Design of a culture medium for protease production for *Bacillus sp.* MIT-MM from poultry waste

Helí Miranda-Chávez[1], Angélica Miranda-Jara[2], Pedro Arteaga-Llacza[2], Félix Carbajal-Gutiérrez[3], César Herbozo-y Romero[3], Alberto Palacios-Miñano[5], Henry Obregón-Tinoco[5]

[1]Universidad Nacional de Trujillo, hmirandch@gmail.com
[2] Universidad Nacional Federico Villarreal, amiranda@unfv.edu.pe, parteaga@unfv.edu.pe
[3] Universidad Nacional de Ingeniería, felix.carbajal.g@uni.edu.pe, cherbozo@uni.edu.pe
[4] Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas, alberto.palacios@upc.pe
[5] Pontificia Universidad Católica del Perú, hobregon@pucp.edu.pe

Abstract– ***The accumulation of chicken feathers poses a serious environmental problem, making their valorization through bacterial degradation a sustainable alternative. The objective of this study was to identify the critical factors influencing protease production by Bacillus sp. using chicken feathers as a substrate. A Plackett-Burman screening design was implemented to evaluate the effect of nine nutritional and environmental factors on two response variables: total protein content and specific enzyme activity. The results revealed a marked dissociation between these two responses. Protein content (0.1044 to 0.1606 mg/L) was significantly determined ($p < 0.05$) by chemical and nutritional variables: pH, keratin concentration, yeast extract, and sulfur. In contrast, specific activity was highly volatile (0 to 121,362.5 AU/mg) and was critically regulated ($p < 0.01$) only by physical and co-activation factors: temperature and magnesium concentration. Formulation 2 stood out as the optimal screening condition, achieving a maximum specific activity of 121,362.5 AU/mg of protein. It is concluded that protein synthesis and protease activation kinetics in Bacillus sp. operate under independent regulatory mechanisms, establishing temperature and magnesium as the key variables for optimizing and scaling up this bioprocess with potential applications in the circular economy.***

Keywords- Bacillus sp., Plackett-Burman, proteases, keratin, protein content, specific activity.

Diseño del medio de cultivo para producción de proteasa de *Bacillus sp. MIT-MM* a partir de desechos avícolas

Helí Miranda-Chávez[1], Angélica Miranda-Jara[2], Pedro Arteaga-Llacza[2], Félix Carbajal-Gutiérrez[3], César Herbozo-y Romero[3], Alberto Palacios-Miñano[5], Henry Obregón-Tinoco[5]

[1]Universidad Nacional de Trujillo, hmirandch@gmail.com
[2] Universidad Nacional Federico Villarreal, amiranda@unfv.edu.pe, parteaga@unfv.edu.pe
[3] Universidad Nacional de Ingeniería, felix.carbajal.g@uni.edu.pe, cherbozo@uni.edu.pe
[4] Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas, alberto.palacios@upc.pe
[5] Pontificia Universidad Católica del Perú, hobregon@pucp.edu.pe

Resumen*– La acumulación de plumas de pollo genera un grave problema ambiental, por lo que su valorización mediante degradación bacteriana representa una alternativa sostenible. El objetivo de este estudio fue identificar los factores críticos que influyen en la producción de proteasas por Bacillus sp. utilizando plumas de pollo como sustrato. Se implementó un diseño de cribado Plackett-Burman para evaluar el efecto de nueve factores nutricionales y ambientales sobre dos variables de respuesta: el contenido proteico total y la actividad enzimática específica. Los resultados revelaron una marcada disociación entre ambas respuestas. El contenido proteico (0.1044 a 0.1606 mg/L) estuvo determinado significativamente ($p < 0.05$) por variables químicas y nutricionales: pH, concentración de queratina, extracto de levadura y azufre. En contraste, la actividad específica fue altamente volátil (0 a 121,362.5 U.A./mg) y estuvo regulada de forma crítica ($p < 0.01$) solo por factores físicos y de coactivación: la temperatura y la concentración de magnesio. La Formulación 2 destacó como la condición óptima del cribado, alcanzando la máxima actividad específica de 121,362.5 U.A./mg de proteína. Se concluye que la síntesis de proteínas y la activación cinética de las proteasas en Bacillus sp. operan bajo mecanismos de regulación independientes, consolidando a la temperatura y al magnesio como las variables clave para la optimización y escalado de este bioproceso con potencial en la economía circular.

Palabras clave*— Bacillus sp., Plackett-Burman, proteasas, queratina, contenido proteico, actividad específica.

I. Introducción

La industria avícola se erige como un sector preponderante en la agricultura global (más del 80%) en la producción total de ganado [1] y produciendo anualmente cerca de 8 mil millones de toneladas de desechos plumeros. Las plumas están compuestas por queratina, que es una proteína estructuralmente muy estable [2] y se distingue por sus interacciones hidrofóbicas y enlaces disulfuro sólidos [3]. Esto constituye tanto una problemática medioambiental como un recurso no explotado. Aunque los residuos de plumas representan actualmente entre el 5 % y el 7 % de la biomasa total de aves de corral, menos del 5 % de estos se valoran a través de procesos industriales [4]. Las proteasas microbianas se distinguen de las proteasas de origen animal y vegetal debido a sus propiedades singulares, particularmente en términos de su especificidad. Se clasifican en función de su origen y del pH ideal para su actividad. Por lo tanto, es posible diferenciar las proteasas de bacterias, levaduras y mohos; además, dentro de estos conjuntos se pueden distinguir las proteasas neutras, alcalinas y ácidas [5].

Comercialmente son importantes por su amplia utilización en la fabricación de detergentes biológicos activos, ablandamiento de carnes, curtido de pieles, suavizado de fibras textiles y en otros usos más [6]. Además, estas enzimas cumplen un rol muy importante en la fisiología microbiana; así, su síntesis regulada permite al microorganismo utilizar eficazmente diferentes substratos proteicos cuando se encuentran a su disposición [6].

En la obtención industrial de enzimas proteolíticas microbianas se busca la utilización de microorganismos que permitan una alta rentabilidad y que el producto sea de fácil separación; de esta manera se asegura una eficiente compatibilidad de las industrias biotecnológicas [5,6].

Las proteinasas generadas por las especies de los géneros *Bacillus, Aspergillus* y *Streptomyces* son las más recomendables entre ellas. Estas secretan sus enzimas al entorno que las rodea, lo que posibilita su sencilla separación a través de centrifugación [7,8].

Todas las especies de Bacillus actualmente conocidas secretan una gran variedad de enzimas extracelulares solubles que se utilizan en las industrias para la elaboración de diversos productos (14,16,19,35).

Una de las proteasas bacterianas más estudiadas es la subtilopeptidasa A, secretada por diversas cepas de *Bacillus subtilis*. En relación con esta enzima se ha determinado que su peso molecular es relativamente pequeño y su pH óptimo está entre [9]. *B. licheniformis* es uno de los organismos más estudiados debido a su robusto sistema de proteasas extracelulares que incluye metaloproteasas y disulfuro reductasas que actúan sinérgicamente para romper la queratina [4]. Se han identificado cepas altamente eficientes como *Streptomyces shaoguanensis* (cepa KKT), capaz de degradar concentraciones elevadas de plumas (hasta el 10% p/v) mediante una respuesta fisiológica adaptativa que libera

amoníaco y utiliza mecanismos reductores independientes del sulfito [10]. También se reporta el uso de *Stenotrophomonas maltophilia* y hongos como *Aspergillus flavus* para la descomposición de plumas en fermentación sumergida [11]. La degradación de la queratina no depende de una sola enzima, sino de un cóctel enzimático y procesos químicos coordinados. Primero la tiolisis, es el paso inicial crítico donde se reducen los enlaces disulfuro (S-S) mediante agentes reductores producidos por el microbio (como el sulfito o el sulfuro de hidrógeno) o enzimas disulfuro reductasas, desestabilizando la proteína [12,13]. Y luego la hidrólisis enzimática, que una vez roto el puente disulfuro, las queratinasas (serina-proteasas y metaloproteasas) pueden acceder a la cadena polipeptídica para hidrolizarla en péptidos y aminoácidos libres [12,14].

Las investigaciones indican que la producción de estas proteasas depende estrechamente de las condiciones de cultivo. Por ejemplo, en estudios con *B. licheniformis*, se alcanzó una producción óptima tras 72 horas de incubación a un pH alcalino de 9, utilizando glucosa y peptona como suplementos de carbono y nitrógeno. La liberación de amoníaco durante la fermentación ayuda a mantener este ambiente alcalino necesario para la actividad enzimática [12,15]. Las proteasas obtenidas a partir de plumas tienen un alto valor industrial en diversos sectores. Por ejemplo, en detergentes se han utilizado con éxito para eliminar manchas difíciles (sangre, remolacha, grasa) de los tejidos, demostrando ser agentes de limpieza biológicos eficaces [16]. Asimismo, como biofertilizantes, los hidrolizados de plumas obtenidos tras la acción enzimática son ricos en aminoácidos (especialmente valina y leucina) y han demostrado potenciar significativamente el crecimiento de plantas en comparación con fertilizantes comerciales [17]. Y en la industria de piensos permiten transformar un desecho en una fuente de proteína soluble y digerible para la alimentación animal [18]. Este trabajo busca determinar el medio de cultivo ideal para la cepa *Bacillus sp*. MIT-MM.

El presente estudio tuvo como objetivo optimizar el medio de cultivo para la producción de proteasa a partir de residuos de plumas de aves de corral mediante fermentación con *Bacillus sp.* Mediante el diseño de Plackett – Burmann y lograr la valorización simultánea de los residuos y la producción de enzimas, estableciendo así un bioproceso sostenible para la generación industrial de proteasa.

II. Materiales y métodos

A. Material biológico

El cultivo microbiano que se usó fue una cepa de *Bacillus sp.* proporcionado por el Laboratorio de Microbiología Industrial de la Universidad Nacional de La Libertad - Trujillo, denominado como cepa *Bacillus sp*. MIT-MM.

B. Procedimiento experimental

El estudio se realizó según el Diseño Plackett-Burman con 9 factores y 10 corridas (Tabla 1).

C. Preparación del sustrato caseína

Se disolvió 10 g de caseína (Caseína bovina Hammarsten, Sigma-Aldrich, USA) en 400 mL de solución de NaOH al 0.2% (p/v). Se enfrió a temperatura ambiente y después se mezcló con 5 mL de tinta china. Se agitó la suspensión con un agitador magnético durante 30 minutos. Se añadió 8 – 9 mL gota a gota ácido acético al 0.3% (v/v) para una completa precipitación. Se eliminó el precipitado negro por filtración, se lavó con 500 mL de agua y se transfirió el precipitado a una placa de Petri. Se secó el precipitado a 80 °C y luego se sometió a horno de aire caliente a 200 ℃ por 4 horas. Esta caseína modificada térmicamente y conteniendo tinta china es molida en un mortero y suspendida repetidamente en NaOH al 1 – 4 % (p/v), hasta que la mayoría de las partículas negras sean eliminadas. Se filtró el substrato, lavándose con agua. Se secó a 80℃ y se molió en un mortero para obtener partículas finas.

D. Preparación de queratina

La queratina se obtuvo usando 20 g de pluma de pollo trituradas, para realizar digestión con un 1 L de agua durante 10 horas, luego se eliminó el agua y los trozos de plumas en maceraron en una mezcla de 200 mL de alcohol/éter (1:1) por 10 horas. El residuo seco se hirvió suavemente a reflujo en un matraz redondo con 190 mL de ácido acético glacial (100% anhidro p.a. EMSURE® ACS, ISO), durante 40 – 50 horas, se filtró la solución resultante y se destiló el ácido acético glacial. El residuo de consistencia siruposa se vertió sobre placas de vidrio, se secó a temperatura 90 °C ± 1 °C se separó con una espátula la queratina que formaba laminillas y se puso en desecador.

D. Producción de proteasa

Preparación del inóculo

Se tomó una alícuota del cultivo de *Bacillus sp*. MIT-MM, conservado en tubos de agar nutritivo y se sembró en placas de agar-queratina, las cuales fueron incubadas a 37° C por espacio de tres días (72 horas).

Estandarización del inóculo

Se preparó el inóculo mediante una suspensión en solución salina fisiológica estéril, con una concentración final de 10^9 células/mL, usando el cultivo que creció en las placas de agar-queratina.

Producción de la enzima

Las preparaciones del medio base, que se usaron para medir el impacto de las variables ambientales y nutricionales en la producción de proteasas por *Bacillus sp*., se hicieron con un volumen de 50 mL por triplicado en frascos de vidrio y a cada uno se le suministró 0.5 mL del inóculo de *Bacillus sp*. Los frascos fueron incubados a 15 y 45 °C según el diseño de Placket - Burman por tres días con agitación constante. En una segunda etapa los frascos se incubaron a 30 °C en agitación por 3 días. Al cabo del tiempo programado, los contenidos de los frascos incubados se centrifugaron a 5000 rpm por 10 minutos. Cada sobrenadante se recogió en frascos estériles y se dializó,

utilizando membranas de colodión, durante 12 horas en agua destilada y durante 24 horas en agua corriente. Las soluciones enzimáticas se concentraron aireando el material dializado que se encontraba en la membrana de colodión con un ventilador. Luego se centrifugaron y dializaron nuevamente. Estas preparaciones obtenidas fueron consideradas como enzima cruda para posteriores ensayos enzimáticos.

D. Cuantificación de la proteína total

Para establecer la cantidad total de proteínas presentes en el extracto enzimático, se aplicó la técnica de Lowry y se utilizó como estándar albúmina de suero bovino (BSA) [19]. Se documentaron las mediciones de absorbancia a una longitud de onda de 660 nm, y se extrapoló el nivel de proteínas con base en una curva estándar de calibración creada con concentraciones conocidas de BSA.

E. Determinación de la actividad de la proteasa

La actividad enzimática se determinó utilizando el método de la caseína alcalina. Una Unidad de Actividad Proteolítica (U. A.) se define como la cantidad de enzima capaz de liberar un micromol de tirosina por minuto bajo las condiciones del ensayo (pH 9.0, 50 °C). según el protocolo modificado de Sigma-Aldrich [20].

$$Actividad\ \left(\frac{U}{mL}\right) = \frac{\mu g\ de\ Tirosina\ liberados\ x\ Volumen\ total\ del\ ensayo\ (mL)}{Peso\ molecular\ tirosina\ \left(181.2\frac{g}{mol}\right) * Tiempo\ (15\ min) * Volumen(mL)}$$

La actividad específica se expresa en Unidades por miligramo de proteína (U.A./mg) y se calcula dividiendo la actividad enzimática entre la concentración de proteínas totales:

$$Actividad\ Específica\ \left(\frac{UA}{mg\ de\ proteína}\right) = \frac{Actividad\ (\frac{U}{mL})}{Concentración\ de\ Proteína\ Total\ (\frac{mg}{mL})}$$

F. Análisis de datos

Se realizó un análisis del Diseño Plackett – Burman con el Software MS Excel. (Massachusetts, USA). Los parámetros cinéticos enzimáticos se muestran con su respectiva media.

II. Resultados

Los resultados de la cinética enzimática para las 10 formulaciones del diseño de cribado se presentan en la Tabla II. Se observó una marcada disociación entre la acumulación de biomasa proteica y la eficiencia catalítica de las enzimas secretadas. Mientras que el contenido proteico total se mantuvo en un rango estrecho y homogéneo (entre 0.1044 y 0.1606 mg/L). La actividad específica mostró una variabilidad de varios órdenes de magnitud, oscilando entre 0 y 121,362.5 U.A./mg. La formulación 2 destacó exponencialmente sobre las demás, alcanzando la máxima actividad específica (121,362.5 U.A./mg) acoplada a un contenido proteico de 0.1487 mg/L. Por el contrario, las formulaciones 3, 7 y 9, a pesar de registrar concentraciones de proteína detectables, no evidenciaron actividad catalítica frente al sustrato (0 U.A./mg).

TABLA I
DISEÑO EXPERIMENTAL PLACKETT – BURMAN

N°	T	pH	Q	G	EL	K	Mg	S	Ca
	(°C)		g/L						
1	45	7.0	0.2	1.0	1.0	0.02	0.01	0.05	0.05
2	15	7.0	3.0	1.0	1.0	0.005	0.01	0.20	0.05
3	45	3.5	3.0	1.0	1.0	0.005	0.05	0.05	0.05
4	15	7.0	0.2	1.0	0.1	0.02	0.05	0.20	0.05
5	15	3.5	3.0	0.1	1.0	0.02	0.01	0.20	0.20
6	15	3.5	0.2	1.0	0.1	0.02	0.05	0.20	0.20
7	45	3.5	3.0	0.1	1.0	0.005	0.05	0.05	0.20
8	45	7.0	0.2	0.1	0.1	0.02	0.01	0.20	0.20
9	45	7.0	3.0	0.1	0.1	0.005	0.05	0.05	0.20
10	15	3.5	0.2	0.1	0.1	0.005	0.01	0.05	0.05

T: Temperatura, Q: Queratina, G: Glucosa, EL: extracto de lavadura, K: Potasio, S: Azufre, Mg: Magnesio, Ca: Calcio.

Roshan y Kurian [4] utilizando una cepa de *B. licheniformis* y plumas de pollo como sustrato, lograron parámetros optimizados tras 72 horas de incubación a un pH alcalino de 9, de actividad enzimática: 2.833 ± 0.011 µg/mL (utilizando glucosa y peptona como suplementos), de contenido de proteína total 123.13 ± 1.38 µg/mL, de actividad específica se alcanzó un máximo de 23.01 µg/mg, lo que refleja la pureza y eficiencia de la enzima cruda obtenida bajo condiciones optimizadas. Estos valores son superiores a los hallados en este trabajo, debido a la especie de Bacillus utilizada.

TABLA II
RESULTADOS DE LA CINÉTICA ENZIMÁTICA

Formulación	Unidades de Actividad	Contenido Proteico	Actividad Específica
	(U. A./mL)	(mg/L)	(U. A./mg de proteína)
1	146.60	0.1175	1247.7
2	18046.60	0.1487	121362.5
3	0	0.1119	0
4	46.60	0.1369	340.39
5	2846.60	0.1044	27266.28
6	3846.60	0.1294	29729.42
7	0	0.1175	0
8	4546.60	0.1606	28310.09
9	0	0.1337	0
10	7246.60	0.1181	61359.86

Sin embargo, Liaqat et al. [21] investigaron la cepa *B. licheniformis* DCS 1 para el procesamiento de desechos avícolas, reportando una actividad de 48.5 U/mL en un periodo de 14 días, muy inferior a la actividad máxima alcanzada en esta investigación (121,362.5 U.A./mg).

Investigaciones citadas mencionan concentraciones de proteína superiores en extractos de queratina de 2.76 ± 0.65 mg/mL y hasta 9.8 mg/mL tras 6 días de extracción en condiciones específicas [22–24].

La enorme disparidad entre el contenido proteico y la actividad específica (Tabla II) es un indicador clave de la regulación metabólica de *Bacillus sp*. frente a la inducción por queratina. En sistemas de fermentación utilizando residuos agroindustriales como las plumas de pollo, el nitrógeno orgánico puede ser canalizado hacia la síntesis de proteínas estructurales, biomasa celular u otras enzimas no queratínicas [17]. Esto explica por qué tratamientos como el 9 poseen un contenido proteico relativamente alto (0.1337 mg/L) pero una actividad nula. La existencia de formulaciones con actividad específica cero frente a la respuesta sobresaliente de la formulación 2 corrobora el análisis de efectos principales discutido previamente. Factores como la temperatura y la disponibilidad de cofactores catiónicos (Mg^{2+}) actúan como interruptores moleculares ("switches") [25]. Si estas condiciones críticas no se encuentran en sus niveles óptimos, la enzima puede secretarse en forma de proenzima inactiva (zimógeno) o sufrir desnaturalización parcial, anulando su capacidad de hidrolizar la queratina de la pluma [12,14,15]. La formulación 2 representa el balance ideal de screening donde confluyen la inducción de la síntesis proteica (favorecida por el pH y nutrientes) y la activación cinética y estabilidad de la estructura terciaria de la proteasa.

TABLA III
EFECTOS PRINCIPALES PARA EL CONTENIDO PROTEICO

Factor	Valor t	Valor p
Temperatura	0.256	< 0.10
pH	8.112	< 0.05*
Queratina	3.250	< 0.01*
Extracto de levadura	5.500	< 0.05*
Glucosa	0.699	< 0.10
Potasio	1.320	> 0.05
Magnesio	1.390	< 0.10
Azufre	5.699	> 0.05*
Calcio	0.874	< 0.10

* Nivel de significancia a $\alpha = 0.05$.

El análisis del diseño Plackett-Burman para la variable de contenido proteico (Tabla III) reveló un perfil de significancia marcadamente distinto al observado para la actividad enzimática. Con un nivel de significancia del 5% ($\alpha = 0.05$) se identificaron cuatro factores con un impacto crítico en la concentración de proteína en el medio de cultivo: el pH ($t = 8.112$, $p < 0.05$), concentración de queratina ($t = 3.250$, $p < 0.01$), extracto de levadura ($t = 5.500$, $p < 0.05$) y azufre ($t = 5.699$, $p > 0.05$).

Por el contrario, factores físicos como la temperatura ($t = 0.256$) y fuentes de carbono alternativas como la glucosa ($t = 0.699$) no mostraron efectos significativos ($p < 0.10$), sugiriendo que la acumulación de proteína es altamente dependiente de la composición nutricional del sustrato y las condiciones de solubilidad. La marcada significancia del pH ($p < 0.05$) y la queratina ($p < 0.01$) sobre el contenido proteico se relaciona directamente con el mecanismo de degradación de las plumas. Las plumas de pollo son ricas en queratina, una proteína insoluble altamente reticulada por puentes disulfuro [2,6]. Un pH óptimo favorece tanto el crecimiento de *Bacillus sp*. como la solubilidad de los péptidos liberados [16]. El hecho de que la queratina sea altamente significativa es lógico: a mayor disponibilidad de sustrato, mayor es el contenido de proteína detectable en el medio tras la hidrólisis enzimática. Asimismo, el extracto de levadura ($p < 0.05$) actúa como una fuente de nitrógeno orgánico de fácil asimilación y aporta vitaminas esenciales que aceleran la biomasa inicial del microorganismo, potenciando indirectamente la secreción de proteínas [9]. Finalmente, el fuerte impacto del azufre ($p > 0.05$) posee una alta relevancia biológica en la queratólisis [6,15]. Muchos *Bacillus* queratínicos secretan compuestos reductores de azufre (como sulfitos) para romper los puentes disulfuro de la queratina, permitiendo que las proteasas ataquen la estructura de la pluma [4,17,18]. La adición de azufre en el medio podría estar estimulando o complementando esta vía metabólica, facilitando una mayor liberación de fragmentos proteicos al medio.

De acuerdo con el diseño binomial factorial exponencial de Plackett – Burmann para identificar las variables nutricionales y ambientales que influyen significativamente en la producción de proteasas por *Bacillus sp.* utilizando plumas de pollo, se evaluaron 9 factores mediante un diseño de cribado de Plackett-Burman.

TABLA IV
EFECTOS PRINCIPALES PARA LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Factor	Valor t	Valor p
Temperatura	2.760	< 0.01*
pH	0.894	< 0.10
Queratina	0.750	< 0.10
Extracto de levadura	0.540	< 0.10
Glucosa	0.510	< 0.10
Potasio	1.400	< 0.10
Magnesio	2.920	< 0.01*
Azufre	2.210	> 0.05
Calcio	1.430	< 0.10

* Nivel de significancia a $\alpha = 0.05$.

Los efectos principales de cada variable, junto con sus respectivos valores t y valores p, se presentan en la Tabla IV. De acuerdo con el análisis estadístico ($\alpha = 0.05$), la temperatura ($t = 2.760$) y la concentración de magnesio ($t = 2.920$) mostraron un efecto estadísticamente significativo ($p < 0.05$) sobre la actividad enzimática. Los factores restantes, incluyendo el pH, la fuente de carbono (glucosa) y la concentración de sustrato (queratina), presentaron valores de $p < 0.05$, lo que indica que no tienen un impacto crítico bajo las condiciones evaluadas en este rango. El azufre no mostró ninguna influencia relevante ($p > 0.05$). Por lo tanto, la temperatura y el magnesio fueron seleccionados como las variables clave para las etapas posteriores de optimización. La alta significancia de la temperatura ($p < 0.01$) es consistente con la naturaleza metabólica de *Bacillus sp.*, dado que la temperatura regula no solo el crecimiento celular, sino también la cinética de secreción de enzimas extracelulares y la fluidez de la membrana celular [26]. Por otro lado, el fuerte impacto positivo del magnesio ($p < 0.01$) puede explicarse debido a que los iones Mg^{2+} actúan frecuentemente como cofactores esenciales que estabilizan la estructura terciaria de las proteasas de *Bacillus* o activan los complejos enzima-sustrato durante la degradación de la queratina [25]. La falta de significancia estricta de la queratina y el extracto de levadura sugiere que, en los niveles basales evaluados, los requerimientos de nitrógeno y carbono ya estaban cubiertos para el nivel de producción actual, permitiendo que los factores físicos y los cofactores químicos tomaran el rol limitante en el proceso [27,28].

De acuerdo con los resultados obtenidos la formulación más adecuada para obtener una mayor producción de proteasas por el *Bacillus sp.* MIT-MM fue el siguiente: Temperatura (15 °C), pH (7.0), Queratina (0.20 %), Glucosa (0.10%), Extracto de Levadura (0.10%), Potasio (0.005%), Azufre (0.20%), Magnesio (0.01%) y Calcio (0.20%).

IV. Conclusiones

Se demostró con éxito la viabilidad de utilizar plumas de pollo como sustrato de bajo costo para la producción de proteasas mediante *Bacillus sp*., representando una alternativa biotecnológica eficiente para la valorización de este residuo industrial. El diseño de cribado Plackett-Burman permitió identificar que la acumulación de contenido proteico total y la inducción de la actividad enzimática específica están reguladas por vías metabólicas y factores críticos marcadamente independientes. La síntesis y liberación de proteínas al medio de cultivo está determinada de manera significativa ($p < 0.05$) por el entorno químico y nutricional, siendo el pH, la concentración de queratina, el extracto de levadura y el azufre las variables determinantes en la degradación inicial del sustrato. Por el contrario, la eficiencia catalítica (actividad específica) es altamente sensible a las variables físicas y de coactivación, donde únicamente la temperatura y la concentración de magnesio ejercieron un efecto estadísticamente significativo ($p < 0.01$) como interruptores cinéticos del complejo enzima-sustrato. La Formulación 2 se estableció como la condición óptima del cribado, alcanzando una actividad específica máxima de 121,362.5 U.A./mg proteína con un contenido proteico de 0.1487 mg/L, consolidando a la temperatura y al magnesio como las variables críticas definitivas para las etapas subsecuentes de optimización del bioproceso.

Referencias

[1] A. Mottet, G. Tempio, Global poultry production: current state and future outlook and challenges, Worlds Poult. Sci. J. 73 (2017) 245–256. https://doi.org/10.1017/S0043933917000071.

[2] S. Mattiello, A. Guzzini, A. Del Giudice, C. Santulli, M. Antonini, G. Lupidi, R. Gunnella, Physico-Chemical Characterization of Keratin from Wool and Chicken Feathers Extracted Using Refined Chemical Methods, Polymers (Basel). 15 (2022) 181. https://doi.org/10.3390/polym15010181.

[3] K. Gregg, G.E. Rogers, Feather Keratin: Composition, Structure and Biogenesis, in: Biology of the Integument, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1986: pp. 666–694. https://doi.org/10.1007/978-3-662-00989-5_33.

[4] H. Roshan, S. Kurian, Sustainable bioconversion of poultry feather waste into industrial protease by Bacillus licheniformis through optimised fermentation and functional application, Journal of Applied and Natural Science 18 (2026) 1039–1049. https://doi.org/10.31018/jans.v18i2.7568.

[5] P. Song, X. Zhang, S. Wang, W. Xu, F. Wang, R. Fu, F. Wei, Microbial proteases and their applications, Front. Microbiol. 14 (2023). https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1236368.

[6] M.J. Hasan, P. Haque, M.M. Rahman, Protease enzyme based cleaner leather processing: A review, J. Clean. Prod. 365 (2022) 132826. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.132826.

[7] A.K. Patel, C.-D. Dong, C.-W. Chen, A. Pandey, R.R. Singhania, Production, purification, and application of microbial enzymes, in: Biotechnology of Microbial Enzymes, Elsevier, 2023: pp. 25–57. https://doi.org/10.1016/B978-0-443-19059-9.00019-0.

[8] N.C. Gimenes, E. Silveira, E.B. Tambourgi, An Overview of Proteases: Production, Downstream Processes and Industrial Applications, Separation & Purification Reviews 50 (2021) 223–243. https://doi.org/10.1080/15422119.2019.1677249.

[9] A.S. Rozanov, S. V. Shekhovtsov, N. V. Bogacheva, E.G. Pershina, A. V. Ryapolova, D.S. Bytyak, S.E. Peltek, Production of subtilisin proteases in bacteria and yeast, Vavilov Journal of Genetics and Breeding 25 (2021) 125–134. https://doi.org/10.18699/VJ21.015.

[10] D. Zhou, W. Zheng, Y. Li, Z. Zhang, X. Ding, Y. Ke, Streptomyces shaoguanensis sp. nov.: elucidating the mechanisms of efficient chicken feather degradation and its potential for biofertilizer development, Microb. Cell Fact. 25 (2025) 1. https://doi.org/10.1186/s12934-025-02878-8.

[11] P. Nehring, S.S. Robalo, C.C.B. Brasil, C.R. de Menezes, R.E.F. de Macedo, M. Voss, P.C.B. Campagnol, A.J. Cichoski, How to exploit the potential of different compounds from chicken by-products, Ciência Rural 56 (2026). https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20240552.

[12] P. Kshetri, S.S. Roy, S.K. Sharma, T.S. Singh, M.A. Ansari, N. Prakash, S. V. Ngachan, Transforming Chicken Feather Waste into Feather Protein Hydrolysate Using a Newly Isolated Multifaceted Keratinolytic Bacterium Chryseobacterium sediminis RCM-SSR-7, Waste Biomass Valorization 10 (2019) 1–11. https://doi.org/10.1007/s12649-017-0037-4.

[13] N.S. Elleboudy, Y.A. Trabik, M.M. Aboulwafa, Optimization of feather degradation by a Bacillus thuringiensis isolate using response surface methodology and investigation of the feather protein hydrolysate structure, Biotechnol. Appl. Biochem. 70 (2023) 1258–1269. https://doi.org/10.1002/bab.2436.

[14] Z.-W. Li, S. Liang, Y. Ke, J.-J. Deng, M.-S. Zhang, D.-L. Lu, J.-Z. Li, X.-C. Luo, The feather degradation mechanisms of a new

Streptomyces sp. isolate SCUT-3, Commun. Biol. 3 (2020) 191. https://doi.org/10.1038/s42003-020-0918-0.
[15] Z. Peng, J. Zhang, G. Du, J. Chen, Keratin Waste Recycling Based on Microbial Degradation: Mechanisms and Prospects, ACS Sustain. Chem. Eng. 7 (2019) 9727–9736. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b01527.
[16] A. Muras, M. Romero, C. Mayer, A. Otero, Biotechnological applications of Bacillus licheniformis, Crit. Rev. Biotechnol. 41 (2021) 609–627. https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1873239.
[17] S. Kittler, F. Müller, M. Elshazly, G.B. Wandrey, T. Klein, A. Daub, O. Spadiut, J. Kopp, Transferability of bioprocessing modes for recombinant protease production: from fed-batch to continuous cultivation with Bacillus licheniformis, BMC Biotechnol. 25 (2025) 13. https://doi.org/10.1186/s12896-025-00947-9.
[18] A. Sellami-Kamoun, A. Haddar, N.E.-H. Ali, B. Ghorbel-Frikha, S. Kanoun, M. Nasri, Stability of thermostable alkaline protease from Bacillus licheniformis RP1 in commercial solid laundry detergent formulations, Microbiol. Res. 163 (2008) 299–306. https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.06.001.
[19] J.H. Waterborg, The Lowry Method for Protein Quantitation, in: J. Walker (Ed.), The Protein Protocols Handbook, Humana Press, Totowa, 2009: pp. 7–10. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-198-7_2.
[20] C. Cupp-Enyard, Sigma's Non-specific Protease Activity Assay - Casein as a Substrate, Journal of Visualized Experiments (2008). https://doi.org/10.3791/899.
[21] I. Liaqat, S. Ali, A. Butt, A.I. Durrani, U. Zafar, S. Saleem, S. Naseem, F. Ahsan, Purification and Characterization of Keratinase from <i>Bacillus licheniformis</i> dcs1 for Poultry Waste Processing, J. Oleo Sci. 71 (2022) ess21426. https://doi.org/10.5650/jos.ess21426.
[22] S. Sharma, A. Gupta, S. Chik, K.C. Gek, P.K. Podde, J. Thraisingam, M. Subramaniam, Extraction and characterization of keratin from chicken feather waste biomass: a study, in: Proceedings of the National Conference for Postgraduate Research (NCON-PGR 2016), Universiti Malaysia Pahang (UMP), Pekan, 2016: pp. 693–699.
[23] A.A.H. Faisal, Z.K. Ramadhan, N. Al-Ansari, G. Sharma, Mu. Naushad, C. Bathula, Precipitation of (Mg/Fe-CTAB) - Layered double hydroxide nanoparticles onto sewage sludge for producing novel sorbent to remove Congo red and methylene blue dyes from aqueous environment, Chemosphere 291 (2022) 132693. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132693.
[24] S. Sharma, A. Gupta, A. Kumar, C.G. Kee, H. Kamyab, S.M. Saufi, An efficient conversion of waste feather keratin into ecofriendly bioplastic film, Clean Technol. Environ. Policy 20 (2018) 2157–2167. https://doi.org/10.1007/s10098-018-1498-2.
[25] J.A. Beebe, J.C. Kurz, C.A. Fierke, Magnesium Ions Are Required by Bacillus subtilis Ribonuclease P RNA for both Binding and Cleaving Precursor tRNA, Biochemistry 35 (1996) 10493–10505. https://doi.org/10.1021/bi960870m.
[26] X. Hu, H. Fu, M. Bao, X. Zhang, W. Liu, X. Sun, Y. Pan, Temperature mediates metabolism switching of Bacillus sp. ZT-1: Analysis of the properties and structure of exopolysaccharides, Microbiol. Res. 251 (2021) 126839. https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126839.
[27] B. Sun, K. Zou, Y. Zhao, Y. Tang, F. Zhang, W. Chen, X. Tang, C. Chang, Y. Zheng, The fermentation optimization for alkaline protease production by Bacillus subtilis BS-QR-052, Front. Microbiol. 14 (2023). https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1301065.
[28] A.R. Patel, N.U. Mokashe, D.S. Chaudhari, A.G. Jadhav, U.K. Patil, Production optimisation and characterisation of extracellular protease secreted by newly isolated Bacillus subtilis AU-2 strain obtained from Tribolium castaneum gut, Biocatal. Agric. Biotechnol. 19 (2019) 101122. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101122.