

Enriquecimiento de consorcios microbianos de muestras de suelo para la bioconversión de queratina

Melanie Gazco^a, Vasti Jiménez^a

^aUniversidad Peruana Unión, Facultad de Ingeniería y Arquitectura, EP Ingeniería Ambiental Lima, Perú.

Resumen

La queratina se refiere a un grupo de materiales proteicos insolubles y recalcitrantes. Los mataderos producen una gran cantidad de subproductos queratinosos, que son eliminados o mal valorizados; sin embargo, los consorcios de microbios queratinolíticos representan una forma rentable y respetuosa con el medio ambiente de valorizar, ya que estos transforman la queratina en productos de alto valor comercial, como aminoácidos, biofertilizantes y biomateriales. Por ello, el objetivo del presente artículo es evaluar la adaptación de consorcios microbianos de muestras de suelo a la queratina. Se evaluó el crecimiento microbiano por medio de la absorbancia en una curvatura de 600 nm, a la par se fue verificando la actividad queratinolítica de manera diaria de las muestras. Se observó un crecimiento de los microorganismos en un 117% en comparación al muestreo inicial, lo que demuestra la eficiencia del consorcio microbiano en el uso de queratina como fuente de nutrientes. Se evidencia una buena adaptación a la queratina como fuente de nutrientes, confirmando el potencial de estos microorganismos para la degradación de queratina en aplicaciones industriales y en un rango de temperatura mesófilo que disminuiría los costes energéticos.

Palabras clave: Plumas de pollo; α -queratina; enriquecimiento; consorcios microbianos; degradación microbiana.

1. Introducción

El aumento del comercio y demanda de productos agrícolas resulta en una descarga masiva de desechos sólidos de queratina en forma de plumas, generalmente extraído de aves como pollos, pavos, gallinas, patos, etc (Bhari et al., 2021; Chen et al., 2022). Ello representa valores por encima de los 7 millones de toneladas anuales de desechos avícolas recalcitrantes altamente acumulados en todo el mundo que pueden ocasionar problemas en la salud y el ambiente (Babbar et al., 2022). La eliminación de dichos desechos de origen animal generalmente es por medio de incineradores o vertederos, debido a que muestran una inmensa rigidez frente a agentes físicos, químicos y biológicos, además de resistencia a la proteólisis por proteasas como tripsina, pepsina y papaína, lo que es un obstáculo importante en la gestión de residuos (Qin et al., 2022). A pesar de ello, estos pueden ser considerados como una enorme fuente de nitrógeno, sin embargo, no se les ha prestado la suficiente atención para su uso o reciclaje (Sironi et al., 2022).

La queratina, una proteína fibrosa estructural con alto contenido de cisteína y enlaces disulfuro en la β -queratina, es el componente principal que contribuye a su extrema estabilidad/resistencia a la degradación (Alahyaribeik et al., 2020). Sin embargo, debido a su alto contenido de proteínas (90%), nitrógeno (12-18%) y azufre orgánico (2-5%), presenta un buen potencial para promover el crecimiento de las plantas y mejorar la calidad del suelo, además de contar con una gran estabilidad bajo diferentes valores de pH y temperatura (Qin et al., 2022). Por lo tanto, los residuos de queratina pueden tener una amplia gama de aplicaciones;

entre ellas, los biofertilizantes. Sin embargo, en comparación con otros desechos, la tasa de mineralización de los desechos de queratina en el suelo es lenta, por lo que no se puede utilizar directamente en él (Bhari et al., 2021; Chen et al., 2022).

Los métodos más investigados consisten en convertirlos en hidrolizado de plumas mediante tratamientos físicos, químicos y/o mecánicos; sin embargo, la aplicación de estos pueden provocar una pérdida nutricional sustancial del sustrato (Jagadeesan et al., 2023).

Para la bioconversión de los residuos de queratina en productos de valor agregado se necesita un poderoso biocatalizador, llamado queratinasa microbiana. Sin embargo, esta necesita de ayuda de un agente reductor (como los microorganismos) para romper los enlaces disulfuro de la queratina por su poca capacidad de hidrolizar los enlaces disulfuro de la queratina (Li et al., 2023).

En la hidrólisis microbiana, las macromoléculas son hidrolizadas a oligómeros y monómeros por la actividad microbiana antes de ser posteriormente degradadas; para ello se emplean microorganismos que realizan la bioconversión correspondiente (McGauran et al., 2021).

Los microorganismos más usados son los Bacillus, tales como: *Bacillus aerius*, *Bacillus Pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus cereus* (Bhari et al., 2021); una de las principales ventajas que tienen estos, es la capacidad de formar una barrera física para evitar la evaporación del agua en el suelo, lo cual genera un rendimiento en el proceso de riego de las plantas; además de mejorar las propiedades físicas y químicas del suelo. Lo que hace aún más especial a estos organismos, es la capacidad de producir una hormona antioxidante y promotora del crecimiento vegetal, denominada *ácido indol-3-acético* (Jagadeesan et al., 2023; McGauran et al., 2021).

Algunos beneficios que presenta el hidrolizado de manera general son los siguientes: brinda un enfoque respetuoso con el medio ambiente, produce aminoácidos esenciales para el crecimiento de las plantas, mejora el contenido fitoquímico y la fertilidad microbiana del suelo, además de desarrollar una inmunidad adaptativa contra patógenos vegetales. Es por ello que, la hidrólisis microbiana se considera un enfoque prometedor para la gestión de los desechos de plumas sin disminuir el contenido y la disponibilidad de aminoácidos esenciales, dándole un gran potencial para el uso como biofertilizantes (Bhari et al., 2020). Sin embargo, se ve necesario acostumbrar previamente a los microorganismos para garantizar y optimizar los posteriores resultados.

Dadas las tendencias actuales hacia la búsqueda de procesos biotecnológicos aplicables al tratamiento de los residuos agroindustriales y la existencia de un alto potencial microbiano en la naturaleza, capaz de utilizar una amplia variedad de sustratos orgánicos, se ha dirigido el objetivo de esta investigación es evaluar la adaptación de consorcios microbianos de muestras de suelo a la queratina.

2. Materiales y Métodos

2.1. Caracterización de la muestra

Se recogieron plumas de pollo de la avícola Ávila, las cuales se lavaron con 10 ml de hipoclorito de sodio y 2 L de agua de grifo (Rodríguez-Clavel et al., 2019); ello para eliminar la sangre, materia fecal y patógenos que pueda contener la muestra. Seguidamente, se secó la muestra durante 48 horas a temperatura ambiente. Una vez secas, las plumas fueron cortadas en pedazos de aproximadamente 1 cm. Cabe resaltar que se usaron todas las partes de la pluma.

2.1.1. Determinación de materia total seca y humedad

Para la determinación de Materia Total Seca (Aguilar, 2023), en primer lugar se rotularon los crisoles (C1, C2, C3 y C4) se pesaron para ser secados a 120 °C durante 1 hora en la mufla. Luego se retiraron de la mufla y se llevaron al desecador (por 1 hora) hasta su enfriamiento. Se sacaron los crisoles del desecador y con una pinza se colocaron cada crisol en una balanza analítica previamente tarada, esto se hizo para conocer su peso inicial. Teniendo los pesos de los crisoles, se procedió a añadir la materia prima respectivamente (plumas de pollo), una cantidad de 0.5 gr en cada crisol y después se llevaron nuevamente a la mufla a una temperatura de 120 °C durante 1 hora. Pasado el tiempo en la mufla, se retiraron los crisoles y se llevaron al desecador (por 1 hora) hasta su enfriamiento (Figura 1). Se sacaron los crisoles del desecador y se pesaron en la balanza analítica, anotando los pesos para posteriormente realizar los cálculos matemáticos respectivos, usando la siguiente ecuación:

$$\%MTS = \frac{[(\text{Peso cápsula vacía} + \text{Muestra deshidratada}) - (\text{Peso cápsula Vacía})] * 100}{\text{Peso de la muestra húmeda}}$$

La determinación de humedad se calculó con los datos previos de la Materia Total Seca. Para la cual se utilizó la siguiente ecuación.

$$\% \text{ Humedad} = 100\% - \%MTS$$

Figura 1

Determinación de Materia Total Seca



2.1.2. Determinación de proteína y nitrógeno total

Se usó el método micro Kjeldahl (Martínez, 2013) para medir el contenido de nitrógeno total y proteína de las plumas de pollo. Este se divide en 3 etapas: digestión o mineralización, destilación y titulación. En la etapa de digestión se introdujeron 1 gr de muestra de plumas, 3 gr de K_2SO_4 y 0,5 gr de $CuSO_4$ en cada tubo de mineralización; cabe resaltar que la prueba se realizó por triplicado y se sumó una muestra blanco, teniendo un total de 4 tubos. Después se adicionaron 25 ml de H_2SO_4 en cada tubo. Posteriormente se digirió

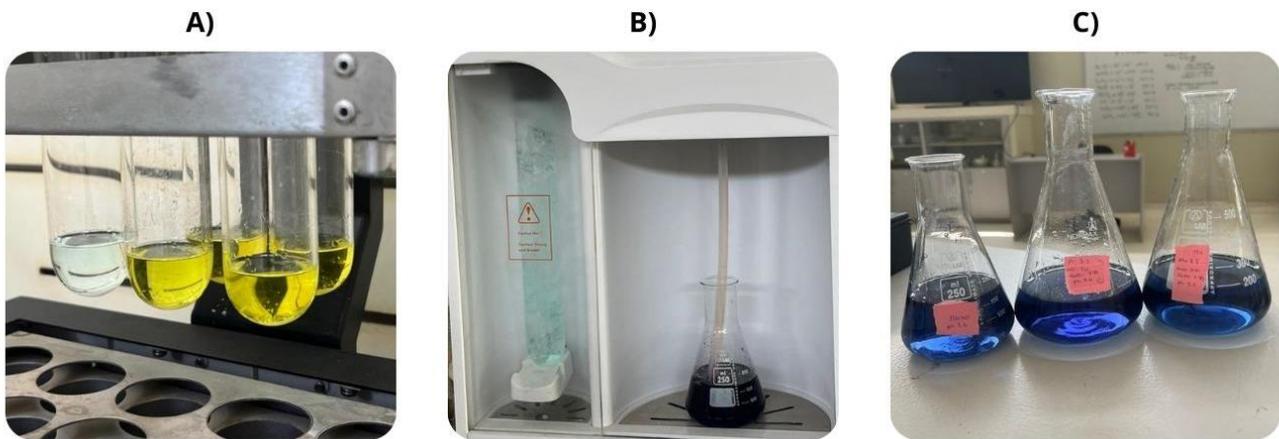
a 420 °C durante 2 horas en el equipo de digestión Kjeldahl. Se supo que la digestión culminó debido a que la disolución adquirió un color verde característico (Figura 2).

En la siguiente etapa, llamada destilación, se llevaron los tubos a la unidad de destilación, donde se adicionaron 50 ml de agua destilada, 50 ml de H₃BO₃ (al 4% p/v) y 80 ml de NaOH 10N. El resultado de la destilación se depositó en un matraz erlenmeyer de 250 ml por cada tubo de mineralización (Figura 2).

En la última etapa de titulación, se realizó una volumetría ácido-base empleando H₂SO₄ 10N y como indicador una disolución alcohólica de una mezcla de rojo de metilo y azul de metileno. Teniendo el pH de la muestra blanco como guía (Figura 2).

Figura 2

Pasos del método micro Kjeldahl



Nota. A) Etapa de digestión, cambio de color de la muestra. B) Etapa de destilación. C) Etapa de titulación.

Para el cálculo de concentración de nitrógeno total se usó la siguiente ecuación (Godoi, 2021):

$$N = \frac{V_1}{V_m} \times M_{H_2SO_4} \times 2 \times 14.000$$

Donde:

N - representa la concentración de nitrógeno de la muestra, en mg N-NH₄/L o N-NTK/L;

V₁ - volumen de la solución de ácido utilizado para titular la muestra (ml);

V_m - volumen original de la muestra antes de la digestión (ml);

M H₂SO₄ - molaridad de solución de ácido sulfúrico utilizado en la titulación (mol/L);

14.000 - equivalente de nitrógeno contenido en NH₄;

2 - número de hidrógenos ionizados en la molécula de H₂SO₄.

Para el cálculo de proteína total se multiplicó el porcentaje de nitrógeno total por un factor de conversión de 6.38 (Sinkiewicz, 2016).

2.2. Preparación de sustrato y medio

Se realizó un muestreo compuesto de suelo para “muestra superficial” siguiendo los lineamientos dados por MINAM (2014) de un criadero de pollos en Ñaña, Lima. En esta, se realizaron hoyos con una profundidad de 0 a 10 cm en 6 puntos diferentes de la zona. Seguido a ello, se realizó un cernido de la muestra, logrando como resultado 2 kg de suelo, el cual fue refrigerado para su próximo uso (Figura 3).

Para el medio, se usaron (0,5 g/L de NH_4Cl , 0,5 g/L de NaCl , 0,3 g/L de K_2HPO_4 , 0,4 g/L de KH_2PO_4 , 0,1 g/L de $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) por cada 100 ml de agua destilada, este fue nombrado medio mineral (MM) (Kang, 2018). Para el medio de queratina (KM), se usaron 100 ml de MM con un gramo de queratina como única fuente de carbono. Ambos medios fueron esterilizados en autoclave por 21 min a 120 °C (Figura 3).

Figura 3

Preparación de sustrato y medio



Nota. A) Muestreo compuesto de suelo. B) Medio Mineral y Medio de queratina.

2.3. Enriquecimiento queratinolítico

2.3.1. Ensayo preliminar

Se utilizó un gramo de suelo previamente recolectado como inóculo para el posterior enriquecimiento. El cultivo se llevó a cabo en un matraz de 250 ml, el cual contenía 100 ml de KM (Medio de Queratina), durante cinco días. Se utilizaron KM en blanco y MSM como controles negativos. Los matraces se agitaron durante cinco días a 200 rpm en condiciones aeróbicas a 24 °C. Durante este periodo de tiempo, se realizaron pruebas de crecimiento microbiano por medio de la absorbancia utilizando un espectrofotómetro, en una curvatura de 600 nm; diluyendo 2 ml de muestra 1:2 con agua destilada. Cabe recalcar que las muestras fueron tomadas en un rango de 24 horas.

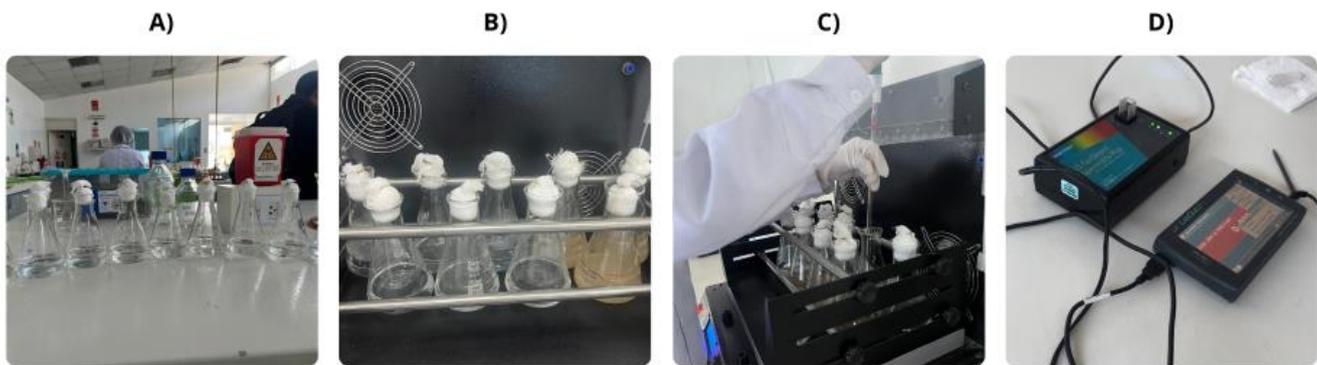
2.3.2. Cálculo de porcentaje de crecimiento

Una vez obtenidos los datos de absorbancia, se sacó la media y desviación estándar de cada uno, para posteriormente calcular el porcentaje de crecimiento en base a la muestra cero, usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ crecimiento} = \frac{(\text{Muestra } x - \text{Muestra } 0)}{\text{Muestra } 0}$$

Figura 4

Enriquecimiento Queratinolítico



Nota. A) MSM, KM blanco y KM + suelo. B) Agitador Orbital. C) Dilución 2:1. D) Medición en el Espectrofotómetro.

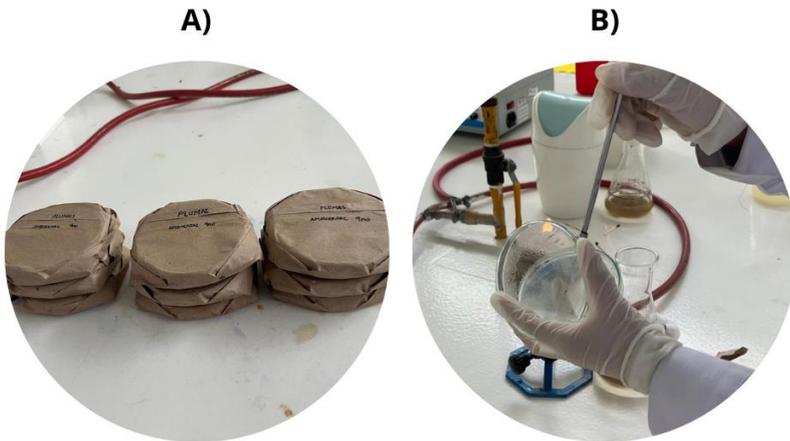
2.4. Actividad queratinolítica

2.4.1. Ensayo preliminar

Se prepararon 180 ml de Agar Bacteriológico con un contenido de 0,5% de queratina, los cuales se repartieron en 9 placas previamente esterilizadas. Culinado el periodo de 5 días de incubación continua en las pruebas del Enriquecimiento Queratinolítico, se sembró en las placas por método de picadura. Las placas se incubaron a 35 °C por 48 - 72 horas. La prueba se realizó por triplicado. Para identificar las cepas que mostraron mejor crecimiento, se realizaron mediciones del diámetro del halo de crecimiento.

Figura 5

Actividad Queratinolítica



Nota. A) Placas Esterilizadas. B) Sembrado por picadura.

2.5. Análisis estadístico

Todos los resultados se realizaron por triplicado y fueron expresados como media \pm desviación estándar de la media. Los datos que se obtuvieron como resultado, se analizaron estadísticamente en el software R Studio.

3. Resultados y Discusión

3.1. Caracterización de muestra

Los resultados de la caracterización son mostrados en la Tabla 1. La concentración de nitrógeno total muestra una cantidad dentro del rango encontrado por otras investigaciones, el cual va de 4,8 a 6,92 gr (Badrulzaman, 2021), cumpliendo con el 12 -18% por pluma; cabe destacar que el nitrógeno con el que se cuenta es muy favorecedor para su posterior uso como fertilizante, además de que ayuda al crecimiento microbiológico de las bacterias del tipo *Bacillus subtilis*, las cuales son una especie capaz de degradar la queratina (Bhari, 2021). En cuanto al porcentaje de proteína, fue bastante baja en comparación con otros datos reportados por artículos previos, 91% (Bhari, 2021), 95% (Chen, 2022) y 93% (Sironi et al., 2022); podría deberse a que la estructura de las plumas dependen mucho de la raza, alimentación y medio ambiente de crianza. Siller (2014) presentó valores similares, reportando que el contenido protéico de las plumas puede variar en función del método previo de secado.

Por otro lado, la humedad y materia total seca presentan valores similares a los obtenidos previamente por Kurien (2022), quien realizó un análisis estructural de este residuo. Cabe resaltar que, la caracterización fue de suma importancia, debido a que los resultados nos darán una idea de los posibles futuros hallazgos en la investigación.

Tabla 1
Caracterización de la muestra de plumas de pollo.

Análisis	Resultados
Nitrógeno Total	5.586 gr
% Proteína	35.638 %
% Materia Total seca	94.5 ± 1,91
% Humedad	5.51 ± 1,91

3.2. Enriquecimiento queratinolítico

Se esperaba que este proceso seleccionara microorganismos que crecieran eficientemente en un rango de temperatura mesófilo para disminuir los costes energéticos en la escala industrial, además del enriquecimiento queratinolítico de consorcios microbianos con especies importantes involucradas en la degradación de la queratina de manera natural.

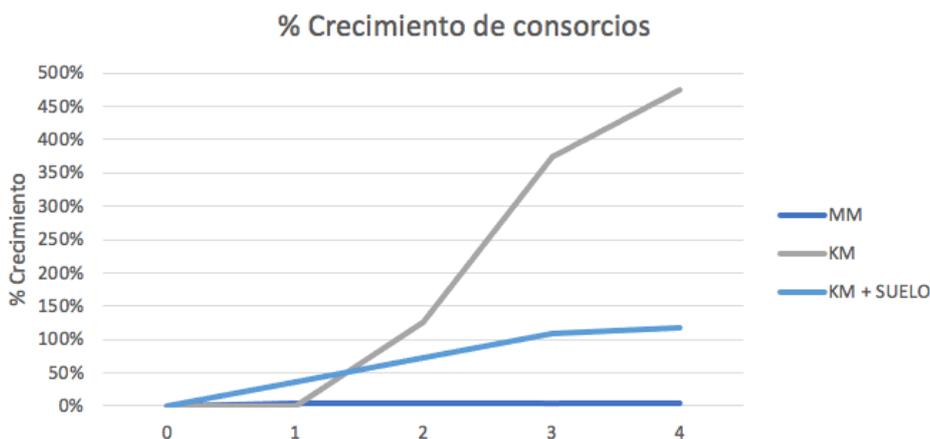
Gracias a los resultados (Figura 6) se dio a conocer que el medio queratinoso con el inóculo pudo crecer gradualmente hasta llegar a una fase estacionaria transcurridos 3 días, y en los días contiguos disminuyeron ligeramente hasta el último periodo de prueba, indicando una reducción de número de células. En total, alcanzó un porcentaje de crecimiento de 117% en comparación al muestreo del día 0.

Un estudio similar de enriquecimiento realizado por Kang (2018) presentó un comportamiento similar, lo cual indica que el inóculo usado en el experimento contiene comunidades microbianas que podrían usar la queratina como única fuente de nutrientes.

Un punto importante a tomar en cuenta es el hecho de que la muestra en blanco de KM presentó una contaminación en el transcurso del segundo al tercer día con un pequeño porcentaje de la muestra de KM+suelo; en ese transcurso, los microorganismos del KM+suelo se encontraban llegando a la fase estacionaria, por lo que al entrar en otro medio nuevo rico en queratina crecieron rápidamente.

Figura 6

Porcentaje de crecimiento



Nota. Crecimiento de consorcios a lo largo del periodo de prueba en los 3 medios.

3.3. Actividad queratinolítica

3.3.1. Ensayo Preliminar

Los resultados de las mediciones respectivas de los diámetros de los halos de crecimiento producidos en las placas se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Tamaño del Halo de cada Medio de Cultivo

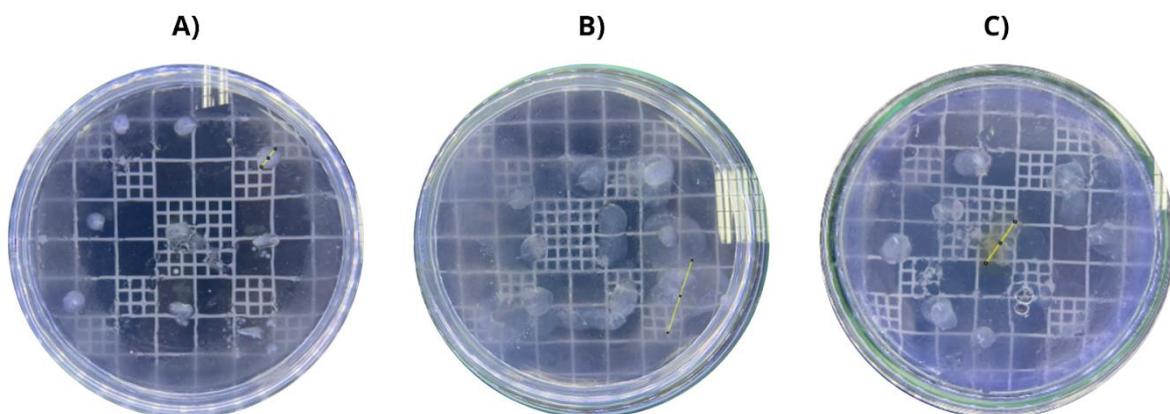
Medio	Tamaño del Halo*
MM	6.976 ± 5.794
KM	15.639 ± 4.847
KM + SUELO	11.600 ± 2.285

Nota: *Tamaño del Halo en milímetros medido luego de 48 horas.

En la Figura 6 y 7 se presenta la evidencia de crecimiento de los microorganismos. Se observa el crecimiento de consorcios en el Medio Queratinoso más suelo. Por lo que, son microorganismos con potencial actividad queratinolítica, ya que para su desarrollo utilizaron el sustrato (suelo con residuos queratinosos), como única fuente de carbono y nitrógeno (Juárez 2012). Un factor que ayudó al crecimiento de los halos fue la temperatura, ya que cada microorganismo tiene su temperatura óptima (Anwar et al., 2014; Guzmán et al., 2015; Tamariz, 2014). Sin embargo, también se pudo observar el crecimiento de consorcios microbianos en el KM, esto debido a una presentó una contaminación en el transcurso del segundo al tercer día, ello podría deberse a un descuido en el cambio de pipetas, y además, a que los microorganismos crecen más cuando hay menos dilución. Esto se debe a que una menor dilución significa que hay una mayor concentración de nutrientes disponibles para las bacterias, el caso del KM (Lin et al., 2020).

Figura 6

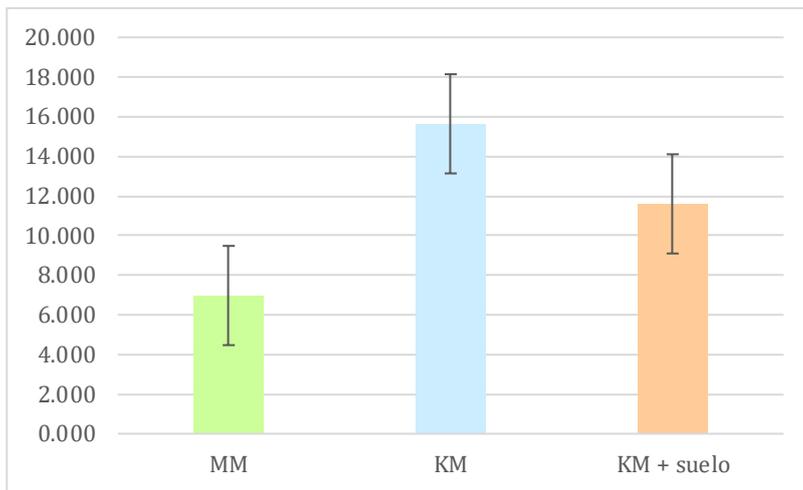
Crecimiento del Halo por Medio de Cultivo



Nota. A) Medio Mineral (MM). B) Medio Queratinoso (KM). C) Medio Queratinoso + Suelo (KM + suelo).

Figura 7

Actividad Queratinolítica



Nota. MM: Medio Mineral; KM: Medio con Queratina; KM: Medio con Queratina + Muestra de suelo

4. Conclusiones

Las plumas de pollo contienen un contenido importante de nitrógeno total, lo cual es beneficioso para su uso como fertilizante debido a su capacidad para mejorar el crecimiento microbiológico; de igual manera, los resultados de MTS y humedad dieron valores estándar del residuo. Por otro lado, el porcentaje de proteína fue menor al presentado en otros artículos, ello puede deberse al método previo de secado y la alimentación de los animales.

Se observó un crecimiento de los microorganismos en un 117% en comparación al muestreo inicial, lo que evidencia la eficiencia del consorcio microbiano en el uso de queratina como fuente de nutrientes. Por lo que se demuestra una buena adaptación a la queratina como fuente de nutrientes, confirmando el potencial de estos microorganismos para la degradación de queratina en aplicaciones industriales y en un rango de temperatura mesófilo que disminuiría los costes energéticos.

Referencias

Aguilar, H., Estefania, D., Macías Zambrano, D. K., & Neira Mosquera, J. A (2023). Estudio del proceso de extracción de queratina mediante hidrólisis enzimática en tres tipos de aves (Plumas), Pollo Campero, Pollo Cobb y Pollo Ross a partir de distintas concentraciones de queratinasas producidas por *Bacillus* sp., para la elaboración de bioplástico. <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/36077/1/T-ESPESD-003289.pdf>

Anwar, Z.; Gulfraz, M. & Irshad, M. (2014). Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 7(2), 163-173.

- Badrulzaman, SZS, Aminan, AW, Ramli, ANM, Che Man, R. y Wan Azelee, NI (abril de 2021). Extracción y caracterización de queratina de plumas de pollo y salangana. En Foro de Ciencia de Materiales (Vol. 1025, págs. 157-162). Publicaciones Trans Tech Ltd.
- Babbar, N., Sharma, G., & Arya, S. K. (2022). Effective degradation of chicken feather waste by keratinase enzyme with triton X-100 additive. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 44, 102447. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102447>
- Bhari, R., Kaur, M. y Sarup Singh, R. (2021). Hidrolizado de desechos de plumas de pollo como biofertilizante superior en la agroindustria. *Microbiología actual* , 78 (6), 2212-2230.
- Chen, H., Gao, S., Li, Y., Xu, H.-J., Li, W., Wang, J., & Zhang, Y. (2022). Valorization of Livestock Keratin Waste: Application in Agricultural Fields. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/ijerph19116681>
- Godoi, L. A. G. D., Costa, R. B., Guerrero, R. D. B. S., Santos, C. E. D. D., Miranda, C. A. S., & Adorno, M. A. T. (2021). Métodos analíticos aplicados ao monitoramento de processos biológicos de tratamento de águas residuárias. Universidade de São Paulo. Escola de Engenharia de São Carlos.
- Guzmán, A.; Zambrano, D.; Rivera, R.; Rondón, A.; Laurencio, M. y Pérez, M. (2015). Aislamiento y selección de bacterias autóctonas de Manabí-Ecuador con actividad celulolítica. *Cuba. Cultivos Tropicales*, 36(1), 7-16.
- Jagadeesan, Y., Meenakshisundaram, S., Raja, K., & Balaiah, A. (2023). Sustainable and efficient-recycling approach of chicken feather waste into liquid protein hydrolysate with biostimulant efficacy on plant, soil fertility and soil microbial consortium: A perspective to promote the circular economy. *Process Safety and Environmental Protection*, 170, 573-583. Scopus. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2022.12.029>
- Juárez, Jorge Alejandro Siller. 2012. «“BÚSQUEDA E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS»». UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO, 56.
- Kang, D., Herschend, J., Al-Soud, WA, Mortensen, MS, Gonzalo, M., Jacquioid, S. y Sørensen, SJ (2018). Enriquecimiento y caracterización de un consorcio microbiano ambiental que muestra actividad queratinolítica eficiente. *Tecnología de biorecursos* , 270 , 303-310.
- Martínez & López (2013). Aplicación de la determinación de proteínas de un alimento por el método Kjeldahl. Valoración con una base fuerte. Upv.es. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/29832/proteinas%20medio%20b%20c%20a%20sico-%202013.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- McGauran, T., Dunne, N., Smyth, B. M., Cunningham, E., & Harris, M. (2021). Poultry feather disulphide bond breakdown to enable bio-based polymer production. *Polymers from Renewable Resources*, 12(3-4), 92-110. Scopus. <https://doi.org/10.1177/20412479211008746>
- MINAM, P. (2014). Guía para el muestreo de suelos. Ministerio del Ambiente, 72.
- Li, Q. (2022). Perspectives on Converting Keratin-Containing Wastes Into Biofertilizers for Sustainable Agriculture. *Frontiers in Microbiology*, 13. Scopus. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.918262>

- Lin J, Manhart M, Amir A. Evolution of Microbial Growth Traits Under Serial Dilution. *Genetics*. 2020 Jul;215(3):767-777. doi: 10.1534/genetics.120.303149. Epub 2020 May 4. PMID: 32366512; PMCID: PMC7337084.
- Rodríguez-Clavel, I. S., Paredes-Carrera, S. P., Flores-Valle, S. O., Paz-García, E. J., Sánchez-Ochoa, J. C., & Pérez-Gutiérrez, R. M. (2019). Effect of Microwave or Ultrasound Irradiation in the Extraction from Feather Keratin. *Journal of Chemistry*, 2019. Scopus. <https://doi.org/10.1155/2019/1326063>
- Siller, J. A. (2014). Búsqueda e identificación de microorganismos con actividad queratinolítica.
- Sironi, P. B., Mazotto, A. M., Fabio de Lima, M., Nogueira, R. I., Melim Miguel, Â. S., & Vermelho, A. B. (2022). Hydrolyzed feather keratin obtained by microbial fermentation encapsulated with maltodextrin – A sustainable approach to increase digestible protein in feed. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 40, 102297. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102297>
- Sinkiewicz, I., Śliwińska, A., Staroszczyk, H., & Kołodziejska, I. (2016). Alternative Methods of Preparation of Soluble Keratin from Chicken Feathers. *Waste and Biomass Valorization*, 8(4), 1043–1048.
- Tamariz, C. (2014). Diversidad de bacterias termotolerantes celulolíticas y xilanolíticas aisladas de fuentes termales del Callejón de Huaylas (tesis doctoral). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
- Qin, X., Xu, X., Guo, Y., Shen, Q., Liu, J., Yang, C., Scott, E., Bitter, H., & Zhang, C. (2022). A sustainable and efficient recycling strategy of feather waste into keratin peptides with antimicrobial activity. *Waste Management*, 144, 421-430. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2022.04.017>