

Queratina a partir de la hidrólisis enzimática de harina de plumas de pollo, utilizando queratinasas producidas por *Bacillus subtilis*

Geanina, Machuca-Loja¹, Braulio, Madrid-Celi², Diana, Sanmartin-Galvan³,
Jhonny, Pérez- Rodríguez⁴

Resumen

El objetivo de la presente investigación fue hidrolizar harina de plumas de pollo para la obtención de queratina. El diseño metodológico de la investigación fue experimental; se realizaron cuatro fermentaciones correspondientes a un diseño experimental completamente al azar, resultantes de considerar factores [concentración de sustrato (18 g/L y 23 g/L) y concentración del inóculo (2 y 3 g/L), dos niveles para cada factor]. La determinación de la concentración de nitrógeno total se efectuó mediante espectrofotometría UV-Visible, el método utilizado fue la digestión de persulfato de potasio (K₂S₂O₈), la concentración máxima de nitrógeno se alcanzó en el tratamiento 2 (1,5 %), lo cual multiplicado por el factor proteico 6,25 dio un porcentaje de proteína de 9,4% de queratina en el hidrolizado, presentando diferencia significativa ($p < 0,05$) del resto de tratamientos, al cabo de 24 horas de retención hidráulica. En conclusión, es posible la hidrólisis enzimática de harina de plumas de pollo utilizando el *Bacillus subtilis* como productor de proteasas.

Palabras Clave: digestión; espectrofotometría UV-Visible; fermentación; hidrólisis enzimática; proteasas.

Getting keratin from feather meal using keratinases produced by *Bacillus subtilis*

Abstract

The objective of this research was hydrolyzed feather meal of chicken for the production of keratin. The methodological research design was experimental; four fermentations, corresponding to a completely randomized experimental design, resulting from considering factors [substrate concentration (18 g / L and 23 g / L) and concentration of inoculum (2 and 3 g / L), two levels was performed for each factor]. Determining the total nitrogen concentration was performed by UV-Visible spectrophotometry, the method used is the persulfate potassium digestion (K₂S₂O₈), the maximum concentration of nitrogen is reached in the treatment 2 (1.5%) which multiplied by the factor protein 6.25 gives a percentage of 9.4% protein in the hydrolyzed keratin, showing significant difference ($p < 0.05$) from other treatments at 24 hours hydraulic retention. In conclusion the enzymatic hydrolysis of chicken feather meal is possible using the *Bacillus subtilis* as a producer of proteases.

Keywords: fermentation; UV-visible spectrophotometry; digestion; enzymatic hydrolysis; proteases.

Recibido: 20 de agosto de 2015

Aceptado: 31 de agosto de 2016

¹Bioquímica Farmacéutica. geaninamachucaloja@hotmail.com

²Docente de la carrera de Ingeniería Química, Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud, Universidad Técnica de Machala, Ecuador. Ingeniero Petroquímico. Especialista en Auditoría y Gestión de la Seguridad y Salud Ocupacional. bmadrid@utmachala.edu.ec; brauliomadrid@gmail.com

³Docente Contratada de la cátedra de Microbiología, Farmacología y Microbiología General en la Carrera de Bioquímica y Farmacia e Ingeniería Química de la Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud-Universidad Técnica de Machala, Ecuador. Bioquímica Farmacéutica. dsanmartin_est@utmachala.edu.ec

⁴Docente Auxiliar Tiempo Completo en Imagenología y Clínica de Especies Menores, Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias-Universidad Técnica de Machala, Ecuador. Doctor en Medicina Veterinaria y Zootecnia. Máster en Clínica y Cirugía Canina. Máster en Salud Canina. Doctorando en Ciencias Ambientales. jeperez@utmachala.edu.ec

I. INTRODUCCIÓN

La avicultura es uno de los sustentos de la alimentación y la economía en Ecuador, hay aproximadamente 1576 granjas avícolas de pequeños, medianos y grandes productores, dedicados a la producción de huevos, carne y reproductoras, dentro de las cuales, en ocasiones se presentan dificultades con el manejo de los residuos orgánicos que representan aproximadamente el 8 % del peso de las aves (Morochó, 2014).

La fuente natural principal de la queratina es la pluma de ave de corral, que como deshecho puede ser aprovechado, mediante una combinación de tratamientos fisicoquímicos y biológicos, debido al alto contenido proteico que presentan, aunque con limitaciones en su estado natural debido a su baja digestibilidad (Reddy & Santosh, 2016) y escaso valor biológico por la mínima presencia de aminoácidos esenciales, los métodos convencionales de aprovechamiento implican alto consumo de energía, lo cual degrada los pocos aminoácidos esenciales que contienen las plumas y por ende el alto valor económico (Fakhfakh et al, 2011).

En la actualidad se da el uso de herramientas biotecnológicas, como los microorganismos productores de enzimas hidrolíticas capaces de hidrolizar este sustrato (Pluma de pollo), entre ellos puede mencionarse la queratina, colágeno y elastina, y en especial los *Bacillus subtilis* productores de queratinasas y con alta actividad queranolítica (Zaghloul, Embaby, & Elmahdy, 2011). Por lo cual, el objetivo de la presente investigación fue la obtención de queratina a partir de la hidrólisis enzimática de plumas de pollo, dándole valor agregado a este tipo de desechos orgánicos y de esta manera fomentar la aplicación de nuevas tecnologías amigables con el ambiente.

II. DESARROLLO

1. Marco Referencial

En Ecuador mensualmente se desechan 72 toneladas de plumas de pollo y se importa grandes cantidades de productos cosméticos como cremas, gel, shampoo, loción, etc., para el cabello, que contienen queratina (Núñez Altamirano & Salazar Cedillo, 2013). En los últimos 5 años, se ha importado queratina cosmética, 823.035 toneladas en 1999 a 2'21.009 toneladas en el 2011, que proviene de países como Brasil, México, Colombia y Argentina, cuya inversión aproximada fue de 73 millones de dólares (Noureddine, 2015).

En promedio, de 200 pollos se generan 30 kg de

plumas al día y se desechan alrededor de 11.000 kg al año. Si esta cantidad de plumas se procesara como materia prima, de ella se obtendría alrededor de 9000 kg de queratina, ya que el 80% de su peso corresponde a esta proteína (Osejos, 2010; Rai & Mukherjee, 2015).

La queratina es rica en treonina, arginina, valina y leucina y muy rica en cisteína; contrariamente, las tasas de histidina, lisina y metionina son bastante bajas. Los hidrolizados de las plumas de los pollos contienen 88 % de la fracción proteica que corresponde a α -queratina.

Las alfa queratinas son especialmente ricas en aminoácidos con grupos hidrofóbicos como fenilalanina, isoleucina, valina, metionina y alanina y particularmente ricas en cistina, llegando a un 18% en el caso de las alfa queratinas más duras como las del caparazón de las tortugas (Lehninger, 1995; Yusuf et al, 2016).

De acuerdo al trabajo de investigación titulado "Determinación del método para la obtención de queratina cosmética a partir de plumas gallináceas", con el método químico Na₂S se obtienen las soluciones de queratina, con características similares a las de la queratina cosmética (comercial), en su procedimiento se emplea agua y temperatura ambiente que bajan el costo de producción y no es peligroso, por lo tanto es el más recomendado para la obtención de queratina cosmética (Virginia, Cedillo, Rodrigo, & Altamirano, 2013).

Por tal motivo la presente investigación utilizó el método biológico para la obtención de queratina a partir de plumas de pollo, estas fueron el sustrato fermentable para la secreción de queratinasas capaces de degradarlas. Este fenómeno está asociado a la necesidad de la célula de hidrolizar sustratos proteicos de gran tamaño en moléculas pequeñas para su aprovechamiento como fuente de nutrientes. Entre los microorganismos Gram +, encontramos *Bacillus subtilis* que producen una proteasa con actividad para degradar queratina, el cual se usa en el tratamiento de degradación de las plumas de aves (Cui, Li, Li, & Lin, 2016 ; Abhrajyoti, Krishanu & Dhruvajyoti, 2008) .

2. Metodología

Localización de la investigación: la presente investigación se desarrolló en los laboratorios de la Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud de la Universidad Técnica de Machala, Ecuador.

Medio de Fermentación y Condiciones de Cultivo: se empleó el medio salino basal descrito por Pandian et al. 2012, el cual contiene un litro de agua

de mar y un litro de suero de leche y ajustado a pH 7,5 con bicarbonato de sodio (NaHCO₃) al 10 %. Este medio fue suplementado con harina de plumas molidas a una concentración de 40 g/L y 50 g/L y esterilizado por autoclave 15 min, a 121°C (Pandian, Sundaram, & Panchatcharam, 2012).

El diseño de la investigación fue de carácter descriptivo (describe situaciones porque se observa y define el tratamiento que resulte estadísticamente significativo en la obtención de queratina a partir de plumas de pollo) experimental, (se realizaron cuatro fermentaciones, correspondientes a un diseño experimental completamente al azar, resultantes de considerar dos factores [concentración de sustrato y concentración del inóculo y dos niveles para cada factor]). Ver Tabla 1

Tabla 1. Combinación factorial del experimento

Concentración de Sustrato (%)	Concentración de Enzima (g/L)	
	B ₁ = 2 g/L	B ₂ = 3 g/L
A ₁ = 18 %	A ₁ B ₁	A ₁ B ₂
A ₂ = 23 g/L	A ₂ B ₁	A ₂ B ₂

HPP: Harina de plumas de pollo, A_n*B_n: Interacción de los dos

La preparación del medio de cultivo se realizó, adicionando 40 g/L y 50 g/L (Factor A) de plumas de pollos molidos, se ajustó el pH a 7,5 con NaHCO₃, posteriormente se esterilizó a 121°C por 15 min, al cual se le inoculó 2 g/L y 3 g/L de enzima Granozyme de la marca comercial GRANOTEC (Factor B).

El criterio utilizado para seleccionar la concentración de plumas del medio de cultivo (40 g/L y 50 g/L) y la temperatura de incubación (Temperatura ambiente), estuvo basado en ensayos previos realizados con enzimas proteasas (Daroit, Corrêa, & Brandelli, 2011)-

Obtención de Enzimas: Granozyme ACC es una enzima proteasa neutral que contiene exclusivamente actividad endo - peptidasa. Se obtiene a partir de una cepa seleccionada de *Bacillus subtilis*, la cual tiene la capacidad de hidrolizar proteínas de alto peso molecular en péptidos de bajo peso molecular (GRANOTEC, 2013). Ver Tabla 2.

Tabla 2. Composición del extracto enzimático.

Constituyentes	%
Solución de Proteasa	40
Glicerol	30
Sorbitol	30

Fuente: Granotec (2013)

Granozyme ACC tiene una actividad mínima de 840 UHb/g. El producto cumple con las especificaciones recomendadas de la FAO/OMS, JECFA y la Food Chemicals Codex (FCC), para enzimas de grado alimenticio. El conteo viable total está dentro del límite superior de 5 x10⁴/g.

Dosificación: Hidrólisis de proteínas 0,01 -0,5 % basado en el contenido de proteínas del sustrato.

Protocolo de hidrólisis enzimática de las plumas de pollo

Obtención de la Harina de Pluma de Pollo

Molienda: luego del Prensado se obtiene un Cake un poco duro que debe ser sometido a un proceso de molienda en molinos de martillos, para lograr la granulometría de 300 µm.

Tamizado: el tamaño de partícula fue un parámetro importante en la hidrólisis enzimática de la harina de plumas de pollos, de preferencia menor a una granulometría baja (315 µm), de esta manera existe mayor área de ataque para los *Bacillus subtilis* productores de enzimas proteolíticas.

Inoculación de la Enzima: una vez ajustado el medio de cultivo a pH 7 se esterilizó, enfrió a temperatura ambiente y se inoculó la cantidad de enzima de acuerdo al tratamiento.

Purificación del Hidrolizado: una vez transcurrido las 72 horas de hidrólisis enzimática se procedió a separar mediante filtración la porción de harina de plumas que no se solubilizó, al hidrolizado soluble se lo desodorizó y concentró por tratamiento térmico.

3. Resultados

Determinación de la relación óptima de sustrato – inóculo (hidrólisis enzimática)

La relación recomendable de la concentración óptima de sustrato-enzima se la determinó en función del mayor porcentaje de hidrólisis obtenido. En la Figura 1 se muestran los porcentajes de hidrólisis obtenidos.

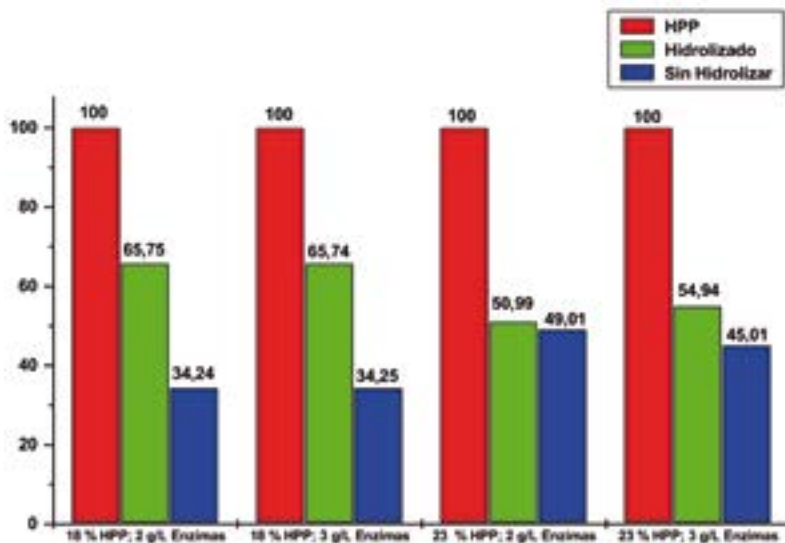


Figura 1. Porcentaje de hidrólisis obtenido en los cuatro tratamientos estudiados

En la Figura 1, puede observarse cómo los tratamientos 1 y 2 alcanzan los mayores porcentajes de hidrólisis de la harina de plumas de pollo (65,75 %), mientras que los tratamientos 3 y 4 solo alcanzan el 50,99 y 54,94 %, respectivamente.

La prueba de Tukey indica que existe diferencia significativa entre los cuatro tratamientos estudiados, el factor que influye en la hidrólisis enzimática es la concentración de harina de pluma de pollos, ya que a mayor concentración de proteína mayor formación de nitrógeno amoniacal, el cual es un inhibidor de la hidrólisis enzimática.

Análisis Estadístico

Este método se lo realizó con la finalidad de optimizar el proceso de hidrólisis enzimática. En la Tabla 3 se muestra la prueba de Tukey realizada a los 4 tratamientos.

Tabla 3. Pruebas de rango múltiple de Tukey

Contraste	Diferencia	Límites (±)
1-2	-0,1	4,21
1-3	*14,96	4,21
1-4	*10,76	4,21
2-3	*15,12	4,21
2-4	*10,92	4,21
3-4	-4,2	4,21

* Indica una diferencia estadísticamente significativa

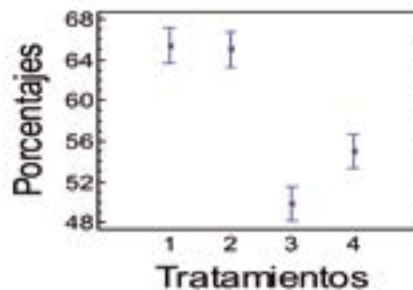


Figura 2. Prueba de Tukey (95 % HSD)

La prueba de Tukey indica los intervalos alrededor de cada media. Los intervalos que se muestran se basan en la prueba de Tukey, la cual indica que si existe diferencia honestamente significativa (HSD), de tal manera que todas las medias se encuentran por encima del 95,0% de confianza. Ver Figura 2.

Determinación de los parámetros que intervienen en la hidrólisis enzimática (pH, nitrógeno total, oxígeno disuelto, conductividad, solidos totales disueltos y queratina total)

Durante la hidrólisis enzimática existieron parámetros fisicoquímicos que son indispensables controlar, para un correcto desarrollo del proceso. En Figura 3 se muestra el comportamiento del pH durante las 60 horas de hidrólisis enzimática de la harina de plumas de pollo (HPP).

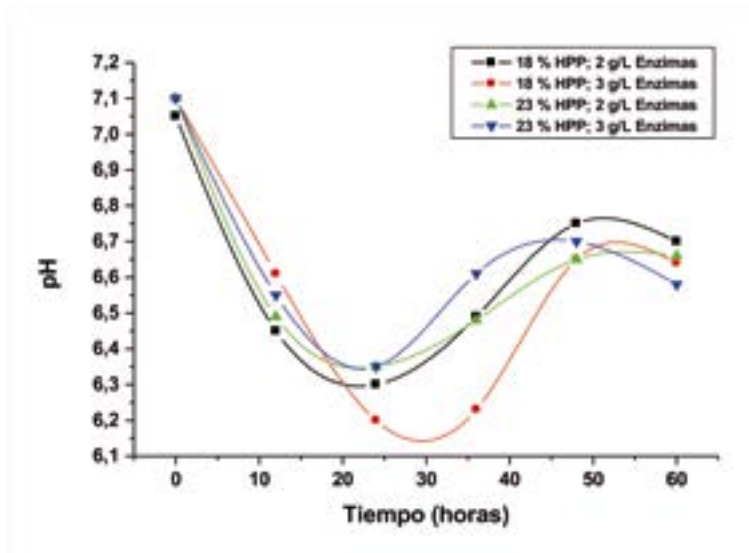


Figura 3. Variación del pH en la hidrólisis enzimática.

Como puede verse en la Figura 3 el pH desciende durante las 24 primeras horas en los cuatro tratamientos desde un 7,1 en el tratamiento 1 y 2 hasta 6,3 y 6,2 respectivamente y 7,05 en el tratamiento 3 y 4 hasta un valor pH de 6,35 en ambos tratamientos. El descenso de pH se presenta las 24 primeras horas de hidrólisis, luego se incrementa debido a la formación de nitrógeno amoniacal como producto de degradación.

En la Figura 4 se presenta el comportamiento del oxígeno disuelto durante las 60 horas de hidrólisis enzimática. Como se visualiza en la

Figura 4, la concentración de oxígeno disuelto desciende significativamente ($p < 0,05$) en los cuatro tratamientos, en el tratamiento 1 desde 5 mg/L hasta 0,3 mg/L, en el 2 desde 4 mg/L hasta 0,35 mg/L, en el tratamiento 3 desde 2,8 mg/L hasta 0,2 mg/L y en el 4 desde 2,5 mg/L hasta 0,25 mg/L, este fenómeno se le atribuye a que el *Bacillus subtilis*, es un microorganismo aerobio que comienza a consumir oxígeno y reproducir enzimas queratinas desde el inicio de la hidrólisis enzimática (Suntornsuk & Suntornsuk, 2003).

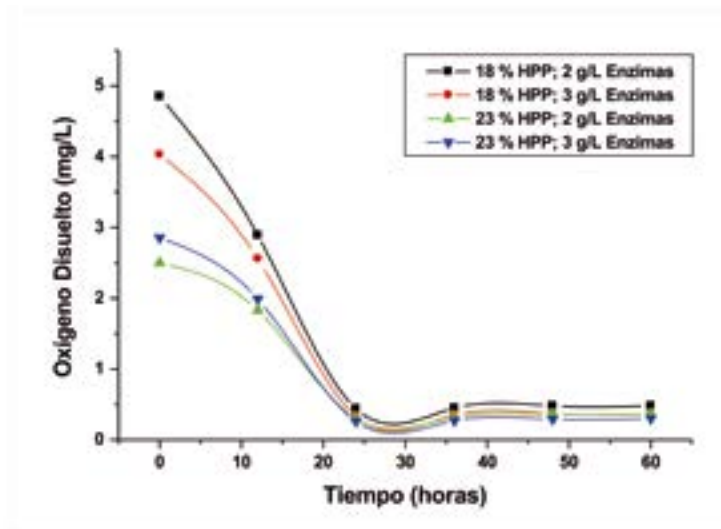


Figura 4. Variación de la concentración de oxígeno disuelto

En la Figura 5 se muestra el comportamiento de la conductividad del hidrolizado durante las 60 horas de hidrólisis enzimática. Como se puede ver en la Figura 5, se incrementa la conductividad eléctrica en

el hidrolizado ($\mu\text{S}/\text{cm}$), en los cuatro tratamientos, lo cual tiene una relación directamente proporcional con el incremento de la concentración de los sólidos totales (Brusco, 2014).

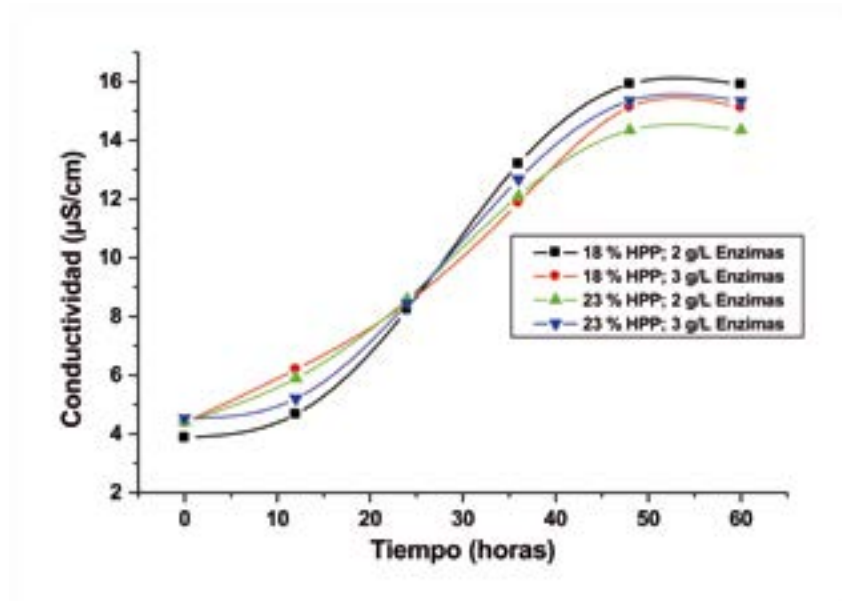


Figura 5. Comportamiento de la conductividad durante la hidrólisis enzimática

En la Figura 6 se muestra el incremento de la concentración de sólidos disueltos totales en el hidrolizado. Como puede apreciarse en la Figura 6, la concentración de sólidos disueltos totales se incrementa significativamente en los

4 tratamientos, llegando a estabilizarse a las 48 horas de hidrólisis enzimática, y al realizar la medición de este parámetro no hubo incremento significativo ($p > 0,05$).

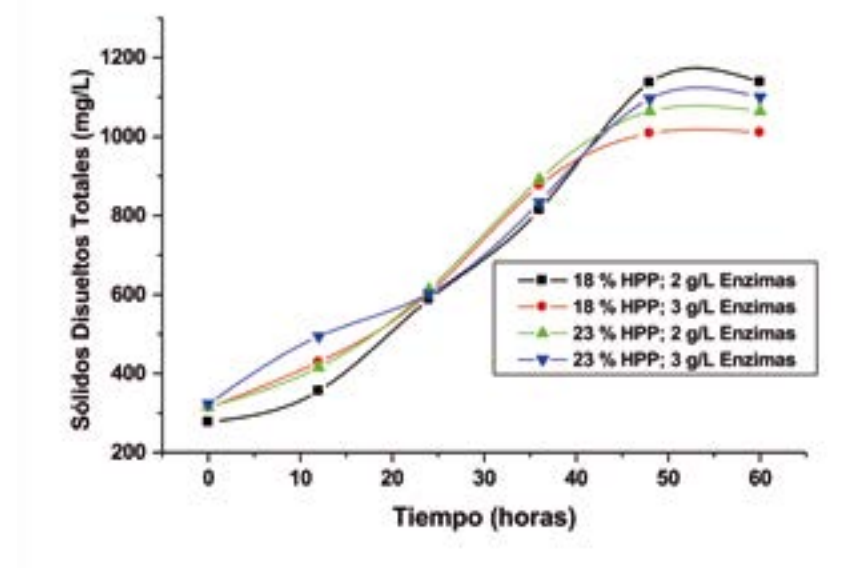


Figura 6. Incremento de los sólidos disueltos totales en el hidrolizado.

Determinación del tiempo de retención de la hidrólisis enzimática

El tiempo de retención depende en gran medida del tamaño y la longitud del péptido, la composición de aminoácidos y la presencia de áreas hidrofóbicas (Reddy & Santosh, 2016). El tamaño de partícula es un factor importante debido que a menor tamaño de partícula, mayor área de ataque por parte de los microorganismos (Vidal, Christen, & Coello, 2000).

En la Figura 7 se muestran las concentraciones de Nitrógeno total obtenidas durante el proceso de hidrólisis enzimática. Puede apreciarse el incremento de nitrógeno total y por ende queratina, metabolito secundario de interés en la presente investigación, aumenta significativamente ($p < 0,05$) hasta las 24 horas de hidrólisis enzimática, pasado ese tiempo inicia el incremento de nitrógeno amoniacal, el cual inhibe la hidrólisis enzimática.

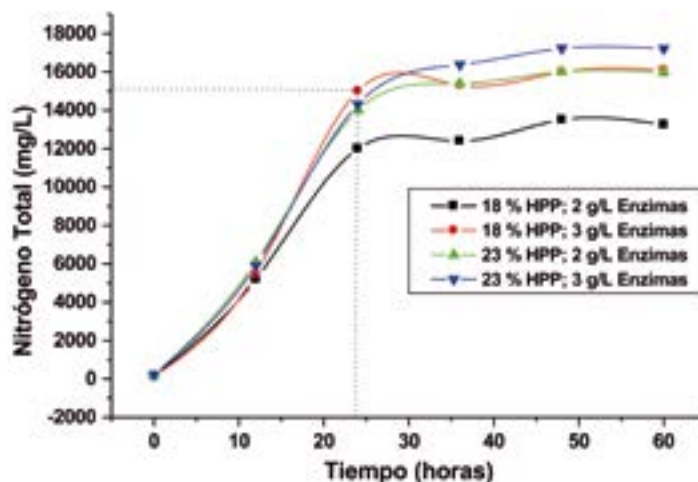


Figura 7. Incremento de la concentración de nitrógeno total en el hidrolizado

Análisis de Varianza

Para determinar con exactitud el tiempo de retención hidráulico óptimo se realizó un análisis de varianza, cada doce (12) horas, tomando como referencia la producción de nitrógeno total. En la Tabla 4 se muestra el análisis de varianza del experimento.

Tabla 4. Análisis de varianza del experimento a las 24 horas de hidrólisis enzimática

Fuente	Media	Varianza	N
T1=18 % HPP; 2 g/L Enzimas	12000,04	1156,00	3
T2=18 % HPP; 3 g/L Enzimas	15000,07	14151,62	3
T3=23 % HPP; 2 g/L Enzimas	13999,91	9161,54	3
T4=23 % HPP; 3 g/L Enzimas	14300,66	79274,33	3
F = 191,55404			
p = 8,69751E-8			

Como muestra la Tabla 4, a las 24 horas de hidrólisis enzimática existió diferencia significativa en la producción de nitrógeno total, y por ende ese es el tiempo de retención hidráulico óptimo en la producción de queratina.

III. CONCLUSIONES

Se determinó que la relación óptima de sustrato - enzima se consiguió en los tratamientos 1 (18 % harina de plumas de pollo; 2 g/L de enzima) y 2 (18 % harina de plumas de pollo; 3 g/L de enzima), los que alcanzaron los mayores porcentajes de hidrólisis de la harina de plumas de pollo (65,75 %), mientras de los tratamientos 3 (23 % harina de plumas de pollo; 2 g/L de enzima) y 4 (23 % harina de plumas de pollo; 3g/L de enzima) solo alcanzaron el 50,99 y 54,94 % respectivamente. La prueba de Tukey para la determinación de la relación óptima sustrato-enzima indicó que si existe diferencia significativa entre los cuatro tratamientos estudiados, el factor que influyó en la hidrólisis enzimática fue la concentración de harina de pluma de pollos, ya que a mayor concentración de proteína, mayor concentración de queratina en el hidrolizado.

El descenso de pH de los hidrolizados durante las primeras 24 horas, en los cuatro tratamientos,

indicaba que se estaba desarrollando con eficiencia el proceso. La concentración de oxígeno disuelto descendió significativamente ($p < 0,05$) en los cuatro tratamientos, este fenómeno se le atribuye a que el *Bacillus subtilis*, es un microorganismo aerobio que comienza a consumir oxígeno y reproducir enzimas queratinas desde el inicio de la hidrólisis enzimática (Guo et al, 2016). La conductividad eléctrica en el hidrolizado ($\mu\text{S}/\text{cm}$) se incrementó en los cuatro tratamientos, lo cual tiene una relación directamente proporcional con el incremento de la concentración de los sólidos totales (Jablonska, Rybarczyk, & Lieder, 2016). (Brusasco, 2014) La concentración de sólidos disueltos totales se incrementó significativamente en los 4 tratamientos, llegando a estabilizarse a las 48 horas de hidrólisis enzimática, y al realizar la medición de este parámetro después de este tiempo no hubo incremento significativo ($p > 0,05$).

En la presente investigación queda demostrado que es posible hidrolizar las plumas de pollo mediante hidrólisis enzimática. Durante el proceso de hidrólisis se produjo el incremento significativo ($p < 0,05$) de nitrógeno total y por ende la solubilidad de la queratina, metabolito secundario de interés en la presente investigación (Zaghoul et al, 2011). El estadístico Chi-cuadrado calculado para la prueba fue igual a 44,0. El valor de p fue inferior a 0,05, en conclusión se acepta la hipótesis alternativa: es posible la hidrólisis enzimática de las plumas de pollo.

IV. REFERENCIAS

- Cui, H., Li, W., Li, C., & Lin, L. (2016). Intelligent release of cinnamon oil from engineered proteoliposome via stimulation of *Bacillus cereus* protease. *Food Control*, 67, 68–74. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.02.036>
- Daroit, D. J., Corrêa, A. P. F., & Brandelli, A. (2011). International Biodeterioration & Biodegradation Production of keratinolytic proteases through bioconversion of feather meal by the Amazonian bacterium *Bacillus sp.* P45. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(1), 45–51. <http://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.04.014>
- Granotec. (2006). Ficha técnica: Nutrición y Biotecnología para la salud. Granozyme 3, (4 C), 82.
- 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. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.05.023>
- Guo, X., Chen, D.-D., Peng, K.-S., Cui, Z.-W., Zhang, X.-J., Li, S., & Zhang, Y.-A. (2016). Identification and characterization of *Bacillus subtilis* from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) for use as probiotic additives in aquatic feed. *Fish & Shellfish Immunology*, 52, 74–84. <http://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.03.017>
- Jablonska, M. A., Rybarczyk, M. K., & Lieder, M. (2016). Electricity generation from rapeseed straw hydrolysates using microbial fuel cells. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.062>
- Noureddine, L., Arnaud, C., Mathieu, S., Alain L., Jérôme, M. (2016). Application of the Direct Quadrature Method of Moments for the modelling of the enzymatic hydrolysis of cellulose: II. Case of insoluble substrate. *Chemical Engineering Science journal*, 1 (149)322–333
- Morocho, M., (2015). Diseño de un plan de administración ambiental para la granja avícola NUTRIVIT. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo
- Pandian, S., Sundaram, J., & Panchatcharam, P. (2012). Isolation, identification and characterization of feather degrading bacteria. *European Journal of Experimental Biology*, 2(1), 274–282.
- Rai, S. K., & Mukherjee, A. K. (2015). Optimization for production of liquid nitrogen fertilizer from the degradation of chicken feather by iron-oxide (Fe_3O_4) magnetic nanoparticles coupled β -keratinase. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1–13. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2015.07.002>
- Reddy, N., & Santosh, M. S. (2016). Recovery and Applications of Feather Proteins, 255–274. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-802391-4/00014-8>
- Vidal, L., Christen, P., & Coello, M. N. (2000). Feather degradation by *Kocuria rosea* in submerged culture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(6), 551–

554. <http://doi.org/10.1023/A:1008976802181>
Virginia, M., Cedillo, S., Rodrigo, W., & Altamirano, N. (2013). Determinación del método para la obtención de queratina cosmética a partir de plumas gallináceas. Químico-Farmacéutico. Universidad Central del Ecuador.
- Yusuf, I., Ahmad, S. A., Phang, L. Y., Syed, M. A., Shamaan, N. A., Abdul Khalil, K., ... Shukor, M. Y. (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*, 1–14. <http://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.08.059>.
- Zaghloul, T. I., Embaby, A. M., & Elmahdy, A. R. (2011). Biodegradation of chicken feathers waste directed by Bacillus subtilis recombinant cells: Scaling up in a laboratory scale fermentor. *Bioresource Technology*, 102(3), 2387–2393. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.106>