

Correlación de variables operativas y nutrientes del medio de cultivo en la biodegradación de plumas de pollo

Roberto González-Reyes*¹, Maribel Quezada-Cruz², Maribel Baltazar-Quezada², Samuel García-Hernández³

¹ Consejo de Ciencia, Tecnología e Innovación de Hidalgo. Edificio Ciencia, Exhacienda de la Concepción 3, 42162 La Concepción, Hgo.

² Universidad Tecnológica de Tecámac, División Química Biológicas. Carretera Federal México - Pachuca, KM 37.5 ; Colonia: Sierra Hermosa, Tecámac, Estado de México. ; C.P. 55740.

³ Universidad Tecnológica de Tecámac, División Económico Administrativas. Carretera Federal México - Pachuca, KM 37.5 ; Colonia: Sierra Hermosa, Tecámac, Estado de México. ; C.P. 55740.
zerj_000@hotmail.com

Resumen

La bioconversión de residuos de queratina de plumas de pollo en productos de alto valor agregado es un concepto “verde” de la industria sostenible; consiste en la degradación microbiana de plumas de pollo a través de enzimas queratinolíticas producidas por bacterias, hongos y consorcios microbianos, que aumentan la disponibilidad de queratina. Aquí se reportan análisis de estimación lineal no paramétrica para variables operativas y de nutrientes del medio de cultivo en relación con la actividad queratinolítica como una respuesta del nivel de degradación de las plumas de pollo, de referencias bibliográficas reportadas. Se obtuvo un análisis de ponderación del bioproceso de degradación de plumas de pollo y un análisis correlacional para seleccionar variables de observación durante el escalamiento. Se determinó la ecuación lineal para la actividad queratinolítica: $AE^* = 949.92 + 7,231.255 \text{ fuente de calcio} + 63.633 \text{ neutralizador de pH} + 41.585 \text{ primera fuente de nitrógeno} - 29.952 \text{ temperatura} - 1.554 \text{ tiempo de degradación}$, que describe el 86.1% de la actividad queratinolítica en la degradación de plumas de pollo. Además, a través de coeficientes de Rho de Spearman con moderada correlación, se encontró que la velocidad de agitación, concentración de fuente de calcio, el neutralizador de pH, los pasos de pretratamiento, tiempo de degradación, concentración de la primera fuente de nitrógeno y temperatura, generan altos niveles de actividad queratinolítica y degradación de plumas de pollo, por lo que tienen potencial para utilizarse como variables de observación a escalas de producción industriales.

Palabras Claves: escalamiento, actividad queratinolítica, biodegradación, Rho Spearman

Abstract

The bioconversion of keratin waste from chicken feathers into high value-added products is a “green” concept of sustainable industry. Here, non-parametric linear estimation analyses are reported for operational and nutrient variables of the culture medium in relation to keratinolytic activity, from reported bibliographic references. A weighting analysis of the chicken feather degradation bioprocess and a correlational analysis were obtained to select observation variables during scaling. The linear equation for keratinolytic activity was determined: $AE^* = 949.92 + 7,231,255 \text{ calcium source} + 63,633 \text{ pH neutralizer} + 41,585 \text{ first nitrogen source} - 29,952 \text{ temperature} - 1,554 \text{ degradation time}$, which describes 86.1% of the keratinolytic activity in the degradation of chicken feathers. Additionally, through Spearman's Rho coefficients with moderate correlation, it was found that the stirring speed, concentration of calcium source, pH neutralizer, pretreatment steps, degradation time, concentration of the first nitrogen source and temperature, generate high levels of keratinolytic activity and degradation of chicken feathers, so they have the potential to be used as observation variables at industrial production scales.

Key Words: scaling, keratinolytic activity, biodegradation, Rho Spearman

Introducción

Las plumas de pollo se acumulan en los procesos avícolas y se producen en millones de toneladas al año (Demir et al., 2015), al ser desechadas en el ambiente provocan problemas de salud pública como clorosis y micoplasmosis (Embaby et al., 2015). Las plumas de pollo con residuos de sangre son un sustrato para el fácil crecimiento de diversos microorganismos patógenos como el virus H5N1 (Dhiva et al., 2020).

Las plumas de pollo están constituidas por más del 90% de proteína, siendo el componente principal la beta-queratina, una proteína estructural fibrosa (Kani et al., 2012), con un alto contenido de azufre (Lai et al., 2023), es insoluble y ampliamente entrecruzada por enlaces disulfuro que las hace estables y resistentes a la degradación (Bohacz, 2017). En comparación con las proteínas solubles, las queratinas exhiben una alta estabilidad mecánica y son resistentes a la hidrólisis por enzimas proteolíticas (tripsina, pepsina y papaína) (Bagewadi et al., 2018) debido a esta estabilidad la queratina está asociada con problemas al momento de su eliminación como residuo agroindustrial. El tercer polímero más abundante en la naturaleza es la queratina (después de la celulosa y la quitina), que por ser recalcitrante funciona como una cubierta protectora en animales y humanos (Lai et al., 2023), también es un componente importante del pelo, cuernos, pezuñas, uñas, garras y lana (Bagewadi et al., 2018).

En los últimos años, la bioconversión de residuos de queratina de plumas de pollo en productos valiosos es un concepto “verde” en la industria sostenible, en comparación con los tratamientos fisicoquímicos (Lai et al., 2023). La estructura bioquímica de las beta-queratinas reforzada por numerosos enlaces disulfuro, pueden ser degradadas mediante bacterias (Demir et al., 2015; Embaby et al., 2015; Yusuf et al., 2016; Anand et al., 2016; Jankiewicz & Frank, 2017; Dhiva et al., 2020; Ouertani et al., 2020; Nnolim et al., 2020; De Toni et al., 2002; Ezenwali, 2022; Lai et al., 2023), hongos (Liang et al., 2011; Paul et al., 2013; Bagewadi et al., 2018) y consorcios integrados por diversos microorganismos (Pahua-Ramos et al., 2017a; Bohacz, 2017; Peng et al., 2019), las evidencias demuestran que son el sistema de tratamiento más

económico y respetuoso con el medio ambiente (Lai et al., 2023). Las enzimas queratinolíticas presentes en el proceso de degradación de las plumas podrían usarse para la producción de detergentes (Ghaffar et al., 2018), algunos cosméticos y fármacos (Chaturvedi et al., 2021). Además, los productos digeridos podrían ser un material para producir alimentos para animales, fertilizantes o gas natural (Kani et al., 2012), suplemento proteico de alta calidad (Lai et al., 2023), piensos o forraje, hidrolizados que funcionan como promotores de crecimiento (Sun et al., 2020; Kaur et al., 2021;) o un buen fertilizante nitrogenado para el crecimiento microbiano (Dhiva et al., 2020).

Los estudios enfocados en la producción de enzimas queratinolíticas se basan en la capacidad de agentes microbianos para la degradación de sustratos con altos contenidos de queratina, en dichos estudios se utilizan diseños experimentales principalmente de tipo Box-Behnken (Govarathan et al., 2014), Metodología de Superficie de Respuesta (RSM) (Nnolim et al., 2020), Plackett-Burman (Demir et al., 2015), Diseño compuesto central (CCD) (Yusuf et al., 2016), Experimento de un solo factor (Liang et al., 2011), Análisis canónico y cresta ascendente más pronunciada y Factorial 3^2 (Embaby et al., 2015) para la optimización de la degradación de plumas de pollo y principalmente la producción enzimática. Se distinguen dos grandes conjuntos de datos en términos de la optimización, las variables relacionadas con las condiciones de operación tales como pH, temperatura, tiempo de degradación, velocidad de agitación, entre otros y las variables relacionadas con el tipo de nutrientes en el medio de cultivo.

La revisión de datos de artículos publicados ha sido una práctica frecuente en la búsqueda del estado del arte sobre degradación de plumas de pollo con agentes microbianos, centrados en la identificación de bacterias y enzima que degradadores (Shih, 1993), los métodos biológicos y fisicoquímicos para degradación (Pahua-Ramos et al., 2017b), la caracterización de queratinasas, los métodos moleculares para identificar especies degradadoras (Kowalczyk et al., 2018), los mecanismos involucrados en la descomposición microbiana de la queratina (Peng et al., 2019), el potencial para

bioconvertir las plumas en biofertilizantes y alimentos para animales (Li, 2019), así como las diversas fuentes de queratina a partir de los desechos orgánicos (Maurya & Singh, 2024); dejando fuera un análisis sistemático sobre la relación entre las variables de operación y los nutrientes del medio de cultivo con la biodegradación de las plumas de pollo.

Adicionalmente, el escalamiento de los procesos de fermentación son un problema complejo para la industria biotecnológica, debido a las interacciones entre las condiciones operativas, como la agitación y aireación, viscosidad y la concentración de oxígeno disuelto, así como el crecimiento, producción, tipo y cantidad de enzimas de los microorganismos. Otros factores contribuyentes son la naturaleza no lineal de las interacciones de la red bioquímica y, en algunos casos, el conocimiento incompleto sobre la cinética involucrada en dichos sistemas (Rendón-Castrillón et al., 2021).

Los cambios en la velocidad de los procesos de transporte (calor, masa y momento), se ven afectados fuertemente y constituyen uno de los mayores problemas en el escalamiento (Nielse et al., 2003). Sin embargo, los análisis de regresión lineal de las variables de operación y el contenido de los medios de cultivo podrían proporcionar información útil para el escalamiento de un bioproceso. En el presente estudio se determinó la correlación que existe entre la actividad queratinolítica generada durante la biodegradación de plumas de pollo, con respecto a las variables de operación y los

nutrientes del medio de cultivo, para ponderar su importancia en el bioproceso.

Materiales y Métodos

Selección de variables

Se realizó una selección de referencias bibliográficas sobre el proceso de degradación de plumas de pollo utilizando las palabras clave de optimización, degradación de plumas de pollo y actividad queratinolítica. Se llevó a cabo la extracción de datos, se homogenizaron respecto a sus unidades, las variables cualitativas se convirtieron en valores numéricos y los conjuntos de variables se agruparon en dos categorías 1) variables de operación: pasos de pretratamiento de las plumas; número de nutrientes del medio de cultivo, número de fuentes de carbono, nivel de degradación de las plumas de pollo (%), pH, temperatura (°C), tiempo de degradación (días), tipo de microorganismo (1 para bacterias, 2 para hongos), concentración del inóculo (células/l), velocidad de agitación (rpm), volumen del experimento (l), concentración de la principal fuente de carbono (g/l), contenido de proteína soluble total (mg/ml) y actividad queratinolítica (U/ml). 2) Nutrientes del medio de cultivo (g/l) (Tabla 1): fuente de carbono adicional, estimulador de crecimiento, primera fuente de nitrógeno, segunda fuente de nitrógeno, primera fuente de fósforo, segunda fuente de fósforo, primera fuente de azufre, segunda fuente de azufre, fuente de calcio, neutralizador de pH, fuente de hierro, fuente de magnesio, fuente de sodio y regulador de crecimiento.

Tabla 1. Clasificación de los nutrientes del medio de cultivo para degradación de plumas de pollo.

| Componente | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---------------------------------------|----------------------------------|---|----------------------------------|--------|----------|
| Fuentes de carbono adicionales | Suero lácteo | Glucosa | Glicerol | Xilosa | Sacarosa |
| Estimulador de crecimiento microbiano | Leche desnatada | Extracto de levadura | | | |
| Primera fuente de nitrógeno | NH ₄ HCO ₃ | NH ₄ Cl | Peptona | Urea | |
| Segunda fuente de nitrógeno | Urea | Peptona | | | |
| Primera fuente de fósforo | K ₂ HPO ₄ | NaH ₂ PO ₄ | | | |
| Segunda fuente de fósforo | KH ₂ PO ₄ | K ₂ H ₂ PO ₄ | Na ₂ HPO ₄ | | |
| Primera fuente de azufre | MgSO ₄ | | | | |
| Segunda fuente de azufre | ZnSO ₄ | | | | |
| Fuente de Calcio | CaCl ₂ | | | | |
| Neutralizador de pH | CaCO ₃ | | | | |
| Fuente de Hierro | FeSO ₄ | FeCl ₃ | | | |
| Fuente de Magnesio | MgCl ₂ | | | | |
| Fuente de sodio | NaCl | | | | |
| Regulador de crecimiento | Citrato Trisódico Dihidratado | | | | |

Se buscó la correlación entre las variables de operación respecto a la actividad queratinolítica y de la misma manera, entre los nutrientes del medio de cultivo con la actividad queratinolítica. En general, para todos los estudios consultados, la actividad queratinolítica se determinó mediante método espectrofotométrico con cinco compuestos diferentes para la generación de color: P-nitroanilida, tirosina, queratina azul, azoqueratina y péptido de extinción intramolecular, con un mayor uso de queratina azul. La actividad queratinolítica se midió a las longitudes de onda de 280, 320, 405, 440, 590, 595 y 660 nm, con uso de mayor frecuencia en 280 nm.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de normalidad en la distribución de los datos de las variables de operación y de los nutrientes del medio de cultivo. Para conjuntos de datos en los cuales el número de observaciones fue menor a 50, se usó la prueba de normalidad de Sapiro-Wilk. Si el valor de la significancia era mayor al 5% entonces se aceptaba la hipótesis nula: los datos siguen una distribución normal. Posteriormente y debido a que en todos los casos hubo al menos una variable que no cumplió la condición de distribución normal de los datos, se realizó un análisis de correlación de enfoque no paramétrico de tipo Rho de Spearman. Se identificó a la variable de actividad queratinolítica como dependiente, mientras que las variables de operación y los nutrientes del medio de cultivo se consideraron variables independientes. Las variables fueron consideradas si el valor de correlación era de moderado a muy fuerte en sentido positivo y negativo. Posteriormente, se revisó la multicolinealidad de las variables (alta correlación entre las variables predictoras). Las variables independientes en las que se dio una relación de moderada a fuerte se descartaron (Cardona et al., 2013).

Finalmente, se realizó un análisis de regresión lineal en el que se calculó el coeficiente de correlación ajustado y un análisis ANOVA con un nivel de significancia al 95%. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software SPSS Statistics versión 25.

Los valores de los coeficientes de la estimación lineal, de las variables de operación y las variables de nutrientes del medio se emplearon para construir una ecuación para predecir la actividad queratinolítica. Los valores de correlación de Rho de Spearman se utilizaron para ponderar las variables de operación y los nutrientes del medio de cultivo para un análisis integral del bioproceso.

Resultados

Extracción de información

Los pasos de pretratamiento (A) se refieren al procesamiento de las plumas de pollo previo a su degradación (Tabla 2), no incluyen la etapa de conservación ni el modo de recolección. Hubo entre uno y cinco pasos de pretratamiento de las plumas de pollo. El proceso más corto fue el lavado con agua (69.56%), el paso dos más frecuente fue el secado (57.89%), en el que se emplea la mínima temperatura para secar de 25°C (Embaby et al., 2015; Zaghloul et al., 2011) y la máxima de 80°C (Anand et al., 2016), con un promedio de 53.44°C ($\pm 14.9^\circ\text{C}$). El paso tres fue la esterilización (43.75%), seguido de la molienda de las plumas (50%) como paso cuatro y secado (50%) como paso cinco. La mayor actividad queratinolítica estuvo asociada a los procesos de pretratamiento de tres pasos, lavado, secado y esterilizado o molido (Govarathanan et al., 2014; Demir et al., 2015; Pahua-Ramos et al., 2017a; Jankiewicz & Frank, 2017; Peng et al., 2019; Nnolim et al., 2020).

Tabla 2. Valores de variables de operación en las que se determinó la actividad queratinolítica.

| Referencia | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | |
|----------------------------|---|---|---|-----|------|-----|---|-----|------|------|-------|-------|
| Demir et al. (2015) | 3 | 4 | 1 | 8 | 28 | 5.5 | 1 | 150 | 0.05 | 5 | 487 | |
| Demir et al. (2015) | 3 | 5 | 1 | 8 | 28 | 5.5 | 1 | 150 | 1.5 | 5 | 400 | |
| Bagewadi et al. (2018) | 4 | 9 | 2 | 8.5 | 37 | 10 | 2 | 120 | 0.05 | 150 | 67.66 | |
| Govarathanan et al. (2014) | 3 | 1 | 2 | 7 | 55 | 2.5 | 1 | 120 | 0.05 | 60 | 1075 | |
| Paul et al. (2013) | 1 | 6 | 1 | 6.4 | 30.2 | 3.5 | 1 | 2 | 150 | 0.05 | 5 | 54.13 |
| Liang et al. (2011) | 4 | 5 | 1 | 7.9 | 37 | 6 | 2 | 120 | 0.05 | 20 | 5.1 | |
| Bohacz, (2017) | 1 | 3 | 1 | 6.5 | 28 | 42 | 2 | 120 | 0.1 | 10 | 5.66 | |
| Yusuf et al. (2016) | 1 | 9 | 1 | 8 | 27 | 3 | 1 | 150 | 0.1 | 5 | 98 | |

Artículos

| Referencia | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K |
|------------------------------|------|-----|------|------|------|-----|-----|-------|-------|------|--------|
| Lai et al. (2023) | 4 | 6 | 1 | 7 | 37 | 2 | 1 | 200 | 0.1 | 10 | 195.05 |
| Peng et al. 2019 | 3 | 7 | 2 | 7 | 30 | 4 | 1 | 220 | 0.05 | 50 | 483.4 |
| Peng et al. 2019 | 3 | 7 | 2 | 7 | 30 | 2 | 1 | 500 | 1.5 | 50 | 600 |
| Ouertani et al. (2020) | 4 | 6 | 1 | 8 | 37 | 10 | 1 | 180 | 0.1 | 10 | 1.059 |
| Nnolim et al. (2020) | 3 | 5 | 2 | 5 | 25 | 5 | 1 | 150 | 0.097 | 10 | 1944 |
| Brandelli and Riffel, (2005) | 1 | 4 | 1 | 6 | 25 | 2 | 1 | 180 | 0.1 | 10 | 95 |
| Anand et al. (2016) | 2 | 5 | 1 | 8.5 | 37 | 5 | 1 | 120 | 0.1 | 5 | 81.8 |
| De Toni et al. (2022) | 1 | 5 | 1 | 7 | 30 | 3 | 1 | 200 | 0.5 | 10 | 324 |
| Dhiva et al. (2020) | 5 | 4 | 1 | 7 | 30 | 4 | 1 | 120 | 0.1 | 1 | 45 |
| Kani et al. (2012) | 5 | 7 | 1 | 7.5 | 37 | 30 | 1 | 120 | 1 | 1 | 0.884 |
| Kani et al. (2012) | 5 | 7 | 1 | 7.5 | 37 | 30 | 1 | 120 | 1 | 1 | 0.425 |
| Jankiewicz et Frank, (2017) | 3 | 5 | 1 | 8 | 28 | 3 | 1 | 120 | 1 | 10 | 8.08 |
| Promedios | 2.95 | 5.5 | 1.25 | 7.29 | 32.6 | 8.9 | 1.2 | 165.5 | 0.4 | 21.4 | 298.6 |

A: Pasos en el pretratamiento, B: Componentes en el medio de cultivo, C: Número de fuentes de carbono, D: pH, E: Temperatura (°C), F: Tiempo de degradación (días), G: Tipo de microorganismo, H: Velocidad de agitación (rpm), I: volumen (l), J: Concentración del sustrato (g/l) y K: Actividad queratinolítica (U/ml).

El número de nutrientes del medio (B) se refiere a la cantidad de sustancias que se usaron para evaluar la biodegradación de plumas de pollo. En promedio los medios de cultivo están conformados por 5.45 componentes. El medio de cultivo más simple fue el utilizado por Zaghoul et al. (2011) y Govarthanan et al. (2014) quienes únicamente emplearon agua destilada para la degradación de plumas de pollo. Hubo dos medios de cultivo con el número máximo de ocho sustancias (g/l): extracto de levadura (1.0), glucosa (3.0), K₂HPO₄ (1.5), MgSO₄*7H₂O (0.05), CaCl₂ (0.025), NaCl (0.5), FeSO₄*7H₂O (0.015) y ZnSO₄*7H₂O (0.005) para la biodegradación de plumas de pollo reportado por Bagewadi et al (2018). También el medio de cultivo utilizado en Yusuf et al (2016) contiene ocho componentes (g/l): NaCl (0.5), K₂HPO₄ (0.7), KH₂PO₄ (1.4), MgSO₄*6H₂O (0.001), sacarosa (5), H₂CO₃ (1.5), leche desnatada (3) y urea (0.1), estos medios de cultivo no se relacionaron con altos niveles de actividad queratinolítica (67.66 y 98 U/ml, respectivamente), en comparación con el valor promedio de 298.56 U/ml obtenido de 20 reportes bibliográficos considerados en esta parte del estudio.

El número de fuentes de carbono (C) se refiere al uso de otras fuentes de carbono adicionales a las plumas de pollo, mismas que se espera mejoren el crecimiento microbiano y/o el proceso de degradación; el 25% de los reportes consultados integró una segunda fuente de carbono más sencilla desde el punto

de vista molecular y de fácil asimilación (suero lácteo, glucosa, glicerol, xilosa y sacarosa). En algunos casos, la adición de la segunda fuente de carbono generó bajos niveles de actividad queratinolítica con respecto al promedio (298.56 U/ml); glucosa y sacarosa con valores de 98 U/ml (Bagewadi et al., 2018) y 60.89 U/ml respectivamente (Yusuf et al., 2016 y Lai et al., 2023).

Los promedios obtenidos para el pH (D), temperatura (E), tiempo de degradación (F), velocidad de agitación (H) y concentración de sustrato (J) fueron 7.29 (± 0.88), 32.6 ($\pm 6.88^\circ\text{C}$), 8.9 (± 11.27 horas), 165.5 (± 85.06 rpm) y 21.4 (± 34.92 g/l) respectivamente. El volumen de operación en general fue a nivel de laboratorio 0.37 (± 0.51 l), con algunos reportes que evaluaron la actividad queratinolítica en reactores tipo lote de 1 y 1.5 l (Kani et al., 2012; Demir et al., 2015; Jankiewicz & Frank, 2017; Peng et al., 2019). El impacto de las variables en la degradación de plumas de pollo no tiene una tendencia aparente, por lo que fue necesario realizar una regresión lineal con dichas variables para identificar el nivel de impacto en la actividad queratinolítica.

Para la variable del tipo de microorganismo (G) se asignó el valor de 1 para el caso de bacterias y el valor de 2 para cuando se trata de hongos, considerando que los hongos en general tienen un ciclo de vida y de reproducción que toma más tiempo en comparación con las bacterias, además de

que los hongos presentan mayor requerimientos nutrimentales. Los estudios de biodegradación de plumas de pollo principalmente consideran a las siguientes bacterias Gram positivas, *Bacillus* sp. Nnolim-K1 (Nnolim et al., 2020), *Bacillus* sp. MG-MASC-BT (Govarthanan et al., 2014), *Bacillus licheniformis* BBE11-1 y *Stenotrophomonas maltophilia* BBE11-1 (Peng et al., 2019), *Streptomyces* sp. 2M21 (Demir et al., 2015), *Bacillus* sp. CN2 (Lai et al., 2023), *Bacillus halotolerans* 4BC (Ouertani et al., 2020), *Leuconostoc* sp. (Kani et al., 2012), y bacterias Gram negativas, *Alcaligenes* sp. AQ05-001 (Yusuf et al., 2016), *Xanthomonas maltophilia* (POA-1) (De Toni et al., 2002), *Chryseobacterium* sp. kr6 (Brandelli & Riffel, 2005), *Kocuria rosea* (Anand et al., 2016), *Pseudomonas aeruginosa* SU-1 (Dhiva et al., 2020), *Stenotrophomonas maltophilia* N4 (Jankiewicz & Frank, 2017b), *Pseudomonas microphilus* (Kani et al., 2012), *Alcaligenes* sp. y *Brevundimonas* sp. (Pahua-Ramos et al., 2017a), Células recombinantes de *Bacillus*

subtilis (Zaghloul et al., 2011), *Bacillus licheniformis* SHG10 (Embaby et al., 2015) y *Alcaligenes faecalis* (TPB18) (Ezenwali, 2022). Por otro lado, las especies de hongos comunes en los estudios de degradación de plumas de pollo fueron *Trichoderma harzianum* aislado HZN12 (KP235366) (Bagewadi et al., 2018), *Aspergillus fumigatus* TKF1 (Paul et al., 2013), *Aphanoascus fulvescens* y *Chrysosporium articulatum* (Bohacz, 2017) y *Myceliophthora thermophila* (Apinis) Cepa Oorschot GZUIFR-H49-1 (Liang et al., 2011).

Análisis estadístico

Estimación de la actividad queratinolítica

Del análisis estadístico se encontraron los coeficientes de correlación de Rho Spearman entre la actividad queratinolítica y las variables extraídas de los reportes bibliográficos (Tabla 3) con los valores para variables de operación contra actividad queratinolítica.

Tabla 3. Coeficientes de correlación de Rho de Spearman entre variables de operación y la actividad queratinolítica.

| | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J |
|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Pasos de pretratamiento (A) | 1.000 | 0.258 | 0.062 | 0.274 | 0.539 | 0.389 | 0.112 | -0.309 | 0.089 | -0.130 |
| Nutrientes del medio de cultivo (B) | 0.258 | 1.000 | 0.194 | 0.309 | 0.214 | 0.096 | -0.022 | 0.236 | 0.156 | 0.004 |
| Número de fuentes de carbono adicionales (C) | 0.062 | 0.194 | 1.000 | -0.194 | 0.083 | -0.181 | 0.000 | 0.180 | -0.322 | 0.692 |
| pH (D) | 0.274 | 0.309 | -0.194 | 1.000 | 0.286 | 0.334 | 0.055 | -0.320 | 0.105 | -0.111 |
| Temperatura (E) | 0.539 | 0.214 | 0.083 | 0.286 | 1.000 | 0.207 | -0.168 | -0.302 | -0.166 | 0.135 |
| Tiempo de degradación (F) | 0.389 | 0.096 | -0.181 | 0.334 | 0.207 | 1.000 | -0.381 | -0.528 | -0.041 | -0.283 |
| Tipo de microorganismo (G) | 0.112 | -0.022 | 0.000 | 0.055 | -0.168 | -0.381 | 1.000 | 0.344 | 0.461 | -0.268 |
| Velocidad de agitación (H) | -0.309 | 0.236 | 0.180 | -0.320 | -0.302 | -0.528 | 0.344 | 1.000 | 0.089 | 0.257 |
| Volumen (I) | 0.089 | 0.156 | -0.322 | 0.105 | -0.166 | -0.041 | 0.461 | 0.089 | 1.000 | -0.375 |
| Concentración de fuente de carbono (J) | -0.130 | 0.004 | 0.692 | -0.111 | 0.135 | -0.283 | -0.268 | 0.257 | -0.375 | 1.000 |
| Actividad queratinolítica | -0.382 | -0.180 | 0.591 | -0.248 | -0.334 | -0.574 | 0.347 | 0.521 | -0.206 | 0.389 |

Correlación con nivel de significancia del 0.05 (95% de confianza).

Las variables de operación correlacionadas con la actividad queratinolítica a un nivel moderado fueron el número de fuentes de carbono adicionales, tiempo de degradación y la velocidad de agitación. Las variables de pasos de pretratamiento y concentración de fuente de carbono, se consideraron aunque tuvieron correlación débil. Después de revisar multicolinealidad, las variables resultantes y

que permitieron una estimación lineal respecto a la actividad queratinolítica fueron el número de fuentes de carbono adicionales y el tiempo de degradación. El coeficiente de correlación R^2 fue bajo, aún más bajo el R^2 ajustado, este último se refiere a la diferencia que existe entre los datos obtenidos de la literatura con respecto a la ecuación lineal obtenida mediante mínimos cuadrados y

asociada al número de variables que se emplean en el proceso de estimación lineal. Para el caso anterior el número de variables fue de 2, en general a mayor número de variables incrementa el valor de R^2 pero no el R^2 ajustado. El R^2 ajustado indica que el tiempo de degradación y el número de fuentes de carbono, guardan una correlación significativa con la actividad queratinolítica y representan el 39% de dicha variable, mientras que el 61% se explica con otras variables que no están integradas en el análisis. El análisis de ANOVA mostró un valor de significancia menor al 5% (0.005), por ello se puede decir que es factible construir un modelo de regresión lineal múltiple a partir de las variables dependientes y sus predictoras. El valor del coeficiente indica que a mayor número de fuentes de carbono (679.59) y menor tiempo de degradación (-6.13), es mayor la actividad queratinolítica esperada. Con los valores de los coeficientes estandarizados se puede calcular el nivel de impacto de cada variable, en este sentido el tiempo de degradación impacta 4.36 veces menos que el número de fuentes de carbono. El signo del coeficiente estandarizado o no estandarizado, indica el sentido del impacto entre las variables correlacionadas (Modelo 1, Fig. 2).

Las variables de nutrientes del medio de cultivo correlacionadas con la actividad queratinolítica a un nivel moderado fueron, la primera fuente de nitrógeno, la fuente de calcio y el neutralizador de pH, mismas que no presentan multicolinealidad, por lo que es posible una estimación lineal respecto a la actividad queratinolítica. El coeficiente de correlación R^2 ajustado (Modelo 2, Fig. 2) fue mayor al obtenido en la estimación lineal realizada con las variables de operación, aun considerando que para este caso el número de variables independientes fue de 3. El R^2 ajustado indica que el neutralizador de pH, la fuente de calcio y la primera fuente de nitrógeno guardan una correlación significativa con la actividad queratinolítica y representan el 80.5% de dicha variable, mientras que el 19.5% se explica con otras variables. El análisis de ANOVA mostró un valor de significancia menor al 5% (0.005), por ello se puede decir que es factible construir un modelo de regresión lineal múltiple a partir de las variables dependientes y sus predictoras. Con base en los valores de coeficientes del

modelo lineal estandarizados se puede decir que el mayor elemento de influencia en la actividad queratinolítica fue la fuente de calcio, seguido de las sustancias neutralizadoras de pH (3.09 veces menos) y la fuente de nitrógeno (41.90 veces menos).

En un estudio sobre los nutrientes del medio de cultivo para la etapa de degradación con la cepa H49-1 de *M. thermophila* mostró que algunas fuentes de carbono complementarias podrían promover la actividad queratinolítica, la cual aumentó a 1800 U/l después de agregar almidón soluble al medio líquido básico e incubar durante 6 días (Liang et al., 2011). Sin embargo, para otros estudios la adición de fuentes de carbono adicionales como maltosa, glicerol, sorbitol y fructosa al medio, no aumentó el nivel de actividad queratinolítica en el medio en comparación con el control (Yusuf et al., 2016).

Los porcentajes obtenidos de las 22 referencias bibliográficas revisadas, para los distintos componentes del medio de cultivo fueron: segunda fuente de nitrógeno en 95.5% (urea y peptona HM B#), regulador de crecimiento en 90.9% (citrato trisódico dihidratado), fuente de magnesio en 81.8% ($MgCl_2$), primera fuente de fósforo en 68.2% (K_2HPO_4 y NaH_2PO_4), fuente de carbono adicional en 45.5% (suero lácteo, glucosa, glicerol, xilosa y sacarosa), estimulador de crecimiento microbiano en 40.9% (leche desnatada y extracto de levadura), segunda fuente de fósforo en 40.9% (KH_2PO_4 , $K_2H_2PO_4$ y Na_2HPO_4), fuente de iones de hierro en 31.8% ($FeSO_4$ y $FeCl_3$), segunda fuente de azufre en 13.6% ($ZnSO_4$), fuente de calcio en 13.6% ($CaCl_2$ y $CaCO_3$), neutralizador de pH en 13.6% ($CaCO_3$), primera fuente de nitrógeno en 9.1% (NH_4HCO_3 , NH_4Cl , peptona y urea), primera fuente de azufre en 4.5% ($MgSO_4$) y fuente de sodio en 4.5% ($NaCl$).

El pH juega un doble rol en la actividad queratinolítica de las enzimas; éste parámetro se ve afectado durante el proceso de la hidrólisis ya que las plumas de pollo son ricas en nitrógeno y al momento de la degradación se libera nitrógeno inorgánico, lo que conduce a un aumento del pH (alcalinización), esta reacción se ha atribuido a la alta concentración de amoníaco, resultante de la desaminación de los grupos que contienen

aminoácidos que emanan de la queratina de las plumas de pollo (Nnolim et al., 2020). Sin embargo, el pH de producción no necesariamente es el pH óptimo de reacción de la enzima, se ha reportado que la actividad queratinolítica se mantuvo en 90% de su actividad cuando se expuso a un pH de 5 a 7 durante 3 h, mientras que los valores de pH bajos le confieren mayor estabilidad. A pH 9, la enzima retuvo 50% de su actividad catalítica, con actividad queratinolítica mejorada a pH 8 (Paul et al., 2013). En cepas bacterianas como *Chryseobacterium* sp. kr6 durante la degradación de plumas de pollo, los valores de pH aumentaron hasta 8.3, con una tasa máxima de producción específica alcanzada a las 24 h, la cual coincide con el final de la fase de crecimiento exponencial (Brandelli & Riffel, 2005). Para el estudio con *Alcaligenes* sp. AQ05-001 crecida en un rango de pH de 7 a 9 usando tampón fosfato, la mejor actividad queratinolítica se limitó a un pH de 7.5 a 8.5 con una degradación de las plumas del 96%. En tanto que a valores de pH extremadamente bajos y/o altos, hubo baja actividad enzimática y degradación de las plumas, mostrando que las condiciones no son favorables para su crecimiento y supervivencia (Yusuf et al., 2016). En el caso de algunos hongos como *Acipenser fulvescens* y *C. articulatum* a los 42 días de cultivo provocaron la solubilización y mineralización de las proteínas de las plumas, como lo indica la liberación de péptidos y la acumulación de $N-NH_4$ en el medio, mismos que se correlacionaron con un aumento del pH (Bohacz, 2017).

La elección del $CaCl_2$ como componente del medio de cultivo se fundamenta en varias razones. En primer lugar, el calcio es un cofactor esencial para muchas enzimas, incluidas las queratinasas, que catalizan la degradación de la queratina. La presencia de $CaCl_2$ en el medio proporciona este cofactor, lo que aumenta la eficiencia y la actividad enzimática. Además, el $CaCl_2$ puede actuar como un estabilizador de la estructura de las proteínas, facilitando la interacción entre la enzima y su sustrato, lo que conduce a una mayor eficacia en la degradación de las proteínas queratinolíticas. Las investigaciones llevadas a cabo por Liang et al. (2010) respaldan la importancia del $CaCl_2$ en el proceso de degradación de plumas de pollo. En su estudio, encontraron que, entre las

sales metálicas analizadas, el $CaCl_2$ fue la más eficaz, aumentando la actividad queratinolítica a 1600 U/l. Este aumento significativo en la actividad enzimática subraya el papel crucial del $CaCl_2$ en la potenciación de la actividad queratinolítica y la descomposición de queratina. Además, los hallazgos de Bagewadi et al. (2018) proporcionan una perspectiva adicional sobre la importancia del $CaCl_2$ en la actividad queratinolítica. En su investigación, encontraron que la producción máxima de queratinasa se alcanzó en un medio que incluía $CaCl_2$ en un nivel alto (0.005%) Esto sugiere que la presencia de $CaCl_2$ contribuye significativamente a la optimización de las condiciones de cultivo para la producción de enzimas queratinolíticas, lo que resulta en una mayor eficiencia en la degradación de queratina.

Acerca de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo, se ha reportado que la adición de 1 g/l de nitrógeno elemental procedente de nitrógeno inorgánico (bicarbonato de amonio y urea) aumentó la actividad queratinolítica y velocidad de degradación de las plumas de pollo mediante *Alcaligenes* sp. AQ05-001 (Yusuf et al., 2016). Otro reporte similar aunque para el hongo *M. thermophila* GZUIFR-H49-1 indica que la urea y el tiosulfato de sodio aumentaron la actividad queratinolítica en comparación con los cultivos en medio líquido básico. Aunque, otras fuentes de nitrógeno y azufre como caseína, soja, gelatina, alanina, NH_4NO_3 y NH_4C (Son et al., 2008; Gioppo et al., 2009) inhibieron hasta cierto punto la actividad queratinolítica cuando se agregaron al medio (Liang et al., 2011). La actividad queratinolítica con la bacteria *Bacillus* sp. Nnolim-K1 no aumentó con la adición de fuentes de nitrógeno en comparación con el control (Nolim et al., 2020). Se han asociado los bajos rendimientos de actividad enzimática en medios con fuentes de nitrógeno y plumas de pollo, debido a que los microorganismos prefieren las fuentes de nitrógeno fácilmente asimilables en comparación con el nitrógeno presente en las plumas de pollo, de ahí la caída en la actividad queratinolítica (Nnolim et al., 2020).

En cuanto a las variables de operación y las variables de nutrientes del medio de cultivo correlacionados con la actividad

Artículos

queratinolítica, se utilizaron 17 referencias bibliográficas que cumplieron con los elementos necesarios. Las variables con correlación moderada en la actividad queratinolítica fueron los pasos de pretratamiento, la temperatura, tiempo de degradación, la velocidad de agitación, la primera fuente de nitrógeno, la fuente de calcio y el neutralizador de pH. Aunque bajo el criterio de multicolinealidad únicamente las variables que permitieron una estimación lineal respecto a la actividad queratinolítica fueron el neutralizador de pH, la fuente de calcio, el tiempo de degradación, la temperatura y la primera fuente de nitrógeno. En comparación con los análisis estadísticos independientes de las variables de operación y los nutrientes del medio de cultivo, en el análisis integral se agregó la variable de temperatura y se eliminó el número de fuentes de carbono adicionales, demostrando que hay mayor influencia de la temperatura que por la fuente de carbono adicional, en la actividad queratinolítica cuando se incorpora al análisis estadístico a todos los nutrientes del medio de cultivo. El coeficiente de correlación R^2 ajustado fue mayor al obtenido en la estimación lineal realizada en forma independiente de las variables de operación y las variables de los nutrientes del medio de cultivo, aun considerando que para este caso el número de variables independientes fueron cinco (Modelo 3, Fig. 2). El valor del R^2 ajustado, indica que las cinco variables independientes tienen una correlación significativa con la actividad queratinolítica que representa el 86.1% de dicha variable, mientras que el 13.1% se explica con otras

variables. En la tabla 4 de ANOVA mostrada a continuación, el valor de significancia fue menor al 5% (0.005), por ello se puede decir que es factible construir un modelo de regresión lineal múltiple a partir de las variables dependientes y sus predictoras.

Con los valores obtenidos de la regresión lineal de la actividad queratinolítica con respecto a las variables de operación y de los nutrientes del medio de cultivo (Tabla 4, columna B) se obtuvo la ecuación 1 (Fig. 1), que es una importante guía en la estimación de la actividad queratinolítica durante la biodegradación de plumas de pollo, que podría resultar útil en la evaluación *a priori* de bioprocesos que se centren en la producción de la enzima queratinolítica y en donde no es posible determinar dicha actividad enzimática. Cabe mencionar que el valor de R^2 ajustado, es un buen valor considerando la diversidad de los datos en la que las condiciones y los métodos utilizados fueron diversos, tal como en el caso de la actividad queratinolítica. Incluso para reportes en donde no se determinó la actividad queratinolítica es posible estimarla con esta ecuación, tales es el caso de los reportes de Pahuá-Ramos et al. (2017a) y Embaby et al. (2015), en los que la estimación genera un valor de -4.845 y -140.619 U/ml, respectivamente, los valores negativos en la estimación lineal de la actividad queratinolítica se generan cuando ésta es menor a 20 U/ml, con base en la ecuación mostrada (Fig. 1), por lo que la actividad enzimática para ambos reportes bibliográficos de medirse habría estado por debajo de 20 U/ml.

Tabla 4. Regresión lineal de la actividad queratinolítica con respecto a las variables de operación y de los nutrientes del medio de cultivo.

| Modelo | Coeficientes ^a | | no | Coeficientes estandarizados | t | Sig. | 95.0% intervalo de confianza para B | | |
|-----------------------------|---------------------------|---------|----|-----------------------------|--------|--------------|-------------------------------------|-----------------|-----------------|
| | estandarizados | | | | | | Beta | Límite inferior | Límite superior |
| | B | Desv. | | | | | | | |
| (Constante) | 949.920 | 355.379 | | | 2.673 | 0.022 | 167.736 | 1732.105 | |
| Temperatura | -29.952 | 11.159 | | -0.309 | -2.684 | 0.021 | -54.514 | -5.390 | |
| Tiempo de degradación | -1.554 | 4.154 | | -0.040 | -0.374 | 0.715 | -10.696 | 7.589 | |
| Primera fuente de nitrógeno | 41.585 | 27.827 | | 0.183 | 1.494 | 0.163 | -19.662 | 102.832 | |
| Fuente de calcio | 7231.255 | 813.438 | | 0.882 | 8.890 | 0.000 | 5440.890 | 9021.620 | |
| Neutralizador de pH | 63.633 | 28.253 | | 0.230 | 2.252 | 0.046 | 1.449 | 125.818 | |

a. Variable dependiente: Actividad queratinolítica.

AE vs AE*

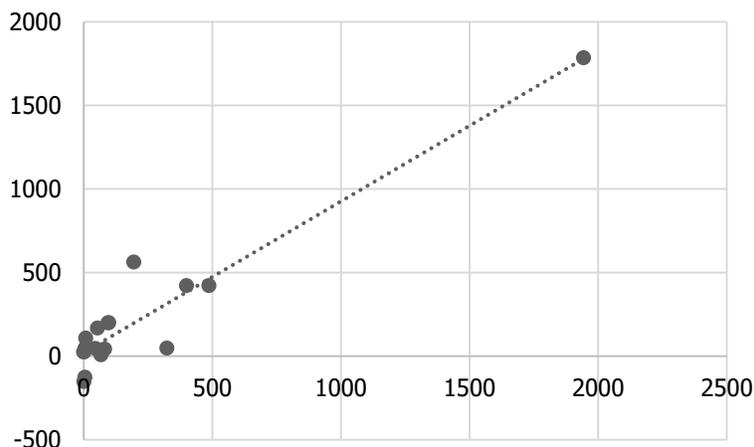


Figura 1. Distribución de datos sobre actividad queratinolítica de fuentes bibliográficas (●) y obtenidos a partir de ecuación lineal (---): actividad queratinolítica estimada (AE*) = 949.92+7231.255 fuente de calcio + 63.633 neutralizador de pH + 41.585 primera fuente de nitrógeno - 29.952 temperatura - 1.554 tiempo.

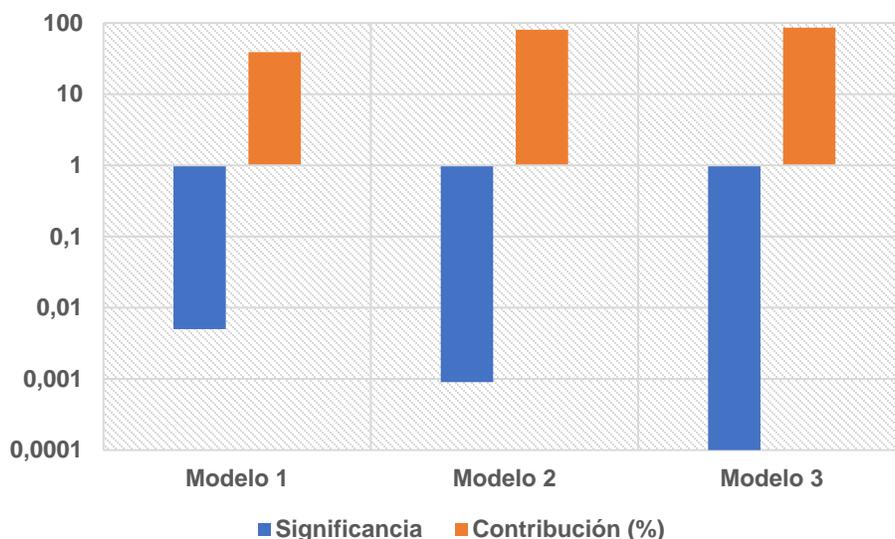


Figura 2. Resumen de resultados de regresión lineal de la actividad queratinolítica con respecto a las variables de operación y nutrientes del medio de cultivo.

Análisis integral del bioproceso

Otro resultado importante del análisis estadístico de las variables inmersas en la biodegradación de plumas de pollo fueron los valores de correlación, obtenidas mediante un método no paramétrico para correlación de Rho de Spearman, algunas de estas fueron descartadas en el apartado 3.2.1, por tener bajos valores de correlación o presentar multicolinealidad. Sin embargo, para un proceso de revisión enfocado en el escalamiento del bioproceso podrían ser relevantes (Tabla 5).

Las variables con un nivel de correlación moderada podrían ser consideradas como variables de observación durante un proceso de escalamiento por tener algún nivel de correlación representativo con la actividad queratinolítica, con la reserva de que ésta última solo describe una parte de la degradación de las plumas de pollo. Al menos 10 referencias bibliográficas utilizadas en este trabajo reportaron el porcentaje de degradación de las plumas de pollo (C1), la concentración de dicho sustrato (C2) y la actividad queratinolítica (AE). Se utilizaron

para aplicar el mismo proceso expuesto en la metodología para la estimación lineal, se observó una fuerte correlación de Rho de Spearman entre AE y C1 (0.699) y moderada correlación para AE con C2 (0.467). El valor de R^2 ajustado fue de -0.024 para AE relacionado con C1 y C2 y de 0.041 para EA relacionado con C1, lo cual indica que existe alta correlación no lineal entre la degradación de plumas de pollo y la actividad queratinolítica.

En general se podría esperar que la biodegradación de plumas de pollo este fuertemente asociada a la actividad queratinolítica, aunque diversos autores han reportado que en dicha biodegradación participan otras enzimas proteolíticas (Bohacz, 2017; Peng et al., 2019 y Kang et al., 2020). Generalmente se considera que la descomposición microbiana de la queratina se puede dividir en tres etapas: desnaturalización, degradación y transaminación (Peng et al., 2019). La degradación de la queratina de las plumas está determinada por la capacidad de los microorganismos para superar la barrera de resistencia a la hidrofobicidad (Kang et al., 2020), la compacta configuración estructural impuesta por cadenas polipeptídicas, alta reticulación (Ignatova et al., 1999) y la presencia de enlaces disulfuro (Kang et al., 2020). En lo que respecta a la ruptura de enlaces disulfuro, las teorías de la tiolisis y la hidrólisis enzimática se consideran las más razonables (Peng et al., 2019). La biodegradación de la queratina de las plumas de pollo por *A. fulvescens* y *C. articulatum* estuvo condicionada a la desaminación de los aminoácidos proteicos durante la cual se alcalinizaron los cultivos. La liberación de iones amonio se correlacionó negativamente con las actividades de la proteasa caseínolítica y la queratinolítica, lo que puede indicar que otra enzima participa en la desaminación (Bohacz, 2017). Los productos de proteólisis y amonificación de proteínas pueden inhibir la actividad proteolítica (Korniłłowicz-Kowalska, 1997). Aunque la actividad hidrolítica de las enzimas queratinolíticas sobre los monómeros de queratina es mayor que la de las proteasas ordinarias, la degradación completa de la queratina requiere la acción sinérgica de múltiples enzimas y una sola enzima queratinolítica parece tener dificultades para

hidrolizar de manera eficiente los sustratos naturales de queratina con una estructura compleja (Kang et al., 2020).

En el estudio de degradación de plumas de pollo es altamente recomendable medir la actividad queratinolítica y el porcentaje de degradación a saber, de los 26 estudios considerados en esta revisión, 46.15% cumple con este criterio.

Las variables de correlación de Rho de Spearman con nivel muy débil (Tabla 5) no impactan de manera importante en la producción de la actividad queratinolítica y en consecuencia no juegan un rol importante en la degradación de plumas de pollo. Por lo que se espera que no afecten la productividad del bioproceso a escalas superiores, tal es el caso de la primera fuente de fósforo, la segunda fuente de azufre, la primera fuente de azufre, el estimulador de crecimiento y el pH. Aunque hay que destacar que a pesar de que las variables de la segunda fuente de nitrógeno, concentración de fuente de carbono y fuente de sodio están en la categoría de correlación muy débil, son superiores en un orden de magnitud con respecto a las cinco variables antes mencionadas.

En la tabla 5, se muestran siete variables de correlación de nivel moderado, que pueden utilizarse con mayor seguridad como variables de observación durante el escalamiento del bioproceso. Debido a la correlación moderada que tienen con la actividad queratinolítica, se espera que sean las variables que puedan prever los cambios a escalas superiores de producción. En general, se esperaba que a mayor velocidad de agitación, concentración de fuente de calcio, contenido de neutralizador de pH y a menores pasos de pretratamiento, tiempo de fermentación, concentración de la primera fuente de nitrógeno y temperatura, se genere altos niveles de actividad queratinolítica y en consecuencia de degradación de plumas de pollo. Las variables con coeficientes débiles eventualmente podrían ayudar a dar seguimiento en el escalamiento del bioproceso, aunque con menor seguridad.

No hay que perder de vista que el análisis de la información considerada en este estudio es un acercamiento a la generalidad, proveniente de información con diferencias importantes

Artículos

pero que encuentran una correlación por la forma y cantidad de datos analizados. Por ello el proceso metodológico aquí empleado podría utilizarse en las investigaciones preliminares sobre un bioproceso en nuevos organismos probados, bajo condiciones de operación distintas y tipos de medio de cultivo,

con el objeto de generar diseños experimentales, esboce general de las variables implícitas en un bioproceso, identificación de variables de impacto en procesos de escalamientos, entre otras aplicaciones.

Tabla 5. Nivel de correlación Rho Spearman de variables de operación y variables de los nutrientes del medio de cultivo en la actividad queratinolítica.

| Variable | Coefficiente de correlación | Nivel de correlación | Multicolinealidad positiva | Multicolinealidad negativa |
|--|-----------------------------|----------------------|---|--|
| Velocidad de agitación | 0.571 | moderada | Regulador de crecimiento | Tiempo |
| Fuente de calcio | 0.405 | moderada | Número de fuentes de carbono adicionales, Regulador de crecimiento, Fuente de carbono adicional, Segunda fuente de azufre, Concentración de fuente de carbono | NA |
| Neutralizador de pH | 0.404 | moderada | Fuente de sodio, Primera fuente de fósforo | Segunda fuente de fósforo |
| Número de fuentes de carbono adicionales | 0.298 | débil | Fuente de calcio, Segunda fuente de azufre, Concentración de fuente de carbono | Volumen |
| Tipo de microorganismo | 0.283 | débil | Volumen | Primera fuente de fósforo, Fuente de Fe y Concentración de fuente de carbono |
| Fuente de carbono adicional | 0.232 | débil | Regulador de crecimiento, Fuente de calcio, Segunda fuente de azufre y Primera fuente de azufre | NA |
| Regulador de crecimiento | 0.204 | débil | Fuente de carbono adicional, Fuente de calcio y Velocidad de agitación | NA |
| Segunda fuente de nitrógeno | 0.144 | muy débil | Estimulador de crecimiento, Primera fuente de nitrógeno, pH | NA |
| Concentración de fuente de carbono | 0.139 | muy débil | Fuente de calcio, Número de fuentes de carbono adicionales y Segunda fuente de azufre | NA |
| Fuente de sodio | 0.130 | muy débil | Neutralizador de pH | Segunda fuente de fósforo, Fuente de calcio |
| Primera fuente de fósforo | 0.059 | muy débil | Neutralizador de pH, Fuente de Fe | Tipo de microorganismo |
| Segunda fuente de azufre | 0.000 | muy débil | Número de fuentes de carbono adicionales, Fuente de Fe, Fuente de carbono adicional, Fuente de calcio, Concentración de fuente de carbono | Tipo de microorganismo |
| Primera fuente de azufre | -0.026 | muy débil | Fuente de Fe, Fuente de carbono adicional | Tiempo, Fuente de Magnesio |
| Estimulador de crecimiento | -0.078 | muy débil | Segunda fuente de nitrógeno, Primera fuente de nitrógeno, pH | Primera fuente de fósforo |
| pH | -0.087 | muy débil | Estimulador de crecimiento, Segunda fuente de nitrógeno | NA |
| Fuente de Fe | -0.118 | muy débil | Primera fuente de azufre, Segunda fuente de azufre, Primera fuente de fósforo | Tipo de microorganismo |
| Volumen | -0.201 | débil | Tipo de microorganismo y Fuente de Magnesio | NA |
| Segunda fuente de fósforo | -0.265 | débil | NA | Neutralizador de pH y Fuente de sodio |
| Fuente de Magnesio | -0.268 | débil | Tiempo, Pasos de pretratamiento, Primera fuente de nitrógeno, Volumen | Primera fuente de azufre |

Artículos

| Variable | Coefficiente de correlación | Nivel de correlación | Multicolinealidad positiva | Multicolinealidad negativa |
|-----------------------------|-----------------------------|----------------------|---|----------------------------|
| Pasos de pretratamiento | -0.467 | moderada | Temperatura, Fuente de Magnesio y Tiempo | NA |
| Tiempo | -0.541 | moderada | Fuente de Magnesio, Pasos de pretratamiento, Primera fuente de nitrógeno | Velocidad de agitación |
| Primera fuente de nitrógeno | -0.561 | moderada | Estimulador de crecimiento, Temperatura, Segunda fuente de nitrógeno, Fuente de Magnesio y Tiempo | NA |
| Temperatura | -0.567 | moderada | Pasos de pretratamiento, Primera fuente de nitrógeno | NA |

Conclusiones

Con base en el objetivo planteado, fue posible realizar cálculos de estimación lineal con la información publicada en literatura hasta obtener un factor de correlación ajustado aceptable en comparación con estudios semejantes, dicha correlación permitió la generación de una ecuación lineal para el cálculo de la actividad queratinolítica con base en variables de operación y los nutrientes del medio de cultivo más usuales en la biodegradación de plumas de pollo. Por otro lado, se propuso una vía para la selección de variables para el seguimiento de un escalamiento teórico del bioproceso, con base en los valores de correlación de Rho de Spearman. El método de revisión aquí propuesto es una alternativa rápida para el análisis de los reportes de literatura de algún bioproceso, del que se desee conocer la correlación de las variables involucradas con potencial para la jerarquización de las variables implícitas, que podrían funcionar como una guía en procesos de diseños experimentales y seguimiento en el escalamiento de procesos.

Agradecimientos

El presente proyecto se realizó como parte de una estancia posdoctoral, financiada por parte del Consejo de Ciencia Tecnología e Innovación de Hidalgo. De la misma manera se agradece a la Universidad Tecnológica de Tecámac por las facilidades para el trabajo que se desarrolló.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Referencias

Cardona D, González Rodríguez JL, Rivera Lozano M & Cárdenas Vallejo E (2013) Inferencia estadística Módulo de regresión lineal simple. Repositorio Institucional E-docUR. Universidad del Rosario.
https://doi.org/10.48713/10336_10447

Anand C, Mehta M, Shah G (2016) Degradation of keratin waste products by *Kocuria rosea*. National Journal of Advanced Research 2 (4), 21-22.

Bagewadi ZK, Mulla SI, Ninnekar HZ (2018) Response surface methodology based optimization of keratinase production from *Trichoderma harzianum* isolate HZN12 using chicken feather waste and its application in dehairing of hide. Journal of Environmental Chemical Engineering 6(4), 4828-4839.
<https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.07.007>

Bohacz J, (2017) Biodegradation of feather waste keratin by a keratinolytic soil fungus of the genus *Chrysosporium* and statistical optimization of feather mass loss. World Journal of Microbiology and Biotechnology 33, 1-16.
<https://doi.org/10.1007/s11274-016-2177-2>

Brandelli, A, Riffel, A 2005 Production of an extracellular keratinase from *Chryseobacterium* sp. growing on raw feathers. Electronic Journal of Biotechnology 8(1), 35-42.

Chaturvedi V, Agrawal K, & Verma P (2021) Chicken feathers: A treasure cove of useful metabolites and value-added products. Journal of Environmental Sustainability 4, 231-243.
<https://doi.org/10.1007/s42398-021-00160-2>

De Toni, C H, Richter MF, Chagas JR, Henriques JA, Termignoni, C 2002 Purification and characterization of an alkaline serine endopeptidase from a feather-degrading *Xanthomonas maltophilia* strain. Canadian Journal of Microbiology 48(4), 342-348.

<https://doi.org/10.1139/w02-027>

Demir T, Hameş EE, Öncel SS, Vardar-Sukan F, 2015 An optimization approach to scale up keratinase production by *Streptomyces* sp. 2M21 by utilizing chicken feather. International Biodeterioration & Biodegradation 103, 134-140.

<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.04.025>

Dhiva S, Ranjith KR, Prajitsya P, Sona KPNarendrakumar G, Prakas, P, Samrot AV, 2020 Optimization of keratinase production using *Pseudomonas aeruginosa* Su-1 having feather as substrate. Biointerface Research in Applied Chemistry 10, 6540-6549.

<https://doi.org/10.33263/BRIAC105.65406549>

Embaby AM, Marey HS, Hussein A, 2015 A statistical-mathematical model to optimize chicken feather waste bioconversion via *Bacillus licheniformis* SHG10: a low cost effective and ecologically safe approach. Journal of Bioprocessing & Biotechniques5(6), 1-14.

<https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000231>

Ezenwali M, 2022 Optimization, Isolation and Characterization of a keratinolytic Protease from Human Hair-Degrading Bacterium *Alcaligenes faecalis* strain TPB18. World Journal of Research and Review 15, 01-19.

Ghaffar I, Imtiaz A, Hussain A, Javid A, Jabeen F, Akmal M, Qazi JI 2018 Microbial production and industrial applications of keratinases: an overview. International Journal of Microbiology 21, 163-174.

<https://doi.org/10.1007/s10123-018-0022-1>

Gioppo N, Moreira-Gasparin F, Costa A, Alexandrino A, Souza C, Peralta R 2009 Influence of the carbon and nitrogen sources on keratinase production by *Myrothecium verrucaria* in submerged and solid state cultures. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 36, 705e711.

<https://doi.org/10.1007/s10295-009-0540-0>

Govarthanan M, Selvankumar T, Selvam K, Sudhakar C, Aroulmoji V, Kamala-Kannan S 2014 Response surface methodology based optimization of keratinase production from alkali-treated feather waste and horn waste using *Bacillus* sp. MG-MASC-BT. Industrial & Engineering Chemistry Research 27, 25-30.

<https://doi.org/10.1016/j.jiec.2014.12.022>

Ignatova Z, Gousterova A, Spassov G, Nedkov P 1999 Isolation and partial characterisation of extracellular keratinase from a wool degrading thermophilic actinomycete strain *Thermoactinomyces candidus*. Canadian Journal of Microbiology 45(3), 217-222.

Jankiewicz U, Frał M 2017 Identification and properties of a keratinase from *Stenotrophomonas maltophilia* N4 with potential application in biotechnology. Ecological Questions 28, 15-24.

<https://doi.org/10.1139/w98-230>

Kang E, Jin HS, La JW, Sung JY, Park SY, Kim WC, Lee DW 2020 Identification of keratinases from *Fervidobacterium islandicum* AW-1 using dynamic gene expression profiling. Microbial Biotechnology 13(2), 442-457.

<https://doi.org/10.1111/1751-7915.13493>

Kani T P, Subha K, Madhanraj P, Senthilkumar G, Panneerselvam A 2012 Degradation of chicken feathers by *Leuconostoc* sp. and *Pseudomonas microphilus*. European Journal of Experimental Biology 2(2), 358-362.

Kaur M, Bhari R, Singh R, 2021 Chicken feather waste-derived protein hydrolysate as a potential biostimulant for cultivation of mung beans. Biology 76(6), 1-9.

<https://doi.org/10.1007/s11756-021-00724-x>

Korniłowicz-Kowalska T 1997 Studies on the decomposition of keratin wastes by saprotrophic microfungi. I. Criteria for evaluating keratinolytic activity. Acta Mycológica 32(1), 51-79.

Kowalczyk P, Mahdi-Oraibi S, Misiewicz A, Gabzdyl N, Miskiewicz A, Szparecki G 2018 Feather-degrading bacteria: their biochemical and genetic characteristics. Arabian Journal for Science and Engineering 43, 33-41.

<https://doi.org/10.1007/s13369-017-2700-2>

Lai Y, Wu X, Zheng X, Li W, Wang L 2023 Insights into the keratin efficient degradation mechanism mediated by *Bacillus* sp. CN2 based on integrating functional degradomics. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts* 16(59)

<https://doi.org/10.1186/s13068-023-02308-0>

Li Q 2019 Progress in microbial degradation of feather waste. *Frontiers in Microbiology* 10(2717), 1-15.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02717>.

Liang JD, Han YF, Zhang JW, DuW, LiangZQ, Li ZZ 2011 Optimal culture conditions for keratinase production by a novel thermophilic *Myceliophthora thermophila* strain GZUIFR-H49-1. *Journal of Applied Microbiology* 110(4), 871-880.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04949.x>

Maurya SD, Singh A 2024 Application and future perspectives of keratin protein extracted from waste chicken feather: A review. *Sustainable Chemical Engineering* 5(1), 32-46.

<https://doi.org/10.37256/sce.5120243521>

Nielsen J, Villadsen J, Lidén G 2003 Scale-up of bioprocesses. In: *Bioreaction Engineering Principles*. Springer, Boston, MA.

https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0767-3_11

Nnolim N E, Mpaka L, Okoh AI, Nwodo UU 2020 Biochemical and molecular characterization of a thermostable alkaline metallo-keratinase from *Bacillus* sp. Nnolim-K1. *Microorganisms* 8(9), 1304.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms8091304>

Nnolim NE, Okoh AI, Nwodo UU 2020 *Bacillus* sp. FPF-1 produced keratinase with high potential for chicken feather degradation. *Molecules* 25(7).

<https://doi.org/10.3390/molecules25071505>

Ouertani R, Chouchane H, Mahjoubi M, Khdhira H, Masmoudi AS, Cherif A, Neifar M, 2020 Feather degradation efficiency and hide dehairing ability of a new keratinolytic *Bacillus halotolerans* strain, isolated from a tannery

wastewater. *MOJ Applied Bionics and Biomechanics* 4(5), 102-109.

<https://doi.org/10.15406/mojabb.2020.04.00143>

Pahua-Ramos M, Hernández-Melchor D, Camacho-Pérez B 2017a Biodegradation of Chicken Feathers by A Co-Culture of *Alcaligenes* and *Brevundimonas*. *Indian Journal of Biotechnology* 13(6), 152.

Pahua-Ramos M E, Hernández-Melchor DJ, Camacho-Pérez B, Quezada-Cruz M 2017b Degradation of chicken feathers: a review. *BioTechnology: An Indian Journal* 13(6), 1-24.

Paul T, Das A, Mandal A, Halder SK, DasMohapatra PK, Pati BR, Mondal KC 2013 Production and purification of keratinase using chicken feather bioconversion by a newly isolated *Aspergillus fumigatus* TKF1: detection of valuable metabolites. *Biomass Conversion and Biorefinery* 4, 137-148.

<https://doi.org/10.1007/s13399-013-0090-6>

Peng Z, Mao X, Zhang J, Du G, Chen J 2019 Effective biodegradation of chicken feather waste by co-cultivation of keratinase producing strains. *Microbial Cell Factories* 18(1), 1-11.

<https://doi.org/10.1186/s12934-019-1134-9>

Rendón-Castrillón L, Ramírez-Carmona M, Ocampo-López C, Gómez-Arroyave L 2021 Mathematical Model for Scaling up Bioprocesses Using Experiment Design Combined with Buckingham Pi Theorem. *Applied Sciences* 11(11338), 1-17.

<https://doi.org/10.3390/app112311338>

Shih JC 1993 Recent development in poultry waste digestion and feather utilization—A review. *Poultry Science* 72(9), 1617-1620.

<https://doi.org/10.3382/ps.0721617>

Son HJ, Park HC, Kim HS & Lee CY (2008) Nutritional regulation of keratinolytic activity in *Bacillus pumilis*. *Biotechnology Letters* 30, 461–465.

<https://doi.org/10.1007/s10529-007-9567-3>

Sun Z, Li X, Liu K, Chi X, Liu L 2020 Optimization for Production of a Plant Growth Promoting Agent from the Degradation of Chicken Feather Using Keratinase Producing Novel Isolate *Bacillus pumilus* JYL. *Journal of*

Artículos

Wastes and Biomass Management 12(4).
<http://dx.doi.org/10.1007/s12649-020-01138-7>

Yusuf I, Ahmad SA, Phang LY, Syed MA, Shamaan NA, Khalil KA, ShukorMY 2016 Keratinase production and biodegradation of polluted secondary chicken feather wastes by a newly isolated multi heavy metal tolerant bacterium-Alcaligenes sp. AQ05-001. Journal of Environmental Management 183, 182-195. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.08.0599>

Zaghloul TI, Embaby AM, Elmahdy AR 2011 Biodegradation of chicken feathers waste directed by Bacillus subtilis recombinant cells: Scaling up in a laboratory scale fermentor. Bioresource Technology102(3), 2387-2393. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.106>