

Biodegradación de pelos y cerdas de porcino por *Kocuria rosea*

Analisse Bertsch^{1*}, Nereida Coello¹ e Isabel Díaz²

¹Laboratorio de Biotecnología Agroindustrial. Instituto de Química y Tecnología. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Apdo. 4579, Maracay. Aragua. Venezuela.

²Facultad de Ingeniería. Núcleo Cagua. Universidad Central de Venezuela. Apdo. 4579. Cagua 2122. Aragua. Venezuela.

RESUMEN

La finalidad de este trabajo consistió en optimizar las condiciones de cultivo (pH, concentración de sustrato y temperatura) necesarias para obtener nitrógeno amínico como resultado de la biodegradación de pelos y cerdas de porcinos por *Kocuria rosea*. Se utilizó la metodología de superficie de respuesta (MSR) con un diseño compuesto central ortogonal conformado por un factorial 2x3, 6 puntos estrellas y 3 puntos centrales. La MSR permitió determinar que las condiciones óptimas de cultivo fueron 66 g sustrato/L; pH 7,69 y 43°C en 24 h. La comparación entre el proceso optimizado y no optimizado permitió evidenciar un mejoramiento en la degradación del sustrato en 41% del nitrógeno amínico (mg/100 g), 12% en la proteína soluble (mg/mL) y 58% de la actividad proteolítica del caldo, con un incremento en 68% del aporte de la biomasa microbiana (g/L). Las condiciones de cultivo determinadas permitieron mejorar el proceso de biodegradación de los pelos y cerdas por *K. rosea* para la potencial obtención de bioproductos ricos en proteína y enzimas cuyo destino sea la alimentación animal, en armonía con el medio ambiente.

Palabras clave: pelos, porcino, fermentación, *Kocuria rosea*.

Biodegradation of hairs and bristles of hog by *Kocuria rosea*

ABSTRACT

The purpose of this work consisted in optimizing the conditions of culture (pH, concentration substrate, and temperature) necessary to obtain aminic nitrogen from the biodegradation of hairs and bristles of hog by *Kocuria rosea*. The methodology of response surface was used with an orthogonal central compound design composed by a 2x3 factorial, 6 central points and 3 star points. The results showed that optimal culture conditions were 66 g substrate/L, pH 7.69 and 43°C in 24 h. The comparison between the optimized and non optimized fermentation process evidenced an improvement in substrate biodegradation in 41% for aminic nitrogen (mg /100 g), 12% soluble protein (mg/mL) and 58% in proteolytic activity. The microbial biomass (g/L) was increased in 68%. The optimized culture conditions allowed the improvement of hair hog and bristles biodegradation by *K. rosea* to obtain a bioproduct rich in protein and enzymes to use in feedstock, with environmental friendliness.

Key words: hog hair, swine, fermentation, *Kocuria rosea*.

INTRODUCCIÓN

En Venezuela, para el año 2007 la producción de carne porcina fue de 150 769 t obteniéndose a partir de su procesamiento 3 015 t de pelos y cerdas como desechos, los cuales representan 2% del peso del animal (Feporcina,

2009). La acumulación de este residuo presenta incidencias ambientales ya que está compuesto por queratina en 90%, la cual es una proteína de tipo fibroso cuyas cadenas polipeptídicas se ordenan en filamentos que forman una estructura secundaria con enlaces disulfuro entre grupos SH de cisteínas vecinas, que estabilizan el complejo e impiden el ataque de las enzimas, lo que genera una lenta biodegradación (Vázquez *et al.*, 2008).

*Autor de correspondencia: Analisse Bertsch

E-mail: bertscha@gmail.com

Recibido: mayo 20, 2009

Aceptado: julio 09, 2009

Actualmente, los pelos y cerdas de porcinos se utilizan para fabricar cepillos, pinceles, filtros de aire y en la alimentación animal. Para esta última actividad, éstos son sometidos a tratamientos para mejorar su digestibilidad, los cuales se basan en provocar la hidrólisis de la queratina por ruptura de los enlaces disulfuro a fin de obtener aminoácidos libres o péptidos. Para ello, el material queratinoso es procesado a elevadas temperaturas y presiones, consumiendo gran cantidad de energía. La inclusión de la harina de pelos hidrolizados en dietas para cerdos o pollos de engorde, debido a su déficit en aminoácidos esenciales tales como la lisina y metionina, está limitada a sustituir 2-3% de harina de soya en raciones balanceadas (Wang y Parsons, 1997; Kornegay y Thomas, 1973).

Los bioprocesos representan una opción atractiva al ser considerados como tecnología limpia, rentable y de fácil manejo. La biodegradación del material queratinoso por microorganismos mediante la excreción de enzimas proteolíticas, representa un método alternativo para aumentar su valor nutricional para el consumo animal, obtención de proteasas comerciales y recientemente, la producción de biohidrógeno (Bálint, 2006). En este sentido, la cepa bacteriana LPB-3 de *Kocuria rosea* ha sido aislada y estudiada por su capacidad de excretar enzimas proteolíticas de tipo queratinolíticas (Coello y Vidal, 2001). Estas enzimas permiten hidrolizar la queratina de plumas y obtener un producto rico en proteínas destinado al consumo animal, enriquecido por la proteína microbiana (harina de plumas fermentadas) y pigmentos carotenoides (Bertsch y Coello, 2005). Su utilización en la degradación de pelos y cerdas de porcinos no ha sido señalada en la literatura, por lo que el estudio de la bioconversión de éstos por *K. rosea* requiere el establecimiento de las condiciones de cultivo.

La metodología de superficie de respuesta (MSR) representa una alternativa de gran utilidad en la optimización de procesos biotecnológicos, ya que proporciona información completa de la relación que pueda existir entre las variables que intervienen en el proceso, sin necesidad de conocer exactamente el modelo teórico que las relaciona. Se basa en la aplicación de un conjunto de métodos y procedimientos matemáticos y estadísticos, con los que se modelan y analizan problemas en los cuales una respuesta de interés es influenciada por varias variables, siendo el objeto optimizar esta respuesta (Adinarayana y Ellaiah, 2002; Chacín, 1998).

Por estas razones, en el presente trabajo se evaluaron las condiciones óptimas (pH, concentración de sustrato y temperatura) de cultivo de la cepa LPB-3 de *K. rosea* con el objeto de degradar hasta nitrógeno amínico, la proteína contenida en los pelos y cerdas de porcinos. Así mismo, se compararon bajo condiciones optimizadas, el aporte de

proteína microbiana, nitrógeno amínico, proteína soluble y actividad proteolítica respecto a las condiciones sin optimizar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó la bacteria *K. rosea* (cepa LPB-3) aislada en el Laboratorio de Procesos Biotecnológicos del Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela (Vidal *et al.*, 2000).

Las cerdas y pelos fueron obtenidos a partir de porcinos recién sacrificados por una empresa de productos cárnicos localizada en el estado Aragua, Venezuela. Una vez lavado con abundante agua, el material fue esterilizado a 121°C por 15 min, deshidratado en un secador de bandejas a 60°C durante 10 h y molido en un molino de martillo (tamiz 1 mm Ø), siendo finalmente almacenado a 5°C para su conservación. Se determinó su composición bromatológica en cuanto a humedad, materia seca, proteína cruda, cenizas y grasa, según los procedimientos descritos en la AOAC (1990).

Medios, condiciones de cultivo y controles de pureza

El medio salino mínimo utilizado contuvo, por cada litro de agua potable, lo siguiente: NH_4Cl (0,48 g), NaCl (0,5 g), K_2HPO_4 (0,43 g), KH_2PO_4 (0,39 g), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,052 g) y extracto de levadura (0,054 g). Los precultivos y cultivos sin optimizar se llevaron a cabo en fiolas a 40°C, 90 rpm, pH 7,5 y una concentración del sustrato de 20 g/L durante 24 h. Los cultivos a su vez se realizaron durante 30 h. Durante las fermentaciones se llevaron controles de pureza de los cultivos a partir de observaciones al microscopio de frotis teñidos con coloración Gram y la realización de siembras en placas de Petri con agar nutritivo (Coello y Vidal, 2001).

Toma y tratamiento de las muestras

Para el tratamiento de las muestras, el caldo del cultivo fue filtrado a través de papel Whatman #4 con el fin de eliminar los restos del sustrato que no fueron solubilizados durante la fermentación.

A partir del filtrado obtenido anteriormente, se tomó una alícuota para la estimación de la biomasa con lectura de la absorbancia a 600 nm, para su conversión a peso seco mediante una curva de calibración elaborada para tal fin. El filtrado remanente fue centrifugado a 10 000 rpm por 10 min en una centrífuga Beckman GS-15R para obtener un sobrenadante libre de células, el cual fue utilizado para la determinación de nitrógeno amínico mediante el método de Sørensen (Rodríguez y Martín, 1980), proteína soluble según Bradford (1976) usando el reactivo BioRad y la albúmina sérica de bovino como estándar (SIGMA®), y actividad proteolítica mediante método espectrofotométrico,

empleando caseína como sustrato e incubando la muestra a 40 °C por 20 min. En este último caso, la reacción se llevó a cabo en un volumen final de 0,5 mL, y una vez transcurrido el tiempo se detuvo por adición de 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA 5%). Una unidad de actividad enzimática fue definida como el incremento de una unidad de absorbancia a 280 nm y determinada en un Shimadzu UV2101PC (Coello y Vidal, 2001).

Diseño del experimento

Se aplicó la MSR a fin de realizar la búsqueda de las condiciones óptimas para la variable nitrógeno amínico presente en el caldo (Y1) como indicador de la degradación proteica. Tal como se presenta en el Cuadro 1, las variables independientes consideradas fueron: pH (X_1), concentración del sustrato (X_2) y temperatura (X_3). Se planteó un modelo polinomial de segundo orden en tres variables para describir la respuesta de interés, cuya ecuación se representó por:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2$$

Mediante el polinomio ajustado a los datos para la variable dependiente se estudió la superficie de respuesta con la finalidad de establecer las condiciones "óptimas" de cultivo de *K. rosea* para la degradación de la proteína hasta aminoácidos.

Cuadro 1. Combinaciones de las variables consideradas en el diseño compuesto central ortogonal.

	Variables independientes ¹			pH	Sustrato (g/L)	Temperatura (°C)
	X ₁	X ₂	X ₃			
Factorial	-1	-1	1	6,5	10	47,4
	-1	1	1	6,5	30	47,4
	1	-1	1	8,5	10	47,4
	1	1	1	8,5	30	47,4
	-1	-1	-1	6,5	10	32,6
	-1	1	-1	6,5	30	32,6
	1	-1	-1	8,5	10	32,6
	1	1	-1	8,5	30	32,6
Puntos	-1,35	0	0	5,2	20	40,0
Estrellas	1,35	0	0	9,9	20	40,0
	0	-1,35	0	7,5	5	40,0
	0	1,35	0	7,5	45	40,0
	0	0	-1,35	7,5	20	30,0
	0	0	1,35	7,5	20	50,0
	Puntos	0	0	0	7,5	20
Centrales	0	0	0	7,5	20	40,0
	0	0	0	7,5	20	40,0

¹Variables: pH (X_1), concentración del sustrato (X_2) y temperatura (X_3).

Se empleó un análisis de regresión múltiple para estimar los coeficientes del polinomio planteado, empleando para la obtención de los datos un diseño compuesto central ortogonal, el cual contempló 17 tratamientos distribuidos de la siguiente forma: 8 correspondientes a un factorial (2x3) con niveles -1,1; 6 puntos estrellas con niveles de $\alpha \pm 1,3531$ y 3 repeticiones del punto central (Cuadro 1). La información generada se analizó por medio de SYSTAT (1997).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La composición bromatológica de los pelos y cerdas de porcino se caracterizó por presentar un contenido de proteína cruda ($95,6 \pm 1,5\%$) superior a lo reportado por Vázquez *et al.* (2008), con una participación menor de grasa ($2,85 \pm 0,4\%$), minerales ($1,54 \pm 0,1\%$) y humedad ($9,00 \pm 0,08\%$).

La aplicación de la MSR permitió establecer el modelo que estima la respuesta en función de las variables independientes. El 93% de la variación total fue explicada por el modelo y no se evidenció falta de ajuste (Cuadros 2 y 3). Tal como se observa en el Cuadro 3, la concentración de pelos y cerdas (X_2) fue el factor de principal influencia sobre la cantidad de nitrógeno amínico presente en el caldo, así como la temperatura (X_3) luego de 30 h de fermentación. La influencia del pH (X_1) resultó de menor relevancia.

Las gráficas de superficie de respuesta muestran la tendencia a aumentar la cantidad de nitrógeno amínico en el caldo a medida que se incrementa la cantidad de pelos y cerdas en el medio de cultivo (Figura 1).

Cuadro 2. Coeficientes estimados por regresión múltiple del modelo polinómico determinado para la variable nitrógeno amínico ($R^2=0,93$).

Factor	Coeficiente	Nitrógeno Amínico	
		t	p
Constante	16,86	29,78	0,000
X ₁	-0,29	-0,90	0,39
X ₂	2,66	8,32	0,00
X ₃	0,56	1,80	0,12
X ₁ X ₁	-0,74	-1,75	0,12
X ₂ X ₂	-0,54	-1,29	0,24
X ₃ X ₃	-1,79	-4,26	0,004
X ₁ X ₂	0,18	0,46	0,66
X ₁ X ₃	0,001	0,003	0,99
X ₂ X ₃	0,36	0,92	0,39

p=probabilidad; t = T-Student.

Cuadro 3. Análisis de varianza para el nitrógeno amínico.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F _c	F _t
Tratamiento	123,69	14	8,83	52,55	
Regresión	115,70	9	12,85	76,48	
Falta de ajuste	7,99	5	1,60	9,51	19,43*
Error Exp.	0,34	2	0,17		
Total		16			

*F_{calculado} (F_c) < F_{tabulado} (F_t), *p < 0,05

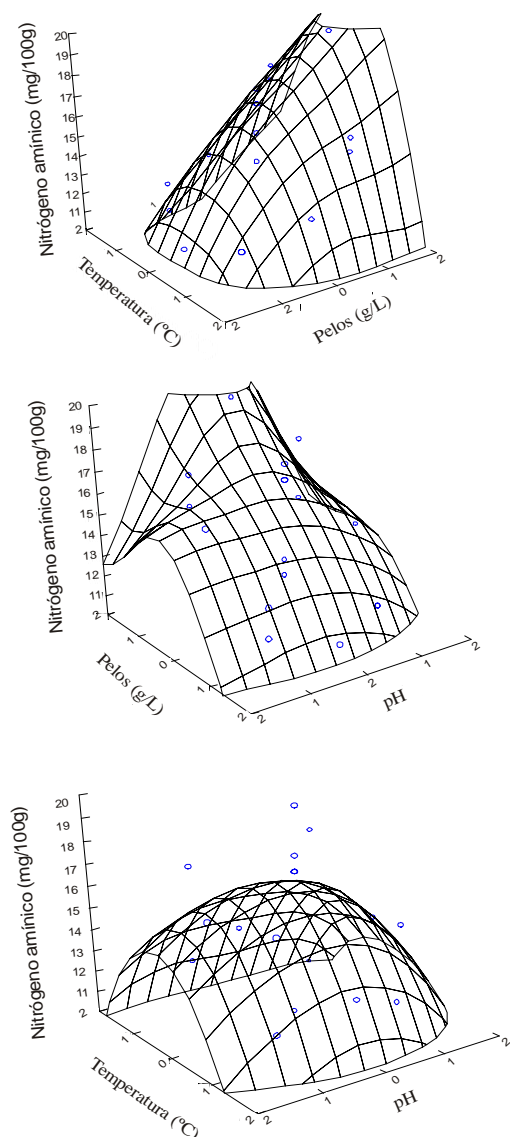


Figura 1. Representación gráfica de las superficies de respuesta para la aparición de nitrógeno amínico en el caldo [a. Temperatura (X₃) y Concentración de pelos (X₂); b. Concentración de pelos (X₂) y pH (X₁); c. Temperatura (X₃) y pH (X₁)].

La caracterización de las superficies de respuesta del nitrógeno amínico señaló un punto donde el grado de degradación proteica sería máximo. Allí la cantidad de nitrógeno amínico estimada en el caldo fue de 20,4 mg/100 g al llevar a cabo el cultivo a pH 7,7 con 66,3 g/L de sustrato y una temperatura de 43°C. El modelo obtenido fue el siguiente:

Nitrógeno amínico (mg/100 g) = 16,86 – 0,29 (pH) + 2,66 (Pelos) + 0,58 (T) – 0,74 (pH)² – 0,54 (Pelos)² – 1,79 (T)² + 0,18 (pH)(Pelos) + 0,001 (T)(pH) + 0,36 (T)(Pelos), donde pelos hace referencia a la concentración de pelos y cerdas (g/L) y T a la temperatura (°C).

Comparación de la cinética de fermentación

El comportamiento de la fermentación evaluando el crecimiento del microorganismo, nitrógeno amínico, proteína soluble y actividad proteolítica en condiciones optimizadas y sin optimizar se observa en la Figura 2.

En lo relativo al crecimiento del microorganismo (Figura 2a), este alcanzó un valor máximo de 1,55 g/L en 48 h durante la fase estacionaria de la biomasa bajo condiciones optimizadas, valor que superó en 68% al control. El incremento neto en la cantidad de biomasa obtenida durante la fermentación fue 1,25 g/L, mientras en el control se limitó a 0,5 g/L. Así mismo, la productividad volumétrica fue de 0,026 g L⁻¹h⁻¹, la cual fue 60% superior a la obtenida bajo las condiciones del control (0,0104 g L⁻¹h⁻¹). *K. rosea* es una bacteria no patógena cuya biomasa puede enriquecer con aminoácidos esenciales la proteína proveniente del sustrato evaluado, el cual al igual que las plumas, muestra deficiencias en aminoácidos como histidina, metionina y lisina (Bertsch y Coello, 2005; Wang y Parsons, 1997).

En cuanto a la degradación del sustrato proteico, se observa en la Figura 2b el incremento del contenido de nitrógeno amínico en el caldo de fermentación, superando en 41% al control en 48 h. El incremento neto en la cantidad de nitrógeno amínico obtenido durante el cultivo (17 mg/100 g) fue superior en 65% al control. Para complementar la información acerca de la degradación del sustrato proteico se evaluó el contenido de proteína soluble en el caldo y la actividad proteolítica (Figuras 2c y 2d). Ambas variables se incrementaron durante la fermentación, alcanzando valores superiores en 12,3 y 52% referido al control, respectivamente. La actividad proteolítica específica máxima de 9 405,75 U/mg de proteína a las 24 h de cultivo fue superior a la reportada previamente para *K. rosea* de 103 U/mg a las 48 h de cultivo en medio suplementado con pelos y cerdas (Bernal, 2005).

Las condiciones de cultivo optimizadas permitieron obtener un incremento en el crecimiento de *K. rosea* y en la degradación proteica, siendo de gran relevancia en estas condiciones de cultivo el incremento en 70% de la

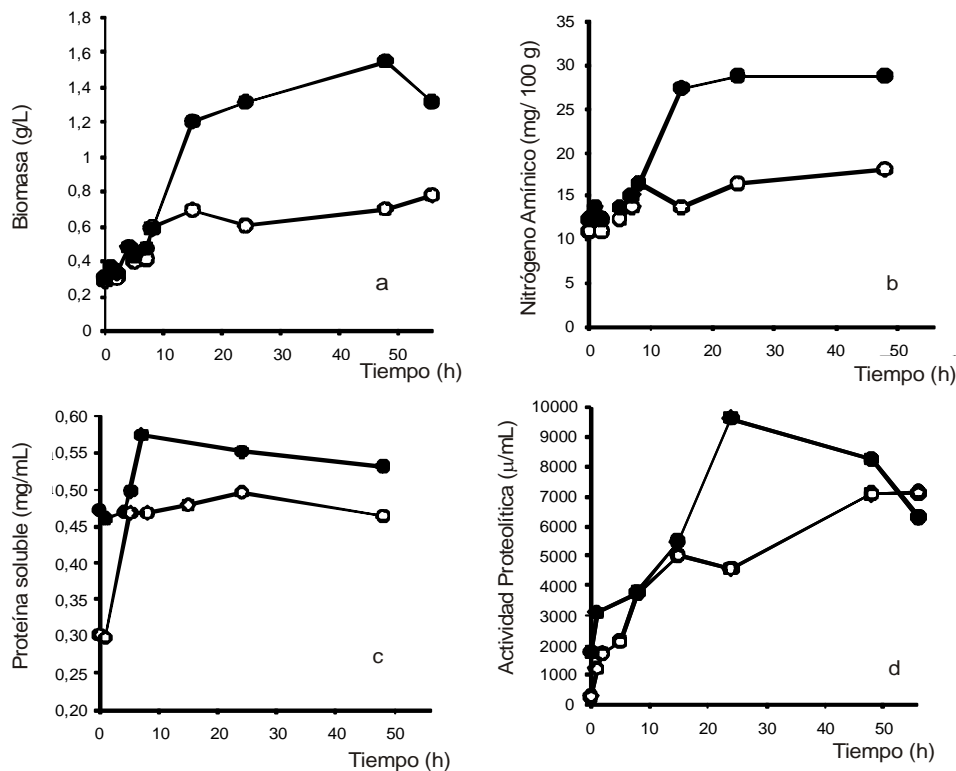


Figura 2. Crecimiento de *K. rosea* (a), contenido de nitrógeno amínico (b), proteína soluble (c) y actividad proteolítica (d) en el caldo del cultivo con pelos y/o cerdas de porcinos en condiciones óptimas (●) y sin optimizar (○).

concentración del sustrato a emplear en la formulación del medio de cultivo. Esto parece inducir un mayor crecimiento del microorganismo producto de una mayor degradación de los pelos y cerdas hasta péptidos y aminoácidos.

En este sentido, las enzimas proteolíticas excretadas al medio por los microorganismos pueden ser constitutivas o inducibles, y en la mayoría de los casos, la velocidad de síntesis parece estar regulada por inhibición del producto final y represión catabólica. Se ha reportado que en el caso de la excreción de enzimas queratinolíticas por *K. rosea* en medios con plumas, éstas son el sustrato inductor (Bernal, 2005).

Estos resultados constituyen la primera etapa en la definición de un proceso de bioconversión de este sustrato para la obtención de una harina de pelos y cerdas fermentadas de porcinos, rica en aminoácidos y proteína soluble o un aditivo enzimático que aporte proteasas cuyo destino sea, en ambos casos, la alimentación animal.

CONCLUSIONES

Las condiciones de cultivo determinadas mediante la MSR permitieron mejorar el proceso de biodegradación de pelos y cerdas de porcinos desechados por la industria cárnica

a partir del empleo de *K. rosea*, siendo una estrategia para la potencial obtención de bioproductos ricos en proteína y enzimas cuyo destino sea la alimentación animal, bajo un esquema en armonía con el medio ambiente.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo económico al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) de la Universidad Central de Venezuela mediante el Proyecto PI-01-37-5268-2007, así como a la TSU Hazel Román por su colaboración técnica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adinarayana, K.; P. Ellaiah. 2002. Response surface optimization of the critical medium components for the production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus sp.* J. Pharm. Sci. 5: 272-278.
- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. Washington EUA.
- Bálint, B. 2006. Biohydrogen production from keratin-containing animal wastes. Acta Biol. Szeged. 50: 137.

- Bernal, C. 2005. Aspectos fisiológicos de la cepa *Kocuria rosea* y estudio bioquímico de las enzimas queratinolíticas excretadas en cultivos sumergidos con sustratos queratinosos. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. 102 p.
- Bertsch, A.; N. Coello. 2005. A biotechnological process for treatment and recycling poultry feathers as a feed ingredient. *Bioresource Technol.* 96: 1703-1708.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Coello, N.; L. Vidal. 2001. *Kocuria rosea* as a new feather degrading bacteria. In: Durieux A. y J.P. Simon (Eds). *Applied Microbiology*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp.165-174.
- Chacín, F. 1998. *Análisis de Regresión y Superficie de Respuesta*. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela.
- FEPORCINA. 2009. Federación Venezolana de Porcicultores (FEPORCINA). Disponible en: www.feporcina.org.marzo (Consulta: 17-03-2009).
- Kornegay, E.; H. Thomas. 1973. Evaluation of hydrolyzed hog hair meal as a protein source for swine. *J. Anim. Sci.* 36: 279-284.
- Rodríguez, B.; E. Martín. 1980. *Análisis de Alimentos*. Tomo I. edit. OBE. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- SYSTAT, 1997. *Systat 7.0 for Window: Statistics*. SPSS, Chicago. EUA.
- Vázquez, I.; A. Aguilera; L. Prado-Barragán; C. Aguilar. 2008. Producción fúngica de proteasas inducidas con pelo de cerdo. *Información Tecnológica* 19: 33-40.
- Vidal, L.; P. Christen; N. Coello. 2000. Feather degradation by *Kocuria rosea* in submerged culture. *World J. Microbiol. Biotech.* 16: 551-554.
- Wang, X.; C.M. Parsons. 1997. Effect of processing systems on protein quality of feather meals and hog hair meals. *Poultry Sci.* 76: 491-496.