

“Búsqueda e identificación de microorganismos con actividad queratinolítica”

A UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



TESIS

“BÚSQUEDA E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS
CON ACTIVIDAD QUERATINOLÍTICA”

POR

JORGE ALEJANDRO SILLER JUÁREZ

Presentada como requisito para obtener el título de:
INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Junio 2012

*“Búsqueda e identificación de microorganismos con actividad
queratinolítica”*

“Búsqueda e identificación de microorganismos con actividad queratinolítica”

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Búsqueda e identificación de microorganismos con actividad queratinolítica

Presentado por:

Jorge Alejandro Siller Juárez

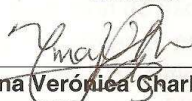
TESIS

Que se Somete a Consideración del H. Jurado Examinador Como Requisito
Parcial Para Obtener el Título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

El presente trabajo ha sido dirigido por el siguiente comité:

Director


Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez


Co-Director

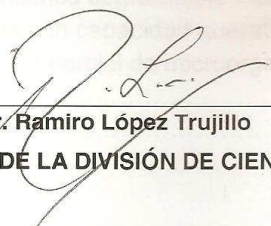

MC. María Lilitana Flores López

Asesor Externo


Dra. María de Lourdes Virginia Díaz
Jiménez

Asesor Interno


Dra. Dolores Gabriela Martínez
Vázquez


Dr. Ramiro López Trujillo

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

Buenavista, Saltillo, Coahuila

Mayo, 2012



ÍNDICE GENERAL

I.	RESUMEN.....	1
II.	ABSTRACT.....	3
1.	INTRODUCCIÓN.....	5
1.1.	Antecedentes.....	5
1.2.	Justificación.....	6
1.3.	Hipótesis.....	7
1.4.	Objetivo general.....	7
1.5.	Objetivos específicos.....	7
2.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	8
2.1.	Residuos agroindustriales.....	8
2.2.	Plumas de ave.....	9
2.2.1.	Composición de plumas de ave.....	10
2.3.	Alternativas de aprovechamiento de desecho.....	12
2.4.	Uso potencial de plumas de ave.....	14
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.1.	Caracterización fisicoquímica de plumas de ave.....	16
3.2.	Aislamiento de microorganismos degradadores de queratina.....	19
3.3.	Selección de microorganismos degradadores de queratina.....	20
3.3.1.	Pruebas para selección de microorganismos con capacidad queratinolítica.....	21
3.4.	Purificación e identificación parcial de microorganismos degradadores de queratina.....	22
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
4.1.	Caracterización fisicoquímica de plumas de ave.....	25
4.2.	Aislamiento de microorganismos degradadores de queratina.....	27
4.3.	Selección de microorganismos degradadores de queratina.....	31
4.3.1.	Selección de cepas con capacidad queratinolítica.....	33
4.4.	Purificación e identificación parcial de microorganismos degradadores de queratina.....	34
5.	CONCLUSIONES.....	42
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

ÍNDICE DE CUADROS

1. Perfil de aminoácidos de la harina de pluma fermentada (HPF) y de la harina de pluma comercial (HPC).....	11
2. Caracterización fisicoquímica de las pluma de ave utilizadas.....	26
3. Morfología y descripción macroscópica de las cepas encontradas en el aislamiento microbiológico.....	27
4. Selección de cepas por tamaño de halo de crecimiento.....	32
5. Descripción morfológica colonial y celular de las cepas seleccionadas para purificación.....	35
6. Resultados de la identificación de las cepas seleccionadas.....	39

ÍNDICE DE GRÁFICOS Y FIGURAS

1. Sustrato no convencional: residuos de la industria alimentaria.....	9
2. Sustrato no convencional: guishe, residuo del tallado del <i>Agave lecheguillaa</i> Torrey.....	9
3. Diversas aplicaciones de aminoácidos en la industria: a) champú enriquecido con aminoácidos, b) películas biodegradables a base de aminoácidos, c) fertilizante con aminoácidos.....	12
4. a) Fermentador piloto para escalamiento de procesos biotecnológicos, b) fermentación en medio sólido en charolas.....	13
5. Plumitas de ave molidas, lavadas y esterilizadas, condiciones necesarias para su utilización como sustrato.....	25
6. Halo de crecimiento de las diferentes cepas aisladas en APA.....	32
7. Medio de cultivo líquido al cabo de 48 h, cepas: 14, 19, 16, 20, 27 y 28....	33
8. Prueba cualitativa de grupos amino libres (GAL), cepas no purificadas....	34
9. a) Cultivo J19 en agar nutritivo 24h a 32°C, b) Bacilo con espora observado con microscopio 100X.....	36

“Búsqueda e identificación de microorganismos con actividad queratinolítica”

10. a) Cultivo J27 en agar nutritivo 24h a 32°C, b) Bacilo con espora observado con microscopio 100X.....	36
11. a) Cultivo J28 en agar nutritivo 24h a 32°C, b) Bacilo con espora observado con microscopio 100X.....	36
12. Prueba cualitativa de grupos amino libres (GAL), cepas purificadas.....	37
13. Visualización del segmento de 400 pb amplificados de las cepas J27 y J28, 1) Marcador 100 pb DNA Ladder, 2) J27, 3) J27, repetición, 4) J28 y 5) J28, repetición.....	40

“Búsqueda e identificación de microorganismos con actividad queratínolítica”

Esta tesis fue financiada por el “Aprovechamiento de un residuo de la industria avícola (plumas de ave) para la obtención de aminoácidos a través de degradación microbiana” (COAH-2010-C15-149538).

I. RESUMEN

Las plumas de aves representan un gran desecho a nivel mundial. Tan solo en EUA son desechadas anualmente 8 mil toneladas de plumas a los basureros. México es el cuarto país a nivel mundial en la producción de pollo, por debajo de Estados Unidos, China y Brasil. En México se producen 260 millones de pollos por ciclo (cada 45 días), y de estos aproximadamente el 4% corresponden al peso de las plumas.

Debido a su contenido proteico las plumas representan un recurso alimenticio potencial, aunque con limitaciones en su estado natural debido a su baja digestibilidad y escaso valor biológico por la deficiencia en aminoácidos esenciales. El tratamiento convencional de las plumas para mejorar su calidad nutricional se ha basado en su degradación mediante métodos fisicoquímicos. Sin embargo, el producto obtenido por estos métodos también posee calidad limitada debido a que durante el proceso ocurre la pérdida de aminoácidos esenciales. Adicionalmente, esta tecnología tiene un elevado costo termo-energético. Hallazgos recientes han demostrado el potencial microbiano presente en la naturaleza, capaz de degradar sustratos no convencionales, tales como queratina, quitina, elastina y colágeno.

El objetivo de este proyecto se ha orientado al aprovechamiento de las plumas de ave para obtener aminoácidos. Se propone como alternativa, el uso de tratamientos fermentativos con microorganismos queratinolíticos aislados del propio ambiente de las aves; esto dentro del marco de las tendencias actuales de búsqueda de procesos biotecnológicos para el tratamiento de residuos agroindustriales.

En esta investigación se aislaron 26 cepas a partir de los suelos de naves avícolas de una empresa de la región y, adicionalmente fueron estudiadas 2 cepas

“Búsqueda e identificación de microorganismos con actividad queratinolítica”

del género *Bacillus* pertenecientes a la Colección de Cepas de la empresa Biorganix Mexicana S.A. de C.V.; a estas cepas se les determinó su capacidad degradadora de plumas de ave mediante la evaluación cualitativa de la concentración de grupos amino libres (GAL) presentes en el medio de fermentación.

Los métodos de prueba aplicados a las 28 cepas estudiadas, permitieron seleccionar las cepas J19, J27 y J28, las cuales fueron identificadas parcialmente como pertenecientes al género *Bacillus* a través pruebas bioquímicas primarias, y por extracción de ADN y comparación de las secuencias obtenidas con los bancos de genes por megablast en el National Center for Biotechnology Information (NCBI), obteniendo porcentajes de identidad de 87 y 88% de homología a *Bacillus subtilis* para las cepas J19 y J27; mientras que la cepa J28 fue confirmada como *Bacillus firmus*.

La aplicación de cepas J19, J27 y J28 que presentaron actividad queratinolítica, representan un alto potencial para el aprovechamiento de las plumas de ave como sustrato para la obtención de productos de alto valor agregado.

Palabras clave: Bacillus spp., actividad queratinolítica, plumas de ave.

II. ABSTRACT

The waste of feathers is a huge problem worldwide. In the U.S., 8 000 tons of feathers are discarded annually to landfills. Mexico is the fourth largest producer of chicken, just below U.S., China and Brazil. In Mexico there are 260 million chickens produced per cycle (every 45 days), and about 4% of the chicken's weight is accounted for by feathers.

Because of the protein content, feathers represent a potential amino acid source, although with limitations in their natural state due to their low digestibility and low biological value because of the deficiency in essential amino acids. Conventional treatment of feathers to improve their nutritional quality has been based on their degradation by physicochemical methods. These methods also have limited quality because, during the process, the loss of essential amino acids occurs. Additionally, this technology has a high cost and it consumes too much energy. Recent findings have shown the microbial potential presented in nature, capable of degrading unconventional substrates such as keratin, chitin, elastin and collagen.

The objective of this project was to use feathers by fermentation treatments with keratinolytic microorganisms isolated from an environment close to chickens, as an alternative to obtain amino acids, given current trends on the pursuit of biotechnological processes applicable to agro-industrial waste.

“Búsqueda e identificación de microorganismos con actividad queratinolítica”

In this study 26 strains were isolated from soils of poultry ships and in addition were studied 2 more strains of the genus *Bacillus* belonging to the Strains Collection of Biorganix Mexicana S.A de C.V. company, which degrading capacity of chicken feathers was determined by qualitative assessment of free amino groups (FAG) concentration in the fermentation medium.

The tests methods applied to the 28 strains studied, allowed to select J19, J27 and J28 strains, which were partially identified as belonging to the genus *Bacillus*, by primary biochemical tests and for DNA extraction and comparison with sequences obtained by the gene banks in the National Center for Biotechnology Information (NCBI), obtaining identity rates of 87 and 88% to *Bacillus subtilis* for strains J19 and J27; and the J28 strain was identified as *Bacillus firmus*.

The application of the J19, J27 and J28 strains, which showed keratinolytic activity, poses a potential to the use of chicken feathers in order to obtain high value products.

Key words: *Bacillus* spp., keratinolytic activity, feathers.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

En todo el mundo, la industria procesadora de carne de pollo desecha grandes cantidades de plumas que afectan al medio ambiente, al no presentar una opción económica y técnicamente viable para su utilización. Los aminoácidos contenidos en las plumas pueden servir para enriquecer suelos (Goldstein *et al.*, 2004), nutrición de la planta entre otras cosas.

Las plumas, en su mayoría, son destinadas a la elaboración de harinas para ser utilizadas como suplemento de los alimentos concentrados para aves, debido al alto contenido proteico (95% de peso seco), principalmente de queratina (88%). Sin embargo, los procesos tradicionales a los que son sometidos mediante cocción a altas presiones, no mejoran la digestibilidad de estas harinas. La razón es el alto contenido de enlaces bisulfuro presentes en la queratina, lo que la convierten en una proteína muy resistente a la degradación por las enzimas digestivas de las aves. Por otro lado, existe un desbalance de aminoácidos e incluso algunos de ellos son destruidos durante el proceso que combina los tratamientos térmicos con los químicos (ácidos o alcalinos) (Norbest's, 1971).

Los aminoácidos son compuestos orgánicos que constituyen la base fundamental de muchas moléculas biológicas. No puede realizarse proceso biológico alguno, sin que en alguna fase del mismo intervengan los aminoácidos. Las plantas sintetizan los aminoácidos a través de reacciones enzimáticas, por medio de procesos de aminación y transaminación, los cuales conllevan un gran gasto energético por parte de la planta. Partiendo del ciclo del nitrógeno, existe la posibilidad de poder suministrar aminoácidos a la planta, para que ésta se ahorre el trabajo de sintetizarlos. Los aminoácidos, además de una función nutricional,

pueden actuar como reguladores del transporte de microelementos, ya que pueden formar complejos con metales en forma de quelatos (Xia *et al.*, 2012).

Hallazgos recientes han demostrado el potencial microbiano presente en la naturaleza, capaz de degradar sustratos no convencionales, tales como queratina (Coello *et al.*, 2000; Wang y Parson, 1997), quitina (Vidal, 1999), elastina (Frosco *et al.*, 1992) y colágeno (Revista Fenavi, 1998).

Actualmente, Biorganix Mexicana cuenta con una línea de investigación para el estudio y aprovechamiento de residuos. Dadas las tendencias actuales hacia la búsqueda de procesos biotecnológicos aplicables al tratamiento de los residuos agroindustriales y la existencia de un alto potencial microbiano en la naturaleza, capaz de utilizar una amplia variedad de sustratos orgánicos, se ha dirigido el objetivo de esta investigación a la búsqueda de microorganismos queratinolíticos con capacidad de degradar las plumas de ave como sustrato, como alternativa para la obtención de aminoácidos de aplicación en la industria agrícola.

Este trabajo de investigación se realizó en la empresa Biorganix Mexicana S.A. de C.V., como parte del proyecto “Aprovechamiento de un residuo de la industria avícola (plumas de ave) para la obtención de aminoácidos a través de degradación microbiana” financiado por Fondos Mixtos del Estado de Coahuila (COAH-2010-C15-149538). El trabajo experimental se realizó en colaboración con el Departamento de Producción Animal de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

1.2 Justificación

Las plumas de aves representan un gran desecho a nivel mundial, lo que ocasiona el aumento de carga microbiana al suelo, situación que puede propiciar una importante fuente de enfermedades para los humanos y los animales.

México ocupa el cuarto lugar del mundo en la producción de pollos, tan sólo por debajo de Estados Unidos, China y Brasil. Por ciclo (45 días), se producen 260 millones de pollos, y de éstos aproximadamente el 4% de su peso corresponde al peso de las plumas; y dado al alto contenido proteico de las plumas de ave, puede considerarse a este residuo como fuente potencial para la obtención de aminoácidos con aplicación en la industria agroquímica. A través de procesos biotecnológicos innovadores se pueden desarrollar nuevos productos que representen una fuente económica.

1.3 Hipótesis

Los microorganismos aislados de zonas cercanas al hábitat de las aves (camas avícolas) presentan potencial queratinolítico.

1.4 Objetivo General

Aislar e identificar parcialmente microorganismos con actividad queratinolítica para la obtención de aminoácidos a partir de queratina de plumas de ave.

1.5 Objetivos Específicos

- Caracterizar fisicoquímicamente plumas de ave de naves avícolas de la región.
- Aislar microorganismos degradadores de queratina.
- Seleccionar y purificar al menos 2 cepas degradadoras de queratina.
- Identificar parcialmente cepas degradadoras de queratina.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Residuos agroindustriales

Típicamente, los residuos agroindustriales, los cuales son generados en altas cantidades a nivel mundial, tienen un bajo valor comercial. La utilización de estos residuos a veces resulta en costos adicionales para los productores, de manera que en la mayoría de las veces éstos son dispuestos en rellenos sanitarios sin ningún aprovechamiento. Sin embargo, su acumulación suele ocasionar contaminación del medio ambiente (Daroit *et al.*, 2011). Por tal motivo, existe cada vez un mayor interés en el aprovechamiento de tales residuos en procesos que permitan la obtención de productos de alto valor agregado. Así, pueden por ejemplo, ser sustratos de bajo costo para la producción de enzimas y otros productos microbianos de valor agregado (Ko *et al.*, 2010; Lateef *et al.*, 2010; Siqueira *et al.*, 2010).

La biotecnología permite la bioconversión de residuos agroindustriales en productos de interés comercial mediante procesos de extracción directos o de transformación química o microbiológica (Moldes *et al.*, 2002).

En este sentido, existe un gran número de subproductos de la agroindustria que podrían ser utilizados como sustratos no convencionales (Figuras 1 y 2). Las plumas de ave, generadas a partir del procesamiento de pollos alrededor de todo el mundo, son un buen ejemplo. Por su composición, en su mayoría de queratina, éste desecho representa una fuente de aminoácidos para el complemento alimenticio de animales, entre otros productos.



Figura 1. Sustrato no convencional: residuos de la industria alimenticia.



Figura 2. Sustrato no convencional: guishe, residuo del tallado del *Agave lecheguilla* Torrey.

2.2 Plumas de ave

México es el cuarto país a nivel mundial en la producción de pollo, tan solo por debajo de Estados Unidos, China y Brasil. En México son producidos 260 millones de pollos por ciclo (cada 45 días). De éstos, aproximadamente el 4% de su peso corresponden a plumas. Cada año se producen cerca de 5 millones de toneladas de plumas de pollo, como un residuo de la producción de carne de esta ave para consumo humano (Poole *et al.*, 2009).

Las plumas de ave representan un alto porcentaje de los desechos generados en las plantas beneficiadoras de aves de corral, son aproximadamente el 4% del peso total del ave, lo que alcanzaría aproximadamente 770 millones de kg/año en deshecho de la industria avícola a nivel mundial; aunque la mayoría de los granjeros tiran la pluma fuera o las muelen y las mezclan con el pienso para añadir la proteína a las dietas de los animales, no es suficiente para poder eliminar el problema; por lo que se ha considerado la utilización de dicho desecho como alimento para las aves, reduciendo costos por el uso del complemento alimenticio y la cantidad del mismo (El-Boushi y van der Poel, 2000).

Los procesos tradicionales de producción de suplemento alimenticio a partir de plumas de ave se realizan mediante métodos químicos y físicos, como hidrólisis

alcalina y cocción con vapor a presión (Dalev *et al.* 1997; Cai *et al.* 2008). Sin embargo, estos métodos requieren de mucha energía, además que degradan en cierta proporción a los aminoácidos que contienen las plumas, resultando en un producto de baja digestibilidad y de bajo valor nutrimental (Wang y Parsons, 1997).

2.2.1 Composición de plumas de ave

Las plumas de ave están compuestas en aproximadamente un 90% de proteínas, las cuales están conformadas fundamentalmente de queratinas (Harrap y Woods, 1994). Estas son proteínas de tipo fibroso cuyas cadenas polipeptídicas se ordenan en filamentos; en su mayoría como β -queratina (Sawyer *et al.*, 2000), que es difícil de degradar por proteasas comunes, debido a la presencia de enlaces disulfuro y enlaces cruzados (Papadopoulos *et al.*, 1986).

Por otro lado, los aminoácidos son compuestos orgánicos que constituyen la base fundamental de muchas moléculas biológicas. Su denominación responde a la química general, en la que un grupo amino (NH_2) y otro carboxilo o ácido ($-\text{COOH}$), se unen a un carbono. Existen 20 aminoácidos diferentes, sin embargo, las múltiples combinaciones en que se pueden encontrar, forman todas las proteínas (Moldes *et al.*, 2002).

Los aminoácidos que un organismo no puede sintetizar y, por tanto, tienen que ser suministrados con la dieta, se denominan aminoácidos esenciales. Estos son treonina, metionina, lisina, valina, triptófano, leucina, isoleucina y fenilalanina. Mientras que los aminoácidos que son sintetizados por el cuerpo se denominan aminoácidos no esenciales (Moldes *et al.*, 2002).

Se ha reportado que la queratina de plumas de ave muestra un alto contenido de glicina, serina, alanina, cisteína y valina; y a su vez bajo contenido de metionina, lisina y triptófano (Harrap y Woods, 1994).

A nivel mundial existen pocas investigaciones dirigidas al aprovechamiento de este residuo. En México no se tienen reportes sobre el aprovechamiento de las plumas de ave; motivo por el cual no se cuenta con información concerniente a la composición de las plumas de ave nativas. Sin embargo, se ha reportado la caracterización de harinas de pluma de ave que son indicativas de la composición de este residuo sin procesamiento. Uno de estos estudios fue realizado por Bertsch *et al.* (2005) (Cuadro 1), en el cual se comparó la digestibilidad y presencia aminoacídica en la harina de plumas fermentadas contra la harina de plumas comercial. Como resultado se encontró que la harina de plumas fermentadas presentó una mayor disponibilidad de aminoácidos, específicamente de lisina, metionina e histidina. La explicación se dio en términos de que los procesos biotecnológicos no fueron tan drásticos y permitieron obtener una mayor disponibilidad de aminoácidos esenciales; lo que puede resultar interesante para la reducción de costos y de desecho para la industria procesadora de pollos.

Cuadro 1. Perfil de aminoácidos de la harina de pluma fermentada (HPF) y de la harina de pluma comercial (HPC)

Aminoácido	HPF (%)	HPC (%)
Lisina	3.46	2.46
Metionina	0.69	0.54
Histidina	0.94	0.62
Cisteína	3.28	1.55
Ácido aspártico	9.18	7.14
Triptófano	4.42	4.12
Ácido glutámico	11.01	10.33
Alanina	9.04	7.14
Tirosina	1.37	1.10
Glicina	12.05	14.76
Serina	6.45	8.42
Prolina	10.79	11.45
Valina	8.02	9.04
Isoleucina	4.09	4.79
Fenilalanina	3.33	3.65
Leucina	7.23	8.03

Fuente: Bertsch, 2005.

“Búsqueda e identificación de microorganismos con actividad queratinolítica”

Los aminoácidos presentes en las plumas de ave pudieran tener diversas aplicaciones. En la industria farmacéutica se podrían usar en la obtención de productos de cuidado personal como champús y productos exfoliantes (Figura 3a). En el área de la biotecnología, en el desarrollo de películas biodegradables (Figura 3b); y en la agronomía pudiera representar una materia prima importante en productos biofertilizantes y promotores de crecimiento vegetal (Figura 3c).



Figura 3. Diversas aplicaciones de aminoácidos en la industria: a) champú enriquecido con aminoácidos, b) películas biodegradables a base de aminoácidos, y c) fertilizante con aminoácidos.

2.3 Alternativas de aprovechamiento de desecho

En la actualidad se generan como residuos grandes cantidades de queratina (proteína formadora de fibras duras y tejidos musculares), las cuales por lo general son acumuladas en rellenos sanitarios e incineradas, lo que conlleva a muchos problemas ecológicos (Deydier *et al.*, 2005; Paisley y Hostrup-Pedersen, 2005).

Debido a su contenido proteico, las plumas representan un recurso alimenticio potencial, aunque con limitaciones en su estado natural, debido a su baja digestibilidad y escaso valor biológico por la deficiencia en aminoácidos esenciales (Dalev *et al.*, 1997; Tsujibo *et al.*, 2000). El tratamiento convencional de las plumas para mejorar su calidad nutricional se ha basado en su degradación mediante

métodos fisicoquímicos (Burgos *et al.*, 1974; Hollmeyer 1994). El producto resultante también posee calidad limitada debido a que durante el proceso ocurre la pérdida de aminoácidos esenciales (Piñero-Bonilla *et al.*, 2000). Adicionalmente, esta tecnología tiene un elevado costo termo-energético.

Debido a la necesidad de reducción de costos y contaminantes, se ha tratado de aplicar otros procesos para el aprovechamiento de residuos que sean eficaces y económicos. La alternativa la ofrecen los procesos biotecnológicos a través de procesos de degradación de sustratos no convencionales, utilizando para ello fermentaciones en medio líquido o sólido (Figura 4).



a)



b)

Figura 4. a) Fermentador piloto para escalamiento de procesos biotecnológicos y b) fermentación en medio sólido en charolas.

Hallazgos recientes han demostrado el potencial microbiano presente en la naturaleza, capaz de degradar sustratos no convencionales, tales como queratina (Coello *et al.*, 2000; Wang y Parson, 1997), quitina (Vidal, 1999), elastina (Frosco *et al.*, 1992) y colágeno (Revista Fenavi, 1998). En la búsqueda de tecnologías, la biotecnología puede ser una alternativa interesante, con los consecuentes beneficios a nivel ambiental por la remoción de este tipo de residuos de la naturaleza. Existen evidencias en la literatura sobre la factibilidad del

procesamiento biotecnológico de las plumas a través de la utilización de microorganismos con actividad queratinolítica, así como el de sus queratinasas purificadas, en la obtención de hidrolizados de plumas (Papadopulus *et al.*, 1986).

La aplicación de bacterias para la degradación de ciertos desechos y obtención de productos de interés, ha resultado benéfica para la industria avícola, ya que no es un proceso que requiera de mucha energía ni gasto monetario. Además se ha comprobado que el uso de hidrólisis enzimática aumenta la digestibilidad total aminoacídica de las plumas crudas y del complemento alimenticio (Lee *et al.*, 1995).

Existen varios microorganismos unos pertenecientes al género *Actinomycetes* y otras al reino fungi (Santos *et. al*, 1996), así como ciertas subespecies de *Bacillus* como: *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. halodurans* y *B. pseudofirmus* (El-Refai. *et al.*, 2005; Evans. *et al.*, 2000; Suh *et al.*, 2001; Kojima *et al.*, 2006) que tienen la capacidad de degradar la queratina. También se ha reportado que *B. cereus* y *B. polymyxa* presentan actividad queratinolítica (Wojciech y Rodziewicz, 2010).

2.4 Uso potencial de plumas de ave

El alto contenido proteico de las plumas de ave, permite considerar a este residuo como fuente potencial para la obtención de aminoácidos con aplicación en la industria agroquímica. Acorde con estadísticas del SIAP (2009), en México la producción de carne de canal de ave rebasó los 3.3 millones de toneladas, lo que de acuerdo con los datos indicados por Robles, *et al.* (2010), equivaldrían a más de 140 mil toneladas de plumas generadas, tan sólo de aves para sacrificio.

En México no existen antecedentes de investigación en el aprovechamiento de plumas de ave como sustrato para la obtención de subproductos de alto valor agregado. También son de considerar las tendencias actuales hacia la búsqueda

“Búsqueda e identificación de microorganismos con actividad queratinolítica”

de procesos biotecnológicos aplicables al tratamiento de los residuos agroindustriales y la existencia de un alto potencial microbiano en la naturaleza, capaz de utilizar una amplia variedad de sustratos orgánicos. Por estas razones, se ha dirigido el objetivo de esta tesis a la búsqueda de microorganismos queratinolíticos capaces de degradar plumas de ave, mediante tratamientos fermentativos. Lo anterior como una alternativa para la obtención de aminoácidos de aplicación en la industria agrícola. La tesis se basa en la hipótesis de que existen evidencias acerca de la utilización de este potencial microbiano, que permitan el uso de bacterias para modificar la queratina de las plumas en ausencia de tratamientos drásticos y así obtener harina de plumas fermentadas enriquecida en aminoácidos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se desarrolló en las instalaciones de la empresa Biorganix Mexicana S.A. de C.V., situada en el municipio de Ramos Arizpe, Coahuila, México. La caracterización fisicoquímica de la materia prima se realizó en el Departamento de Producción Animal de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

3.1 Caracterización fisicoquímica de plumas de ave

Para el estudio fueron proporcionados aproximadamente 5 kg de plumas de ave, producto del desecho de una nave avícola de la región, las cuales fueron lavadas con abundante agua corriente y después secadas al sol. Para su utilización, las muestras fueron molidas en molino de martillo (SIEMENS) y posteriormente, fueron esterilizadas a 121 °C por 15 min. Las muestras así obtenidas, se empacaron en bolsas de plástico y se almacenaron en un lugar fresco y seco hasta su uso.

La caracterización fisicoquímica de las plumas de ave comprendió los análisis bromatológicos convencionales: contenido de proteínas, cenizas, materia seca total, humedad y fibra cruda utilizando los métodos recomendados por la AOAC (1996). El extracto etéreo se determinó siguiendo el método Soxhlet (AOAC, 1996). La descripción de cada metodología empleada se precisa en los siguientes apartados.

3.1.1 Materia seca total

Se usaron crisoles sometidos a peso constante mediante secado en estufa durante 1 h a 120°C monitoreando su peso al quedar secos. Una vez determinado el peso de cada crisol, se agregaron 0.5 g de plumas y se colocó en estufa por 1 h

a 120°C. Transcurrido el tiempo, el crisol se dejó enfriar en desecador y se tomó su peso. El cálculo de la Materia Seca Total se determinó usando la siguiente ecuación.

$$\text{Materia Seca (\%)} = \frac{(\text{peso crisol con muestra} - \text{peso crisol solo})}{\text{gramos de muestra}} \times 100 \quad (1)$$

3.1.2 Cenizas

La muestra obtenida a partir de la determinación de Materia Seca Total se pre incineró a 120°C en una campana de flujo laminar. Posteriormente se colocó en una mufla (Felisa) entre 2 y 3 h a una temperatura de 550°C. Se dejó enfriar el crisol en un desecador por 15 a 20 min y se registró el peso del crisol con cenizas. Se realizaron los cálculos necesarios siguiendo la siguiente ecuación.

$$\text{Cenizas (\%)} = \frac{(\text{peso del crisol con cenizas} - \text{peso del crisol solo})}{\text{gramos de muestra}} \times 100 \quad (2)$$

3.1.3 Proteínas

La determinación de proteínas se realizó por el método Kjeldhal.

Para la digestión: se pesó 1 g de muestra sobre papel filtro. Se pasó a un matraz Kjeldhal de 800 mL con 4 perlas de vidrio para evitar el burbujeo excesivo durante la ebullición. Se agregó una cucharada de mezcla reactiva de selenio. Se adicionó 30 mL de ácido sulfúrico concentrado y se conectó al aparato Kjeldhal en la sección de digestión durante 4 horas.

Para la destilación: Se diluyó con 300 mL de agua destilada el resultado de la digestión. Al enfriarse la muestra se agregaron 50 mL de solución de ácido bórico al 4% (v/v) y 6 gotas de indicador mixto (rojo de metilo y verde de bromocresol) en un matraz Erlenmeyer de 500 mL. Se agregaron al matraz Kjeldhal 110 mL de

NaOH al 45% y seis granallas de zinc, después se conectó a la parte destiladora del Kjeldhal. Se recibieron 250 mL de destilado.

Para la titulación: Se hizo con ácido sulfúrico 0.098 N hasta que viró de color azul a rojo. Para determinar el contenido de proteína se realizó el cálculo siguiendo la siguiente ecuación.

$$\%N = \frac{(mL \text{ gastados en muestra} - mL \text{ de blanco})(N \text{ del ácido})(0.014)}{\text{gramos de muestra}} \times 100 \quad (3)$$

$$\%P = \%N \times 6.38$$

3.1.4 Humedad

Esta determinación se realizó por la diferencia del peso de la muestra inicial menos el peso de la Materia Seca Total.

3.1.5 Extracto etéreo

Se pesaron 5 g de muestra seca sobre papel filtro y se depositaron en un cartucho poroso de celulosa, se cubrió con algodón y se puso en un sifón. Se tomó un matraz redondo de fondo plano y boca esmerilada y se llevó a peso constante en estufa a 200°C. Posteriormente se dejó enfriar por 15-20 min en desecador y se pesó. Como siguiente paso, al matraz redondo se le adicionó hexano hasta la mitad. Se acopló al refrigerante del dispositivo Soxhlet. Se extrajo por un período de 4 h (se contó el tiempo a partir de que empezó la ebullición). Al finalizar la extracción se evaporó el solvente en rotavapor (Yamato). Se puso a peso constante nuevamente el matraz en estufa a 100- 103°C por un espacio de 12 h. Transcurrido el tiempo, se sacó, se dejó enfriar y pesó. El cálculo de extracto etéreo se realizó usando la siguiente ecuación.

$$\text{Grasa total} = \frac{\text{peso de matraz con grasa} - \text{peso de matraz solo}}{\text{gramos de muestra}} \times 100 \quad (4)$$

3.1.6 Carbohidratos

La determinación de carbohidratos se hizo por diferencia de los porcentajes de las pruebas anteriores. Utilizando la siguiente ecuación.

$$\% \text{ Carbohidratos} = 100\% - (\% \text{ Proteína} + \% \text{ Fibra cruda} + \% \text{ Extracto etéreo} + \% \text{ MST} + \% \text{ Cenizas} + \% \text{ Humedad}) \quad (5)$$

3.1.7 Fibra cruda

Se pesaron 2 g de muestra, previamente desgrasada. Se puso la muestra en un vaso de Berzelius. Se agregaron 100 mL de solución de ácido sulfúrico 0.225 N. Se conectó al aparato de reflujo por un período de treinta minutos contados a partir de punto de ebullición, al hervir se mantuvo en ebullición suave. Transcurrido el tiempo se sacó y filtró a través de una tela de lino y se lavó con 3 porciones de 100 mL de agua destilada caliente. Se pasó la fibra (residuo que quedó en la tela de lino) al vaso de Berzelius con 100 mL de solución de hidróxido de sodio 0.313 N y se conectó al aparato de reflujo por 30 minutos. Transcurrido el tiempo se sacó y filtró a través de lino y se lavó con 3 porciones de agua destilada caliente. Se escurrió el exceso de agua presionando la tela de lino. Se sacó la tela de lino del embudo, se extendió y se retiró la fibra con una espátula para depositarla en un crisol de porcelana, previamente identificado. Se puso a peso constante en la estufa a 100 - 103°C, por 12 h. Transcurrido el tiempo, se sacó de la estufa, se enfrió y pesó. Se pre incineró la muestra en parrillas para meterla en la mufla a 600° C por tres horas. Al finalizar se registró el peso y se realizaron los cálculos correspondientes de acuerdo a la siguiente ecuación.

$$\% \text{ Fibra cruda} = \frac{(\text{pérdida de peso en la incineración} - \text{pérdida de peso del blanco de fibra de cerámica})}{\text{gramos de muestra}} \times 100 \quad (6)$$

3.2 Aislamiento de microorganismos degradadores de queratina

Para el aislamiento de microorganismos degradadores de queratina, se muestreó suelo de camas de gallina vieja y de gallina joven. Para tener acceso a las diferentes naves de gallinas, fue necesario seguir las recomendaciones de sanidad indicadas por la granja de muestreo. Se tomaron muestras representativas para realizar las pruebas de aislamiento, de aproximadamente 100 g en bolsas de plástico con sellado hermético. En total se recolectaron 10 muestras: 5 de gallina vieja y 5 de gallina joven, las cuales fueron trasladadas al Laboratorio de Microbiología de Biorganix Mexicana para su procesamiento. Posteriormente, cada suelo fue colocado en cajas petri y se secaron a 60°C por 2 h. Se tomó 1 g de cada muestra y se disolvió en 100 mL de agua destilada estéril, se mezcló bien y se tomó 1 mL de muestra, la cual fue sometida a un proceso de pasteurización a 80°C por 15 min. Se realizaron diluciones seriales con agua destilada estéril (10^{-1} a 10^{-10}) y se colocaron 100 μ L de cada dilución en cajas petri con agar nutritivo y se incubaron a 32-35°C (Demian *et al.*, 1986) por 24 h, para el aislamiento de microorganismos esporulados.

Se realizaron observaciones macroscópicas (tamaño, forma, borde, superficie, consistencia, comportamiento frente a la luz, color y pigmento) de los crecimientos obtenidos. Las colonias bacterianas con morfología distinta fueron resembradas en agar nutritivo y evaluadas para la selección de cepas degradadoras de queratina y su posterior purificación.

3.3 Selección de microorganismos degradadores de queratina

Para la selección de cepas con potencial actividad queratinolítica, se desarrolló una técnica rápida en placa. Se prepararon cajas de agar selectivo denominado Agar Plumas de Ave (APA) con plumas de ave, 15 g/L; cloruro de amonio, 0.5 g/L (Baker Analyzed); cloruro de sodio, 0.5 g/L (Fermont); fosfato monobásico de potasio, 0.3 g/L (Quantyka); fosfato dibásico de potasio, 0.4 g/L (Baker); cloruro de magnesio hexahidratado, 0.1 g/L (Analytyka); extracto de levadura, 0.1 g/L

(Bioxon); agar bacteriológico, 15 g/L (Difco). En la prueba de selección se incluyeron 2 cepas del género *Bacillus* sp., pertenecientes a la Colección de Cepas de Biorganix Mexicana.

Las cepas aisladas a partir de las muestras obtenidas en la granja avícola, fueron sembradas en cajas petri con agar APA por el método de picadura. Se colocaron 4 cepas por caja en orden aleatorio; posteriormente se incubaron a 32-35 °C por 48-72 h. La prueba se realizó por triplicado.

Para identificar las cepas que mostraron mejor crecimiento en APA, se realizaron mediciones del diámetro del halo de crecimiento. Finalmente, las cepas que presentaron mejor crecimiento fueron sometidas a pruebas de degradación de queratina para la selección de aquellas con mayor potencial queratinolítico.

3.3.1 Pruebas para selección de cepas con capacidad queratinolítica

Para el montaje de la prueba, se prepararon matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio salino basal descrito por Williams *et al.* (1991): Cloruro de amonio, 0.5 g/L (Baker Analyzed); cloruro de sodio, 0.5 g/L (Fermont); fosfato monobásico de potasio, 0.3 g/L (Quantyka); fosfato dibásico de potasio, 0.4 g/L (Baker); cloruro de magnesio hexahidratado, 0.1 g/L (Analytyka); extracto de levadura, 0.1 g/L (Bioxon); y fue suplementado con plumas molidas a una concentración de 20 g/L, se ajustó el pH a 7.5 con hidróxido de potasio 1 M (Fermont) y se esterilizó por autoclave 15 min a 121°C. Se inocularon las cepas aisladas, en el medio suplementado con plumas, y se mantuvieron en incubación a 32°C con agitación orbital (Daigger), por 48 h a 300 rpm. La selección de los microorganismos se llevó a cabo tomando como base su capacidad degradadora de plumas en medio de cultivo, lo cual se estimó cualificando la concentración de grupos amino libres (GAL) presentes en el medio de fermentación mediante el método colorimétrico de ninhidrina (Meyer, 1957).

Para la determinación de GAL, se filtró el contenido del matraz a través de filtro Whatman No. 5 utilizando bomba de vacío. Posteriormente, se agregó 3 mL de muestra en tubos de ensaye y 0.5 mL de ninhidrina (1.0 %) (Hycel). La mezcla se dejó en baño maría durante 10 min y se enfrió en baño de agua con hielo durante 5 min. Al terminar se tomó lectura de absorbancia en el espectrofotómetro (Thermo Spectronic) a 540 nm de longitud de onda.

Fueron seleccionadas para la etapa de purificación, las cepas con mayores títulos de GAL presentes en el medio de fermentación.

Después del proceso de purificación se realizó una segunda prueba bajo las mismas condiciones (incubación a 32 °C por 48 h a 3 00 rpm), para seleccionar las 2 cepas con mayores títulos de degradación de queratina.

3.4 Purificación e identificación parcial de microorganismos degradadores de queratina

Los microorganismos con mayores títulos de GAL fueron seleccionados para su purificación y posterior identificación a nivel género y especie, por medio de técnicas moleculares y pruebas bioquímicas.

Para la purificación de cepas se utilizó el método de resiembras por asada, así como diluciones de la muestra y la posterior siembra a 32-35°C durante 24 h.

Adicionalmente, se realizaron pruebas primarias de identificación: reacción rápida de Gram con hidróxido de potasio al 3 % (p/v) (Schaad, 1988), tinción de Gram siguiendo las instrucciones del fabricante (Hycel), prueba de catalasa (Madigan *et. al.* 2004) y prueba de oxidasa realizada con discos (Becton Dickinson and Company).

Para corroborar la identidad de las bacterias, se amplificó y secuenció parte del gen ribosomal 16S; para ello, se realizó extracción y determinación de la integridad del ADN de las colonias bacterianas.

Para la extracción de ADN se utilizó el método de extracción de ADN de bacterias Gram positivas de Graham *et al.* (1994), modificado por Rodríguez-Herrera *et al.* (2009). Previamente, se inoculó cada cepa en caldo nutritivo (Bioxon) estéril, contenido en tubos de ensaye 13X100 mm con rosca, se incubó a 32°C por 24 h. Posteriormente, se tomó 1 mL de medio de cultivo y se centrifugó a 10000 rpm por 2 min en una centrífuga (Spectrafuge). La pastilla de células resultante de la centrifugación se resuspendió en 400 µL de buffer TE (88 mL de agua grado MilliQ, 10 mL de Tris, 1 M, 2 mL de EDTA, 0.5 M, pH 8.0), 25 µL de SDS al 20% (Usb) y 20 µL de proteinasa K (20 mg/mL) (Invitrogen) y se dejó incubando a 37°C durante 1 h. Después de transcurrido el tiempo se le adicionó 1/3 del volumen de acetato de amonio 7.5 M (Research organics), 0.1 volumen de etanol al 100% (Bio Basic Inc.) y se precipitó en hielo por 10 min. Al término del tiempo, se centrifugó a 12000 rpm por 10 min. Al sobrenadante resultante se le agregó 0.5 mL de cloroformo Probiotek-alcohol isoamílico (Baker Analyzed) (24:1), se mezcló y se volvió a centrifugar a 12000 rpm por 5 min (este paso se repitió una vez más). Se recuperó el sobrenadante y se le agregó 400 µL de isopropanol, mezclando y centrifugando de nuevo a 12000 rpm por 5 min. Transcurrido el tiempo se decantó y se dejó secar la pastilla que después se disolvió en 50 µL de agua MilliQ y se leyó absorbancia de la relación 260/280 para la determinación de concentración de ADN (ng/µl).

La amplificación del gen ribosomal 16S del ADN extraído de las cepas degradadoras de queratina, se llevó a cabo preparando un cóctel con 22.5 µL de reactivo PCR-mix (Invitrogen), 1 µL del ADN (100 ng/µL) de cada cepa, se colocó 1 µL de cada uno de los iniciadores específicos para la región del gen ribosomal 16S 5' AGGAGGTGATCCAACCGCA 3' y 5' AACTGGAGGAAGGTGGGGAT 3' (Griesen *et al.*, 1994) a una concentración de 25 mM en microtubos de 200 µL

“Búsqueda e identificación de microorganismos con actividad queratínolítica”

(Axygen); se colocaron en el termociclador (Techne) y se seleccionó el programa con temperatura de desnaturalización de 94°C por 5 min, y 35 ciclos de 94°C por 1 min (desnaturalización), 54°C por 1 min (alineación) y 72°C por 1 min. Una vez terminada la reacción se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % (p/v). Para la visualización de los segmentos amplificados se utilizó como referencia un marcador molecular de 100 bp (pares de bases) DNA Ladder (Invitrogen). Los geles se visualizaron y documentaron en el sistema de fotodocumentación (Minibispro DNR).

Los amplificados de 400 pb, fueron enviados para su secuenciación en un laboratorio externo en Macrogen (Corea). La identificación se realizó comparando los datos obtenidos con la base de datos Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), soportado por el Centro de Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information U.S. National Library of Medicine).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización fisicoquímica de plumas de ave

La primera parte de la tesis involucró la recolección de plumas de ave (Figura 5) a partir de las cuales se realizaron las pruebas de selección de cepas degradadoras de queratina.



Figura 5. Plumas de ave lavadas, molidas y esterilizadas; condiciones necesarias para su utilización como sustrato.

La concentración de proteínas determinada fue bastante baja en comparación con datos reportados en trabajos anteriores. Tal es el caso de Bonilla *et al.* (2000), quienes encontraron concentraciones por encima del 95% de proteínas de las cuales aproximadamente un 88% correspondió a queratina. Una de las causas pudiera ser la sensibilidad del método utilizado para la determinación de proteínas, así como el procesamiento previo de las muestras. Macedo (2002), reportó que el contenido de proteínas en plumas molidas y harina de plumas, puede variar en función del método previo de preparación de la muestra (secado). Otra de las explicaciones a la alta divergencia del contenido de proteínas determinado, también pudiera relacionarse con la alimentación de las aves.

“Búsqueda e identificación de microorganismos con actividad queratínolítica”

En el Cuadro 2 se presenta la caracterización fisicoquímica de las plumas de ave.

Cuadro 2. Caracterización fisicoquímica de las plumas de aves utilizadas.

Componente	Porcentaje (%)
Proteínas	14.10
Grasas	2.92
Fibra cruda	87.62
Humedad	5.30
Cenizas	0.18
Materia seca total	94.70

Por otro lado, se observó un alto contenido de fibra (87.6%) el cual pudiera deberse a que la recolección de plumas de ave se hizo a partir de montículos de desecho expuestos al medio ambiente. Así, la composición se considera que el alto contenido de fibra pueda estar relacionado con las partículas adheridas del medio ambiente, y podría compensar al bajo valor de proteínas encontrado.




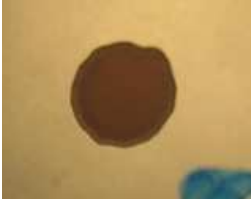
En cuanto al contenido de grasas, humedad, cenizas y materia seca total, determinado en las plumas de ave de esta investigación, los datos coinciden a reportes de caracterización fisicoquímica presentados previamente (Xia *et al.*, 2012).

La importancia de la caracterización fisicoquímica radica en que, para la producción de enzimas, es necesario conocer la composición de las plumas de ave, ya que con esta se puede dar una idea del porcentaje de algún componente de interés para su utilización próxima; en este caso para esta investigación fue necesario conocer el porcentaje de proteínas, para su degradación y la final obtención de aminoácidos.








4.2 Aislamiento de microorganismos degradadores de queratina

Como resultado en la búsqueda de microorganismos con características de producción de espóra, característica típica del género *Bacillus* (Cai *et al.* 2008), se obtuvieron 26 cepas con morfología distinta de los 10 suelos que fueron muestreados en las naves avícolas de la empresa. De las cuales se observó: tamaño, forma, borde, superficie, consistencia, comportamiento frente a la luz, color y pigmento; las cuales se describen en el Cuadro 3. Adicionalmente, se incluye la descripción morfológica de las 2 cepas del género *Bacillus* sp., pertenecientes a la Colección de Cepas de Biorganix Mexicana.








Cuadro 3. Morfología y descripción macroscópica de las cepas encontradas en el aislamiento microbiológico.

No. Colonia	Morfología macroscópica (10X)	Descripción
1.		Circular, plegada, umbilicada, bordes ondulados, color beige con filamentos oscuros hacia el centro, opaca frente a la luz.
2.		Circular, filamentosa, beige con pliegues oscuros al centro, convexa, opaca frente a la luz.
3.		Circular, bordes lisos, umbilicada, opaca frente a la luz, color beige, rugosa, pigmento ligeramente amarillo.
4.		Circular, bordes lisos, plana, color café claro, rugosa, opaca frente a la luz





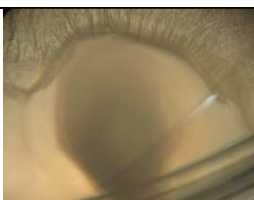


“Búsqueda e identificación de microorganismos con actividad queratinolítica”

5.		Circular, bordes lisos, plana, color café oscuro, opaca a la luz, rugosa.
6.		Circular, bordes ondulados, color beige oscuro, opaca a la luz, rugosa, pigmento ligeramente amarillo.
7.		Circular, bordes ondulados, umbilicada, color beige claro, opaca frente a la luz.
8.		Filamentosa, umbilicada, color gris, rugosa, opaca frente a la luz.
9.		Circular, bordes ondulados, color café, umbilicada, rugosa, opaca frente a la luz.
10.		Circular, bordes ondulados, color café con centro claro, rugosa, opaca frente a la luz, plana.
11.		Circular, bordes ondulados, color beige, rugosa, poco brillante frente a la luz, convexa.




“Búsqueda e identificación de microorganismos con actividad queratinolítica”

12.		Circular, bordes dentados, color café, rugosa, opaca frente a la luz, convexa.
13.		Circular, bordes ondulados y extensos, color gris, opaca frente a la luz, plegada al centro, rugosa, plana.
14.		Irregular, bordes dentados y extensos, color gris, opaca a la luz, rugosa, plana.
15.		Circular, bordes ondulados, color café, rugosa, umbilicada, opaca frente a la luz.
16.		Circular, bordes ondulados y muy extensos, color gris, plana, rugosa, opaca frente a la luz.
17.		Filamentosa, bordes ondulados, color gris, rugosa, plana, opaca frente a la luz.
18.		Irregular, bordes lisos, color beige, rugosa, plana, opaca a la luz.

“Búsqueda e identificación de microorganismos con actividad queratinolítica”

19.		Irregular, bordes ondulados y extensos, color beige con manchas oscuras, plana, opaca a la luz.
20.		Circular, bordes lisos, color café, rugosa, convexa, poco brillante frente a la luz.
21.		Circular, bordes dentados, color beige con centro café y pliegues centrales oscuros, rugosa, convexa, opaca frente a la luz.
22.		Circular, bordes poco dentados, color beige, rugosa, plana, poco brillante frente a la luz.
23.		Circular, bordes ondulados, plegada hacia el centro, color gris, rugosa, plana, opaca frente a la luz.
24.		Circular, bordes dentados, color beige con centro oscuro, rugosa, convexa, poco brillante frente a la luz.
25.		Irregular, bordes poco ondulados, color beige, rugosa, plana, poco brillante frente a la luz.

“Búsqueda e identificación de microorganismos con actividad queratinolítica”

26.		Circular, bordes ondulados, color gris, plegada al centro, rugosa, convexa, opaca frente a la luz.
27.		Circulares, bordes poco ondulados, color beige con centro oscuro, rugosa, convexa, opaca frente a la luz.
28.		Circular, bordes ondulados, color beige con pliegues centrales oscuros, rugosa, convexa, opaca frente a la luz.

Las cepas se seleccionaron tomando como base igualdades en morfología con el género *Bacillus*, de acuerdo con la literatura, ya que se sabe que son capaces de formar espores y presentan capacidad para degradar el sustrato no convencional, plumas de ave, utilizado para este proyecto (Goldstein *et al.*, 2004).

4.3 Selección de microorganismos degradadores de queratina

Las 28 cepas obtenidas con morfologías distintas, fueron sometidas a pruebas en placa para la selección de aquellas con mayor capacidad para degradar queratina. Para ello, se preparó el medio APA, con un medio salino basal suplementado con plumas de ave. El parámetro de selección de las cepas degradadoras de queratina, fue el tamaño del halo de crecimiento que produjo cada cepa. El diámetro promedio del halo de crecimiento producido por las cepas que mostraron mayor capacidad queratinolítica se presenta en el Cuadro 4.

“Búsqueda e identificación de microorganismos con actividad queratinolítica”

Cuadro 4. Selección de cepas por tamaño de halo de crecimiento.

Cepa	Tamaño de halo (cm)
14	1.3 ± 0.1
16	1.0 ± 0.20
19	0.65 ± 0.05
20	1.0 ± 0.26
27	1.1 ± 0.3
28	1.2 ± 0.46

Nota: Se presentan resultados promedio.

En la Figura 6 se presenta la evidencia de crecimiento de las cepas seleccionadas. Los microorganismos que presentaron crecimiento sobre el medio APA, son microorganismos con potencial actividad queratinolítica, ya que para su desarrollo utilizaron el sustrato (plumas de ave), como fuente de carbono y nitrógeno. Esta acción es lograda por la producción de enzimas denominadas queratinasas o enzimas queratinolíticas (Jeong *et al.*, 2010). Estas cepas, fueron sometidas a otras pruebas más específicas para la degradación de queratina, en función de la liberación de grupos amino libres a fin de seleccionar aquellas con mayor potencial queratinolítico.

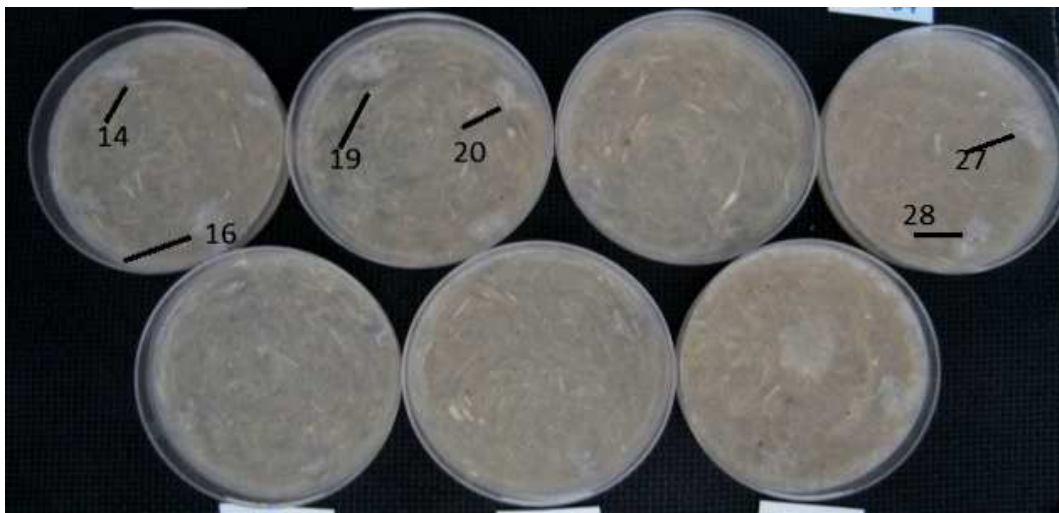


Figura 6. Halo de crecimiento de las diferentes cepas aisladas en APA.

4.3.1 Selección de cepas con capacidad queratinolítica

Las 6 cepas seleccionadas por su crecimiento en medio APA, se sometieron a otra prueba para medir los niveles de degradación de queratina. Para ello, cada cepa fue inoculada en un medio de cultivo líquido, que también fue suplementado con plumas de ave, con agitación constante durante un periodo de 48 h a 32°C.

Al cabo de las 48 h, el medio, que al inicio era de apariencia densa, cambió a un aspecto casi completamente líquido. Además se pudo observar la aparición de un precipitado al fondo de los matraces, lo que fue un indicativo de que las cepas seleccionadas presentan potencial de actividad queratinolítica (Figura 7).

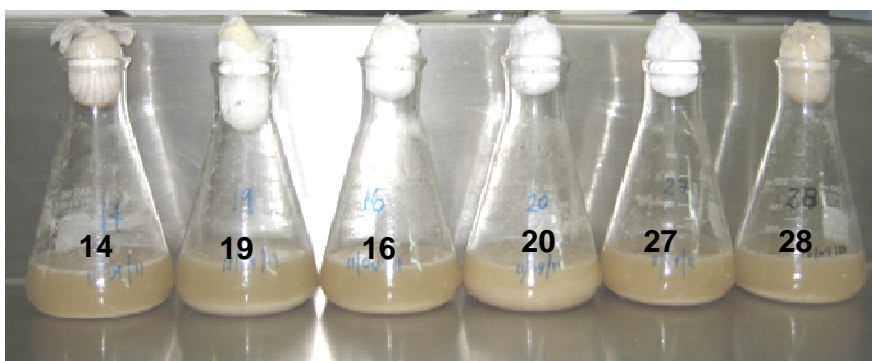


Figura 7. Medio de cultivo líquido al cabo de 48 h, cepas: 14, 19, 16, 20, 27 y 28.

Después de transcurrido el tiempo de incubación, donde los microorganismos estuvieron en contacto con las plumas de ave como única fuente de carbono; el medio de cultivo fue filtrado. Posteriormente el filtrado resultante fue evaluado en su composición de GAL por medio de la técnica de ninhidrina (Meyer, 1957). En el Gráfico 1 se presentan los resultados obtenidos de contenido de GAL presentes en cada muestra. Cabe señalar que la técnica de ninhidrina utilizada es una prueba cualitativa, ya que no se consideró una curva estándar de aminoácidos, por lo que se presentan solamente los valores de absorbancia obtenidos a la longitud de onda de 540 nm.

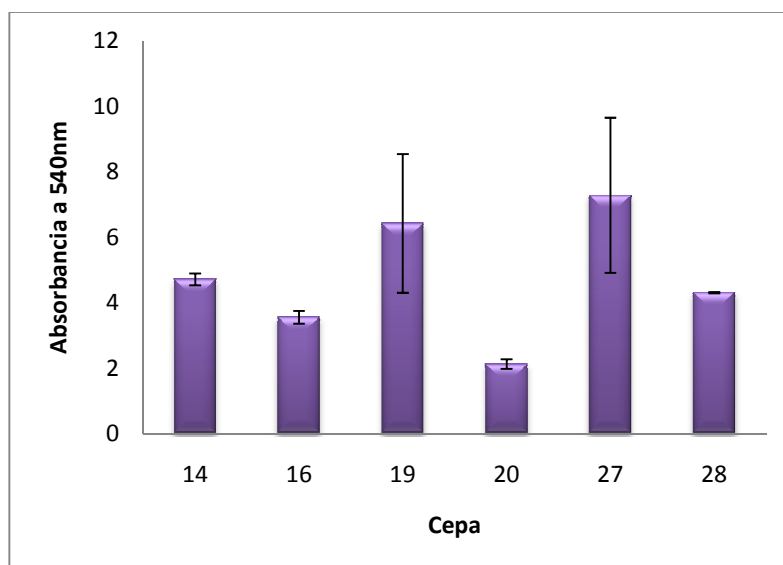


Gráfico.1. Prueba cualitativa de grupos amino libres (GAL), cepas no purificadas.

Como puede observarse del Gráfico 1, las cepas que presentaron los mayores títulos de GAL promedio, determinados por el método de ninhidrina fueron las cepas 27, 19, 14 y 28. Lo anterior se puede relacionar con la probable mayor producción de enzimas queratinolíticas (Jeon *et al.*, 2010).

De esta manera, las cepas 19, 27 y 28 fueron sometidas a un proceso de purificación para realizar una identificación parcial; la cepa 14 no fue considerada para la etapa de purificación, debido a que presentó crecimiento y comportamiento irregular en la liberación de GAL.

4.4 Purificación e identificación parcial de microorganismos degradadores de queratina

El proceso de purificación se llevó a cabo por medio de diluciones seriadas y de resiembras de muestras por asada. Para la etapa de purificación, las cepas se denominaron de la siguiente manera: J19, J27 y J28.

“Búsqueda e identificación de microorganismos con actividad queratinolítica”

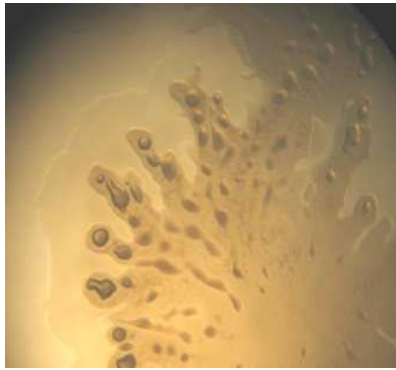
La importancia de este proceso de purificación radicó en saber con certeza, si la cepa que presentó capacidad de degradación de queratina, era un único microorganismo, o era una mezcla de microorganismos que lograban tal actividad queratinolítica. La morfología de las cepas sometidas a este proceso, se describe y presenta en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Descripción morfológica colonial y celular de las cepas seleccionadas para purificación.

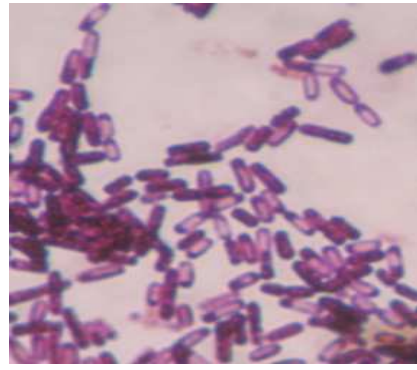
Característica	J19	J27	J28
Morfología colonial	Colonias de forma irregular, bordes lisos con un halo translúcido, superficie plana, consistencia mucoide, color crema y opacas.	Colonias de forma irregular, bordes lisos con un halo translúcido, superficie plana, consistencia mucoide, color crema y opacas.	Colonias de forma irregular, bordes lisos con un halo translúcido, superficie plana, consistencia mucoide, color crema y opacas.
Morfología celular	Bacilos G (+), cortos, con endospora central no deformante, dispuestas en cadenas largas y sencillos.	Bacilos G (+), cortos, con endospora central no deformante, dispuestas en cadenas largas y sencillos.	Bacilos G (+), cortos, con endospora central no deformante, dispuestas en cadenas largas y sencillos.

En la Figuras 8a, 9a y 10a, se presentan las imágenes correspondientes a la morfología colonial (10X) de las cepas J19, J27 y J28, respectivamente, tomadas al estereoscopio (Zeigen). De igual manera, en las Figuras 8b, 9b y 10b, se observa la morfología microscópica (100X) de cada cepa tomadas con ayuda del microscopio de contraste de fases (Carl Zeiss).

“Búsqueda e identificación de microorganismos con actividad queratinolítica”



a)

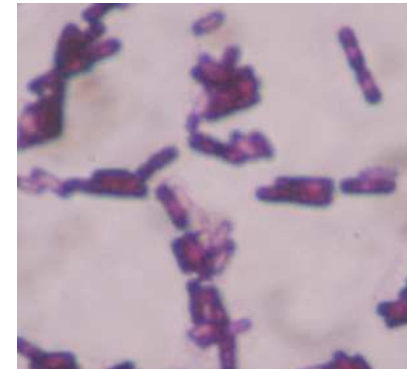


b)

Figura 8. a) Cultivo J19 en agar nutritivo 24 h a 32°C, b) Ba cilo con espora observado con microscopio 100X.

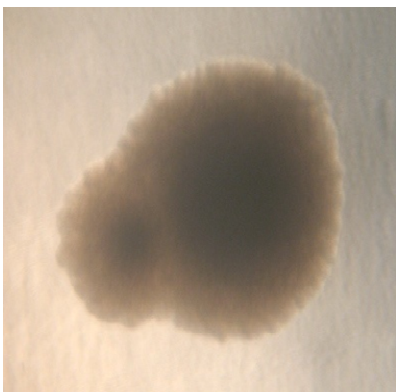


a)



b)

Figura 9. a) Cultivo J27 en agar nutritivo 24 h a 32°C, b) Bacilo con espora observado con microscopio 100X.



a)



b)

Figura 10. a) Cultivo J28 en agar nutritivo 24 h a 32°C, b) Ba cilo con espora observado con microscopio 100X.

Al concluir el proceso de purificación de las cepas J19, J27 y J28, se realizó una segunda prueba de degradación de queratina y se llevó a cabo la prueba de ninhidrina para medir los títulos de GAL. En el Gráfico 2 se presentan las absorbancias promedio que cada cepa mostró al realizar la prueba de determinación de GAL.

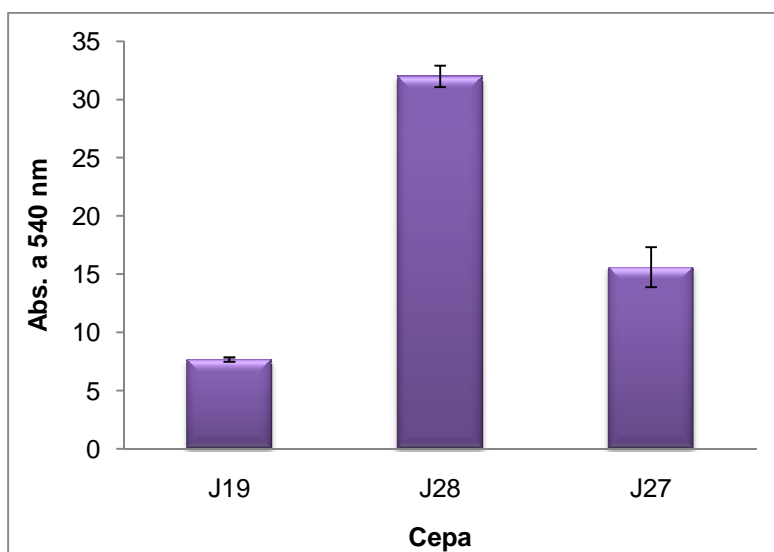


Gráfico 2. Prueba cualitativa de grupos amino libres (GAL), cepas purificadas.

En los resultados que se muestran en el Gráfico 2, se puede observar que dos de las cepas sometidas al proceso de purificación (J27 y J28), aumentaron su nivel de degradación de queratina con respecto a la prueba de degradación realizada con las cepas sin purificar. La cepa J28 fue la mejor, obteniendo títulos dos veces mayor en comparación a los títulos obtenidos antes de ser purificadas. De esta manera se confirma la capacidad queratinolítica de las cepas seleccionadas y su potencial aplicación para su uso en la obtención de aminoácidos a partir de plumas de ave. Es importante considerar que las cepas J27 y J28 no fueron aisladas de suelos del ambiente de las plumas de ave, por lo que el mecanismo enzimático de estas cepas tiene características relevantes y que se sugiere estudiar a más profundidad en siguientes trabajos.

Por otro lado, existen reportes en literatura en donde las evaluaciones de actividad queratinolítica realizados por Jeong *et al.* (2010) utilizando la bacteria Gram-negativa *Stenotrophomonas maltophilia*, indicaron la liberación de altos niveles de valina, histidina, metionina (1797.70, 270.10 y 125.30 μM , respectivamente). Mientras que Mukherjee *et al.* (2011), midieron directamente la actividad β -queratinasa (Mukartinasa) purificada a partir de un mutante de *Brevibacillus* sp. cepa AS-S10-II, sobre plumas de ave, reportando que esta enzima degradó un 78-82% de la queratina de plumas después de 48 h de incubación. Dicho estudio se realizó utilizando microscopía electrónica de barrido y se detectó la liberación de los siguientes aminoácidos por cromatografía de gases-masas en el siguiente orden: cisteína > valina > treonina > lisina > isoleucina > fenilalanina = metionina.

Cabe señalar que la presente tesis, forma parte de un proyecto cuyo objetivo principal es obtener una cepa capaz de producir aminoácidos a partir de la degradación de la queratina de plumas de ave. En esta investigación sólo se determinó el nivel de producción de GAL a través del método cualitativo de ninhidrina (Meyer, 1957), a fin de cumplir el objetivo de seleccionar cepas con alto potencial queratinolítica. Sin embargo, en la continuación del proyecto se utilizarán técnicas cromatográficas que respalden los resultados obtenidos en esta investigación.

Después de haber corroborado la capacidad de degradación de queratina de las cepas seleccionadas, se realizó una serie de pruebas de identificación primaria, cuyos resultados se presentan en el Cuadro 6. Los resultados confirman características del género *Bacillus* y corresponden a algunas características reportadas por Guillén Cruz *et al.*, (2006) para una serie de *Bacillus* aislados de suelo con potencial actividad contra hongos fitopatógenos. Los *Bacillus* aislados por Guillén Cruz *et al.*, (2006) presentaron formación de endospora y dieron negativo a la prueba de oxidasa y positivo a la prueba de catalasa, resultando correspondientes a *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* y *B. subtilis*.

“Búsqueda e identificación de microorganismos con actividad queratínolítica”

Cuadro 6. Resultados de la identificación de las cepas seleccionadas.

Prueba	Resultado		
	J19	J27	J28
Reacción KOH	-	-	-
Gram	+	+	+
Catalasa	+	+	+
Oxidasa	-	-	+
Endospora	+	+	+

Considerando los resultados de las pruebas primarias de identificación, a estas cepas se les realizó extracción, visualización, amplificación y secuenciación del gen 16S. En la Figura 8, se muestran los amplificadores visualizados por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.2 %. En la amplificación se observó la presencia de una sola banda en las cepas J27, J28 y J19. Dichas bandas correspondieron a un tamaño aproximado de 400 pb; estos amplificadores fueron purificados para su secuenciación. Las secuencias obtenidas se compararon con las existentes en los bancos de genes para corroborar la identidad de las especies. Los resultados en BLAST mostraron que la secuencia J19 correspondió a la cepa *Bacillus subtilis* con un 87% de homología, mientras que para las cepas J27 y J28 se tuvieron para ambas un porcentaje de homología de 88% con *Bacillus subtilis*. Sin embargo, los porcentajes de homología encontrados son bajos para considerar la confiabilidad de los mismos; por lo que, se consideró que la identificación parcial confirma que las cepas J19 y J27 pertenecen al género *Bacillus sp.*

Por otra parte, la empresa Biorganix Mexicana realizó pruebas adicionales para obtener el perfil completo de la cepa J28, por considerar los resultados generados a partir de esta cepa de relevancia para la ejecución del proyecto “Aprovechamiento de un residuo de la industria avícola (plumas de ave) para la obtención de aminoácidos a través de degradación microbiana” (COAH-2010-C15-149538); este análisis se llevó a cabo por solicitud a la Colección Microbiana del

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV).

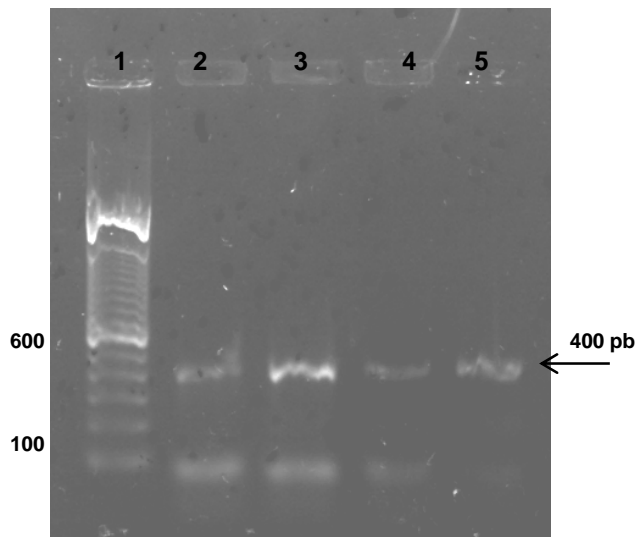


Figura 8. Visualización del segmento de 400 pb amplificados de las cepas J27 y J28, 1) Marcador 100 pb DNA Ladder, 2) J27, 3) J27, repetición, 4) J28 y 5) J28, repetición.

Los resultados generados de las pruebas de identificación realizados por el CINVESTAV, confirmaron la identificación de la cepa J28 como *Bacillus firmus*, las pruebas D-manitol, esculina, almidón y glucógeno resultaron negativas y aunque son predominante positivas, no son primordiales para su caracterización.

Bacillus firmus se ha utilizado para la decoloración de poliéster y otras telas (Arora *et al.*, 2011) además produce sustancias antimicrobianas activas contra diferentes cepas de *Bacillus* y son capaces de inhibir bacterias sulfo-reductoras (Korenblum *et al.*, 2005; Korenblum *et al.*, 2008). Esta especie tiene una capacidad de adsorción de metales (Ahluwalia y Goyal, 2007) y algunas cepas forman carotenoides (Pane *et al.*, 1998). Es una especie común en la piel (Bidel y LeBrun, 1975) y no se considera patogénica para el ser humano (Mlcková *et al.*, 2001); y ya que presentó un interesante comportamiento para la liberación de GAL a partir de la degradación de plumas de ave, esta cepa puede considerarse como potencial para su aplicación en la agroindustria.

“Búsqueda e identificación de microorganismos con actividad queratinolítica”

Para fines de la investigación se cumplió el objetivo principal propuesto, al lograrse seleccionar e identificar cepas con alto potencial queratinolítico, siendo mejor la cepa J28, seguida de las cepas J27 y J19.

Este trabajo permitirá la continuidad de una serie de pruebas para optimizar la producción de aminoácidos a partir de plumas de ave, desecho de la industria avícola, y su potencial aplicación en la obtención de productos de alto valor agregado.

5. CONCLUSIONES

- Se caracterizó fisicoquímicamente las plumas de ave que fueron utilizadas como sustrato no convencional en esta investigación.
- Se seleccionaron las cepas J19, J27 y J28 que presentaron los títulos más altos en las pruebas de degradación de queratina de las 28 estudiadas en la investigación.
- Las cepas fueron identificadas como pertenecientes al género *Bacillus*; mientras que la cepa J28 (cepa que presentó mayor actividad queratinolítica) fue confirmada como *Bacillus firmus*.
- La investigación realizada confirma la factibilidad del uso de las plumas de ave (residuo industrial) como sustrato para microorganismos con actividad queratinolítica (*Bacillus* spp.), para la obtención de productos con alto valor agregado.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC Official Methods of Analysis. 1996. Association of Official Analytical Chemist. 16a edition.
- Arora, S., Saini, H.S., Singh, K. 2011. Biological decolorization of industrial dyes by *Candida tropicalis* and *Bacillus firmus*. *Water Sci. Technol.* 63(4), 761-8.
- Ahluwalia, S.S. y Goyal, D. 2007. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresour Technol.* 2007 98(12), 2243-57.
- Bertsch, A., Coello, N. 2005. A biotechnological process for treatment and recycling poultry feathers as a feed ingredient. *Bioresource Technology* 96, 1703–8.
- Bibel D.J. y LeBrun J.R. 1975. Effect of experimental dermatophyte infection on cutaneous flora. *J. Invest. Dermatol.* 64(2),119-23.
- Burgos, A., Floyd, J.I., Stephenson, E.L. 1974. The amino acid content and availability of different samples of poultry by-product meal, and feather meal. *Poult. Sci.* 53, 198-203.
- Cai, C.G., Chen, J.S., Qi, J.J., Yin, Y., Zheng, X.D. 2008. Purification and characterization of keratinase from a new *Bacillus subtilis* strain. *J Zhejiang Univ Sci B* 9(9), 713–720.
- Coello, N., Vidal, L. y Bretaña, A. 2000. Aislamiento de una cepa de *Kocuria rosea* degradadora de plumas de aves de corral. *Rev. Cient. Fac. Ciens. Vets. LUZ.* 10(2), 107-113.

- Dalev, P., Ivanov, I., Liubomirova, A. 1997. Enzymic modification of feather keratin hydrolysates with lysine aimed at increasing the biological value. *J Sci Food Agric* 73, 242–244.
- Daroit, D.J., Corrêa, A.P.F., Brandelli, A. 2011. Production of keratinolytic proteases through bioconversion of feather meal by the Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. *International biodeterioration and biodegradation* 65, 45-51.
- Demian, Arnold, Solomon, N. 1986. *Manual of industrial microbiology and biotechnology*. American society for microbiology, Washington, 98-117.
- Deydier, E., Guilet, R., Sarda, S., Sharrock, P. 2005. Physical and chemical characterization of crude meat and bone meal combustion residue: “waste or raw material”. *Journal of hazardous materials* 121, 141-148.
- El-Boushi, A.R.Y., van der Poel, F.B. 2000. *Handbook of poultry feed from waste. Processing and Use*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- El-Refai, H.A., AbdelNaby, M.A., Gaballa, A., El-Araby, M.H., Abdel Fattah, A.F. 2005. Improvement of the newly isolated *Bacillus pumilus* FH9 keratinolytic activity. *Process biochem* 40, 2325-2332.
- Evans, K.L., Crowder, J., Miller, E.S.n. 2000. Subtilisins of *Bacillus* spp. hydrolyze keratin and allow growth on feathers, *Can. J. Microbiol.* 46, 1004.
- Frosco, M., Chase, T., Macmillan, J.D. 1992. Purification and properties of the elastase from *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immunol.* 60, 728-734.
- Goldstein, G., Flory, K.R., Browne, B.A., Majid, S., Ichida, J.M., Burt, Jr. E.H. 2004. Bacterial degradation of black and white feathers. Department of Botany-Microbiology, Ohio, Wesleyan University, Delaware, Ohio 43015, USA. *The Auk* 121(3), 656-659.

- Guillén Cruz, R., Hernández Castillo, F.D., Gallegos Morales, G., Rodríguez Herrera, R., Aguilar González, C.N., Padrón Corral, E., Reyes Valdés, M.H. 2006. *Bacillus* spp. como biocontrol en suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y rendimiento de cultivo de chile. Revista mexicana de fitopatología 24(2), 105-114.
- Harrap, B.S. y Woods, E. 1994. Soluble derivatives of feather keratin. 2. Molecular weight and conformation. Biochemistry Journal 92, 19-26.
- Hollmeyer, R. 1994. Subproductos Avícolas. Industria Avícola. Octubre 94, 14-18.
- Jeong, J.H., Lee, O.M., Jeon, Y.D., Kim, J.D., Lee, N.R., Lee, C.Y., Son, H.J. 2010. Production of keratinolytic enzyme by a newly isolated feather-degrading *Stenotrophomonas maltophilia* that produces plant growth-promoting activity. Process biochemistry 45, 1738-1745.
- Ko, C.H., Lin, Z.P., Tu, J., Tsai, C.H., Liu, C.C., Chen, H.T., Wang, T.P. 2010. Xylanase production by *Paenibacillus campinasensis* BL11 and its pretreatment of hardwood kraft pulp bleaching. International biodeterioration and biodegradation 64, 13-19.
- Kojima, M., Kanai, M., Tominaga, M., Kitazume, S., Inoue, A., Horikoshi, K. 2006. Isolation and characterization of a feather-degrading enzyme from *Bacillus pseudofirmus* FA30-01. Extremophiles 10, 229-235.
- Korenblum, E., der Weid, I., Santos, A.L., Rosado, A.S., Sebastián, G.V., Coutinho C.M., Magalhães, F.C., Paiva, M.M., Seldin, L. 2005. Production of antimicrobial substances by *Bacillus subtilis* LFE-1, *B. firmus* HO-1 and *B. licheniformis* T6-5 isolated from an oil reservoir in Brazil. J Appl Microbiol. 98(3), 667-75.

- Korenblum, E., Sebastián, G.V., Paiva, M.M., Coutinho, C.M., Magalhães, F.C., Peyton, B.M., Seldin, L. 2008. Action of antimicrobial substances produced by different oil reservoir *Bacillus* strains against biofilm formation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 79(1), 97-103.
- Lateef, A., Oloke, J.K., Kana, E.B.G., Sobowale, B.O., Ajao, S.O., Bello, B.Y. 2010. Keratinolytic activities of a new feather-degrading isolate of *Bacillus cereus* LAU 08 isolated from Nigerian soil. *International biodeterioration and biodegradation.* International biodeterioration and biodegradation 64(2), 162-165.
- Lee, C., Garlich, J., Shih, J. 1995. Evaluation of a bacterial feather-lysate, as a feed protein. *Poult. Sci.* 70, 85-94.
- Macedo, M. 2002 Obtención de un hidrolizado proteico por fermentación sumergida de plumas utilizando *Bacillus* spp. *Revista científica, FVC-LUZ.* 3(12), 214-220.
- Madigan, M., Martinko, J.M., Parker, J. 2004. *Brock Biología de los microorganismos.* 10ª edición. Pearson Education, Madrid.
- Meyer, H. 1957. The ninhydrin reaction and its analytical applications. *Bioch.*, 67, 333-340.
- Mlcková, P., Cechová, D., Chalupná, P., Novotná, O., Prokesová, L. 2001. Enhanced systemic and mucosal antibody responses to a model protein antigen after intranasal and intratracheal immunisation using *Bacillus firmus* as an adjuvant. *Immunol Lett.* 77(1), 39-45.
- Moldes, A. B., Cruz, J. M., Domínguez, J. M, Parajó, J. C. 2002. Production of a cellulosic substrate susceptible to enzymatic hydrolysis from prehidrolized barley husks. *Agr. Food Sci. Finland* 11(1), 51-58.

- Mukherjee, A.K., Rai, S.K., Bordoloi, N.K. 2011. Biodegradation of waste chicken-feathers by an alkaline β -keratinase (Mukartinase) purified from a mutant *Brevibacillus* sp. Strain AS-S10-II. International biodeterioration and biodegradation 65, 1229-1237.
- Norbest's Pelican Rapids. 1971. Processes wastes for profit food engineering. Food engineering 43(12), 56-57.
- Paisley, L.G. y Hostrup-Pedersen, J. 2005. A quantitative assessment of the BSE risk associated with fly ash and slag from the incineration of meat-and-bone meal in a gas fired power plant in Denmark. Preventive veterinary medicine 68, 263-275.
- Pane, L., Radin, L., Franconi, G., Carli, A. 1996. The carotenoid pigments of a marine *Bacillus firmus* strain. Boll Soc Ital Biol Sper. 72(11-12), 303-8.
- Papadopoulos, M.C., El Boushy, A.R., Roodbeen, A.E., Ketelaars, E.H., 1986. Effect of processing time and moisture content on amino acid composition and nitrogen characteristics of feather meal. Anim. Feed Sci. Technol. 14, 279–290.
- Piñero-Bonilla, J., Vidal, L., Coello, N. 2000. Aislamiento y caracterización de una cepa de *Bacillus* spp. degradadora de plumas de aves de corral. Revista científica, FCV-Luz 10(2), 124-129.
- Poole, A.J., Church, J.S., Huson, M.G. 2009. Environmentally sustainable fibers from regenerated protein. Biomacromolecules 10, 1-8.
- Revista Fenavi. 1998. Federación Nacional de Avicultura de Venezuela. Edición Especial Aniversario. Primer semestre.
- Ríos de Álvarez, L., de Combellas, J., Álvarez-Ramón, Z. 2005. Zootecnia tropical 23(2), 183-210.

- Robles, H., Martínez, A.L., Velasco, C., Castaño, V. M. 2010. Una riqueza tecnológica por descubrir: las plumas de ave y la vermicultura. *Ciencia Hoy*.
- Rodríguez, H., Alonso, C., De la Rosa, L, Valdés, M., González, M., Ramírez, E., Hernández, F.D. 2009. Modificaciones al método de Graham para la extracción de ADN. Memorias del XXXI Congreso Nacional / VI Congreso Internacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Veracruz, Veracruz, México. Resumen L-72.
- Santos, R.M.D.B., Firmino, A.A., de Sá, C.M., Felix, C.R. 1996. Keratinolytic activity of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Current Microbiology* 33, 364–70.
- Sawyer, R.H., Glenn, T., French, J.O., Mays, B., Shames, R.B., Barnes Jr., G.L., Rhodes, W., Ishikawa, Y. 2000. The expression of beta (b) keratins in the epidermal appendages of reptiles and birds. *Am. zool.* 40, 530-539.
- Schaad, N. W. 1988. Laboratory guide for identification of plant pathogenic. Bacteria 2da. Edición. APS Press. St. Paul Minnesota, EE.UU., 37-55.
- SIAP Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera [Online]. 2009. <http://www.siap.gob.mx>.
- Siqueira, F.G., Siqueira, E.G., Jaramillo, P.M.D., Silveira, M.H.L., Andreus, J., Couto, F.A., Batista, L.R., Ferreira Filho, E.X. 2010. The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. *International biodeterioration and biodegradation* 64, 20-26.
- Suh, H.J., Lee, H-K. 2001. Characterization of a keratinolytic serine protease from *Bacillus subtilis* KS-1. *Protein chem.* 20,165-169.
- Tsujibo, H., Hatano, N., Endo, H., Miyamoto, K., Inamori, Y. 2000. Purification and characterization of a thermostable chitinase from *Streptomyces*

- thermoviolaceus* OPC-520 and cloning of the encoding gene. Biosci. Biotechnol. Biochem. 64(1), 96-102.
- Vidal, L. 1999. Aislamiento e identificación de microorganismos degradadores de plumas. Estudio comparativo de la cinética de fermentación de dos cepas bacterianas (*Kocuria rosea* y *Bacillus* spp). Trabajo de ascenso. Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina U.C.V. Caracas. Venezuela. 76 pp.
- Wang, C. y Parson, S. 1997. Effect of processing system on protein quality of feather meal and hog hair meals. Poult. Sci. 76, 491-496.
- Wojciech, L. y Rodziewicz, A. 2010. Keratinolytic Potential of Feather-Degrading *Bacillus polymyxa* and *Bacillus cereus*. Department of Biotechnology and Food Microbiology, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, 50-375 Wrocław, Norwida 25, Poland. Polish J. of Environ. Stud. 19(2) (2010), 371-378.
- Xia, Y., Massé, D.I., Macallister, T.A., Beaulieu, C., Ungerfeld, E. 2012. Anaerobic digestion of chicken feather with swine manure or slaughterhouse sludge for biogas production. Waste Management, 32(3), 404-409.