

OBTENCIÓN DE UN HIDROLIZADO PROTEICO POR FERMENTACIÓN SUMERGIDA DE PLUMAS UTILIZANDO *Bacillus* spp

Obtaining of a protein-hydrolysate by submerged fermentation of feathers using *Bacillus* spp

Manuel De Macedo¹, Roxana Segura¹, Judith Piñero Bonilla¹, Nereida Coello^{2*}

¹ Ingeniería de Alimentos, Núcleo Canoabo, Universidad Nacional Experimental, "Simón Rodríguez". Edo. Carabobo, Venezuela.

² Laboratorio de Procesos Biotecnológicos, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. E-mail: mcoello reacciun.ve

RESUMEN

Se obtuvo un hidrolizado proteico a partir de la fermentación sumergida de las plumas por una cepa queratinolítica de *Bacillus* spp designada como LPB-2. El proceso se realizó en condiciones aeróbicas, utilizando un medio salino basal (pH 7,5), suplementado con 20 g/l de plumas molidas y un fermentador de 6 L de capacidad regulado a 40°C durante 26 horas. Mediante alimentaciones semi-continuas de sustrato, efectuadas cada 12 horas, se pudo prolongar el tiempo de fermentación hasta 58 horas. A las 44 horas de fermentación se alcanzó el valor máximo de biomasa (2,34 g/L) y producto de la hidrólisis bacteriana de las plumas, la mayor concentración de grupos amino libres, (32,79 mM). Finalizado el proceso, el caldo de fermentación se sometió a tres métodos diferentes de secado: aspersión, bandeja y una combinación de precipitación con CaCl₂ y secado en bandeja. La harina de plumas resultante del método de secado por aspersión presentó el mayor contenido proteico (91,53%). Adicionalmente, la digestibilidad *in vitro* de este hidrolizado (58%) fue 6 veces mayor que la de las plumas sin tratar y resultó enriquecido en el aminoácido esencial L-lisina (3,1%). La harina de plumas hidrolizadas obtenida por fermentación podría ser usada en la elaboración de alimentos concentrados para animales.

Palabras clave: Hidrolizado proteico, plumas, fermentación sumergida, *Bacillus* spp, queratinolítico.

ABSTRACT

The protein-hydrolysate was obtained by submerged fermentation of feathers using a keratinolytic strain LPB-2 of *Bacillus* spp. The fermentation was carried out in aerobic conditions

with a basal saline medium (pH 7.5), supplemented with 20 g/L of feathers and using a fermenter of 6 L of capacity regulated to 40°C during 26 hours. By means of semi continuous feedings of substrate, carried out every 12 hours, the time of fermentation could be prolonged up to 58 hours. At 44 hours of fermentation, the maximum value of biomass (2.34 g/L) and the greater concentration of free amino groups (32.79 mM), were reached due to the bacterial hydrolysis of the feathers. At the end of the process, the fermentation broth was dried by three different methods: aspersion, drying in trays and a combination of precipitation with CaCl₂ and drying in trays. The feather meal obtained by the first method of drying displayed the greatest protein content (91.53%). Additionally, this feather-hydrolysate showed a higher *in vitro* digestibility (58%) than feathers (6 times) and was enriched in the essential amino acid L-lysine (3.1%). The feather-hydrolysate meal obtained by fermentation may be used in the elaboration of feed concentrates for animals.

Key words: Protein-hydrolysate, feathers, submerged fermentation, *Bacillus* spp, keratinolytic.

INTRODUCCIÓN

A nivel nacional, el beneficio de las aves de corral genera, entre sus residuos, gran cantidad de plumas: aproximadamente 37.000 Ton en 2000 [24]. Debido a su contenido proteico las plumas representan un recurso alimenticio potencial, aunque con limitaciones en su estado natural debido a su baja digestibilidad y escaso valor biológico por la deficiencia en aminoácidos esenciales [17, 29]. El tratamiento convencional de las plumas para mejorar su calidad nutricional se ha basado en su degradación mediante métodos físico-químicos [4, 20, 33]. No obstante, las harinas de plumas obtenidas por

este método también poseen calidad limitada debido a que durante el proceso ocurre la pérdida de aminoácidos esenciales [22, 26] y la formación de aminoácidos no nutritivos [2]. Adicionalmente, esta tecnología tiene un elevado costo termo-energético [25].

Hallazgos recientes han demostrado el potencial microbiano presente en la naturaleza, capaz de degradar sustratos no convencionales, tales como queratina [6, 27, 32], quitina [30], elastina [19] y colágeno [23]. En la búsqueda de tecnologías para mejorar el valor nutricional de la harina de plumas, la biotecnología puede ser una alternativa interesante, con los consecuentes beneficios a nivel ambiental por la remoción de este tipo de residuos de la naturaleza. Existen evidencias en la literatura sobre la factibilidad del procesamiento biotecnológico de las plumas a través de la utilización de microorganismos con actividad queratinolítica, así como el de sus queratinasas purificadas o no, en la obtención de hidrolizados de Plumav [25]. Por una parte, la estructura de la queratina resulta modificada debido a la acción de las enzimas excretadas por el microorganismo y además, la harina de plumas obtenida resulta enriquecida con el aporte proteico de la biomasa microbiana [3, 18]. Tales hidrolizados han sido ensayados como suplementos proteicos en raciones alimenticias para aves de corral, con resultados satisfactorios en el crecimiento y desarrollo de los animales [26, 34].

En un estudio previo realizado con la cepa de *Bacillus* spp LPB-2 [27], aislada a partir de muestras de suelo de galpones de cría de pollos de engorde, se determinó la capacidad queratinolítica de esta cepa en fermentaciones sumergidas con plumas. Con el propósito de proseguir en la búsqueda de alternativas aplicables al tratamiento de las plumas, el presente trabajo tiene como objetivo estudiar condiciones de fermentación de la cepa LPB-2, que mejoren la producción de biomasa y de degradación del sustrato, con el fin de obtener un hidrolizado de plumas y evaluar diferentes métodos de secado para su deshidratación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo

Se utilizó la cepa queratinolítica LPB-2 de *Bacillus* spp, aislada del suelo de galpones de cría de pollos de engorde [27] y perteneciente al cepario del Laboratorio de Procesos Biotecnológicos del Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela. Esta cepa es conservada a 8°C por repiques sucesivos en estrías de agar nutritivo (Oxoid) y por tiempos prolongados a -80°C en glicerol 25%.

Medio de fermentación y condiciones de cultivo

Se empleó el medio salino basal descrito por Williams *et al.* [34] el cual contiene por litro de agua destilada: 0,5 g de NH_4Cl , 0,5 g de NaCl , 0,3 g de K_2HPO_4 , 0,4 g de KH_2PO_4 , 0,1 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 0,1 g de extracto de levadura y ajusta-

do a pH 7,5 con KOH al 10%. Este medio fue suplementado con plumas molidas a una concentración de 20 g/L y esterilizado por autoclave 15 min, a 120°C. Para la preparación de los medios se emplearon plumas blancas de pollo, provenientes de la planta BENAVER del Estado Aragua. Para tal fin, las plumas fueron lavadas con abundante agua corriente, secadas por exposición al sol durante 24 horas y esterilizadas 10 min 120°C, para garantizar su conservación por largos periodos de tiempo. Posteriormente fueron molidas en un molino de martillo y el producto se empacó en bolsas de papel de 20 Kg de capacidad y se almacenó en un lugar seco y fresco. Las sales utilizadas en la preparación de los medios se obtuvieron de la casa comercial Riedel-de-Haën, y el extracto de levadura de la casa Difco.

La cepa conservada a 8°C en estrías de agar nutritivo fue inoculada con un asa de platino en erlenmeyers con 500 mL de medio e incubada a 40°C y 110 rpm en un agitador orbital durante 48 horas. Posteriormente, este precultivo fue utilizado para inocular el fermentador (New Brunswick Microferm) con 4,5 l del medio descrito. Este fermentador está equipado con electrodos que permiten regular el pH (7,5) y la concentración de oxígeno disuelto (20%), la temperatura (40°C) y el volumen de aire inyectado (1500 cc/min). El criterio utilizado para seleccionar la concentración de plumas del medio de cultivo (20 g/L) y la temperatura de incubación (40°C) fue con base en ensayos previos realizados con la misma cepa [31]. El estado de pureza de los cultivos en el curso de la fermentación se realizó tanto por control de la morfología de las colonias de la cepa LPB-2 (mediante siembras en placas de Petri con agar nutritivo), como por observaciones al microscopio de las formas celulares de frotis teñidos con coloración Gram.

Inicialmente se realizaron ensayos de fermentación a dos velocidades de agitación (300 y 500 rpm), con la finalidad de determinar el efecto de la distribución del oxígeno y los nutrientes en el medio. Una vez seleccionada la velocidad de agitación en la cual el crecimiento microbiano era favorecido, se realizaron ensayos con alimentaciones de sustrato cada 12 horas en el curso de la fermentación. Para tal fin, en condiciones asépticas se adicionaron suspensiones estériles de 20 g de plumas en 200 mL de agua destilada o de medio salino basal.

Deshidratación del hidrolizado de plumas

Finalizado el proceso (aproximadamente 56 horas), se procedió a deshidratar el jugo de fermentación utilizando tres métodos de secado:

a) Secado por aspersión: el hidrolizado de plumas se filtró para separar la fracción gruesa y lograr que el producto fino pudiera ser atomizado. Este último se utilizó para alimentar el secador por aspersión, a 150°C durante 1-3 segundos. La fracción gruesa se secó en estufa, a 60°C por 24 horas y fue molida. Posteriormente, se mezclaron las dos fracciones deshidratadas.

b) Secado en bandeja: se colocaron 625 mL del hidrolizado de plumas en cada bandeja de 0,48 m² de área y se sometió a 60°C durante 2 horas.

c) Precipitación con CaCl₂ y deshidratación en secador de bandeja: la precipitación se realizó con la finalidad de concentrar el hidrolizado. Mediante filtración se separó la fracción gruesa de la fina, esta última se precipitó con CaCl₂ al 20%, en la proporción de 1 mL de CaCl₂ por 20 mL de la fracción fina del hidrolizado. El precipitado se separó por decantación del sobrenadante y se deshidrató en el secador de bandeja bajo las condiciones descritas. El producto ya deshidratado se mezcló con la fracción gruesa, previamente secada en estufa a 60°C por 24 horas. Ambas porciones fueron molidas. Al sobrenadante conservado a -20°C se le determinó la concentración de grupos aminos libres.

Los hidrolizados de plumas, resultantes de los métodos de secado ensayados, fueron molidos utilizando un molino de martillo, empacados en bolsas plásticas de 50 g de capacidad y almacenados en un lugar fresco y seco.

Determinaciones analíticas

A fin de realizar el seguimiento del crecimiento bacteriano y la degradación del sustrato (plumas) durante el proceso fermentativo, se tomaron muestras del jugo de fermentación cada dos horas. Para estimar la magnitud de la degradación de las plumas se realizó la determinación de la concentración de los grupos aminos libres (GAL), en los sobrenadantes de los cultivos, usando el método de la ninhydrina [28]. La cinética del crecimiento bacteriano se realizó por turbidimetría (600 nm) y la conversión a peso seco (g/L) de la biomasa producida, se efectuó mediante una curva de calibración realizada por gravimetría, siguiendo el método descrito por Piñero *et al.* [27].

Las plumas molidas sin fermentar y los hidrolizados de plumas deshidratados se caracterizaron en cuanto a su contenido de calcio, cenizas, grasa cruda, proteínas crudas, fibra cruda, fósforo en base seca, según las normas COVENIN contempladas para este tipo de productos [7-14]. Además, a los hidrolizados de plumas deshidratados se les realizaron ensayos microbiológicos para determinar la presencia de hongos, levaduras y *Salmonella* según normas COVENIN [15-16]. El contenido de L-lisina se estimó por el método colorimétrico de la ninhydrina ácida [5], previa hidrólisis de la muestra con HCl 6 N 1% fenol en fase gaseosa a 110°C durante 24 horas. La determinación de la digestibilidad *in vitro*, se realizó mediante la acción de la pepsina según el método 971-09 de la A.O.A.C [1].

Reproducibilidad

Todos los experimentos fueron realizados dos veces en triplicado y los resultados son las medias de tres cultivos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la velocidad de agitación sobre el crecimiento de la cepa LPB-2

Inicialmente se ensayaron diferentes velocidades de agitación (300 y 500 rpm), a fin de evaluar el efecto de la distribución del oxígeno y los nutrientes en el medio de fermentación sobre el crecimiento del microorganismo. La cinética de crecimiento de la cepa LPB-2 muestra una fase de latencia de aproximadamente 2 horas a 300 rpm, a diferencia de 500 rpm en donde no se observó retardo en el crecimiento del microorganismo. Ello indica que en esta última condición la cepa alcanza la fase exponencial con mayor rapidez. En efecto, puede notarse que a una velocidad de agitación de 500 rpm se obtienen a las 14 horas de incubación 1,44 g/L de biomasa, en comparación con el valor máximo obtenido de 1,27 g/L en 24 horas a 300 rpm (FIG. 1). El análisis estadístico mostró que existen diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las biomásas máximas obtenidas a 500 rpm y 300 rpm. En relación a la disminución observada de la biomasa, una vez alcanzados los valores máximos a 300 o 500 rpm, posiblemente fue debida al agotamiento del sustrato, la acumulación de productos tóxicos del metabolismo u otro factor que afecta el crecimiento microbiano [27]. Sin embargo, mediante recuento de células en placas con agar nutritivo, se comprobó la viabilidad de la biomasa presente en estas condiciones.

La velocidad de agitación puede afectar la transferencia de oxígeno y nutrientes en el medio de fermentación y consecuentemente influir sobre el crecimiento y la degradación del sustrato. En *Bacillus licheniformis* se ha reportado que el crecimiento de una cepa queratinolítica resulta favorecido en aerobiosis, donde además disminuye la concentración de aminoácidos solubles en el caldo de fermentación [21]. Es probable que, en presencia de oxígeno los aminoácidos y péptidos generados de la degradación queratinolítica sean utilizados rápidamente, mientras que en condiciones anaeróbicas posiblemente disminuye el metabolismo microbiano haciendo que estos se acumulen en el medio de fermentación. En lo que respecta a la cepa LPB-2, se ha demostrado que su crecimiento a expensas de sustratos queratinolíticos resulta favorecido, cuando los cultivos se realizan en erlenmeyers con deflectores de medio porque mejora la transferencia de oxígeno, sugiriendo que se trata de un proceso aeróbico [31].

Con base en estos criterios: mayor rendimiento de biomasa (1.44 g/L), menor tiempo de fermentación (14 h) y viabilidad al final del proceso, se seleccionó 500 rpm como la velocidad de agitación para realizar los ensayos subsiguientes.

Efecto de alimentaciones semi-continuas de sustrato sobre las cinéticas de crecimiento de la cepa LPB-2 y degradación de las plumas

Dado el estado viable de la biomasa al término del proceso y con la finalidad de proseguirlo más allá de las 14 horas

de fermentación e incrementar la biomasa total producida, se ensayaron alimentaciones semi-continuas de sustrato. Adicionalmente, esto permitiría elucidar si la inhibición del crecimiento era debida al agotamiento de algún nutriente del medio de cultivo. Las fermentaciones en tanda-alimentada permiten eliminar los efectos de represión por altas concentraciones de las fuentes de carbono y nitrógeno utilizables rápidamente, además de reducir la viscosidad del medio y los efectos por acumulación de productos tóxicos del metabolismo, haciendo posible prolongar el tiempo de fermentación.

La FIG. 2 muestra que luego de la primera alimentación (plumas en solución salina basal), se logra mantener la pendiente de aumento progresivo de la biomasa y de la concentración de GAL, más allá de las 14 horas de fermentación. Este resultado contrasta con la disminución de la biomasa reportada anteriormente en el sistema por lote tradicional (FIG. 1) y sugiere que el cambio en la tendencia del crecimiento del microorganismo se debe al agotamiento del sustrato. Luego de la segunda alimentación (24 horas), se observaron de manera similar incrementos de la biomasa y de la concentración de GAL, pero con una pendiente menor. Finalmente, la tercera alimentación mostró una tendencia de la biomasa y de los GAL a alcanzar un *plateau*. Este resultado indica que, en estas condiciones, otros factores distintos al agotamiento de nutrientes, tales como la acumulación de algún componente en el medio o la elevación del pH, podrían estar afectando el crecimiento de la cepa LPB-2. En el presente estudio se observó una alcalinización del pH en el curso de la fermentación, incrementando de 7,3 al inicio de la fermentación hasta 8,3 al final del proceso (FIG. 2). Se ha reportado que en otras cepas que ratinólicas del género *Bacillus* la actividad enzimática disminuye en condiciones básicas [21]. En estudios previos con la cepa LPB-2 en medio con plumas, se ha observado una dismi-

nución de la actividad proteolítica al final de la fermentación [31].

En su conjunto estos resultados muestran que la fermentación en tanda- alimentada constituye una estrategia adecuada para la utilización de las plumas como sustrato fermentable, por cuanto permiten prolongar el tiempo de fermentación y obtener mayor concentración de biomasa, a expensas de una mayor degradación de dicho sustrato.

Evaluación de los métodos de secado del hidrolizado de plumas

La TABLA I muestra el contenido proteico, en base seca, de las harinas obtenidas mediante los métodos de secado ensayados. Puede observarse que en todas las harinas obtenidas el contenido proteico disminuyó en relación con el de las plumas sin procesar, pero el método de aspersión fue el que rindió el mayor porcentaje de proteínas (91,53%). Posiblemente esto es debido a las condiciones menos drásticas de este tipo de secado que, aunque alcanza 150°C, el tiempo de residencia del hidrolizado a esta temperatura es muy corto (1-3 segundos), haciendo que el material esté menos expuesto a la destrucción térmica, comparado con el secador de bandeja (60°C, 2 horas).

En el método combinado, precipitación con CaCl_2 -secador de bandeja, el contenido proteico fue el más bajo (84,33%). La precipitación logra remover las proteínas, pero los péptidos y/o aminoácidos solubles quedan en el sobrenadante. Es probable que al descartar este líquido se pierdan compuestos nitrogenados; de forma que mediante este método se subestima el valor del contenido proteico al cuantificar solamente la fracción precipitada. En concordancia con esta observación está el valor de grupos amino libres obtenido en el sobrenadante de 4,03 mM. Adicionalmente, la combinación de este método con el secado en bandeja, puede ejercer una

TABLA I
CARACTERIZACIÓN DEL HIDROLIZADO OBTENIDO POR FERMENTACIÓN DE *Bacillus* spp Y DESHIDRATADO POR DIFERENTES METODOS Y DE LAS PLUMAS MOLIDAS SIN HIDROLIZAR

Análisis	Plumas Molidas	Hidrolizados de plumas		
		Metodo de secado		
		Aspersión	Bandeja	CaCl_2 + Bandeja
Físico-químico* (%)				
Proteína cruda	92,78 ($\pm 0,7$)	91,53 ($\pm 0,7$)	89,16 ($\pm 0,6$)	84,33 ($\pm 0,8$)
Grasa cruda	3,40 ($\pm 0,1$)	3,81 ($\pm 0,2$)	4,10 ($\pm 0,2$)	4,08 ($\pm 0,3$)
Cenizas	2,91 ($\pm 0,15$)	2,36 ($\pm 0,09$)	3,22 ($\pm 0,4$)	2,94 ($\pm 0,13$)
Calcio	0,21 ($\pm 0,03$)	0,22 ($\pm 0,05$)	0,22 ($\pm 0,05$)	0,23 ($\pm 0,01$)
Fósforo	0,19 ($\pm 0,02$)	0,16 ($\pm 0,03$)	0,21 ($\pm 0,05$)	0,22 ($\pm 0,01$)
Métodos microbiológicos				
<i>Salmonella</i>		Ausente	Ausente	Ausente
Hongos y levaduras (ufc/g)		1×10^4	10	Menos de 10

*Los valores son en base seca.

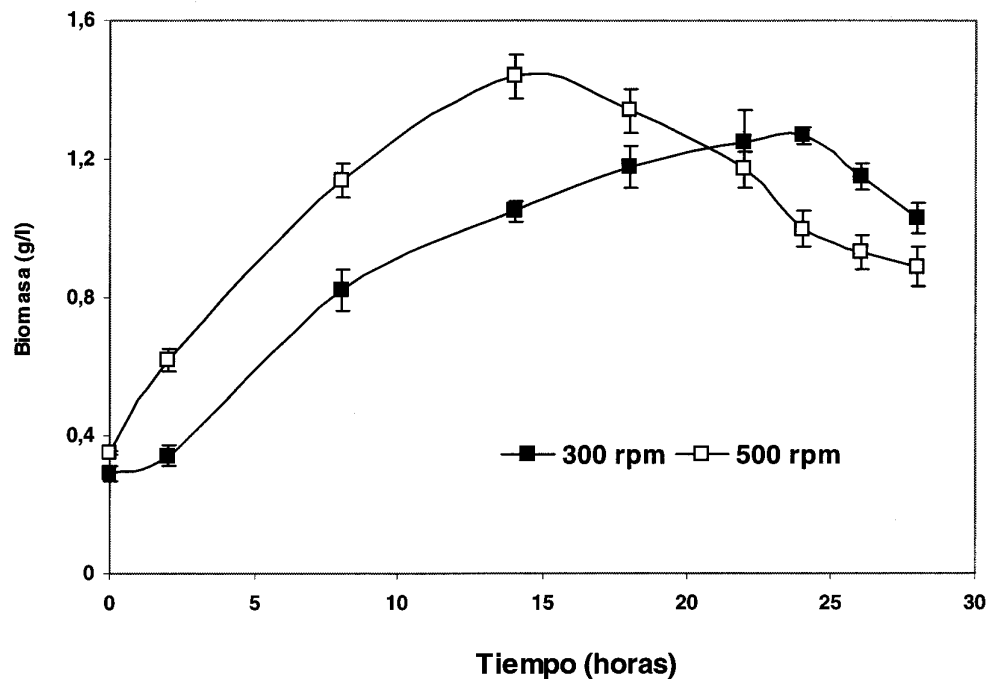


FIGURA 1. CURVA DE CRECIMIENTO DE LA CEPA LPB-2 DE *Bacillus* spp EN FERMENTACIÓN SUMERGIDA DE PLUMAS A DIFERENTES VELOCIDADES DE AGITACIÓN DEL CULTIVO.

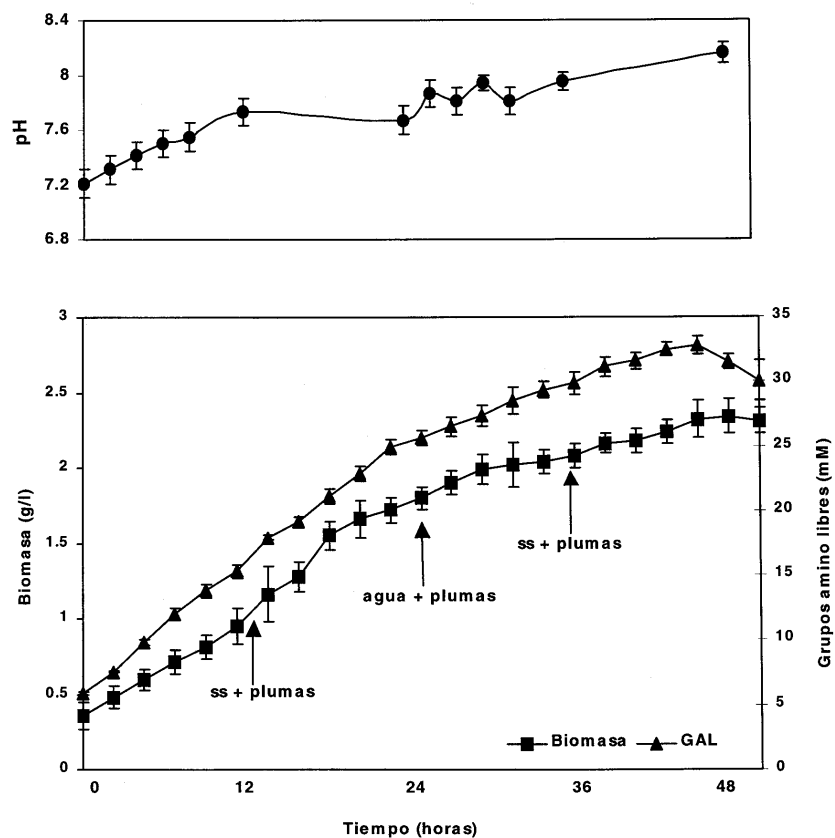


FIGURA 2. CINÉTICA DE FERMENTACIÓN EN TANDA-ALIMENTADA DE LA CEPA LPB-2 DE *BACILLUS* spp EN MEDIO SALINO CON PLUMAS: EVOLUCIÓN DEL pH, LA BIOMASA Y LA DEGRADACIÓN DEL SUSTRATO (GRUPOS AMINO LIBRES). LAS FLECHAS INDICAN EL TIEMPO DE LA FERMENTACIÓN EN EL CUAL SE REALIZARON ALIMENTACIONES DE SUSTRATO: SS + PLUMAS (SOLUCIÓN SALINA Y PLUMAS) O AGUA + PLUMAS.

influencia negativa adicional debido al efecto térmico ya mencionado. Con base en estos criterios, este método no es una alternativa adecuada para la deshidratación de los hidrolizados de esta naturaleza.

De acuerdo a la norma COVENIN [7-14], la harina de plumas a ser utilizada en la alimentación animal debe cumplir en su fabricación con una serie de requisitos, entre los cuales podemos citar: contenido proteico mínimo, en base seca, (86,96%) y valores máximos de grasa cruda de 5%, cenizas 5%, calcio 0,4% y fósforo 0,6%. Además la norma especifica lo relativo a la ausencia de insectos, larvas, fragmentos metálicos o contaminación microbiológica con *Salmonella*, y mohos patógenos [15-16]. De las harinas obtenidas, cumplen los requisitos proteicos establecidos por la norma aquellas resultantes del secado por aspersión (91,53%) y secado en bandeja (89,16%). En cuanto a la calidad microbiológica, no se detectó la presencia de *Salmonella* ni mohos patógenos en los productos obtenidos.

En relación a la calidad nutricional de los hidrolizados de plumas, la literatura reporta que las harinas obtenidas por fermentación resultan enriquecidas en su contenido de aminoácidos esenciales cuando se incorpora la biomasa microbiana derivada del proceso fermentativo al producto final, lo cual incrementa el valor agregado de estos insumos [3, 18]. Cabe mencionar que en estudios previos fue demostrada la no patogenicidad de la cepa LPB-2 [27,31], por lo que podría ser considerado su uso en la alimentación animal. En el presente estudio se observó que el hidrolizado de plumas obtenido por fermentación con la cepa LPB-2, presentó un contenido de L-lisina mayor (3,1%) que el reportado [34] para las plumas sin fermentar (2,16%). Por otra parte, se observó que producto de modificaciones en la estructura de la queratina debido a la acción de las enzimas excretadas por el microorganismo, la digestibilidad *in vitro* de la harina de plumas obtenida por fermentación y deshidratada por aspersión fue de 58%, valor mayor que el de las plumas sin fermentar.

CONCLUSIONES

En la definición de un proceso para el uso de las plumas como sustrato fermentable, resulta fundamental lograr un enriquecimiento importante en la biomasa del microorganismo degradador a expensas de la mayor utilización de sustrato posible, ya que ambos factores tienen incidencia en la calidad nutricional del hidrolizado proteico obtenido. En el presente estudio, fue posible mediante alimentaciones semi-continuas de sustrato prolongar hasta 44 horas el tiempo del proceso y obtener mayor concentración de biomasa (2,34 g/L), a expensas de una mayor degradación de las plumas (GAL= 32,79 mM), que cuando se utiliza el sistema por lote tradicional.

De los métodos de secado ensayados, el de aspersión resultó ser el más adecuado para la deshidratación de los jugos obtenidos de la fermentación en tanda-alimentada. El hidrolizado proteico deshidratado por aspersión presentó un

contenido del 91,53% de proteína, 3,81% de grasas, 2,36% de cenizas, 0,22% de calcio, 0,16% de fósforo. Aunque en el producto obtenido la cantidad de proteína no aumentó en comparación con la de las plumas molidas sin fermentar, la concentración de GAL mostró un incremento en el grado de hidrólisis de este sustrato, con repercusiones en su digestibilidad (58%), debido a modificaciones en la estructura de la queratina y presentó condiciones microbiológicas adecuadas para ser utilizado en la elaboración de alimentos concentrados para animales. Además, el hidrolizado de plumas obtenido por fermentación con la cepa LPB-2 resultó enriquecido en el aminoácido esencial L-lisina (30%) con respecto a las plumas. A este respecto, información sobre el perfil aminoacídico por HPLC de la harina obtenida, sería de gran utilidad para conocer el balance en otros aminoácidos esenciales. Por otra parte, se requieren ensayos adicionales de digestibilidad *in vivo*, así como pruebas zootécnicas, que indiquen el valor nutricional y su efecto sobre el crecimiento y desarrollo de aves de corral, a fin de conocer el uso potencial de este hidrolizado como suplemento proteico.

AGRADECIMIENTO

El presente estudio fue financiado mediante fondos del proyecto del Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (S1-2001000728).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis of the A.O.A.C. 15th Edition. Kenneth Heldrich editors. Arlington, USA. 1990.
- [2] BAKER, D.H.; BLITENTHAL, R.C.; BOEBEL, K.P.; CZRNECKI, G.L.; SOUTHERN, L.L.; WILLIS, G.M. Protein amino-acid evaluation of steam-processed feather meal. **Poult. Sci.** 60: 1865-1872. 1981.
- [3] BERTSCH, A. Obtención de un hidrolizado proteico enriquecido con proteína unicelular producto de la fermentación bacteriana (*K. rosea*) de plumas de aves de corral. Trabajo Especial de Grado de Maestría. ICTA. Facultad de Ciencias UCV. Caracas. Venezuela. 81 pp. 2001.
- [4] BURGOS, A.; FLOYD, J.I.; STEPHENSON, E.L. The amino acid content and availability of different samples of poultry by-product meal, and feather meal. **Poult. Sci.** 53: 198-203. 1974.
- [5] CHINARD, F.D. Photometric estimation of proline and ornithine. **J. Biol. Chem.** 199: 91-95. 1952.
- [6] COELLO, N.; VIDAL, L.; BRETANA, A. Aislamiento de una cepa de *Kocuria rosea* degradadora de plumas de aves de corral. **Rev. Cient. Fac. Cienc. Vets. LUZ.** 10(2): 107-113. 2000.
- [7] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES. 986-82. Alimentos para Animales. Determinación de calcio y magnesio. Método complexométrico.

- [8] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES. 1155-79. Alimentos para Animales. Determinación de cenizas.
- [9] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES. 1162-79. Alimentos para Animales. Determinación de grasa cruda.
- [10] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES. 1195-80. Alimentos para Animales. Determinación de nitrógeno.
- [11] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES. 1274-80. Alimentos para Animales. Determinación de cenizas insolubles en ácido.
- [12] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES. 1178-83. Alimentos para Animales. Determinación de fósforo.
- [13] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES. 1316-81. Alimentos para Animales. Determinación de la digestibilidad de las proteínas de origen animal.
- [14] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES. 1728-81. Alimentos para Animales. Harinas de plumas hidrolizadas
- [15] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES. Alimentos. 1291-79. Alimentos. Detección de *Salmonella*.
- [16] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES. 1337-78. Alimentos. Método para recuento de hongos y levaduras.
- [17] DALEV, P.; IVANOV, I.; LIUBOMIROVA, A. Enzymic modification of feather keratin hydrolysates with Lysine aimed at increasing the biological value. **J. Sci. Food and Agric.** 73: 242-244. 1997.
- [18] ELMAYERGI, H.; SMITH, R. Influence of growth of *Streptomyces fradiae* on pepsin-HCl digestibility and methionine content of feather meal. **Can. J. Microbiol.** 17: 1067-1072. 1971.
- [19] FROSCO, M.; CHASE, T.; MACMILLAN, J.D. Purification and properties of the elastase from *Aspergillus fumigatus*. **Infect Immunol.** 60: 728-734. 1992.
- [20] HOLLMEYER, R. Subproductos Avícolas. **Industria Avícola.** Octubre 94: 14-18. 1994.
- [21] LIN, X.; GINN, L.; ELLEN, C.; SHIH, J. Purification and characterization of a keratinase from feather-degrading *Bacillus licheniformis* strain. **Appl. Environ. Microbiol.** 58(10): 3271-3275. 1992.
- [22] MORAN, E.; SUMMERS, J.; SLINGER, S. Keratin a source of protein for the growing chick. I. Amino acid imbalance as the cause for inferior performance of feather meal. **Poult. Sci.** 45: 1257-1266. 1966.
- [23] NAGANO, H.; TO, K.A. Purification of Collagenase and Specificity of its Related Enzyme from *Bacillus subtilis* FS-2. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 63 (7):181-183. 1999.
- [23] REVISTA FENAVI. **Federación Nacional de Avicultura de Venezuela.** Edición Especial Aniversario. Primer semestre 1998.
- [24] ONIFADE, A.; AL-SANE, N.; AL-MUSALLAM, A.; AL-ZARBAN, S. 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. **Biores. Technol.** 66:1-11. 1998.
- [25] PAPADOPOULUS, M.; EL BOUSHY, A.; KETELAARS, E. Effect of different processing conditions on amino acid digestibility of feather meal determined by chicken assay. **Poult. Sci.** 64: 1729-1741. 1985.
- [26] PIÑERO B.J.; VIDAL, L.; COELLO, N. Aislamiento y caracterización de una cepa de *Bacillus* spp degradadora de plumas de aves de corral. **Rev. Cient. Fac. Ciens. Vets. LUZ.** 10(2): 124-129. 2000.
- [27] ROSEN, H. A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. **Arch. Biochem. Biophys.** 67: 10-15. 1957.
- [28] STILBORN, H.; MORAN, E.; GOUS, R.; HARRISON, M. Effect of age on feather amino acid content in two broiler strain crosses and sexes. **J. Appl. Poult. Res.** 6: 205-209. 1997.
- [29] TSUJIBO, H.; HATANO, N.; ENDO H.; MIYAMOTO, K.; INAMORI, Y. Purification and Characterization of a Thermotable Chitinase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 and Cloning of the Encoding Gene. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 64 (1): 96-102. 2000.
- [30] VIDAL, L. Aislamiento e identificación de microorganismos degradadores de plumas. Estudio comparativo de la cinética de fermentación de dos cepas bacterianas (*Kocuria rosea* y *Bacillus* spp). Trabajo de ascenso. Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina U.C.V. Caracas. Venezuela. 76 pp. 1999.
- [31] VIDAL, L.; CHRISTEN, P.; COELLO, M.N. Feather degradation by *Kocuria rosea* in submerged culture. **Wld. J. Microbiol. Biotechnol.** 16: 551-554. 2000.
- [32] WANG, C.; PARSONS. Effect of processing system on protein quality of feather meal and hog hair meals. **Poult. Sci.** 76: 491-496. 1997.
- [33] WILLIAMS, C.; LEE, C.; GARLICH, J.; SHIH, J. Evaluation of a bacterial feather fermentation product, feather-lysate, as a feed protein. **Poult. Sci.** 70: 85-94. 1991.
- [34] WILLIAMS, C.; LEE, C.; GARLICH, J.; SHIH, J. Evaluation of a bacterial feather-lysate, as a feed protein. **Poult. Sci.** 70: 85-94 1991.