

Universidad de Matanzas
Sede "Camilo Cienfuegos"
Facultad de Ciencias Técnicas
Departamento de Química



Tesis presentada en opción al título de Ingeniero Químico

Título: Obtención de peptonas a partir de plumas de pollos mediante hidrólisis Básica.

Autor:

Lisandra Medina Martell

Tutor:

MSc. Lic. Arley Pérez Rojas

Matanzas, Cuba

2019

Nota de Aceptación.

Presidente del Tribunal

Firma

Miembro del Tribunal

Firma

Miembro del Tribunal

Firma

Declaración de autoridad

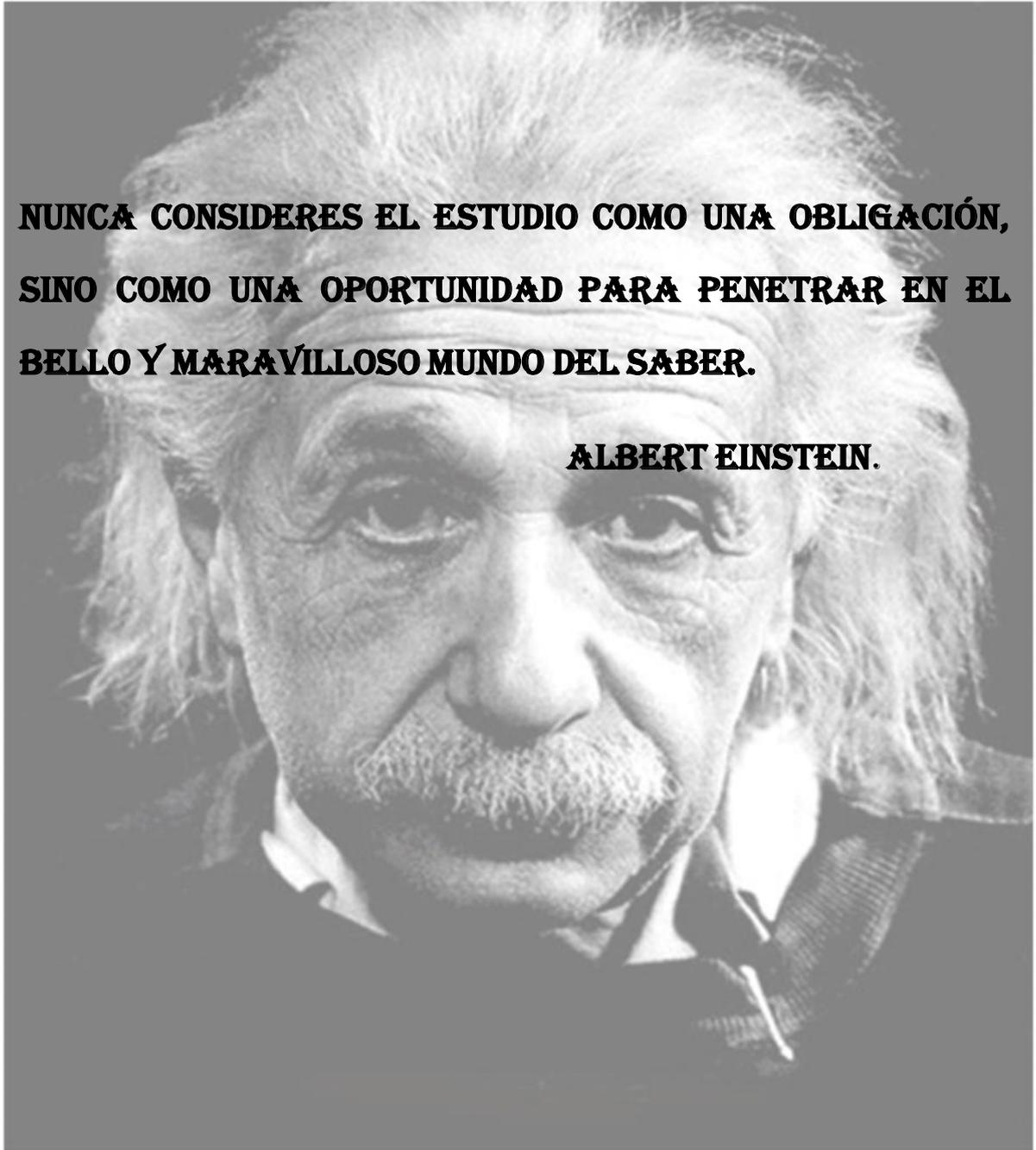
Yo, Lisandra Medina Martell, declaro que soy la única autora de este Trabajo de Diploma y lo pongo a disposición de la Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”, para hacer uso del mismo con el objetivo y finalidad que se estime conveniente.

Lisandra Medina Martell

Pensamiento.

**NUNCA CONSIDERES EL ESTUDIO COMO UNA OBLIGACIÓN,
SINO COMO UNA OPORTUNIDAD PARA PENETRAR EN EL
BELLO Y MARAVILLOSO MUNDO DEL SABER.**

ALBERT EINSTEIN.



Dedicatoria

A mami, por estar siempre de forma incondicional.

A papi, por luchar tanto para sacarme adelante.

A mi familia, por haber contribuido a que se hicieran realidad mis sueños.

A la Revolución, por haberme permitido ser un profesional.

Agradecimientos

-A Dios, por haberme permitido llegar hasta aquí.

-A mis padres, por ser el pilar fundamental de todo lo que soy, por ser mi soporte, por su incondicional apoyo a pesar del tiempo y la distancia, por ser un ejemplo de fortaleza y darme ánimos para seguir en todo momento.

-A mi hermanito que, aunque pequeño también supo darme su apoyo infinito.

-A mi novio, quien más que mi pareja ha sido mi amigo, me ha llenado de fuerzas, amor y me ha demostrado que todo en la vida se obtiene gracias al sacrificio.

-A mi tío Eliodil por siempre darme aliento, apoyo y confianza.

-A mi tía Nancy por acompañarme muchas noches sin dormir, darme seguridad y guiarme para que me sienta segura de mi misma.

-A mi amiga Angélica y a sus padres por darme ánimo y por siempre estar a mi lado en todo momento.

-A mi familia, que aún en la distancia me apoyan de una manera sin igual.

-A Arley Pérez Rojas, mi tutor, por dedicarme parte de su tiempo y por haber compartido sus conocimientos durante el desarrollo de la presente investigación.

-A Anita y a Edy, por su gran apoyo durante la realización de los experimentos.

- A mis compañeros de aula, por su confianza y apoyo.

-A todos aquellos profesores que me brindaron su conocimiento durante la carrera.

Muchas gracias a todos

Resumen.

En las plantas de procesamiento de aves, existen subproductos que no reciben ningún uso, este es el caso de las plumas de pollo. En la presente investigación se evaluó un método de obtención de peptona a partir de plumas de pollo mediante hidrólisis con NaOH(ac). Se realizó un diseño experimental *Box-Behnken* a través del programa *Statgraphics plus 5*. Los parámetros óptimos para la producción de la peptona de plumas de pollos (PP) son: concentración de NaOH(ac) de 2 N, temperatura de 60 °C, masa de plumas de 1,5 g y tiempo de 6,0 h. Las características de la peptona de pollo obtenida fue humedad 5,2 %, cenizas 23,4 %, proteína cruda 60 % y nitrógeno total 12,42 %. Se realizó un estudio de calidad a través de enfrentamientos de microorganismos y la cantidad de biomasa generada demostró que se puede sustituir en parte peptona comercial (Pc) por peptona de plumas de pollos (PP).

Abstract

In poultry processing plants, there are byproducts that do not receive any use, this is the case of chicken feathers. In the present investigation, a method of obtaining peptone from chicken feathers by hydrolysis with NaOH(ac) was evaluated. A *Box- Behnken* experimental design was carried out through the Statgraphics plus 5 program. The optimal parameters for the production of peptone from chicken feathers (PCF) are: NaOH(ac) concentration of 2 N, temperature of 60 °C, mass of feathers of 1,5 g and time of 6,0 h. The characteristics of the PCF obtained were moisture 5.2 %, ash 23.4 %, crude protein 60 % and total nitrogen 12.42 %. A quality study was carried out through clashes of microorganisms and the amount of biomass generated showed that part of commercial peptone (CP) can be replaced by peptone from chicken feathers (PCK).

Contenido

Introducción.....	1
Capítulo I: Revisión bibliográfica.....	5
1.1. Medios de cultivo y bases nutritivas. Usos e importancia.....	5
1.2. Origen de las peptonas.....	9
1.3. Peptonas de uso convencional.....	11
1.3.1. Caracterización de las plumas de pollo.....	14
1.4. Métodos de obtención de peptonas.....	15
Capítulo 2: Materiales y Métodos.....	21
2.1. Caracterización de la materia prima.....	21
2.2. Caracterización físico-química de la muestra.....	21
2.2.1. Determinación del % de humedad.....	21
2.2.2. Determinación del % de cenizas.....	22
2.2.3. Metodología para determinar el % proteína cruda.....	23
2.3. Diseño experimental para la hidrólisis química.....	25
2.4. Desarrollo de la hidrólisis básica para la obtención de peptona a partir de plumas de pollo.....	26
2.4.1. Caracterización y análisis.....	27
2.4.2. Determinación del % de humedad.....	27
2.4.3. Determinación del % de cenizas.....	27
2.4.4. Determinación del contenido de nitrógeno.....	28
2.5. Evaluación de la peptona de plumas de pollos y la peptona bacteriológica comercial mediante el crecimiento microbiano.....	28
2.6. Prueba ANOVA.....	30
2.7. Análisis del beneficio bruto de la peptona obtenida.....	30
Capítulo 3: Análisis y Discusión de los resultados.....	31
3.1 Resultados de la caracterización físico – química de la materia prima.....	31
3.2 Resultados de la Hidrólisis Básica.....	32
3.3 Resultados de la caracterización de la peptona de pluma de pollo obtenida.....	34
3.4. Resultados de la evaluación de la peptona de plumas de pollos.....	35
3.5 Resultados del análisis del beneficio bruto.....	40
Conclusiones.....	42
Recomendaciones.....	43
Bibliografía.....	44

Introducción.

En los estudios biotecnológicos y los procesos industriales se utiliza con frecuencia microorganismos vivos que se cultivan y crecen gracias a medios nutritivos. Estos medios nutritivos contienen fuentes de carbono y nitrógenos necesarios para el crecimiento microbiano, que generalmente contribuyen a elevar los costos en los procesos industriales. En el cultivo de microorganismos para pruebas microbiológicas hacen uso de medios nutrientes con elevada cantidad de nitrógeno. El nitrógeno que se encuentra en estos medios está por lo general en forma de proteínas y aminoácidos. La presencia de estos compuestos nitrogenados junto con las fuentes de carbono, de vitaminas y otros elementos trazas son necesarios para formar el complejo nutricional capaz de permitir el crecimiento de los microorganismos. Sustancias naturales como la sangre, orina y otros fluidos corporales han sido usados comúnmente como fuente de nitrógeno, pero además las proteínas de la leche, del frijol de soja y extractos de levaduras en combinación con otras sustancias inorgánicas también han demostrado ser factibles para el cultivo de microorganismos (Subosa, *et al.*, 2016).

Las peptonas son digeridos enzimáticos de proteínas animales obtenidos después de una hidrólisis alcalina. En diversos estudios se han concluido en la síntesis de peptonas a partir de varias fuentes de proteínas. Estas fuentes se pueden clasificar en dos categorías; las que su origen es animal y las de origen vegetal. Las de origen animal son en ocasiones encontradas a partir de los residuales de procesos industriales, tales como, la industria procesadora de pescado que genera gran cantidad de residuos en los que se incluyen víscera, cabeza, piel y huesos, en este sentido se puede citar además la industria de procesamiento ganadero donde la sangre, víscera, piel, pelos y cuernos se generan como desechos sin embargo constituyen una valorada fuente de proteínas. Las de origen vegetal incluyen la soja, el arroz, las semillas de algodón, el trigo y los guisantes. Varios estudios, aunque son limitados en comparación con

los estudios realizados en fuentes animales, han demostrado que las peptonas se producen fácilmente por hidrólisis de semillas de girasol y frijoles de soja y frijoles africanos (Subosa, *et al.*, 2016).

Anualmente en el mundo se producen más de 100 millones de toneladas de carne de pollo, esto posiciona a la industria avícola como uno de los sectores de producción agroindustrial más prósperos con un elevado desarrollo anual en países desarrollados y en otros en vías de desarrollo (Aguilar, 2017). Las plumas al representar el 10 % del peso total del ave son consideradas el desecho principal, sin embargo, gracias a su concentración de proteínas se convierte en un material muy valioso para el desarrollo de nuevos productos como las peptonas (USDA, 2013). En diversos estudios se ha cuantificado que las plumas están compuestas al menos por el 90 % de proteína queratina y 2 % de ácidos grasos, por lo que se puede afirmar que esta industria en sus desechos representa una fuente primaria de queratina. Aunque en su estado natural, las plumas son ricas fuentes de proteína, tienen limitaciones y una de ellas es su digestibilidad con valores mínimos y también su bajo valor referido al carácter biológico en correspondencia a la deficiencia de la cantidad de aminoácidos esenciales. (Aguilar, 2017).

Con el propósito de alcanzar la calidad nutricional de las plumas se han realizados tratamientos convencionales basados en la degradación de estas a partir de métodos fisicoquímicos, que representan tecnologías de bajo costo según las técnicas y reactivos utilizados. Aún así, las plumas degradadas obtenidas de esta manera tienen una calidad nutricional limitada, pues en estos procesos ocurren reacciones muy bruscas que provoca la pérdida directa de aminoácidos esenciales, desnaturalización de las proteínas y la formación de otros aminoácidos no nutritivos (Aguilar, 2017). En lo concerniente, a tratamientos no convencionales, se ha demostrado en hallazgos recientes, el potencial microbiano presente en la naturaleza, capaz de degradar sustratos tales como, queratina, quitina, elastina, y el colágeno (Fakhfakh, *et al.*, 2011).

La biotecnología resulta una posibilidad útil para mejorar la calidad nutricional de las plumas, con los consecuentes beneficios que trae consigo la remoción de este

tipo de residuos a nivel ambiental. Estos procesos biotecnológicos en los que se emplean microorganismos con actividad queratinolítica, son muy factibles en la obtención de hidrolizados proteicos (Aguilar, 2017).

En nuestro país existen gran producción de residuos sólidos y líquidos en los mataderos que se vierten sin tratamiento. Es la industria avícola, la actividad pecuaria que más se ha incrementado en los últimos años, a pesar de las afectaciones provocadas por el bloqueo económico, financiero y comercial del gobierno de los Estados Unidos, que ha imposibilitado el acceso a tecnologías y productos biológicos como medicamentos y vacunas (García, *et al.*, 2009). Esta industria, denominada Combinado Avícola Nacional, genera gran cantidad de residuos, entre ellos las plumas, sobre las que no existe una política para definir su uso posterior, por lo que su acumulación se convierte en un problema ambiental que provoca gran proliferación de vectores. En correspondencia con lo expuesto se formula el siguiente:

Problema científico:

¿Cómo aprovechar las plumas de pollo que son desechadas en la industria avícola?

Para dar solución al problema expuesto se plantea la siguiente **hipótesis:**

Si se someten las plumas de pollos a un proceso de hidrólisis, se podrá obtener peptona utilizable como suplemento nutricional para medio de cultivo, y de esta manera se minimizará el impacto que provoca su vertimiento al medio ambiente.

Objetivo General:

Obtener a través de un proceso de hidrólisis básica peptona a partir de plumas de pollos.

Objetivos Específicos:

1. Realizar la caracterización físico - química de la materia prima.
2. Optimizar los parámetros (concentración de NaOH, temperatura, masa de plumas y tiempo) para el proceso de obtención de peptonas.
3. Determinar la composición físico y química de las peptonas obtenidas.
4. Realizar estudios de calidad a través de enfrentamientos de microorganismos a diferentes concentraciones de peptonas.

Capítulo I: Revisión bibliográfica.

En este capítulo se realiza un estudio bibliográfico relacionado con los principales aspectos presentes en la temática a estudiar y tiene como objetivo desarrollar la fundamentación teórica de la investigación.

1.1. Medios de cultivo y bases nutritivas. Usos e importancia.

El hombre mucho antes de 1876 había aprendido a cultivar los microorganismos y fue en ese mismo año cuando Robert Koch por primera vez cultivó y propagó *Bacillus anthracis*. Los alimentos fermentados a partir de cepas salvajes de microorganismos caracterizaron a muchas civilizaciones antiguas. Esto significa que los medios de cultivos artificiales fueron empleados por el hombre antes que tuviera plena conciencia de que había creado un elemento vital para el desarrollo de la civilización (BioCen, 2001).

Con respecto a identificar a Koch como el padre de los medios de cultivo artificiales es casi unánime el criterio de los microbiólogos, por precisamente ser él quien empleó conscientemente la gelatina y otras proteínas para el cultivo de microorganismos en condiciones artificiales. Más tarde incorporó a sus estudios el empleo en los medios de extractos e infusiones de material de naturaleza proteica (Zhurbenko, *et al.*, 2005).

Koch primero desarrolló los medios líquidos y después incorporó como agente gelificante a la gelatina, así logró una nueva generación de medios solidificados. El empleo del agar como agente solidificante revolucionó la práctica de la preparación de los medios sólidos y los convirtió en los más difundidos hasta el momento (Zhurbenko, *et al.*, 2005).

Naegeli por primera vez utilizó el término peptona para designar al producto obtenido por la hidrólisis enzimática de las proteínas, resultado ya obtenido años antes, específicamente en 1820, por Braconnot. Además, realizó novedosos

estudios sobre la influencia de diferentes aminoácidos, carbohidratos y sales sobre el crecimiento de los microorganismos (Zhurbenko, *et al.*, 2005).

Más de 2 000 medios de cultivo artificiales habían sido creados a principios del presente siglo, y en la actualidad, es prácticamente imposible determinar su cantidad. Además, de manera sistemática se modifican los medios existentes, o se crean nuevos, que permitan mejorar el aislamiento y la diferenciación de los microorganismos, o que posibiliten el crecimiento exuberante durante su cultivo masivo (BioCen, 2001).

El desarrollo de la industria biofarmacéutica y de la biotecnología ha impuesto nuevos conceptos referentes a los requisitos de calidad de los productos, pero también ha abierto nuevas perspectivas en el diseño de los medios de cultivo y de sus componentes (BioCen, 2001).

Según Zhurbenko, (2008), a partir de la generalización de la composición de los medios existentes y de su empleo en diferentes campos, los medios de cultivo podrían ser definidos como el conjunto de elementos o sustancias que garantizan a los microorganismos u otras células, los nutrientes necesarios para su conservación o desarrollo. Estas sustancias o elementos pueden ser de origen orgánico o inorgánico, natural o artificial. Su finalidad es garantizar el crecimiento del organismo o célula, su identificación o diferenciación dentro de un conjunto de ellos, e incluso, limitar el desarrollo de otros.

Los ingredientes de los medios de cultivo son agrupados de acuerdo a su naturaleza y función tal como se muestra en la Figura 1.

El agua es un elemento vital para el desarrollo de los microorganismos. Es el solvente en que son disueltos los ingredientes de los medios porque constituye el vehículo de las células que se liberan como productos de este proceso. Para muchos microorganismos que poseen locomoción propia, el agua constituye el medio idóneo para sus movimientos y nutrición (Corry, *et al.*, 2013; BioCen, 2001).



Figura 1: Los ingredientes de los medios de cultivos agrupados por su naturaleza y función.

Fuente: BioCen, 2001.

Las bases nutritivas son ingredientes fundamentales de muchos medios destinados al cultivo de microorganismos que requieren para su crecimiento de compuestos nitrogenados de naturaleza proteica, tales como péptidos, polipéptidos, aminoácidos y, además aportan vitaminas, carbohidratos y otros elementos nutritivos. Pueden ser definidas como productos hidrosolubles de naturaleza orgánica, obtenidos mediante extracción o hidrólisis del material biológico. Las peptonas y los hidrolizados son productos hidrosolubles que se obtienen de materias primas ricas en proteínas, las primeras mediante hidrólisis enzimáticas y los segundos mediante hidrólisis con agentes de naturaleza química (Zhurbenko, 2008). No existe un criterio unánime en cuanto a la clasificación de las bases nutritivas y casi la totalidad de los casos de las obtenidas por hidrólisis enzimática se les denomina hidrolizado enzimático (de caseína, lactoalbúmina, gelatina, etc.). Estos, por lo general presentan un grado de hidrólisis superior al de las peptonas.

Con el término digerido se denomina en ocasiones, a los productos obtenidos por hidrólisis enzimática en los que el grado de hidrólisis puede ser inferior al de las peptonas, aunque se pueden encontrar bases nutritivas denominadas como digerido enzimático, pancreático, péptico, papaínico que por su composición corresponden, al rango de las peptonas (Zhurbenko, 2008).

Los extractos e infusiones son productos solubles en agua que se obtienen por diferentes métodos mediante extracción en medio acuoso. Ellos aportan al medio sustancias de variada naturaleza, tales como: proteínas y sus fracciones, vitaminas, minerales y otros factores de crecimiento. Los dializados son productos que se obtienen al someter el material a dializar contra agua. De todas las bases nutritivas, son ellos los que poseen el más bajo contenido de sólidos y sustancias nitrogenadas (Zhurbenko, 2008; Corry, *et al.*, 2013).

Los carbohidratos constituyen ingredientes esenciales de muchos medios de cultivo. Dentro de ellos están: los azúcares, que se incluyen en la formulación de los medios, no sólo como fuentes de energía, sino para diferenciar determinadas especies de microorganismos fermentadores; el agar, que juega un importante papel como agente gelificante en los medios sólidos; los almidones, que constituyen una fuente de energía, actúan como coloides protectores de las células microbianas y evitan la acción tóxica de algunos componentes del medio o de los productos tóxicos del metabolismo de los microorganismos (BioCen, 2001; Corry, *et al.*, 2013).

Las sales minerales (orgánicas e inorgánicas), se incorporan a los medios, con fines nutricionales, como agentes amortiguadores de pH y como sustancias inhibitorias del crecimiento de determinados microorganismos, entre otras funciones (BioCen, 2001).

Los indicadores y colorantes juegan un importante papel como componentes inhibitorios de determinados organismos en los medios selectivos y facilitan la identificación o diferenciación de los microorganismos por la coloración adquirida, o por el cambio de la reacción del medio (BioCen, 2001; Corry, *et al.*, 2013).

Las vitaminas, proteínas y aminoácidos son factores de crecimiento que pueden ser incorporados a los medios, tanto desde su fabricación como en calidad de suplementos (BioCen, 2001; Corry, *et al.*, 2013).

En muchos medios de cultivo están presentes los antibióticos que son sustancias sintéticas o naturales, orgánicas o inorgánicas, de composición definida o no, que cumplen diferentes funciones (BioCen, 2001).

1.2. Origen de las peptonas.

Las peptonas son mezclas de aminoácidos (moléculas y compuestos químicos que provienen de las proteínas) y de polipéptidos (una cadena de aminoácidos ligados por péptidos). Proviene de la acción de una enzima proteolítica (es decir, que es capaz de deshacer las proteínas) sobre una sustancia que contiene numerosas proteínas como las carnes, los pescados, la sangre y la fibrina (proteína derivada del fibrinógeno que interviene en el fenómeno de la coagulación) (Pillou, 2014; Taskin and Kurbanoglu, 2011; Subosa, *et al.*, 2016).

Según Murillo, (2017), las peptonas son el producto de la degradación o desintegración de la molécula proteica obtenida como resultado de la hidrólisis enzimática, muy parecida a la hidrólisis digestiva, a partir de proteínas vegetales y animales, y los efectos que producen en el paciente son completamente naturales. Además, constituyen la principal fuente de nitrógeno en el medio orgánico para el cultivo de bacterias y contienen aminoácidos libres y cadenas cortas de péptidos, ciertas vitaminas y a veces carbohidratos.

Isaza, (2006), las define como proteínas hidrolizadas que obtienen de la digestión parcial de carne, caseína, soya, gelatina, queratina, semillas de cacahuete, harina de soja, semillas de algodón, semillas de girasol y otras fuentes proteicas. Estas sirven como fuentes de carbono, energía y nitrógeno, importantes para la fabricación de material celular y contienen una mezcla de aminoácidos libres, péptidos y proteosomas que se mantienen en la solución después de calentarlas a 100 °C.

Según la autora de esta tesis, las peptonas son una mezcla de aminoácidos y de polipéptidos, formada durante la degradación enzimática y la transformación de proteínas. Son la principal fuente de nitrógeno en el medio orgánico, para el cultivo de bacterias y, además, el producto de la desintegración o degradación de la molécula proteica obtenida como resultado de la hidrólisis enzimática a partir de proteínas vegetales y animales.

Estudios realizados por Isaza, (2006), demuestran que las proteínas empleadas en la producción de peptonas son de dos tipos: proteínas animales (caseína, gelatina, carne) y proteínas vegetales (soya semillas de cacahuete, semillas de algodón, semillas de girasol). Las peptonas se obtienen a través de varios tipos de procesos de digestión como ácido, alcalino y enzimático. La hidrólisis rompe todas las proteínas y péptidos y produce sólo aminoácidos libres; al tiempo que destruye algunos importantes como triptófano. Las peptonas pueden ser usadas por las bacterias como fuente de energía que permite la producción de proteínas de H₂S (sulfuro de hidrógeno), indol, aminos, etc. La preparación de medios de cultivo exige la utilización de peptonas con características adecuadas. Por ejemplo, en la prueba de indol se debe emplear una peptona rica en triptonal (peptona de caseína). Es importante recordar que aparte de los aminoácidos presentes las peptonas contienen otros constituyentes que pueden estimular el crecimiento de ácidos nucleicos, minerales, vitaminas y ocasionalmente carbohidratos como es el caso de la peptona de soya.

En los últimos años las peptonas han sido usadas como suplemento nutricional en varios medios de cultivo celular. Ellas son más versátiles y menos costosas que los productos a base de sueros y han demostrado un buen desempeño. Algunas favorecen una mejor producción de anticuerpos debido a su propiedad antiapoptótica. Su alta variedad y disponibilidad puede ayudar a conocer los requerimientos nutricionales de las células, lo cual genera la posibilidad de mejorar cada paso de los procesos fermentativos (Isaza, 2006).

Peptonas animales

Las peptonas animales contienen ingredientes esenciales y a menudo insustituibles en muchas formulaciones de medios de diagnóstico y de fermentación. Son extremadamente ricas y se componen de aminoácidos y péptidos únicos que estimulan el crecimiento bacteriano. La gama bovina se completa con un gran número de referencias de origen porcino, así como un producto de origen aviar producido exclusivamente por SOLABIA Biotech.

Peptonas vegetales:

Las peptonas vegetales se producen con especial atención a su valor nutritivo intrínseco, así como a las características físico-químicas que permiten muchas y diversas aplicaciones en el diagnóstico, en la fermentación o en el cultivo celular. Tanto si se usan de forma individual como mezcladas con otros hidrolizados de origen no animal suponen un reemplazo ventajoso de los sustratos de origen animal (CA_Diptico-Peptonas).

1.3. Peptonas de uso convencional.

-Peptona de carne: es un hidrolizado enzimático animal de origen porcino que incluye una mezcla de aminoácidos libres y péptidos. Es recomendada como nutriente para medios de cultivo y fermentaciones industriales. En las formulaciones para medios de cultivo puede ser reemplazadas por peptonas de carne bovina. Este producto posee un 3.7 % de nitrógeno amínico (NA) y un 13.08 % de nitrógeno total (NT) (Zhurbenko, *et al.*, 2005).

-Peptona de corazón de vaca: el corazón de vaca es un subproducto de la industria cárnica y su valor nutritivo es menor que el de la carne. La presencia de grasa, tejido conectivo y vascular lo hacen menos atractivo para la producción de peptona y resulta un desafío tecnológico obtener un producto de alta calidad que promueva el crecimiento microbiano de manera similar a la peptona de carne de vaca, usualmente conocida como peptona bacteriológica (Zhurbenko, *et al.*, 2005).

-Peptona de caseína: se utiliza en diversas aplicaciones, sobre todo en el diagnóstico de bacterias y en la fermentación agroalimentaria, cosmética y farmacéutica para la producción de biomasa. Como materia prima estable y estandarizada, las peptonas de caseína son una fuente fiable y consistente de nitrógeno para los medios de cultivo (CA_Diptico-Peptonas). El hidrolizado de proteína "GE" es un digerido pancreático de caseína, adecuado para el cultivo de diferentes grupos de bacterias. El tratamiento enzimático produce mínimo daño a los aminoácidos de la caseína como el triptófano, lo que hace adecuado su uso para el cultivo de microorganismos exigentes (Peptona de caseína GE-Probiotek).

-Peptona de soya: es una especie enzimática hidrolizada de proteína de soya que da propiedades promotoras de crecimiento comparables. Es una excelente fuente de vitaminas y nitrógeno de alta calidad ampliamente utilizado en medios de cultivo, para el cultivo y otros fines. Es un hidrolizado enzimático, altamente soluble de harina de soja que apoya el crecimiento de una amplia gama de microorganismos. Es una peptona de costo, efectiva para el uso en muchos medios de fermentación. Se ha utilizado con éxito para la producción de vacunas y bio-activos farmacéuticos con *E. coli* y sistemas basados en levadura.

Se utiliza en medios de cultivo para una amplia variedad de microorganismos que incluyen bacterias y hongos. Es una excelente fuente de vitaminas y carbohidratos. Se recomienda su uso en los medios de cultivo y fermentación del tejido microbiológico, así como para la producción comercial de vacunas, antibióticos, enzimas y otros productos. Esta peptona posee un 12 % de nitrógeno total y un 4.0 % de nitrógeno amoniacal (Carabalí, 2015; Suttiniyom, 2015; Yato, 2015; Eaksuree, *et al.*, 2016).

Posibles fuentes alternativas:

-peptonas de pescado: se producen a partir de la hidrólisis enzimática de los subproductos del relleno de la carpa plateada por alcalasa y tripsina. El desecho de esta puede ser una fuente eficiente de producción de peptona de pescado

para la obtención de nitrógeno para el medio de *S. aureus*. Sin embargo, el tipo de enzima proteolítica utilizada afecta considerablemente el rendimiento de la peptona resultante a pesar del grado de hidrólisis (DH). La peptona de pescado producida por la alcalasa se desempeñó de manera significativa como medio para las bacterias, mientras que el rendimiento de la peptona de tripsina no fue tan bueno como el medio comercial (Fallah and Javadian., 2015; Husin, *et al.*, 2015).

- peptona de cuerno de carnero: El hidrolizado de proteína de cuerno de carnero se ha investigado solo en menor medida; y su uso en procesos industriales es limitado. Los cuernos de carnero consisten en α -queratina, que es relativamente rica en cisteína (hasta 22 %). Además, contienen la mayoría de los otros aminoácidos comunes. Se han realizado experimentos con hidrolizado de proteína de cuerno de carnero, para estudiar su influencia en el rendimiento de cultivo del hongo *Agaricus bisporus*, para la producción de ácido cítrico y para mejorar la producción de glicerol (Kurbanoglu and Kurbanoglu, 2004).

-peptona de plumas de pollo: La queratina es una proteína que se encuentra en las plumas de pollo, pavo, cabello y otras fuentes. Una fuente principal de queratina se encuentra en las plumas de pollos y pavos. El contenido de aminoácidos de estos materiales es lo suficientemente alto como para desarrollar métodos para hidrolizar la queratina en peptonas digeribles u otras.

Chenault y Mulidhara, (2007), plantearon un proceso para la producción de peptona a partir de plumas de pavo. Varios de sus estudios han demostrado la viabilidad de peptonas de plumas de pollo como sustrato de crecimiento para bacterias y hongos. Según Sisman, *et al.*, (2011), se usaron plumas de pollo para preparar peptonas mediante hidrólisis ácida en la producción de carotenoides. Un estudio realizado por Ozkan, *et al.*, (2012), concluyó la efectividad de las peptonas de plumas de pollo para respaldar la producción de exopolisacáridos a partir de la seta *Morchella esculenta*. Si bien estos estudios han demostrado que la producción de peptona a partir de plumas de pollo es viable, no se han dado recomendaciones claras para su producción en masa a escala superior (Subosa,

et al., 2016).

1.3.1. Caracterización de las plumas de pollo.

Las plumas son excreciones córneas de la piel de las aves, de estructura similar a las escamas de los peces y reptiles que cumplen la función de protección frente al agua y el frío. Si bien están localizadas extracelularmente, se producen en el interior de las células epidérmicas de la piel, como ocurre también con los pelos, uñas, cuernos o pezuñas (Lehninger, *et al.*, 1995).

Las plumas son unas de las estructuras constituidas por queratina más complejas de los vertebrados. Ellas presentan numerosas funciones de vital importancia para la vida y desarrollo de las aves; constituyen una barrera que las protege del ambiente externo, contribuyen a regular su temperatura corporal y son fundamentales en el vuelo aviar, presentan otras funciones como son la exhibición, camuflaje e identificación (Schrooyen, *et al.*, 2007). La estructura de una pluma común consta de 4 partes principales (Figura 2); el cálamo o cañón es la parte más gruesa y rígida que se inserta en la epidermis del ave (3), la parte central conocida como raquis (4), que le sirve de eje y otorga la rigidez estructural necesaria para mantenerla firme y las barbas (2) que son láminas delgadas en posición perpendicular al raquis, en su conjunto forman el estandarte (1), además su estructura es ramificada. Estas constituyen cerca del 10 % del total del peso de un pollo y son el principal subproducto de la industria avícola. Su composición es aproximadamente 91 % proteína, 1 % lípidos y 8 % agua, el porcentaje de proteína corresponde a la α -queratina. Comúnmente se descartan como desperdicio convirtiéndose en un problema ambiental por su difícil disposición y el desconocimiento de procesos de manufactura para procesarlas (Carabalí, 2015).

En su estado natural las plumas no son digestibles debido a que no son solubles en proteasas como la pepsina y tripsina. Esta característica hace que, para utilizarlas, sea necesario transformarlas en compuestos que puedan ser digeridos; el proceso utilizado se conoce como hidrólisis (Han, *et al.*, 2012).

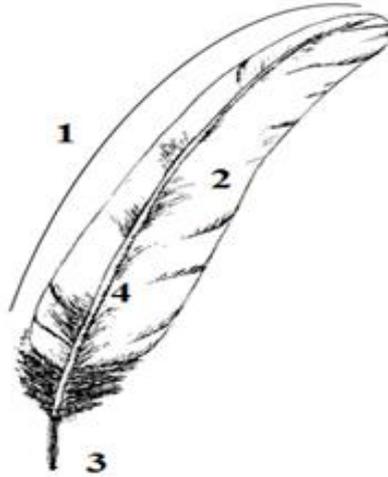


Figura 2: Estructura de una pluma común:1 Estandarte,2 Barbas,3 Cálamo, 4 Raquis.

Fuente: Elaboración propia

1.4. Métodos de obtención de peptonas.

Una peptona es el producto de la hidrólisis enzimática o química parcial de una o varias proteínas de origen animal o vegetal. La composición de una peptona es siempre compleja, porque durante la hidrólisis se generan aminoácidos libres, péptidos de bajo, mediano y alto peso molecular cuando se usan proteínas puras. Pero son altamente complejas cuando se usan tejidos, órganos o glándulas animales, porque no solo habrá péptidos y aminoácidos libres, sino parte o todo el volumen de componentes que son propios de la célula del tejido al que pertenecen.

✓ Hidrólisis ácida

Para llevar a cabo este proceso las plumas se someten a ebullición con soluciones de ácidos fuertes. El ácido más empleado para romper puentes disulfuro es el ácido perfórmico. Este tratamiento tarda de 2 a 3 h en romper los puentes disulfuro y generar polipéptidos solubles en agua. Este tratamiento tiene

como inconveniente la producción de residuos de ácido cisteico, además ser demasiado drástico y, por tanto, destruir aminoácidos (Álvarez, 2018).

Aunque la hidrólisis ácida también se ha utilizado en algunos estudios para obtener hidrolizados de proteínas, se argumenta que podría resultar en la destrucción de aminoácidos esenciales, como la metionina, la cistina, la cisteína y el triptófano y conversión de glutamina y aspargina a ácido glutámico y aspártico, respectivamente. Se indica que, durante la hidrólisis ácida, las sales en los hidrolizados pueden ser perjudiciales para el crecimiento de los microorganismos (Akpor, *et al.*, 2019).

La hidrólisis ácida se emplea en la obtención de un número reducido de bases nutritivas, en las que generalmente se utilizan sustratos tales como caseína, carne, soya, gelatina y otras materias primas ricas en proteínas de origen animal, como tarros, pezuñas y pelos, así como proteínas de origen vegetal, como la harina de soya y de coco. Se emplean como agentes hidrolizantes ácidos minerales, tales como el clorhídrico, sulfúrico y fosfórico. La hidrólisis transcurre a temperaturas de 100 a 130°C y presión de 1 a 4 atmósferas en un tiempo de 4 a 45 h. Estas condiciones de presión y temperatura aumentan considerablemente el DH y, por ende, se obtiene un elevado contenido de aminoácidos libres. Debido a las condiciones severas en que transcurre este proceso, se produce la destrucción oxidativa del triptófano, la pérdida de aminoácidos sulfurados: cisteína y metionina, y la disminución del contenido de serina, treonina y tirosina, lo que puede provocar la racemización de algunos aminoácidos tales como la L-cistina (Zhurbenko, *et al.*, 2005).

✓ **Hidrólisis alcalina**

A partir de las investigaciones realizadas por Zhurbenko, (2008) se llegó a la conclusión de que la hidrólisis alcalina podía producir un alto rendimiento de queratina y también aumentar la efectividad de la extracción de la misma. Además, Coello, *et al.*, (2003), realizó un estudio sobre la hidrólisis alcalina donde

demonstró su eficacia en la degradación de los desechos que contienen queratina y colágeno. También se opina que el uso de hidrólisis alcalina inactiva patógenos y priones como la encefalopatía espongiforme transmisible y la encefalopatía espongiforme bovina (Akpor, *et al.*, 2019).

A pesar de que en la mayoría de los procesos de hidrólisis química para mejorar el rendimiento se emplea el calor, en estudios realizados por Sinkiewicz, *et al.*, (2017) sobre esta hidrólisis para producir una alternativa a la peptona más económica a partir del hidrolizado de proteínas de plumas de pollo (CFPH) y la harina de sangre (BM) se llevó a cabo a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 h. Se dice que la hidrólisis química llevada a cabo a altas temperaturas conduce a la destrucción de los aminoácidos.

La hidrólisis alcalina se realiza con el empleo, en calidad de agentes hidrolizantes, de los hidróxidos de sodio, calcio y amonio. Entre los sustratos más comunes se encuentran cuernos, pezuñas y pelos, pero también se ha ensayado en proteínas lácteas y en colágeno (con la utilización del hidróxido de calcio). La hidrólisis que transcurre a temperaturas superiores a los 80-100 °C y presiones de 1 a 4 atmósferas conlleva a la destrucción parcial de aminoácidos tales como arginina y tirosina, entre otros, y a la racemización de asparagina, fenilalanina, glutamina y valina y de serina, treonina y fenilalanina, y de serina, treonina y cisteína. Este tipo de hidrólisis no se emplea, en la obtención de bases nutritivas (Zhurbenko, *et al.*, 2005).

A diferencia de la hidrólisis ácida, en esta no se corre un riesgo tan alto de destruir aminoácidos, a menos que el pH del medio sea extremadamente básico. Es recomendable que la hidrólisis se realice a pH entre 8 y 12 (Gupta, *et al.*, 2012).

✓ **Hidrólisis con líquidos iónicos**

La queratina se puede extraer de las plumas con el uso de 1-hidroxietil-3-metilimidazolio di (trifluorometanosulfonil) amida ([HOEMIm][NTf2]); la queratina que se hidroliza es soluble en agua, mientras que el líquido iónico es inmisible.

El rendimiento que se alcanza es 21 % a las condiciones de operación 1:1 peso plumas a NaHSO₃ (ac) y 1:40 plumas a líquido iónico a 80 °C durante 4 h. Los resultados muestran que [HOEMIm] [NTf₂] es eficiente como catalizador y solvente de plumas; además se recupera el 95 % de [HOEMIm][NTf₂] por ser hidrófobo (Wang y Cao, 2012).

✓ **Hidrólisis por cocción con vapor**

La hidrólisis por cocción con vapor es el método tradicional, las plumas son cocidas en hornos calentados por vapor que pasa entre las paredes de estos. Este método requiere el control de ciertos parámetros como temperatura, duración de la cocción y presión, ya que su variación influye sobre el valor nutricional del producto final. La principal desventaja de esta tecnología es el daño sustancial y selectivo a nivel de los aminoácidos, lo que disminuye en gran medida la disponibilidad de algunos de ellos como es el caso de la cisteína y traen como consecuencia una digestibilidad baja y variable (Carabalí, 2015).

✓ **Por hidrólisis microbiana**

La utilización de microorganismos en la obtención de hidrolizados de plumas es evidentemente factible tras la actividad queratinolítica de los mismos (Tiwarý, 2012). Debido a la acción de las enzimas excretadas por el microorganismo la estructura de la queratina se modifica, pues la harina de pluma obtenida posee gran valor proteico resultado de la biomasa microbiana, además del gran aporte de aminoácidos. 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 (Vidal, *et al.*, 2000).

La mayoría de las cepas productoras de queratinasas han sido aisladas de los residuos de gallineros mediante el uso de un medio nutriente enriquecido y son capaces de degradar las plumas en un intervalo de temperaturas de 30 – 60 °C (Werlang y Brandelli, 2005).

La cepa *Bacillus licheniformis* NH1 produce α -amilasa y proteasas alcalinas al degradar las plumas cuando estas se fermentan durante 48 h a 37 °C. Se alcanza una degradación total con la adición de 1 g/L del extracto de la bacteria a 7,5 g de plumas debido a la biosíntesis de enzimas a partir de los residuos de las plumas hidrolizadas. Este proceso no solo hidroliza las plumas, sino que, además, produce otras especies químicas con aplicaciones farmacéuticas (Hmidet, 2010). Coello, *et al.*, (2003), reportó la capacidad de *Kocuria rosea* de degradar plumas en fermentaciones sumergidas; se obtuvo un producto rico en proteína, equivalente en cuanto a digestibilidad proteica a la harina comercial obtenida mediante el tratamiento térmico tradicional y cuyo aporte energético alcanza 2220,6 Kcal/kg. Adicionalmente, la biomasa bacteriana, incorporada al producto final, permite el enriquecimiento de esta harina en aminoácidos esenciales cuya disponibilidad es mayor que en la harina de plumas comercial. En su conjunto, los resultados obtenidos sugieren que la harina de plumas fermentadas por *Kocuria rosea* puede ser una fuente de proteína alternativa para la alimentación de las aves.

✓ **Por hidrólisis enzimática**

La hidrólisis enzimática permite recuperar cantidades significativas de aminoácidos, péptidos y polipéptidos del material original. Las condiciones suaves en que transcurre permiten eliminar o atenuar algunos de los inconvenientes que presentan la hidrólisis ácida y la alcalina y los productos obtenidos alcanzan un alto grado de asimilación por los microorganismos (Zhurbenko, 2008).

La hidrólisis enzimática se ha utilizado principalmente para convertir estos desechos animales en hidrolizados con un alto DH y rendimiento. El DH es un término usado para describir la extensión de la escisión enzimática peptídica de un sustrato proteico y se calcula como la relación porcentual entre el número de enlaces peptídicos escindidos y el número total de enlaces peptídicos en el sustrato. Factores como el tiempo de hidrólisis, el pH del medio de reacción, la

temperatura, la concentración de la enzima y la naturaleza del sustrato han demostrado afectar la extensión de la hidrólisis enzimática y existen diferentes combinaciones de los valores de estos factores en la literatura que dan el DH óptimo para diferentes hidrolizados. La mayoría de las investigaciones sobre la utilización de subproductos animales como fuentes de hidrolizados se han centrado en los subproductos de procesamiento de los peces y esto podría deberse a la facilidad de aislamiento e hidrólisis de las proteínas de los peces (Lasekan, *et al.*, 2013).

Conclusiones parciales del capítulo:

1. Las plumas son un subproducto de la industria avícola disponible en grandes cantidades y a bajo costo.
2. constituyen una materia prima rica en proteínas y con potencialidades favorables para la obtención de hidrolizados proteicos.
3. Pueden ser utilizadas en diversas producciones industriales debido a sus características químicas y su elevado contenido de nitrógeno.

Capítulo 2: Materiales y Métodos.

En este capítulo se describen detalladamente los pasos a seguir en las metodologías utilizadas para el desarrollo de la investigación.

2.1. Caracterización de la materia prima.

La materia prima, plumas de pollo, fue obtenida en el Matadero de Aves “XI Festival”, ubicada en el km 185 de la Carretera Central, municipio Colón, provincia de Matanzas. La muestra fue lavada con agua, para eliminar la suciedad, las impurezas y otras materias extrañas presentes. Para eliminar la humedad residual del lavado fueron secadas al aire durante una semana, y posteriormente en la estufa en el transcurso de 24 h a una temperatura de 60 °C. Para facilitar la reducción de tamaño, las plumas fueron cortadas con tijera. Después, el material seco fue triturado en un molino de bolas (mLW, tipo KM 1), se preservó en bolsas de polietileno y se almacenó en un lugar seco y fresco para evitar cualquier contaminación.

2.2. Caracterización físico-química de la muestra.

Para la caracterización físico-química de la muestra se determinó el % de humedad, de cenizas y de proteína cruda.

2.2.1. Determinación del % de humedad.

Se utilizó para la determinación de la humedad el procedimiento planteado en *Official Methods of Analysis of AOAC International* (Horwitz, 2003). Este método se basa en el análisis gravimétrico por volatilización indirecta.

Materiales utilizados

- ✓ Cisoles de porcelana, 50 mL.

- ✓ Estufa-incubadora digital con control térmico AISETYLD-6000, Alemania.
- ✓ Balanza analítica digital Sartorius BS124S, máx.120 g, con una precisión de 0,1 mg, China.
- ✓ Desecadora.

Expresiones para el cálculo

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Masa de agua}}{\text{Masa inicial}} * 100$$

Ec 2.1

$$\text{Masa seca} = \frac{\text{Humedad}}{100 - \%}$$

Ec 2.2

Procedimiento

Se pesa una fracción de 1 g de la muestra, se coloca en la estufa a 105 °C, hasta obtener peso constante (dos pesadas consecutivas deben diferenciarse en no más de 0,2 mg).

2.2.2. Determinación del % de cenizas.

Se incineró con calentamiento progresivo hasta 550 °C en el horno mufla 1 g de muestra seca hasta la obtención de cenizas grisáceas, aproximadamente durante 3 h. Luego de este tiempo cada muestra se trasladó al desecador y moderó para pesarla (Thiex, 2012).

Materiales utilizados

- ✓ Crisoles de porcelana, 50 mL.
- ✓ Horno mufla analógico con control térmico AISETYLD-6000, Alemania.
- ✓ Balanza analítica digital Sartorius BS124S, máx.120 g, con una precisión de 0.1 mg, China.
- ✓ Desecadora.

Expresiones de cálculo

%

Ec 2.3

$$\text{de Ceniza} = \frac{\text{Masa de Ceniza}}{\text{Masa inicial}} * 100$$

Masa de Cenizas = Masa inicial – Masa final

Ec 2.4

2.2.3. Metodología para determinar el % proteína cruda.

La determinación del contenido de proteínas fue realizada a partir del método *Kjeldahl* según la NC ISO 20483, (2009). Este método se basa en la destrucción de la materia orgánica con ácido sulfúrico concentrado, y se forma sulfato de amonio, que en exceso de hidróxido de sodio, libera amoníaco, el cual se destila y se recibe en ácido bórico que forma borato de amonio, para finalmente valorar con ácido clorhídrico.

Se cuantifica el contenido de nitrógeno presente en la muestra, posteriormente el valor se afecta por un factor en función de la naturaleza de la muestra tomada.

Materiales utilizados

- ✓ Balanza analítica digital *Sartorius* BS 124 S, máx. 120 g, con una precisión de 0.1 mg, China.
- ✓ Equipo *Kjeldahl*.
- ✓ Manto calefactor.
- ✓ Material usual de laboratorio.

Reactivos

- ✓ Ácido sulfúrico concentrado, p.a.
- ✓ Sulfato de potasio o sulfato de sodio, p.a.
- ✓ Sulfato cúprico, p.a.
- ✓ Solución de hidróxido de sodio al 15 % (se disolvió 150 g de hidróxido

de sodio y se completó hasta 1 L).

- ✓ Solución de ácido sulfúrico 0,1 N (se tomó 2,7 mL de ácido sulfúrico concentrado y se completó a 1 L, luego se estandarizó con carbonato de sodio anhidro), p.a.
- ✓ Solución de hidróxido de sodio al 30 % (se disolvió 300 g de hidróxido de sodio y se completó hasta 1 L).
- ✓ Solución indicadora de rojo de metilo al 1 % en etanol. (Se disolvió 1 g de rojo de metilo en 100 mL de etanol (95 %)).
- ✓ Solución de hidróxido de sodio 0,1 N. Se tomó 4 g de hidróxido de sodio y se enrasó a 1 L con agua recientemente hervida y enfriada. (Se valoró con ácido succínico).
- ✓ Ácido bórico al 3 %. (Se disolvió 30 g de ácido y se completó 1 L).
- ✓ Indicador de Tashiro: rojo de metilo al 0,1 % y azul de metileno al 0,1 % en relación de 2:1, en alcohol etílico.
- ✓ Solución de ácido clorhídrico de 0,1 N. (Se toma 8,3 mL de ácido clorhídrico concentrado y se enrasa a 1 L). (Se valora con carbonato de sodio anhidro).

Procedimiento

1. Se realiza la muestra por duplicado.
2. Se efectúa un ensayo en blanco con una sustancia orgánica sin nitrógeno (sacarosa) que sea capaz de provocar la reducción de los derivados nítricos y nitrosos eventualmente presentes en los reactivos.
3. Se pesa 1.000 g de muestra homogeneizada en un matraz de digestión *Kjeldahl*.
4. Se agrega 3 perlas de vidrio, 10 g de sulfato de potasio o sulfato de sodio (0,5 g de sulfato cúprico y 20 mL de ácido sulfúrico concentrado).
5. Se conecta el matraz a la trampa de absorción que contiene 250 mL de hidróxido de sodio al 15 %. El disco poroso produjo la división de los humos en finas burbujas con el fin de facilitar la absorción y que tenga una duración prolongada, limpiándolo antes de usarlo. Los depósitos de sulfito sódico se eliminan con ácido clorhídrico.

6. Cuando la solución de hidróxido de sodio al 15 % adicionada de fenolftaleína contenida en la trampa de absorción permanece incolora debe ser cambiada (aproximadamente cada 3 análisis).
7. Se calienta en manta calefactora, hasta cambio de color y permanece en ebullición de 15 a 20 min más.
8. Se enfría y agrega 200 mL de agua.
9. Se conecta el matraz al aparato de destilación y se agrega lentamente 100 mL de hidróxido de sodio al 30 % por el embudo.
10. Se destila no menos de 150 mL en un matraz que llevo sumergido el extremo del refrigerante o tubo colector en 50 mL de ácido bórico al 3 %. Valorar con ácido clorhídrico al 0,1 N hasta cambio de coloración (anexo1) en presencia del indicador de Tashiro hasta pH 4,6.

Expresiones de cálculo

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{14 \cdot N \cdot V \cdot 100}{m \cdot 100} \quad \text{Ec 2.5}$$

$$\% \text{ Proteína} = \frac{14 \cdot N \cdot V \cdot 100 \cdot \text{Factor}}{m \cdot 100} \quad \text{Ec 2.6}$$

Donde:

V: gasto de ácido clorhídrico.

N: normalidad del HCl (0,1).

m: masa de la muestra (g).

Factor: 6,25 (para compuestos ricos en proteínas).

2.3. Diseño experimental para la hidrólisis química.

Para realizar la hidrólisis química se utilizan los valores óptimos de parámetros como: temperatura, masa de plumas, concentración de hidróxido de sodio y tiempo con el objetivo de obtener una peptona a partir de plumas de pollos.

Para ello a través del programa *Statgraphics plus 5*, se creó un diseño *Box-Behnken* que estudia los efectos de 4 factores en 27 corridas. Este se ejecuta en un bloque y el orden de los experimentos ha sido completamente al azar. De esta forma se proporciona protección contra los efectos de las variables y los valores escogidos se muestran en la tabla 2.1. (ver Anexo 2).

Tabla 2.1. Valores máximos y mínimos de los cuatro parámetros utilizados en la prueba de *Box-Behnken* durante la selección de los parámetros óptimos del proceso.

Factores	Mínimos	Máximos	Unidad
Concent. NaOH	1,0	2,0	N
Temperatura	30,0	60,0	°C
Masa de plumas	0,5	1,5	G
Tiempo	6,0	12	H

Fuente: Elaboración propia.

2.4. Desarrollo de la hidrólisis básica para la obtención de peptona a partir de plumas de pollo.

Para la realización de la hidrólisis básica según las combinaciones de los diferentes factores arrojados en el diseño de experimentos explicados en el epígrafe anterior, se procede de la siguiente manera.

Cuando la materia prima estuvo lista, se mezcló bien con la solución de hidróxido de sodio antes de someterlas a calor. La hidrólisis se realizó durante un tiempo determinado y a una temperatura según el diseño y se agitó de forma constante con la ayuda de un agitador magnético o manualmente con varillas de vidrio. Luego, se neutraliza mediante la adición gota a gota de HCl(ac) al 0,1 N y las mezclas digeridas se conservan a 4 °C para su posterior uso. Seguidamente se pasa a una etapa de filtración donde se utiliza un filtro de vacío cubierto con papel de filtro *Whatman* 40 con un tamaño de poro de 0,2 µm. Las mezclas

neutralizadas se transfirieron a tubos cubiertos de 15 mL y se centrifugaron a 1500rpm durante 30 min para eliminar los sólidos y los precipitados.

Materiales utilizados

- ✓ Erlenmeyer
- ✓ Pipeta
- ✓ Probeta
- ✓ Beaker
- ✓ Cucharillas
- ✓ Estufa
- ✓ Zaranda orbital
- ✓ Campana
- ✓ Balanza analítica
- ✓ Balanza técnica
- ✓ Centrifuga
- ✓ Filtros a vacío

Reactivos

- ✓ Hidróxido de sodio ($\text{NaOH}_{(\text{ac})}$).

2.4.1. Caracterización y análisis.

Los parámetros comunes utilizados para caracterizar los hidrolizados de proteínas incluyen: contenido de cenizas, humedad y contenido de nitrógeno. La elección del método y el equipo dependen principalmente de la disponibilidad y el costo.

2.4.2. Determinación del % de humedad.

Para el cálculo de la humedad se aplicó la metodología planteada en el epígrafe 2.2.1.

2.4.3. Determinación del % de cenizas.

Para el cálculo de cenizas se aplicó la metodología planteada en el epígrafe

2.2.2.

2.4.4. Determinación del contenido de nitrógeno.

Esta determinación de nitrógeno se realiza por la metodología planteada en el epígrafe 2.2.3 pero sin multiplicar el resultado por el factor de conversión.

2.5. Evaluación de la peptona de plumas de pollos y la peptona bacteriológica comercial mediante el crecimiento microbiano.

Para determinar la calidad de la peptona de plumas de pollos (PP), se utilizaron seis alternativas, se variaron las cantidades de peptonas y se combinaron con peptonas comerciales estandarizadas en los medios de cultivos. Los medios empleados fueron caldo nutriente que es un medio general para el cultivo de microorganismos poco exigentes.

Las bacterias que se utilizaron en este medio son *Bacillus sp.* P33 cepa asentada en la base genética del *GenBank* con el código KC513770 perteneciente al banco de cepas del Centro Biotecnológico (CeBio) de la Universidad de Matanzas (Fernández, *et al.*, 2013), *Escherichia coli* y *Pseudomonas aureginosa* son aislamientos patológicos donados por el Centro Provincial de Higiene y Epidemiología (CPHE).

En el caso de la levadura *Sccharomyces cerviseae* se utilizó caldo extracto de malta que es un medio para el cultivo de mohos y levaduras.

Los medios de cultivos se prepararon a partir de sus ingredientes que se describen para cada medio y el pH final ajustado de la mezcla.

Ingredientes para el medio de cultivo Caldo Nutriente:

Fórmula g/L

Peptona bacteriológica 5.0.

Extracto nutritivo 1.0.

Extracto de levadura 2.0.

Cloruro de sodio 5.0.

pH ajustar a 7.4 ± 0.2 .

Ingredientes para el medio de cultivo Caldo Extracto de Malta:

Fórmula g/L

Extracto de malta 17.0.

Peptona micológica 3.0.

pH ajustar a 5.4 ± 0.2 .

Posteriormente se transfiere 5 mL de cultivo previo del microorganismo a estudiar para erlenmeyer de 250 mL con 145 mL de medio de cultivo estéril y se incuba a 35°C por 24 h con una velocidad de agitación de 200 rpm.

Para determinar el grado crecimiento de todos los microorganismos probados se usó la metodología del peso seco (Ps) en la cual se plantea que se toma asépticamente muestras de 5 mL, cada dos horas hasta llegar hasta las 24 h. Estas se colocaron en tubos falcon previamente pesados y se centrifugaron a 5000 rpm por 10 min, para separar la biomasa del sobrenadante. La biomasa obtenida se lava y se resuspende en 10 mL de solución salina estéril para luego ser centrifugada nuevamente. Este procedimiento se realiza 2 veces y luego de eliminar los restos de agua, la muestra se seca en estufa a 105 °C hasta peso constante. La cantidad de biomasa para ese tiempo se determina por gravimetría, o sea, por diferencia de peso (Fajardo, 2016).

Materiales utilizados

- ✓ Balanza Analítica: *Sartorius* BS124S.
- ✓ Centrífuga: *Heal Force. Neofuge* 15R de fabricación china.
- ✓ Estufa: DHG-914GA Model. Electro-thermal; constant-temperature air

blowing dry box.

- ✓ Papel de filtro *Whatman 40*.
- ✓ Solución salina estéril.
- ✓ Tubo falcon de 10 mL.

2.6. Prueba ANOVA.

Se realizó un estudio de varianza simple y una prueba de rango múltiples para determinar si existen diferencias significativas entre las medias del valor de la biomasa para cada microorganismo y sus tratamientos.

2.7. Análisis del beneficio bruto de la peptona obtenida.

No es posible escalar las condiciones de laboratorio a nivel industrial, y de esta manera se hace imposible determinar los costos de producción, se determina a priori el costo del beneficio bruto (BB), que no es más que el valor aproximado de la sintetización de las plumas de pollo, y se tiene en cuenta solamente el gasto de reactivos y agua; además de analizar un posible precio de venta del producto terminado (Turton, 1998).

Para la realización de este análisis se calcula el gasto y precio de reactivos que consume la fabricación del material obtenido, y se adiciona el consumo de agua; todo esto se agrupa como costo total y se tiene una visión preliminar para la posterior implementación de la tecnología a nivel industrial.

Capítulo 3: Análisis y Discusión de los resultados.

3.1 Resultados de la caracterización físico – química de la materia prima.

Determinación del % de humedad.

Para la determinación del porcentaje de humedad fue utilizado el procedimiento descrito por Horwitz, 2003, tal como se indica en el capítulo 2. Este método se basa en el análisis gravimétrico por volatilización indirecta.

El resultado de la determinación de humedad para las plumas molidas fue de 5,5 %, lo que se corresponde con lo planteado en la literatura consultada: Carabalí, 2015, Shilpa, 2017, Bertsch, 2005, con un 4,5 %, 6,4 % y 7,2 % respectivamente y Zerdani, *et al.*, 2004 con un 5 % por lo que de este análisis se reconocen que existe un intervalo de 4 % a 8 %. Como se puede apreciar hay diferencia en los porcentos de humedad que se reportan y puede estar relacionado con la temperatura a que las muestras son sometidas y a su capacidad de retener mayor humedad.

Determinación del % de cenizas.

Como se muestra en la tabla 3.1, la determinación de cenizas expresa un 3,01 % de su contenido en las plumas, si se compara este valor con el que se refleja en la literatura se puede afirmar que está incluido dentro de los parámetros normales. Por ejemplo, Subosa, *et al.*, 2016, Poopathi, *et al.*, 2016 y Benítez *et al.*, 2014 reportaron 8,52 %, 1,3 % y 2,5 % respectivamente.

Determinación del % de proteína cruda.

Tal como se describe en el capítulo 2, la determinación del contenido de proteínas fue realizada a partir del método Kjeldahl. Este está basado en la transformación de la materia orgánica con ácido sulfúrico concentrado que en exceso de hidróxido de

sodio libera amoníaco, el cual se destila y se recibe en ácido bórico para formar borato de amonio que se valora con ácido clorhídrico.

No son pocas las publicaciones que indican que el porcentaje de proteína de las plumas de pollos supera el 90 %, esta variación al igual que las cenizas y otros elementos están directamente relacionados con la edad y dieta del animal. Por lo que es lógico encontrar en la literatura amplia variedad de criterios con respecto a estas características (Karthikeyan, 2016 y De Oliveira, *et al.*, 2016).

El porcentaje de proteínas de las plumas de pollos molidas para este estudio fue de un 92 %, por lo que se considera que este resultado está muy cerca del valor máximo reportado por varios autores (Orak, *et al.*, 2018).

Tabla 3.1: Composición de las plumas molidas.

Composición	Plumas molidas
Proteína cruda (%)	93
Humedad (%)	5,5
Cenizas (%)	3,01

Fuente: Elaboración propia.

3.2 Resultados de la Hidrólisis Básica.

Como se indica en el capítulo 2, a través del programa **Statgraphics plus 5** para **Windows**, y a partir del diseño **Box-Behnken**, se estudiaron los efectos de 4 factores en 27 corridas. El diseño se ejecutó en un solo bloque y el orden de los experimentos ha sido completamente al azar.

Diagrama estandarizado de Pareto para NT

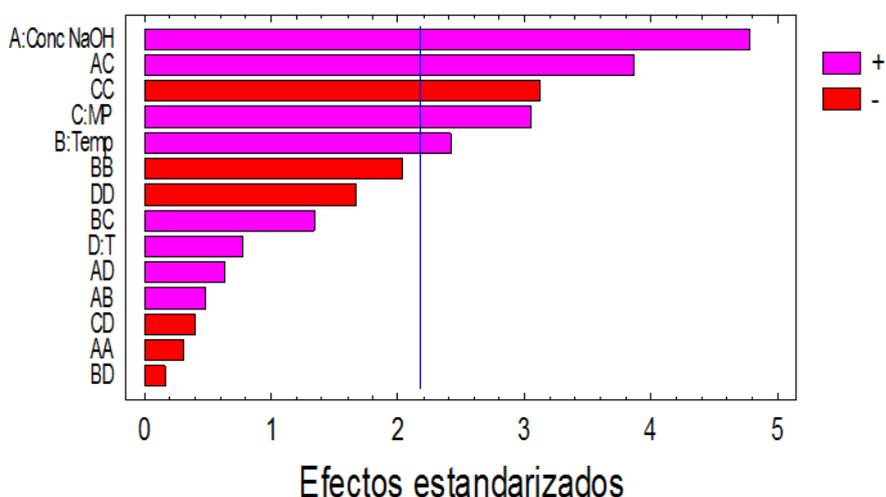


Figura 3: Diagrama estandarizado de Pareto para Nitrógeno Total

Fuente: Elaboración propia.

El resultado de las determinaciones de Nitrógeno Total (NT) para las 27 corridas experimentales se muestra en el Anexo (2). En la figura 3 se puede apreciar cómo influye la masa de plumas (MP), la concentración de NaOH (conc NaOH), la temperatura (Temp.) y el tiempo (T) en el proceso de producción de peptona. Obsérvese como todos los factores por si mismos ejercen efectos positivos sobre este.

A partir del análisis del estudio de optimización de la variable respuesta (NT) se obtuvieron los siguientes resultados (ver tabla 3.2).

Tabla 3.2: Valores óptimos de los parámetros de diseño.

Parámetros	Mínimo	Máximo	Óptimo	Definido	NT (%)
Conc NaOH	1,0	2,0	1,9	2,0	13,42
Temp	30,0	60,0	60	60	
M P	0,5	1,5	1,5	1,5	
T	6,0	12,0	7,3	6,0	

Fuente: Elaboración propia.

Nótese que se asume el valor máximo de concentración de $\text{NaOH}_{(\text{ac})}$ y temperatura. debido a la influencia positiva que tiene en el proceso; mientras que para tiempo se toma el valor mínimo ya que su influencia a pesar de resultar positiva no es significativa en un 95 % de confianza.

3.3 Resultados de la caracterización de la peptona de pluma de pollo obtenida.

Con respecto al porcentaje de proteína en la peptona obtenida en esta investigación se reporta un valor de 60 % que difiere del que publica Orak, *et al.*, 2018, que obtuvo 67,2 %, sin embargo, este parámetro resulta inferior cuando se realiza el proceso a través de una hidrólisis ácida según las investigaciones realizadas por Taskin, 2012 y Ozdal y Kurbanoglu, 2019, que reportaron porcentaje de proteína de 58 % y 56 % respectivamente.

Autores como Serna, *et al.*, 2012 y Taskin, *et al.*, 2012, informan valores de humedad de 3,2 % y 2,7 % respectivamente y en el presente estudio se reporta un 5,2 % que es mayor que en los referidos.

Como se puede apreciar en la tabla 3.3, hay un incremento en cuanto al porcentaje de cenizas en el proceso de 3,01 a 23,4 %, este comportamiento es usual en estos casos y se debe a las etapas de alcalinización y neutralización de los productos hidrolizados. Estudios anteriores con procedimientos hidrolíticos ácidos muestran elevados porcentajes de cenizas, por ejemplo: Ozdal y Kurbanoglu, 2019, con 41 % y Taskin, 2012, con 42,1 %. Esto se debe a que para su neutralización se utilizan compuestos como $\text{Ca}(\text{OH})_{2(\text{ac})}$, $\text{NaOH}_{(\text{ac})}$ y $\text{KOH}_{(\text{ac})}$ que aportan elementos minerales necesarios para el crecimiento de los microorganismos pero que en exceso pueden llegar a inhibir dicho crecimiento por lo que elevados porcentajes de cenizas no resultan ser beneficiosos. Por otra parte, los ácidos como el $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{ac})}$, $\text{H}_3\text{PO}_{4(\text{ac})}$ y $\text{HCl}_{(\text{ac})}$, incrementan los niveles de sulfuro, fósforo y iones cloruros que, sin duda, dificultan el crecimiento de los microorganismos.

Como se puede apreciar en la tabla 3.3 al comparar los valores de cenizas en la peptona de plumas de pollo (PP) y las peptonas comerciales estandarizadas, las PP tienen mayores contenidos de cenizas, aspecto negativo si se analiza lo antes planteado.

Tabla 3.3: Resultados de la producción de peptona a partir de los parámetros optimizados.

Composición (%)	Plumas Molidas	Peptona de plumas	Peptona Microbiológica	Peptona Micológica
Proteína cruda	93	60	83	76
Humedad	5,5	5,2	3,2	3,8
Cenizas	3,01	23,4	4, 7	7,4
NT	-----	12,7	15,55	11,8

Fuente: Elaboración propia

En cuanto al contenido de nitrógeno, como se puede observar, para la PP fue de 12,7 %, este valor se encuentra por debajo del obtenido en el estudio de optimización de la variable que fue de 13,42 %. No obstante, si se compara con el contenido de nitrógeno de las peptonas comerciales (Anexo 3), el de las PP es adecuado porque estos varían desde 7 % a 15 %. Si se compara con las PP obtenidas por hidrólisis ácida el porcentaje de nitrógeno de este estudio es mayor. Esta afirmación se hace evidente al citar las publicaciones de Lasekan, *et al.*, 2013, con 8,6 % y Subosa, *et al.*, 2016, con 9 %.

La autora sugiere para próximos estudios: analizar el contenido real en lo referente a elementos minerales y al aporte que se realiza ya sea en el proceso de hidrolisis como en el de neutralización y determinar los aminoácidos libres que hay en la PP. La importancia de estos estudios radica en las potencialidades que posee el uso de las PP en diversos procesos biotecnológicos.

3.4. Resultados de la evaluación de la peptona de plumas de pollos.

La calidad de un medio de cultivo y sus ingredientes se puede evaluar a través del crecimiento de los microorganismos que se puede medir de forma directa o indirecta. Dentro de los métodos directos se encuentra el peso seco o el contenido de sólidos de las células bacterianas que están en una suspensión y se obtiene por el secado de un volumen en un horno a 105 °C hasta peso constante. Esta técnica es útil para grandes volúmenes de muestra porque a diferencia del orden de los miligramos

representa el peso de un gran número de bacterias. La desventaja de este método es que componentes volátiles de la célula pueden perderse por el secado y puede existir alguna degradación. También la muestra seca puede recobrar humedad durante el pesado, principalmente si el ambiente tiene una humedad relativa alta.

Los resultados de las determinaciones del crecimiento de los microorganismos estudiados se muestran en el anexo 4 y en las figuras 4,5,6 y 7.

Se puede observar como el valor de la biomasa seca para *Bacillus sp* decrece en la medida que se incrementan las concentraciones de PP, no obstante, en las combinaciones de 60 % - 40 % y 50 % - 50 % los valores de biomasa están muy cercanos 2,9 y 2,7 el análisis de varianza simple y basados en las pruebas de rango múltiples permitió determinar para qué medias muestrales son significativamente diferentes una de las otras. Para este caso se demuestra que no hay diferencias significativas lo que sugiere que es posible sustituir en ambos casos la cantidad referida de peptona comercial sin perjudicar el crecimiento del microorganismo (ver Anexos 5,6, 7 y 8).

El análisis estadístico indica que en la alternativa en la que se usa el medio con todos sus ingredientes el crecimiento del microorganismo es significativamente mayor que en la que se sustituye hasta un 80 % de PC por PP.

De las tres bacterias estudiadas, la que mayor biomasa produjo en todos los tratamientos, fue *Bacillus sp*. Estudios de crecimiento realizados por Taskin, (2012), con PP muestran como entre las cepas de *Bacillus sp*. y *E. Coli*, de la primera se obtiene mayor cantidad de biomasa, es decir mayor crecimiento, y su máximo valor de biomasa fue de 3,13 g/L, mientras que para *E. coli* el valor máximo reportado fue de 2,64 g/L. En este estudio los máximos valores obtenidos con la influencia de PP fueron 2,9 g/L y 2,7 g/L para *Bacillus sp*. y para *E.coli*, 2,38 g/L y 2,31 g/L. Por otra parte, Subosa, *et al.*, 2016 reporta resultados diferentes, pues al hacer crecer cepas de *B. cereus* y *E. coli*, esta última es la que más rendimiento de biomasa mostró. Este comportamiento se puede explicar si se toma en cuenta las diferencias nutricionales de *E. coli* ya que esta es poco exigente y puede sintetizar los 20

aminoácidos, lo que le permite proliferar en condiciones adversas y transformar metabólicamente cualquier forma de glucosa en los compuestos macromoleculares de la célula. Diferente es la situación de *B. cereus*, el cual se conoce que es un microorganismo fastidioso en cuanto a requerimientos se refiere.

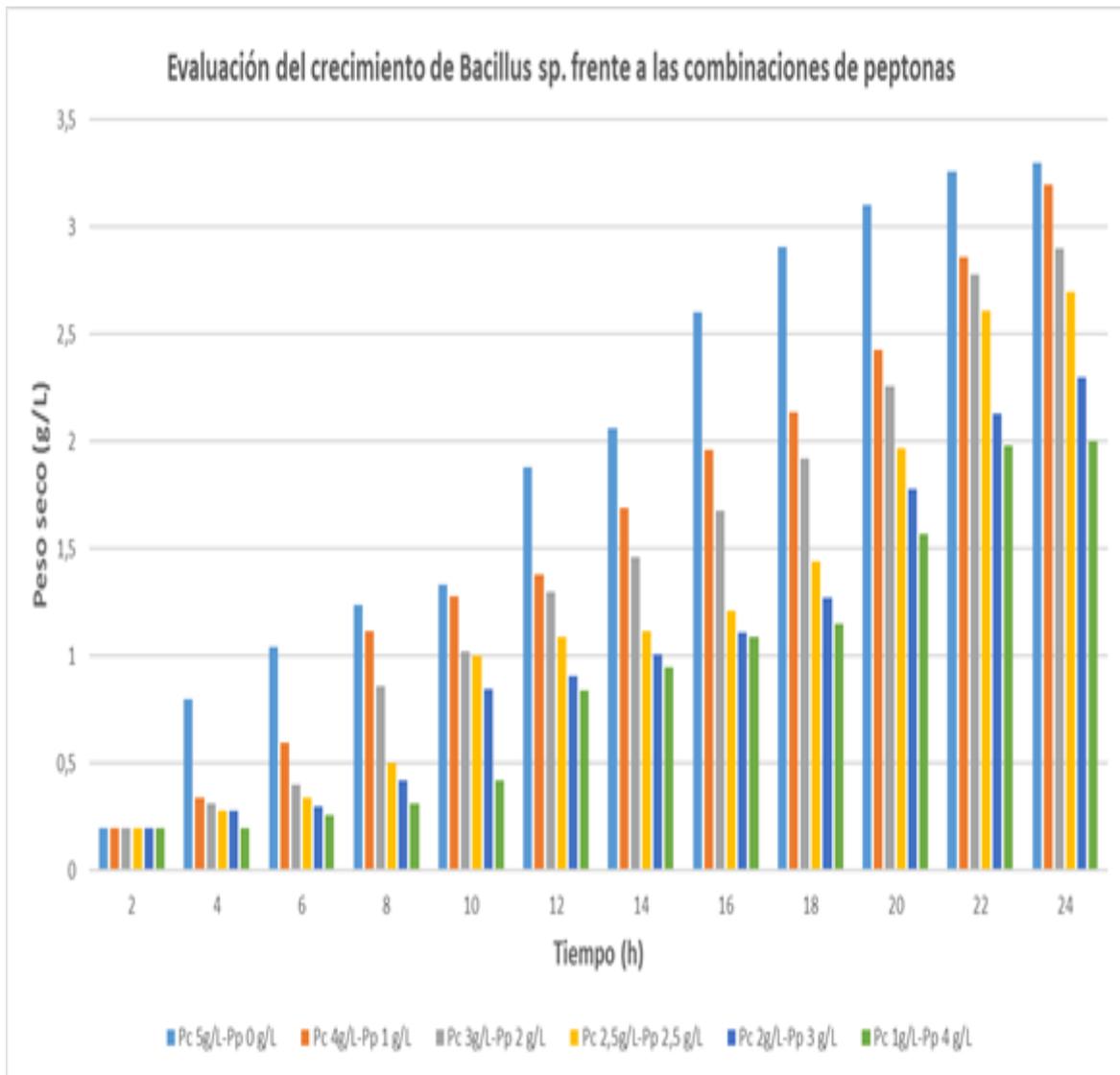


Figura 4: Evaluación del crecimiento de *Bacillus sp.* frente a las combinaciones de peptonas.

Fuente: Elaboración propia.

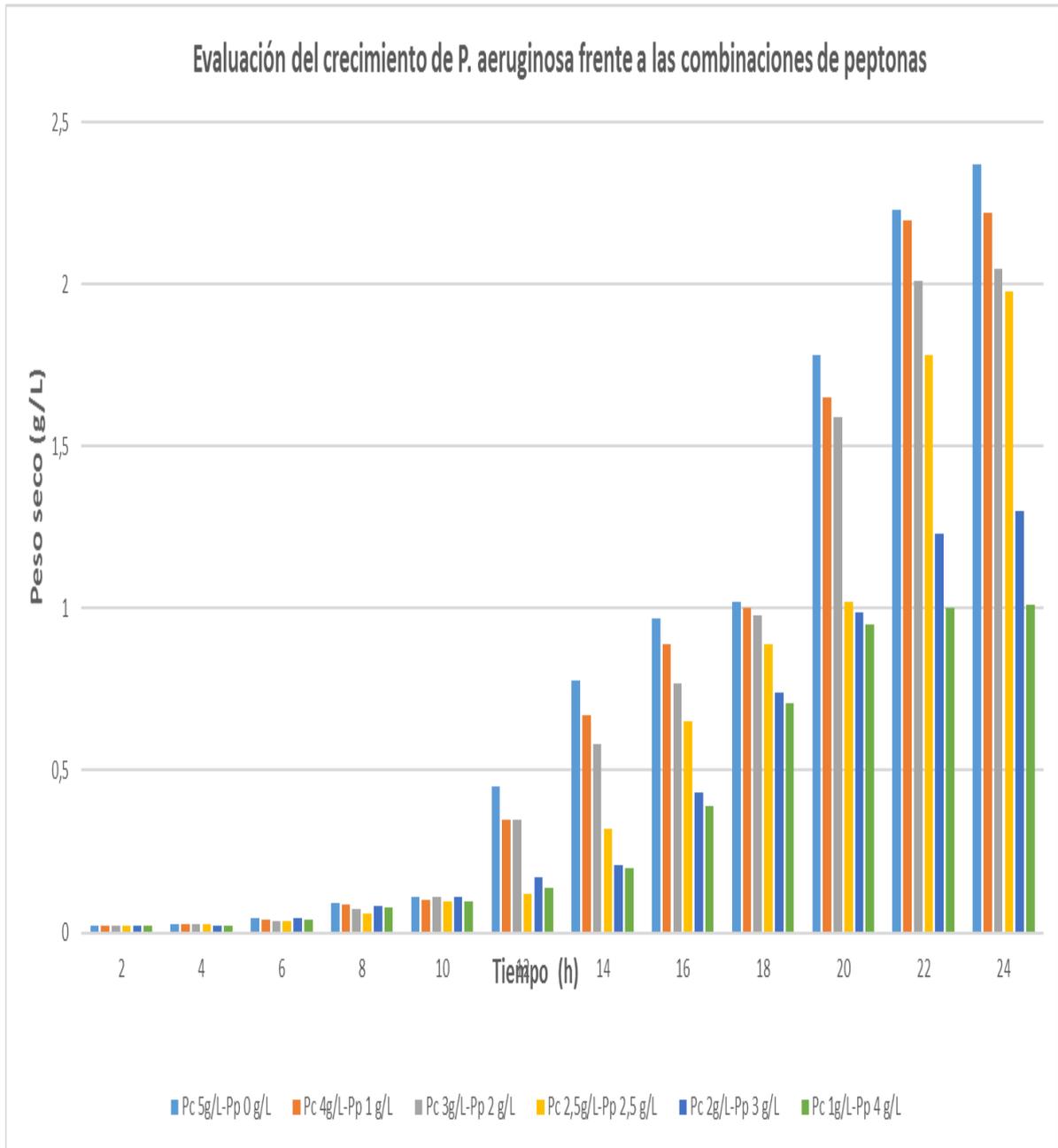


Figura 5: Evaluación del crecimiento de *P. aeruginosa* frente a las combinaciones de peptonas.

Fuente: Elaboración propia.

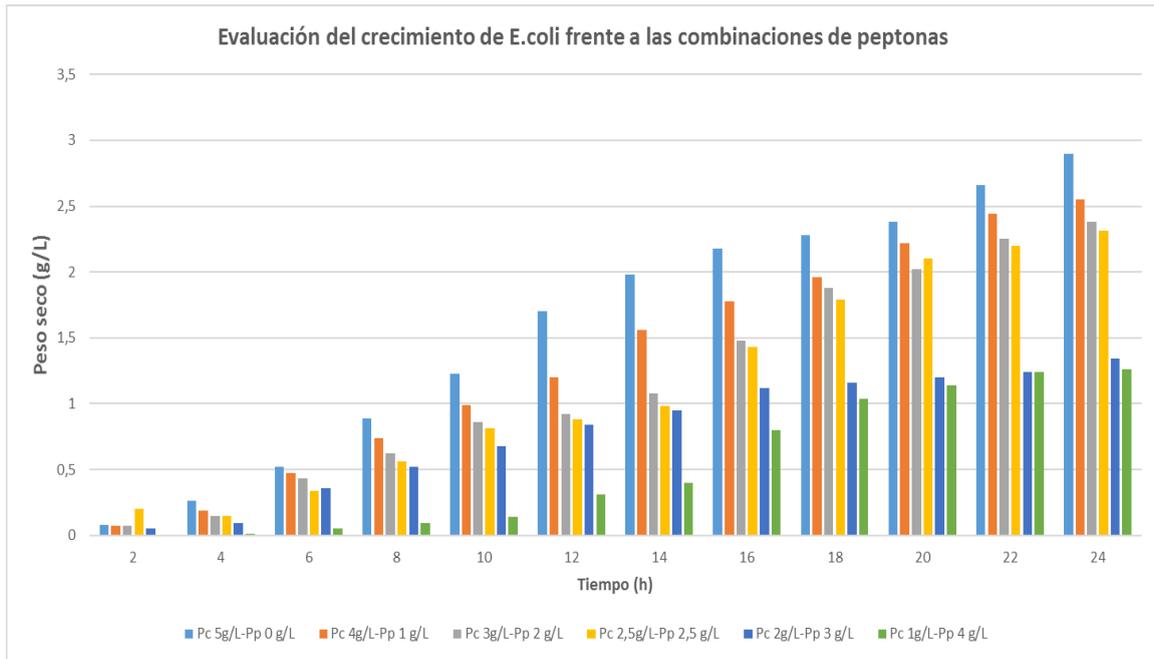


Figura 6: Evaluación del crecimiento de *E.coli* frente a las combinaciones de peptonas.

Fuente: Elaboración propia.

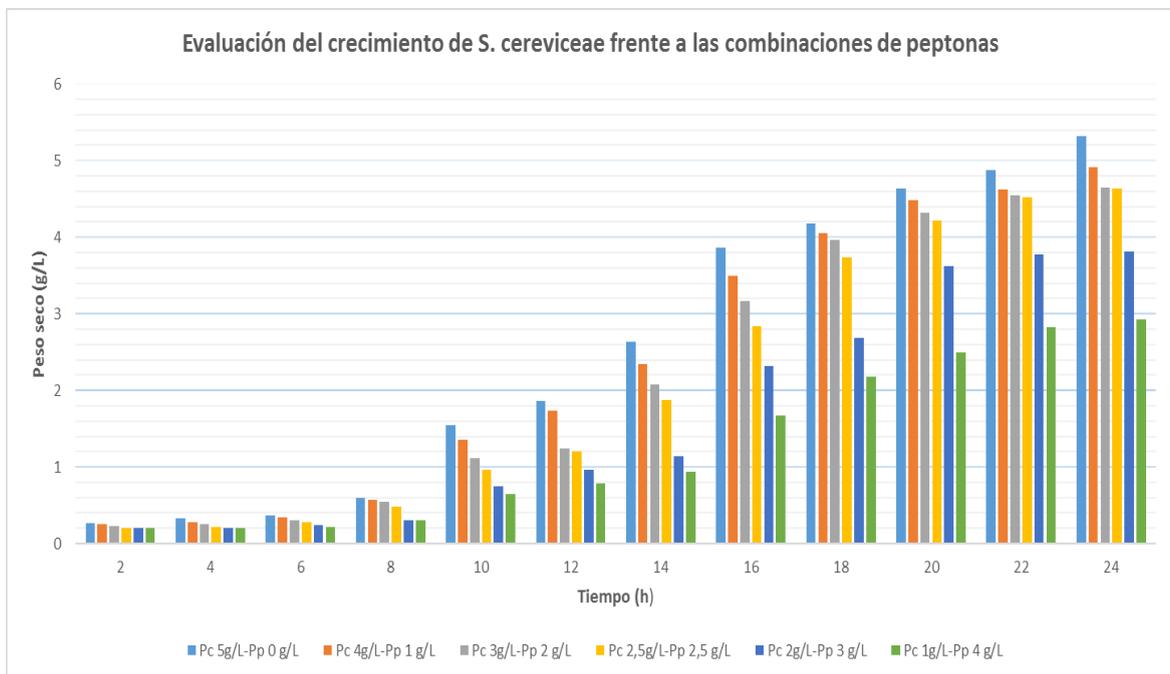


Figura 7: Evaluación del crecimiento de *S. cereviceae* frente a las combinaciones de peptonas.

Fuente: Elaboración propia.

Una situación diferente sucede con *Bacillus subtilis* pues según Taskin, (2012), el crecimiento favorable de este microorganismo se debe a la composición de la peptona que es rica en compuesto minerales, y se ha demostrado que para el crecimiento de cepas de *Bacillus sp.* estos elementos son indispensables.

Al analizar el crecimiento del resto de los microorganismos en estudio se puede apreciar que el comportamiento es de manera similar y se puede notar que el crecimiento en las combinaciones del centro se comporta de forma similar.

3.5 Resultados del análisis del beneficio bruto.

El costo del beneficio bruto (BB), reporta el valor aproximado de la producción de 1kg de plumas de pollo. Para ello se tuvo en cuenta todos los gastos en materias primas principales y auxiliares (tabla 3.4), así como el posible precio de venta del material obtenido.

Todos los gastos que se reportan fueron extraídos del catálogo de precios de reactivos químicos (Veravitrum, 2014).

El costo de la peptona con características similares a los materiales producidos oscila alrededor de los 150 CUC/kg (Chemical, 2014).

Tabla 3.4. Gastos para la producción de la peptona de pluma de pollo.

	Reactivos	Gastos (CUC)
200 g	NaOH	0,16 CUC
250 mL	HCl	2,26 CUC
100 L	H ₂ O	0,1 CUC
Total		2,52 CUC

Fuente: Elaboración propia.

El beneficio bruto se determina a partir del análisis de la diferencia de los gastos en la síntesis del material con el posible precio de venta del producto.

Tabla 3.5. Beneficio bruto (BB) para el material obtenido.

Material obtenido	Gasto total (CUC)	Precio de venta (CUC)	Beneficio Bruto (CUC)
-------------------	-------------------	-----------------------	-----------------------

	2,52 CUC	150 CUC	147,48 CUC
--	----------	---------	------------

Fuente: Elaboración propia.

Como puede observarse en este caso se obtiene un beneficio bruto positivo, lo cual indica de manera preliminar, la posibilidad de continuar con estudios técnicos – económicos más detallados en el material obtenido; con el fin de implementar la producción del mismo.

Conclusiones parciales del capítulo.

1. La conversión de plumas de pollo de desecho en peptona, no solo proporcionará un nuevo sustrato barato para estudios microbianos, sino que también ayudará a la solución de problemas ambientales al reducir la cantidad de desechos.
2. La peptona podría ser utilizada de manera efectiva como sustrato en los cultivos de bacterias de importancia industrial, clínica y biotecnológica.
3. Se comprueba a partir del análisis del beneficio bruto la posibilidad de continuar con estudios más detallados para la aplicación del material obtenido.

Conclusiones.

1. Se logró la obtención de peptona de plumas de pollos por hidrólisis básica.
2. Las características físicas y químicas de la materia prima son, cenizas 3,01 %, humedad 5,5% y proteína cruda 93 %.
3. Los parámetros óptimos para la producción de la peptona de plumas de pollos son: concentración de $\text{NaOH}_{(ac)}$ de 2 %, temperatura de 60 °C, un porcentaje de masa de plumas de 1,5 g y un tiempo de 6,0 h.
4. Las características de la peptona obtenida son: nitrógeno 12,7 %, proteína cruda 60 %, humedad 5,2 % y ceniza 23,4 %.
5. Se realizó un estudio de calidad a través de enfrentamientos de microorganismos donde se demostró que se puede sustituir peptona plumas pollos por peptona comercial.
6. Se comprobó que el análisis del beneficio bruto fue positivo con un valor de 147,48 CUC.

Recomendaciones.

1. Para próximos estudios, determinar el del contenido exacto de los elementos minerales y los aportes que se realizan tanto en el proceso de hidrólisis como en la neutralización.
2. Sugerir que en próximas investigaciones se estudie la composición de aminoácidos libres que hay en la peptona obtenida.
3. Sugerir en próximos trabajos, el estudio económico del proceso.

Bibliografía.

1. Aguilar Rodríguez, Ángel Osmel. (2017). Evaluación de dos métodos de hidrólisis de plumas de pollo. Matanzas. 82h. Tesis en opción al título de Ingeniero Químico. Universidad de Matanzas.
2. Akpor, O. B.; Odesola, D. E.; Thomas, R. E. and Oluba, O. M. (2019). Chicken feather hydrolysate as alternative peptona source for microbial cultivation. *F1000Research*, 7:1918. (<https://doi.org/10.12688/f1000research.17134.2>). pp. 1-21.
3. Álvarez, Lázaro Miguel. (2018). Obtención de un medio de cultivo para la producción de queratinasas, por hidrólisis microbiana, a partir de plumas de pollo. Matanzas. 71h. Tesis en opción al título de Ingeniero Químico. Universidad de Matanzas.
4. Benítez, R.; Rosero, B.; and Martín, J. (2014). Evaluación de dos materias primas como fuente de proteína: pluma de pollo (*Gallus gallus*) y pezuña de vaca (*Bos primigenius taurus*). Ingenium, Departamento de Química, Universidad del Cauca, Popayán, Colombia.
5. Bertsch, A. (2005). 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.
6. BIOCEN, (2001). Manual BIOCEN de medios de cultivo. Segunda Edición. Ciudad de la Habana. pp 6-8.
7. CA_Diptico-Peptonas. [en línea]. [Consulta: 8 enero 2019]. Disponible en <https://www.ibdciencia.com/es/peptona-u>.
8. Carabalí, V. (2015). Producción de proteína para consumo animal mediante hidrólisis de plumas de pollo en agua suscritica. Estudio de Planta Piloto.
9. Chemical Co. Ltd. (2014). Carbón activado con alta calidad y precio bajo. Cuenta Registrada. China.
10. Chenault, D. and Muralidhara, H. M. United States Patent 0141230, 2007.
11. Coello, N.; Bernal, C.; Bertch, A.; Estrada, O.; Mocco, Y. y Hasegawa, M. (2003). Las plumas como residuo agroindustrial: su utilización biotecnológica para producir insumos de interés industrial. *Revista de la Facultad de Ingeniería de la U.C.V*, Vol. 18, No 3. pp.119-126.

12. Corry, J. E. L.; Curtis, G. D. W. and Baird, R. M. (3Eds). (2013). Handbook of Culture Media for Food and Water Microbiology. doi: 10.1039/9781847551450.
13. De Oliveira, C. T.; Pellenz, L.; Pereira, J. Q.; Brandelli, A. and Daroit, D. J. (2016). Screening of Bacteria for Protease Production and Feather Degradation. *Waste and Biomass Valorization*, 7, 447-453.
14. Eaksuree, W.; Prachayakitti, A.; Upathanpreecha, T.; Taharnklaew, R.; Nitisinprasert, S. and Keawsompong, S (2016). "In vitro and in vivo evaluation of protein quality of enzymatic treated feather meals", SpringerPlus. Springer International Publishing, pp. 2-7. doi: 10.1186/s40064-016-2626-2.
15. Fajardo Naranjo, Carlos Daniel. (2016). Obtención de un hidrolizado proteico por fermentación de plumas de pollos. Matanzas. 77h. Tesis en opción al título de Ingeniero Químico. Universidad de Matanzas.
16. Fakhfakh, N.; Ktari, N.; Haddar, A.; Mnif, I. H.; Dahmen, I. and 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*.
17. Fallah, Meysam; Bahram, Somayeh and Roholla Javadian, Seyed. (2015). Fish peptone development using enzymatic hydrolysis of silver carp by-products as a nitrogen source in *Staphylococcus aureus* media. *Food Science & Nutrition*, 3(2). pp.153-157.
18. Fernández, M.; Martínez Mora, M.M.; Pérez Rojas, A.; Villalonga Santana, R.; Ramírez Pérez, H.L.; Gómez Brizuela, L.; Briones Pérez, A.I. and Ubeda Iranzo, J. (2013). *Bacillus* sp. strain P33 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: KC513770. Disponible en <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.
19. García, Y.; Ortiz, A. y LonWo, E. (2009). Efecto de los residuales avícolas en el ambiente Instituto de Ciencia Animal, Cuba.
20. Gupta, R.; Sharma, R. and Beg, Q.K. (2012). Revisiting microbial keratinases: next generation proteases for sustainable biotechnology. *Crit Revist Biotechnol*.
21. Han, M.; Luo, Q. and Gu, Yu. (2012). Isolation and characterization of a keratinolytic protease from a feather-degrading bacterium *Pseudomonas aeruginosa* C11. *African Journal of Microbiology Research*, vol. 6, p. 2211–2222.

22. Hmidet, N. (2010). *Chicken feathers: a complex substrate for the coproduction of alpha-amylase and proteases by B. licheniformis NH1*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*.
23. Horwitz, W. (2003). *Official Methods of Analysis of AOAC International*. Association of Official Analytical Chemists [AOAC]. (17th ed.). Gaithersburg, MD: AOAC.
24. Husin, N.; Kamal, S. M. M.; Chuan, L. T.; Muhammad, N. F. and Jusoh, N. (2015) "Comparison of Microbial Growth on Fish Waste Peptones from Different Hydrolysis Methods", 81 (Icbet), pp. 54-57. doi: 10.7763/IPCBE.
25. Isaza, A. J. (2006). Optimización de un medio de cultivo a base de peptonas vegetales para el cultivo de *Clostridium chauvoei*. *Microbióloga*.
26. Karthikeyan, S. and NG, R.B., (2016). Alkaline Protease Production from Bacteria Inhabiting Chicken Feather. *Imperial Journal of Interdisciplinary Research*, 2(9).
27. Kurbanoglu, E. B. and Kurbanoglu, N. I, (2004) "Ram horn peptone as a source of citric acid production by *Aspergillus niger*, with a process", pp. 289-294. doi: 10.1007/s10295-004-0147-4.
28. Lasekan, A.; Bakar, F. A. and Hashim, D. (2013). Potential of chicken by-products as sources of useful biological resources. *Waste Management*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman2012.08.001>.
29. Lehninger, A.L.; Nelson, D.L. y COX, M.M. (1995). *Principios de Bioquímica*. 2da. Ed. Barcelona, Omega. 1087p.
30. Murillo Will, Jaime (2017). *Conceptos generales sobre las peptonas*. (2da parte de 2). Colombia.
31. NC ISO 20483 (2009) *Cereales y legumbres. Determinación del contenido de nitrógeno y cálculo del contenido de la proteína bruta. Método de Kjeldahl* (iso 20483:2006, idt).
32. Ocampo, M. (2010). *Producción de un hidrolizado proteínico a partir de plumas de pollo: Aprovechamiento de un subproducto de la industria avícola. Tesis previa a la obtención del título de Ingeniería Química*. Universidad del Valle. Guatemala.
33. Orak, T.; Caglar, O.; Ortucu, S.; Ozkan, H. and Taskin, M. (2010). Chicken feather peptone: A new alternative nitrogen source for pigment production by *Monascus purpureus*, *Journal of Biotechnology* (2010), <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.02.010>.

34. Ozdal, M. and Kurbanoglu, E. B. (2019). Citric Acid Production by *Aspergillus niger* from Agro-Industrial By- Products: Molasses and Chicken Feather Peptone Waste and Biomass Valorization (2019) 10:631–640 <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0240-y>.
35. Ozdal, M. and Kurbanoglu, E. B. (2019). Use of Chicken Feather Peptone and Sugar Beet Molasses as Low Cost Substrates for Xanthan Production by *Xanthomonas campestris* MO-03. Department of Biology, Faculty of Science. Turkey.
36. Ozkan, B.; Taskin, M. K. E.; B.; Atici, O. and Aydogan, M.N. (2012). "Utilization of chicken feather hydrolysate as a novel fermentation substrate for production of exopolysaccharide and mycelial biomass from edible mushroom *Morchella esculenta*". International Journal of Food Sciences and Nutrition. vol. 63, no.5. pp. 597-602.
37. Peptona DE Caseína GE Probiotek. [en línea]. [Consulta: 8 enero 2019]. Disponible en <https://www.probiotek.com/productos/reactivos/medios-de-cultivos.../peptona-de-caseína-ge/>.
38. Pillou, Jean-François. (2014). Peptona-Definición. [en línea]. [Consulta: 8 enero 2019]. Disponible en <https://educalingo.com/es/dic-es/peptona>.
39. Poopathi, S.; Murugan, K.; Selvakumari, J.; Mani, C. and Bala, P. (2016). Production of Microbial Bio-Pesticides from Waste Disposal of Chicken Feathers. *Ferment Technol* 5: e123. doi:10.4172/2167-7972.1000e123
40. Schrooyen, P.M. and Oberthur, R. (2007). Keratin-based products and methods for their productions. Netherlands, Stichting Nederlands Instituut voor Zuivelonderzoek.
41. Serna. L.; Rengifo, C. A. G.1, Rojas, M. A. (2012). Hidrolizado de plumas de gallina como fuente de peptona para la producción de biomasa láctica. Facultad de Ingeniería y Administración. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira.
42. Shilpa Ashok Jani; Sumaiya Malek; Anvi Patel; Krupa Pathak and Kinjal Baria. (2017). Production of Alkaline Keratinolytic Protease by *Bacillus* sp. B13 from Feather Waste. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 6(5): 1538-1552. doi: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.605.168>.
43. Sisman, T.; Taskin, M. K. E.; Erdal, S. and Kurbanoglu, E.B. (2011). "Use of waste chicken feathers as peptone for production of carotenoids in submerged culture of *Rhodotorula glutinis* MT-5". *Eur Food Res Technol*, vol. 233. pp.657-665.

44. Subosa, B. N. F.; Mirando, J. S.; Velasquez, A. P. V.; Alamar, V. L. Q.; Capinpin, G. G. L.; Sablan, K. A. D. and de Leon, R. L. (2016). "Production of Peptone from Chicken Feathers", 37(1), pp. 63-78.
45. Suttiniyom, C. (2015) "Digestibility and Protein Content Improvement of Corn cob Silage Using Chicken Feather Partially Digested by *Bacillus subtilis* G8", pp. 1207-1212. doi: 10.17957/IJAB/14.0031.
46. Taskin, M. and Kurbanoglu, E. B. (2011). "Evaluation of waste chicken feathers as peptone source for bacterial growth", pp.826-834. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05103.x.
47. Taskin, M. (2012). A new strategy for improved glutathione production from *Saccharomyces cerevisiae*: use of cysteine-and glycine-rich chicken feather protein hydrolysate as a new cheap substrate. DOI10.1002/jsfa.5818.
48. Thiex, N., Novotny, L., and Crawford, A. (2012). *Determination of Ash in Animal Feed: AOAC Official Method 942.05 Revisited*, Vol. 95. no. 5. pp. 1392-1397.
49. Tiwary, E. and dan Gupta, R. (2012). *Rapid Conversion of Chicken Feather to Feather Meal Using Dimeric Keratinase from Bacillus licheniformis ER- 15. J. Bioprocess Biotechniq.*
50. Turton, R. (1998). Analysis, synthesis and design of Chemical Processes. Editorial Prentice Hall. New Jersey.
51. USDA. (2013). Department of Agriculture National Agricultural Statistics Service.
52. Veravitrum, 2014. Lista de precios de reactivos químicos. 72 p.
53. Vidal, L.; Chriten, P. and Coello, M.N. (2000). *Feather degradation by Kocuria roseain submerged culture. Wld. J. Microbiol. Biotechnol.*
54. Wang, Y.-X. and Cao, X.-J. (2012). *Extracting keratin from chicken feathers by using a hydrophobic ionic liquid. Process Biochemistry*, 47. pp. 896–899.
55. Werlang PO, Brandelli A. (2005). *Characterization of a novel feather-degrading Bacillus sp. strain. Appl Biochem Biotechnol*; 120. pp.71–90.
56. Yato, G. A. (2015). "Uso de fuentes no convencionales de nitrógeno en la fertilización del maíz (*Zea mays* L.), En Cañete (Perú). I: Rendimiento y extracción de N, picuse of NON-Conventional sources of nitrogen in corn (*Zea mays* L.) Fertilization in Cañete (Perú)." 14(2).
57. Zerdani, I.; Faid, M. and Malki, A. (2004). Feather wastes digestion by new isolated strains *Bacillus* sp. in Morocco. *African journal of Biotechnology*, 3(1), pp.67-70.

58. Zhurbenko, Raisa. (2008). Bases Nutritivas para el Cultivo de los Microorganismos: Parte 1-Procesos Tecnológicos. Sociedad Iberoamericana de Información Científica, segunda edición. La Habana, Vol. 10, No. 6. <http://www.siicsalud.com/des/expertoimpreso.php/94144>.
59. Zhurbenko, Raisa; Rodríguez Martínez, Claudio; García Marichal, José M.; López Hernández, Orestes D.; Zayas Ruiz, Yordania; Quesada Muñiz, Vivian de J.; Lobaina Rodríguez, Tamara; Viera Oramas, Diana R. y Varela Llanes, Alberto E. (2005). Generalización de bases nutritivas en el país. La Habana. pp.1-117.

Anexos.

Anexo 1: Valoración con HCl en presencia del indicador de Tashiro.



Anexo 2: Tabla de diseño experimental *Box-Behnken*.

BLOCK	Conc NaOH	Temp	MP	T	NT
1	1,5	45	1,5	6	10,7
1	2	30	1	9	10
1	1,5	30	1	12	8
1	2	45	1	12	10,1
1	1,5	45	1	9	9,8
1	1,5	45	1	9	9,9
1	2	45	1	6	10,3
1	1	45	0,5	9	6,5
1	1	45	1	6	8,8
1	1,5	60	1	12	9,6
1	1	30	1	9	7,9
1	1,5	45	1,5	12	10,2
1	1,5	60	1	6	9,7
1	2	60	1	9	11,2
1	1,5	45	0,5	12	6,4
1	1,5	30	1,5	9	8,8
1	1,5	45	1	9	9,9
1	1	45	1	12	8
1	1,5	60	0,5	9	6,3
1	1,5	30	1	6	7,9
1	1,5	30	0,5	9	6,6
1	2	45	0,5	9	6

1	1	60	1	9	7,5
1	1	45	1,5	9	7,3
1	2	45	1,5	9	11,8
1	1,5	45	0,5	6	5,5
1	1,5	60	1,5	9	11

Anexo 3. Composición química y física de peptonas comerciales.



TYPICAL ANALYSIS	CAT. N°	%					pH (2% solution)	%				AMINO ACIDS (%)															MICROBIOLOGICAL ANALYSIS				DIGESTION			
		Amino Nitrogen (AN)	Total Nitrogen (TN)	AN/TN Ratio	Loss on drying	Ash		Calcium	Magnesium	Potassium	Sodium	Alanine	Arginine	Aspartic acid	Cysteine	Glutamic acid	Glycine	Histidine	Isoleucine	Leucine	Lysine	Methionine	Phenylalanine	Proline	Serine	Threonine	Tryptophan	Tyrosine	Valine	Standard plate count		Yeasts and molds	Coliforms	Salmonella
ACID CASEIN PEPTONE (H)	1604	5.40	8.80	61.40	3.00	33.00	6.8	0.015	0.0050	0.035	12.25	1.70	2.00	5.30	0.20	13.70	1.00	1.40	2.90	5.00	4.60	1.50	2.00	5.80	2.80	2.00	<1.0	1.70	3.60	<5000	<100	Neg	Neg	Acid Hydrolysis
BACTERIOLOGICAL OX BILE (i)	1710				3.10		8.3																						<5000	<100	Neg	Neg	Purification	
BACTERIOLOGICAL PEPTONE	1616	3.00	15.55	19.20	3.20	4.70	6.9	0.023	0.0130	0.25	1.40	7.95	7.21	6.42	0.14	9.93	20.71	0.93	1.41	3.02	3.69	0.92	1.94	11.71	3.51	1.90	0.09	0.75	2.40	<5000	<100	Neg	Neg	Enzymatic
BEEF EXTRACT POWDER	1700	4.10	12.48	32.90	2.50	9.40	6.8	0.011	0.0190	2.60	1.60	3.28	3.22	6.60	0.35	15.86	2.29	2.08	3.91	6.50	5.98	1.63	3.58	6.91	4.37	3.56	0.97	1.68	4.85	<5000	<100	Neg	Neg	Extraction
BILE SALTS N° 3 (ii)	1706				4.10		8.1																					<5000	<100	Neg	Neg	Purification		
CASEIN CC PEPTONE	1603	4.15	13.10	31.67	3.15	6.80	6.8	0.020	0.0069	1.80	2.20	2.94	3.36	6.28	0.41	17.90	1.88	2.39	4.44	7.60	6.63	2.31	4.13	8.62	5.02	3.96	0.92	1.85	5.50	<5000	<100	Neg	Neg	Enzymatic
CASEIN PEPTONE	1602	4.20	13.13	32.00	3.30	6.00	6.8	0.019	0.0079	1.30	2.10	2.91	3.30	6.99	0.44	18.74	1.86	2.38	4.45	7.62	6.60	2.32	4.11	8.65	5.08	3.91	0.95	1.86	5.51	<5000	<100	Neg	Neg	Enzymatic
CASEIN PEPTONE N° 2	1620	4.20	13.49	31.10	3.30	6.40	6.8	0.019	0.0057	0.86	2.20	2.74	3.29	6.99	0.49	19.23	1.73	2.44	4.52	7.70	6.73	2.45	4.18	9.11	5.14	3.95	1.00	1.91	5.59	<5000	<100	Neg	Neg	Enzymatic
CASEIN PEPTONE HS (High Solubility)	1622	5.90	12.26	48.10	3.00	6.20	6.6	0.039	0.0098	0.48	2.90	2.44	2.99	5.98	0.30	16.36	1.69	2.20	3.99	6.52	7.82	1.46	3.51	7.90	4.53	5.87	0.94	1.23	4.96	<5000	<100	Neg	Neg	Enzymatic
GELATIN PEPTONE	1606	3.50	15.48	22.60	3.00	4.20	6.9	0.018	0.0100	1.10	0.97	7.89	7.16	6.34	0.13	9.58	20.60	0.89	1.39	2.84	3.61	0.85	1.88	11.46	3.45	1.87	0.09	0.71	2.31	<5000	<100	Neg	Neg	Enzymatic
HEART INFUSION	1714	3.50	11.00	31.80	3.50	10.10	7.0	0.009	0.0200	1.40	3.60	3.20	3.55	6.05	0.31	15.97	2.50	2.13	3.91	6.68	6.01	1.75	3.66	7.04	4.54	3.12	0.87	1.61	4.73	<5000	<100	Neg	Neg	Extraction
LACTALBUMIN HYDROLYSATE	1626	5.30	12.40	42.70	4.40	5.30	6.8	0.078	0.0270	0.83	2.10	3.20	1.36	7.59	0.76	17.12	1.83	2.02	4.30	6.52	6.68	1.60	3.08	7.37	4.72	4.58	1.17	0.97	5.07	<5000	<100	Neg	Neg	Enzymatic
MALT EXTRACT (iii)	1708	0.40	1.30	30.77	2.50		5.0	0.014	0.0730	0.0005		0.40	0.50	0.90		1.60	0.40	0.60	0.50	0.60	0.60	0.20	0.70	0.60	0.40	0.40		0.30	0.60	<5000	Neg	Neg	Neg	Enzymatic
MEAT PEPTONE	1600	3.70	12.33	30.00	2.70	9.20	6.9	0.072	0.0290	2.70	2.50	5.62	4.08	5.61	0.37	11.62	8.37	1.31	2.63	4.50	4.30	0.85	2.61	6.29	2.95	2.46	0.59	1.11	3.50	<5000	<100	Neg	Neg	Enzymatic
PEPTONIZED MILK	1628	2.40	7.41	32.40	4.30	8.40	6.7	0.430	0.0610	1.20	1.90	1.56	1.71	3.86	0.28	10.01	1.07	1.29	2.43	4.25	3.35	1.02	2.18	4.81	2.73	2.18	0.52	1.20	2.98	<5000	<100	Neg	Neg	Enzymatic
POLYPEPTONE	1610	4.10	13.12	31.25	3.40	8.80	6.8	0.030	0.0140	1.60	2.12	4.05	3.76	8.83	0.43	15.97	5.70	1.81	3.44	5.99	5.50	1.81	3.34	8.21	4.33	3.31	0.80	1.42	4.37	<5000	<100	Neg	Neg	Enzymatic
PORK BRAIN HEART INFUSION	1712	3.30	11.81	27.90	3.50	9.20	7.2	0.020	0.0120	2.11	4.09	3.47	3.31	8.78	0.50	15.04	3.45	1.72	3.35	5.80	5.40	1.65	3.15	6.25	3.80	6.27	0.87	1.49	4.21	<5000	<100	Neg	Neg	Extraction
PORK HEART INFUSION	1716	3.50	11.67	30.00	4.00	10.50	7.1	0.018	0.0120	2.36	3.96	3.32	3.08	8.77	0.54	14.77	2.55	0.05	3.39	5.83	5.43	1.65	3.15	5.84	3.81	3.33	0.91	1.44	4.22	<5000	<100	Neg	Neg	Extraction
PORK MEAT PEPTONE	1624	3.70	13.08	28.30	2.70	9.50	6.9	0.023	0.0200	1.66	2.65	5.38	4.55	8.56	0.29	12.38	9.85	1.24	2.45	4.32	4.37	1.19	2.48	7.37	3.26	2.58	0.52	1.22	3.30	<5000	<100	Neg	Neg	Enzymatic
PROTEOSE PEPTONE	1609	4.30	12.57	34.20	3.00	7.80	6.7	0.024	0.0230	1.40	2.70	3.49	3.54	6.50	0.38	15.51	3.41	1.98	3.66	6.68	5.81	1.64	3.53	7.11	4.30	3.46	0.80	1.59	4.82	<5000	<100	Neg	Neg	Enzymatic
PROTEOSE PEPTONE N°3	1607	4.35	12.42	35.02	3.20	8.20	6.8	0.024	0.0200	2.20	2.40	3.48	3.29	6.69	0.47	16.14	2.90	1.99	3.83	6.50	5.95	1.77	3.56	6.95	4.30	3.57	0.95	1.58	4.89	<5000	<100	Neg	Neg	Enzymatic
SOY PEPTONE	1608	3.00	12.54	23.90	2.80	8.70	6.8	0.026	0.0120	1.50	3.00	4.73	4.31	5.94	0.34	9.98	11.38	0.94	1.56	2.82	3.08	0.73	1.83	6.88	2.81	1.78	0.19	1.06	2.09	<5000	<100	Neg	Neg	Enzymatic
TRYPTONE	1612	4.20	13.31	31.70	3.30	6.00	6.8	0.019	0.0065	0.95	2.10	2.87	3.31	6.52	0.40	18.70	1.79	2.29	4.48	7.63	6.51	2.35	4.09	8.65	5.08	3.91	1.05	1.86	5.51	<5000	<100	Neg	Neg	Enzymatic
TRYPTOSE	1614	4.40	13.40	32.50	3.20	9.70	7.4	0.001	0.0220	0.679	3.41	4.45	4.65	6.34	0.44	13.92	2.84	<0.01	0.34	3.67	4.64	1.92	7.52	6.33	4.09	3.55	0.62	2.21	1.93	<5000	<100	Neg	Neg	Enzymatic
YEAST EXTRACT	1702	5.40	10.70	50.46	3.30	9.50	6.8	0.100	0.1000	5.70	0.30	8.70	5.00	9.70	0.80	16.10	4.90	2.00	5.60	7.60	8.00	1.30	3.80	4.00	4.70	4.40	1.20	2.30	5.80	<5000	<100	Neg	Neg	Autolysis

NOTES	Additional Chemical Characteristics (%)			
	BACTERIOLOGICAL OX BILE (i)	BILE SALTS N° 3 (ii)	MALT EXTRACT (iii)	
	Cholic acid	47.0	Sodium cholate	49.4
	Sodium cholate	49.3	Sugar content	96.0
			Sulfuric ash	1.4
			Sodium Desoxycholate	49.4

Anexo 4: Crecimiento de los microorganismos a través de combinaciones entre la peptona comercial (PC) y la peptona de plumas de pollo (PP).

Bacillus sp.

Peptona C	Peptona P	Peptona C	Peptona P	Peptona C	Peptona P	Peptona C	Peptona P	Peptona C	Peptona P	Peptona C	Peptona P
5g/L(100%)	0g/L(0%)	4g/L(80%)	1g/L(20%)	3g/L(60%)	2g/L(40%)	2,5g/L(50%)	2,5g/L(50%)	2g/L(40%)	3g/L(60%)	1g/L(20%)	4g/L(80%)
Tiempo	peso seco	Tiempo	peso seco	Tiempo	peso seco	Tiempo	peso seco	Tiempo	peso seco	Tiempo	peso seco
2	0,06	2	0,2	2	0,1	2	0,27	2	0,27	2	0,05
4	0,2	4	0,8	4	0,6	4	0,35	4	0,35	4	0,09
6	0,6	6	1,04	6	1	6	0,34	6	0,4	6	0,12
8	1,04	8	1,12	8	1,06	8	0,5	8	0,596	8	0,31
10	1,33	10	1,28	10	1,2	10	1	10	1,05	10	0,61
12	1,88	12	1,38	12	1,3	12	1,09	12	1,1	12	1,04
14	2,06	14	1,69	14	1,46	14	1,12	14	1,17	14	1,25
16	2,6	16	1,96	16	2,02	16	1,21	16	1,41	16	1,39
18	2,91	18	2,14	18	2,22	18	1,44	18	1,7	18	1,55
20	3,1	20	2,43	20	2,46	20	1,97	20	1,98	20	1,7
22	3,26	22	2,66	22	2,68	22	2,41	22	2,13	22	1,98
24	3,3	24	3	24	2,9	24	2,7	24	2,3	24	2,02

Continuación del anexo 4.

Pseudomonas aeruginosa.

Peptona C	Peptona P	Peptona C	Peptona P	Peptona C	Peptona P	Peptona C	Peptona P	Peptona C	Peptona P	Peptona C	Peptona P
5g/L(100%)	0g/L(0%)	4g/L(80%)	1g/L(20%)	3g/L(60%)	2g/L(40%)	2,5g/L(50%)	2,5g/L(50%)	2g/L(40%)	3g/L(60%)	1g/L(20%)	4g/L(80%)
Tiempo	peso seco	Tiempo	peso seco	Tiempo	peso seco	Tiempo	peso seco	Tiempo	peso seco	Tiempo	peso seco
2	0,02	2	0,02	2	0,02	2	0,02	2	0,02	2	0,02
4	0,028	4	0,028	4	0,027	4	0,026	4	0,023	4	0,021
6	0,045	6	0,041	6	0,035	6	0,035	6	0,043	6	0,042
8	0,092	8	0,088	8	0,072	8	0,058	8	0,084	8	0,078
10	0,11	10	0,10	10	0,11	10	0,097	10	0,11	10	0,095
12	0,45	12	0,35	12	0,35	12	0,12	12	0,17	12	0,14
14	0,78	14	0,67	14	0,58	14	0,32	14	0,21	14	0,20
16	0,97	16	0,89	16	0,77	16	0,65	16	0,43	16	0,39
18	1,02	18	1,00	18	0,98	18	0,89	18	0,74	18	0,71
20	1,78	20	1,65	20	1,59	20	1,02	20	0,99	20	0,95
22	2,23	22	2,20	22	2,01	22	1,78	22	1,23	22	1,00
24	2,37	24	2,22	24	2,05	24	1,98	24	1,3	24	1,01

Continuación del anexo 4.

E. Coli.

Peptona C	Peptona P	Peptona C	Peptona P	Peptona C	Peptona P	Peptona C	Peptona P	Peptona C	Peptona P	Peptona C	Peptona P
5g/L(100%)	0g/L(0%)	4g/L(80%)	1g/L(20%)	3g/L(60%)	2g/L(40%)	2,5g/L(50%)	2,5g/L(50%)	2g/L(40%)	3g/L(60%)	1g/L(20%)	4g/L(80%)
Tiempo	peso seco	Tiempo	peso seco	Tiempo	peso seco	Tiempo	peso seco	Tiempo	peso seco	Tiempo	peso seco
2	0,04	2	0,08	2	0,27	2	0,2	2	0,006	2	0,05
4	0,09	4	0,26	4	0,35	4	0,35	4	0,01	4	0,09
6	0,07	6	0,52	6	0,34	6	0,43	6	0,05	6	0,36
8	0,14	8	0,89	8	0,48	8	0,62	8	0,09	8	0,52
10	0,45	10	1,23	10	0,66	10	0,84	10	0,14	10	0,68
12	0,62	12	1,7	12	0,92	12	0,84	12	0,31	12	0,84
14	0,86	14	1,98	14	1,08	14	0,98	14	0,4	14	0,95
16	1,28	16	2,18	16	1,43	16	1,48	16	0,8	16	1,12
18	1,66	18	2,28	18	1,72	18	1,88	18	1,04	18	1,16
20	2,02	20	2,38	20	2,02	20	2,1	20	1,14	20	1,2
22	2,66	22	2,44	22	2,13	22	2,2	22	1,24	22	1,24
24	2,9	24	2,55	24	2,38	24	2,31	24	1,34	24	1,26

Continuación del anexo 4.

Sccharomyces cerviseae.

Peptona C	Peptona P	Peptona C	Peptona P	Peptona C	Peptona P	Peptona C	Peptona P	Peptona C	Peptona P	Peptona C	Peptona P
5g/L(100%)	0g/L(0%)	4g/L(80%)	1g/L(20%)	3g/L(60%)	2g/L(40%)	2,5g/L(50%)	2,5g/L(50%)	2g/L(40%)	3g/L(60%)	1g/L(20%)	4g/L(80%)
Tiempo	peso seco	Tiempo	peso seco	Tiempo	peso seco	Tiempo	peso seco	Tiempo	peso seco	Tiempo	peso seco
2	0,27	2	0,27	2	0,33	2	0,34	2	0,27	2	0,28
4	0,35	4	0,35	4	0,4	4	0,4	4	0,35	4	0,35
6	0,34	6	0,34	6	0,51	6	0,59	6	0,4	6	0,34
8	0,596	8	0,596	8	0,77	8	0,68	8	0,596	8	0,596
10	1,05	10	1,05	10	1,11	10	0,96	10	1,05	10	1,05
12	1,33	12	1,857	12	1,64	12	1,16	12	1,66	12	1,18
14	2,04	14	3,3	14	2,88	14	1,66	14	2,14	14	1,44
16	3,04	16	3,97	16	3,57	16	2,48	16	2,32	16	1,77
18	4,06	18	4,18	18	4	18	3,44	18	2,68	18	2,18
20	4,64	20	4,48	20	4,32	20	4,02	20	3,62	20	2,49
22	4,88	22	4,72	22	4,55	22	4,23	22	3,81	22	2,82
24	5,32	24	4,92	24	4,65	24	4,63	24	3,25	24	2,93

Anexo 5 Prueba de Rangos Múltiples Bacillus

Method: 95,0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous Groups
P 6 20% Pc/80% PP Bacillus	3	2,02	X
P 5 40% Pc/60% PP Bacillus	3	2,23333	X
P 4 50% Pc/50% PP Bacillus	3	2,86333	X
P 3 60% Pc/40% PP Bacillus	3	2,90333	X
P 2 80% Pc/20% PP Bacillus	3	3,12333	X
P 1 100% Pc/0% PP Bacillus	3	3,33333	X

Contrast	Difference	+/- Limits
P 1 Bacillus - P 2 Bacillus	*0,21	0,0882553
P 1 Bacillus - P 3 Bacillus	*0,43	0,0882553
P 1 Bacillus - P 4 Bacillus	*0,47	0,0882553
P 1 Bacillus - P 5 Bacillus	*1,1	0,0882553
P 1 Bacillus - P 6 Bacillus	*1,31333	0,0882553
P 2 Bacillus - P 3 Bacillus	*0,22	0,0882553
P 2 Bacillus - P 4 Bacillus	*0,26	0,0882553
P 2 Bacillus - P 5 Bacillus	*0,89	0,0882553
P 2 Bacillus - P 6 Bacillus	*1,10333	0,0882553
P 3 Bacillus - P 4 Bacillus	0,04	0,0882553
P 3 Bacillus - P 5 Bacillus	*0,67	0,0882553
P 3 Bacillus - P 6 Bacillus	*0,883333	0,0882553
P 4 Bacillus - P 5 Bacillus	*0,63	0,0882553
P 4 Bacillus - P 6 Bacillus	*0,843333	0,0882553
P 5 Bacillus - P 6 Bacillus	*0,213333	0,0882553

* denotes a statistically significant difference.

Anexo 6 Prueba de Rangos Múltiples (E.coli)

Method: 95,0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous Groups
P 6 20% Pc/80% PP E coli	3	1,26333	X
P 5 40% Pc/60% PP E coli	3	1,34	X
P 4 50% Pc/50% PP E coli	3	2,35333	X
P 3 60% Pc/40% PP E coli	3	2,38	X
P 2 80% Pc/20% PP E coli	3	2,55	X
P 1 100% Pc/0% PP E coli	3	2,90333	X

Contrast	Difference	+/- Limits
P 1 E coli - P 2 E coli	*0,353333	0,0308131
P 1 E coli - P 3 E coli	*0,523333	0,0308131
P 1 E coli - P 4 E coli	*0,55	0,0308131
P 1 E coli - P 5 E coli	*1,56333	0,0308131
P 1 E coli - P 6 E coli	*1,64	0,0308131
P 2 E coli - P 3 E coli	*0,17	0,0308131
P 2 E coli - P 4 E coli	*0,196667	0,0308131
P 2 E coli - P 5 E coli	*1,21	0,0308131
P 2 E coli - P 6 E coli	*1,28667	0,0308131
P 3 E coli - P 4 E coli	0,0266667	0,0308131
P 3 E coli - P 5 E coli	*1,04	0,0308131
P 3 E coli - P 6 E coli	*1,11667	0,0308131
P 4 E coli - P 5 E coli	*1,01333	0,0308131
P 4 E coli - P 6 E coli	*1,09	0,0308131
P 5 E coli - P 6 E coli	*0,0766667	0,0308131

* denotes a statistically significant difference.

Anexo 7 Prueba de Rangos Múltiples (Pseudomonas)

Method: 95,0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous Groups
P 6 20% Pc/80% PP Pseud	3	1,01333	X
P 5 40% Pc/60% PP Pseud	3	1,30667	X
P 4 50% Pc/50% PP Pseud	3	2,02	X
P 3 60% Pc/40% PP Pseud	3	2,05333	X
P 2 80% Pc/20% PP Pseud	3	2,22	X
P 1 100% Pc/0% PP Pseud	3	2,37	X

Contrast	Difference	+/- Limits
P 1 Pseud - P 2 Pseud	*0,15	0,0397796
P 1 Pseud - P 3 Pseud	*0,316667	0,0397796
P 1 Pseud - P 4 Pseud	*0,35	0,0397796
P 1 Pseud - P 5 Pseud	*1,06333	0,0397796
P 1 Pseud - P 6 Pseud	*1,35667	0,0397796
P 2 Pseud - P 3 Pseud	*0,166667	0,0397796
P 2 Pseud - P 4 Pseud	*0,2	0,0397796
P 2 Pseud - P 5 Pseud	*0,913333	0,0397796
P 2 Pseud - P 6 Pseud	*1,20667	0,0397796
P 3 Pseud - P 4 Pseud	0,0333333	0,0397796
P 3 Pseud - P 5 Pseud	*0,746667	0,0397796
P 3 Pseud - P 6 Pseud	*1,04	0,0397796
P 4 Pseud - P 5 Pseud	*0,713333	0,0397796
P 4 Pseud - P 6 Pseud	*1,00667	0,0397796
P 5 Pseud - P 6 Pseud	*0,293333	0,0397796

* denotes a statistically significant difference.

Anexo 8 Prueba de Rango Múltiples *Saccharomyces cerevisiae*

Method: 95,0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous Groups
P 6 20% Pc/80% PP Cerev	3	2,93	X
P 5 40% Pc/60% PP Cerev	3	3,25	X
P 4 50% Pc/50% PP Cerev	3	4,63	X
P 3 60% Pc/40% PP Cerev	3	4,64667	X
P 2 80% Pc/20% PP Cerev	3	4,92	X
P 1 100% Pc/0% PP Cerev	3	5,31667	X

Contrast	Difference	+/- Limits
P 1 Cerev - P 2 Cerev	*0,396667	0,0330168
P 1 Cerev - P 3 Cerev	*0,67	0,0330168
P 1 Cerev - P 4 Cerev	*0,686667	0,0330168
P 1 Cerev - P 5 Cerev	*2,06667	0,0330168
P 1 Cerev - P 6 Cerev	*2,38667	0,0330168
P 2 Cerev - P 3 Cerev	*0,273333	0,0330168
P 2 Cerev - P 4 Cerev	*0,29	0,0330168
P 2 Cerev - P 5 Cerev	*1,67	0,0330168
P 2 Cerev - P 6 Cerev	*1,99	0,0330168
P 3 Cerev - P 4 Cerev	0,0166667	0,0330168
P 3 Cerev - P 5 Cerev	*1,39667	0,0330168
P 3 Cerev - P 6 Cerev	*1,71667	0,0330168
P 4 Cerev - P 5 Cerev	*1,38	0,0330168
P 4 Cerev - P 6 Cerev	*1,7	0,0330168
P 5 Cerev - P 6 Cerev	*0,32	0,0330168

* denotes a statistically significant difference.