimization Approach to Scale up Keratinase Production by *Streptomyces* Sp. 2M21 by Utilizing Chicken Feather. *International Biodeterioration & Biodegradation* 103(Supplement C): 134–140.

Fakhfakh, Nahed, Naourez Ktari, Anissa Haddar, et al.
2011 Total Solubilisation of the Chicken Feathers by Fermentation with a Keratinolytic Bacterium, *Bacillus Pumilus* A1, and the Production of Protein Hydrolysate with High Antioxidative Activity. *Process Biochemistry* 46(9): 1731–1737.

Ferreze, Patrícia Aline Gröhs, Ana Paula Folmer Correa, and Adriano Brandelli
2016 Purification and Characterization of a Keratinolytic Protease Produced by Probiotic *Bacillus Subtilis*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 7(Supplement C): 102–109.

Ferraro, Vincenza, Marc Anton, and Véronique Santé-Lhoutellier
2016 The “Sisters” α -Helices of Collagen, Elastin and Keratin Recovered from Animal by-Products: Functionality, Bioactivity and Trends of Application. *Trends in Food Science & Technology* 51(Supplement C): 65–75.

Fontoura, Roberta, Daniel J. Daroit, Ana P. F. Correa, et al.
2014 Production of Feather Hydrolysates with Antioxidant, Angiotensin-I Converting Enzyme- and Dipeptidyl Peptidase-IV-Inhibitory Activities. *New Biotechnology* 31(5): 506–513.

Fontoura, Roberta, Daniel J. Daroit, Ana Paula F. Corrêa, et al.

2018 Characterization of a Novel Antioxidant Peptide from Feather Keratin Hydrolysates. *New Biotechnology*. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871678418301547>, accessed November 2, 2018.

Gang, Guo, Chu Jie, Wang Jun-gao, He Qiu-xia, and Liu Ke-chun
2013 A Two-Step Biotechnological Process for Improving Nutrition Value of Feather Meal by *Bacillus Licheniformis* S6. *Journal of Northeast Agricultural University (English Edition)* 20(3): 71–77.

Gegeckas, Audrius, Renata Gudiukaitė, and Donaldas Citavicius
2014 Keratinolytic Proteinase from *Bacillus Thuringiensis* AD-12. *International Journal of Biological Macromolecules* 69(Supplement C): 46–51.

Govarthanan, Muthusamy, Thangasamy Selvankumar, Kandasamy Selvam, et al.
2015 Response Surface Methodology Based Optimization of Keratinase Production from Alkali-Treated Feather Waste and Horn Waste Using *Bacillus* Sp. MG-MASC-BT. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 27(Supplement C): 25–30.

Grazziotin, A., F. A. Pimentel, E. V. de Jong, and A. Brandelli
2006 Nutritional Improvement of Feather Protein by Treatment with Microbial Keratinase. *Animal Feed Science and Technology* 126(1): 135–144.

Gülçin, İlhami
2012 Antioxidant Activity of Food Constituents: An Overview. *Archives of Toxicology* 86(3): 345–391.

Jaouadi, Bassem, Badis Abdelmalek, Djamila Fodil, et al.
2010 Purification and Characterization of a Thermostable Keratinolytic Serine Alkaline Proteinase from *Streptomyces* Sp. Strain AB1 with High Stability in Organic Solvents. *Bioresource Technology* 101(21): 8361–8369.

Jeong, Jin-Ha, O-Mi Lee, Young-Dong Jeon, et al.
2010 Production of Keratinolytic Enzyme by a Newly Isolated Feather-Degrading *Stenotrophomonas Maltophilia* That Produces Plant Growth-Promoting Activity. *Process Biochemistry* 45(10): 1738–1745.

Khardenavis, Anshuman A., Atya Kapley, and Hemant J. Purohit
2009 Processing of Poultry Feathers by Alkaline Keratin Hydrolyzing Enzyme from *Serratia* Sp. HPC 1383. *Waste Management* 29(4): 1409–1415.

Korniłowicz-Kowalska, Teresa, and Justyna Bohacz
2011 Biodegradation of Keratin Waste: Theory and Practical Aspects. *Waste Management* 31(8): 1689–1701.

Lange, Lene, Yuhong Huang, and Peter Kamp Busk
2016 Microbial Decomposition of Keratin in Nature—a New Hypothesis of Industrial Relevance. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100(5): 2083–2096.

Lasekan, Adeseye, Fatimah Abu Bakar, and Dzulkiyfly Hashim
2013 Potential of Chicken By-Products as Sources of Useful Biological Resources. *Waste Management* 33(3). Special Thematic Issue: Urban Mining: 552–565.

- Lemes, Ailton Cesar, Gabriel Teixeira Álvares, Mariana Buranelo Egea, Adriano Brandelli, and Susana Juliano Kalil
2016 Simultaneous Production of Proteases and Antioxidant Compounds from Agro-Industrial by-Products. *Bioresource Technology* 222(Supplement C): 210–216.
- Lin, Xiang, Chung-Ginn Lee, Ellen S. Casale, and Jason C. H. Shih
1992 Purification and Characterization of a Keratinase from a Feather-Degrading *Bacillus Licheniformis* Strain. *Applied and Environmental Microbiology* 58(10): 3271–3275.
- Lo, Wei-Hsun, Jui-Rze Too, and Jane-Yii Wu
2012 Production of Keratinolytic Enzyme by an Indigenous Feather-Degrading Strain *Bacillus Cereus* Wu2. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 114(6): 640–647.
- Lowry, Rosebrough, Farr, and Randall
1951 Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent 193(1): 265–275.
- Martínez-Alvarez, Oscar, Susana Chamorro, and Agustín Brenes
2015 Protein Hydrolysates from Animal Processing By-Products as a Source of Bioactive Molecules with Interest in Animal Feeding: A Review. *Food Research International* 73(Supplement C). *Byproducts from Agri-Food Industry: New Strategies for Their Revalorization*: 204–212.
- Mazotto, Ana Maria, José Luis Ramírez Ascheri, Ronoel Luiz de Oliveira Godoy, et al.
2017 Production of Feather Protein Hydrolyzed by *B. Subtilis* AMR and Its Application in a Blend with Cornmeal by Extrusion. *LWT - Food Science and Technology* 84: 701–709.
- Mazotto, Ana Maria, Sonia Couri, Mônica C. T. Damaso, and Alane Beatriz Vermelho
2013 Degradation of Feather Waste by *Aspergillus Niger* Keratinases: Comparison of Submerged and Solid-State Fermentation. *International Biodeterioration & Biodegradation* 85(Supplement C): 189–195.
- Molyneux
1959 The Digestion of Wool by a Keratinolytic *Bacillus* 12: 274–281.
- Moore, S., and W. H. Stein
1954 A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *Journal of Biological Chemistry* 211: 907–913.
- Mukherjee, Ashis K., Sudhir K. Rai, and Naba K. Bordoloi
2011 Biodegradation of Waste Chicken-Feathers by an Alkaline β -Keratinase (Mukartinase) Purified from a Mutant *Brevibacillus* Sp. Strain AS-S10-II. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65(8): 1229–1237.
- Ohba, Riichiro, Tomoaki Deguchi, Minekazu Kishikawa, et al.
2003 Physiological Functions of Enzymatic Hydrolysates of Collagen or Keratin Contained in Livestock and Fish Waste. *Food Science and Technology Research* 9(1): 91–93.
- Okoroma, Emeka A., Hemda Garelick, Oduola O. Abiola, and Diane Purchase
2012 Identification and Characterisation of a *Bacillus Licheniformis* Strain with Profound

Keratinase Activity for Degradation of Melanised Feather. *International Biodeterioration & Biodegradation* 74(Supplement C): 54–60.

Oliveira, Cibele Freitas de, Ana Paula Folmer Corrêa, Douglas Coletto, et al. 2015 Soy Protein Hydrolysis with Microbial Protease to Improve Antioxidant and Functional Properties. *Journal of Food Science and Technology* 52(5): 2668–2678.

Onifade, A. A., N. A. Al-Sane, A. A. Al-Musallam, and S. Al-Zarban 1998 A Review: Potentials for Biotechnological Applications of Keratin-Degrading Microorganisms and Their Enzymes for Nutritional Improvement of Feathers and Other Keratins as Livestock Feed Resources. *Bioresource Technology* 66(1): 1–11.

Park, Geun-Tae, and Hong-Joo Son 2009 Keratinolytic Activity of *Bacillus Megaterium* F7-1, a Feather-Degrading Mesophilic Bacterium. *Microbiological Research* 164(4): 478–485.

Paul, Tanmay, Arijit Jana, Amit K. Mandal, et al. 2016 Bacterial Keratinolytic Protease, Imminent Starter for NextGen Leather and Detergent Industries. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* 3(Supplement C): 8–22.

Pillai, Priya, Sweta Mandge, and G. Archana 2011 Statistical Optimization of Production and Tannery Applications of a Keratinolytic Serine Protease from *Bacillus Subtilis* P13. *Process Biochemistry* 46(5): 1110–1117.

Pownall, Trisha L., Chibuike C. Udenigwe, and Rotimi E. Aluko 2010 Amino Acid Composition and Antioxidant Properties of Pea Seed (*Pisum Sativum* L.) Enzymatic Protein Hydrolysate Fractions. Research-article. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf904456r>, accessed November 2, 2018.

Rai, Sudhir K., Rocktotpal Konwarh, and Ashis K. Mukherjee 2009 Purification, Characterization and Biotechnological Application of an Alkaline β -Keratinase Produced by *Bacillus Subtilis* RM-01 in Solid-State Fermentation Using Chicken-Feather as Substrate. *Biochemical Engineering Journal* 45(3): 218–225.

Re, Roberta, Nicoletta Pellegrini, Anna Proteggente, et al. 1999 Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26(9): 1231–1237.

Reddy, Narendra 2015 Non-Food Industrial Applications of Poultry Feathers. *Waste Management* 45(Supplement C). Urban Mining: 91–107.

Reddy, Narendra, Lihong Chen, and Yiqi Yang 2013 Biothermoplastics from Hydrolyzed and Citric Acid Crosslinked Chicken Feathers. *Materials Science and Engineering: C* 33(3): 1203–1208.

Riffel, A., and A. Brandelli 2002 Isolation and Characterization of a Feather-Degrading Bacterium from the Poultry Processing Industry. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 29(5): 255–258.

Riffel, Alessandro, and Adriano Brandelli

- 2006 Keratinolytic Bacteria Isolated from Feather Waste. *Brazilian Journal of Microbiology* 37(3): 395–399.
- Riffel, Alessandro, Adriano Brandelli, Cláudia de M. Bellato, et al. 2007 Purification and Characterization of a Keratinolytic Metalloprotease from *Chryseobacterium* Sp. Kr6. *Journal of Biotechnology* 128(3): 693–703.
- Riffel, Alessandro, Françoise Lucas, Philipp Heeb, and Adriano Brandelli 2003 Characterization of a New Keratinolytic Bacterium That Completely Degrades Native Feather Keratin. *Archives of Microbiology* 179(4): 258–265.
- Rodríguez-Morgado, Bruno, Isidoro Gómez, Juan Parrado, et al. 2015 Accelerated Degradation of PAHs Using Edaphic Biostimulants Obtained from Sewage Sludge and Chicken Feathers. *Journal of Hazardous Materials* 300(Supplement C): 235–242.
- Sanghvi, Gaurav, Harshit Patel, Devendra Vaishnav, et al. 2016 A Novel Alkaline Keratinase from *Bacillus Subtilis* DP1 with Potential Utility in Cosmetic Formulation. *International Journal of Biological Macromolecules* 87(Supplement C): 256–262.
- Tesfaye, Tamrat, Bruce Sithole, Deresh Ramjugernath, and Viren Chunilall 2017 Valorisation of Chicken Feathers: Characterisation of Chemical Properties. *Waste Management* 68(Supplement C): 626–635.
- Thys R.C.S., Lucas F.S., Riffel A., Heeb P., and Brandelli A. 2004 Characterization of a Protease of a Feather-degrading Microbacterium Species. *Letters in Applied Microbiology* 39(2): 181–186.
- Tiwary, Ekta, and Rani Gupta 2012 Rapid Conversion of Chicken Feather to Feather Meal Using Dimeric Keratinase from *Bacillus Licheniformis* ER-15. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques* 2(4). <https://www.omicsonline.org/rapid-conversion-of-chicken-feather-to-feather-meal-using-dimeric-keratinase-from-bacillus-licheniformis-er-15-2155-9821.1000123.php?aid=6857>.
- Toldrá, Fidel, M. -Concepción Aristoy, Leticia Mora, and Milagro Reig 2012 Innovations in Value-Addition of Edible Meat by-Products. *Meat Science* 92(3). 58th International Congress of Meat Science and Technology (58th ICoMST): 290–296.
- Wan, Min-Yuan, Ge Dong, Bin-Qing Yang, and Hong Feng 2016 Identification and Characterization of a Novel Antioxidant Peptide from Feather Keratin Hydrolysate. *Biotechnology Letters* 38(4): 643–649.
- Wang, Bin, Wen Yang, Joanna McKittrick, and Marc André Meyers 2016 Keratin: Structure, Mechanical Properties, Occurrence in Biological Organisms, and Efforts at Bioinspiration. *Progress in Materials Science* 76(Supplement C): 229–318.
- Zaghloul, Taha I., Amira M. Embaby, and Ahmed R. Elmahdy 2011 Biodegradation of Chicken Feathers Waste Directed by *Bacillus Subtilis* Recombinant Cells: Scaling up in a Laboratory Scale Fermentor. *Bioresource Technology* 102(3): 2387–2393.
- Zaraï Jaouadi, Nadia, Hatem Rekik, Mouna Ben Elhouli, et al.

2015 A Novel Keratinase from *Bacillus Tequilensis* Strain Q7 with Promising Potential for the Leather Bating Process. *International Journal of Biological Macromolecules* 79(Supplement C): 952–964.

Zhang, Zhen, Li Xu, Wenshu Liu, et al.
2014 Effects of Partially Replacing Dietary Soybean Meal or Cottonseed Meal with Completely Hydrolyzed Feather Meal (Defatted Rice Bran as the Carrier) on Production, Cytokines, Adhesive Gut Bacteria, and Disease Resistance in Hybrid Tilapia (*Oreochromis Niloticus* ♀ × *Oreochromis Aureus* ♂). *Fish & Shellfish Immunology* 41(2): 517–525.

2. Potencial producción de hidrolizados de plumas con alta actividad antioxidante

Resumen

La búsqueda de microorganismos que tengan la habilidad de degradar sub-productos de la industria considerados de difícil tratamiento, como las plumas de pollo representa una alternativa amigable con el medio ambiente y dando valor agregado no solo con la bioconversión del sub-producto parcialmente aprovechado, sino también abriendo la posibilidad de nuevas aplicaciones y producción de diferentes compuestos con potencial bioactivo. Los microorganismos *Bacillus circulans* BL32, *Microbacterium. sp* KR10 y *Bacillus subtilis* FTCO2PRO2 cepa probiótica demostraron ser eficientes en la degradación de plumas de pollo. Se probó el potencial antioxidante de los hidrolizados de plumas de los tres microorganismos por el radical ABTS, radical DPPH, Poder Reductor de Hierro y Actividad Quelante de Hierro dando como resultado alta actividad antioxidante excepto la medida por el radical DPPH. El hidrolizado producido por *Bacillus subtilis* FTCO2PRO2 cepa probiótica fue parcialmente purificado en columna Sephadex® G-50 (Pharmacia Biotech, Sweden) y se identificaron dos péptidos SDIMNMTP y IVSLAPEVL mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem. Es la primera vez que se identifica hidrolizados de plumas con actividad antioxidante por parte de un microorganismo probiótico, lo que sigue abriendo la brecha a la búsqueda de más microorganismos queratinolíticos que puedan dar valor agregado a sub-productos de difícil degradación como las plumas de pollo, y con la producción de potenciales compuestos bioactivos.

Palabras claves: Queratina, Cepa probiótica, Biocompuestos, Hidrólisis

Abstrac:

Microorganisms that have the ability to degrade industry by-products considered difficult to treat, such as chicken feathers, represents an environmentally friendly alternative, giving added value not only by bioconverting the partially exploited by-product, but also could open the possibility of new applications and production of different compounds with bioactive potential. The microorganisms *Bacillus circulans* BL32, *Microbacterium* sp KR10 and *Bacillus subtilis* FTCO2PRO2 probiotic strain proved to be efficient in the degradation of chicken feathers. The antioxidant potential of the feather hydrolysates of the three microorganisms was tested by the radical ABTS, radical DPPH, Iron Reducing Power and Chelating Iron Activity resulting in high antioxidant activity except as measured by the radical DPPH. The hydrolysate produced by *Bacillus subtilis* FTCO2PRO2 probiotic strain was partially purified in Sephadex® G-50 column (Pharmacia Biotech, Sweden) and two peptides SDIMNMTP and IVSLAPEVL were identified by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. It is the first time that potential antioxidant compounds have been identified starting from feathers hydrolysates by a probiotic bacteria, which continues to open the way to the search for more keratinolytic microorganisms that can give added value to by-products of difficult degradation such as chicken feathers, and with the production of potential bioactive compounds.

Key words: Keratin, Probiotic strain, Biocompounds, Hydrolysis

2.1 Introducción

En la creciente búsqueda de nuevas soluciones para minimizar el impacto ambiental que produce la industria, el uso de subproductos representa una excelente alternativa, ya que reduce la producción de desechos al medio ambiente y es posible obtener ingredientes de muy bajo coste económico, pero con gran potencial (Reddy 2015). Las plumas son un material de gran disponibilidad, debido al alto consumo de aves de corral en todo el mundo (Wang et al., 2016), es un subproducto de bajo costo, empleado en múltiples sectores de la industria como la farmacéutica, cosmética, alimentaria, textil etc., además de ser utilizado en la producción de biofertilizantes, en la ingeniería de tejidos, y hasta en aplicaciones

eléctricas y electrónicas, como una alternativa amigable con el medio ambiente, sustituyendo materiales para crear productos biodegradables (Reddy, 2015).

Las plumas son uno de los subproductos más económicos y abundantes en el mundo, representan al menos el 10% del peso del ave y está compuesta por casi el 90% de queratina (Reddy, 2015). La queratina es una escleroproteína especializada que tiene como función la protección mecánica, producida en las células epiteliales de los vertebrados superiores, incluidos los seres humanos (Lange et al., 2016). Hace parte de los seis tipos de filamentos que forman el citoesqueleto y se encuentra en mayor cantidad en la epidermis, cabello, cuernos, pezuñas, cuernos, picos, plumas y escamas (Wang et al., 2016). La queratina es una proteína resistente a factores ambientales (físicos o químicos), a proteínas proteolíticas como la pepsina y la tripsina por el alto contenido de cisteína, haciéndola resistente a la lisis enzimática, además de ser insoluble en agua, solventes orgánicos, ácidos y bases débiles (Wang et al., 2016; Lange et al., 2016). Según la cantidad de enlaces disulfuro que pueda tener la queratina, se puede separar en dos grandes grupos que son: queratina suave y queratina dura. La queratina suave posee un contenido de cisteína del 2% lo cual la hace poco resistente al daño químico, esta se puede encontrar en la epidermis y en el cabello. La queratina dura o β -queratina posee un 22% de cisteína con una estructura diversificada, que le confiere una alta resistencia al daño químico, esta se puede encontrar en el cabello, uñas, pezuñas, piel, picos, plumas, entre otras estructuras (Korniłłowicz-Kowalska and Bohacz, 2011).

Diferentes avances en biotecnología han permitido que desechos como las plumas, sean aprovechados dando valor agregado, ya que se ha demostrado que la hidrólisis de plumas con cepas bacterianas no solo mejora la calidad de la proteína obtenida en materia de balance de aminoácidos y digestibilidad, sino también, se han hallado diferentes compuestos bioactivos presentes en los hidrolizados de plumas con propiedades antioxidantes y compuestos usados en la industria farmacéutica como antihipertensivos y antidiabéticos (Fontoura et al., 2014; Lemes et al., 2016). Diferentes cepas del género *Bacillus* han sido objeto de estudio, ya que son las más usadas para la comercialización de enzimas proteolíticas, además que representan la mayor fuente de enzimas queratinolíticas para procesos queratinolíticos usando plumas de aves de corral (Brandelli et al., 2015; Lemes et

al., 2016). Sin embargo esta no es la única ventaja de usar este género en procesos industriales, ya que se ha reportado recientemente que una cepa probiótica de *Bacillus subtilis* es capaz de solubilizar hasta el 92% de plumas enteras sin ningún pretratamiento y al ser de naturaleza probiótica, podría ser usada para obtener hidrolizados de plumas para alimentación animal (Ferrareze et al., 2016).

En este sentido el concepto de biorrefinería podría aplicarse muy bien en procesos de hidrólisis de plumas, usando diferentes cepas bacterianas, obteniendo productos interesantes para la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética etc. (Brandelli et al., 2015; Lemes et al. 2016), sin necesidad de realizar tratamientos previos (Fakhfakh et al. 2011; Ferrareze et al., 2016), ya que estos microorganismos y sus enzimas son bastante eficientes contribuyendo a procesos amigables con el medio ambiente. El objetivo de este trabajo fue utilizar tres microorganismos y comprobar su efectividad de hidrólisis sobre plumas de aves para la producción de proteínas, aminoácidos y compuestos antioxidantes.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Microorganismos y preparación del Inóculo y el cultivo

Porcentaje de degradación

Las plumas de pollo fueron proveídas por una planta de sacrificio en la Universidade Federal do Rio Grande do Sul en Porto Alegre, Brasil. Las plumas fueron lavadas con agua de grifo y secadas a 40°C toda la noche y se almacenaron a temperatura de congelación hasta su uso.

Cepas Bacterianas

Se usaron tres microorganismos bacterianos en este estudio, *Bacillus circulans* (BL32), *Microbacterium sp* (KR10) y *Bacillus subtilis* cepa probiótica (FTCO2PRO2). Los microorganismos fueron activados en caldo BHI a 37°C por 48 horas y luego en agar BHI a 37°C por 24 horas más.

Preparación del inóculo y cultivo

Se realizó un inóculo de cada microorganismo suspendiendo unidades formadoras de colonia (UFC) a partir de placas de agar BHI después de 24 h de incubación en solución salina hasta obtener una DO: 0.3 ± 0.05 a 700 nm (10^8 UFC/ml). Se inoculó 10 mL/L en medio mineral con plumas enteras de pollo como única fuente de carbono y nitrógeno (0.5 g/l NaCl, 0.3 g/l K_2HPO_4 , 0.5 g/l KH_2PO_4 , 10 g/l plumas) y se incubó a 37°C y 125 RPM en sheaker por 72 horas tomando alícuotas a las 24, 48 y 72 horas de cultivo. Se realizó conteo en placa a las 72 horas de muestreo para evaluar el crecimiento de la biomasa a lo largo del cultivo. Las alícuotas fueron centrifugadas a 10.000 rpm por 5 min a 4°C y se filtraron con Syringe Filtrir Ministart® y se almacenaron a -18°C hasta su análisis.

Porcentaje de degradación

El porcentaje de degradación $PD = (F_f/F_i) \times 100$, donde F_f es el peso de las plumas sin degradar después de 72 horas de cultivo, lavadas y secadas a 40°C hasta peso constante y F_i es el peso de las plumas a las 0 horas de cultivo. Se realizó observación macroscópica de las plumas secas después de 72h de cultivo para evaluar la degradación de la barba y el raquis.

2.2.2 Métodos analíticos

Para la determinación de proteína soluble, aminoácidos libres y la actividad antioxidante, se usaron las alícuotas centrifugadas y filtradas de los cultivos de BL32, KR10 y FTCO2PRO2 a las 24, 48, y 72 horas a temperatura ambiente.

Determinación de proteína soluble y aminoácidos libres

La determinación de proteína se realizó usando el reactivo de Folin (Lowry et al. 1951), con curva de calibración ($R^2 = 0.99$) usando bovine serum albumin BSA como patrón. La determinación de aminoácidos libres se realizó mediante la técnica de la ninhidrina (Moore y Stein 1954). Las muestras se leyeron en espectrofotómetro a 440 nm usando etanol como blanco. Los resultados se compararon con curva de calibración ($R^2 = 0.99$) usando leucina como patrón.

2.2.3 Actividad antioxidante

Radical ABTS•+ (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)

Capacidad antioxidante por ABTS se realizó según el método propuesto por Re et al., (1999) se tomó 10 µL de muestra con 1 mL de radical ABTS ajustado con etanol, y se leyeron en espectrofotómetro a 750 nm a los 6 minutos de reacción usando etanol como blanco, se comparó el resultado con curva de calibración (R^2 0.99) usando Trolox como patrón. Los resultados se expresaron en Meq de trolox/ ml de muestra.

Poder reductor de hierro

Se realizó tomando 2,5 mL de muestra con 2,5 mL de ferricianuro de potasio $K_4Fe(CN)_6$ al 1% se incubó a 50°C por 20 min, luego se adicionó 2,5 mL de ácido tricloroacético TCA 10% mezclándolo en vortex por un minuto y se centrifugó a 3000 g por 10 minutos. El sobrenadante (1 mL) se mezcló con 2,5 mL de agua destilada y 0,2 mL de cloruro férrico al 0.1%. La absorbancia fue medida a 700 nm usando agua destilada como blanco y BHT como control. Una alta absorbancia indica alto poder reductor (Oliveira et al. 2015).

Actividad quelante de hierro

La actividad quelante de hierro Fe^{2+} fue medida usando el método de Oliveira et al., (2015), mezclando 1 mL de muestra en 3.7 mL de agua destilada con 0.1 mL de 2 Mm $FeSO_4$ (Fe^{2+}), y 0.2 mL de 5 Mm (3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phenyl-sulfonic acid)-1,2,4-triazine). La absorbancia se leyó a 562 nm después de 10 minutos de incubación. Los resultados fueron expresados como porcentaje de actividad quelante (AQ) $AQ\% = [1 - (A/A_0)] \times 100$, donde A es la absorbancia de la muestra y A_0 es la absorbancia del control.

Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo)

Se determinó según Brand-Williams et al., 1995 Tomando 1950 µl de radical DPPH (0,06 µM diluido en metanol) con 500 µl de muestra, se incubó por 45 min a temperatura ambiente en oscuridad y luego se tomó la lectura de la actividad en espectrofotómetro a 515 nm usando

metanol como blanco. Los resultados se compraron con curva de calibración ($R^2 = 0.99$) usando radical DPPH diluido en metanol como patrón.

2.2.4 Identificación de péptidos

Fraccionamiento de proteínas en columna

El fraccionamiento de proteínas se llevó a cabo utilizando 100 mg de cultivo después de 72 h, filtrado y liofilizado en 1 ml de tampón Tris HCL (0.05 M pH 7.0) en columna Sephadex® G-50 (Pharmacia Biotech, Sweden) (20.2 x 1.1 cm) previamente equilibrada con tampón Tris HCL (0.05 M pH 7.0). La tasa de fluido se mantuvo a 1.5 mL por minuto, donde se recolectaron 30 fracciones de 1 mL, se realizó porcentaje de actividad antioxidante por ABTS de cada fracción y se hizo un pool con las fracciones activas.

Determinación de péptidos por cromatografía líquida y análisis de espectrometría de masas en tándem

Se tomaron 200 μ m del pool de las fracciones activas resultado de la separación en columna y se inyectó directamente al sistema Agilent 1200 HPLC- chip interfaz MS, con una columna de enriquecimiento C18, de 160 nl y 75 μ m 150 mm de columna analítica (Referencia Agilent: G4240-62010). La fase móvil A fue 0,1% de ácido fórmico (AF) en agua, y B fue 90% acetonitrilo (ACN) en agua y 0,1% ácido fórmico. El gradiente de flujo con el Agilent Serie 1200 Series Nanoflow LC fue según se indica: línea de base, 3% B; 0-30 min, 3-50% B; 30-32 min, 50-95% B; 32-37 min, 95% B; 37-38 min, 95-3% B; 38-47 min, una tasa de flujo de 0,3 μ l/min. La detección de masas se realizó con un Agilent 6520 LC/MS Q-TOF de masa precisa operando en modo de iones positivos. Los espectros se adquirieron en el modo MS/MS, y el 6520 Q-TOF se operó en el Modo de Rango Dinámico extendido con un escáner MS de 110-3000 m/z y un rango de exploración de MS/MS de 50-3000 m/z. El Agilent ESI Q-TOF se utilizó para la adquisición de datos y procesamiento. El software usado fue Agilent Spectrum Mill MS Proteomics Workbench, para realizar una búsqueda en la base de datos utilizando SwissProt.MAR.2013.fasta.

2.3 Resultados y discusión

2.3.1 Degradación de las plumas de pollo

Los microorganismos *Bacillus circulans* (BL32), *Microbacterium sp* (KR10) y *Bacillus subtilis* cepa probiótica (FTCO2PRO2) fueron cultivados adecuadamente en medio mineral con plumas por 72 h a 37°C en agitador rotatorio hasta obtener alta producción de biomasa (Tabla 2.1). Se pudo observar que las tres cepas bacterianas usaron las plumas de pollo como única fuente de carbono, nitrógeno, azufre y energía para su crecimiento pudiendo degradar más del 95% de las plumas (BL32 el 98,801 %, KR10 el 96,708 %, FTCO2PRO2 el 96,154 %). La degradación de plumas en este estudio fue más alta que lo reportado por Ferrareze et al., (2016) con *Bacillus subtilis* FTCO2PRO1 cepa probiótica. La degradación de plumas puede ser vista en la Figura 1, donde se muestran las plumas antes del cultivo (Figura 1A) y plumas sumamente degradadas sin dejar la estructura inicial (Figura 2.1C, 2.1D, 2.1E). Según las imágenes se puede observar que las cepas son capaces solubilizar las barbas de las plumas y parte del raquis.

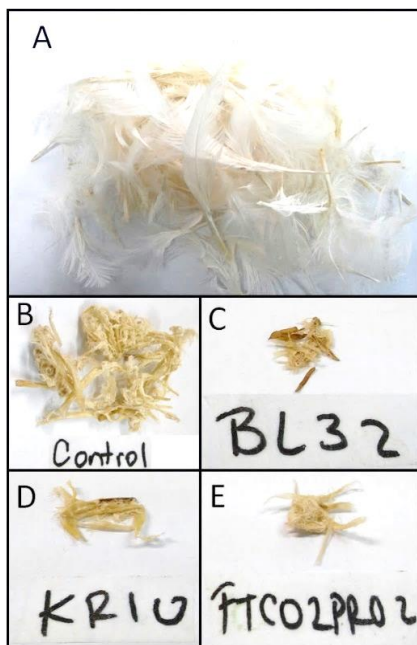


Figura 2-1: Plumas antes de la hidrólisis (A) y después de la hidrólisis con bacterias. BL32 (C), KR10 (D), FTCO2PRO2 (E), y el cultivo control sin inoculación de microorganismos (B)

Tabla 2-1: Biomasa del inóculo y biomasa del cultivo a las 72 horas en medio mineral con plumas

| CEPA | INÓCULO | CULTIVO A LAS 72 HORAS |
|-------------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| <i>Bacillus circulans</i> BL23 | 4 × 10 ⁴ UFC/ml | 6 × 10 ⁸ UFC/ml |
| <i>Microbacterium sp</i> KR10 | 6 × 10 ⁴ UFC/ml | 3 × 10 ⁸ UFC/ml |
| <i>Bacillus subtilis</i> FTCO2PRO2* | 3 × 10 ⁴ UFC/ml | 2 × 10 ⁸ UFC/ml |

*Cepa probiótica

La liberación de proteína soluble fue monitoreada a las 24, 48 y 72 horas de cultivo (Tabla 2.2), ésta aumento durante el tiempo de estudio comparado con el control (medio mineral con plumas de pollo sin ningún inóculo).

La desintegración de las plumas está fuertemente relacionada con el incremento de proteína soluble en el medio de cultivo de las tres cepas estudiadas, así como la cantidad de aminoácidos libres liberados (Tabla 2.2).

Tabla 2-2: Proteína soluble liberada (mg/ml) a las 24, 48 y 72 horas de cultivo.

| Horas | Proteína soluble (mg/ml) | | | |
|-------|-----------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| | Control | <i>Bacillus circulans</i> BL32 | <i>Microbacterium sp</i> KR10 | <i>Bacillus subtilis</i> * |
| 0 | 0,010 ± 0.00 ^{A a} | 0,010 ± 0.00 ^{A c} | 0,010 ± 0.00 ^{A c} | 0,010 ± 0.00 ^{A c} |
| 24 | 0,005 ± 0.00 ^{D d} | 0,012 ± 0.00 ^{A c} | 0,011 ± 0.00 ^{B c} | 0,007 ± 0.00 ^{C d} |
| 48 | 0,006 ± 0.00 ^{D c} | 0,031 ± 0.00 ^{C b} | 0,052 ± 0.00 ^{A b} | 0,047 ± 0.00 ^{B b} |
| 72 | 0,009 ± 0.00 ^{D b} | 0,038 ± 0.00 ^{C a} | 0,062 ± 0.00 ^{B a} | 0,099 ± 0.00 ^{A a} |

- Los valores que tienen letras mayúsculas en común en la misma línea no tienen diferencias significativas entre las cepas bacterianas.
 - Los valores que tienen en común letras minúsculas en la misma columna no tienen diferencias significativas entre las horas de estudio.

*Cepa probiótica

La liberación de la proteína comenzó después de las 24 horas de cultivo y transcurridas 48 horas es posible observar una alta concentración de proteína comparado con el control. A las 72 horas la concentración de proteína aumentó significativamente (p<0.05). El hidrolizado con *Bacillus subtilis* cepa probiótica FTCO2PRO2 tuvo la concentración más alta de proteína comparado con los hidrolizados de *Microbacterium sp* KR10 y *Bacillus circulans* BL32 a las 72 horas de cultivo (Figura 2.2). La liberación de aminoácidos libres también fue medida a las 24, 48 y 72 horas de cultivo. La concentración de aminoácidos libres fue incrementando en el tiempo de estudio comparado con el control (Figura 2.3), las

cepas fueron capaces de producir altas concentraciones de aminoácidos libres, y no se encontraron diferencias significativas entre las cepas ($p>0.05$) (Tabla 2.3). Estos valores fueron muy cercanos a los reportado por Zaghloul et al., (2011), donde usaron hidrolizados de plumas con una cepa recombinante de *Bacillus subtilis*.

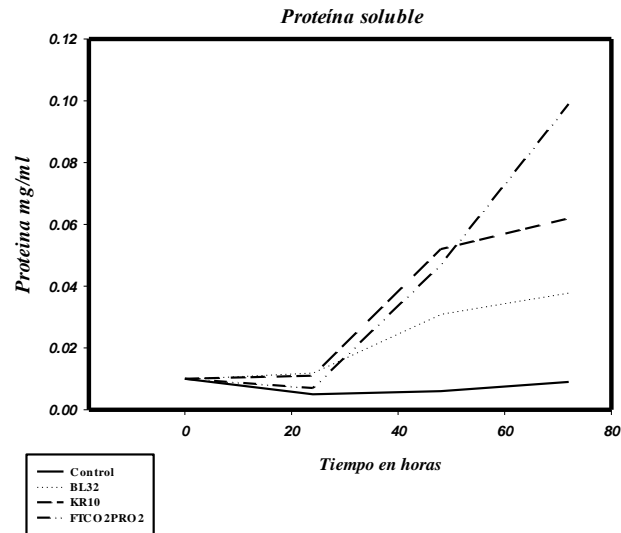


Figura 2-2. Proteína soluble liberada (mg/ml) a las 24, 48 y 72 horas de cultivo

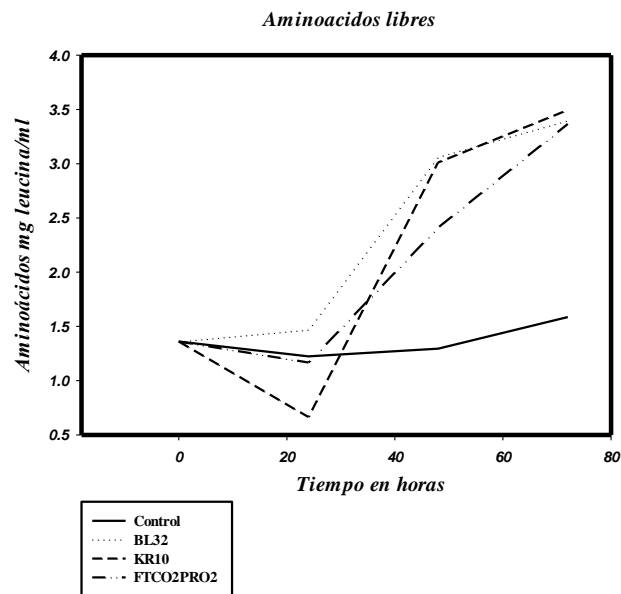


Figura 2-3: Aminoácidos Libres (mg leucina/mL) a las 24, 48 y 72 horas de cultivo

Tabla 2-3: Aminoácidos Libres (mg leucina/mL) a las 24, 48 y 72 horas de cultivo

| Horas | Aminoácidos libres (mg leucina/ml) | | | |
|-------|------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|---|
| | Control | <i>Bacillus circulans</i> BL32 | <i>Microbacterium sp</i> KR10 | <i>Bacillus subtilis</i> * FTCO2PRO2 |
| 0 | 1,360 ± 0,02 ^{A a} | 1,360 ± 0,02 ^{A c} | 1,360 ± 0,02 ^{A b} | 1,360 ± 0,02 ^{A c} |
| 24 | 1,224 ± 0,03 ^{B a} | 1,469 ± 0,06 ^{A c} | 0,663 ± 0,05 ^{C c} | 1,166 ± 0,00 ^{B c} |
| 48 | 1,295 ± 0,07 ^{B a} | 3,063 ± 0,18 ^{A b} | 3,012 ± 0,27 ^{A a} | 2,412 ± 0,30 ^{A b} |
| 72 | 1,586 ± 0,48 ^{B a} | 3,399 ± 0,11 ^{A a} | 3,496 ± 0,06 ^{A a} | 3,367 ± 0,17 ^{A a} |

- Los valores que tienen letras mayúsculas en común en la misma línea no tienen diferencias significativas entre las cepas bacterianas.

- Los valores que tienen en común letras minúsculas en la misma columna no tienen diferencias significativas entre las horas de estudio.

*Cepa probiótica

2.3.2 Actividad antioxidante

Para identificar la actividad antioxidante, se evaluaron los métodos ABTS, DPPH, poder reductor de hierro (RIP) las cuales involucran reacciones de transferencia de electrones o transferencia de átomos de hidrogeno (Gülçin 2012), y la actividad quelante de hierro (CIA). Se encontró que los hidrolizados de plumas de los tres microorganismos utilizados presentaron actividad antioxidante, excluyendo la actividad con el radical DPPH, la cual no presentó ninguna actividad antioxidante significativa, lo que pudo ser debido al pH inicial del medio de cultivo (pH 7.0), que pudo afectar la actividad del radical DPPH en los hidrolizados de plumas, coincidiendo con resultados obtenidos por Fontoura et al. (2014).

Los ensayos de actividad antioxidante ABTS, actividad quelante de hierro (CIA) y poder reductor de hierro (RIP) fueron evaluados durante el tiempo de cultivo a las 24, 48 y 72 horas. Los valores de la capacidad antioxidante medida por ABTS se muestran en la Tabla 2.4, donde se puede observar que la actividad antioxidante de los hidrolizados de *Bacillus circulans* (BL32) y *Microbacterium sp* (KR10) comienza incluso antes de las 24 horas de cultivo. Por otro lado, la actividad antioxidante de *Bacillus subtilis* cepa probiótica FTCO2PRO2 comenzó justo después de 24 horas de cultivo. Sin embargo, a las 72 horas de cultivo (Figura 2.4), BL32 y FTCO2PRO2 muestran la mayor actividad antioxidante sin diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ellos. Estos resultados sugieren que los hidrolizados de plumas generados por *Bacillus circulans* BL32, *Microbacterium sp* KR10 y *Bacillus subtilis* cepa probiótica FTCO2PRO2 podrían tener péptidos antioxidantes hidrófilos, debido a la facilidad del radical ABTS para ser solubilizados en solventes acuosos y

orgánicos coincidiendo con Awika et al., (2003) y Lemes et al., (2016). Los resultados de la actividad antioxidante ABTS obtenidos en este estudio para los hidrolizados de plumas para los tres microorganismos utilizados, son superiores a los hidrolizados producidos por *Bacillus sp.* P45 en el estudio de Lemes et al. (2016). Esta es la primera vez que se evalúa la actividad antioxidante en los hidrolizados de plumas por bacterias queratinolíticas probióticas. La cepa FTCO2PRO2 de *Bacillus subtilis* mostró la mayor actividad antioxidante mediada por el radical ABTS a las 72 horas de cultivo en comparación con los hidrolizados de *Bacillus circulans* BL32 y *Microbacterium sp* KR10.

Tabla 2-4: Actividad antioxidante radical ABTS (meqTrolox/mL) monitorizada a las 24, 48 y 72 horas de cultivo

| Actividad Antioxidante Radical ABTS | | | | |
|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|---|
| Horas | Control | <i>Bacillus circulans</i> BL32 | <i>Microbacterium sp</i> KR10 | <i>Bacillus subtilis</i> * FTCO2PRO2 |
| 0 | 230,5 ± 3,54 ^{Aa} | 230,5 ± 3,54 ^{Ad} | 230,5 ± 3,54 ^{Ac} | 230,5 ± 3,54 ^{Ab} |
| 24 | 248,0 ± 14,14 ^{Ca} | 600,5 ± 95,46 ^{Bc} | 887,5 ± 108,19 ^{Ab} | 248,0 ± 7,07 ^{Cb} |
| 48 | 238,0 ± 35,36 ^{Ca} | 1278,0 ± 42,43 ^{Bb} | 2203,0 ± 77,78 ^{Aa} | 2203,0 ± 233,35 ^{Aa} |
| 72 | 260,5 ± 17,68 ^{Aa} | 650,5 ± 229,81 ^{Ba} | 2273,0 ± 0,00 ^{Aa} | 2380,5 ± 3,54 ^{Aa} |

- Los valores que tienen letras mayúsculas en común en la misma línea no tienen diferencias significativas entre las cepas bacterianas.

- Los valores que tienen en común letras minúsculas en la misma columna no tienen diferencias significativas entre las horas de estudio.

*Cepa probiótica

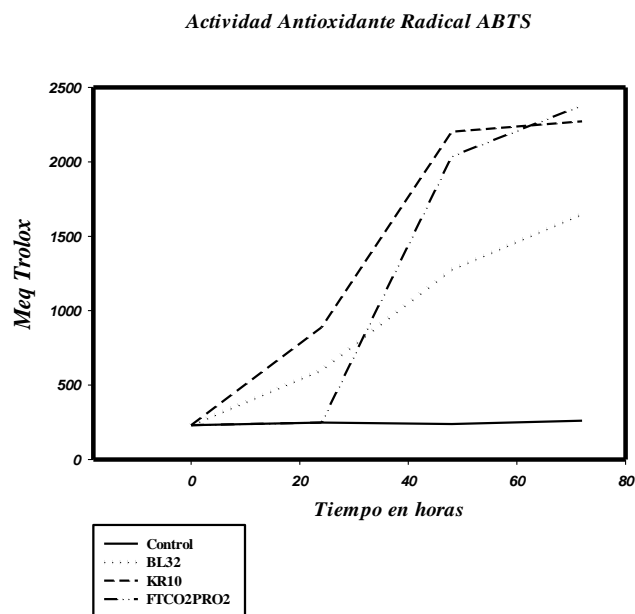


Figura 2-4: Actividad antioxidante radical ABTS (miliequivalentes de Trolox/mL) monitorizada a las 24, 48 y 72 horas de cultivo

Se cree que existe una correlación entre la actividad antioxidante y el poder reductor de hierro en diferentes compuestos bioactivos, igualmente demostrado por Fakhfakh et al., (2011). Este ensayo se utilizó para valorar la aptitud de los péptidos presentes en los hidrolizados para reducir el Fe³⁺ a Fe²⁺ y puede medirse por la formación de azul de la Prusia de Perl a 700 nm (Fakhfakh et al. 2011). Antes de las 24 horas de cultivo se pudo observar actividad reductora, principalmente en los hidrolizados con *Bacillus circulans* BL32, pero al final del cultivo (72 horas) tuvo la menor actividad frente al hidrolizado de *Microbacterium sp* KR10, la cual fue capaz de producir compuestos con alta actividad reductora de hierro, así como *Bacillus subtilis* cepa probiótica FTCO2PRO2 a las 48 horas de cultivo. A las 72 horas, el hidrolizado de este microorganismo no presenta diferencias significativas (p>0.05) con los hidrolizados con *Microbacterium sp* KR10 y *Bacillus circulans* BL32 (Tabla 2.5 y Figura 2.5).

Tabla 2-5: Poder Reductor de Hierro expresado en Absorbancia a 700 nm, A las 24, 48 y 72 horas de cultivo

| Poder Reductor de Hierro (ABS 700nm) | | | | |
|---|--|---|--|--|
| Hours | Control | <i>Bacillus circulans</i> BL32 | <i>Microbacterium sp</i> KR10 | <i>Bacillus subtilis</i>* FTCO2PRO2 |
| 0 | 0,129 ± 0,01 ^{A a} | 0,129 ± 0,01 ^{A d} | 0,129 ± 0,01 ^{A d} | 0,129 ± 0,01 ^{A d} |
| 24 | 0,130 ± 0,01 ^{C a} | 0,652 ± 0,06 ^{A c} | 0,486 ± 0,03 ^{B c} | 0,363 ± 0,02 ^{B c} |
| 48 | 0,136 ± 0,00 ^{D a} | 0,881 ± 0,00 ^{C b} | 0,934 ± 0,01 ^{A b} | 0,906 ± 0,00 ^{B b} |
| 72 | 0,121 ± 0,00 ^{C a} | 1,227 ± 0,00 ^{B a} | 1,402 ± 0,06 ^{A a} | 1,281 ± 0,04 ^{A, B a} |
| - | Los valores que tienen letras mayúsculas en común en la misma línea no tienen diferencias significativas entre las cepas bacterianas | | | |
| - | Los valores que tienen en común letras minúsculas en la misma columna no tienen diferencias significativas entre las horas de estudio. | | | |
| *Cepa probiótica | | | | |

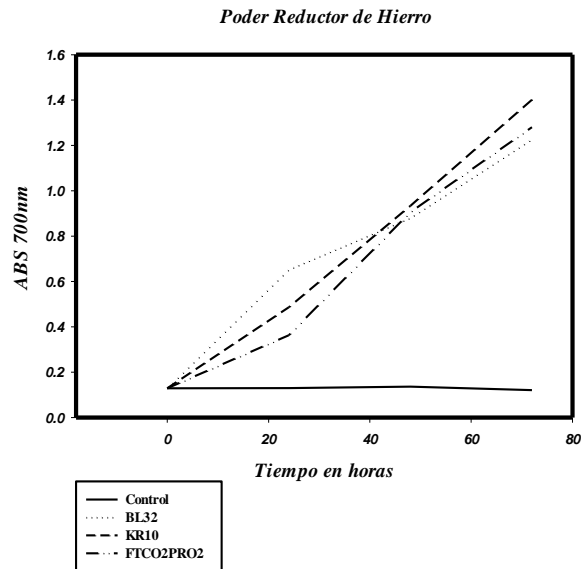


Figura 2-5: Poder Reductor de Hierro expresado en Absorbancia a 700 nm, A las 24, 48 y 72 horas de cultivo

El poder reductor de hierro probablemente podría ser llevado a cabo por aminoácidos hidrofóbicos con potencial actividad antioxidante (Pownall et al., 2010; Fontoura et al. 2014). La actividad quelante de hierro se presenta en la Figura 2.6, donde *Bacillus circulans* BL32 y *Microbacterium sp* KR10 presentaron una alta actividad frente a *Bacillus subtilis* probiótica FTCO2PRO2 a las 24 horas. A las 48 horas de cultivo esta bacteria aumentó la producción y a las 72 horas los tres microorganismos no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre ellas (Tabla 2.6). Los valores para poder reductor de hierro para los tres microorganismos en el presente estudio fueron bastante similares a los hidrolizados producidos por *Bacillus pumilus* A1 reportados por Fakhfakh et al. (2011), y siguen la tendencia del péptido SNLCRPCG por *Bacillus subtilis* S1-4 (Wan et al. 2016). Los valores para actividad quelante de hierro alcanzados por los hidrolizados de los tres microorganismos utilizados también siguen la tendencia del péptido SNLCRPCG obtenida a partir de *Bacillus subtilis* S1-4 (Wan et al. 2016).

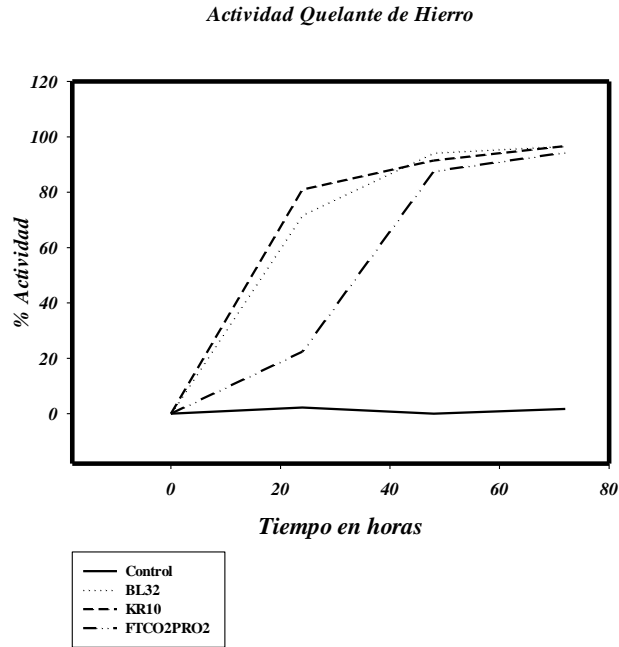


Figura 2-6: Actividad Quelante de Hierro expresada en % de Actividad, a las 24, 48 y 72 horas de cultivo

Tabla 2-6: Actividad Quelante de Hierro expresada % de Actividad, a las 24, 48 y 72 horas de cultivo

| Actividad Quelante de Hierro (% Activity) | | | | |
|--|-----------------------------|---|--|--|
| Hours | Control | <i>Bacillus circulans</i> BL32 | <i>Microbacterium sp</i> KR10 | <i>Bacillus subtilis</i>* FTCO2PRO2 |
| 0 | 0,000 ± 0,00 ^{A a} | 0,000 ± 0,00 ^{A c} | 0,000 ± 0,00 ^{A d} | 0,000 ± 0,00 ^{A d} |
| 24 | 2,249 ± 0,00 ^{D a} | 71,780 ± 0,87 ^{B b} | 80,982 ± 0,58 ^{A c} | 22,393 ± 2,17 ^{C c} |
| 48 | 0,000 ± 1,74 ^{C a} | 94,275 ± 1,45 ^{A a} | 91,514 ± 1,01 ^{A, B b} | 87,628 ± 1,88 ^{B b} |
| 72 | 1,738 ± 2,60 ^{B a} | 96,729 ± 0,29 ^{A a} | 96,729 ± 0,29 ^{A a} | 94,377 ± 0,43 ^{A a} |

- Los valores que tienen letras mayúsculas en común en la misma línea no tienen diferencias significativas entre las cepas bacterianas.

- Los valores que tienen en común letras minúsculas en la misma columna no tienen diferencias significativas entre las horas de estudio.

*Cepa probiótica

En este estudio se puede concluir que la producción de proteínas y los aminoácidos libres liberados están altamente relacionados con la actividad antioxidante de los hidrolizados de plumas, por lo que se hace evidente que a partir de las 24 horas ya existen péptidos antioxidantes en los hidrolizados de *Bacillus circulans* BL32 y *Microbacterium sp* KR10 Figuras 2.4, 2.5 y 2.6. La cepa probiótica *Bacillus subtilis* FTCO2PRO2 presenta hidrolizados con alta capacidad antioxidante justo después de 24 horas de cultivo, lo cual puede correlacionarse con las Figuras 2.2 y 2.3, donde este microorganismo sólo empieza a producir proteínas solubles y aminoácidos libres después de 24 horas de cultivo y *Bacillus*

circulans BL32 y *Microbacterium sp* KR10 son capaces de liberar proteínas solubles y aminoácidos libres incluso antes de 24 horas de cultivo. Los valores obtenidos en este estudio son más altos que los presentados en otros estudios, donde se evaluaron ensayos de ABTS, actividad quelante de hierro y poder reductor de hierro a partir de hidrolizados bacterianos realizados con cepas de *Bacillus sp* como CL18, CL33A, CL14 (Callegaro et al.2018).

Para tener una visión global de los datos obtenidos se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) que es una herramienta que busca reducir la dimensionalidad de la información, soportando la mayor cantidad de información posible, la cual es determinada por la varianza obtenida. En definitiva, toda la información podrá ser estudiada mediante el análisis de dos gráficos, en los que se puede establecer la relación que existe entre las muestras, entre las variables y las muestras con respecto a las variables (Brereton 2007). Además, se realizó un Análisis de Conglomerados (Análisis Cluster). Esta técnica multivariante permite agrupar las variables situándolas en grupos homogéneos, pero haciendo la mayor diferencia entre los grupos.

La Figura 2.7 representa la relación existente entre las variables estudiadas, se puede ver la interacción entre la proteína soluble liberada (SPR) y los aminoácidos libres liberados (FAR) y la relación entre la capacidad antioxidante probada, donde puede ser posible confirmar que la actividad antioxidante por el radical DPPH no tuvo influencia en los hidrolizados de las tres cepas estudiadas. En las Figuras 2.9, 2.10 y 2.11 y las tablas 2.7, 2.8 y 2.9 se pueden apreciar las relaciones que existen entre las variables medidas para cada cepa. Para la cepa *Bacillus circulans* BL32, en la Figura 2.9 se puede ver que podría existir una correlación directa entre los aminoácidos libres liberados y la actividad quelante de hierro con un ranquin total de 0.997 (Tabla 7), así como también entre la proteína soluble liberada al medio con la actividad antioxidante medida por el radical ABTS (ranquin total 0.996 Tabla 7), de lo cual se puede concluir que parte de la capacidad antioxidante donadora de electrones o átomos de hidrogeno, podría ser mediada por los péptidos liberados por *Bacillus circulans* BL32 en los hidrolizados de plumas, mientras que la quelación de metales prooxidantes estaría mediada por los aminoácidos libres en los hidrolizados de plumas obtenidos por la cepa de *Bacillus circulans* BL32. De la Figura 9 también se puede concluir que el poder

reductor de hierro en los hidrolizados de BL32 podría no estar relacionado ni con la proteína soluble en el medio, ni con los aminoácidos libres y que es un factor independiente que podría estar mediado por otro tipo de compuestos liberados en la hidrólisis de las plumas.

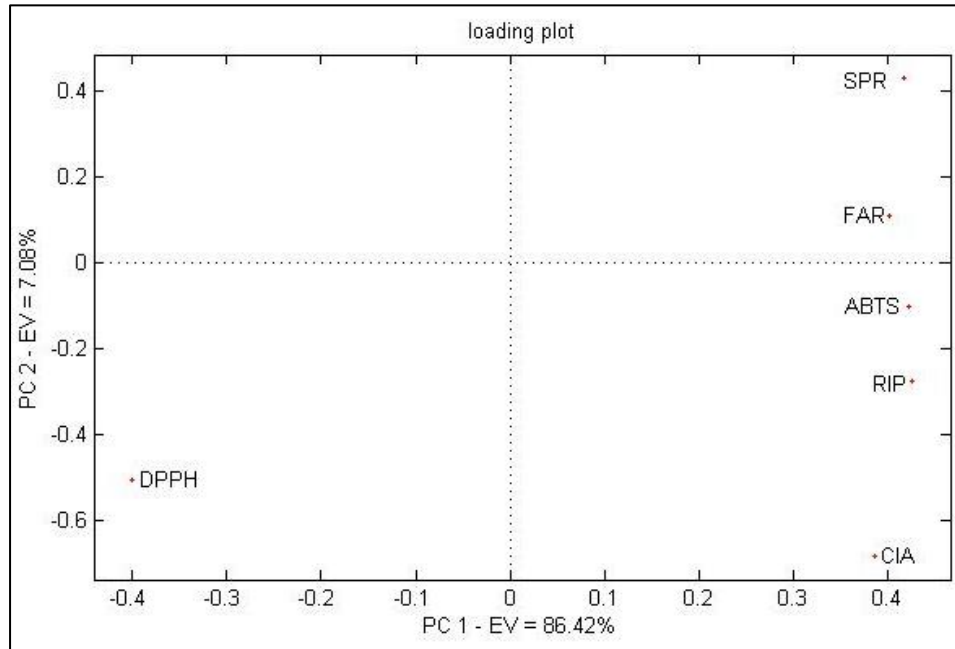


Figura 2-7: PCA loading plot, relación entre las variables a través del tiempo de estudio de los hidrolizados de plumas por los tres microorganismos

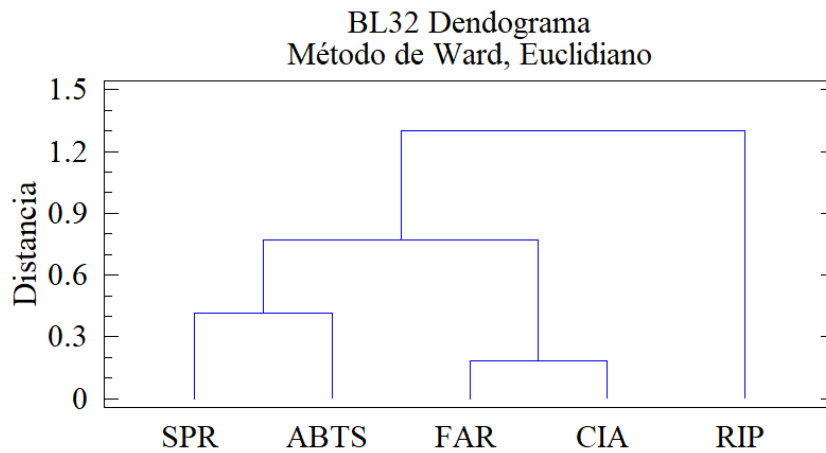


Figura 2-8: Dendrograma relación entre variables medidas del hidrolizado de plumas por la cepa *Bacillus circulans* BL32

Tabla 2-7: Correlaciones de las variables estudiadas en los hidrolizados de plumas de *Bacillus circulans* BL32, según el ranquin total.

| Ranquin BL32 | |
|---------------------|----------------------|
| Correlación | Ranquin Total |
| CIA - FAR | 0.997 |
| SPR - ABTS | 0.996 |
| SPR - FAR | 0.995 |
| CIA - SPR | 0.985 |
| FAR - ABTS | 0.981 |
| CIA - ABTS | 0.964 |

Para *Microbacterium sp* KR10 en la Figura 2.9 se puede observar que existe una fuerte correlación entre la proteína soluble liberada y los aminoácidos libres en el medio, con un ranquin total de 1.00 (Tabla 2.8), y además se puede observar que existe una correlación entre el poder reductor de hierro y la actividad quelante de hierro. Aunque en la Tabla 8 se muestra que podría existir una correlación incluso más fuerte entre el poder quelante de hierro y la proteína soluble (ranquin total 0,986) y los aminoácidos libres (ranquin total 0,985), que entre la actividad antioxidante medida por el radical ABTS y la proteína soluble (ranquin total 0,978) y aminoácidos libres en el medio (ranquin total 0,979), El dendograma (Figura 2.9) expresa que existe una correlación más fuerte entre la actividad antioxidante medida por el radical ABTS con la proteína soluble y los aminoácidos liberados en el medio, que la relación entre el poder reductor de hierro, el poder quelante de hierro, la proteína soluble y los aminoácidos libres, debido a que la distancia presentada en la gráfica es mayor. El análisis de clusters es una técnica multivariada que recopila la información y toma en cuenta cada parámetro, pero relacionándolos entre formando grupos o correlaciones, mientras que el ranquin total es una técnica univariante que solo tiene en cuenta los dos parámetros comparados, es por eso que, se puede concluir que para el microorganismo *Microbacterium. sp* KR10 existe una correlación entre la actividad antioxidante medida por el radical ABTS, que puede ser mediada por la donación de electrones o la donación de átomos (Gülçin 2012), y la producción de aminoácidos libres y proteína soluble en la hidrólisis de plumas, y que el poder reductor de hierro y la actividad quelante de hierro son factores independientes en los cuales podrían estar involucrados otro tipo de compuestos liberados por el microorganismo.

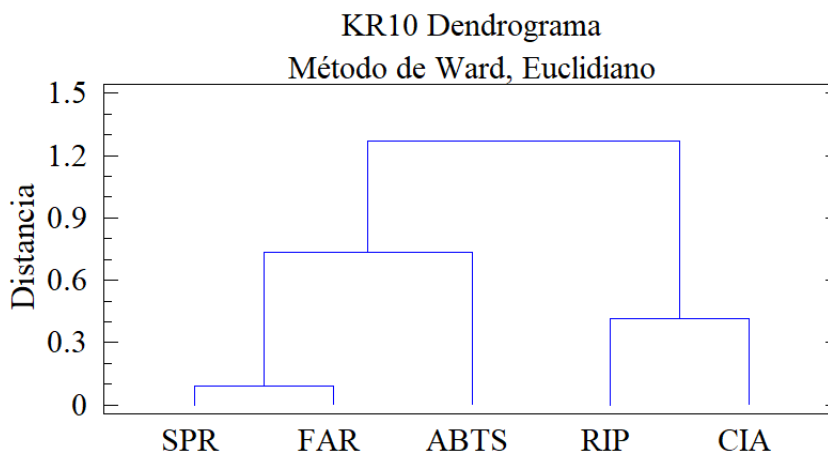


Figura 2-9: Dendrograma, relación entre las variables medidas del hidrolizado de plumas por la cepa *Microbacterium sp KR10*

Tabla 2-8: Correlaciones de las variables estudiadas en los hidrolizados de plumas de *Microbacterium. sp KR10*, según el ranquin total

| Ranquin KR10 | |
|---------------------|----------------------|
| Correlación | Ranquin Total |
| FAR - SPR | 1.000 |
| CIA - SPR | 0.986 |
| CIA - FAR | 0.985 |
| ABTS - FAR | 0.979 |
| CIA - RIP | 0.979 |
| ABTS - SPR | 0.978 |

En la Figura 2.10, donde se expresan las correlaciones de las variables medidas de los hidrolizados de plumas de la cepa probiótica de *Bacillus subtilis* FTO2PRO2, se puede inferir que la actividad antioxidante mediada por la reducción de hierro podría estar relacionada principalmente con los aminoácidos libres liberados en el medio durante la hidrólisis (ranquin total: 1.00 Tabla 2.9) y en segundo lugar con la proteína soluble (ranquin total: 0.985). También se puede deducir que la actividad quelante de hierro y la actividad antioxidante medida por el radical ABTS con un ranquin total de 0.998, podrían ser factores que están fuertemente relacionados entre sí, pero que no están relacionados con la producción de aminoácidos libres ni con la proteína soluble liberada en el medio, de lo cual se puede inferir que en la hidrólisis de plumas por este microorganismo se podrían estar liberando otros compuestos responsables de esta actividad.

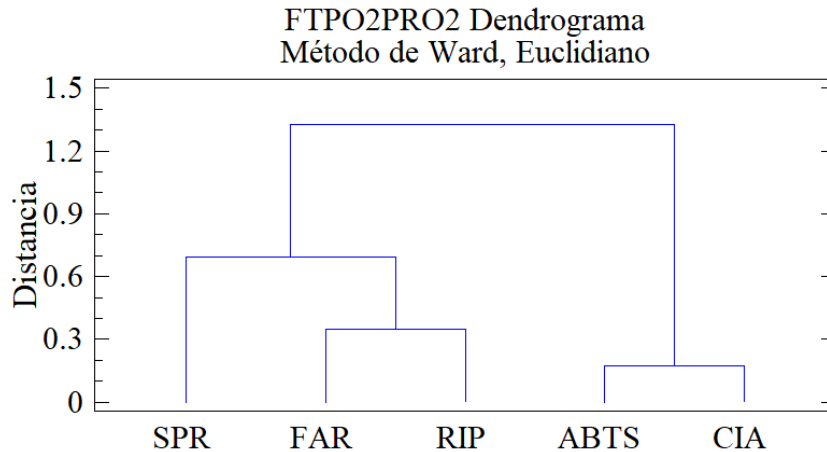


Figura 2-10: Dendrograma, relación entre variables medidas del hidrolizado de plumas por la cepa probiótica de *Bacillus subtilis* FTCO2PRO2

Tabla 2-9: Correlaciones de las variables estudiadas en los hidrolizados de plumas de *Bacillus subtilis* FTCO2PRO2 cepa probiótica, según el ranquin total

| Ranquin FTCO2PRO2 | |
|--------------------------|----------------------|
| Correlación | Ranquin Total |
| RIP - FAR | 1.000 |
| CIA - ABTS | 0.998 |
| FAR - SPR | 0.989 |
| RIP - SPR | 0.985 |
| RIP - ABTS | 0.964 |
| ABTS - FAR | 0.956 |

Por otro lado, en la Figura 2.11 se puede observar el comportamiento de las cepas a lo largo del tiempo de cultivo, donde a las 24 horas *Bacillus subtilis* FTCO2PRO2 no tiene diferencias significativas ($p > 0.05$) frente al cultivo control, mientras que BL32 y KR10 a las 24 h y 72 h se solaparon, por lo que se puede concluir que *Bacillus circulans* BL32 y *Microbacterium sp* KR10 presentaron un comportamiento bastante similar. Por otro lado, aunque *Bacillus subtilis* FTCO2PRO2 se solapaba a las 48 h con *Bacillus subtilis* BL23 y *Microbacterium sp* KR10, existe un cambio en el metabolismo justo después de 24 horas. De otra parte a las 72 horas aumenta el rendimiento de todos los parámetros probados, por lo que se puede concluir que *Bacillus subtilis* probiótica FTCO2PRO2 podría tener una fase de adaptación más larga que *Bacillus circulans* BL32 y *Microbacterium sp* KR10, pero a

pesar de este hecho, la cepa probiótica *Bacillus subtilis* FTCO2PRO2 tiene una gran eficiencia que probablemente podría ser capaz de seguir hidrolizando plumas de pollo incluso después de 72 horas, por lo que podría ser posible obtener una mayor degradación de las plumas y, por lo tanto, más péptidos y aminoácidos con una alta actividad antioxidante.

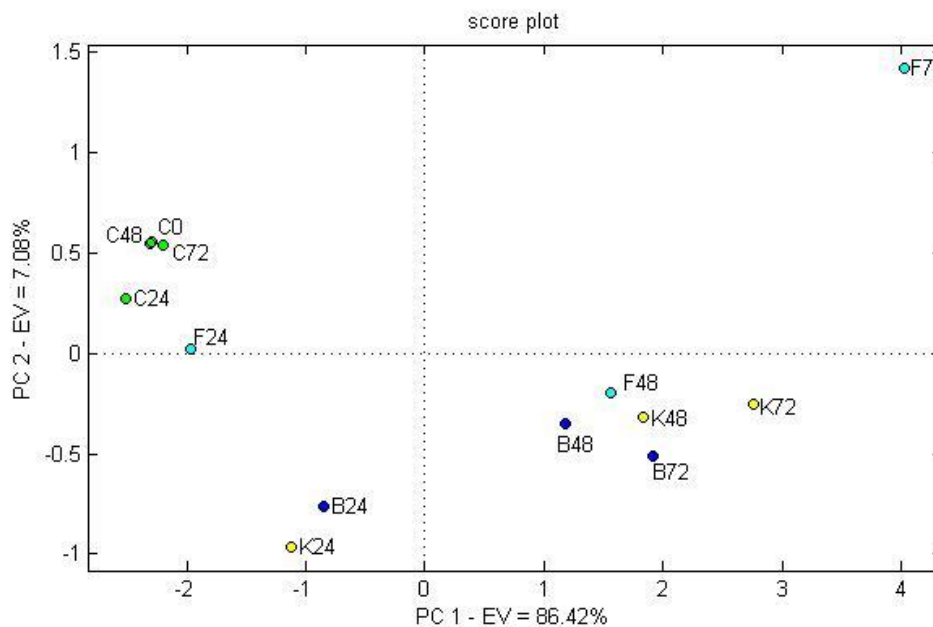


Figura 2-11: PCA Score Plot, comparación del comportamiento de las cepas a las 24, 48 y 72 horas de cultivo. C: Control; B: *Bacillus circulans* BL32; K: *Microbacterium. sp* KR10; F: *Bacillus subtilis* FTCO2PRO2 cepa probiótica

Para evaluar el mejor rendimiento de los microorganismos en este estudio, se realizó un estudio de utilidad y conveniencia, donde el microorganismo que se muestra más útil y conveniente en la producción de hidrolizados de plumas con actividad antioxidante es *Bacillus subtilis* FTCO2PRO2 cepa probiótica, a las 72 horas de cultivo (Figura 2.12), seguida de *Microbacterium. sp* KR10 a las 72 horas de cultivo, lo cual se puede inferir que este microorganismo también podría tener un gran potencial en la hidrólisis de plumas de pollo, sin embargo para efectos de este estudio, se decidió investigar el o los péptidos involucrados en la capacidad antioxidante examinada en el hidrolizado de plumas por el microorganismo *Bacillus subtilis* FTCO2PRO2 cepa probiótica, debido a que por los resultados obtenidos, se considera como un microorganismo prometedor tanto por la habilidad de su queratinasa para hidrolizar un sustrato difícil como las plumas de pollo,

como por su naturaleza probiótica la cual puede ser una gran ventaja para su uso en diferentes procesos de obtención de compuestos bioactivos, alimentación animal, etc.

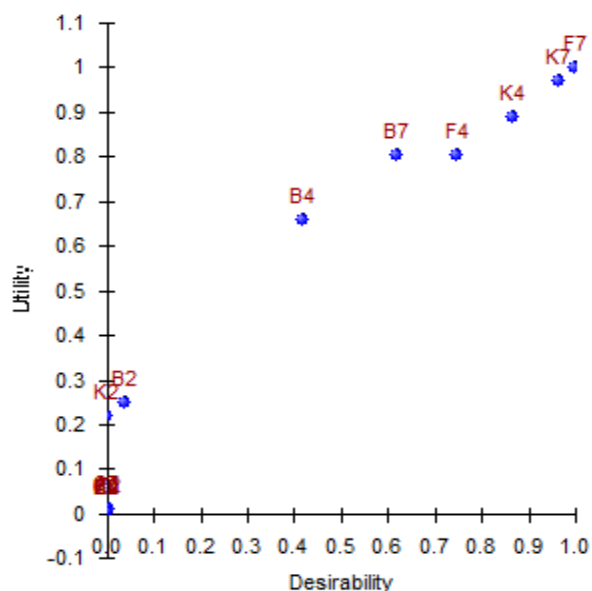


Figura 2-12: Grafico de utilidad y conveniencia en los hidrolizados de plumas por los microorganismos B: *Bacillus circulans* BL32, K: *Microbacterium. sp* KR10, y F: *Bacillus subtilis* FTCO2PRO2 cepa probiótica

2.3.3 Identificación de péptidos potencialmente antioxidantes de *Bacillus subtilis* FTCO2PRO2 cepa probiótica

Con el análisis de cromatografía líquida y análisis de espectrometría de masas en tándem se pudo identificar dos péptidos los cuales podrían tener actividad antioxidante. Estos péptidos fueron identificados por un pico al minuto 23.9, el cual se confirmó con la verificación de la absorbancia la cual fue de 215 nm. La secuencia y cuantificación de la masa de los péptidos identificados del hidrolizado parcialmente purificado se muestran en la Tabla 2.10.

Tabla 2-10: Secuencias de los péptidos identificados del hidrolizado de plumas por el microorganismo *Bacillus subtilis* FTCO2PRO2 cepa probiótica

| Péptido | Secuencia | Masa Calculada (Da) | Masa Medida (Da) |
|----------------|------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| P1 | SDIMNMTP | 939,3678 | 939,5658 |
| P2 | IVSLAPEVL | 939,5641 | 939,5658 |

La identificación de las cadenas peptídicas arrojó las posibles configuraciones de aminoácidos, donde se muestra que en la configuración del péptido uno P1 SDIMNMTP, las metioninas podrían encontrarse de forma oxidada. Debido a la naturaleza de los aminoácidos que componen la cadena de los péptidos aislados, concuerda con los estudios realizados por (Pownall et al., 2010; Fontoura et al. 2014) en el cual atribuyen el poder reductor de hierro de los péptidos a los aminoácidos de característica apolar contribuyendo a la protección de moléculas sensibles a la oxidación (Fontoura et al., 2018). Sin embargo, debido a que la identificación de los péptidos se llevó a cabo mediante algoritmos, no se puede afirmar que esta sea la configuración real de los péptidos, debido a diversos factores implicados en el proceso de hidrolisis, siendo uno de los más importantes la consideración de la o las enzimas implicadas en la ruptura de los péptidos que no fueron identificadas en este estudio y que se propondría como objeto de estudio en próximos estudios con este microorganismo.

Si bien en la composición de la queratina se pueden encontrar una fuerte presencia de aminoácidos como Pro, Leu, Ile, Val, además de aminoácidos con estructuras aromáticas (Fontoura et al. 2018), los cuales se encuentran presentes en los péptidos identificados producto de la hidrolisis de plumas de pollo por el microorganismo *Bacillus subtilis* FTCO2PRO2 cepa probiótica, no corresponden a alguna secuencia presente en la queratina de plumas, y se podría decir que pueden ser producto de otro tipo de mecanismo o un metabolito sintetizado por el microorganismo en el proceso de hidrólisis.

Debido a la búsqueda de compuestos bioactivos producto de hidrolizados de proteínas, las plumas de pollo tienen un gran potencial de exploración ya que, es un sustrato de fácil acceso, económico y de fácil manejo, además el aprovechamiento de microorganismos que

puedan degradarlas eficazmente podría mejorar los procesos de degradación dando valor agregado.

2.4 Conclusiones

La bioconversión de sustratos complicados de degradar como las plumas de pollo, con bacterias queratinolíticas, dan valor agregado a este sub-producto, lo cual podría tener gran potencial en la identificación de componentes potencialmente bioactivos, como los compuestos antioxidantes que actúan como moléculas estabilizadoras donando electrones, átomos de hidrogeno, reduciendo compuestos y quelando metales con potencial oxidante, que son de gran importancia en la industria. El surgimiento de nuevos microorganismos con actividad queratinolítica capaces de degradar parcial o completamente las plumas es un tema que merece ser estudiado a fondo debido a la complejidad de los mecanismos utilizados en los cuales se pueden obtener productos diversificados pudiéndose acoplar a las diferentes necesidades de la industria y abre el panorama de nuevos métodos y compuestos que podrían ser identificados, siendo muy importante el hallazgo de microorganismos probióticos como *Bacillus subtilis* FTCO2PRO2, involucrados en los procesos de hidrolisis de los cuales además de tener el valor agregado de ser benéficos para la salud se le suma la posible capacidad de entrar en procesos de bioconversión para obtener componentes con potencial bioactivo teniendo excelentes resultados en materia de degradación de las plumas obteniendo así compuestos con potencial antioxidante

2.5 Referencias

Awika, Joseph M., Lloyd W. Rooney, Xianli Wu, Ronald L. Prior, and Luis Cisneros-Zevallos
2003 Screening Methods To Measure Antioxidant Activity of Sorghum (*Sorghum Bicolor*) and Sorghum Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(23): 6657–6662.

Brandelli, Adriano, Luisa Sala, and Susana Juliano Kalil
2015 Microbial Enzymes for Bioconversion of Poultry Waste into Added-Value Products. *Food Research International* 73(Supplement C). *Byproducts from Agri-Food Industry: New Strategies for Their Revalorization*: 3–12.

Brand-Williams, W., M. E. Cuvelier, and C. Berset
1995 Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT - Food Science and Technology* 28(1): 25–30.

Brereton, Richard G.
2007 *Applied Chemometrics for Scientists*. John Wiley & Sons.

Callegaro, Kelly, Nicolay Welter, and Daniel Joner Daroit
2018 Feathers as Bioresource: Microbial Conversion into Bioactive Protein Hydrolysates. *Process Biochemistry*. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511318308213>, accessed October 26, 2018.

Fakhfakh, Nahed, Naourez Ktari, Anissa Haddar, et al.
2011 Total Solubilisation of the Chicken Feathers by Fermentation with a Keratinolytic Bacterium, *Bacillus Pumilus* A1, and the Production of Protein Hydrolysate with High Antioxidative Activity. *Process Biochemistry* 46(9): 1731–1737.

Ferrareze, Patrícia Aline Gröhs, Ana Paula Folmer Correa, and Adriano Brandelli
2016 Purification and Characterization of a Keratinolytic Protease Produced by Probiotic *Bacillus Subtilis*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 7(Supplement C): 102–109.

Fontoura, Roberta, Daniel J. Daroit, Ana P. F. Correa, et al.
2014 Production of Feather Hydrolysates with Antioxidant, Angiotensin-I Converting Enzyme- and Dipeptidyl Peptidase-IV-Inhibitory Activities. *New Biotechnology* 31(5): 506–513.

Fontoura, Roberta, Daniel J. Daroit, Ana Paula F. Corrêa, et al.
2018 Characterization of a Novel Antioxidant Peptide from Feather Keratin Hydrolysates. *New Biotechnology*. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871678418301547>, accessed November 2, 2018.

Gülçin, İlhami
2012 Antioxidant Activity of Food Constituents: An Overview. *Archives of Toxicology* 86(3): 345–391.

Korniłłowicz-Kowalska, Teresa, and Justyna Bohacz
2011 Biodegradation of Keratin Waste: Theory and Practical Aspects. *Waste Management* 31(8): 1689–1701.

- Lange, Lene, Yuhong Huang, and Peter Kamp Busk
2016 Microbial Decomposition of Keratin in Nature—a New Hypothesis of Industrial Relevance. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100(5): 2083–2096.
- Lemes, Ailton Cesar, Gabriel Teixeira Álvares, Mariana Buranelo Egea, Adriano Brandelli, and Susana Juliano Kalil
2016 Simultaneous Production of Proteases and Antioxidant Compounds from Agro-Industrial by-Products. *Bioresource Technology* 222(Supplement C): 210–216.
- Lowry, Rosebrough, Farr, and Randall
1951 Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent 193(1): 265–275.
- Moore, S., and W. H. Stein
1954 A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *Journal of Biological Chemistry* 211: 907–913.
- Oliveira, Cibele Freitas de, Ana Paula Folmer Corrêa, Douglas Coletto, et al.
2015 Soy Protein Hydrolysis with Microbial Protease to Improve Antioxidant and Functional Properties. *Journal of Food Science and Technology* 52(5): 2668–2678.
- Pownall, Trisha L., Chibuike C. Udenigwe, and Rotimi E. Aluko
2010 Amino Acid Composition and Antioxidant Properties of Pea Seed (*Pisum Sativum* L.) Enzymatic Protein Hydrolysate Fractions. Research-article. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf904456r>, accessed November 2, 2018.
- Re, Roberta, Nicoletta Pellegrini, Anna Proteggente, et al.
1999 Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26(9): 1231–1237.
- Reddy, Narendra
2015 Non-Food Industrial Applications of Poultry Feathers. *Waste Management* 45(Supplement C). *Urban Mining*: 91–107.
- Wan, Min-Yuan, Ge Dong, Bin-Qing Yang, and Hong Feng
2016 Identification and Characterization of a Novel Antioxidant Peptide from Feather Keratin Hydrolysate. *Biotechnology Letters* 38(4): 643–649.
- Wang, Bin, Wen Yang, Joanna McKittrick, and Marc André Meyers
2016 Keratin: Structure, Mechanical Properties, Occurrence in Biological Organisms, and Efforts at Bioinspiration. *Progress in Materials Science* 76(Supplement C): 229–318.
- Zaghloul, Taha I., Amira M. Embaby, and Ahmed R. Elmahdy
2011 Biodegradation of Chicken Feathers Waste Directed by *Bacillus Subtilis* Recombinant Cells: Scaling up in a Laboratory Scale Fermentor. *Bioresource Technology* 102(3): 2387–2393.

3. Conclusiones y recomendaciones

Diferentes estudios concuerdan con que la hidrólisis de plumas de pollo con microorganismos es una buena alternativa para el aprovechamiento de este sub-producto, que podría causar problemas ambientales debido a su difícil degradación. La búsqueda de nuevos microorganismos capaces de degradar este sustrato podría abrir una nueva brecha en la obtención de proteína asimilable para alimentación animal, la industria cosmética etc. Además de eso se ha demostrado que producto de la hidrólisis de plumas con microorganismos podría resultar en la producción de diferentes compuestos bioactivos muy importantes en la industria a partir de una matriz muy económica debido al alto consumo de aves de corral en el mundo. El concepto de biorrefinería no es ajeno a la hidrólisis de plumas con microorganismos, ya que en diferentes estudios han logrado escalar los procesos para obtener diferentes productos a partir de las plumas, y así como existe gran variedad de microorganismos queratinolíticos, podría ser posible obtener productos diversificados que se adapten a las necesidades de las industrias y las tendencias actuales.

En cuanto a los microorganismos tratados en este estudio se puede decir que el uso de microorganismos probióticos en la hidrólisis de plumas tiene un gran potencial en la producción de alimentos para animales ya que podría contribuir nutricionalmente no solo con hidrolizados ricos en proteína sino también con diferentes compuestos benéficos para la salud y el desarrollo. También se destaca el rendimiento de la cepa de *Microbacterium. sp* KR10, la cual podría tener un gran potencial en procesos hidrolíticos y en obtención de compuestos potencialmente bioactivos lo cual amerita continuar con estudios con este microorganismo.