



**DEGRADACIÓN DE PLUMAS DE AVE
MEDIANTE LA APLICACIÓN
DE AISLADOS DE *BACILLUS
LICHENIFORMIS* PROCEDENTES DE
PILAS DE COMPOSTAJE DE RESTOS
VEGETALES**

Autor: Juan Manuel López Doblas
Director: José Joaquín Moreno Casco
Codirector: Juan Antonio López González
Facultad: Ciencias Experimentales
Titulación: Grado de Biotecnología
Área: Microbiología
Curso Académico: 2019/2020



Agradecimientos

Desde mi primer contacto con la biología tuve claro que mi futuro laboral iba encaminado hacia el estudio de la naturaleza, de una forma u otra. Tuve la suerte de tener un gran profesor en el área de biología en los años decisivos previos a la elección de la carrera, que supo transmitirme su pasión por todo lo relacionado con la ciencia. Recuerdo tener una charla con él acerca de perspectivas de futuro, ya que no sabía exactamente por qué rama de la ciencia ascender. Me habló de diferentes carreras, no obstante, cuando describió la biotecnología se me iluminó la decisión. Desde ese momento tuve claro la carrera a elegir. Por esto y mucho más le estaré agradecido siempre.

Los 4 años de carrera y la realización del presente TFG me han proporcionado desde excelentes momentos de felicidad hasta estrés y desmotivación. En ocasiones pueden ocurrir cosas que pueden cambiar la forma de ver la vida, hacerte salir de la conocida monotonía y obligarte a adaptarte a una nueva situación, lo que no suele ser fácil. Sin embargo, como bien dice J. R. R. Tolkien, “Donde no falta voluntad siempre hay un camino”. En lo personal, esta voluntad me ha sido mermada en alguna ocasión, no obstante, he tenido personas a mi alrededor capaces de darme un golpe de realidad y recordarme por qué he elegido este camino. Es por ello, que querría daros las gracias.

Quiero dar las gracias a una de las mejores personas con las que me he cruzado y por las que me alegro enormemente haber elegido Almería como Universidad para llevar a cabo la carrera, mi tutor Joaquín. Gracias por acogerme en tu laboratorio con los brazos más que abiertos para culminar este periodo de mi formación. La pasión que tienes por transmitir todos los conocimientos que impartes, la constante preocupación por lograr que interioricemos dichos conocimientos o la enorme sabiduría que posees, hacen de ti mucho más que un gran profesor. Nunca se me olvidará aquella conversación en la que fui en busca de auxilio. Tus palabras consiguieron tranquilizarme y mostrarme qué era lo importante en ese momento. Porque profesores como tú quedan muy pocos. Por todo esto y mucho más te estaré eternamente agradecido.

Gracias también a mi cotutor, Juan. He aprendido más que nunca en el laboratorio directamente de tu mano durante la realización del TFG. Siempre has encontrado un hueco para resolver mis dudas, así como las de mis compañeros de forma tan eficaz que me cuesta creer que el día tenga 24 horas. En la modalidad telemática, es envidiable la efectividad y rapidez con la que respondes. La enorme alegría y el positivismo que transmites constantemente le dan una luz especial al laboratorio que estoy seguro no encontraré en ninguna otra zona de trabajo.

Continúo agradeciendo Macarena y Paqui por habernos enseñado tanto a lo largo de las asignaturas impartidas por vosotras. A Macarena por el buen rollo que genera, que hace que sus clases sean realmente únicas y a Paqui por preocuparse de esa manera en el laboratorio por nosotros, procurando que todo saliera bien. No quiero olvidarme tampoco de todo el personal de laboratorio que me habéis aceptado como a uno más desde el principio y nos habéis echado esa mano tan necesaria cuando nos veáis perdidos.

Degradación de plumas mediante la aplicación de aislados de *Bacillus licheniformis* procedentes de pilas de compostaje de restos vegetales

Durante todo este tiempo, mi familia ha sido el pilar fundamental que me ha brindado apoyo sin siquiera requerirla, es por ello, que gran parte de la superación lograda durante esta carrera va dedicada a ellos. A mi madre, por presionarme a luchar por lo que realmente quería en el momento justo, consiguiendo que entrara en la carrera. A mi padre, por ser la persona que más ha creído en mi en todo momento y saber transmitirme un ápice de esa seguridad. A mis hermanos por escucharme y ayudarme a superar cualquier dificultad acontecida a lo largo del camino. En general, dentro de mi familia he encontrado ejemplos de superación y constancia, que me han mostrado en ocasiones cómo luchar por lo que uno realmente quiere.

Gracias a todos los amigos más cercanos, tanto de dentro de la carrera como fuera de ella. Me habéis enseñado muchísimo a lo largo de estos 4 años, haciéndome reír cuando era necesario y cuando no. Por mostrarme la mano e incluso el brazo en todo momento, brindándome apoyo sin dudarlo.

Gracias por todos esos fines de semana que siempre tenían un brillo único, ya fueran en Baza, en Almería o en Granada, que sin duda ayudaban en gran manera a afrontar cada semana con buena cara.

Sin todos y cada uno de vosotros, nada de esto habría sido posible. Por ello, una vez más, gracias.

**Degradación de plumas mediante la aplicación de aislados de *Bacillus licheniformis*
procedentes de pilas de compostaje de restos vegetales**

Resumen	5
Abstract.....	6
I. Introducción	7
1- Problemática asociada a la acumulación de los residuos orgánicos procedentes de la actividad ganadera avícola.....	7
2- Clasificación molecular de las queratinas.....	10
3- Queratinasas microbianas	13
a) Caracterización molecular de queratinasas	14
b) Utilidad de las queratinasas en la biotecnología	16
4- Bioconversión de plumas de ave mediante queratinasas.....	18
a) Producción de sustratos con uso para alimentación animal.....	18
b) Generación de fertilizantes.....	20
c) Producción de péptidos y otras sustancias de valor añadido	22
II. Objetivos.....	24
III. Materiales y Metodología	24
1- Materiales del estudio	24
2- Medios de cultivo	25
3- Diseño experimental	28
4- Selección de cepas productoras de queratinasas	29
5- Obtención de queratina a partir de plumas de ave	32
6- Inoculación e incubación de las cepas seleccionadas en medio de plumas y centrifugación	32
7- Determinación del contenido proteico total del extracto	33
8- Determinación espectrofotométrica de la actividad queratinasa	34
9- Determinación de la pérdida de plumas producida durante la incubación.....	34
IV. Resultados y Discusión	35
1- Selección del cepario de estudio de <i>Bacillus licheniformis</i> en base a métodos cualitativos de degradación de plumas de ave	35
2- Determinación de niveles de queratinas, proteínas y degradación de plumas durante el proceso	43
V. Conclusiones	46
VI. Bibliografía	47
ANEXO	54

Resumen

La acumulación masiva de plumas de ave consecuencia de la creciente industria avícola conlleva diferentes problemas ambientales debido al carácter recalcitrante de este material. Su estructura, basada en la molécula de queratina, se considera químicamente muy estable por lo que su eliminación es todo un reto. El alto nivel proteico de las plumas hace de la correcta gestión de este tipo de residuo una abundante y barata fuente de péptidos y aminoácidos. Los métodos tradicionales para la eliminación de sustratos queratinosos conllevan grandes gastos de energía, además de la destrucción de varios aminoácidos esenciales, por lo que no se consideran técnicas viables. Es por ello, que la aplicación de microorganismos capaces de degradar la queratina se convierte en la técnica con mayor viabilidad para la eliminación del residuo, además de generar un producto con diversas aplicaciones en diferentes campos.

Bacillus licheniformis ha sido caracterizada por diversos autores como uno de los microorganismos con mayor capacidad queratinasa. Por ello, en el presente estudio se partió de una colección de 56 cepas diferentes de *B. licheniformis*, obtenidas en procesos de compostaje de materiales lignocelulósicos para la determinación de la cepa con mayor capacidad de degradación de plumas de ave. Para el ensayo cualitativo se llevó a cabo la preparación de medios de cultivo cuya única fuente de carbono y nitrógeno eran las plumas, por lo que si la bacteria era capaz de crecer en ese medio debía ser hidrolizando las plumas y asimilando su contenido. De las 56 cepas ensayadas, 55 lograron crecer de forma más o menos abundante en dicho medio, lo que confirmó las grandes capacidades de este microorganismo en su producción de queratinasas.

La mayor o menor capacidad de degradación de plumas de ave no sólo depende de la cepa a utilizar. Las condiciones de temperatura y pH dadas para la incubación de la cepa productora de queratinasas, así como las dadas a la hora de su actividad influyen enormemente en el resultado, difiriendo entre diferentes cepas. Una cepa con gran capacidad queratinasa incubada en las condiciones adecuadas es capaz de la completa degradación de plumas en un periodo de tiempo aproximado de 5 días, por lo que el uso de *Bacillus licheniformis* para la biodegradación de plumas se convierte en una técnica muy viable.

Palabras clave: *Bacillus licheniformis*, plumas de ave, queratinasa, biodegradación

Abstract

The massive accumulation of bird feathers as a result of the growing poultry industry leads to different environmental problems due to the recalcitrant nature of this material. Its structure, based on the keratin molecule, is considered chemically very stable and its disposal is a challenge. The high protein level of the feathers makes the correct management of this type of waste an abundant and cheap source of peptides and amino acids. Traditional methods for the disposal of keratin substrates, involve high energy costs and the destruction of several essential amino acids. Consequently, they are not considered viable techniques. Therefore, the application of microorganisms capable of degrading keratin, becomes the most viable technique for the elimination of the waste, in addition to generating a product with diverse applications in different fields.

Bacillus licheniformis has been characterized by several authors as one of the microorganisms with the highest keratinase capacity. Therefore, in the present study, a collection of 56 different strains of *B. licheniformis*, obtained in composting processes of lignocellulosic materials for the determination of the strain with the highest capacity to degrade bird feathers, was used. For the qualitative test, the preparation of culture media whose only source of carbon and nitrogen were the feathers, was carried out. If the bacteria were able to grow in that medium it should be by hydrolysing the feathers and assimilating their content. Of the 56 strains tested, 55 managed to grow more or less abundantly in that medium, which confirmed the great capacities of this microorganism in its keratinase production.

The greater or lesser capacity to degrade bird feathers does not only depend on the strain to be used. Temperature and pH conditions given for the incubation of the keratinase producing strain, as well as those given at the time of its activity, greatly influence the result, differing between different strains. A strain with high keratinase capacity incubated under the right conditions is capable of complete feather degradation in a period of approximately 5 days, so the use of *Bacillus licheniformis* for feather biodegradation becomes a very viable technique.

Keywords: *Bacillus licheniformis*, bird feathers, keratinase, biodegradation

I. Introducción

1- Problemática asociada a la acumulación de los residuos orgánicos procedentes de la actividad ganadera avícola

El incesable aumento de la población en las últimas décadas y el aumento de la incorporación de productos cárnicos a las dietas han generado un excepcional incremento en la demanda de productos de necesidad primaria como lo es la carne. La industria ganadera avícola ha sido la que más ha notado este aumento del consumo y, por tanto, demanda de carne (**Tabla I.I**). Esto es debido a que el precio relativo de la carne de ave es el más asequible, en comparación con de carne de vacuno o porcino (Henchion et al., 2014). Además, la facilidad de manipulación de la carne de ave de mano del consumidor (Brandelli et al., 2015), así como las restricciones de tipo religioso que prohíben consumir carnes como la de vacuno (hindúes y budistas) o porcino (musulmanes), lo que provoca un aumento en el consumo de carne de ave dentro de estas poblaciones (Heiman et al., 2019).

	1990	2009	% cambio
Carne bovina	54.065	63.835	18,1
Carne de cordero y cabra	9100	12.763	40,2
Carne de cerdo	68.692	105.503	53,6
Carne de ave	40.173	90.664	125,7
Otras carnes	3.634	6.098	67,8
Agregados	175.665	278.863	58,7

Tabla I.I: Consumo global de carne en toneladas en los años 1990 y 2009, extraído de Henchion et al. (2014).

Como cualquier industria de actividad ganadera, en la industria avícola se producen materiales considerados residuales, cuya correcta gestión es crucial para promover la sostenibilidad del proceso. No obstante, la excesiva producción de estas industrias tiene como consecuencia una sobreabundancia de basura y estiércol, provenientes principalmente de lodos generados y del compost de las aves muertas en las propias instalaciones de producción y en un principio poseen aplicación sobre tierras de cultivo, utilizándolas como abono. Aunque su uso como fertilizante en principio es satisfactorio, el resultado final, debido a la ingente cantidad de material, puede resultar en una excesiva aplicación en los cultivos, e incluso un almacenamiento imprudente o el vertido de los propios residuos a las vías fluviales cercanas (Salminen & Rintala, 2002).

Entre los principales problemas asociados a la aplicación directa de los residuos orgánicos avícolas sobre cultivo cabe citar la creación de una capa de grasa en la superficie del cultivo y por tanto la obstrucción física del suelo, la propagación de patógenos contenidos en los residuos, así como la contaminación del aire y la producción de gases de efecto invernadero (Brandelli et al., 2015). No obstante, el principal problema suele residir en el excesivo vertido de nutrientes

Degradación de plumas mediante la aplicación de aislados de *Bacillus licheniformis* procedentes de pilas de compostaje de restos vegetales

en las aguas cercanas a las explotaciones avícolas, provocando el aumento en la demanda de oxígeno en el medio por las bacterias contenidas en ellas, empobreciendo el agua en nutrientes y generando por tanto su eutrofización, lo que impide la proliferación de otras formas de vida ajenas a aquellas que utilizan dichos nutrientes, eliminando cualquier posible uso del agua (Kelleher et al., 2002).

Algunos ejemplos de los residuos sólidos generados en esta industria son la propia piel del animal, sus órganos internos, sangre, huesos, carne a la que no se le da uso y las plumas del ave. Estos residuos están considerados como unos de los residuos sólidos más contaminantes del mundo (Zhu et al., 2010). Las plumas constituyen alrededor del 8% del peso del ave, y dado que su estructura está basada en queratina, proteína que es insoluble en agua, su constante acumulación tras el proceso industrial avícola tiene consecuencias muy destacadas en la contaminación ambiental.

El hecho de que las plumas tengan una composición basada en una proteína (90% del peso de la pluma se corresponde con composición proteica) como lo es la queratina, hace de ellas una fuente de proteínas y aminoácidos muy potente. Esto origina que el correcto reciclaje de este residuo sea de gran interés para el aprovechamiento de los nutrientes contenidos en ellas, pues una correcta extracción de los aminoácidos permitirá el uso de la proteína contenida en la pluma de manera eficiente, tanto para la alimentación animal como para la elaboración de suplementos proteínicos para uso humano, así como para su uso como fertilizantes (Bhari et al., 2018).

La limitación del uso de las plumas como fuente de proteínas se origina por la difícil digestión de la queratina. La composición de esta proteína (**Tabla I.II**), induce la formación de puentes de disulfuro dentro de la molécula debido a su alto contenido en cisteína (grupo tiol de la molécula promueve la formación del enlace disulfuro), y presenta gran cantidad de puentes de hidrógeno que se dan entre polipéptidos, lo que le otorga gran resistencia a ser hidrolizada. Todo ello ocasiona dificultades en dar con un método de extracción eficiente que permita el uso de esta proteína de manera barata, pues hasta el momento las plumas son consideradas un residuo en la industria avícola y la materia prima, por tanto, no tendrá ningún coste (Onifade et al., 1998). Además, como particularidad de estos materiales, se puede observar el déficit en ciertos aminoácidos como la metionina, la histidina y alanina, lo que genera un problema a la hora de utilizar las plumas como sustrato para la generación de suplementos nutricionales.

Degradación de plumas mediante la aplicación de aislados de *Bacillus licheniformis* procedentes de pilas de compostaje de restos vegetales

Proteínas y aminoácidos	Latshaw et al., 1994, sin procesar	Latshaw et al., 1994, procesado a 207 kPa por 24 min	Wang and Parsons (1997), procesado a 160 °C por 15 min
Proteínas	922	866	880
Alanina	28,8	37,7	39,6
Glicina	51,8	50,7	68,7
Isoleucina	39,4	41,3	42,3
Leucina	56,9	68,8	70,9
Valina	53	44	59,6
Fenilalanina	34,6	40,1	42,1
Arginina	67,6	62,5	61
Histidina	2,3	8,6	5,7
Lisina	15,4	22,6	18,8
Ácido aspártico	41,8	55,9	55,2
Ácido glutámico	82,2	72,3	97,2
Serina	87,3	72,1	100
Treonina	34,5	36,5	40,2
Prolina	73,9	74,8	88,4
Cisteína	65,8	48,7	42,9
Metionina	7,1	6,3	6,5

Tabla I.III: Concentración de proteína y aminoácidos (g kg^{-1}) en las plumas procesadas y no procesadas, extraído de Onifade et al. (1998).

Un método de gestión tradicionalmente usado con frecuencia es la incineración, no obstante, es lógico que no es una forma de reciclaje eficiente pues se obtiene un producto del cual no se podía obtener ningún beneficio. Esto genera un enorme desperdicio de energía en forma de calor, además de las enormes emisiones obtenidas tras la incineración de dióxido de carbono (CO_2), dióxidos de nitrógeno (NO_2), partículas en suspensión y monóxidos de carbono (CO), cuyo valor superaba los obtenidos al quemar carbón vegetal, haciendo de la incineración de las plumas una opción poco viable (Deydier et al., 2005).

Por ello, diversos autores han buscado métodos de extracción de los nutrientes presentes en queratinas. Cabe citar a Papadopoulos (1985) que estableció algunos métodos eficaces para permitir que la proteína contenida en la queratina pase a una forma más fácilmente hidrolizable y por tanto extraíble y aplicable a dietas. Estos fueron los siguientes:

- Hidrólisis en autoclave: Este tratamiento se basa en la introducción de las plumas en el interior de un autoclave y por tanto la exposición del material a unas presiones que ascienden a los 445 kPa durante 60 minutos, generando una cierta pérdida de la calidad nutricional de las plumas, aunque mínima con respecto a otros protocolos de autoclave utilizados.
- Tratamientos químicos: Diferentes tratamientos se llevaron a cabo, como el uso de sulfuro de sodio junto con sosa, cuya aplicación en dietas de aves aumentó la ratio de crecimiento de estas (Draper, 1942), o el uso de hidróxido de sodio durante el proceso

Degradación de plumas mediante la aplicación de aislados de *Bacillus licheniformis* procedentes de pilas de compostaje de restos vegetales

de autoclave (Gruhn & Zander, 1977), que demostró una potencial aplicación al uso de gallinas ponedoras. No obstante, resultados experimentales a la hora de su uso como suplemento nutricional demostraron un resultado negativo en los valores de digestibilidad.

- Tratamientos enzimáticos: Es bien sabido que muchos microorganismos contienen enzimas capaces de hidrolizar casi cualquier molécula. La queratina no es una excepción, pues existen grandes cantidades de microorganismos con capacidad de hidrolizarla por las enzimas que contienen. Un ejemplo generalizado de una enzima eficiente que aumenta la digestibilidad de proteínas como la queratina es la maxatasa, cuya composición contiene una endopeptidasa que facilita la adquisición de aminoácidos (Argüello et al., 2003)

En el artículo de Papadopoulos (1985) ya se llegó a la conclusión de que el método más eficiente y ecológico era el tratamiento enzimático mediado por microorganismos, no obstante, se necesitaba mucha investigación para corroborarlo. No estaban muy alejados de la realidad pues estudios posteriores han demostrado que los otros dos métodos tradicionales tienen tendencia a destruir algunos aminoácidos esenciales tales como la lisina, el triptófano y la metionina (Korniłowicz-Kowalska & Bohacz, 2011) y su aplicación genera la producción de gases de efecto invernadero, que contribuyen al calentamiento global (Acda, 2010). Además, los artículos con referencia a los métodos de tratamiento tradicionales como lo son la hidrólisis en autoclave o los tratamientos químicos se han ido reduciendo, al contrario de las referencias a tratamientos enzimáticos, que han ido en claro aumento.

2- Clasificación molecular de las queratinas

Ahora bien, como se mencionaba anteriormente, la queratina presenta una cantidad notable de cisteína en su estructura primaria, lo que induce la formación de puentes de cisteína o disulfuro (SS) en su estructura espacial. Esto produce una compactación de la molécula de tal manera que se crea una molécula con gran estabilidad, cuya estructura radica en una sucesión de fibras llamadas filamentos agrupados y embebidos alrededor de una matriz de composición parecida a los mismos y cuya estructura se mantiene gracias tanto a puentes disulfuro como a puentes de hidrógeno. Las queratinas se clasifican en un grupo de filamentos llamado "filamentos intermedios" (IF), llamados así porque son más grandes que los filamentos de actina y más pequeños que los microtúbulos más largos encontrados (Herrmann & Aebi, 2004; McLellan et al., 2019). Dependiendo de la cantidad de puentes disulfuro que contenga la proteína se pueden clasificar en queratinas duras (contienen gran cantidad de enlaces disulfuro y por tanto su estructura es más compacta), que parecen ser las principales responsables de la estructura del tejido epidérmico, conformándose de manera que los IF se incrustan dentro la matriz epidérmica, y queratinas blandas (menor cantidad de cisteína y por tanto de enlaces disulfuro), que se suelen encontrar en el citoplasma y de manera mucho menos compacta, dando lugar a una estructura mucho menos resistente (Feroz et al., 2020).

Degradación de plumas mediante la aplicación de aislados de *Bacillus licheniformis* procedentes de pilas de compostaje de restos vegetales

No obstante, la ciencia ha tendido a clasificar la queratina según la estructura secundaria predominante, y así, se pueden diferenciar 2 estructuras, la α -queratina y la β -queratina. Ambas comparten una composición básica, compuesta por una matriz de queratina en la cual se incrustan los filamentos de la misma proteína como se menciona anteriormente. En cuanto a la estructura básica de la proteína, las α -queratinas se componen por dos tipos de proteínas: una matriz proteica con un gran contenido en cisteína, por lo que se induce la formación de muchos puentes disulfuro, y los filamentos que, al contrario, no contienen gran cantidad de aminoácidos sulfurados, por lo que su estructura es menos compacta (Wang et al., 2016). Las β -queratinas se componen por una única proteína, que conforma los filamentos y la matriz al mismo tiempo (Fraser & Parry, 2011). La masa molecular de las β -queratinas es notablemente menor (10-22 kDa) que las de las α -queratinas (40-68 kDa) (Alibardi et al., 2006), lo que explica el mayor diámetro de los IF en la α -queratina (alrededor de 7 nm) frente a los de la β -queratina (3-4 nm) (Fraser & Parry, 2011).

La principal diferencia que hay entre ambos tipos de queratina se centra en la estructura molecular predominante. La α -queratina se organiza en hélices-alfa, estructura plegada en el espacio de forma helicoidal con giro dextrógiro, cuya estructura se mantiene gracias a los puentes de hidrógeno que se dan entre los aminoácidos que la componen (**Figura I.I**). La estructura del IF se da por la unión de dos monómeros de hélice-alfa, que se superenrollan en el espacio formando un dímero. Estos, a su vez se unen entre sí mediante dos asociaciones, por los extremos y por los laterales, vía puentes disulfuro dando lugar al protofilamento. Este se unirá a otro protofilamento (de nuevo vía puentes disulfuro) para formar la protofibra. Finalmente 4 protofibras se unen entre sí para dar lugar al filamento intermedio, que se compactará de manera helicoidal y pasará a unirse a la matriz (Wang et al., 2016).

Por otro lado, las β -queratinas basan su estructura en láminas beta plegadas formadas por cadenas polipeptídicas paralelas o antiparalelas (estas últimas más estables), de manera que las láminas permanecen unidas gracias a los puentes de hidrógeno que se dan entre aminoácidos. La estructura del filamento de β -queratina radica en 4 cadenas de aminoácidos unidas por enlaces de hidrógeno que forman una lámina plegada, que tenderá a enrollarse en sí misma de forma levógira. Esta se unirá a otra lámina plegada formando un filamento de 4 nm de diámetro (**Figura I.II**). La matriz está formada por los residuos terminales de las láminas plegadas, que se enrollan alrededor de los filamentos y forman una estructura considerada matriz amorfa (Wang et al., 2016).

Degradación de plumas mediante la aplicación de aislados de *Bacillus licheniformis* procedentes de pilas de compostaje de restos vegetales

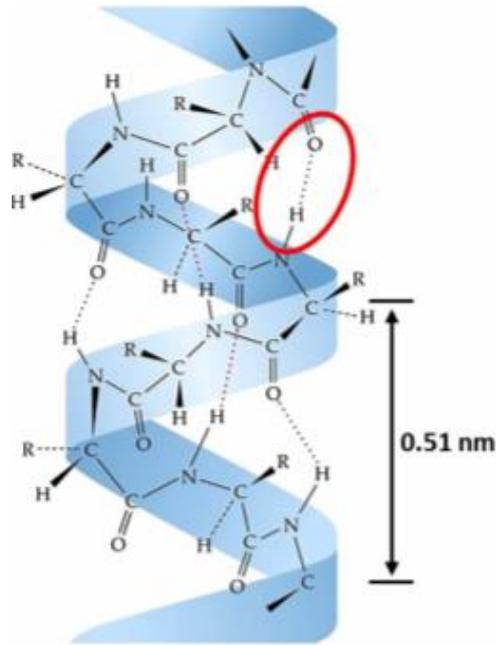


Figura I.I: Modelo de barras de una molécula en conformación hélice-alfa resaltando el enlace de hidrógeno (rodeado en rojo) y la distancia entre hélices (0,51nm), extraído de Wang et al. (2016).

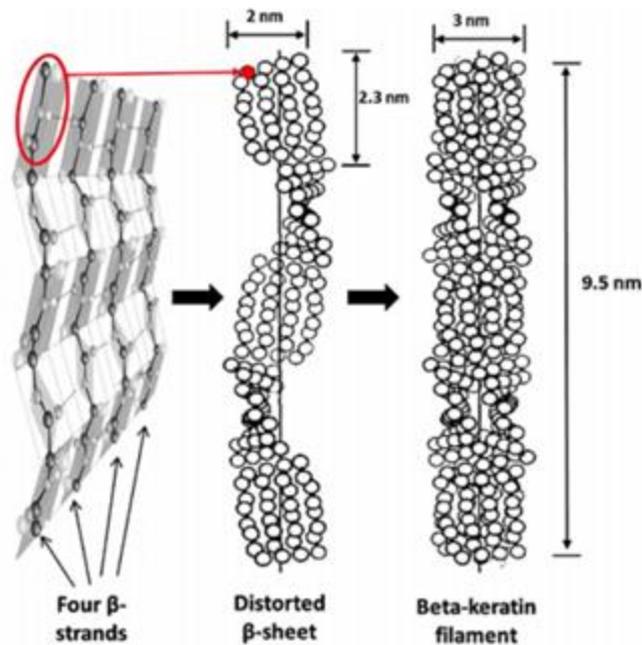


Figura I.II: Dibujo esquemático de la formación de un filamento de beta-queratina. Se puede observar la proteína inicial formada por 4 cadenas de proteínas, dando lugar al plegamiento de la proteína y a su posterior unión con otra lámina beta, creando el IF, extraído de Wang et al. (2016).

Degradación de plumas mediante la aplicación de aislados de *Bacillus licheniformis* procedentes de pilas de compostaje de restos vegetales

La estructura de las plumas de ave se conforma en un 90% por β -queratina (Ashraf et al., 2018), por lo que se tendrá que realizar la búsqueda de microorganismos que contengan enzimas capaces de degradar la queratina organizada en esta conformación. Ambos tipos de queratina no tendrán la misma resistencia ni capacidad para ser hidrolizadas y por tanto no todas las enzimas con capacidad proteolítica de un tipo de queratina serán capaces de degradar el otro tipo.

3- Queratinasas microbianas

Dada la compleja estructura de la queratina, es lógico afirmar que peptidasas comunes y fácilmente extraíbles tales como la pepsina, la tripsina o la papaína no son capaces de hidrolizarla (Williams, 1990). Es por ello por lo que se hace necesario encontrar organismos capaces de hidrolizar la queratina, mediante las denominadas “queratinasas” (Gupta & Ramnani, 2006). La existencia de este tipo de enzimas se hace evidente observando el entorno natural, pues las plumas no se acumulan en la naturaleza, lo que indica que debe de haber algún organismo capaz de descomponer la estructura de la queratina y transformarla en una forma asimilable (Onifade et al., 1998), y todo parece apuntar a que los hongos son los principales responsables del reciclaje de carbono, nitrógeno y azufre proveniente de las queratinas en ambientes naturales (Marchisio, 2000). Los hongos dermatofitos son un ejemplo de microorganismos capaces de crecer en sustratos queratinosos, pues son capaces de parasitar superficies queratinosas de animales vivos, demostrando su capacidad de degradar queratina y utilizarla como fuente de carbono y nitrógeno. No obstante, existen más microorganismos capaces de degradar dicho sustrato tales como hongos saprófitos o parásitos, actinomicetos, algunos bacilos, algunas cepas de *Streptomyces*, incluso la conocida *E. coli* (Onifade et al., 1998).

Concretamente una especie procariota destaca sobremanera en este ámbito, *Bacillus licheniformis*. Esta bacteria fue pionera en utilización de bacterias para la degradación de plumas, más específicamente la cepa PWD-1, aislada en el laboratorio a partir de desechos de plumas (Williams et al., 1990). *Bacillus licheniformis* es una bacteria gram-positiva, formadora de esporas y que, pese a que la mayoría del resto de bacilos son predominantemente aeróbicos, tiene un metabolismo anaeróbico facultativo, permitiéndole por tanto ocupar una cantidad de nichos ecológicos superior. Se trata de una bacteria capaz de generar gran cantidad de enzimas extracelulares, tales como proteasas (entre las que se encuentran las queratinasas), amilasas, β -mananasas, así como algunas pectinasas. Esto genera interés en la aplicación de dicha bacteria en industrias como en la textil, pues la amilasa secretada por la bacteria ayuda a darle el diseño a la tela, además de que puede darle forma al papel y es capaz de hidrolizar el almidón. Además, algunas cepas de *Bacillus licheniformis* son usadas para la producción de antibióticos peptídicos tales como bacitracina y proticina, así como algunos compuestos de interés como el ácido cítrico, inosina y el ácido poliglutámico (Rey et al., 2004).

a) Caracterización molecular de queratinasas

Las queratinasas son proteasas que se encuentran expandidas por la mayoría de los ambientes naturales, debido a que hay gran cantidad de microorganismos capaces de utilizarlas para degradar los sustratos queratinosos y así permitir una nutrición con base en dicho sustrato. En gran parte dicha ubicuidad es debida a que la enzima muestra una estabilidad anormalmente superior en términos de rango de temperaturas y pH (alcalino) con respecto a otras proteasas más comunes (tripsina, papaína, etcétera) (Herzorg et al., 2016). La mayoría de las proteasas capaces de degradar la queratina lo hacen de forma parcial, requiriendo la presencia de otras proteasas queratinolíticas para lograr una completa digestión del sustrato inicial (queratina) (Lange et al., 2016). Este tipo de enzimas parecen ser principalmente activas cuando se encuentran en presencia de queratina, consiguiendo degradar un sustrato tan hidrofóbico y compacto hasta liberar los aminoácidos de forma individual, es decir, consiguiendo una completa digestión del sustrato (Bhari et al., 2018).

La mayoría de las investigaciones muestran que solamente enzimas proteolíticas son capaces de degradar la queratina de forma eficiente, no obstante, debido a la existencia de puentes de hidrógeno y puentes disulfuro se hace evidente la necesidad de que una completa hidrólisis de la queratina requiere de la eliminación de dichos enlaces intramoleculares (Srivastava et al., 2019). Así, se ha relatado que la capacidad de reducir los puentes disulfuro formados en la molécula de queratina determina la actividad queratinasa de una enzima (Ramnani et al., 2005).

Diversos estudios han puesto de manifiesto que existen tanto queratinasas intracelulares como extracelulares, de manera que ambas son capaces de hidrolizar el sustrato de queratina de forma individual. Se puede destacar el estudio de Ramnani et al. (2005), que expone las actividades de ambos tipos de enzimas, así como la actividad de una mezcla de las dos, extraídas de la cepa RG1 de *Bacillus licheniformis*. Como resultado se obtuvo una actividad extracelular muy superior (425 U) a la intracelular (70 U), demostrando la marcada tendencia de dicha enzima a usarse de forma extracelular. No obstante, cuando ambas enzimas se usaron al mismo tiempo la actividad resultó ser máxima (1742 U) con respecto a las anteriores, sugiriendo que ambas enzimas actúan de forma conjunta para adquirir un máximo de actividad. La baja actividad de las enzimas intracelulares de forma singular indica que estas actúan facilitando la digestión de las enzimas (proteasas o queratinasas) extracelulares.

El mecanismo de degradación de la queratina se puede dividir en 2 fases:

1. Reducción de puentes disulfuro: durante esta fase las enzimas disulfuro reductasas producen la rotura de los puentes disulfuro dados entre las moléculas de cisteína que componen la molécula de queratina, liberando grupos tiol (-SH). Esta rotura de puentes disulfuro alteran la configuración de la molécula de queratina, haciéndola menos hidrofóbica y, por tanto, facilitando la unión de proteasas para la degradación de la

Degradación de plumas mediante la aplicación de aislados de *Bacillus licheniformis* procedentes de pilas de compostaje de restos vegetales

cadena polipeptídica (Kunert, 1973). Este es el mecanismo que las enzimas intracelulares utilizan para facilitar la digestión de la queratina a las enzimas extracelulares (Ramnani et al., 2005).

2. Proteólisis: donde las enzimas proteolíticas proceden a la rotura de los enlaces peptídicos dados entre aminoácidos, liberándolos al medio de forma singular o en forma de polipéptidos menos complejos que su sustrato inicial (Kunert, 1973).

Ambos pasos ocurren simultáneamente, pues, aunque la proteína de queratina tenga un nivel de compactación muy alto, algunas zonas de esta son susceptibles a las proteasas sin necesidad de la rotura de los puentes disulfuro. No obstante, sin la reducción de los puentes disulfuro de la molécula no se podrá lograr una completa digestión de la proteína (Ramnani et al., 2005). Esto implica que la completa degradación de la queratina requiere de un organismo vivo con enzimas disulfuro reductoras o bien algunos agentes químicos reductores para que se produzca la reducción de los puentes disulfuro.

En la **Figura I.III** se puede observar una ilustración esquemática del proceso de degradación de la queratina.

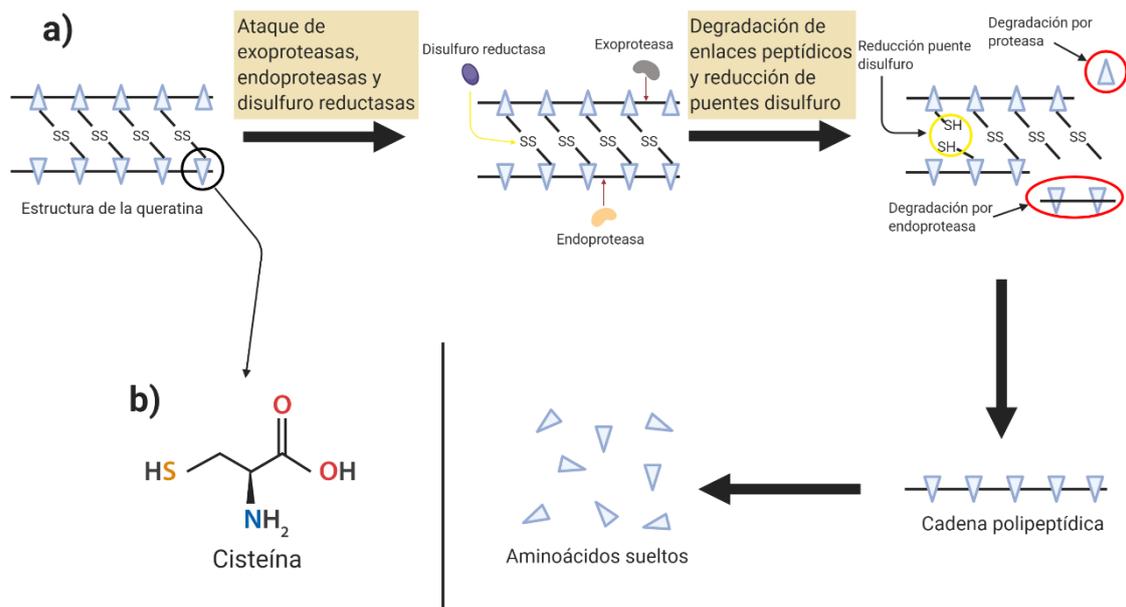


Figura I.III: Mecanismo de degradación de una molécula de queratina: (a) rotura de enlaces peptídicos tanto por exoproteasas como por endoproteasas y reducción de enlaces disulfuro; (b) molécula de cisteína, cuyo grupo tiol (naranja) es responsable de los enlaces disulfuro producidos en la molécula de queratina. Modificado de Srivastava et al. (2019).

b) Utilidad de las queratinasas en la biotecnología

Las extremas condiciones de trabajo que son capaces de soportar este tipo de enzimas anteriormente mencionadas, y su capacidad de degradar moléculas tan compactas y estables como lo es la queratina hacen de las queratinasas unas potenciales enzimas con función proteasa capaces de sustituir a las proteasas convencionales. Esto ha provocado un aumento de interés en las diversas aplicaciones que puede tener este tipo de enzimas (Gupta & Ramnani, 2006).

En un principio, la degradación de queratina se les atribuía principalmente a los hongos productores de queratinasas, aunque nunca se le llegaron a atribuir aplicaciones biotecnológicas a dichos hongos, más bien se les señalaba como microorganismos infecciosos capaces de colonizar superficies cutáneas (Lakshmipathy & Kannabiran, 2010). El interés biotecnológico en estas enzimas surgió tras el aislamiento y estudio de la primera bacteria capaz de degradar un sustrato queratinoso (y, por tanto, recalcitrante) como lo son las plumas, *Bacillus licheniformis* PWD-1 (Williams et al., 1990).

Tras el éxito en el reciclaje de plumas se trataron de buscar diferentes aplicaciones industriales para este tipo de enzimas, así surgieron variantes en diferentes industrias tales como la alimentaria, la de fertilizantes, de detergentes, la industria del cuero, la cosmética y la farmacéutica. La aplicación más prometedora y utilizada hasta el momento es la alimentaria, utilizando sustratos queratinosos para generar un producto rico en proteínas y utilizarlo como suplemento en la alimentación para las actividades ganaderas, a la vez de producir la eliminación del residuo (Gupta & Ramnani, 2006). No obstante, existen muchas más aplicaciones prometedoras de este tipo de sustratos.

El uso de harina de plumas como fertilizante también ha sido estudiado, pues dicho componente, como se menciona anteriormente está basado en proteína, lo que provoca que su contenido en nitrógeno sea relativamente alto (alrededor del 15% de su composición) (Gupta & Ramnani, 2006), además de que dada la poca solubilidad de la harina, la liberación de dicho nitrógeno en el suelo se da de forma lenta, lo que aumenta el interés de su uso como tal (Hadas & Kautsky, 1994). Las ventajas de este uso radican en el bajo coste del producto, su fácil producción, así como su alto contenido nutritivo (Gupta & Ramnani, 2006).

Se ha logrado la producción de pegamentos, revestimientos o películas a partir de sustratos queratinosos tales como pelos de animales, piel, pezuñas, así como plumas, considerándose compostables debido a que diferentes microorganismos con capacidad queratinolítica son capaces de degradarlos (Schrooyen et al., 2001). En el proceso de producción, la composición de la molécula de queratina se altera de manera controlada por medio de queratinasas para producir una conformación estable que permite la fabricación de este tipo de material. El uso de este material podría ayudar a la hora de la transición hacia una tecnología respetuosa con el medio ambiente.

Degradación de plumas mediante la aplicación de aislados de *Bacillus licheniformis* procedentes de pilas de compostaje de restos vegetales

La industria de los detergentes desde siempre ha utilizado en gran medida proteasas (sobre todo alcalinas) para la correcta eliminación de los residuos en la ropa (Gupta et al., 2002), de forma que el descubrimiento de otra enzima con capacidad proteasa con la peculiaridad de degradación de queratina se transforma en una oportunidad para ampliar el alcance de detergentes con base en enzimas, destacando también los altos rangos de temperatura y pH que dichas enzimas son capaces de soportar (Gupta & Ramnani, 2006). La capacidad de las queratinasas de unirse al sustrato queratinoso previo a su degradación aumenta el interés de este tipo de enzimas como detergentes, pues una característica esencial para que puedan actuar como tal es la capacidad de unirse al sustrato adherido a alguna superficie sólida. Dos ejemplos específicos de su uso como detergente son la eliminación del material queratinoso que en ocasiones presentan algunas camisas en la zona del cuello (Gessesse et al., 2003) o su uso para la eliminación de residuos queratinosos acumulados en los desagües obstruidos (Farag & Hassan, 2004).

En la industria del cuero cada vez es más creciente la búsqueda de queratinasas que no tengan capacidad para degradar el colágeno (para evitar degradar el cuero) para poder llevar a cabo de forma sostenible un paso clave en la elaboración de cueros, el precurtido. Los métodos tradicionales conllevan el uso de sulfuros y producen como resultado tanto cal como residuos sólidos que aumentan la demanda química y biológica de oxígeno, siendo por tanto altamente contaminantes (Thanikaivelan et al., 2004). Además, el uso tradicional conlleva la transformación de los pelos que se desean eliminar en una especie de pasta, mientras que, mediante el uso de enzimas, el cuero queda intacto (Pillai & Archana, 2008). Es lógico afirmar entonces que la aplicación de queratinasas en este sector incrementa la calidad del producto, así como reduce el vertido de contaminantes y reduce el gasto de agua en la fábrica, dando lugar a una alternativa muy viable.

En la industria farmacéutica y cosmética podemos encontrar diversas aplicaciones en diferentes campos tales como la degradación de las cicatrices para permitir una regeneración adecuada de la zona epitelial, la prevención de infecciones fúngicas, disolución de la caspa (Chao et al., 2007), la eliminación de los callos, la eliminación de pieles queratinizadas e incluso como tratamiento para el acné o la psoriasis debido a la capacidad para degradar tejidos epidérmicos de mamíferos (Friedrich et al., 2005). También es destacable su posible uso para la depilación, pues se ha demostrado la capacidad de las queratinasas para degradar este tipo de material (Takami et al., 1992). Aunque todavía falta investigación, es destacable la posible transformación de la queratina en péptidos bioactivos que puedan influenciar directamente en el metabolismo de los organismos, actuando como proteínas funcionales (Peng et al., 2020).

Es especialmente destacable la aplicación de las queratinasas en la degradación de priones, partículas proteicas infecciosas responsables de enfermedades neurodegenerativas llamadas encefalopatías espongiiformes transmisibles, que suelen acabar con la vida del huésped. La enfermedad se basa en el resultado de una conversión conformacional de la

proteína PrPc (prion protein), una glicoproteína de membrana cuya expresión es abundante en el sistema nervioso central a otra rica en láminas β (PrPSc) que es resistente a proteasas comunes (Pan et al., 1993). La estructura molecular de PrPSc es por tanto muy parecida a algunas moléculas cuya composición se basa en queratina, como las plumas, por lo tanto, las queratinas capaces de degradar plumas se convierten en potenciales degradadores de priones (Suzuki et al., 2006). La completa eliminación de los priones en un principio requería del uso de métodos físicos-químicos al mismo tiempo que el enzimático (Langeveld et al., 2003). Es por ello, que destaca el estudio de Mitsuiki et al. (2006), en el cual se demuestra la completa eliminación del agente infeccioso del tejido nervioso utilizando únicamente métodos enzimáticos, permitiendo el ahorro del gasto energético que los métodos tradicionales conllevan.

En definitiva, la singular capacidad de degradación de un material como lo es la queratina convierte a las queratinasas en enzimas interesantes biotecnológicamente hablando, pues se trata de un material muy presente en la mayoría de los ambientes y cuya correcta gestión se convierte en algo necesario. No obstante, el mecanismo de queratinolisis aún tiene que ser profundamente estudiado para comprender su funcionamiento y ser capaces de aplicar estas enzimas para obtener los beneficios anteriormente mencionados de manera extensa (Gupta & Ramnani, 2006), al mismo tiempo que se eliminan los residuos, construyendo así industrias respetuosas con el medio ambiente.

4- Bioconversión de plumas de ave mediante queratinasas

Dentro de los residuos cuya composición se basa en queratina, las plumas son, sin duda, el residuo más numeroso debido a las anteriormente mencionadas crecientes actividades ganaderas avícolas (Korniłłowicz-Kowalska & Bohacz, 2011), lo que aumenta el interés en la bioconversión de este tipo de material en vista a posibles aplicaciones. Las aplicaciones más frecuentes tras la degradación de la queratina que se encuentran en las plumas, por medio de microorganismos con actividad queratinasa (**Figura I.IV**), son la producción de sustratos usados como suplementos para la alimentación animal (Onifade et al., 1998), la generación de fertilizantes (Ichida et al., 2001), además la producción de péptidos bioactivos con diferentes funciones.

a) Producción de sustratos con uso para alimentación animal

Tradicionalmente los tratamientos empleados para producir una harina de plumas utilizada como suplemento nutricional en las diferentes dietas de animales eran químicos (Friedrich et al., 1996), tales como el uso del autoclave o de sustancias químicas capaces de transformar la queratina en una forma más fácilmente asimilable, como se menciona anteriormente (Papadopoulos, 1985). El resultado obtenido a través de estos métodos se trata de una una harina, que posibilita su uso como suplemento nutricional, no obstante, éste es considerado de baja calidad debido a sus déficits en aminoácidos esenciales tales como tirosina,

Degradación de plumas mediante la aplicación de aislados de *Bacillus licheniformis* procedentes de pilas de compostaje de restos vegetales

triptófano, metionina y lisina (Friedrich et al., 1996), además del enorme gasto energético que este tipo de tratamientos químicos supone. Esto supuso la búsqueda de alternativas capaces de mantener la calidad nutricional de las plumas, así como de eliminar el costo energético de los métodos tradicionales. La degradación de este tipo de sustratos por medio de microorganismos productores de queratinasas resultó ser la opción más viable. De esta manera diversos autores realizaron ensayos para confirmar la viabilidad del uso de la harina producto de la aplicación de microorganismos con actividad queratinasa utilizándola como suplemento en las dietas de diferentes animales.

El primer intento realizado para evaluar el valor nutricional de la biodegradación de las plumas fue de mano de Elmayergi & Smith (1971) mediante una biodegradación llevada a cabo por *Streptomyces fradiae*. El resultado fue un producto que mostró un incremento en las concentraciones de todos los aminoácidos con respecto a la harina de plumas obtenida mediante los métodos tradicionales. No obstante, la aplicación del producto como alimento para las aves no fue satisfactorio del todo, pues no mostró un aumento significativo en el crecimiento de los pollos, con respecto a las alimentaciones utilizadas tradicionalmente como la basada en harina en base de soja, hecho que se atribuyó al rechazo de los animales por parte del nuevo alimento.



Figura I.IV. Potenciales aplicaciones de los extractos obtenidos tras la biodegradación de las plumas de corral. Modificado de Brandelli et al. (2015).

Degradación de plumas mediante la aplicación de aislados de *Bacillus licheniformis* procedentes de pilas de compostaje de restos vegetales

Tras este experimento, Lin et al. (1992) trataron de aplicar la enzima cruda directamente sobre el sustrato de plumas, para observar si de esta manera aumentaba la digestibilidad de las plumas al uso de suplemento nutricional. El resultado mostró un incremento notable en la digestibilidad de los aminoácidos contenidos en las plumas, no obstante, nuevamente tras su aplicación en las dietas de animales el peso no aumentó tanto como en los animales alimentados con dietas basadas en soja. El uso de la queratinasa purificada mostró unos resultados parecidos en cuanto a valores de digestibilidad, además de demostrar los altos valores de estabilidad de temperatura y de pH de las enzimas queratinasas. Así, la conclusión fue que la aplicación de queratinasas incrementaba la digestibilidad de las plumas, permitiendo una mejora para la fabricación de dietas basadas en este sustrato.

Finalmente, Grazziotin et al. (2006) demostró mediante una digestión *in vitro* del hidrolizado de plumas por medio de queratinasas y utilizando pepsina como enzima, que este tratamiento aumentaba la susceptibilidad al ataque de proteasas comunes como pepsina o tripsina, obteniendo un resultado asimilable por la mayoría de los animales. Esto demostró indiscutiblemente la capacidad de los microorganismos con actividad queratinasa de generar un producto con un alto valor nutritivo utilizando como sustrato las plumas (Onifade et al., 1998).

No todas las queratinasas actúan con la misma eficacia, de forma que habrá algunas cepas que producirán enzimas cuyo producto tendrá un mayor valor nutricional que otras. El uso de las queratinasas producidas por algunas cepas de *Bacillus licheniformis* da como resultado un alimento que requiere del suplemento de metionina, histidina y lisina para asemejarse al de dietas basadas en soja, en términos nutricionales (Grazziotin et al., 2006). Por el contrario, una enzima bifuncional extraída de una especie diferente de *Bacillus* dio muy buenos resultados a la hora de la preparación de una harina con base de plumas (Verma et al., 2017).

El principal problema del uso de las queratinasas, por tanto, radica en el alto precio de adquisición de una enzima capaz de hidrolizar las plumas sin generar ningún déficit de aminoácidos. Esto lleva a las industrias alimentarias a utilizar queratinasas de bajo coste, pues, aunque el producto no tenga el mismo valor nutricional que el utilizado normalmente, las enormes cantidades de plumas que se producen como desecho abaratan el coste del sustrato del cual se obtiene el alimento y por tanto permiten la producción en grandes cantidades (Verma et al., 2017).

b) Generación de fertilizantes

El mencionado alto valor proteico de las plumas hace de ellas una interesante fuente de nitrógeno y por tanto genera expectativas en su uso como fertilizante (Gupta & Ramnani, 2006). El compostaje de este tipo de material por medio de organismos con actividad queratinasa posibilita una liberación del nitrógeno contenido en las plumas de forma lenta. En el estudio de Choi et al. (1996) se demostró que la aplicación del hidrolizado de plumas por medio de *Bacillus*

Degradación de plumas mediante la aplicación de aislados de *Bacillus licheniformis* procedentes de pilas de compostaje de restos vegetales

licheniformis incrementó la concentración de nitrógeno en el medio durante las 8 primeras semanas tras su aplicación en el suelo.

Una correcta aplicación de nitrógeno sobre los cultivos tiene diferentes beneficios como aumentar el crecimiento de la planta, promover las interacciones planta-microbio, mejora la textura y la calidad de la tierra a cultivar y previene la erosión de esta. Tanto un déficit como una sobreabundancia de nitrógeno en la planta genera efectos adversos que disminuyen la producción de esta, luego conviene mantener los valores en un rango óptimo (Pandey et al., 2000). El bajo coste tanto del sustrato en forma de plumas como de las enzimas queratinasas de este tipo hace del uso de este proceso de compostaje y su posterior aplicación en cultivos una opción muy económica y ecológica (Verma et al., 2016).

El ácido indolacético (IAA) produce un aumento y una mejora en el crecimiento y desarrollo de las plantas, pues participa en procesos moleculares como la división y elongación celular, la diferenciación de estas y por tanto la formación de los patrones celulares que darán lugar a los órganos de la planta (Dastager et al., 2010). El triptófano, entre muchos otros se considera un precursor de la formación de auxinas, pues existen varios microorganismos, como es el ejemplo de *Pseudomonas fluorescens*, capaces de generar IAA utilizando como precursor el triptófano (Kochar et al., 2011).

La hidrólisis de plumas produce, entre otras cosas, cantidades abundantes de triptófano, de manera que se convierten en un sustrato apto para la formación de IAA. La mayoría de los microorganismos con capacidad queratinasa son capaces de generar IAA utilizando triptófano como precursor, de manera que a través del uso de estos se pueden generar grandes cantidades de auxinas utilizando como sustrato las plumas. La lenta liberación del triptófano al medio utilizando este método para la generación de IAA produce que una alta concentración de plumas sea requerida para aumentar la síntesis de auxinas. Este método de síntesis de auxinas por medio de microorganismos se convierte en una opción muy barata y viable, teniendo en cuenta el bajo coste del sustrato inicial (Jeong et al., 2010).

Algunas cepas con actividad queratinasa se ha detectado que pueden afectar al crecimiento de la planta mediante la supresión de posibles patógenos en la planta, utilizando antibióticos, amoníaco, sideróforos o enzimas capaces de degradar las paredes celulares tanto de bacterias como de hongos, como pectinasas o lipasas. Jeong et al. (2010) estudiaron la actividad queratinasa, así como la capacidad antifúngica de la cepa SP5 de *Xanthomonas* sp., dando como resultado una actividad enzimática notable, además de la producción de un metabolito soluble capaz de inhibir el crecimiento de bacterias y hongos. Esta capacidad antifúngica hace de esta bacteria una alternativa a los químicos realmente viable y barata.

Muchos nematodos son parásitos de plantas que pueden afectar a las plantas produciendo déficits nutricionales y heridas en las raíces, reduciendo la capacidad de

Degradación de plumas mediante la aplicación de aislados de *Bacillus licheniformis* procedentes de pilas de compostaje de restos vegetales

crecimiento de las plantas, e incluso produciendo la pérdida de cosecha en ocasiones extremas, por lo que, dar con un método eficaz de eliminación de este tipo de parásitos se convierte en algo conveniente. El uso de químicos para impedir este tipo de infecciones es algo común en la agricultura, no obstante, la alta toxicidad de estos químicos en animales y humanos genera altas restricciones a la hora de su uso, prohibiendo su uso en varias ocasiones. Para cambiar esta dinámica, Yue et al. (2011) propusieron el uso de queratinasas extraídas de *Bacillus* sp. para evaluar la supresión de *Meloidogyne incógnita* (parásito de plantas), ya que la cutícula se compone por colágeno y queratina. El resultado fue satisfactorio pues, tras 24 horas se observó cierta degradación de la cutícula, abriendo una posibilidad viable para sustituir a los pesticidas químicos. No obstante, es necesaria más información e investigación al respecto para ser capaces de afirmar la viabilidad del proceso.

En definitiva, el alto valor nutricional de las plumas permite que una correcta aplicación de estas, unidas a microorganismos capaces de degradar su compleja estructura sean una potente fuente de nutrientes para las plantas. Además, la producción de IAA, así como ciertas sustancias con capacidad de eliminar a los posibles patógenos de la planta por parte de estos mismos microorganismos aumenta las aplicaciones a su uso.

c) Producción de péptidos y otras sustancias de valor añadido

Dependiendo de las condiciones de hidrólisis de las plumas, así como de los microorganismos empleados para el proceso, se pueden obtener péptidos bioactivos con diferentes capacidades. Normalmente, la actividad de este tipo de proteínas se da en proteínas de bajo peso molecular, cuya estabilidad normalmente suele aumentar conforme más hidrofóbica sea la proteína. La queratina es especialmente conocida por su alta hidrofobicidad, de manera que una correcta hidrólisis de esta se convierte en algo necesario si se desea la producción de péptidos bioactivos, y esto depende de la especificidad de la enzima utilizada (Phelan et al., 2009; Sarmadi & Ismail, 2010). Así se han descrito péptidos de diferentes tipos con diferentes actividades como antioxidante, antihipertensivo, antidiabético y antienvjecimiento utilizando plumas como sustrato principal (De Oliveira et al., 2020).

Los aminoácidos y péptidos resultado de la hidrólisis de las plumas pueden reaccionar con los radicales libres, formando así productos estables, actuando como agente reductor y por tanto impidiendo la oxidación. Esto potencia el uso del hidrolizado de plumas como alimento para los animales, pues además del alto valor proteico, pueden actuar como antioxidante, mejorando la calidad del producto. Además, aplicándose este producto sobre la comida tradicional para animales, se protege de la oxidación del producto, permitiendo una vida útil más larga. La aplicación del hidrolizado de plumas por medio de queratinasas extraídas de *Bacillus pumilus* en dietas de peces criados mediante acuicultura ha demostrado un mayor crecimiento en los peces, además de la retención por parte de estos de los péptidos con carácter

Degradación de plumas mediante la aplicación de aislados de *Bacillus licheniformis* procedentes de pilas de compostaje de restos vegetales

antioxidante, por lo que, de cara al consumidor, la aplicación de este tratamiento produce un aumento de la calidad del producto (Fakhfakh et al., 2011).

El hidrolizado de plumas ha demostrado inhibir la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), responsable de la conversión de angiotensina I hasta angiotensina II (un vasoconstrictor potente), además de degradar bradiquinina (vasodilatador). Esto permite que mediante la correcta aplicación de este producto se pueda conseguir un control de la presión sanguínea, aplicable para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares pues actúa reduciendo la hipertensión (Fontoura et al., 2014). Se ha descrito que la inhibición de este tipo de tratamientos es comparable a la que se produce mediante la aplicación del producto de fermentación de los derivados lácteos, cuya actividad inhibitoria de ACE ha sido comprobada con éxito (Pihlanto et al., 2011).

La enzima dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4) es conocida por su rápida degradación de incretinas *in vivo*, sustancias que estimulan la segregación de insulina, entre otras cosas. El péptido similar al glucagón tipo 1, una incretina que en un funcionamiento normal actúa regulando la concentración de glucosa en el medio, tiene una vida útil muy corta debido a la anteriormente mencionada enzima, de forma que su rápida degradación promueve un aumento de concentración de glucosa en sangre. La inhibición de esta enzima se convierte, por tanto, en un objetivo en vista a tratamientos para la diabetes tipo II, donde episodios de hiperglucemia son muy comunes. La aplicación de este tipo de inhibidores ha resultado en una mejora para el control de la hiperglucemia en este tipo de casos (McIntosh et al., 2005). Los productos de hidrólisis de plumas por medio de determinados organismos son capaces de actuar como inhibidores de DPP-4 (Fontoura et al., 2014), lo que los convierte en un potencial tratamiento para la diabetes.

Moléculas obtenidas de la fermentación de plumas por medio de *Fervidobacterium islandicum* en altas temperaturas, seguidos por una ultrafiltración han demostrado una débil inhibición de la actividad de las melaninas (Yeo et al., 2018), cuya excesiva producción puede causar ciertos desórdenes en la pigmentación de la piel (Briganti et al., 2003). Estos péptidos, además, han tenido un resultado exitoso en la supresión de la expresión de metaloproteinasas de tipo 1 y 13 inducidas por rayos ultravioleta B, que son los principales responsables del envejecimiento de la piel. Por tanto, una correcta aplicación de este tipo de moléculas en la piel puede favorecer el antienvjecimiento de esta, además de ser capaz de impedir desórdenes tales como la hiperpigmentación de la piel, por lo que su uso como cosmético se convierte en algo interesante (Yeo et al., 2018).

II. Objetivos

Este trabajo se enmarca dentro de las diversas aplicaciones que derivan de la creación de una colección de cepas tipo aisladas de los procesos de compostaje dados en residuos vegetales del proyecto AGL2009-08405 del Ministerio de Economía y Competitividad. Las numerosas aplicaciones que surgen como consecuencia del producto obtenido tras la hidrólisis de plumas de ave por medio de microorganismos promueven la búsqueda de cepas capaces de degradar las plumas de forma óptima. Dentro de la amplia colección de cepas que posee el grupo de investigación BIO-175 de la Universidad de Almería existen numerosos aislados de *Bacillus licheniformis*, y dado que esta bacteria ha demostrado su capacidad de degradación de plumas por medio de queratinasas, la búsqueda de las cepas con mayor actividad queratinolítica dentro de la colección resulta de gran interés.

Así, el objetivo principal de este trabajo fue la búsqueda y selección de las cepas de *Bacillus licheniformis* procedentes de pilas de compostaje de restos vegetales con mayor capacidad de degradación de plumas de ave.

Para lograr el objetivo principal se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Detectar la producción de queratinasas entre cepas aisladas en procesos de compostaje mediante ensayos cualitativos.
2. Evaluar el contenido en proteínas del extracto enriquecido en plumas de ave obtenido tras el periodo de incubación.
3. Cuantificar la actividad queratinasa producida por las cepas seleccionadas a partir del ensayo cualitativo.
4. Determinar la degradación de plumas de ave utilizadas como sustrato para *Bacillus licheniformis*.

III. Materiales y Metodología

1- Materiales del estudio

La queratina requerida a lo largo de todo el estudio se extrajo de plumas de ave. La obtención de dichas plumas se realizó mediante su compra a granel a un distribuidor externo a la Universidad de Almería. La situación ideal habría sido su obtención por medio de un matadero de aves donde este material se acumula en forma de residuo, no obstante, la dificultad de disponibilidad con este tipo de empresas dificultó su adquisición y se optó por la compra. El material, dado que su distribución se dirige principalmente a la producción de cojines, almohadas, sofás, etcétera, recibe un tratamiento previo a su venta en el cual las plumas de ave

Degradación de plumas mediante la aplicación de aislados de *Bacillus licheniformis* procedentes de pilas de compostaje de restos vegetales

se desengrasan y se lavan hasta quedar totalmente blancas. Este paso de lavado de las plumas era necesario para los posteriores experimentos según exponen la mayoría de los ensayos que utilizan las plumas como fuente de queratina (Saber et al., 2010; Mazotto et al., 2011; Bhari et al., 2018), luego este paso no fue necesario llevarlo a cabo en el presente experimento.

Tras la obtención de las plumas se procedió a la molienda de estas por medio de una trituradora perteneciente al grupo de investigación BIO-175 del Área de Microbiología de la Universidad de Almería, para facilitar sus posteriores aplicaciones en la creación de medios de cultivo, pues además de facilitar la manipulación del sustrato, permite una mayor dispersión del material en medio acuoso para su uso como componente para medio de cultivo. El resultado de la molienda es una especie de pelusa que permite una mayor compactación del material y por tanto hace de su almacenaje una tarea más fácil.

2- Medios de cultivo

Los medios de cultivo empleados a lo largo del estudio se relacionan a continuación:

Medio APHA

En la Tabla III.I se describen los componentes del medio APHA, el cual se utilizó para facilitar la manipulación de las cepas con las que se trabajó durante la realización del estudio tras su siembra:

Componente	Cantidad (g/L)
Glucosa	1
Agar bacteriológico	15
Extracto de levadura	2,5
Enzima digestiva caseína	5

Tabla III.I. Componentes del medio APHA.

El medio de cultivo fue utilizado tanto para el cultivo en placa como para el cultivo en tubo de agar inclinado. Para las placas se pesaron 17,625 g de APHA (Panreac) y 3,75 g de agar bacteriológico (Panreac), utilizado como refuerzo, en dos matraces de 1 L, añadiendo 0,75 L de agua destilada utilizada como disolvente en cada uno de ellos. Así se obtiene 1,5 L de medio que se llevó a esterilización en autoclave a 1 atm de presión durante 20 minutos y que tras su enfriado se vertió en placa. Para los tubos de agar inclinado se prepararon 0,25 L de medio en un vaso de precipitado y se calentó en el microondas hasta su ebullición, para proceder al llenado de los tubos con la ayuda de un embudo y un dosificador. Posteriormente fueron tapados con tapones de celulosa y se llevaron a esterilización bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas en el autoclave. Finalmente, tras 20 minutos de tratamiento se inclinaron hasta su solidificación.

Medio agar plumas

Para obtener un resultado cualitativo de la capacidad de degradación de queratina por parte de las cepas de *Bacillus licheniformis* de actividad proteasa conocida previamente (López-González et al., 2014) se procedió a la elaboración de un medio de cultivo cuya única fuente de carbono y nitrógeno eran las plumas molidas, de manera que cualquier microorganismo capaz de crecer en dicho medio debía de hacerlo hidrolizando la queratina contenida en las plumas mediante queratinasas, demostrando por tanto su actividad queratinolítica.

La composición inicial de este medio se muestra en la tabla III.II:

Componente	Cantidad (g/L)
NaCl	0,5
KH ₂ PO ₄	0,7
K ₂ HPO ₄	1,4
MgSO ₄	0,1
Plumas de ave molidas	10
Agar bacteriológico	20

Tabla III.II. Componentes del medio agar de plumas. Inspirado en Cai et al. (2008).

Se preparó un total de un litro de medio de plumas en primera instancia, mezclando los componentes en un matraz de 1 L de capacidad y esterilizándolo en el autoclave durante 20 minutos para su posterior vertido en placa. Dicho vertido se realizó en una etapa más temprana de enfriamiento, pues el medio, al contener pluma molida es particularmente denso y su solidificación se da antes que el medio APHA.

El resultado obtenido no fue del todo satisfactorio, pues la alta concentración de pluma molida en el medio aumentó la opacidad del medio, impidiendo la correcta visualización de crecimiento de microorganismos o la degradación de queratina en el medio. Se procedió por tanto a la determinación de una concentración de pluma molida adecuada para permitir una fácil caracterización cualitativa.

Para ello se usaron 4 matraces de 250 mL para preparar 150 mL de medio con concentración de pluma molida diferente. En cada matraz de añadieron 0,075 g de NaCl, 0,105 g de KH₂PO₄, 0,21 g de K₂HPO₄, 0,04 g de MgSO₄ y 3 g de agar bacteriológico (Panreac). Una vez obtenidos los matraces con las sales correspondientes y el agar se realizaron los cálculos para la preparación de 4 concentraciones diferentes de pluma molida. Las concentraciones y cantidades añadidas a cada matraz se muestran en la **Tabla III.III:**

Degradación de plumas mediante la aplicación de aislados de *Bacillus licheniformis* procedentes de pilas de compostaje de restos vegetales

Concentración pluma molida (g/L)
2
4
6
8

Tabla III.III. Cantidades de pluma molida ensayadas.

Se añadieron 150 mL de agua destilada y se procedió a su esterilización en autoclave durante 20 minutos para su posterior vertido en placa. Se obtuvieron así varias placas con medio agar pluma a diferentes concentraciones de dicho sustrato. Se tomaron fotografías de los resultados obtenidos para cada medio, utilizando una cepa caracterizada como productora de queratinasas cualitativamente para comprobar la correcta visualización del crecimiento microbiano. Las fotografías se tomaron con una cámara Canon EOS 450D EF-S 18-55 IS kit a través de disparo remoto acoplado a un ordenador Sony Modelo PCG-7V5M y fueron transferidas y procesadas por el software EOS utility.

Las placas que mejor visualización permitían del crecimiento bacteriano, así como del halo de aclaramiento producido por la actividad queratinasa fueron las que tenían una concentración de 6 g/L de pluma molida, como se muestra en el Anexo de esta memoria. Así, se procedió a la preparación de 1 L de medio agar plumas para su vertido en placa con una concentración de 6 g/L de pluma molida y las concentraciones de sales que aparecen en la **Tabla III.II**, utilizando el mismo procedimiento descrito anteriormente.

Medio de enriquecimiento

Este medio de cultivo líquido se utilizó para asegurar un crecimiento exponencial de las cepas seleccionadas. Su composición se detalla en la **Tabla III.IV**:

Componente	Cantidad (g/L)
Glucosa	10
Peptona	10
Extracto de levadura	3
CaCl ₂	2

Tabla III.IV. Composición del medio de enriquecimiento.

Para la preparación de 750 mL de este medio se utilizó un vaso de precipitado de cristal de 1 L de capacidad, en el cual se añadieron las cantidades correspondientes adecuadas de cada componente para disolverlos en 750 mL de agua destilada. Tras esto se distribuyeron en 15 matraces de 250 mL con 50 mL de medio de enriquecimiento cada uno, para ser esterilizados en el autoclave.

Degradación de plumas mediante la aplicación de aislados de *Bacillus licheniformis* procedentes de pilas de compostaje de restos vegetales

Medio de plumas líquido

Este medio se utilizó para la determinación de queratinas y contenido en proteínas. Su composición se detalla en la tabla III.V:

Componente	Cantidad (g/L)
NaCl	0,5
KH ₂ PO ₄	0,7
K ₂ HPO ₄	1,4
MgSO ₄	0,1
Plumas de ave	20

Tabla III.V. Composición del medio de plumas líquido.

La preparación se realizó de la misma manera que en el medio de enriquecimiento, de manera que se obtuvieron 15 matraces de 250 mL con 50 mL de medio de plumas en cada uno.

3- Diseño experimental

Los experimentos llevados a cabo a lo largo de la realización del presente trabajo siguen el patrón descrito en la **Figura III.I:**

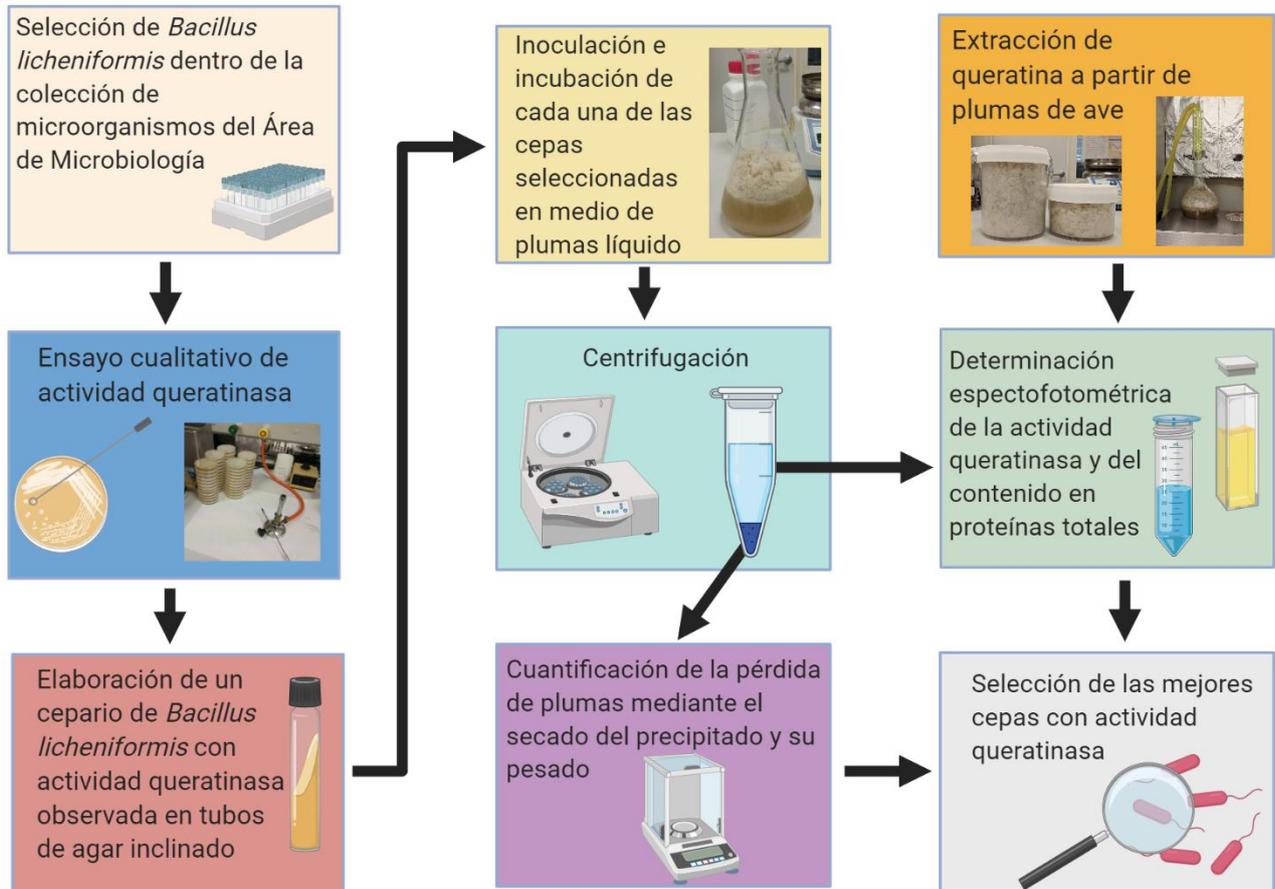


Figura III.I. Diseño experimental llevado a cabo durante el proyecto.

4- Selección de cepas productoras de queratinasas

Para seleccionar las cepas productoras de queratinasas, en primer lugar, se seleccionaron todas los aislados de *Bacillus licheniformis* procedentes de pilas de compostaje elaboradas con restos lignocelulósicos recopilados por el grupo de investigación BIO-175 del Área de Microbiología de la Universidad de Almería. Estas bacterias previamente fueron caracterizadas extensamente de forma enzimática (López-González et al., 2014) y molecular (López-González et al., 2015a, b), por lo que los microorganismos seleccionados tenían una capacidad proteasa confirmada previa a este estudio. En este trabajo se le realizó el ensayo cualitativo a un total de 56 aislados de *Bacillus licheniformis* de la colección. La información de estas cepas se recoge en la **Tabla III.VI**:

Id General	Código	Identidad	%Id Ez
2	AM-MPR-1A-02	<i>Bacillus licheniformis</i>	100
229	AM-TER2A-2B-07	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,64
230	AM-TER2A-2B-08	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,89
252	AM-TER2A-3B-09	<i>Bacillus licheniformis</i>	100
685	AM-MES6-1A-01	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,67
699	AM-MES6-1A-15	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,78
773	AM-MES6-3A-06	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,63
855	AM-MES7-2B-04	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,85
1006	AM-MAD2-1B-08	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,68
1014	AM-MAD2-2A-08	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,47
1054	AM-PRF-2A-07	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,36
1074	AT-MPR-1A-01	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,19
1075	AT-MPR-1A-02	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,17
1079	AT-MPR-1A-06	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,53
1083	AT-MPR-1B-03	<i>Bacillus licheniformis</i>	97,14
1089	AT-MPR-2A-01	<i>Bacillus licheniformis</i>	97,46
1092	AT-MPR-2A-04	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,52
1102	AT-MPR-2B-06	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,78
1112	AT-MPR-3A-05	<i>Bacillus licheniformis</i>	98,77
1116	AT-MPR-3B-03	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,03
1122	AT-MPR-3B-09	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,89
1124	AT-MESA1-1A-02	<i>Bacillus licheniformis</i>	100
1125	AT-MESA1-1A-03	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,56
1128	AT-MESA1-1A-06	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,78
1131	AT-MESA1-1B-03	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,77
1147	AT-MESA1-2B-05	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,04
1160	AT-MESA1-3A-09	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,68
1161	AT-MESA1-3A-10	<i>Bacillus licheniformis</i>	100
1171	AT-TER1A-1A-01	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,78
1175	AT-TER1A-1A-05	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,45
1179	AT-TER1A-1A-09	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,43

Degradación de plumas mediante la aplicación de aislados de *Bacillus licheniformis* procedentes de pilas de compostaje de restos vegetales

Id General	Código	Identidad	%Id Ez
1208	AT-TER1A-2A-05	<i>Bacillus licheniformis</i>	100
1216	AT-TER1A-2A-13	<i>Bacillus licheniformis</i>	100
1233	AT-TER1A-3A-03	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,07
1238	AT-TER1A-3A-08	<i>Bacillus licheniformis</i>	100
1253	AT-TER1B-1A-02	<i>Bacillus licheniformis</i>	100
1258	AT-TER1B-1A-07	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,25
1263	AT-TER1B-1B-01	<i>Bacillus licheniformis</i>	100
1268	AT-TER1B-2A-01	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,89
1278	AT-TER1B-2A-11	<i>Bacillus licheniformis</i>	100
1300	AT-TER1B-3B-03	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,89
1308	AT-MESD1-1A-04	<i>Bacillus licheniformis</i>	100
1337	AT-MESD1-2B-03	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,8
1344	AT-MESD1-3A-03	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,04
1354	AT-MESA2-1A-03	<i>Bacillus licheniformis</i>	100
1407	AT-TER2A-1A-03	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,69
1421	AT-TER2A-1B-05	<i>Bacillus licheniformis</i>	98,71
1422	AT-TER2A-1B-06	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,63
1442	AT-TER2A-3A-01	<i>Bacillus licheniformis</i>	100
1448	AT-TER2A-3A-07	<i>Bacillus licheniformis</i>	100
1460	AT-TER2A-3B-10	<i>Bacillus licheniformis</i>	100
1465	AT-TER2B-1A-03	<i>Bacillus licheniformis</i>	100
1474	AT-TER2B-1B-06	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,21
1553	AT-MESA3-1A-08	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,2
1582	AT-MESA3-3A-01	<i>Bacillus licheniformis</i>	100
1594	AT-MESA3-3B-03	<i>Bacillus licheniformis</i>	100

Tabla III. VI. Cepas de *Bacillus licheniformis* utilizadas a lo largo del ensayo. % Id representa la similitud a la especie de referencia en EZTaxon en la secuencia del gen ribosomal 16S.

La producción de queratinasas se evaluó de manera cualitativa, mediante la siembra de las cepas seleccionadas en medios de agar pluma. Para agilizar el proceso cada placa de agar plumas se dividió en 4 cuadrantes, mediante 2 líneas perpendiculares, de manera que en cada uno de los cuadrantes se procedería a la siembra de cada una de las cepas. La siembra (**Figura III.II**) se realizó por estría simple en cada uno de los cuadrantes, diferenciando el espacio dado para cada cepa, pues previo a la siembra se rotuló cada uno de los cuadrantes con la cepa correspondiente a cada uno de ellos.

Degradación de plumas mediante la aplicación de aislados de *Bacillus licheniformis* procedentes de pilas de compostaje de restos vegetales

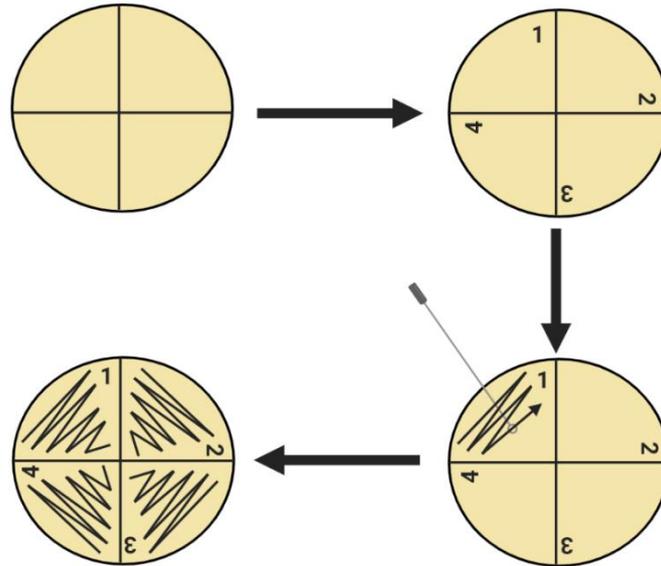


Figura III.II. Siembra en placa por cuadrantes realizada para la determinación cualitativa de la presencia de queratinasas en los microorganismos.

Tras 48 horas de incubación a 30 °C se procedió al visualizado y fotografiado de las placas, para ser capaces de medir de forma estándar el crecimiento microbiano. Las fotografías se tomaron de igual manera que el que se describe para la selección de la concentración de plumas que permite una fácil determinación de producción de queratinasas en ensayo cualitativo. Las cepas productoras de queratinasas fueron capaces de crecer utilizando como fuente de carbono las plumas de ave contenidas en el medio y se consiguió observar dicho crecimiento microbiano, así como un halo de aclaramiento alrededor del mismo como se muestra en la **Figura III.III:**

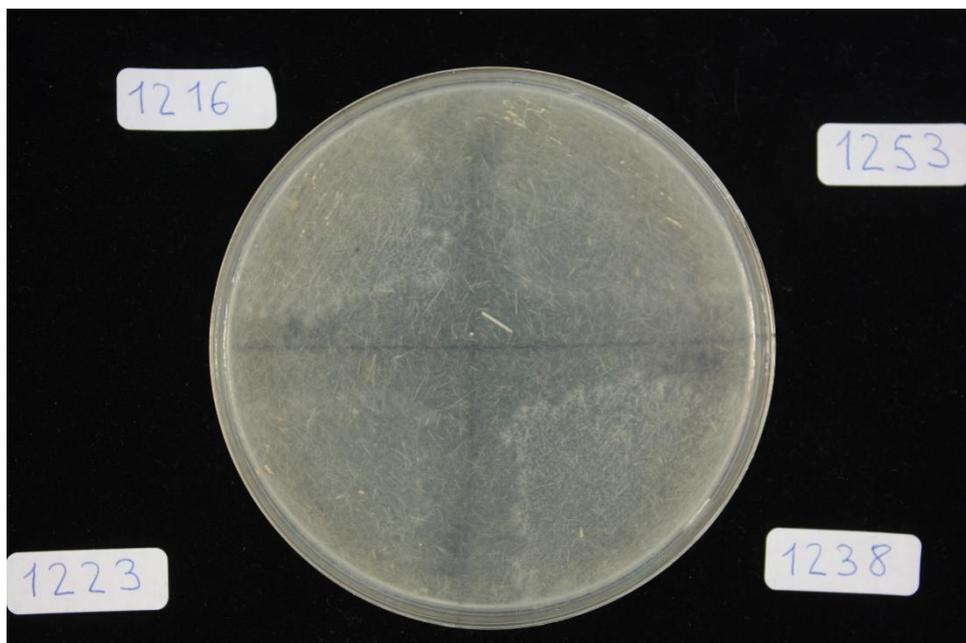


Figura III.III. Ejemplo del crecimiento de *Bacillus licheniformis* en placas de agar pluma.

Degradación de plumas mediante la aplicación de aislados de *Bacillus licheniformis* procedentes de pilas de compostaje de restos vegetales

El resto de las fotografías realizadas para cada una de las cepas seleccionadas se encuentra en el Anexo del presente Trabajo Final de Grado.

Este ensayo permitió hacer una selección cualitativa de las cepas productoras de queratinasas, en base a su observación, además de hacer una idea inicial de las cepas que tienen un mayor potencial a la hora de la producción de estas. Se puede afirmar que una cepa que presente mayor crecimiento y mayores halos de aclaramiento habrá crecido más cómodamente en este medio cuya única fuente de carbono y nitrógeno se obtiene mediante la degradación de queratina, demostrando por tanto una mayor actividad queratinasa.

5- Obtención de queratina a partir de plumas de ave

Para la extracción de queratina contenida en las plumas de ave lavadas y desgrasadas se procedió siguiendo el método descrito en Mazzoto et al. (2011). Para ello, se pesaron 10 g de plumas en un matraz de 1 L de capacidad y se le añadieron 500 mL de dimetilsulfóxido (Panreac), llevándolo a un condensador de reflujo y elevando la temperatura hasta los 100 °C durante 80-120 minutos, lo que permitió la liberación de queratina de las plumas. La queratina se precipitó mediante la adición de dos volúmenes de acetona en frío (1 L) y se mantuvo a -70 °C durante 24-48 horas. Para la recolección de los precipitados de queratina se procedió mediante su centrifugación (15 minutos a 2000 g) y su reiterado lavado con agua destilada. El precipitado lavado así se dejó secar durante 48 horas en una cámara a 37 °C.

El resultado fue un polvo con gran concentración de queratina, que se usará posteriormente para los análisis cuantitativos de actividad queratinasa.

6- Inoculación e incubación de las cepas seleccionadas en medio de plumas y centrifugación

Para ser capaces de obtener un extracto con gran concentración de queratinasas, así como cuantificar la cantidad de pluma consumida durante la incubación se procedió a la inoculación de las cepas con mayor actividad cualitativa observada para promover la producción de queratinasas.

Para ello, en primer lugar, se procedió a la preparación del inóculo, cogiendo 15 matraces de 250 mL y añadiendo 50 mL de medio de enriquecimiento en cada uno. Tras esto, cada matraz se inoculó con cada una de las cepas de *Bacillus licheniformis* con mayor actividad queratinasa observada en los ensayos cualitativos, cogiendo con el asa de siembra colonias separadas de la cepa en cuestión y resuspendiéndolas en el matraz, que se dejó en incubación 48 horas a 30 °C en agitación a 180 rpm. Simultáneamente se procedió a la preparación de 15 matraces de 250 mL de medio de plumas líquido, añadiendo 50 mL de medio en cada uno, lo que corresponde a la adición de 1 g de pluma molida para alcanzar los 20 g/L.

Degradación de plumas mediante la aplicación de aislados de *Bacillus licheniformis* procedentes de pilas de compostaje de restos vegetales

Tras el periodo de incubación se procedió a la inoculación de los matraces con medio de plumas. Para ello se incorporó el 5% del volumen de los matraces con medio de enriquecimiento previamente inoculados (2,5 mL) en los matraces con medio de plumas y se dejó incubar de nuevo durante 24 horas a 30 °C en agitación a 180 rpm.

El contenido obtenido tras la incubación se separó en 2 fases mediante centrifugación a 5000 g durante 15 minutos. De esta manera se obtuvo un precipitado con las plumas que no llegaron a ser hidrolizadas y un extracto en el cual estarán contenidas las queratinasas producidas por el microorganismo como respuesta al contacto con un material queratinoso, así como otras proteínas y aminoácidos en disolución.

7- Determinación del contenido proteico total del extracto

Para la determinación del contenido de proteínas totales de los extractos recogidos tras la incubación se siguió el protocolo de Lowry (Herbert et al., 1971). Este protocolo consiste en la preparación de una recta de calibrado que permitirá establecer un valor a la concentración de proteínas de cada extracto, de manera que su seguimiento se dividió en 2 partes:

Preparación de la recta de calibrado

Para la preparación de la recta de calibrado se partió de una solución de seroalbúmina bovina (SIGMA-ALDRICH) en 0,5 M K_2SO_4 , de forma que se adecuó una solución madre con 1 mg/mL a partir de la cual se prepararon concentraciones crecientes de 25, 50, 75 y 100 μ g/mL. De cada una de las soluciones se extrajo 1 mL y se llevó a tubos de ensayo separados, añadiéndole 2,5 mL del reactivo A, compuesto por una mezcla de 50 mL de Na_2CO_3 al 5% en H_2O y 2 mL de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ al 0,5% en solución al 1% de tartrato potásico, preparada utilizando H_2O como disolvente para agitar vigorosamente para dejarlo reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras esto se incorporaron 0,5 mL del reactivo B, o reactivo de Folin-Ciocalteu diluido en proporción 1:1 en H_2O , que será el que le proporcionará la coloración azul intensa proporcional a la cantidad de proteínas en el extracto. Tras su homogeneización se dejó reposar de nuevo durante 30 minutos a temperatura ambiente, para proceder a la centrifugación de 1 mL de la solución en tubos eppendorf a 5000 rpm durante 5 minutos. El contenido del sobrenadante se llevó a cubetas para posibilitar su medida en un espectrofotómetro a 640 nm, cuantificando la coloración azul producida por la reacción de las proteínas contenidas con los reactivos. Tras la medida de la absorbancia se procedió a la construcción de la recta de calibrado, estableciendo una relación entre la concentración conocida y la absorbancia medida.

Protocolo para las muestras

Para la preparación de las muestras se procedió de igual manera, de forma que se tomó 1 mL de cada uno de los extractos y se les añadieron 2,5 mL de reactivo A, dejándolo reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente tras su homogeneización. Pasado ese tiempo se le añadieron 0,5 mL del reactivo B, agitando la muestra vigorosamente para dejarlo reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente y se realizó la centrifugación (5000 rpm, 5 minutos). El sobrenadante, igual que en la recta de calibrado se llevó a una cubeta para su determinación de absorbancia a 640 nm en un espectrofotómetro.

8- Determinación espectrofotométrica de la actividad queratinasa

La actividad queratinasa se cuantificó según el método descrito por Cai et al. (2008). Para ello, en primer lugar, se procedió a la preparación de una solución de queratina, disolviendo 1 g del polvo obtenido en la extracción de queratina mencionada anteriormente con 20 mL de NaOH 0,05 M, y ajustando el pH a 8 mediante la adición de HCl. Tras esto, 1 mL del extracto de enzima cruda de cada cepa seleccionada obtenido tras la centrifugación se diluyó en tampón TRIS-HCl (0,05 M, pH = 8) y se incubó con 1 mL de la solución de queratina a 50 °C en baño María durante 10 minutos. Tras el periodo de incubación la reacción se detuvo con la adición de 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,4 M para llevar el extracto a centrifugación (1450 rpm, 30 minutos). El sobrenadante obtenido se retiró para medir su absorbancia a 280 nm y compararlo con el blanco de cada enzima, elaborado bajo las mismas condiciones de incubación de los extractos de queratinasas, pero añadiendo el TCA antes de la incubación a 50 °C.

Una unidad de actividad queratinasa se puede definir como un incremento de absorbancia a 280 nm con respecto a la obtenida midiendo el control, aumentando 0,01 U por minuto. El valor se determinó aplicando la siguiente fórmula:

$$U = \frac{4xnxA_{280}}{0,01x10}$$

Donde n es la ratio de dilución, 4 es el volumen final de reacción en mL, 10 es el tiempo de reacción y A_{280} es la absorbancia medida a 280nm.

9- Determinación de la pérdida de plumas producida durante la incubación

Para cuantificar la cantidad de pluma que cada cepa fue capaz de degradar en las 24 horas de incubación establecidas, sabiendo que en cada matraz se añadió 1 g exacto de pluma molida, se pesaron las plumas que no fueron hidrolizadas para el ensayo de cada cepa. Así, el precipitado de cada uno de los matraces incubados en medio líquido de plumas obtenido tras la centrifugación se retiró de los tubos de centrífuga y se dejó secar a 80 °C durante 24 horas hasta perder completamente el agua que contenía. Una vez secos se procedió al pesado de cada uno de ellos, de forma que la pérdida de plumas se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Pérdida de plumas (g)} = 1 - \text{masa precipitado seco (g)}$$

Así, se podrá confirmar que, a mayor pérdida de plumas dada durante el periodo de incubación, mayor será la actividad queratinasa y por tanto la capacidad de degradación de sustratos queratinosos de la cepa en cuestión.

IV. Resultados y Discusión

Una vez planteados los objetivos del trabajo y realizados los experimentos planteados según el diseño experimental ilustrado en la **Figura III.I.**, los resultados obtenidos en cada tramo del estudio, así como la discusión de estos se relatan a continuación, comenzando por la selección de las cepas de *Bacillus licheniformis* con mayor actividad queratinasa en base a ensayos cualitativos y seguido por la determinación de la actividad queratinasa, el contenido de proteínas totales y la cantidad de plumas degradada.

Hay que resaltar en primer lugar, que cada cepa empleada en el presente estudio, de *Bacillus licheniformis*, ha sido en primer lugar seleccionada en trabajos previos como productora de enzimas proteasas (López-González et al., 2014) y, en segundo lugar, identificada molecularmente como parte de la especie *Bacillus licheniformis* (López-González et al., 2015a). Pese a lo anterior, cada cepa procede de diferentes puntos de procesos de compostaje y fueron consideradas como morfotipos distintos por el equipo microbiólogo que la aisló; de hecho, cada una de ellas, pese a las características comunes, presenta un perfil enzimático distinto (López-González et al., 2014), que permite que se consideren cepas diferentes de la misma especie.

1- Selección del cepario de estudio de *Bacillus licheniformis* en base a métodos cualitativos de degradación de plumas de ave

La determinación de producción de queratinasas de forma preliminar y cualitativa, se realizó en base a la observación del crecimiento microbiano en la placa de agar pluma (dado que la única fuente de carbono y nitrógeno de este medio está en la pluma, cualquier microorganismo capaz de proliferar en el medio debe de ser mediante la hidrólisis de dichas plumas) y observación de halos de aclaramiento alrededor de dicho crecimiento.

Para la selección de las cepas con mayor actividad se procedió a la visualización de cada una de las placas del ensayo obtenidas tras el periodo de incubación, tanto de en fotografía (tomadas del mismo modo que se describe anteriormente) como en vivo. Los resultados obtenidos se muestran en las **Figuras IV.I – IV.III**

Degradación de plumas mediante la aplicación de aislados de *Bacillus licheniformis* procedentes de pilas de compostaje de restos vegetales

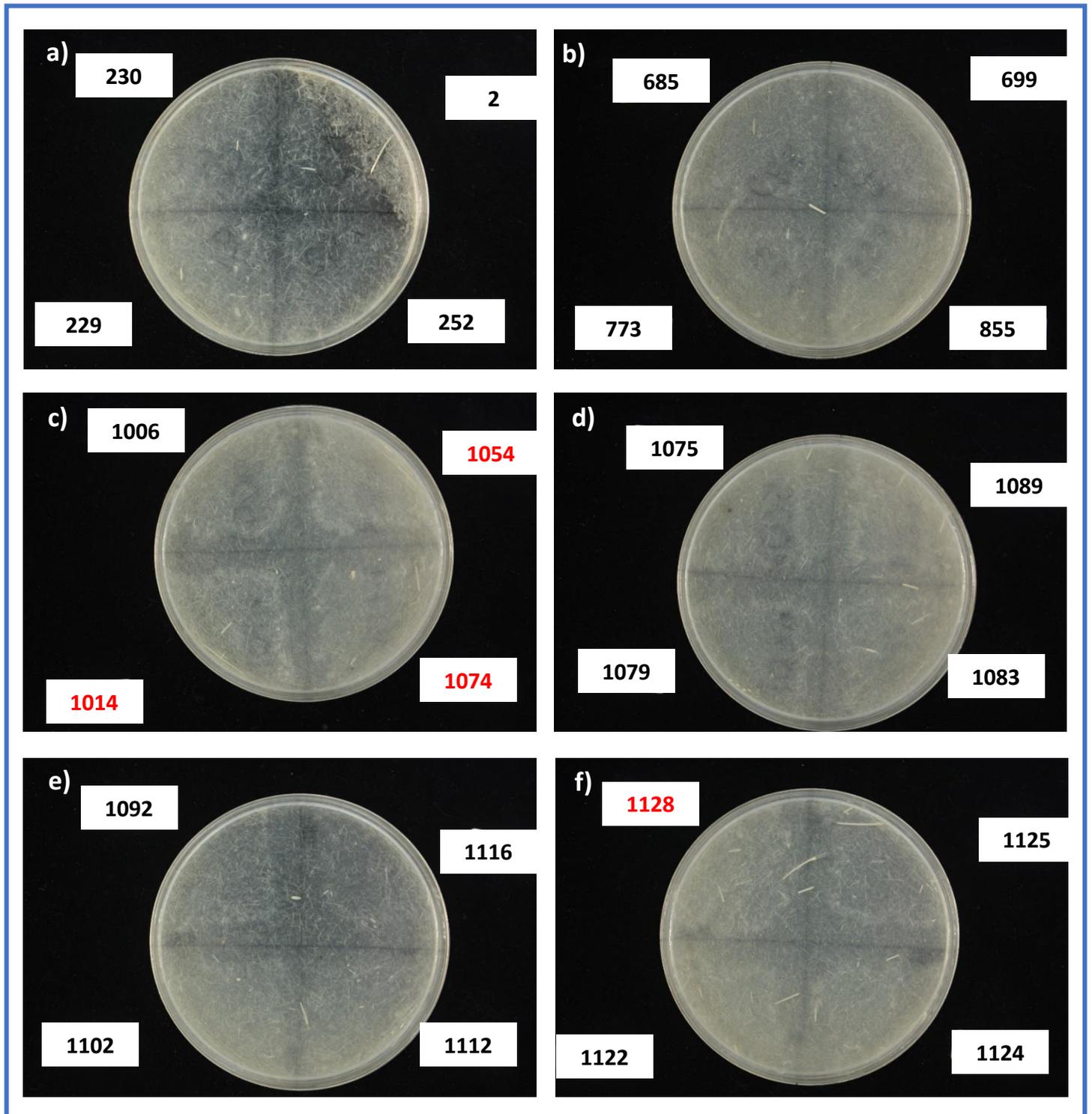


Figura IV.I. Fotografiado de las diferentes placas de agar pluma tras el periodo de incubación de las diferentes cepas (4 por placa), dónde las cepas sembradas se corresponden con los códigos a) 2, 229, 230, 252; b) 685, 699, 773, 855; c) 1006, 1014, 1054, 1074; d) 1075, 1079, 1083, 1089; e) 1092, 1102, 1112, 1116 y f) 1122, 1124, 1125, 1128. Las cepas con actividad resaltable aparecen en rojo.

Degradación de plumas mediante la aplicación de aislados de *Bacillus licheniformis* procedentes de pilas de compostaje de restos vegetales

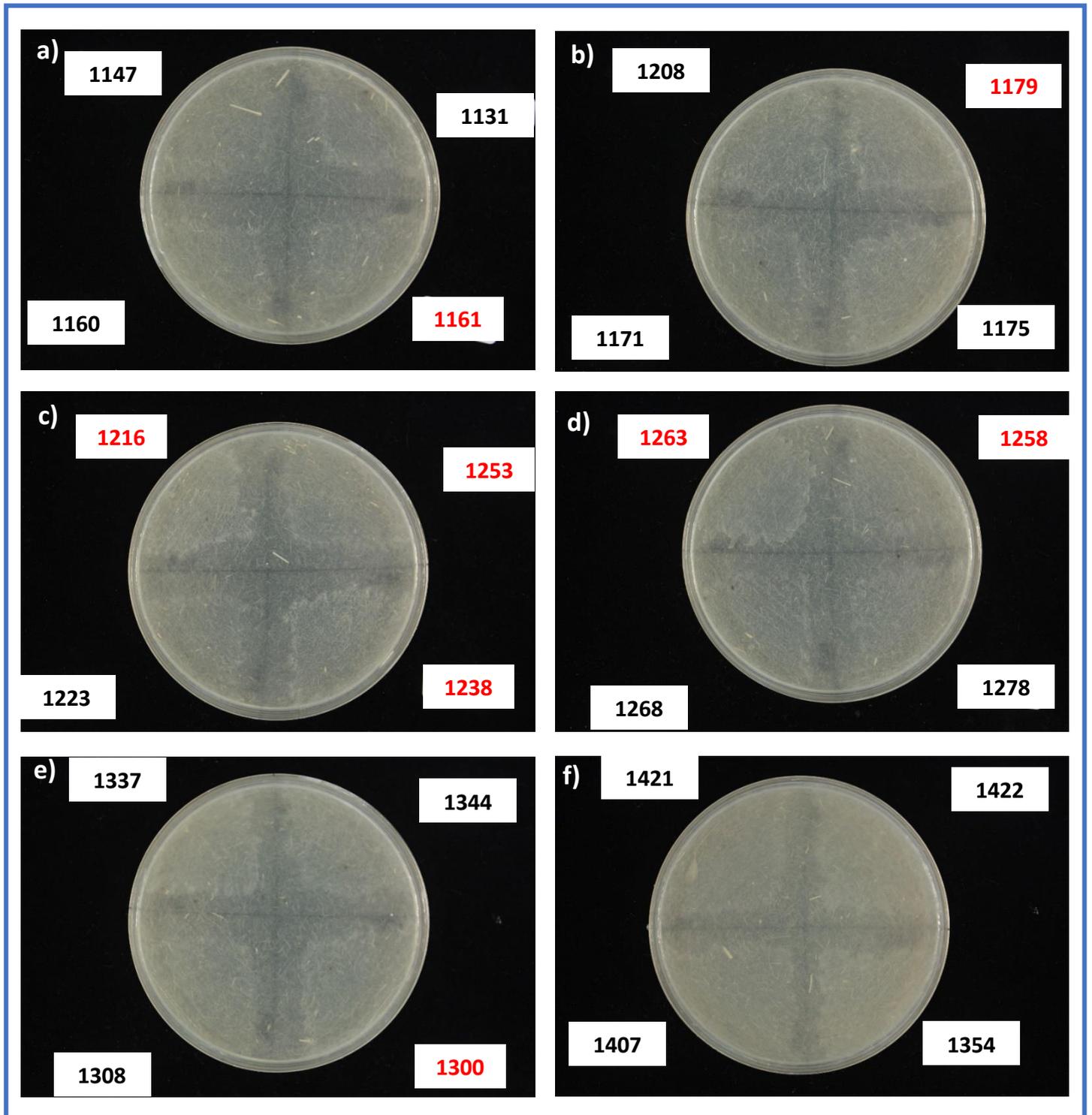


Figura IV.II. Fotografiado de las diferentes placas de agar pluma tras el periodo de incubación de las diferentes cepas (4 por placa), dónde las cepas sembradas se corresponden con los códigos a) 1137, 1147, 1160, 1161; b) 1171, 1175, 1179, 1208; c) 1216, 1223, 1238, 1253; d) 1258, 1263, 1268, 1278; e) 1300, 1308, 1337, 1344 y f) 1354, 1407, 1421, 1422. Las cepas con actividad resaltable aparecen en rojo.

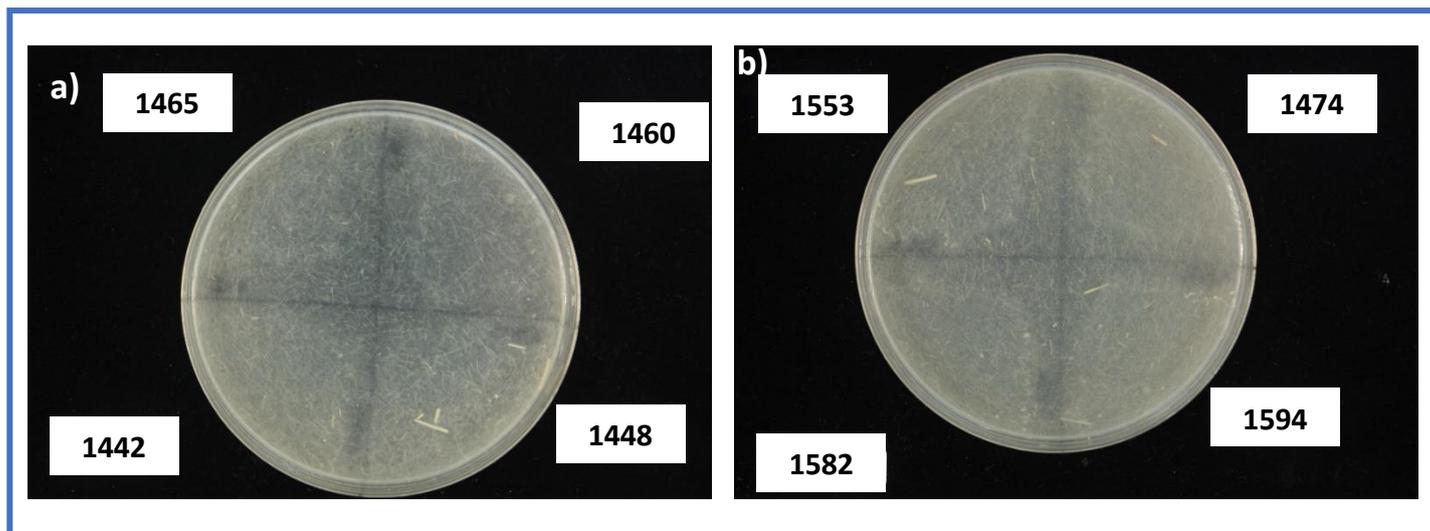


Figura IV.III. Fotografiado de las diferentes placas de agar pluma tras el periodo de incubación de las diferentes cepas (4 por placa), dónde las cepas sembradas se corresponden con los códigos a) 1442, 1448, 1460, 1465 y b) 1474, 1553, 1582, 1594.

Las imágenes muestran que hay diferencias de crecimiento entre cepas. Se procedió, por tanto, a la calificación de las cepas en función de su mayor o menor crecimiento en placa de agar pluma, para seleccionar aquellas cepas que pasarán a la siguiente fase de ensayos cuantitativos. Aquellas cepas con mayor crecimiento observado se encuentran resaltadas en color rojo en las imágenes.

En la **Tabla IV.I** se muestra la calificación dada a cada una de las cepas, seleccionadas para la realización del ensayo cualitativo, donde 0 se corresponde con una ausencia total de crecimiento, 1 a un crecimiento muy leve, 2 a un crecimiento fácilmente observable y 3 a un gran crecimiento:

Degradación de plumas mediante la aplicación de aislados de *Bacillus licheniformis* procedentes de pilas de compostaje de restos vegetales

Cepa	Crecimiento
2	0
229	2
230	1
252	1
685	1
699	1
733	2
855	2
1006	2
1014	3
1054	3
1074	3
1075	2
1079	1
1083	2
1089	2
1092	1
1102	1
1112	1
1116	1
1122	1
1124	2
1125	2
1128	3
1131	2
1147	1
1160	2
1161	3

Cepa	Crecimiento
1171	1
1175	2
1179	3
1208	1
1216	3
1223	2
1238	3
1253	3
1258	3
1263	3
1268	1
1278	2
1300	3
1308	2
1337	2
1344	1
1354	2
1407	2
1421	2
1422	2
1442	2
1448	1
1460	2
1465	2
1474	2
1553	2
1582	1
1594	2

Tabla IV.I. Crecimiento del ensayo cualitativo realizado a cada cepa, donde 0 indica una ausencia casi total de crecimiento bacteriano, 1 la presencia de un crecimiento muy leve, 2 un crecimiento microbiano fácilmente observable y 3 un gran crecimiento bacteriano.

A la vista de la tabla se puede deducir que, dentro de la colección de *Bacillus licheniformis* utilizada, la gran mayoría de las cepas eran capaz de crecer en el medio de plumas y por tanto se puede afirmar su capacidad de degradación de queratina (98,2%), demostrando así su potencial uso como microorganismo capaz de la degradación de plumas. De hecho, todas las cepas productoras de proteasas seleccionadas, salvo una, fueron capaces de generar queratinasas capaces de degradar en cierto grado el residuo de plumas del medio de cultivo.

Estos resultados son coincidentes con los encontrados en bibliografía, donde *Bacillus licheniformis* es uno de los microorganismos con mayor actividad queratinolítica relatada. Numerosos estudios han realizado una búsqueda de microorganismos productores de queratinasas en base a los desechos obtenidos en granjas de aves, y uno de los encontrados de

Degradación de plumas mediante la aplicación de aislados de *Bacillus licheniformis* procedentes de pilas de compostaje de restos vegetales

forma común resulta ser esta bacteria (Xu et al., 2009; Bhari et al., 2018; Alahyaribeik et al., 2020).

Bhari et al. (2018) aislaron un total de 73 cepas bacterianas en un cultivo cuya única base de carbono y nitrógeno eran plumas. La comparación del ARN 16 S en bases de datos de uno de los aislados que mayor actividad queratinasa tuvo sobre las plumas se identificó como *Bacillus licheniformis*. La actividad queratinasa de todas las cepas aisladas conseguían su máximo en plena fase exponencial, y *Bacillus licheniformis* consiguió su máximo de forma destacable, y en una etapa más temprana que el resto, como se muestra en la **Figura IV.IV**:

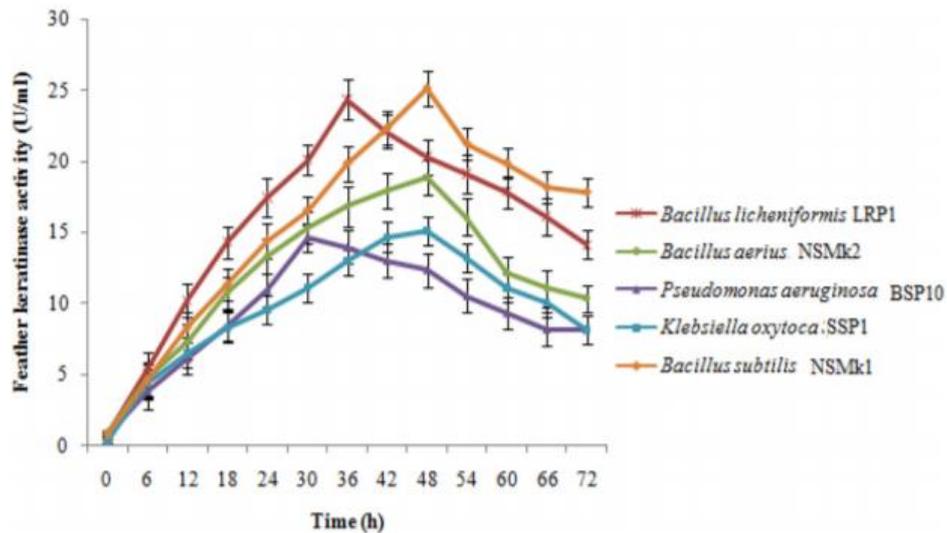


Figura IV.IV. Actividad queratinasa de las diferentes cepas en función del tiempo. Extraído de Bhari et al. (2018).

Procediendo de manera similar, Xu et al. (2009) aislaron un total de 36 cepas bacterianas diferentes recogidas de diferentes lugares de granjas de aves. Una de ellas demostró una actividad queratinasa muy superior al resto, siendo capaz de la total degradación de las plumas en incubación a 37 °C en 3-4 días. Los análisis bioquímicos y fisiológicos, así como el análisis del ARN 16S reveló una similitud del 99% entre este aislado y el correspondiente a *Bacillus licheniformis*, obtenido en Genbank. Es uno de los trabajos inspiradores del presente Trabajo Final de Grado, ya que, el acercamiento a entornos hostiles donde la presencia de sustratos ricos en queratinas supone unas probabilidades de éxito prácticamente garantizadas, puesto que la adaptación microbiana con frecuencia parece no conocer límites (Li et al., 2015).

Degradación de plumas mediante la aplicación de aislados de *Bacillus licheniformis* procedentes de pilas de compostaje de restos vegetales

Recientemente, Alahyaribeik et al. (2020) realizaron un estudio sobre la producción de queratinasas en *Rhodococcus erythropolis*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus licheniformis*, así como de las proteínas soluble. El crecimiento bacteriano en este medio fue muy variable dependiendo de la bacteria analizada. El ensayo consistió en la siembra de las diferentes cepas en medios de plumas ajustados a diferentes valores de pH, y su incubación durante 4 días. Los resultados se muestran en la **Figura IV.V.** y en la **Figura IV.VI.**, y mostraron que *Bacillus licheniformis* demostró ser la especie bacteriana más capaz de la degradación de plumas, pues mostró una mayor actividad queratinasa en su cultivo en diferentes pH medidos, así como un mayor contenido en proteínas solubles.

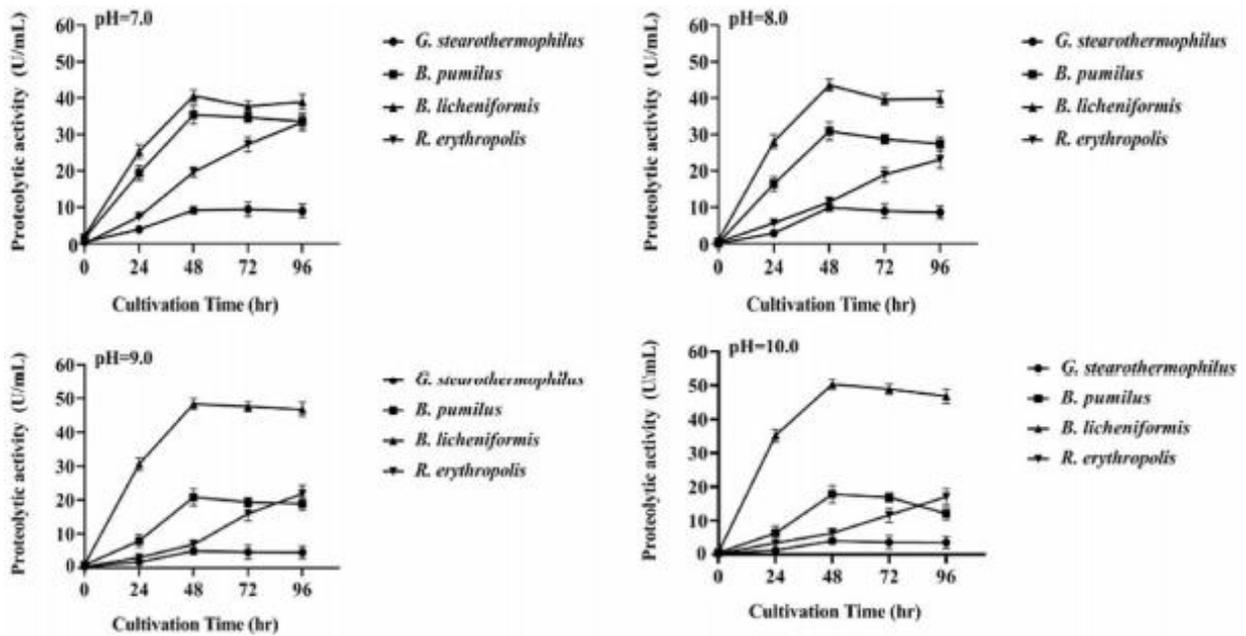


Figura IV.V. Efecto del pH sobre la actividad proteolítica de las proteasas segregadas por los diferentes microorganismos como consecuencia de su incubación en medio de plumas durante 4 días. Extraído de Alahyaribeik et al. (2020)

Degradación de plumas mediante la aplicación de aislados de *Bacillus licheniformis* procedentes de pilas de compostaje de restos vegetales

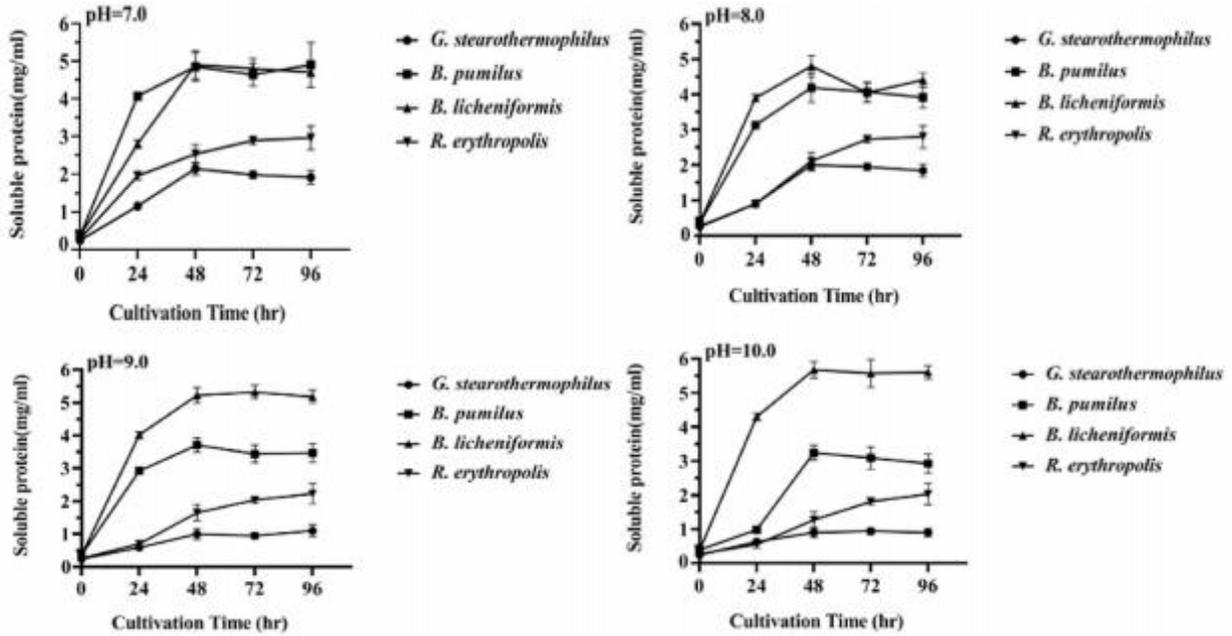


Figura IV.VI. Efecto del pH sobre el contenido de proteínas solubles segregadas por los diferentes microorganismos como consecuencia de su incubación en medio de plumas durante 4 días. Extraído de Alahyaribeik et al. (2020)

De forma parecida, se realizó un estudio para la determinación del porcentaje de pluma hidrolizada de cada especie analizada en el ensayo de Alahyaribeik et al. (2020), mediante la inubación durante 5 días. Los resultados se muestran en la **Figura IV.VII**, y demuestran que la cepa especie de *Bacillus licheniformis* destaca de entre las demás, pese a no alcanzar el 100% de la degradación de las plumas.

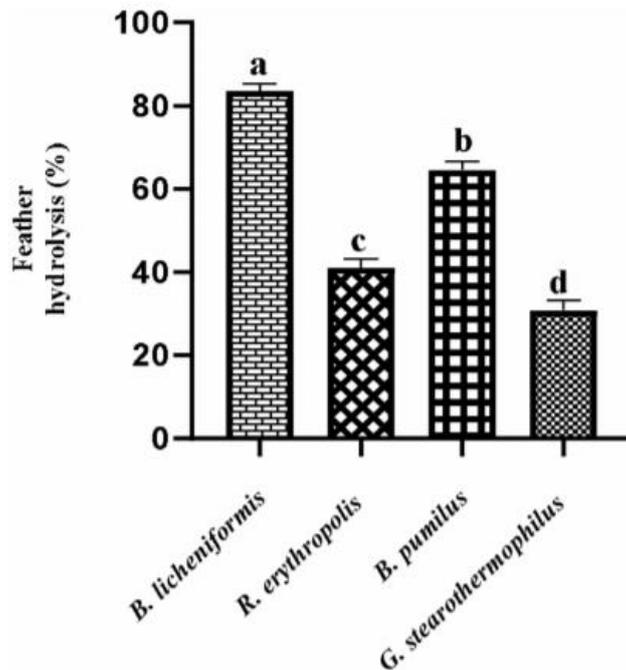


Figura IV.VII. Efectos de las diferentes cepas utilizadas en la hidrólisis de plumas. Extraído de Alahyaribeik et al. (2020).

Dentro de nuestro cepario ensayado se obtuvo un gradiente degradativo en cuanto a actividad queratinasa se refiere, pues se pueden observar cepas en todos los rangos impuestos. 17 de las 56 cepas (30,36 %) lograron un crecimiento mínimo, aunque observable, 26 de ellas (46,42%) consiguieron un crecimiento microbiano notable y 12 (21,42%) un crecimiento masivo. Finalmente, solo una cepa (1,78%) de la colección no logró crecer en dicho medio.

Las cepas calificadas con un 3 demostraron tener una mayor capacidad de degradación de plumas que las demás, de forma que fueron seleccionadas dentro de la colección relatada para la realización de los experimentos restantes. Al resto de cepas cuya calificación no fue de 3 no se usaron para los ensayos cuantitativos. Así, un total de 12 de 56 cepas pasaron a ser sujeto de las pruebas cuantitativas más exhaustivas.

2- Determinación de niveles de queratinas, proteínas y degradación de plumas durante el proceso

La situación de emergencia sanitaria ocasionada como consecuencia de la declaración de pandemia producida por el Covid-19 por parte de la Organización Mundial de la Salud el día 11 de marzo de 2020 generó un estado de crisis sanitaria a nivel mundial. El gobierno español decretó el estado de alarma el día 14 de marzo de 2020, lo que impidió la normal progresión de las labores universitarias, incluyendo la presencialidad de las clases, tanto docentes como prácticas, prácticas de empresa, tanto curriculares como extracurriculares y tareas de laboratorio. Como consecuencia, la asistencia al laboratorio donde se realizaban los ensayos fue suspendida, de forma que la realización de estos, que hasta la fecha se encontraban sin resultados, se paralizaron temporalmente en vista a una posible reincorporación en función de la evolución del estado de emergencia sanitaria. Tal evolución de la situación no permitió la reincorporación, de forma que se llegó al concierto de la suspensión indefinida de dichos ensayos.

En el caso del presente trabajo, todos los ensayos cuantitativos no llegaron a ser realizados, de manera que no se obtuvieron resultados acerca de la actividad queratinasa, las proteínas totales del extracto y los gramos de pluma degradada de cada una de las cepas de *Bacillus licheniformis* seleccionadas en el ensayo cualitativo como mayores productores de queratinasas.

Los resultados esperados con respecto a los ensayos cuantitativos son una actividad queratinasa y contenido proteínas en el extracto mayor en las cepas con mayor crecimiento en los ensayos cualitativos, además de una degradación casi total de las plumas contenidas en el medio de plumas tras el periodo de incubación, destacando alguna cepa en particular.

Degradación de plumas mediante la aplicación de aislados de *Bacillus licheniformis* procedentes de pilas de compostaje de restos vegetales

Como consecuencia de esta falta de resultados, se ha procedido a la revisión bibliográfica de ensayos relacionados con el uso de *Bacillus licheniformis* para la degradación de plumas de ave, relatando las condiciones óptimas de trabajo con respecto al uso de las enzimas producidas por este microorganismo.

Dado que *Bacillus licheniformis* destaca dentro de los ensayos llevados a cabo para la biodegradación de plumas de ave por su alta actividad queratinasa, así como su velocidad en la degradación de estas, se puede resaltar el uso de esta bacteria para la biorremediación de este tipo de residuos como una de las mejores alternativas a usar. Es por ello, que los estudios con respecto a las condiciones óptimas de actividad de sus enzimas queratinasas se hacen necesarios, para ser capaces de optimizar el proceso y obtener una biodegradación de las plumas lo más temprana y satisfactoria posible.

La mayor o menor producción de queratinasa por parte de *Bacillus licheniformis* depende de las condiciones de pH, temperatura y concentración de plumas a la hora de cultivarlas, de forma que una variación de las condiciones óptimas para cada cepa variará la producción de queratinasa, y por tanto su capacidad de degradación de sustratos queratinosos (Bhari et al., 2018).

Diversos estudios han relatado diferentes temperaturas óptimas de crecimiento bacteriano y producción de queratinasas para la bacteria en cuestión en medios de plumas (Williams et al., 1990; Xu et al., 2009; Abdel-Fattah et al., 2018). Pese a ser un microorganismo mesófilo, como la mayoría de los microorganismos del género *Bacillus*, *B. licheniformis* ha sido reconocido capaz de crecer adecuadamente en temperaturas superiores a los 40 °C o, de hecho, contar con una amplia plasticidad térmica asociada a una gran termotolerancia (López-González et al., 2015a). Así, el primer estudio en determinar esta influencia fue puesto en marcha por Williams et al. (1990). En el estudio se determinó una temperatura óptima de 50 °C, consiguiendo un resultado máximo. No obstante, otros estudios han corroborado una producción máxima en temperaturas de 42 °C (Abdel-Fattah et al., 2018) y en temperaturas de 55 °C (Xu et al., 2009), utilizando cepas de diferente procedencia. Se puede concluir, por tanto, que la temperatura óptima para una máxima producción de queratinasas y crecimiento bacteriano se produce entre las temperaturas de 40 °C a 55 °C, dependiendo de la cepa a utilizar en el ensayo.

Algo parecido sucede con el rango óptimo de pH inicial en el medio de cultivo. De igual manera, Williams et al. (1990) obtuvieron un valor óptimo de 7,5, sin embargo, cepas diferentes han demostrado tener crecimientos óptimos en valores de pH de 8 (Korkmaz et al., 2004) y de 6 (Abdel-Fattah et al., 2018). Es destacable el hecho de que la hidrólisis de las plumas produce un aumento sustancial del valor de pH en el medio, por lo que, en ocasiones es necesario controlar el valor de dicho pH (Xu et al., 2009). De igual manera se considera que el pH óptimo de crecimiento y producción de queratinasas se logra por lo general en unos valores ligeramente alcalinos o neutros, aunque dependerá de la cepa de *Bacillus licheniformis* usada.

Degradación de plumas mediante la aplicación de aislados de *Bacillus licheniformis* procedentes de pilas de compostaje de restos vegetales

La actividad queratinasa también se ve alterada con los cambios de temperatura y pH en el medio, de forma que la enzima tendrá sus condiciones de trabajo óptimas. Al igual que con la producción de enzima, diversos estudios han relatado diferencias en las condiciones óptimas que presentan una mayor actividad (Fakhfakh et al., 2009; Desai et al., 2010; Abdel-Fattah et al., 2018).

La temperatura óptima de actividad queratinasa parece rondar los 60 °C, pues diferentes cepas han producido queratinasas cuya actividad óptima se daba a los 50 °C (Desai et al., 2010), a los 60 °C (Vigneshwaran et al., 2010), y en los rangos de 60-70 °C, de forma que a partir de este rango la actividad se veía rápidamente reducida (Fakhfakh et al., 2009; Abdel Fattah et al., 2018). No obstante, la estabilidad de la enzima disminuye de forma proporcional a las condiciones de temperatura (Abdel-Fattah et al., 2018), por lo que se hace necesario encontrar una temperatura que permita una máxima actividad al mismo tiempo que una estabilidad de la enzima que permita su uso durante el tiempo requerido.

De igual manera, la influencia del pH sobre la actividad queratinasa de las enzimas producidas por las diferentes cepas de *Bacillus licheniformis* difiere en función de la cepa analizada. Así, se han encontrado queratinasas que trabajan con un pH óptimo desde 11 (Fakhfakh et al., 2009) hasta 7,5 (Desai et al., 2010), dependiendo de la cepa productora de la enzima. Por lo general, las queratinasas se encuadran dentro del grupo de las proteasas alcalinas, por lo que su actividad se ve aumentada en medios con valores de pH neutros o alcalinos (Bhari et al., 2018).

Finalmente, se han relatado estudios en los que cepas de *Bacillus licheniformis* son capaces de degradar las plumas de forma total en un rango de tiempo que dependerá de la cepa y las condiciones utilizadas (Korkmaz et al., 2004; Vigneshwaran et al., 2010; Bhari et al., 2018).

La degradación se ve reducida con el tiempo, de manera que en las primeras horas se produce la degradación máxima de las plumas (actividad queratinasa máxima), llegando a una degradación de casi el 30 % del contenido de plumas en el medio a lo largo de las 4 primeras horas de ensayo, además de la liberación de la gran mayoría de las proteínas totales de las plumas. Transcurridas estas 4 primeras horas se observa una reducción en ambos parámetros, como se muestra en la **Tabla IV.I.** (Abdel-Fattah et al., 2018).

Degradación de plumas mediante la aplicación de aislados de *Bacillus licheniformis* procedentes de pilas de compostaje de restos vegetales

Tiempo (h)	Actividad restante (%)	Proteínas totales (mg/g pluma)	Degradación de pluma (%)
0	100	77,2	0
4	81,2	297,1	29
8	61,1	307,1	40
12	57	332,6	52
16	48	357,7	57
20	44	400,7	62,3
24	42	440	64

Tabla IV.I. Efecto del tiempo sobre la degradación de plumas y la liberación de proteínas totales de las plumas contenidas en el medio. Extraído de Abdel-Fattah et al. (2018).

La completa degradación de las plumas del medio se ha logrado en periodos de 3-7 días, dependiendo de la cepa utilizada. Así, Vigneshwaran et al. (2010) utilizaron una cepa de *Bacillus licheniformis* no identificada capaz de la degradación de plumas obtenida de suelos de granjas avícolas. Esta bacteria logró la completa degradación de las plumas de ave utilizadas en 7 días. Bhari et al. (2018) consiguieron la completa degradación de las plumas utilizadas como sustrato al quinto día, mediante la correcta incubación de la cepa LRP1 de *Bacillus licheniformis*. El estudio de Korkmaz et al. (2004) logró la degradación más temprana de las plumas contenidas en el medio mediante la incubación de la cepa HK-1 de *Bacillus licheniformis*, siendo de tan solo 3 días, es decir, periodos realmente cortos de tiempo que resaltan la gran actividad enzimática de la bacteria.

V. Conclusiones

El proceso de compostaje constituye una sucesión de ambientes que se caracteriza por la participación de numerosos tipos de microorganismos que, en conjunto, aportan las capacidades necesarias para biotransformar la materia orgánica residual en un producto estable que puede usarse con fines agronómicos. Éste, obviamente, es el enfoque científico que deriva del conocimiento del proceso y permite al ser humano extraer beneficios de él. Desde el punto de vista puramente biológico, los microorganismos se valen de sus capacidades para alcanzar su principal objetivo que es la multiplicación.

El estudio aquí presentado forma parte de un conjunto de investigaciones planteadas con la finalidad de conocer las potenciales aplicaciones de la microbiota del compostaje en diferentes ámbitos, con objeto de señalar el camino por el que se podría iniciar una explotación eficiente de estos recursos.

Se debe considerar a la pila de compostaje como una fuente de recursos biológicos disponibles para explotar las capacidades biológicas microbianas en diferentes parcelas relacionadas con las características de los microorganismos que participan en los procesos de transformación, maduración y estabilización de la materia orgánica residual. En este caso concreto, se pretendía encontrar la capacidad relacionada con la biotransformación de la queratina (una sustancia que forma parte de muchos residuos orgánicos).

Degradación de plumas mediante la aplicación de aislados de *Bacillus licheniformis* procedentes de pilas de compostaje de restos vegetales

Aún con las importantes limitaciones impuestas por la pandemia COVID 19, se pudieron extraer las siguientes conclusiones:

1. La pila de compostaje resultó ser una buena fuente de microorganismos que poseen la capacidad de biotransformar la queratina, lo que permitirá diseñar procesos de actuación dirigida frente a esta clase de material residual.
2. Se pudo confirmar la hipótesis de partida relacionada con la capacidad de las cepas de *Bacillus licheniformis* (aisladas del proceso de compostaje) para actuar sobre el material queratinoso. No fue necesaria la presencia de restos ricos en queratina en las materias primas sujetas a compostaje. La capacidad microbiana (actividad queratinolítica) para el uso de estos residuos es constitutiva en el grupo de microorganismos investigados.
3. La capacidad de actuación de los microorganismos ensayados sobre el material queratinoso fue masiva. El 99% de las cepas ensayadas resultó poseer la capacidad, no solo de propiciar su biotransformación, sino que además fueron capaces de usar las plumas de ave como única fuente de carbono y energía (también como única fuente de nitrógeno) para el mantenimiento de sus actividades biológicas.
4. Desde el punto de vista metodológico, el medio de cultivo diseñado para la detección rápida de microorganismos capaces de actuar sobre los materiales residuales queratinosos resultó ser muy apropiado, útil, rápido, especialmente después de ajustar las concentraciones de plumas de ave pulverizadas.

VI. Bibliografía

- Abdel-Fattah, A. M., El-Gamal, M. S., Ismail, S. A., Emran, M. A., & Hashem, A. M. (2018). Biodegradation of feather waste by keratinase produced from newly isolated *Bacillus licheniformis* ALW1. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 311-318.
- Acda, M. N. (2010). Waste chicken feather as reinforcement in cement-bonded composites. *Philippine Journal of Science*, 139(2), 161-166.
- Alahyaribeik, S., Sharifi, S. D., Tabandeh, F., Honarbakhsh, S., & Ghazanfari, S. (2020). Bioconversion of chicken feather wastes by keratinolytic bacteria. *Process Safety and Environmental Protection*, 135, 171-178.
- Alibardi, L., Dalla Valle, L., Toffolo, V., & Toni, M. (2006). Scale keratin in lizard epidermis reveals amino acid regions homologous with avian and mammalian epidermal proteins. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 288(7), 734-752.
- Ashraf, M. M., Asad, W., & Kiran, T. (2018). Isolation of Keratinolytic Bacterial Strains from poultry farm Soil Samples; Production, Optimization and Thermal Characterization of the Keratinase Enzyme (s). *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 40(05), 953.

- Argüello, M. A., Álvarez, S., Riera, F. A., & Álvarez, R. (2003). Enzymatic cleaning of inorganic ultrafiltration membranes used for whey protein fractionation. *Journal of Membrane Science*, 216(1-2), 121-134.
- Bernal, C., Vidal, L., Valdivieso, E., & Coello, N. (2003). Keratinolytic activity of *Kocuria rosea*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(3), 255-261.
- Bhari, R., Kaur, M., Singh, R. S., Pandey, A., & Larroche, C. (2018). Bioconversion of chicken feathers by *Bacillus aerius* NSMk2: a potential approach in poultry waste management. *Bioresource Technology Reports*, 3, 224-230.
- Brandelli, A., Sala, L., & Kalil, S. J. (2015). Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into added-value products. *Food Research International*, 73, 3-12.
- Briganti, S., Camera, E., & Picardo, M. (2003). Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *Pigment Cell Research*, 16(2), 101-110.
- Cai, C. G., Lou, B. G., & Zheng, X. D. (2008). Keratinase production and keratin degradation by a mutant strain of *Bacillus subtilis*. *Journal of Zhejiang University Science B*, 9(1), 60-67.
- Chao, Y. P., Xie, F. H., Jing, Y., Lu, J. H., & Qian, S. J. (2007). Screening for a new *Streptomyces* strain capable of efficient keratin degradation. *Journal of Environmental Sciences*, 19(9), 1125-1128.
- Choi, J. M., & Nelson, P. V. (1996). Developing a slow-release nitrogen fertilizer from organic sources: II. Using poultry feathers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121(4), 634-638.
- Dastager, S. G., Deepa, C. K., & Pandey, A. (2010). Isolation and characterization of novel plant growth promoting *Micrococcus* sp NII-0909 and its interaction with cowpea. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 987-992.
- De Oliveira Martinez, J. P., Cai, G., Nachtschatt, M., Navone, L., Zhang, Z., Robins, K., & Speight, R. (2020). Challenges and opportunities in identifying and characterising keratinases for value-added peptide production. *Catalysts*, 10(2), 184.
- Desai, S. S., Hegde, S., Inamdar, P., Sake, N., & Aravind, M. S. (2010). Isolation of keratinase from bacterial isolates of poultry soil for waste degradation. *Engineering in Life Sciences*, 10(4), 361-367.
- Deydier, E., Guilet, R., Sarda, S., & Sharrock, P. (2005). Physical and chemical characterisation of crude meat and bone meal combustion residue: "waste or raw material?". *Journal of Hazardous Materials*, 121(1-3), 141-148.
- Draper, C. I. (1942). The nutritive value of corn oil meal and feather protein. *Retrospective Theses and Dissertations*. 13501.

- Elmayergi, H. H., & Smith, R. E. (1971). Influence of growth of *Streptomyces fradiae* on pepsin-HCl digestibility and methionine content of feather meal. *Canadian Journal of Microbiology*, 17(8), 1067-1072.
- Fakhfakh, N., Kanoun, S., Manni, L., & Nasri, M. (2009). Production and biochemical and molecular characterization of a keratinolytic serine protease from chicken feather-degrading *Bacillus licheniformis* RPK. *Canadian Journal of Microbiology*, 55(4), 427-436.
- Fakhfakh, N., Ktari, N., Haddar, A., Mnif, I. H., Dahmen, I., & Nasri, M. (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.
- Farag, A. M., & Hassan, M. A. (2004). Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 34(2), 85-93.
- Feroz, S., Muhammad, N., Ranayake, J., & Dias, G. (2020). Keratin-Based materials for biomedical applications. *Bioactive Materials*, 5(3), 496-509.
- Fraser, R. B., & Parry, D. A. (2011). The structural basis of the filament-matrix texture in the avian/reptilian group of hard β -keratins. *Journal of Structural Biology*, 173(2), 391-405.
- Friedrich, A. B., & Antranikian, G. (1996). Keratin degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order Thermotogales. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(8), 2875-2882.
- Friedrich, J., Gradišar, H., Vrecl, M., & Pogačnik, A. (2005). In vitro degradation of porcine skin epidermis by a fungal keratinase of *Doratomyces microsporus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(4), 455-460.
- Fontoura, R., Daroit, D. J., Correa, A. P., Meira, S. M., Mosquera, M., & Brandelli, A. (2014). Production of feather hydrolysates with antioxidant, angiotensin-I converting enzyme- and dipeptidyl peptidase-IV-inhibitory activities. *New Biotechnology*, 31(5), 506-513.
- Gessesse, A., Hatti-Kaul, R., Gashe, B. A., & Mattiasson, B. O. (2003). Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(5), 519-524.
- Gradišar, H., Friedrich, J., Križaj, I., & Jerala, R. (2005). Similarities and specificities of fungal keratinolytic proteases: comparison of keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microsporus* to some known proteases. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 3420-3426.
- Grazziotin, A., Pimentel, F. A., De Jong, E. V., & Brandelli, A. (2006). Nutritional improvement of feather protein by treatment with microbial keratinase. *Animal Feed Science and Technology*, 126(1-2), 135-144.

- Gruhn, K., & Zander, R. (1977). Technische und chemische Bearbeitung von Schweineborsten und Huhnerfedern zur Gewinnung proteinreicher Futtermittel. *Tierzucht*.
- Gupta, R., Beg, Q., & Lorenz, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(1), 15-32.
- Gupta, R., & Ramnani, P. (2006). Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(1), 21.
- Hadas, A., & Kautsky, L. (1994). Feather meal, a semi-slow-release nitrogen fertilizer for organic farming. *Fertilizer Research*, 38(2), 165-170.
- Heiman, A., Gordon, B., & Zilberman, D. (2019). Food beliefs and food supply chains: The impact of religion and religiosity in Israel. *Food Policy*, 83, 363-369.
- Henchion, M., McCarthy, M., Resconi, V. C., & Troy, D. (2014). Meat consumption: Trends and quality matters. *Meat Science*, 98(3), 561-568.
- Herbert, D., Phipps, P. J., & Strange, R. E. (1971). Chapter III chemical analysis of microbial cells. *Methods in Microbiology*, 5, 209-344.
- Herrmann, H., & Aebi, U. (2004). Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular scaffolds. *Annual Review of Biochemistry*, 73(1), 749-789.
- Herzog, B., Overy, D. P., Haltli, B., & Kerr, R. G. (2016). Discovery of keratinases using bacteria isolated from marine environments. *Systematic and Applied Microbiology*, 39(1), 49-57.
- Ichida, J. M., Krizova, L., LeFevre, C. A., Keener, H. M., Elwell, D. L., & Burt Jr, E. H. (2001). Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. *Journal of Microbiological Methods*, 47(2), 199-208.
- Jeong, J. H., Park, K. H., Oh, D. J., Hwang, D. Y., Kim, H. S., Lee, C. Y., & Son, H. J. (2010). Keratinolytic enzyme-mediated biodegradation of recalcitrant feather by a newly isolated *Xanthomonas* sp. P5. *Polymer Degradation and Stability*, 95(10), 1969-1977.
- Kelleher, B. P., Leahy, J. J., Henihan, A. M., O'dwyer, T. F., Sutton, D., & Leahy, M. J. (2002). Advances in poultry litter disposal technology—a review. *Bioresource Technology*, 83(1), 27-36.
- Kochar, M., Upadhyay, A., & Srivastava, S. (2011). Indole-3-acetic acid biosynthesis in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Psd and plant growth regulation by hormone overexpression. *Research in Microbiology*, 162(4), 426-435.
- Korniłowicz-Kowalska, T., & Bohacz, J. (2011). Biodegradation of keratin waste: theory and practical aspects. *Waste Management*, 31(8), 1689-1701.

**Degradación de plumas mediante la aplicación de aislados de *Bacillus licheniformis*
procedentes de pilas de compostaje de restos vegetales**

- Korkmaz, H., Hür, H., & Dinçer, S. A. D. I. K. (2004). Characterization of alkaline keratinase of *Bacillus licheniformis* strain HK-1 from poultry waste. *Annals of Microbiology*, 54(2), 201-211.
- Kunert, J. (1973). Keratin decomposition by dermatophytes. *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie*, 13, 189-198.
- Mazotto, A. M., de Melo, A. C. N., Macrae, A., Rosado, A. S., Peixoto, R., Cedrola, S. M., Couri, S., Zingali, R. B., Villa, A. L. V., Rabinovitch, L., Chaves, J. Q. & Vermelho, A. B. (2011). Biodegradation of feather waste by extracellular keratinases and gelatinases from *Bacillus spp.* *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(6), 1355-1365.
- McIntosh, C. H., Demuth, H. U., Pospisilik, J. A., & Pederson, R. (2005). Dipeptidyl peptidase IV inhibitors: how do they work as new antidiabetic agents? *Regulatory Peptides*, 128(2), 159-165.
- McLellan, J., Thornhill, S. G., Shelton, S., & Kumar, M. (2019). Keratin-based biofilms, hydrogels, and biofibers. *Keratin as a Protein Biopolymer* 187-200.
- Lakshmipathy, D. T., & Kannabiran, K. (2010). Review on dermatomycosis: pathogenesis and treatment. *Natural Science*, 2(7), 726.
- Lange, L., Huang, Y., & Busk, P. K. (2016). Microbial decomposition of keratin in nature—a new hypothesis of industrial relevance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(5), 2083-2096.
- Langeveld, J. P., Wang, J. J., Van de Wiel, D. F., Shih, G. C., Garssen, G. J., Bossers, A., & Shih, J. C. (2003). Enzymatic degradation of prion protein in brain stem from infected cattle and sheep. *The Journal of Infectious Diseases*, 188(11), 1782-1789.
- Latshaw, J. D., Musharaf, N., & Retrum, R. (1994). Processing of feather meal to maximize its nutritional value for poultry. *Animal Feed Science and Technology*, 47(3-4), 179-188.
- Li, S., Hua, Z., Huang, L. Li, J., Shi, S., Chen, L., Kuang, J., Liu, J., Hu, M., & Shu, W. (2015). Microbial communities evolve faster in extreme environments. *Scientific Reports*, 4, 6205.
- Lin, X., Lee, C. G., Casale, E. S., & Shih, J. C. (1992). Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading *Bacillus licheniformis* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(10), 3271-3275.
- Longshaw, C. M., Wright, J. D., Farrell, A. M., & Holland, K. T. (2002). *Kytococcus sedentarius*, the organism associated with pitted keratolysis, produces two keratin-degrading enzymes. *Journal of Applied Microbiology*, 93(5), 810-816.
- López-González, J. A., Vargas-García, M. C., López, M. J., Suárez-Estrella, F., Jurado, M. M. y Moreno, J., (2014). Enzymatic characterization of microbial isolates from lignocellulose

Degradación de plumas mediante la aplicación de aislados de *Bacillus licheniformis* procedentes de pilas de compostaje de restos vegetales

- waste composting: Chronological evolution. *Journal of Environmental Management* 145, 137-146.
- López-González, J.A., Suárez-Estrella, F., Vargas-García, M.C., López, M.J., Jurado, M.M. y Moreno, J., (2015a). Dynamics of bacterial microbiota during lignocellulosic waste composting: Studies upon its structure, functionality and biodiversity. *Bioresource Technology* 175, 406-416.
- López-González, J.A., Suárez-Estrella, F., Vargas-García, M.C., López, M.J., Jurado, M.M. y Moreno, J., (2015b). Biodiversity and succession of mycobiota associated to agricultural lignocellulosic waste-based composting. *Bioresource Technology* 187, 305-313.
- Marchisio, V. F. (2000). Keratinophilic fungi: their role in nature and degradation of keratinic substrates. *Biology of Dermatophytes and Other Keratinophilic Fungi*, 17, 86-92.
- Mitsuiki, S., Hui, Z., Matsumoto, D., Sakai, M., Moriyama, Y., Furukawa, K., Kanouchi, H. & Oka, T. (2006). Degradation of PrPSc by keratinolytic protease from *Nocardia* sp. TOA-1. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70(5), 1246-1248.
- Onifade, A. A., Al-Sane, N. A., Al-Musallam, A. A., & Al-Zarban, S. (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.
- Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A. N. A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J. & Cohen, F. E. (1993). Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(23), 10962-10966.
- Pandey, R. K., Maranville, J. W., & Chetima, M. M. (2000). Deficit irrigation and nitrogen effects on maize in a Sahelian environment: II. Shoot growth, nitrogen uptake and water extraction. *Agricultural Water Management*, 46(1), 15-27.
- Papadopoulos, M. C. (1985). Processed chicken feathers as feedstuff for poultry and swine. A review. *Agricultural Wastes*, 14(4), 275-290.
- Peng, Z., Mao, X., Zhang, J., Du, G., & Chen, J. (2020). Biotransformation of keratin waste to amino acids and active peptides based on cell-free catalysis. *Biotechnology for Biofuels*, 13, 1-12.
- Phelan, M., Aherne, A., FitzGerald, R. J., & O'Brien, N. M. (2009). Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *International Dairy Journal*, 19(11), 643-654.

**Degradación de plumas mediante la aplicación de aislados de *Bacillus licheniformis*
procedentes de pilas de compostaje de restos vegetales**

- Pihlanto, A., Virtanen, T., & Korhonen, H. (2010). Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk. *International Dairy Journal*, 20(1), 3-10.
- Pillai, P., & Archana, G. (2008). Hide depilation and feather disintegration studies with keratinolytic serine protease from a novel *Bacillus subtilis* isolate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(4), 643.
- Ramnani, P., Singh, R., & Gupta, R. (2005). Keratinolytic potential of *Bacillus licheniformis* RG1: structural and biochemical mechanism of feather degradation. *Canadian Journal of Microbiology*, 51(3), 191-196.
- Rey, M. W., Ramaiya, P., Nelson, B. A., Brody-Karpin, S. D., Zaretsky, E. J., Tang, M., Lopez de Leon, A., Xiang, H., Gusti, V., Clausen, I. G., Olsen, P. B., Rasmussen, M. D., Andersen, J. T., Jørgensen, P. L., Larsen, T. S., Sorokin, A., Bolotin, A., Lapidus, A., Galleron, N., Ehrlich, S. D. & Berka, R. M. (2004). Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biology*, 5(10), r77.
- Saber, W. I. A., El-Metwally, M. M., & El-Hersh, M. S. (2010). Keratinase production and biodegradation of some keratinous wastes by *Alternaria tenuissima* and *Aspergillus nidulans*. *Research Journal of Microbiology*, 5(1), 21-35.
- Salminen, E., & Rintala, J. (2002). Anaerobic digestion of organic solid poultry slaughterhouse waste—a review. *Bioresource Technology*, 83(1), 13-26.
- Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 31(10), 1949-1956.
- Schrooyen, P. M., Dijkstra, P. J., Oberthür, R. C., Bantjes, A., & Feijen, J. (2001). Partially carboxymethylated feather keratins. 2. Thermal and mechanical properties of films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), 221-230.
- Srivastava, B., Khatri, M., Singh, G., & Arya, S. K. (2019). Microbial keratinases: An overview of biochemical characterization and its eco-friendly approach for industrial applications. *Journal of Cleaner Production*, 119847.
- Suzuki, Y., Tsujimoto, Y., Matsui, H., & Watanabe, K. (2006). Decomposition of extremely hard-to-degrade animal proteins by thermophilic bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102(2), 73-81.
- Takami, H., Nakamura, S., Aono, R., & Horikoshi, K. (1992). Degradation of human hair by a thermostable alkaline protease from alkaliphilic *Bacillus* sp. no. AH-101. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 56(10), 1667-1669.

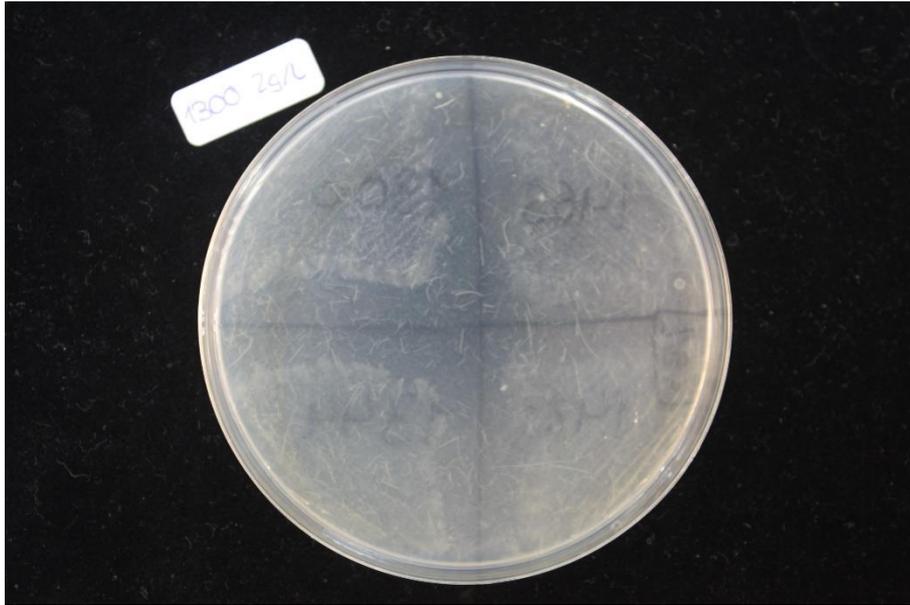
**Degradación de plumas mediante la aplicación de aislados de *Bacillus licheniformis*
procedentes de pilas de compostaje de restos vegetales**

- Thanikaivelan, P., Rao, J. R., Nair, B. U., & Ramasami, T. (2004). Progress and recent trends in biotechnological methods for leather processing. *Trends in Biotechnology*, 22(4), 181-188.
- Verma, A., Singh, H., Anwar, S., Chattopadhyay, A., Tiwari, K. K., Kaur, S., & Dhilon, G. S. (2017). Microbial keratinases: industrial enzymes with waste management potential. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(4), 476-491.
- Vigneshwaran, C., Shanmugam, S., & Kumar, T. S. (2010). Screening and characterization of keratinase from *Bacillus licheniformis* isolated from Namakkal poultry farm. *Researcher*, 2(4), 89-96.
- Wang, B., Yang, W., McKittrick, J., & Meyers, M. A. (2016). Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. *Progress in Materials Science*, 76, 229-318.
- Wang, X., & Parsons, C. M. (1997). Effect of processing systems on protein quality of feather meals and hog hair meals. *Poultry Science*, 76(3), 491-496.
- Williams, C. M., Richter, C. S., Mackenzie, J. M., & Shih, J. C. (1990). Isolation, identification, and characterization of a feather-degrading bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1509-1515.
- Xu, B., Zhong, Q., Tang, X., Yang, Y., & Huang, Z. (2009). Isolation and characterization of a new keratinolytic bacterium that exhibits significant feather-degrading capability. *African Journal of Biotechnology*, 8(18).
- Yeo, I., Lee, Y. J., Song, K., Jin, H. S., Lee, J. E., Kim, D., Lee, D. W. & Kang, N. J. (2018). Low-molecular weight keratins with anti-skin aging activity produced by anaerobic digestion of poultry feathers with *Fervidobacterium islandicum* AW-1. *Journal of Biotechnology*, 271, 17-25.
- Yue, X. Y., Zhang, B., Jiang, D. D., Liu, Y. J., & Niu, T. G. (2011). Separation and purification of a keratinase as pesticide against root-knot nematodes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(9), 2147-2153.
- Zhu, G. Y., Zhu, X., Wan, X. L., Fan, Q., Ma, Y. H., Qian, J., Liu, X. L., Shen, Y. J. & Jiang, J. H. (2010). Hydrolysis technology and kinetics of poultry waste to produce amino acids in subcritical water. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 88(2), 187-191

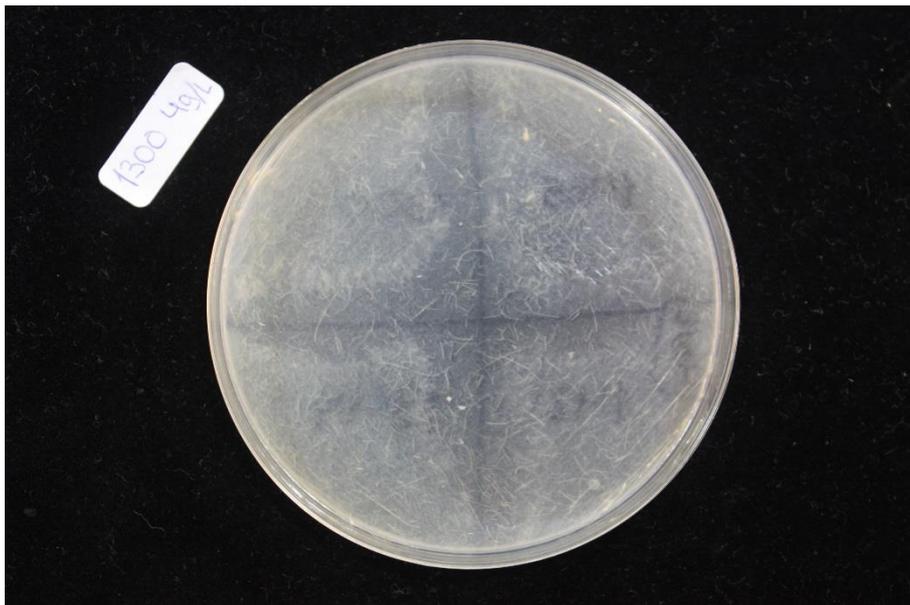
ANEXO

Degradación de plumas mediante la aplicación de aislados de *Bacillus licheniformis* procedentes de pilas de compostaje de restos vegetales

Medio agar plumas con una concentración de plumas de 2 g/L:

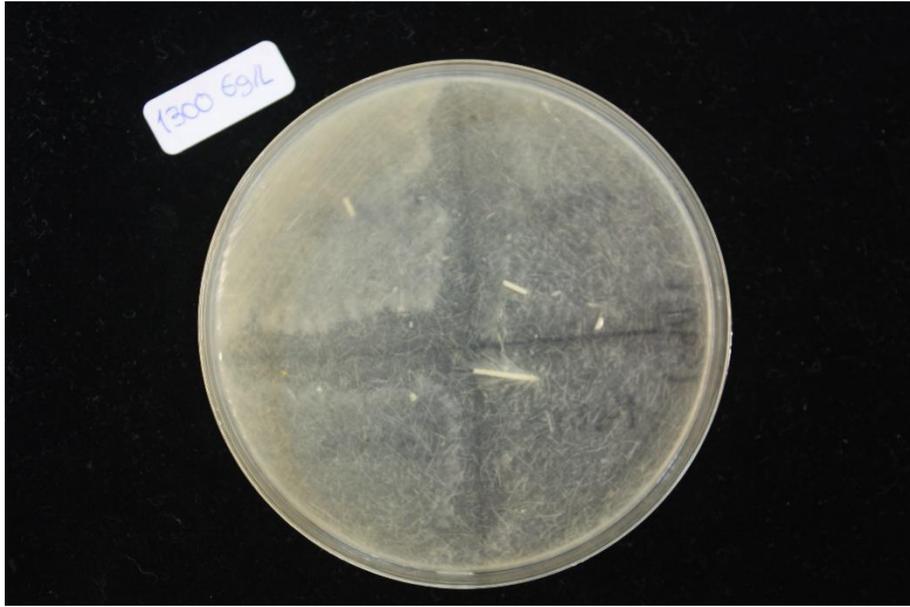


Medio agar plumas con una concentración de 4 g/L

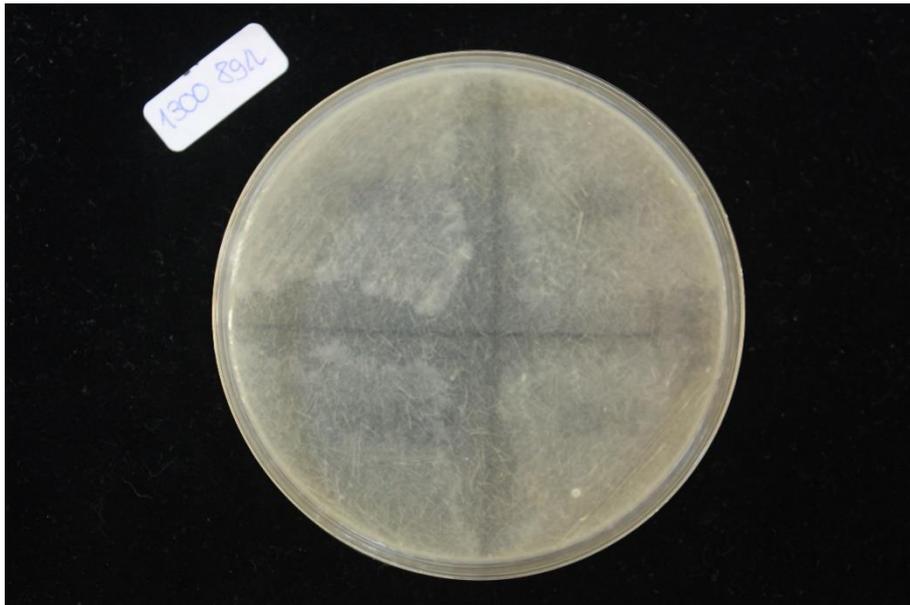


Degradación de plumas mediante la aplicación de aislados de *Bacillus licheniformis* procedentes de pilas de compostaje de restos vegetales

Medio agar plumas con una concentración de 6 g/L



Medio agar plumas con una concentración de 8 g/L



Degradación de plumas mediante la aplicación de aislados de *Bacillus licheniformis* procedentes de pilas de compostaje de restos vegetales

Medio agar plumas con una concentración de 10 g/L

