

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
PROGRAMA DOCENTE DE
INGENIERÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



Evidencia de la capacidad de *Yarrowia lipolytica* para producir proteasas por fermentación en medio sólido utilizando pastas de canola y ajonjolí

POR

MÓNICA GUADALUPE GARZA VÁZQUEZ

T E S I S

Presentada como requisito parcial para obtener el título profesional de

INGENIERÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Saltillo, Coahuila, México

Diciembre, 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

PROGRAMA DOCENTE DE
INGENIERÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

TESIS

Evidencia de la capacidad de *Yarrowia lipolytica* para producir proteasas por fermentación en medio sólido utilizando pastas de canola y ajonjolí

Presentada por

MÓNICA GUADALUPE GARZA VÁZQUEZ

y que el comité de asesoría aprobó como requisito parcial para obtener el título profesional de

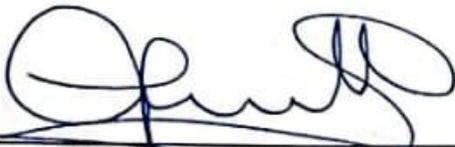
INGENIERÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



Dr. Antonio Francisco Aguilera Carbó
Asesor Principal



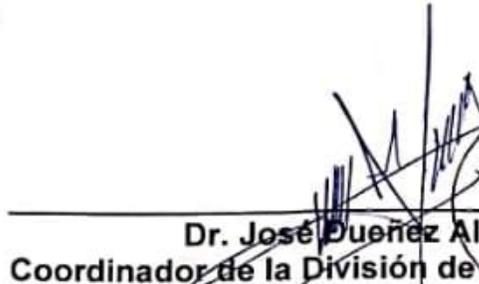
ME. Laura Olivia Fuetes Lara
Asesor



Dra. Xochitl Ruelas Chacón
Asesor



MC. Juan López Trujillo
Asesor



Dr. José Dueñez Alanís
Coordinador de la División de Ciencia Animal

Saltillo, Coahuila, México



Diciembre, 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

Programa Docente de Ingeniería en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Evidencia de la capacidad de *Yarrowia lipolytica* para producir proteasas por fermentación en medio sólido utilizando pastas de canola y ajonjolí

TESIS

Presentada por

MÓNICA GUADALUPE GARZA VÁZQUEZ

y que somete a consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial para obtener el título profesional de

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

APROBADA

ME. Laura Olivia Fuentes Lara
Presidente

Dr. Antonio Francisco Aguilera Carbó
Vocal

Dra. Xochitl Ruelas Chacón
Vocal

MC. Oscar Noé Reboloso Padilla
Vocal

Dr. José Dueñez Alanís
Coordinador de la División de Ciencia Animal

Saltillo, Coahuila, México

Diciembre, 2019

DEDICATORIAS

A mi madre:

María de Lourdes Vázquez Luna por darme la vida y con ella una vida llena de amor incondicional, de apoyo constante en cada uno de mis sueños, por siempre guiarme, por creer en mis capacidades, por darme la oportunidad de crecer profesionalmente, porque mis triunfos siempre llevaran su nombre, por ser y por estar. Te amo infinitamente.

A mis abuelos:

Emma Luna Calderón y **Leoncio Cepeda Sánchez** quienes han sido padres sabios, me han formado con disciplina, amor y firmeza lo cual me servirá para formar una vida con valores y principios, gracias a ustedes he podido realizar mis estudios, han sido fuente importante de mi inspiración y motivación para superarme cada día y así poder luchar por un futuro mejor. Los amo infinitamente.

A mis hermanos:

Samady Reyes Vázquez y **Saúl Alan Garza Vázquez** me han llenado de felicidad en todo momento, a los dos porque nunca estuve sola y sé que nunca lo estaré. Los llevo en mi corazón gracias por su cariño. Los amo infinitamente.

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por darme la vida y acompañarme en todo momento. Me has llenado de salud y amor, gracias por regalarme la mejor familia y por darme la dicha de culminar este sueño.

A mi **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**, mi "**Alma Mater**" por darme la oportunidad de formarme profesionalmente, impulsarme a abrir mis alas y mente. Con gran orgullo buitre por siempre.

Al **Dr. Antonio Aguilera Carbó** por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo de tesis, gracias por los sabios consejos, dedicación y orientación a esta investigación.

Al **M.C. Juan López Trujillo** por su valiosa disposición y sugerencias en la elaboración y revisión de esta tesis, por participar entusiastamente en la realización de este trabajo, por su colaboración muchísimas gracias.

Al **T.A. Carlos Arévalo Sanmiguel** encargado del laboratorio del Departamento de Nutrición Animal, por la ayuda en la realización de esta investigación y a las personas que trabajan en el laboratorio de nutrición animal quienes ayudaron a la conducción de este trabajo.

Al **Dr. Mario Alberto Cruz Hernández** por el apoyo desinteresado que me brindo en la elaboración de este trabajo, muchas gracias.

A todos **mis maestros** que me acompañaron en mi recorrido universitario.

A mis amigas (os) **Karen Alejandra, Ana Carmen, María del Consuelo, Lorena Elizabeth, Montserrat Bravo, Luis Alberto, Leidi Gabriela** gracias por acompañarme

en este fantástico recorrido, por todos los momentos que pasamos juntas (os) por escucharme y entenderme, gracias **Karen, Ana y Consuelo** por siempre estar ahí y ser más que mis mejores amigas, ser mis hermanas, estaré siempre que me necesiten.

Leidi gracias por los buenos consejos, regaños y el tiempo de calidad que me brindaste, a **Elizabeth y Monse** gracias por llegar justo cuando las necesitaba por su comprensión

y respeto, gracias por cada una de las sonrisas que me regalaron y sé que a pesar de la distancia seguiremos siendo amigas, gracias **Luis Alberto** más que mi mejor amigo eres otro hermano para mí, por escucharme en todo momento y aconsejarme sabiamente, gracias por todo lo vivido. Los recordare con gran alegría y espero la vida nos reúna en algún momento, deseo que cada uno cumplamos todos esos sueños que alguna vez nos platicamos, gracias a la Universidad que nos dio la oportunidad de conocernos.

A mi mejor amiga **Wendy Elizabeth Rodríguez** porque a pesar de los distanciamientos ha estado más de la mitad de su vida a mi lado y sé que seguirá estando, gracias por amarme, apoyarme, respetarme, hacerme feliz en cada instante. Te quiero.

A todos mis compañeros (as) y amigos (as) **Arturo Gómez, Lupita Rueda, Alva Nuncio, Lizbeth Esquivel, Rivas del Bosque, Miguel Castro, Sebastián Prado, Peach Damián, Ivon Gómez** con quienes viví momentos inolvidables y quienes estuvieron a lo largo de este camino.

A toda **mi familia** por ayudarme a terminar mis estudios profesionales.

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE CUADROS	xi
RESUMEN	xii
1. Introducción	13
2. Justificación	16
3. Hipótesis.....	17
4. Objetivos	17
4.1. <i>General</i>	17
4.2. <i>Específicos</i>	17
4.2.1. Etapa I	17
4.2.2. Etapa II	17
5. Revisión de literatura	18
5.1. Definición y clasificación de enzimas	18
5.2. Proteasas	19
5.2.1. Clasificación de proteasas	20
5.3. Producción de proteasas	22
5.4. Aplicación de proteasas en la industria alimentaria	23
5.4.1. Ablandamiento de carnes	23
5.4.2. Elaboración de cerveza	23
5.4.3. Elaboración de quesos	24
5.4.4. Panificación.....	24
5.5. Proteasas en la nutrición animal	25
5.6. Fermentación en medio sólido	25
5.7. Pasta de canola	27

5.8. Pasta de ajonjolí	28
5.9. <i>Yarrowia lipolytica</i>	30
5.10. <i>Diformismo de Yarrowia lipolytica</i>	31
6. Metodología	33
6.1. Etapa 1	33
6.1.1. Caracterización fisicoquímica de pasta de canola y ajonjolí	33
6.2.1. Caracterización fisicoquímica de la pasta de canola y ajonjolí mediante un análisis proximal.....	33
6.1.2.1. Materia seca total.....	34
6.1.2.2. Cenizas.....	35
6.1.2.3. Extracto etéreo (Método Soxhlet)	36
6.1.2.4. Nitrógeno y proteína cruda o bruta (Método Kjeldhal)	38
6.1.2.5. Fibra cruda.....	40
6.1.2.6. Carbohidratos totales solubles.....	42
6.1.2.7. Determinación de minerales (Método húmedo por absorción atómica; Fick <i>et al.</i> , 1976).....	43
6.2. Etapa 2	45
6.2.1. Producción de la enzima proteasa en fermentación en medio sólido (FMS) ...	45
6.2.1.1. Microorganismo	45
6.2.1.2. Propagación y conservación del microorganismo.....	45
6.2.1.3. Producción del inóculo.....	45
6.2.1.4. Producción de proteasa en fermentación en medio sólido (FMS) a diferentes pH (4.5, 7.0 y 9.0).	46
6.2.1.5. Extracción de la enzima del material fermentado	47
6.2.1.5. Producción de proteasa en fermentación en medio sólido (FMS) utilizando un sistema de charolas	48
6.2.1.6. Determinación de la actividad proteolítica	49

6.2.1.7. Determinación de la proteína soluble (Método de Lowry, 1951)	50
6.2.1.8. Caracterización físico-química de la pasta de canola y pasta de ajonjolí fermentada mediante un análisis proximal.....	50
6.3. Diseño experimental	50
7. Resultados y discusión	51
Caracterización fisicoquímica de las pasta de canola y pasta de ajonjolí.....	51
Producción de proteasa en fermentación en medio sólido (FMS).....	61
8. Conclusiones	65
9. Perspectivas	66
Bibliografía	67
ANEXOS	72
Anexo A. Algunos equipos utilizados en la presente investigación	72
Anexo B. Principales reactivos utilizados en la presente investigación	75
Anexo C. Preparación de reactivos.....	76
Anexo D. Curva patrón de tirosina	80
Anexo E. diseño experimental ANOVA para proteína soluble.....	81
Anexo F. Diseño experimental ANOVA para actividad enzimática	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Pasta de colza o canola.	27
Figura 2. Semilla de sésamo o ajonjolí.	28
Figura 3. A la izquierda se encuentran colonias de <i>Yarrowia lipolytica</i> que crecen en agar de recuento de placas en una placa de Petri.	31
Figura 4. Equipo para la determinación de materia seca total (MST).	35
Figura 5. Mufla, equipo utilizado para la determinación de cenizas.	36
Figura 6. Equipo utilizado para la determinación de extracto etéreo por el método Soxhlet.	38
Figura 7. Equipo Kjeldhal utilizado para la determinación de nitrógeno (por conversión proteína cruda o bruta), se aprecian los 3 procesos que conlleva el método (digestión, destilación y titulación).	40
Figura 8. Equipo Labconco para la determinación de fibra cruda.	42
Figura 9. Espectrofotómetro de absorción atómica donde se lleva a cabo la lectura de micro y macro nutrientes.	44
Figura 10. Matraces Erlenmeyer de 250 ml con agar extracto de malta y extracto de levadura, inoculados con <i>Yarrowia lipolytica</i> en incubación a 30 °C.	46
Figura 11. Sistema para la fermentación en medio sólido (FMS) de la cinética de producción de proteasa producida por <i>Yarrowia lipolytica</i>	47
Figura 12. Sistema de fermentación en medio sólido (FMS) utilizando charolas.	49
Figura 13. Producción de proteína soluble en pasta de canola Vs pasta de ajonjolí en tres pH.	58
Figura 14. Cinética de producción de proteasa por <i>Yarrowia lipolytica</i> en FMS a 30 °C.	62

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de las enzimas según el tipo de reacción química que catalizan.	18
Cuadro 2. Composición química de las pastas de oleaginosas.....	29
Cuadro 3. Condiciones iniciales de la fermentación en medio sólido.....	47
Cuadro 4. Caracterización fisicoquímica de la pasta de canola y pasta de ajonjolí.....	52
Cuadro 5. Contenido de proteína soluble (mg/g) en pasta fermentada de canola y pasta de ajonjolí.....	56
Cuadro 6. Contenido de proteína soluble (U/L) en pasta fermentada de canola y pasta de ajonjolí.....	57
Cuadro 7. Caracterización fisicoquímica de la pasta fermentada de canola y pasta fermentada de ajonjolí.....	59
Cuadro 9. Contenido de proteína soluble en pasta fermentada de canola y pasta fermentada de ajonjolí durante la cinética a 30°C por 72.....	64

RESUMEN

Actualmente el uso comercial de enzimas se ha incrementado debido a la diversidad de aplicaciones y beneficios industriales que representan. El objetivo del presente trabajo fue la producción y purificación de enzimas proteolíticas en fermentación en medio sólido (FMS) por *Yarrowia lipolytica* utilizando como soportes/sustratos residuos agroindustriales como lo es la pasta de canola y pasta de ajonjolí.

La presente investigación describe la producción de la enzima proteasa utilizando la cepa *Yarrowia lipolytica* mediante la fermentación en medio sólido (FMS) utilizando las pastas de canola y ajonjolí como soportes/sustratos. La concentración de esporas fue ajustada a 2×10^7 por cada gramo (g) de materia seca pasta de canola y pasta de ajonjolí. La cinética de fermentación se mantuvo a una temperatura de 30°C por 72 h.

La máxima producción de la enzima en el caso de la pasta de canola se llevó a cabo a las 30 h de fermentación (163.3 U/g) y para la pasta de ajonjolí la mayor producción de enzima se obtuvo a las 54 h (226.6 U/g).

Se evaluó el efecto de tres valores de pH: 4.5, 7.0 y 9.0, la enzima presentó la máxima actividad proteolítica a pH 4.5 para la pasta de canola (445.26 U/L) y para la pasta de ajonjolí (593.53 U/L), por lo que el extracto proteolítico tiene presentes proteasas ácidas.

Palabras clave: pasta de canola, pasta de ajonjolí, enzimas proteasas, fermentación en medio sólido, *Yarrowia lipolytica*.

1. Introducción

Las proteasas pertenecen al grupo de las hidrolasas. Catalizan la degradación de otras proteínas hidrolizando los enlaces peptídicos con diferentes grados de intensidad y de selectividad. Un enlace peptídico es la unión que se realiza entre el grupo ácido de un aminoácido con el grupo amino de otro, con la consecuente eliminación de una molécula de agua. Estas enzimas son fisiológicamente necesarias para la existencia de los organismos, encontrándose en una amplia diversidad de fuentes como plantas, animales y microorganismos (Rao *et al.*, 1998).

De los procesos de obtención de enzimas, el fermentativo tiene una serie de ventajas sobre el de extracción de tejidos animales y vegetales. Entre esas ventajas, se pueden mencionar: la alta velocidad de síntesis, el elevado rendimiento de conversión del sustrato, el proceso de fermentación no requiere grandes extensiones de terreno (Hernández *et al.*, 2003).

El principal productor de proteasas ha sido el género *Bacillus* sp., sin embargo, en los últimos años se ha incrementado el interés por el uso de hongos filamentosos en la producción de proteasas.

Existen reportes del uso de *Streptomyces* (De Azeredo *et al.*, 2004), *Aspergillus* (Wu *et al.*, 2006), *Penicillium* (Agrawal *et al.*, 2004) y *Rhizopus* (Kumar *et al.*, 2005); así como de *Aerobasidium pullulans* y *Yarrowia lipolytica* (Hernández *et al.*, 2010). Se han reportado altos títulos de proteasa extracelular producidos por *Y. lipolytica* (Madzak *et al.*, 2004).

Las proteasas son enzima ampliamente utilizadas en la producción de alimentos y, posiblemente, las más importantes desde el punto de vista económico, ya que son imprescindibles en industrias como la quesera o la cervecera (Díaz, 1994) Los principales usos de las proteasas hasta el momento son los siguientes: En el ablandamiento de carnes, elaboración de cerveza, elaboración de quesos y panificación.

La aplicación de enzimas en alimentos para animales se hace con la finalidad de: Remover o destruir factores anti nutricionales en raciones para no rumiantes, mejorar la digestibilidad total de la dieta; la baja digestibilidad de algunas materias primas, aumentar la digestibilidad de polisacáridos no amilolíticas, de manera general, los no rumiantes carecen de la capacidad endógena para hidrolizar los carbohidratos de este tipo por lo que cuando se adicionan las enzimas necesarias los componentes monosacáridos producto de su hidrólisis, se pueden absorber y utilizar, complementar la adición de las enzimas endógenas producidas por el animal. En cerdos y aves jóvenes cuando el sistema enzimático aún no se desarrolla completamente, hay deficiencia de algunas enzimas.

La fermentación en medio sólido ofrece una serie de ventajas económicas sobre los procesos convencionales de fermentación sumergida para la obtención de productos de alto valor agregado (Castillo *et al.*, 2000), como etanol, enzimas, antibióticos, hongos comestibles, ácidos orgánicos, aminoácidos, pigmentos, metabolitos secundarios, etc. (Holker *et al.*, 2004); debido a los bajos niveles de humedad y a la disminución del volumen del medio por unidad de peso de sustrato, además de que se obtiene una alta productividad, los volúmenes de fermentación son menores a los sistemas sumergidos y el tratamiento del efluente es reducido (Aguilar *et al.*, 2001).

La fermentación en medio sólido (FMS) presenta diversas ventajas con respecto a la fermentación en medio líquido (FML). Doelle *et al.* (1992) consideran como ventajas los siguientes aspectos: los medios de cultivo son simples, generalmente subproductos agrícolas que presentan un alto contenido de los nutrientes necesarios, la baja actividad del agua es de gran ayuda para evitar las contaminaciones, especialmente de bacterias y levaduras, la concentración natural del sustrato permite utilizar reactores más pequeños en comparación con los utilizados en otro tipo de fermentación. Tienen mayor productividad volumétrica, la aireación forzada es facilitada por la porosidad del soporte, lo que permite una alta transferencia de oxígeno al microorganismo.

Pueden emplearse frecuentemente conidios como inóculo en los procesos de crecimiento de hongos, lo cual disminuye los costos y las manipulaciones en la preparación del inóculo, el proceso de recuperación es simple. Algunos productos son utilizados integralmente, como alimento animal, productos para el control biológico, etc. y porqué los procesos se consideran generalmente como tecnologías limpias.

En los últimos años se ha incrementado el empleo de la pasta de canola en la alimentación de las aves, debido a que se han desarrollado variedades de semilla de canola menos tóxicas. Con el hallazgo de estas nuevas variedades de canola, se ha demostrado que es posible incorporar en los alimentos balanceados niveles más altos de este subproducto.

El ajonjolí tiene un alto valor nutritivo, por la gran cantidad de proteínas, lípidos e importantes minerales y vitaminas (Namiki, 2007). Es de resaltar su contenido de proteína, que oscila entre 12 a 23% y el contenido de aceite, entre 40 y 60%; la calidad de su aceite esencialmente con alto contenido de ácido linoleico (35 a 41% del aceite total) (FAO, 2006).

Lo anterior pone de manifiesto los múltiples beneficios nutricionales de los sustratos como la canola y el ajonjolí. De esta manera la presente investigación pone en evidencia la factibilidad de producir enzimas proteolíticas por *Yarrowia lipolytica* en cultivo sólido en medio sólido usando subproductos agroindustriales.

2. Justificación

El cultivo de canola y ajonjolí ha ido ganando espacio en el mercado nacional e internacional como también en el consumo humano, ya que, en pro de mejorar la salud, las personas lo han incorporado a su dieta, debido a su alto contenido de aceite insaturado que sobrepasa el 40% sin mencionar el omega 3 que previene problemas cardiacos entre otras afecciones al corazón y por ser la fuente proteica por excelencia en la formulación para la alimentación principalmente de animales.

Según Andrade (2010), la disponibilidad de este cultivo no satisface las demandas nacionales por lo que es importado, afectando así su accesibilidad, debido a sus costos y a que el principal objetivo no es el de obtener aceite de esta leguminosa. En el 2005, se importaron 84,067.40 toneladas de aceite crudo proveniente de Argentina, mientras que se importaron 93.78 toneladas métricas entre semilla y pasta de soya en el mismo año (INEC, 2012). Por esta razón, se ha puesto énfasis en buscar nuevas opciones como fuentes de proteína balanceados siempre y cuando los ingredientes cumplan con los requerimientos nutricionales de los animales.

La digestión alimentaria es una prioridad en el organismo de los seres vivos, son necesarias gran cantidad de enzimas para ella, así, una deficiencia enzimática puede llevar a un deterioro de la salud.

Asociado a lo anterior hoy en día existe una mayor conciencia por parte del productor por adquirir productos suplementados con enzimas hidrolíticas, intentando ayudar en la digestión y absorción de un conjunto de nutrientes disponibles o de remover factores anti nutricionales (FAN) de las dietas.

3. Hipótesis.

Las enzimas proteasas pueden ser producidas por *Yarrowia lipolytica* a partir de la fermentación en medio solido de subproductos agroindustriales de canola y ajonjolí.

4. Objetivos

4.1. General

Evidenciar la producción de enzimas proteolíticas a partir de la fermentación por *Yarrowia lipolytica* en cultivo sólido de subproductos agroindustriales como pasta de canola y pasta de ajonjolí determinando el efecto del pH en la producción de proteasas.

4.2. Específicos

4.2.1. Etapa I

- Caracterización fisicoquímica de los subproductos agroindustriales (pasta de canola y pasta de ajonjolí) mediante un análisis proximal.

4.2.2. Etapa II

- Propagación y conservación de la levadura *Yarrowia lipolytica* en medio sólido.
- Producción de la enzima proteasa en fermentación en medio solido a diferentes pH.
- Parámetros cinéticos de la enzima proteasa.

5. Revisión de literatura

5.1. Definición y clasificación de enzimas

Se denominan catalizadores a las sustancias capaces de acelerar una reacción química sin experimentar alteraciones permanentes. En las células vivas los catalizadores biológicos son las enzimas. Como compuestos catalizadores, cada enzima actúa sobre una sustancia específica denominada sustrato y cataliza exclusivamente una reacción. Las enzimas por lo general consisten en proteínas globulares de gran tamaño. Poseen una conformación tridimensional característica y una configuración superficial específica como consecuencia de sus estructuras primaria, secundaria y terciaria. Muchas enzimas intracelulares se encuentran en las formas activa e inactiva. La velocidad con la que una enzima pasa de una de estas formas a la opuesta depende del medio celular (Tortora *et al.*, 2007).

Los nombres de las enzimas usualmente terminan con el sufijo –asa. Las enzimas se pueden clasificar en seis según el tipo de reacción química que catalicen. Las enzimas clasificadas dentro de cada uno de estos seis grupos principales se denominan según el tipo más específico de reacciones que catalicen, como se puede observar en el cuadro 1, (Nelson *et al.*, 2000).

Cuadro 1. Clasificación de las enzimas según el tipo de reacción química que catalizan.

Clase	Tipo de reacción química que cataliza	Ejemplos
Oxidoreductasas	Oxidación y reducción, con ganancia o pérdida de oxígeno e hidrógeno	Citocromo oxidasa, lactato dehidrogenasa

Transferasas	Transferencia de grupos funcionales, como grupos amino, acetilo o fosfato	Acetato cinasa, alanina desaminasa
Hidrolasas	Hidrólisis	Lipasa, sacarasa
Liasas	Eliminación de grupo de átomos sin hidrólisis	Oxalato descarboxilasa. Isocitrato liasa
Isomerasas	Reordenamiento de los átomos en el interior de una molécula	Glucosa fosfato isomerasa alanina racemasa
Ligasas	Unión de dos moléculas (por lo general con energía derivada de la escisión del ATP)	Acetil-CoA sintetasa, DNA ligasa

Nelson *et al.*, 2000.

5.2. Proteasas

Las proteasas pertenecen al grupo de las hidrolasas. Catalizan la degradación de otras proteínas hidrolizando los enlaces peptídicos con diferentes grados de intensidad y de selectividad. Un enlace peptídico es la unión que se realiza entre el grupo ácido de un aminoácido con el grupo amino de otro, con la consecuente eliminación de una molécula de agua. Estas enzimas son fisiológicamente necesarias para la existencia de los organismos, encontrándose en una amplia diversidad de fuentes como plantas, animales y microorganismos (Rao *et al.*, 1998).

Las proteasas de origen microbiano son preferidas sobre las de origen vegetal y animal ya que se elaboran en grandes cantidades y a un bajo costo. Respecto a los procesos de obtención de enzimas, el fermentativo tiene una serie de ventajas sobre el de extracción de tejidos animales y vegetales; entre esas ventajas, se pueden mencionar:

- La alta velocidad de síntesis.
- El elevado rendimiento de conversión del sustrato.
- El proceso de fermentación no es estacional.
- No requiere grandes extensiones de terreno (Hernández *et al.*, 2003).

Las proteasas son activas en un amplio rango de pH (pH 2 a 13) y exhiben una buena especificidad por su sustrato. Se han clasificado en proteasas ácidas, neutras y básicas en base al rango de pH en el que tienen una actividad óptima.

Las proteasas ácidas tienen una actividad entre pH 2 y 6. Las proteasas neutras tienen actividad a valores de pH cercano a la neutralidad y en condiciones ácidas su actividad disminuye. Las proteasas alcalinas tienen una actividad en un rango de pH 8 a 13 (Snadhya, 2005).

Las proteasas pueden encontrarse en plantas, animales y microorganismos, sin embargo, son estos últimos la principal fuente de proteasas debido a su amplia diversidad bioquímica y susceptibilidad a manipulación genética. Las proteasas microbianas juegan un papel importante en procesos biotecnológicos debido a su aplicación en alimentos (bebidas, panificación, ablandamiento de carne, etc.), industria farmacéutica (obtención de péptidos), en la industria de la curtiduría, tratamiento de aguas residuales y en detergentes, entre otros (Singh *et al.*, 2008; Marcial *et al.*, 2011).

5.2.1. Clasificación de proteasas

Debido a que las proteasas muestran una gran diversidad de mecanismos de acción y estructuras, es difícil establecer una clasificación general, y es por ello

que se han propuesto varias clasificaciones. La Comisión de Enzimas (EC) de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB, 1992), contempla que las proteasas pertenecen al grupo 3 (hidrolasas: EC 3.4) y dentro de éste al subgrupo 4 (peptidasas: EC 3.4). Por su parte, Nissen (1993), Gupta *et al.*, (2002) y Sánchez (2005) indican que las proteasas están clasificadas de acuerdo a:

- Fuente u origen: animal, vegetal, bacteriano o fúngico (Guadix *et al.*, 2000).
- Acción catalítica: según este criterio, las proteasas se clasifican en exopeptidasas, cuando hidrolizan un enlace peptídico no sustituido próximo al extremo amino o carboxi terminal del sustrato (separan aminoácidos, dipéptidos y tripéptidos), determinándose aminopeptidasas o carboxipeptidasas (EC 3.4.11-19), respectivamente. Las endoproteasas (3.4.21-24, 3.4.34, 3.4.99), se caracterizan por hidrolizar las cadenas peptídicas en las regiones internas alejadas de los extremos carboxi y amino terminal.
- Su sitio natural de catálisis: las carboxipeptidasas se clasifican en base a la naturaleza de los residuos de aminoácidos en el sitio activo de las enzimas en: serín (EC 3.4.16), metalo (EC 3.4.17), cisteín (EC 3.4.18) y aspartoproteasas. Existe un pequeño grupo dentro de las exopeptidasas que hidrolizan extremos sustituidos: las omegapeptidasas (EC 3.4.19). Las endopeptidasas se dividen en
 - 4 grupos según la naturaleza de su sitio activo: serín (EC 3.4.21), cisteín (EC 3.4.22), asparto (EC 3.4.23) y metaloproteasas (EC 3.4.24). Existe un quinto grupo en el que se incluyen aquellas endoproteasas cuyo mecanismo de acción aún no es conocido (Kenny, 1999).
- De acuerdo al pH, al que se presenta mayor actividad: proteasas ácidas (pH 2-6), proteasas neutras (pH 6-8) y proteasas alcalinas (pH 8-13).

5.3. Producción de proteasas

El principal productor de proteasas ha sido el género *Bacillus* sp., sin embargo, en los últimos años se ha incrementado el interés por el uso de hongos filamentosos en la producción de proteasas.

Existen reportes del uso de *Streptomyces* (De Azeredo *et al.*, 2004), *Aspergillus* (Wu *et al.*, 2006), *Penicillium* (Agrawal *et al.*, 2004) y *Rhizopus* (Kumar *et al.*, 2005); así como de *Aerobasidium pullulans* y *Yarrowia lipolytica* (Hernández *et al.*, 2010). Se han reportado altos títulos de proteasa extracelular producidos por *Y. lipolytica* (Madzak *et al.*, 2004).

El cultivo en medio sólido favorablemente utilizado para la producción de proteasas fúngicas debiéndose principalmente a que los hongos están naturalmente a crecer sobre superficies con bajo contenido de humedad. Dentro de las aplicaciones de cultivo sólido, se enumeran la producción de enzimas extracelulares con estabilidad en un amplio rango de pH y temperatura (Sumantha *et al.*, 2006; Ruíz *et al.*, 2007; Flores *et al.*, 2011). Desde el punto de vista industrial, se estima que el 30-40% de los costos de producción de enzimas es debido al costo medio de cultivo (Wang *et al.*, 2005). Los procesos de cultivo sólido permiten emplear residuos agroindustriales de bajo costo y gran disponibilidad (De Azeredo *et al.*, 2006).

En el proceso de cultivo sólido, las diferentes variables del proceso, como temperaturas, pH, humedad, actividad de agua, naturaleza, disponibilidad y concentración del sustrato, aireación, tamaño de partícula, tiempo de incubación, entre otros, etc., Thomas *et al.*, (2013) pueden ser optimizados con apoyo de métodos estadísticos a fin de identificar los factores críticos y sus interacciones sobre la variable de interés. La temperatura y el pH son dos parámetros ambientales que afectan en gran medida los procesos de fermentación y/o la síntesis enzimática (Bhunja *et al.*, 2013).

5.4. Aplicación de proteasas en la industria alimentaria

Las proteasas son enzima ampliamente utilizados en la producción de alimentos y, posiblemente, las más importantes desde el punto de vista económico, ya que son imprescindibles en industrias como la quesera o la cervecera (Díaz, 1994). Los principales usos de las proteasas hasta el momento son los siguientes:

5.4.1. Ablandamiento de carnes

Como la mayoría de los productos naturales, las enzimas proteolíticas han sido utilizadas empíricamente durante mucho tiempo, especialmente en materia de alimentación y salud. Un buen ejemplo lo constituye el empleo del jugo de mamón (*Carica papaya L.*), con el que los habitantes de muchas regiones de Centro y Sudamérica hacen más tiernas las carnes que consumen. Las proteasas contenidas en dicho jugo provocan el ablandamiento por hidrólisis parcial de las proteínas del tejido conectivo (colágeno y elastina) y en menos grado las de las mismas fibras musculares. Si bien las proteasas pueden aplicarse de muy diversas maneras, actualmente en la industria de la carne se logra un excelente tiernizado inyectado por vía endovenosa al animal antes de ser faenado una solución de enzima reversiblemente inactivada. La proteasa es reactivada por el poder reductor que adquiere el musculo luego de la muerte (Caffini *et al.*, 1988) y manifiesta su máxima actividad con el incremento de la temperatura en el proceso de cocción (Natalucci *et al.*, 2000). Con este tratamiento también se mejora la digestibilidad del producto.

5.4.2. Elaboración de cerveza

Otra aplicación importante de las proteasas es el uso que se hace de ellas en la industria de la cerveza, con el objeto de proporcionar a la misma una buena estabilidad coloidal a bajas temperaturas, es decir impedir que como consecuencia del enfriamiento se manifieste turbiedad o que sedimenten componentes que se mantenían solubles a temperatura ambiente. El fenómeno anterior es debido a la presencia de un complejo tanoproteico (tanino-proteína)

que resulta soluble en caliente o a temperatura ambiente, pero que tiene tendencia a precipitar en frío. Tanto las proteínas como los compuestos fenólicos provienen de las materias usadas en la preparación de la cerveza (cebada y lúpulo). Un modo de resolver el problema es impedir la formación del complejo o digerirlo parcialmente luego de formado; en este último se usan enzimas proteolíticas, en especial papaína, aunque también se ha ensayado con ficina, bromelina y pepsina. Debe tenerse en cuenta que la hidrólisis requiere ser controlada, ya que la cerveza debe mantener una adecuada proporción de proteína coloidal, necesaria para que la misma tenga “cuerpo” y produzca espuma abundante y duradera (Natalucci *et al.*, 2000).

5.4.3. Elaboración de quesos

Las proteasas se utilizan en la industria láctea, en especial en la fabricación de quesos. La renina o quimosina, una endopeptidasa que integra los fermentos gástricos de los rumiantes, ha sido tradicionalmente usada para producir la coagulación de la leche. Este proceso ocurre en dos etapas, la primera de las cuales es de naturaleza enzimática y consiste fundamentalmente en la hidrólisis de una unión peptídica específica de la κ -caseína (Dekker, 2014), haciéndola susceptible a coagular englobando lípidos y proteínas, en presencia de Ca^{++} y calor (lo que constituye la segunda etapa).

5.4.4. Panificación

Durante la panificación se adicionan proteasas fúngicas (*Aspergillus oryzae*), papaína o bromelina para mejorar la manipulación de la masa, así como su elasticidad y la textura del gluten, lo que finamente provoca un incremento sustancial del volumen de la masa, con la consiguiente reducción del tiempo de amasado (Natalucci *et al.*, 2000).

5.5. Proteasas en la nutrición animal

La aplicación de enzimas en alimentos para animales se hace con la finalidad de:

- a) Remover o destruir factores anti nutricionales en raciones para no rumiantes.
- b) Mejorar la digestibilidad total de la dieta; la baja digestibilidad de algunas materias primas, es por lo regular el resultado de la falta de enzimas endógenas del animal para extraer los nutrientes de los complejos dentro del ingrediente alimenticio.
- c) Aumentar la digestibilidad de polisacáridos no amilolíticas, de manera general, los no rumiantes carecen de la capacidad endógena para hidrolizar los carbohidratos de este tipo por lo que cuando se adicionan las enzimas necesarias los componentes monosacáridos producto de su hidrólisis, se pueden absorber y utilizar.
- d) Complementar la adición de las enzimas endógenas producidas por el animal. En cerdos y aves jóvenes cuando el sistema enzimático aún no se desarrolla completamente, hay deficiencia de algunas enzimas.
- e) Liberan algunos de los nutrientes atrapados, como azúcares simples y lisina.

5.6. Fermentación en medio sólido

La fermentación en medio sólido es una tecnología que tuvo sus orígenes como un arte ancestral. Originalmente, estos procesos fueron aquellos en los que los hongos filamentosos invadían ciertos materiales sólidos que luego eran consumidos por las personas (González, 1997). La característica esencial de la fermentación sólida es el crecimiento del microorganismo sobre un sustrato insoluble sin una fase libre, variando el nivel de humedad del 30 al 80% (Laukevics *et al.*, 1984).

La fermentación en medio sólido ofrece una serie de ventajas económicas sobre los procesos convencionales de fermentación sumergida para la obtención de productos de alto valor agregado (Castillo *et al.*, 2000), como etanol, enzimas, antibióticos, hongos comestibles, ácidos orgánicos, aminoácidos, pigmentos, metabolitos secundarios, etc. (Holker *et al.*, 2004); debido a los bajos niveles de humedad y a la disminución del volumen del medio por unidad de peso de sustrato, además de que se obtiene una alta productividad, los volúmenes de fermentación son menores a los sistemas sumergidos y el tratamiento del efluente es reducido (Aguilar *et al.*, 2001).

La fermentación en medio sólido (FMS) presenta diversas ventajas con respecto a la fermentación en medio líquido (FML), Doelle *et al.*, 1992., consideran como ventajas los siguientes aspectos:

- Los medios de cultivo son simples, generalmente subproductos agrícolas que presentan un alto contenido de los nutrientes necesarios.
- La baja actividad del agua es de gran ayuda para evitar las contaminaciones, especialmente de bacterias y levaduras.
- La concentración natural del sustrato permite utilizar reactores más pequeños en comparación con los utilizados en otro tipo de fermentación. Tienen mayor productividad volumétrica.
- La aireación forzada es facilitada por la porosidad del soporte, lo que permite una alta transferencia de oxígeno al microorganismo.
- Pueden emplearse frecuentemente conidios como inóculo en los procesos de crecimiento de hongos, lo cual disminuye los costos y las manipulaciones en la preparación del inóculo.

- Los conidios de los hongos que se producen son mucho más resistentes y tienen mejor adaptabilidad a las condiciones en las que se aplican como agente de biocontrol.
- El proceso de recuperación es simple. Algunos productos son utilizados integralmente, como alimento animal, productos para el control biológico, etc. Los procesos se consideran generalmente como tecnologías limpias.

5.7. Pasta de canola

Brassica napus, conocida como canola y también colza por su variedad oleácea es una especie de planta cultivada de la familia de las brassicáceas.

La canola o nabo se conoce desde tiempos muy antiguos, comúnmente y en mayor cantidad se emplea para la extracción de aceite de uso industrial o comestible; y una mínima parte sobre todo en su forma silvestre, para la alimentación de pájaros. Hasta hace poco se encontraba únicamente como mala hierba en otros cultivos, actualmente se explota como cultivo solo y en asociación con cereales de grano pequeño tales como cebada, trigo y avena. La pasta que queda cuando se extrae el aceite tiene un alto contenido proteínico comparable con el de la soya que se usa en la preparación de alimentos balanceados para la ganadería (Rincón, 1981).



Figura 1. Pasta de canola o canola.

La pasta de canola producida después de remover el aceite contiene cerca de un 40% de proteína, lo que la hace atractiva en la alimentación animal; sin embargo, se ha visto que existe una limitación en cuanto a la cantidad en que se debe incorporar, debido a la presencia en la pasta de un grupo de compuestos sulfurados denominados glucosinatos los cuales son liberados por hidrólisis por la enzima mirosinaza presente en la pasta, causando efectos metabólicos adversos cuando se emplea en cantidades elevadas en la dieta de los animales (Fenwick *et al.*, 1980).

En los últimos años se ha incrementado el empleo de la pasta de canola en la alimentación de las aves, debido a que se han desarrollado variedades de semilla de canola menos tóxicas. Con el hallazgo de estas nuevas variedades de canola, se ha demostrado que es posible incorporar en los alimentos balanceados niveles más altos de este subproducto.

5.8. Pasta de ajonjolí

El sésamo o ajonjolí (*Sesamum indicum* L.) es una planta cultivada por sus semillas ricas en aceite, que se emplean comúnmente en gastronomía.



Figura 2. Semilla de sésamo o ajonjolí.

El ajonjolí tiene un alto valor nutritivo, por la gran cantidad de proteínas, lípidos e importantes minerales y vitaminas (Namiki, 2007). Es de resaltar su contenido de proteína, que oscila entre 12 a 23% y el contenido de aceite entre el 40 y 60%; la calidad de su aceite esencialmente con alto contenido de ácido linoleico que va del 35 hasta 41% del aceite total (FAO, 2006).

La pasta de ajonjolí es un tipo de suspensión coloidal compuesta, principalmente, de sólidos hidrófilos suspendidos en aceite, al ser un residuo de la extracción del mismo, por ello, presenta una gran cantidad de proteína entre el 45 y 50%, de fibra cruda 5-7% y comúnmente, es usada como ingrediente para postres cremosos y salsas (Ahmad, 2012).

En el cuadro 2, se presenta la composición nutricional de las pastas de ajonjolí y canola son las más comunes utilizadas en la alimentación animal (Barreyro *et al.*, 2012).

Esta semilla antes de ser procesada puede ser consumida y utilizada ya sea tostada, molida o decorticada, siendo esta última forma esencial para la elaboración de perfumes, procesamiento de mantequilla, e incluso para producir alimentos para aves mejorando así la digestibilidad del alimento. Por otro lado, dicha oleaginosa puede ser aprovechada en forma de pasta, después de la extracción del aceite. La pasta de ajonjolí puede variar de composición y textura dependiendo de la variedad, como también del método de extracción del que se haga uso. Así mismo, el color de la pasta puede variar desde amarillo claro hasta gris oscuro dependiendo del color de la semilla (Juárez, 2004).

Cuadro 2. Composición química de las pastas de oleaginosas

% de Nutrientes	Pasta de Ajonjolí	Pasta de Canola
Materia seca	97.30 ± 0.0	94.0 ± 1.5
Proteína cruda (%N x 6.25)	51.0 ± 6.9	38.1 ± 1.3
Fibra cruda	15.3 ± 3.1	31.3 ± 3.5

Extracto etéreo	11.3 ± 1.6	14.0 ± 0.2
Cenizas	6.0 ± 0.6	7.0 ± 0.3

(Barreyro *et al.*, 2012).

5.9. *Yarrowia lipolytica*

La levadura ascomiceta *Yarrowia lipolytica* (originalmente clasificada como *Cándida lipolytica*) es una de las especies 'no convencionales' más intensamente estudiadas. Con la aparición de proyectos de proteínas de una sola célula (SCP) a mediados de los años sesenta, surgió un gran interés industrial por el hecho de que las cepas de esta especie pudieron usar *n*-parafinas (que eran baratas y abundantes en este período) como lenguaje. Fuente de carbono También se observó que *Y. lipolytica* fue capaz de producir altas cantidades de ácidos orgánicos (ácido 2-cetoglutarico y ácido cítrico) cuando creció en estos sustratos (Nakase *et al.*, 1989).

Yarrowia lipolytica es un ascomiceto de gran interés biotecnológico, ya que esta levadura es clasificada como “GRAS” (Generally Recognized as Safe, Generalmente Reconocidos como Seguros, por sus siglas en inglés) por la FDA (Food and Drug Administration, Administración de Drogas y Alimentos, por sus siglas en inglés). Es un excelente modelo de estudio en diversos campos de investigación como lo es la secreción enzimas proteolíticas, biogénesis de peroxisomas, dimorfismo y degradación de sustratos hidrofóbicos (Fickers *et al.*, 2005).

Debido a su naturaleza aerobia estricta, esta levadura comúnmente, se encuentra creciendo como contaminante en los alimentos ricos en lípidos y proteínas que habitualmente consumimos, por ejemplo: queso, yogurt, salchicha o ensaladas que contengan camarón o carnes.

Además, en sustratos como alcoholes y acetatos. Esta levadura también es encontrada en sustratos hidrofóbicos, tales como ácidos grasos, alcanos y parafinas (Barth y Gaillardin, 1997).

5.10. *Dimorfismo de Yarrowia lipolytica*

El dimorfismo es la capacidad que disponen ciertos hongos para poder alternar su forma de crecimiento, de levadura a micelio y viceversa; *Yarrowia lipolytica* presenta un crecimiento hifal o levaduriforme. Estos cambios fisiológicos y morfológicos son controlados por diversas condiciones del microambiente de crecimiento, como el pH, temperatura, estrés atmosférico o bien por componentes específicos en el medio de cultivo (Coehlo *et al.*, 2010); por ejemplo, se ha observado que el pH neutro favorece el crecimiento micelial, mientras que un pH ácido (de 3 a 4) induce el desarrollo de células levaduriformes (Ruiz-Herrera y Sentandreu, 2002).

Se cree que el dimorfismo de levaduras está relacionado a un mecanismo de defensa de condiciones adversas, tales como temperatura y cambios nutricionales. En cepas silvestres la habilidad de crecer en forma de hifa puede proveer una ventaja selectiva cuando se está enfrentando a condiciones de estrés.



Figura 3. A la izquierda se encuentran colonias de *Yarrowia lipolytica* que crecen en agar de recuento de placas en una placa de Petri.

Además de los alimentos artesanales, esta levadura se está utilizando ampliamente para la producción de alimentos y productos químicos. Debido a que *Yarrowia* es tan excelente en la producción y liberación de enzimas, se utiliza como una fuente inagotable de secreción de proteínas en biotecnología. Los genes que codifican proteínas útiles a menudo se empalman en la levadura, y se usa para producir y secretar estas proteínas de manera eficiente en grandes lotes. Debido a que la levadura produce tanto aceite dentro de sus células, existe un gran interés en usarla para la producción de biocombustibles. Los productores de mariscos también están interesados en cómo la harina de pescado suplementada con *Yarrowia* podría reemplazar la necesidad de pescado capturado en el medio silvestre como fuente de alimento en la producción comercial de pescado (Wolfe, 2014).

6. Metodología

El presente estudio se realizó en los laboratorios de Nutrición Animal del Departamento de Nutrición Animal de la División de Ciencia Animal de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Saltillo, ubicada en la ex hacienda Buenavista, municipio de Saltillo, Coahuila, México.

6.1. Etapa 1

6.1.1. Caracterización fisicoquímica de pasta de canola y ajonjolí

Se emplearon subproductos agroindustriales de pasta de canola y pasta de ajonjolí, los cuales fueron proporcionados por el Departamento de Nutrición Animal de la UAAAN Unidad Saltillo.

Las muestras fueron deshidratada en una estufa de secado a 60 °C por 48 h, para posteriormente ser molida en un mortero y tamizada por la malla No.14 (1.168 mm) para así obtener un polvo fino para los análisis siguientes.

6.2.1. Caracterización fisicoquímica de la pasta de canola y ajonjolí mediante un análisis proximal

Se llevó a cabo la caracterización físico-química de la pasta de canola y ajonjolí los parámetros determinados fueron:

- Materia seca total
- Humedad
- Cenizas
- Extracto etéreo (grasa)
- Nitrógeno
- Proteína cruda o bruta
- Fibra cruda
- Extracto libre de nitrógeno (ELN)
- Micro y macro nutrientes

Los análisis fueron realizados de acuerdo al manual de técnicas utilizadas por la AOAC (Association of Official Analytical Chemists, 1980), técnicas utilizadas como estándar a nivel internacional. Las muestras fueron analizadas por triplicado.

6.1.2.1. Materia seca total

Para determinar la materia seca total proceda con los siguientes pasos:

- Se colocó un crisol de porcelana en una estufa de secado a 105 °C por 24 horas. Se removió el crisol de porcelana de la estufa, utilizando pinzas de metal, y se colocó en un desecador. Se atemperó por 15 minutos para temperatura ambiente, con unas pinzas de metal se tomó el crisol y se pesó en una balanza analítica.
- Se agregaron 2.0 g de muestra al crisol y registró el peso de la muestra.
- Se colocó el crisol en una estufa de secado a 105 °C durante 24 horas.
- Al final del periodo de secado, se removió el crisol de la estufa y se depositó en un desecador, con las mismas precauciones indicadas con anterioridad. Déjelo atemperar por 15 minutos.
- Registró el peso del crisol más la muestra seca.

Para obtener el contenido de materia seca total a 105 °C, se empleó la siguiente ecuación:

$$\% MST = \frac{\text{peso del crisol} + \text{muestra seca} - \text{peso de crisol vacío}}{\text{gramos de muestra}} \times 100$$

El contenido de humedad se obtiene por diferencia:

$$\%H = 100 - \%MST$$

Las muestras secas se conservaron en los crisoles para la determinación del contenido de cenizas.



Figura 4. Equipo para la determinación de materia seca total (MST).

6.1.2.2. Cenizas

Los minerales que están presentes en los alimentos, de muy diversas formas, constituyen la materia denominada inorgánica, la cual se obtiene como residuo de la incineración del material o cenizas. Para la determinación de cenizas proceda con los siguientes pasos:

- El crisol y la muestra seca utilizada para la determinación de materia seca total (MST) se colocó en una mufla, donde se ha preestablecido como temperatura máxima los 600 °C.
- Cuando la temperatura alcanzó los 600 °C se incineran las muestras por espacio de dos horas.
- Se apaga la mufla y dejó que la temperatura descienda por 4 a 8 h.
- Con cuidado abrió la puerta de la mufla, se pasaron los crisoles hacia un desecador, utilizando pinzas y guantes de asbesto hasta temperatura ambiente.

- Se pesaron los crisoles más las cenizas con exactitud en una balanza de cuatro dígitos y se realizaron los cálculos siguientes para obtener el porcentaje de cenizas:

$$\% C = \frac{\text{peso del crisol} + \text{cenizas} - \text{peso de crisol vacío}}{\text{gramos de muestra}} \times 100$$

Para ajustar sus datos en base a materia seca total dividir su % cenizas entre su % MST y multiplicar por 100.



Figura 5. Mufla, equipo utilizado para la determinación de cenizas.

6.1.2.3. Extracto etéreo (Método Soxhlet)

El procedimiento para determinar extracto etéreo fue el método Soxhlet es el siguiente:

- Un matraz bola de fondo plano con capacidad para 250 mL, se colocó en una estufa de secado a 105°C por espacio de dos horas. Se dejó enfriar en un desecador, se pesó en una balanza y se registró su peso.

- En el matraz bola de fondo plano se adicionaron de 100 a 150 mL del solvente orgánico (hexano). Se recomienda no utilizar solventes cuyo punto de ebullición exceda los 85 °C.
- Se pesaron cerca de 4.0 g de muestra en una balanza y se colocó en los dedales de extracción a base de celulosa.
- El dedal con la muestra se introdujo en el sifón. Se conectó el sifón al matraz bola de fondo plano, se prendieron las parrillas eléctricas, hasta goteo constante.
- La muestra permaneció en recirculación ocho horas. Una vez cumplido el tiempo se retiró el dedal y recuperó el solvente.
- Una vez que no se tengan residuos de hexano en el matraz, los matraces con los residuos del extracto etéreo se depositan en la estufa de secado por 24 horas. Cumplido el tiempo se retiraron y colocados en un desecador. Se dejó enfriar, se pesó y registró el peso del matraz más muestra.

Se estimó el contenido de extracto etéreo de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% EE = \frac{\text{peso del matraz + grasa} - \text{peso de matraz vacio}}{\text{gramos de muestra}} \times 100$$

Para ajustar sus datos en base a materia seca total dividió el porcentaje de extracto etéreo (% EE) entre el porcentaje de materia seca total (% MST) y se multiplica por 100.



Figura 6. Equipo utilizado para la determinación de extracto etéreo por el método Soxhlet...

6.1.2.4. Nitrógeno y proteína cruda o bruta (Método Kjeldhal)

El procedimiento para la determinación de nitrógeno y proteína cruda por el método Kjeldhal fue siguiente:

- En un papel filtro o encerado libre de nitrógeno se pesó aproximadamente 1.0 g de muestra.
- Se colocó la muestra con el papel dentro del matraz tipo Kjeldhal, evitando que se pierda algo de muestra.
- Se añaden con mucho cuidado 30 mL de H_2SO_4 concentrado al matraz y se rota levemente el mismo para que se impregne completamente el papel con la muestra.
- Se colocan de cuatro a ocho perlas de ebullición y la mezcla reactiva de selenio.
- Se encendieron los calentadores de manera que la solución entre en ebullición. Durante este periodo la mezcla del matraz pasa de un color oscuro hasta quedar completamente claro o ligeramente verdoso, y deja de emitir vapores. Terminado el periodo, se apagaron los calentadores y se dejó enfriar los matraces.

- Se adicionó lentamente al matraz aproximadamente 300 mL de H₂O destilada para lavar las paredes, y dejó enfriar a temperatura ambiente. Asegurar que no se le forman cristales.
- Se añade al matraz lentamente, sin agitar, aproximadamente 100 mL de NaOH al 40%. Sin permitir que se caliente bruscamente la solución.
- Se colocó el matraz ola de fondo plano sobre el calentador del sistema de destilación y en el extremo opuesto del sistema de condensación se pone un matraz Erlenmeyer con aproximadamente 50 mL de la solución de ácido bórico al 4 % e indicadores correspondientes, de manera que el extremo del tubo recolector quede inmerso en la solución. Gire el matraz de manera que la solución de NaOH se mezcle completamente con el contenido del matraz. Encienda el calentador y destile.
- Destile hasta haber recolectado cerca de 250 mL de destilado. La solución debe haber cambiado de un color rojo a verde.
- Se retiró el matraz Erlenmeyer y titule el destilado con la solución estandarizada de H₂SO₄ y se calcula el porcentaje de nitrógeno en la muestra. Durante la titulación el color cambiará de color verde a un rojizo casi transparente. Se registró el volumen utilizado de ácido. Se debe correr un blanco en donde se coloca igual cantidad de reactivos.
- Al volumen utilizado para titular la muestra se resta el volumen utilizado en el blanco y se calculó el contenido porcentual de nitrógeno en la muestra de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% N = \frac{0.014 \times [(\text{ml de H}_2\text{SO}_4 \text{ de muestra} - \text{ml de H}_2\text{SO}_4 \text{ de blanco}) \times N \text{ de H}_2\text{SO}_4]}{\text{gramos de muestra}} \times 100$$

Para el cálculo de proteína cruda se multiplica el contenido de nitrógeno por el factor 6.25 o en su defecto el factor que más se adecua al tipo de material analizado, según se indicó con anterioridad.

$$\% \text{ de proteína cruda o bruta (PC o PB)} = \% \text{ de nitrógeno} \times 6.25$$

Para ajustar los datos en base a materia seca total se dividió el % PC entre el % MST y se multiplicó por 100.



Figura 7. Equipo Kjeldhal utilizado para la determinación de nitrógeno (por conversión proteína cruda o bruta), se aprecian los 3 procesos que conlleva el método (digestión, destilación y titulación).

6.1.2.5. Fibra cruda

Este análisis corresponde al método proximal o de Weende. Se basa en la digestión de la muestra en soluciones ácidas y básicas, donde el peso perdido de la muestra luego de la incineración del residuo se considera la fibra cruda. La muestra a utilizar debe ser una muestra libre o con muy poco contenido de lípidos por lo que la muestra que se utiliza para esta determinación es la que proviene de la determinación de extracto etéreo. Los pasos para la determinación de este parámetro son los siguientes:

- Se pesaron 2.0 g de muestra desengrasada, se colocaron en un vaso de Berzelius y registre el peso de la muestra y el vaso.
- Se agregaron 100 mL de ácido sulfúrico 0.255 N. se abrió la llave de recirculación, se encendieron las parrillas y se colocó el vaso de Berzelius. A partir de que la muestra empezó a hervir se tomó el tiempo hasta 30 minutos.
- Se calentó agua destilada, se colocó el filtro sobre el embudo y se filtró la muestra y se lavó con agua caliente.
- Por medio de una espátula se vació la muestra en el vaso y se agregaron 100 mL de hidróxido de sodio 0.313 N, a partir de que empiece a hervir nuevamente se cronometraron 30 minutos.
- Se retiró la muestra, se filtró y lavó con agua caliente, con las pinzas se pasa el crisol a la estufa, con la ayuda de una espátula se retiró la muestra y colocó en el crisol. Se dejó el crisol en la estufa durante 24 horas
- Se sacó el crisol de la estufa con las pinzas, pasándolo a un desecador, se atempero por 15 min., y se registró su peso.
- Posteriormente se colocó el crisol en la mufla durante 2 horas, se atempero en el desecador durante 30 minutos y se pesó.

Se determinó el porcentaje de fibra cruda de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% FC = \frac{\text{peso del crisol} + \text{muestra seca} - \text{peso de crisol} + \text{cenizas}}{\text{gramos de muestra}} \times 100$$

Para ajustar los datos en base a materia seca total se dividió el % FC entre el % MST y se multiplicó por 100.



Figura 8. Equipo Labconco para la determinación de fibra cruda

6.1.2.6. Carbohidratos totales solubles

Se calculó por gravimetría por diferencia de pesos. Los carbohidratos se definen como polihidroxi aldehidos y polihidroxi cetonas y sus derivados, agrupando a una gran cantidad de compuestos. Se obtiene sumando los porcentajes de cenizas, grasas, nitrógeno, proteínas y fibra cruda y se resta de 100 partes de muestra analizada. La ecuación es la siguiente:

$$\% \text{CTS} = 100 - (\% \text{cenizas} + \% \text{grasa} + \% \text{nitrógeno} + \% \text{proteína} + \% \text{fibra cruda})$$

6.1.2.7. Extracto libre de nitrógeno (ELN)

Se calculó por diferencia gravimétrica. El extracto libre de nitrógeno (ELN) corresponde a los azúcares, almidón y gran parte del material clasificado como hemicelulosa. Se obtiene sumando los porcentajes de cenizas, grasas, proteínas y fibra cruda y se resta de 100 partes de muestra analizada. Es necesario para realizar el cálculo total de nutrientes digestibles (TND). La ecuación es la siguiente:

$$\% \text{ELN} = 100 - (\% \text{cenizas} + \% \text{grasa} + \% \text{proteína cruda} + \% \text{fibra cruda})$$

6.1.2.7. Determinación de minerales (Método húmedo por absorción atómica; Fick *et al.*, 1976)

La determinación de los niveles de nutrientes inorgánicos de los alimentos tiene dos objetivos, el primero consiste en obtener minerales de forma concentrada, separados de cuanta fuente de interferencia sea posible, lo que se consigue destruyendo la materia orgánica del alimento por oxidación húmeda o incineración seca, obteniendo los elementos a medir en forma más fácilmente manipulable para su determinación. El segundo objetivo es la determinación de los elementos individuales, lo cual se puede realizar por varias técnicas. En el presente trabajo se analizaron 8 minerales: los microelementos (Cu,Zn,Mn,Fe) y macroelementos (Na,K,Ca,Mg) de la pasta de canola y ajonjolí, utilizando la espectrofotometría por absorción atómica, el tratamiento de la muestra para llevar dicha determinación fue la siguiente:

- Se colocó 1.0 g de muestra en un vaso de precipitado de 100 mL.
- Posteriormente se le adicionan 40 mL de la mezcla digestora ($\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$ en una concentración 3:1 v/v), se colocó en un vidrio de reloj como tapa al vaso de precipitado.
- Se llevó el vaso de precipitado a una plancha de calentamiento dentro de una campana de extracción, ahí se mantuvo hasta observar el cambio de color oscuro a cristalino, procurando que la mezcla digestora no baje de un volumen de 20 mL (en el caso de que no se haya realizado la digestión no se apreció cambio de coloración).
- Una vez digerida la muestra se dejó enfriar y al volumen resultante se le añadió un volumen doble de agua desionizada para neutralizar la muestra, posteriormente se filtró (papel filtro Whatman No.41 sin cenizas), el filtrado se recibió en un matraz de aforación de 100 mL y se afora con agua desionizada.

- Se llevó a cabo la lectura en el espectrofotómetro de absorción atómica, previamente calibrado, con los estándares para cada mineral.



Figura 9. Espectrofotómetro de absorción atómica donde se lleva a cabo la lectura de micro y macro nutrientes.

6.2. Etapa 2

6.2.1. Producción de la enzima proteasa en fermentación en medio sólido (FMS)

6.2.1.1. Microorganismo

Se utilizó la cepa *Yarrowia lipolytica*, conservada en glicerol 30 % (agente crioprotector).

6.2.1.2. Propagación y conservación del microorganismo

La propagación de la cepa *Yarrowia lipolytica* se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer que contenían agar extracto de malta y extracto de levadura en agua destilada, los cuales fueron esterilizados. Los matraces fueron incubados por un período de 48 hrs a 30 °C., de la suspensión de esporas obtenida se realizó una dilución 1:10, utilizando puntillas estériles, la cual se colocó en un tubo cónico Eppendorf (1 mL), la dilución se realizó con 100 µL de la solución concentrada de esporas a la cual se le añadieron 900 µL de agua destilada estéril. Esta dilución fue utilizada para realizar el conteo de esporas en la cámara de Neubauer.

La cepa *Yarrowia lipolytica* fue conservada en tubos Eppendorf con capacidad para 1 mL, utilizando un medio de crio-conservación el cual consistió en una mezcla de leche descremada al 8.5 % y glicerol al 10 % y conservadas en un congelador industrial a una temperatura de -20 °C, hasta su uso.

6.2.1.3. Producción del inóculo

Se tomaron tubos cónicos con la cepa *Yarrowia lipolytica* (previamente colectados en dichos tubos, con un medio de crio-conservación), tomándose alícuotas de 100 µL para inocular matraces Erlenmeyer con agar extracto de malta y extracto de levadura estéril, los cuales fueron incubados a 30 °C por 7 días (en la figura 7 se muestran los matraces en incubación). Pasado el tiempo de incubación se extrajeron las esporas del agar, añadiendo a cada matraz 30

mL de una solución estéril de Tween 80 al 0.01 % (v/v), se agitó en una parrilla durante 5 min. con ayuda de un agitador magnético estéril, por toda la superficie del agar, con la finalidad de desprender las esporas suavemente sin que se desprenda el medio de cultivo. De la suspensión de esporas obtenida se realiza una dilución 1:10, utilizando puntillas estériles, la cual se colocó en un tubo Eppendorf (1 mL), la dilución se realiza con 100 μ L de la solución concentrada de esporas a la cual se le añaden 900 μ L de agua destilada estéril. Esta dilución fue utilizada para realizar el conteo de esporas en la cámara de Neubauer.



Figura 10. Matracas Erlenmeyer de 250 ml con agar extracto de malta y extracto de levadura, inoculados con *Yarrowia lipolytica* en incubación a 30 °C.

6.2.1.4. Producción de proteasa en fermentación en medio sólido (FMS) a diferentes pH (4.5, 7.0 y 9.0).

La cinética de producción de la proteasa se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL. (Figura 11), en los cuales se colocaron 10 g de materia seca (pasta de canola y pasta de ajonjolí, utilizada como soporte/sustrato), posteriormente se ajustó el contenido de humedad a 60 % utilizando un medio mineral, el cual consistió en (g/L): KH_2PO_4 , 1.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5; KCl, 0.5 disueltos en buffer de fosfatos 0.1 M pH 4.5, 7.0 y 9.0 (Sandhya *et al.*, 2005). La concentración de

esporas fue ajustada a 2×10^7 esporas por cada g de materia seca (Tunga *et al.*, 2003). La cinética de fermentación se mantuvo a una temperatura de 30 °C por 72 h (Cuadro 3).



Figura 11. Sistema para la fermentación en medio sólido (FMS) de la cinética de producción de proteasa producida por *Yarrowia lipolytica*.

Cuadro 3. Condiciones iniciales de la fermentación en medio sólido

<i>Condiciones iniciales de la FMS</i>	<i>Ajuste</i>
Inóculo	2×10^7 esporas / g.m.s *
Humedad	60 %
Materia seca	10 g
Tamaño de partícula	850 μ m (Malla # 20)
Temperatura	40 °C
pH	4.5, 7.0 Y 9.0

*g.m.s: gramos de materia seca

6.2.1.5. Extracción de la enzima del material fermentado

El extracto enzimático se obtuvo mediante la adición de 10 mL de buffer de extracción TRIS- HCl 0.02 M pH 4.5, 7.0 y 9.0 por cada gramo de material fermentado. La suspensión se colocó en agitación por 30 min, posteriormente fue

filtrada y centrifugada a 4000 rpm por 10 min a una temperatura de 4 °C. El sobrenadante fue denominado extracto proteolítico y almacenado a – 20 °C, hasta su uso para la determinación de la actividad proteolítica. Se midió el pH del extracto.

6.2.1.5. Producción de proteasa en fermentación en medio sólido (FMS) utilizando un sistema de charolas

De acuerdo a los resultados obtenidos en la cinética de fermentación de producción de la proteasa, se determinó que la máxima producción de la proteasa es en un pH 4.5; en base a esto se procedió a llevar a cabo la producción proteasa a una escala mayor utilizando un sistema de charolas. Se utilizaron charolas de aluminio, en las cuales se colocaron 10 g de materia seca (pasta de canola y pasta de ajonjolí, utilizada como soporte/sustrato, con un tamaño de partícula de 850 µm), los cuales fueron distribuidos en las charolas de aluminio en camas de aproximadamente 1.5 cm de espesor, posteriormente se ajustó el contenido de humedad a 60 % utilizando un medio mineral (1.312 L), el cual consiste en (g/L): KH_2PO_4 , 1.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5; KCl, 0.5 disueltos en buffer de fosfatos 0.1 M pH 4.5 (Sandhya *et al.*, 2005). La concentración de esporas fue ajustada a una concentración de 2×10^7 esporas por cada g de materia seca (Tunga *et al.*, 2003). La cinética de fermentación se mantuvo a una temperatura de 30 °C por 72 h (figura 12).

Cada 6 h se tomaron dos matraces Erlenmeyer y al extracto se le realizaron los siguientes análisis:

- Determinación de la actividad proteolítica
- Medición de pH al extracto
- Determinación de la proteína soluble (método de Lowry) al extracto.



Figura 12. Sistema de fermentación en medio sólido (FMS) utilizando charolas.

Se tomaron muestras para llevar a cabo la extracción de la enzima proteolítica de acuerdo a la metodología previamente descrita. Dicho extracto proteolítico fue utilizado para determinar la actividad proteolítica y la determinación de la proteína soluble, siguiendo las metodologías previamente descritas para cada determinación, respectivamente.

6.2.1.6. Determinación de la actividad proteolítica

La actividad proteasa se determinó por el método Kembhavi descrito por Johnvesly *et al.* (2002). En donde a 100 μ L del extracto enzimático se añadieron a 900 μ L de caseína hidrolizada al 1 % (peso/volumen), la caseína fue disuelta en un buffer de fosfato 0.05 M pH 4.5, 7.0 y 9.0 y pre-incubada a 40 °C por 10 min. La reacción enzimática se llevó a cabo durante 10 min a una temperatura de 40 °C, la reacción se detuvo mediante la adición de 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 5 % (peso/volumen). La mezcla fue centrifugada a 4000 rpm por 10 min a una temperatura de 4 °C y filtrada a través de papel filtro Whatman No.1. Los péptidos solubles presentes en el sobrenadante fueron determinados por el método de Lowry a 660 nm., utilizando una curva patrón de tirosina como referencia (Anexo F). Una unidad de actividad proteasa fue definida como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μ g de tirosina por minuto bajo las condiciones de este ensayo.

6.2.1.7. Determinación de la proteína soluble (Método de Lowry, 1951)

El contenido de proteína soluble se determinó, según el método reportado por Lowry, utilizando tirosina como solución estándar (Lowry OH, 1951). Se colocaron 100 μ L de la muestra (sobrenadante), posteriormente se adicionaron 1000 μ L del reactivo C, se agitó por 30 seg. en vórtex, la mezcla se deja reposar por 10 min a temperatura ambiente. Después de este tiempo se colocan 100 μ L del reactivo Folin-Ciocalteu diluido en agua destilada (1:2), se agita por 30 seg. en vórtex y se deja reposar por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se mide la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 660 nm y la concentración de proteína soluble fue estimada por la interpolación a la curva patrón de tirosina (Anexo F).

6.2.1.8. Caracterización físico-química de la pasta de canola y pasta de ajonjolí fermentada mediante un análisis proximal

De la pasta de canola y pasta de ajonjolí fermentada se tomó una muestra para llevar a cabo el análisis físico-químico mediante un análisis proximal, dicho análisis se siguió de acuerdo a las metodologías previamente descritas.

6.3. Diseño experimental

Las muestras se asignaron a un diseño totalmente al azar. Los resultados se analizaron por ANOVA y comparación múltiple de medias de Tukey. Todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado; en los cuadros y figuras se reportan los valores medios. Las diferencias se aceptaron estadísticamente a $p < 0.05$.

7. Resultados y discusión

Caracterización fisicoquímica de las pastas de canola y pasta de ajonjolí

La semilla de ajonjolí posee nutrientes saludables que benefician a la salud. A esta oleaginosa se le puede dar valor agregado debido a su utilización en una gran variedad de productos que van desde aceites, pastas para dietas de animales, plásticos biodegradables y biocombustibles sin dejar de mencionar su alto contenido de proteínas, vitaminas y minerales, fundamentales en la nutrición (ASERCA, 2012).

Los resultados que se presentan en el cuadro 4, nos permitieron conocer los valores de los nutrientes de las pastas de canola y ajonjolí que se utilizaron como soporte/sustrato en el presente trabajo. El nutriente principal en el cual se centralizó dicho análisis fue en el valor de la proteína cruda (PC) este valor es por el cual las pastas de canola y ajonjolí son utilizadas como fuentes principales de proteína (aminoácidos) en la nutrición principalmente la animal y en este trabajo fue utilizado como soporte/sustrato para llevar a cabo la producción de enzimas proteolíticas en fermentación en medio sólido (FMS) utilizando la cepa *Yarrowia lipolytica*.

El resultado para este trabajo del nutriente de proteína cruda (PC) fue de 42.92 % en la pasta de canola y de 49.85 % para la pasta de ajonjolí muy similar a lo reportado por Barreyro *et al.*, 2012 donde ellos reportan un valor de 38.1 ± 1.3 % para la pasta de canola y de 51.0 ± 6.9 % para pasta de ajonjolí, con lo cual se puede evidenciar que las pastas de canola y de ajonjolí usadas en la presente investigación son de “alto contenido proteico”, Balderrama (2010), menciona que la semilla de ajonjolí es una gran fuente de energía y proteína, debido a que contiene del 17 a 23% de proteína cruda con una gran cantidad de metionina. De igual manera, la pasta de ajonjolí como producto de extracción, después de la obtención de aceite, es utilizado en la alimentación de ganado debido a sus propiedades nutricionales presentando así del 44 a 50% de proteína, del 10 al 12% de extracto etéreo, 5-7% de fibra cruda y del 5 al 12% de cenizas. En

cambio, Rincón (1981) menciona que la pasta de canola que queda cuando se extrae el aceite tiene un alto contenido proteínico que puede ser comparable con el de la soya que se usa en la preparación de alimentos balanceados. La pasta de canola producida después de remover el aceite contiene cerca de un 40 % de proteína; sin embargo, se ha visto que existe una limitación en cuanto a la cantidad en que se debe incorporar, debido a la presencia de factores anti nutricionales (FAN).

Barreyro y colaboradores (2012), dan por hecho que la variabilidad en la cuantificación de FAN en las pastas de oleaginosas se debe a las técnicas empleadas en su determinación, a la variedad de la semilla, así como al tratamiento térmico aplicado para su obtención. La presencia de FAN reduce la disponibilidad biológica y la digestibilidad de uno o más nutrientes, ocasionando disminución del consumo de alimento, de la función digestiva, eficiencia productiva y respuesta inmune. Muchos de estos factores antimetabólicos pueden ser inactivados mediante una adecuada aplicación de diversos tratamientos tecnológicos.

Con los resultados obtenidos (Cuadro 4) en el análisis de micros y macros minerales podemos decir que las pastas de canola y ajonjolí son una buena fuente de minerales. En el caso de la canola contiene niveles altos de potasio (K) 14.23 (mg/g) y de calcio (Ca) 13.47 (mg/g), niveles bajos de zinc (Zn) 0.12 (mg/g), Manganeso (Mn) 0.10(mg/g), cobre (Cu) 0.02 y sodio (Na) 4.97 (mg/g). En cuanto a la pasta de ajonjolí contiene niveles altos de potasio (K) 5.40 (mg/g) y de calcio (Ca) 4.93 (mg/g), sodio (Na) 5.30 (mg/g) niveles bajos de zinc (Zn) 0.05 (mg/g), Manganeso (Mn) 0.06 (mg/g), cobre (Cu) 0.01 (mg/g).

Cuadro 4. Caracterización fisicoquímica de la pasta de canola y pasta de ajonjolí.

	Investigación actual en % de pasta de canola	Valor por Barreyro et al., 2012	Investigación actual en % de pasta de ajonjolí	Valor por Barreyro et al., 2012

Materia seca total (MST)	93.18	94.0 ± 1.5	91.45	97.30 ± 0.0
Humedad	6.82	6.0 ± 1.5	8.54	2.7 ± 0.0
Cenizas	9.66	7.0 ± 0.3	5.67	6.0 ± 0.6
Nitrógeno	6.51	-	7.02	-
Proteína cruda	42.92	38.1 ± 1.3	49.85	51.0 ± 6.9
Extracto etéreo	16.21	14.0 ± 0.2	11.55	11.3 ± 1.6
Fibra cruda	14.27		13.65	
Extracto libre de nitrógeno (ELN)	36.94	-	31.48	35.83
Azúcares totales solubles	0.43	-	0.84	0.3
Cu (mg/g)	0.02	-	0.01	-
Mn (mg/g)	0.10	-	0.06	
Fe (mg/g)	9.33	-	5.67	-
Zn (mg/g)	0.12	-	0.05	-
Mg (mg/g)	5.13	-	2.07	3.51
K (mg/g)	14.23	-	5.40	4.58
Na (mg/g)	4.97	-	5.30	
Ca (mg/g)	13.47	-	4.93	4.55

Durante la segunda etapa se propagó la cepa *Yarrowia lipolytica* y se llevó a cabo la propagación del inoculo en agar extracto de malta combinado con extracto de levadura se incubó durante un periodo de 48 h a 30°C. La cepa fue conservada en un medio crio-conservador y almacenada a temperaturas inferiores a los 0°C hasta su uso.

Producción de proteasa en fermentación en medio sólido a pH 4.5, 7.0 y 9.0.

Las condiciones de operación de la cinética de producción de la proteasa se llevaron a cabo utilizando los sustratos de pasta de canola y pasta de ajonjolí; los cuales se pusieron en contacto con un medio mineral ajustando la humedad al 60 % y disuelto en buffer fosfato 0.1 M con pH 4.5, 7.0 y 9.0. La concentración de esporas fue ajustada a 2×10^7 por cada gramo (g) de materia seca pasta de canola y pasta de ajonjolí (ver cuadro 3). La cinética de fermentación se mantuvo a una temperatura de 30°C por 72 h.

Cabe mencionar que las pastas de canola y ajonjolí que se emplearon en esta investigación, son derivadas de procesos agroindustriales y mezcladas con otros subproductos como lo son: el maíz, sorgo, trigo y soya; con esto decimos que no son meramente pastas puras, sino, pastas que han sido mezcladas con otras fuentes proteicas.

En cuanto a la temperatura según Madigan *et al.*, (1998) y; McNeil, (1994) es uno de los factores más importantes que puede afectar al crecimiento y a la supervivencia microbiana, puede afectar en 2 formas muy diferentes. A medida que la temperatura sube, las reacciones enzimáticas son más rápidas y el crecimiento también, sin embargo, por encima de una cierta temperatura, las proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares pueden dañarse irreversiblemente.

Hablando del pH, cada microorganismo tiene un pH óptimo; independientemente de las condiciones externas, el pH intracelular debe permanecer cercano a la neutralidad, con la finalidad de impedir la destrucción de macromoléculas lábiles en condiciones ácidas o alcalinas.

La extracción de la enzima del material fermentado se obtuvo mediante la adición de un buffer TRIS-HCl 0.02M pH 4.5, 7.0 y 9.0, la suspensión se agito durante 30 minutos, fue filtrada y centrifugada a 4000 rpm durante 10 min a 4°C. El extracto proteolítico fue almacenado a temperaturas inferiores a 0°C hasta su uso para la determinación de la actividad proteolítica. Se midió el pH del extracto obtenido.

De acuerdo a los resultados obtenidos respecto a la cantidad de proteína soluble (Cuadro 5), en la cinética de fermentación de producción de proteasa, el tratamiento con pH 4.5 es más eficiente que los medios alcalinos. Produciendo mayor cantidad de proteína soluble en el sustrato con pasta de ajonjolí con 0.1435 mg/g ó 593.53 U/L y en pasta de canola con 0.1068 mg/g ó 445.26 U/L (Cuadros 5 y 6). Contrario a lo que determina Ikasari y Mitchell, (1996), que obtuvieron buenas recuperaciones de proteasas en el sustrato con canola en todos los valores de pH del tampón de extracción, con la excepción de pH 4.0. Se logró la recuperación más alta (354.3 U/g) utilizando tampón de fosfato de sodio a pH 7,0.

La actividad proteolítica máxima (371 U / g) ocurrió a pH 7.0, indicando que la enzima producida era una proteasa neutra. De acuerdo con Rao *et al.*, (1998) *A. oryzae* produce ácido, neutro, y proteasas alcalinas. Las proteasas ácidas fúngicas tienen un óptimo pH entre 4 y 4.5 y son particularmente útiles en el queso haciendo industria.

En el caso del sustrato con pasta de ajonjolí, no se encuentran trabajos sobre la producción de proteasas usando este subproducto como soporte, principalmente enfocan importancia en la energía metabolizable, contenido de aminoácidos y minerales, extracción de aceite que llega a proporcionar este sustrato, como lo hace Espín, (2013) en el cual concluye que la diferencia de lisina puede explicar la menor ganancia de peso y conversión alimenticia de aves alimentadas con pasta de ajonjolí.

En los resultados que nos presenta en el cuadro 6, podemos apreciar una disminución en el contenido de proteína cruda para la pasta fermentada de ajonjolí (PFA) (32.68 %) y para la pasta fermentada canola (PFC) (33.12 %), en

el caso del extracto etéreo una disminución para la PFA (1.34 %) y para la (1.69 %) En cuanto a la fibra cruda para PFA (15.61 %) y para la PFC (12.95 %), se puede observar un aumento en los niveles de extracto libre de nitrógeno para la PFA (43.86 %) y para la PFC (45.36 %) en cuanto a los azúcares totales solubles un aumento considerable para ambos sustratos en el caso de PFA (71.31 %) y para la PFC (73.18 %).

En relación al tipo de proteínas que conforman la proteína total de las pastas, se encontró que las glutelinas básicas forman la mayor parte de la proteína de las dos (PFA 62.7 ± 8.6 , PFC 59.7 ± 4.3 %), en segundo lugar las globulinas (33.4 ± 8.1 %) para la PFA y las albúminas (11.1 ± 3.5 y 23.0 ± 2.1 %) para la PFC, respectivamente. Para todas las pastas la proporción de prolaminas y glutelinas ácidas fue bajo (0.3 a 1.4 %) con respecto a las fracciones de proteína anteriormente señaladas.

Cuadro 5. Contenido de proteína soluble (mg/g) en pasta fermentada de canola y pasta de ajonjolí.

Sustrato	Proteína soluble (mg/g) a pH 4.5	Proteína soluble (mg/g) a pH 7.0	Proteína soluble (mg/g) a pH 9.0
Ajonjolí	0.1435	0.1249	0.1266
Canola	0.1068	0.1019	0.0933

Cuadro 6. Contenido de proteína soluble (U/L) en pasta fermentada de canola y pasta de ajonjolí.

Sustrato	Proteína soluble (U/L) a pH 4.5	Proteína soluble (U/L) a pH 7.0	Proteína soluble (U/L) a pH 9.0
Ajonjolí	593.53	536.00	516.36
Canola	445.26	438.71	405.04

Los resultados fueron similares a los informes de Qi *et al.*, (2007); Zhu *et al.*, (2008), Sun *et al.*, (2011) y; Wu *et al.*, (2013) para cisteín proteasas de *S. japonicus* con actividad optima en pH 7 (50°C), pH 5 (37°C), pH (40°C).

La actividad proteolítica fue estable en el intervalo de pH 2-6 con 66-79% de actividad residual. La estabilidad proteolítica observada estuvo de acuerdo por los autores mencionados anteriormente, quienes informaron estabilidad a pH 4-7 para cisteín proteasas de *S. japonicus*.

El pH del hábitat en el que se desarrollan estas especies, podría influir en la actividad de sus enzimas digestivas.

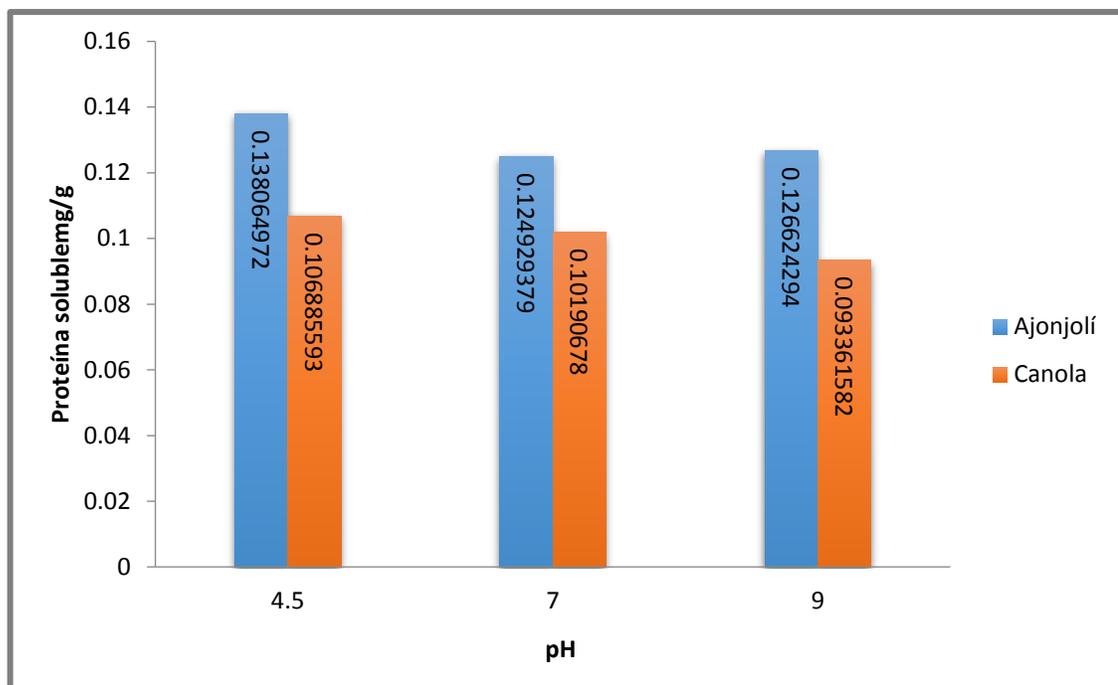


Figura 13. Producción de proteína soluble en pasta de canola Vs pasta de ajonjolí en tres pH.

En la figura 13 podemos ver que la mayor cantidad de proteína soluble se da en medio ácido, de esta manera podemos determinar que es más estable la actividad proteolítica, que se produce en rangos de pH 4.0-5.0.

Segel (1993), dice que la actividad enzimática está altamente influenciada por el pH, los sitios activos de las enzimas a menudo están compuestos por grupos iónicos, cuya conformación se debe mantener, con el fin de proporcionarle al sustrato la unión efectiva y por lo tanto permitir que se produzca la catálisis.

La biomasa de la fermentación se dejó sedimentar a 4°C y posteriormente se separa por filtración. Se realizó un análisis físico-químico a la pasta de canola y pasta de ajonjolí fermentada, los resultados se muestran en el cuadro 7.

Cuadro 7. Caracterización fisicoquímica de la pasta fermentada de canola y pasta fermentada de ajonjolí.

	Ajonjolí pH 4.5	Canola pH 4.5
<i>Materia seca total (MST)</i>	95.91	97.20
<i>Humedad</i>	4.09	5.22
<i>Cenizas</i>	6.5	6.87
<i>Nitrógeno</i>	5.23	5.30
<i>Proteína cruda</i>	32.685	33.12
<i>Extracto etéreo</i>	1.345	1.69
<i>Fibra cruda</i>	15.61	12.95
<i>Extracto libre de nitrógeno (ELN)</i>	43.86	45.36
<i>carbohidratos totales soluble</i>	71.31	73.18
<i>Cu (mg/g)</i>	0.006	0.006

Mn (mg/g)	0.0265	
Fe (mg/g)	0.25	9.75
Zn (mg/g)	0.0355	0.035
Mg (mg/g)	2.95	3.4
K (mg/g)	3.95	4.1
Na (mg/g)	14.15	15.3
Ca (mg/g)	11.4	10.9

Tan *et al.* (2011) mencionan que los procesos de extracción de aceites en las semillas oleaginosas provocan una disminución en la solubilidad de la proteína en agua y en sales diluidas, lo cual está asociado a un decremento en el contenido de FAN de origen proteico.

Barreyro *et al.* (2012), menciona que la pasta de canola y la pasta de ajonjolí fermentada contienen cantidades reducidas de inhibidores de tripsina y la digestión parcial en grandes péptidos por las proteasas secretadas, durante la fermentación se pueden reducir esos grandes péptidos aumentando la concentración de pequeños péptidos en el producto y que sean fácilmente digeridos.

La temperatura es uno de los factores más relevantes en el crecimiento de los microorganismos. Cada microorganismo tiene una temperatura de crecimiento adecuada. Si consideramos la variación de la velocidad de crecimiento en función de la temperatura de cultivo, podemos observar una temperatura mínima por debajo de la cual no hay crecimiento; a temperaturas mayores se produce un incremento lineal de la velocidad de crecimiento con la temperatura de cultivo hasta que se alcanza la temperatura óptima a la que la velocidad es máxima. Por

encima de esta temperatura óptima, la velocidad de crecimiento decae bruscamente y se produce la muerte celular. El aumento de la velocidad de crecimiento con la temperatura se debe al incremento generalizado de la velocidad de las reacciones enzimáticas con la temperatura. En términos generales, la velocidad de las reacciones bioquímicas suele aumentar entre 1.5 y 2.5 veces al aumentar 10 °C la temperatura a la que tienen lugar. La falta de crecimiento a temperaturas bajas se debe a la reducción de la velocidad de las reacciones bioquímicas y al cambio de estado de los lípidos de la membrana celular que pasan de ser fluidos a cristalinos impidiendo el funcionamiento de la membrana celular (Microbiología Clínica, 2008).

Producción de proteasa en fermentación en medio sólido (FMS)

La producción de la proteasa fue evaluada utilizando la levadura *Yarrowia lipolytica* en una fermentación en medio sólido (FMS) utilizando como soportes/sustrato la pasta de canola y pasta de ajonjolí con un volumen de inóculo de 2×10^7 esporas/g de materia seca e incubado a 30 °C por 72 h. En la figura 14 se puede apreciar que la máxima producción de la proteasa para la pasta de canola fue a las 30 h de fermentación (163.3 U/g), y para la pasta de ajonjolí fue las 54 h de fermentación (226.6 U/g), posterior a este tiempo la

Producción decrece, la reducción de la producción de la enzima se puede deber a la limitación de nutrientes y la hidrólisis de la propia proteasa (Sandhya *et al.*, 2005). En una fermentación en medio sólido (FMS) la producción de compuestos bioactivos de alta productividad se busca que se lleve a cabo en tiempos cortos (Ruiz Leza *et al.*, 2007).

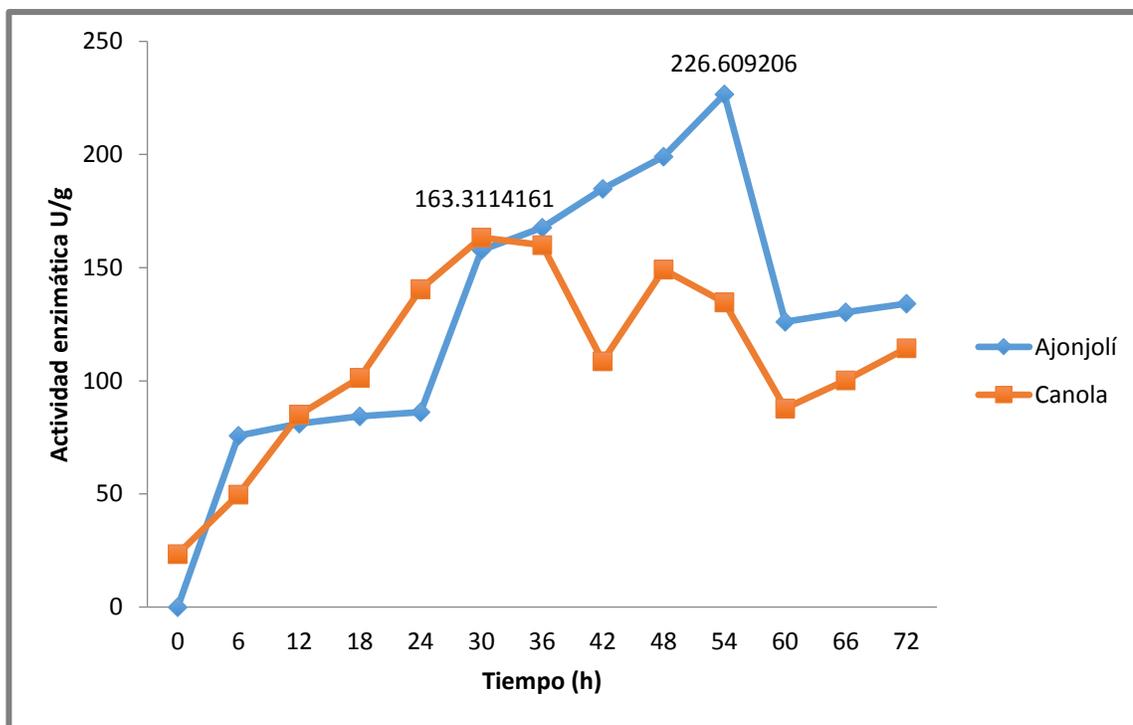


Figura 14. Cinética de producción de proteasa por *Yarrowia lipolytica* en FMS a 30 °C.

En el cuadro 8, se pueden observar una serie de trabajos que se han llevado a cabo para la producción de proteasa utilizando diferentes microorganismos y sustratos, la mayor parte de los trabajos presentados en este cuadro utilizan la fermentación en medio sólido (FMS), en la figura 14, se presentan los niveles máximos de actividad proteolítica y el tiempo al que se presentó la mayor actividad.

De acuerdo a los resultados obtenidos respecto a la cantidad de proteína soluble en la cinética de fermentación de producción de proteasa a 30°C por 72 h muestra que se produce mayor cantidad de proteína soluble en el sustrato con pasta de ajonjolí con 0.0205 mg/g y en pasta de canola con 0.0144 mg/g (Cuadro 9).

Cuadro 8. Producción de proteasa utilizando diferentes microorganismos y sustratos.

Microorganismo	Sustrato	Fermentación	Actividad proteolítica	Tiempo de producción de la proteasa (h)	Referencia
<i>Aspergillus tamarii</i>	Salvado de trigo	Sumergida	120 U/ml	96	Production of extracellular protease by <i>Aspergillus tamarii</i> (Gandolfi and Peralta, 2000)
<i>Aspergillus tamarii</i>	Pasta de soya	Sumergida	161 U/ml	144	Production of extracellular protease by <i>Aspergillus tamarii</i> (Gandolfi and Peralta, 2000)
<i>Penicillium sp.</i>	Pasta de soya	Medio sólido	43 U/ml	48	Characterization and stability of proteases from <i>Penicillium sp.</i> produced by solid state fermentation (Germano S. <i>et al.</i> , 2003)
<i>Streptomyces sp. 594</i>	Harina de plumas	Medio sólido	21.5 U/g	96	A low-cost fermentation medium for thermophilic protease production by <i>Streptomyces sp. 594</i> using feather meal and corn steep liquor (De Azeredo L.A.I. <i>et al.</i> , 2006)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Pelo de cerdo	Medio sólido	975 U/ml	120	Producción fúngica de proteasas inducidas con pelo de cerdo (Vázquez R. I. <i>et al.</i> , 2008)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Salvado de trigo/ salvado de arroz	Medio sólido	1200 U/g	96	Protease production by <i>Aspergillus oryzae</i> in solid state fermentation using agroindustrial substrates (Chutmanop J. <i>et al.</i> , 2008)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Harina de pescado	Medio sólido	252 U/ml	36	Purificación y caracterización de una proteasa termoestable alcalina producida por <i>Yarrowia lipolytica</i> (Hernández Martínez R. <i>et al.</i> , 2011)
<i>Aspergillus flavus</i>	Salvado de trigo	Medio sólido	640 UI	72	Production of protease by <i>Aspergillus flavus</i> through solid state fermentation using different oil seed cakes (Kranthi V.S. <i>et al.</i> , 2012)

<i>Aspergillus oryzae</i> CCBP 001	Harina de canola	Medio sólido	64 U/g	48	Canola cake as a potential substrate for proteolytic enzymes production by a selected Strain of <i>Aspergillus oryzae</i> : selection of process conditions and product characterization (Freitas C.A. <i>et al.</i> , 2013)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Pasta de canola	Medio sólido	163.3 U/g	30	Investigación actual
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Pasta de ajonjolí	Medio sólido	226.6 U/g	54	Investigación actual

Cuadro 8. Contenido de proteína soluble en pasta fermentada de canola y pasta fermentada de ajonjolí durante la cinética a 30°C por 72.

Tiempo (h)	0	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72
Proteína soluble (mg/g) PFA	0.0	0.0068	0.0073	0.0076	0.0078	0.0142	0.0151	0.0167	0.018	0.0205	0.0114	0.0118	0.0121
Proteína soluble (mg/g) en PFC	0.0	0.0045	0.0077	0.0091	0.0127	0.0147	0.0144	0.0098	0.0135	0.0122	0.0079	0.009	0.0103

8. Conclusiones

- Se presenta la evidencia de la producción de enzimas proteolíticas por *Yarrowia Lipolytica* empleando las pastas de canola y de ajonjolí por fermentación en medio sólido.
- Las pastas de canola y de ajonjolí pueden ser utilizada como soportes/sustratos para una fermentación en medio sólido (FMS), debido a su contenido proteico.
- La temperatura, a la cual la levadura *Yarrowia lipolytica*, presenta las mejores condiciones de adaptación para su crecimiento, en este ensayo, es a los 30 °C.
- La levadura *Yarrowia lipolytica* presentó la mayor actividad enzimática a las 30 h de fermentación para el caso de canola, siendo esta de 163.3 U/g y para el ajonjolí a las 54 h con 226.6 U/g, bajo las condiciones de este ensayo.
- En cuanto al pH, la actividad proteolítica se incrementa a valores de pH: 4.5 para el subproducto de canola (445.26 U/L) y pH: 4.5 para el subproducto de ajonjolí (593.53 U/L); por lo que el extracto enzimático producido puede contener proteasas ácidas y alcalinas respectivamente.

9. Perspectivas

La presente investigación establece un precedente en el área de investigación sobre la producción de enzimas proteasas utilizando sustratos de subproductos agroindustriales, esto permite una serie de perspectivas en el tema, las cuales se mencionan a continuación:

- Caracterización e identificación completa de proteasas producidas a partir de pasta de canola y pasta de ajonjolí.
- Evaluar el efecto de la temperatura en cada subproducto agroindustrial para saber si con ello se puede reducir el tiempo de producción del extracto enzimático.
- Determinar las mejores condiciones de producción de la enzima proteasa para cada sustrato utilizando el cultivo en medio sólido.
- Promover la investigación en el área alimentaria para incrementar la producción de alimentos más asimilables y digeribles para los seres vivos.
- Realizar una ósmosis o diálisis de moléculas de bajo peso molecular del extracto enzimático obtenido durante la fermentación para la realización de parámetros cinéticos de enzimas proteasas.
- Aplicación de enzimas proteasas a harinas de leguminosas mediante pulsos enzimáticos variando el tiempo de aplicación.

Bibliografía.

1. 1999, K. A. (1999). Introduction: Nomenclature and Classes of Peptidases. En E.E. Sterchi y W Stöcker (eds), *Proteolytic Enzymes*. Heidelberg: Springer Verlag-Berlin. , 1-8.
2. Adriana C. Freitas, R. J. (2013). Canola Cake as a Potential Substrate for Proteolytic Enzymes Production by a Selected Strain of *Aspergillus oryzae*: Selection of Process Conditions and Product Characterization . *Hindawi Publishing Corporation* .
3. Agrawal, D. P. (2004). Production of alkaline protease by *Penicillium* sp. under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis. . *Process Biochemistry Vol. 39* , 977-981.
4. agropecuaria), A. (. (2012). Oleaginosas. *Boletín ASERCA regional peninsular. Estados Unidos Mexicanos* .
5. Aguilar, C. A.-T.-G. (2001). Induction and repression patterns of fungal tannase in solid state and submerged cultures. . *Process Biochemistry 36* , 565-570.
6. AHMAD, K. (2012). Effect of centrifugation on temperature of sesame paste. *Agric. Eng. Int.: CIGR J. 14* , 179-182.
7. Alberto, G. A. (2016). PRODUCCIÓN DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS EN FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO Y SU EFECTO EN LA DIGESTIBILIDAD DE ALIMENTO DE ANIMALES NO RUMIANTES. *TESIS como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Producción* .
8. Alimentación, F. O.-c. (2006). *Fichas Técnicas, productos frescos y procesados de ajonjolí (Sesamum indicum)*. . Retrieved 12 03, 2019, from Fichas Técnicas, productos frescos y procesados de ajonjolí (Ses-amum indicum). .
9. Araceli Aguilera Barreyro, T. C. (2012). Composición química, constituyentes antinutricionales y fracciones de proteína de pastas de ajonjolí, soya y canola. *Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Querétaro* .
10. B., R. M., & Tanksale Apama M, G. M. (1998). Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and molecular Biology Reviews* , 597-635.
11. Balderrama, V. (2010). Digestibilidad ideal estandarizada de la proteína de pastas de ajonjolí y de soya en lechones. *Volumen 11* .

12. Barth G., G. C. (1997). Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. . *Fems Microbiology Reviews* 19(4) , 219-237.
13. Bhunia, B. B. (2013). Process engineering studies to investigate the effect of temperature and pH on kinetic parameters of alkaline protease production. *Journal of Bioscience and Bioengineering* Vol. 115 , 86-89.
14. C., S. (2005). Caracterización Bioquímica y Molecular de la haloproteasa CP1 producida por *Pseudoalteromonas rutherica*. Tesis Doctoral. Departamento de Microbiología y Parasitología . *Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. España.* , 13-65.
15. Castillo, L. R. (2000). Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agro-industrial residues with *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology* 71 , 45-50.
16. Chandran Snadhya, A. S. (2005). Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry* , 2689-2694.
17. Cristina, T. J. (2004, 04 01). *Proceso para la obtención de un aislado proteico de ajonjolí mediante solubilización, ultra filtrado y precipitación*. . Retrieved 12 10, 2019, from Proceso para la obtención de un aislado proteico de ajonjolí mediante solubilización, ultra filtrado y precipitación. :
<https://patentimages.storage.googleapis.com/10/98/e6/36b8dbdf7ff9d0/WO2004026038A1.pdf>
18. David L. Nelson, A. L. (2000). Lehninger principios de bioquímica. In D. L. Nelson, *Lehninger principios de bioquímica* (pp. 243-246). 3 era Omega, 2013.
19. De Azeredo L.A.I., F. D. (2004). Production and partial characterization of thermophilic proteases from *Streptomyces* sp. isolated from Brazilian cerrado soil. *Enzyme and Microbial Technology* , 354-358.
20. Dekker, R. F. (2014). Enzymes in Food an Beverage Processing. *TECHNICAL REVIEW* , 136-143.
21. Doelle, H. M. (1992). Solid Substrate Cultivation. *Elsevier Applied Science* .
22. Espín, M. G. (2013). "Evaluación de la efectividad nutricional de la pasta de ajonjolí (*Sesamum indicum* L.) como sustituto de la pasta de soya en el crecimiento de codornices (*Coturnix coturnix*)". *Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de Ingeniero en Agroempresas* .

23. Fickers P., B. H.-M. (2005). Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Research*, 5 (6-7) , 527-543.
24. Flores-Flores T.C., G.-R. M.-T. (2011). Comparative study for oxygenases produced by *Aspergillus niger* ATCC 9642 in solid state and submerged fermentation. *Revista Mexicana de Ingenieria Quimica Vol. 10* , 189-2017.
25. Guadix, A. G. (2000). Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Arspharmaceutica.* , 79-89.
26. Gupta R., B. Q. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. . *Appl Microbiol Biotechnol* , 15-32.
27. Hernández, A., Alfaro, I., & Arrieta, R. (2003). Microbiología industrial. In A. Hernández, *Microbiología industrial* (pp. 206-207). San José, Costa Rica: 1 era EUNED.
28. Hernandez-Martínez, R. S.-S.-D.-O. (2011). Purification and characterization of a thermostable alkaline protease produced by *Yarrowia lipolytica*. *Revista Mexicana de Ingenieria Química Vol. 10* , 333-341.
29. Hernández-Sámano, A., Guzmán-García, X., García-Barrientos, R., Ascencio-Valle, F., Sierra-Beltrán, A., Vallejo-Córdoba, B., et al. (2015). EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF SEA CUCUMBER *Isostichopus fuscus* PROTEASES, COLLECTED AT THE GULF OF CALIFORNIA, MEXICO. *Revista Mexicana de Ingeniería Química, vol. 14* , 35-47.
30. Holker, U. H. (2004). Biotechnology advantages of laboratory-scale solid state fermentation. Part I. *Process Biochemistry*, 12 , 24-27.
31. J., A.-N. (1997). Proteases. En: Enzymes in Food processing. T. Nagodawithana and G. Reed. *Academic pres, INC. San Diego California.* , 182-184.
32. J., M. M. (1994). The Medical Important Aerobic Actinomycetes-. *Epidemiology and Microbiology. Clinical Microbiology* , 357-417.
33. Kumar, S. S. (2005). Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. *Process Biochemistry Vol. 40* , 1701-1705.
34. L. Ikasari and D. A. Mitchell. (1996). Leaching and characteration of *Rhizopus oligosporus* acid protease from solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology, vol. 19* , 171-175.

35. Laukevics, J. J. (1984). *Biotechnology and Bioengineering*. 2465-2474.
36. M. B. Rao, A. M. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 62 , 597-635.
37. Madigan M., M. J. (1998). *Crecimiento Microbiano. Brock Biología de los microorganismos*. México, D.F. : Prentice-Hall.
38. Madzak, C. G. (2004). Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. *Journal of Biotechnology Vol. 109* , 63-81.
39. Marcial, J. P.-G.-G. (2011). Caracterización de una Asparto proteasa producida por *Amylomyces rouxii*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química. Vol 10* , 9-16.
40. NAMIKI, M. (2007). Nutraceutical Functions of sesame. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 47* , 651-673.
41. Natalucci, C. P. (2000). FITOPROTEASAS: UN RECURSO NATURAL RENOVABLE NO EXPLOTADO EN ARGENTINA. *Anales de SAIPA - Sociedad Argentina para la Investigación de Productos Aromáticos* , 35-43.
42. NESTOR O. CAFFINI, L. M. (1988). Proteasas de Plantas Superiores I. Características Generales, Rol Fisiológico y Aplicaciones. *Acta Fann. Bonaerense 7* , 193-213.
43. Qi, H. D. (2007). Purification and characterization of a cysteine-like protease from the body wall of the sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Fish Physiology and Biochemistry 33* , 181-188.
44. Rincón, C. (1981). Guía para cultivar oscolza de temporal en los valles alt. *INIA-SARH* , 2-8.
45. Rubio, O. D. (1994, Febrero). *EFFECTO DE LA ADICION DE PROTEASAS EN EL PROCESO MADURATIVO DE LOS EMBUTIDOS CRUDOS CURADOS*. Retrieved 12 03, 2019, from *EFFECTO DE LA ADICION DE PROTEASAS EN EL PROCESO MADURATIVO DE LOS EMBUTIDOS CRUDOS CURADOS*: <http://webs.ucm.es/BUCM/tesis//19911996/D/2/AD2008101.pdf>
46. Ruíz-Leza, H. A.-J.-H.-E. (2007). Bio-reactors design for solid state fermentation. *Revista Mexicana de Ingeniería Química Vol.6* , 33-40.
47. Sandhya C., S. A. (2005). Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid state fermentation. *Process Biochemistry Vol.40* , 2689-2694.
48. Sudheer Kumar Singh, G. S. (2008). Production of Enzymes by Solid-state Fermentation. *Current Developments in Solid-state Fermentation* , 183-204.

49. Sumantha, A. L. (2006). Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: A perspective. *Food Technology and Biotechnology Vol. 44* , 211-220.
50. Sun, L. Z. (2013). Purification and characterization of cathepsin B from the gut of the sea cucumber (*Stichopus japonicas*). *Food Science and Biotechnology 20* , 919-925.
51. Thomas, L. L. (2013). Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal Vol. 81* , 146-161.
52. Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). Introducción a la Microbiología. In G. J. Tortora, *Introducción a la Microbiología* (pp. 116-117). Buenos Aires, Bogotá: Medica Panamericana.
53. Tsugawa R., N. T. (1989). Fermentation of n-paraffins by yeast. Part III. α -Ketoglutarate productivity of various yeast. *Agr. Biol. Chem. (Tokyo) 33* , 929–938.
54. Tunga R., S. B. (2003). Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. *Process Biochem Vol. 38* , 1553-1558.
55. Viniegra González, G. (1997). Advances in solid state fermentation. *Kluwer Academic* , 631.
56. Wang, S. H. (2008). Purification and characterization of three novel keratinolytic metalloproteases produced by *Chryseobacterium indologenes* TKU014 in a shrimp shell powder medium. *Bioresource Technology Vol. 99* , 5679-5686.
57. Wolfe, B. (2014). Guía de microbios: *Yarrowia lipolytica*. *Microbial Foods.Org* .
58. Wu, H. H. (2013). Identification of a novel gelatinolytic metalloproteinase (GMP) in the body wall of sea cucumber (*Stichopus japonicas*) and its involvement in collagen degradation. *Process Biochemistry 48* , 871-877.
59. Wu, T. M. (2006). Investigations on protease production by a wild-type *Aspergillus terreus* strain using diluted retentate of pre-filtered palm oil mill effluent (POME) as substrate. *Enzyme and Microbial Technology Vol. 39* , 1223-1229.
60. Zhu, B. Z. (2008). Purification and characterization of a cathepsin L-like enzyme from the body wall of the sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 72* , 1420-1437.

ANEXOS

Anexo A. Algunos equipos utilizados en la presente investigación

- **Estufa de secado a 60 °C**

Marca: Robertshaw Control Company

Serie: 15697

- **Molino Thomas Willey**

Marca: M. Thomas Company

Modelo: 4

- **Estufa de secado 105 ± 5 °C**

Marca: Thelco

Modelo: 27 GCA Precisión Scientific

- **Mufla Thermo Scientific**

Marca: Thermolyne

Modelo: 1500

- **Balanza analítica capacidad 210 g**

Marca: OHAUS

Modelo: Explorer 490202

- **Balanza portátil scout Pro capacidad 600 g**

Marca: OHAUS

Modelo: 00870

- **Balanza semi-analítica capacidad 410 g**

Marca: AND

Modelo: EJ-410

- **Balanza semi-analítica capacidad 610 g**

Marca: AND

Modelo: EJ-610

- **Aparato Labconco para Fibra Cruda**

Serie: 54781

- **Espectrofotómetro UV**

Marca: Thermo Spectronic

Modelo: Helios Epsilon

- **Centrífuga CL-2**

Marca: Thermo IEC

Modelo: Centro CL-2 42610010

- **Parrilla de agitación y calentamiento**

Marca: IKA C-MAG

Modelo: HS7

- **Potenciómetro digital (pH-meter)**

Marca: conductronic pH10

- **Incubadora**

Marca: Quincy Lab. Inc. (QL)

Modelo: 20 GC Lab.Oven

- **Espectrofotómetro de absorción atómica**

Marca: Varian

Serie: AA-1275

- **Cámara de recuento Neubauer-improved**

Marca: Marienfeld GmbH Co. KG

- **Microscopio óptico binocular**

Marca: Motic microscopes

Serie: B3 Professional Objetivos 4x, 10x, 40 x y 100x (para aceite)

- **Vortex Mixer**

Marca: Labner Internacional Inc.

- **Higrómetro Aqualab**

Marca: Decagon devices Inc.

Modelo: 3

Serie 01056412B

Anexo B. Principales reactivos utilizados en la presente investigación

- **Hexano.** Marca: JalmeK
- **Ácido sulfúrico (H₂SO₄).** Marca JalmeK
- **Hidróxido de sodio (NaOH).** **Marca: JalmeK**
- **Ácido nítrico (HNO₃).** Marca: CTQ
- **Acido perclórico 70 % (HClO₄).** Marca: Fermont Productos Químicos Monterrey
- **Agar extracto malta.** Marca: BD Difco TM
- **Extracto de levadura.** Marca: SOLBIOISA Bionutrientes
- **Glicerina (C₃H₈O₃).** Marca: JalmeK
- **Tween 80 humectante grado.** Marca:BYCEL de México SA de CV
- **Fosfato de potasio dibásico (K₂HPO₄).** Marca: JalmeK
- **Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO₄ 7 H₂O).** Marca: JalmeK
- **Cloruro de potasio (KCl).** Marca: CTR Scientific
- **Fosfato de sodio dibásico (Na₂HPO₄).** Marca: Productos Químicos Monterrey
- **Fosfato de sodio monobásico anhidro (NaH₂PO₄).** Marca: CTR Scientific
- **TRIS Tris (Hydroxymethyl) aminomethano.** Marca: Biotech Biobasic Inc.
- **Ácido Clorhídrico (HCl).** Marca: JalmeK
- **Caseín Hydrolysate** marca Sigma-Aldrich
- **DL- Tyrosine 98 %** marca Sigma-Aldrich
- **Acido tricloacetico (TCA).** Marca: CTR Scientific
- **Hidróxido de sodio (NaOH).** Marca: JalmeK
- **Carbonato de sodio (Na₂CO₃).** marca: JalmeK
- **Tartrato de sodio y de potasio (KNaC₄H₄O₆4H₂O).** Marca: JalmeK
- **Folin Ciocalteu's Phenol** marca Sigma-Aldrich
- **Sulfato cúprico (CuSO₄ 5H₂O)** marca Fermont Productos Químicos Monterrey
- **Fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄).** Marca: JalmeK

Anexo C. Preparación de reactivos.

❖ Preparación de reactivos para extracción de la enzima:

- **Buffer TRIS-HCl 20 mM (0.02 M) pH 8**

Pesar 2.42 g de TRIS base

Medir un volumen de 0.0114 L de HCl 1N

Disolver en agua destilada y aforar a 1 L

❖ Preparación de buffer de fosfatos para ensayo de actividad proteolítica :

- **Buffer de fosfatos 50 mM (0.05 M) pH 7**

Pesar 4.29 g de fosfato disódico anhidro (Na_2HPO_4)

Pesar 2.37 g de fosfato monosódico anhidro (NaH_2PO_4)

Disolver en agua destilada y aforar a 1 L

❖ Preparación de buffer de fosfatos para el medio mineral utilizado en la fermentación :

- **Buffer de fosfatos 0.1 M pH 7**

Pesar 9.47 g de fosfato disódico anhidro (Na_2HPO_4)

Pesar 3.99 g de fosfato monosódico anhidro (NaH_2PO_4)

Disolver en agua destilada y aforar a 1 L

❖ Preparación de reactivos para medir proteína soluble por el método de Lowry

⋮

- **Reactivo A**

Pesar 4 g de hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N

Pesar 30 g de carbonato de sodio (Na_2CO_3) 2 %

Disolver en agua destilada y aforar a 1 L

- **Reactivo B**

Pesar 40 g de tartrato de sodio y potasio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$) 4 %

Pesar 20 g de sulfato cúprico (CuSO_4) 2 %

Disolver en agua destilada y aforar a 1 L

- **Reactivo C**

Solución alcalina de cobre, mezclar 50 mL del reactivo A con 1 mL del reactivo B, esta solución debe ser preparada al momento de su uso.

- **Reactivo D**

Solución de Folin-Ciocalteu diluida en agua destilada (1:2), esta solución debe ser preparada al momento de su uso.

- ❖ **Preparación de buffers para medir el efecto del pH en la actividad proteolítica:**

- **Buffer de citratos 0.1 M pH 3**

Pesar 4.84 g de citrato de sodio ()

Pesar 16.06 g de ácido cítrico ()

Disolver en agua destilada y aforar a 1 L

- **Buffer de citratos 0.1 M pH 4**

Pesar 12.26 g de citrato de sodio ()

Pesar 11.2 g de ácido cítrico ()

Disolver en agua destilada y aforar a 1 L

- **Buffer de citratos 0.1 M pH 5**

Pesar 20.8 g de citrato de sodio ()

Pesar 5.58 g de ácido cítrico ()

Disolver en agua destilada y aforar a 1 L

- **Buffer de fosfatos 0.1 M pH 6**

Pesar 2.0 g de fosfato disódico anhidro (Na_2HPO_4)

Pesar 10.3 g de fosfato monosódico anhidro (NaH_2PO_4)

Disolver en agua destilada y aforar a 1 L

- **Buffer de fosfatos 0.1 M pH 7**

Pesar 9.47 g de fosfato disódico anhidro (Na_2HPO_4)

Pesar 3.99 g de fosfato monosódico anhidro (NaH_2PO_4)

Disolver en agua destilada y aforar a 1 L

- **Buffer de TRIS-HCl 0.1 M pH 8**

Pesar 12.1 g de TRIS base

Medir un volumen de 0.0535 L de HCl 1N

Disolver en agua destilada y aforar a 1 L

- ❖ **Preparación de reactivos utilizados en la determinación de la digestibilidad in vitro:**

- **Ácido Clorhídrico (HCl) 0.075 N**

Medir un volumen de 6.24 mL de ácido clorhídrico (HCl) concentrado

Disolver en agua destilada y aforar a 1 L

- **Hidróxido de sodio (NaOH) 0.2 N**

Pesar 8 g de hidróxido de sodio (NaOH)

Disolver en agua destilada y aforar a 1 L

❖ **Preparación de reactivos utilizados para medir la actividad ureásica:**

- **Rojo de fenol al 0.1 %**

Pesar 0.1 g de rojo de fenol disolverlos en 15 mL de hidróxido de sodio (NaOH) 0.02 N

Aforar a 100mL

- **Solución buffer de fosfatos 0.05 M**

Pesar 3.403 g de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) y disolver en 100 mL de agua destilada recién hervida

Pesar 4.355 g de fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4) y disolver en 100 mL de agua destilada

Combine ambas soluciones, adicione 10 mL de rojo fenol al 0.1 %

Aforar a 100 mL y ajustar el pH a 7

- **Solución buffer de urea**

Pesar 15 g urea

Disolver y aforar a 500 mL con buffer de fosfatos y ajustar el pH a 7

Anexo D. Curva patrón de tirosina

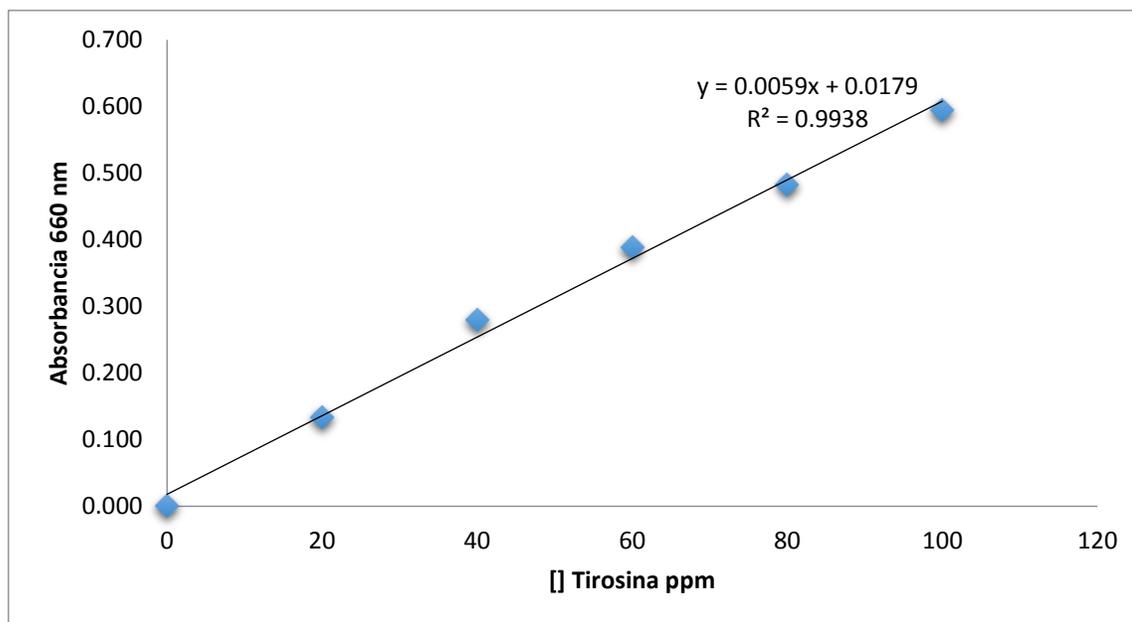


Figura 15. Curva patrón de Tirosina a 100 ppm.

Anexo E. diseño experimental ANOVA para proteína soluble
ANOVA_PROTEINAS SOLUBLE AJONJOLÍ

Procedimiento ANOVA

Información del nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
	Tiempo	13 0 6 12 18 24 30 36 42 48 54 60 66 72

Número de observaciones 39

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Repeticiones

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	12	0.11167969	0.00930664	164.31	<.0001
Error	26	0.00147267	0.00005664		
Total correcto	38	0.11315236			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Rep Media
0.986985	6.556062	0.007526	0.114795

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tiempo	12	0.11167969	0.00930664	164.31	<.0001

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Repeticiones

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	26
Error de cuadrado medio	0.000057
Valor crítico del rango estudentizado	5.13931
Diferencia significativa mínima	0.0223

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	Tiempo
	A	0.204667	3 54
	B	0.180000	3 48
C	B	0.167333	3 42
C	D	0.151333	3 36
E	D	0.142333	3 30
E	F	0.121000	3 72
	F	0.117333	3 66
	F	0.113667	3 60

G	0.077667	3	24
G	0.076000	3	18
G	0.073000	3	12
G	0.068000	3	6
H	0.000000	3	0

ANOVA CANOLA_PROTEINA SOLUBLE

Procedimiento ANOVA

Información del nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
Tiempo	13	0 6 12 18 24 30 36 42 48 54 60 66 72

Número de observaciones 39

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Repeticiones

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	12	0.06599492	0.00549958	20.86	<.0001
Error	26	0.00685557	0.00026368		
Total correcto	38	0.07285049			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Rep Media
0.905895	17.26704	0.016238	0.094041

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tiempo	12	0.06599492	0.00549958	20.86	<.0001

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Rep

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	26
Error de cuadrado medio	0.000264
Valor crítico del rango estudentizado	5.13931
Diferencia significativa mínima	0.0482

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	Tiempo
	A		0.14733 3 30
	A		0.14467 3 36

	B		A		0.13433	3	48
	B		A	C	0.12667	3	24
	B	D	A	C	0.12133	3	54
E	B	D	A	C	0.10333	3	72
E	B	D		C	0.09433	3	42
E	B	D	F	C	0.09167	3	18
E		D	F	C	0.07900	3	60
E		D	F		0.07667	3	12
E			F		0.05853	3	66
	G		F		0.04467	3	6
	G				0.00000	3	0

Anexo F. Diseño experimental ANOVA para actividad enzimatica

Procedimiento ANOVA AJONJOLÍ

Información del nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
Tiempo	13	0 6 12 18 24 30 36 42 48 54 60 66 72

Número de observaciones 39

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Rep

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	12	136423.5645	11368.6304	162.54	<.0001
Error	26	1818.5829	69.9455		
Total correcto	38	138242.1473			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Rep Media
0.986845	6.574291	8.363342	127.2128

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tiempo	12	136423.5645	11368.6304	162.54	<.0001

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Rep

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	26
Error de cuadrado medio	69.94549
Valor crítico del rango estudentizado	5.13931
Diferencia significativa mínima	24.816

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	Tiempo		
	A	226.609	3	54	
	B	199.092	3	48	
C	B	184.826	3	42	
C	D	167.677	3	36	
E	D	157.699	3	30	
E	F	134.157	3	72	
	F	130.259	3	66	
	F	126.127	3	60	
	G	86.215	3	24	
	G	84.267	3	18	
	G	81.071	3	12	
	G	75.770	3	6	
	H	0.000	3	0	

PROCEDIMIENTO ANOVA CANOLA

Procedimiento ANOVA

Información del nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
Tiempo	13	0 6 12 18 24 30 36 42 48 54 60 66 72

Número de observaciones 39

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Repeticiones

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Suma de la media	Cuadrado de F-Valor	Pr > F
Modelo	12	76115.87036	6342.98920	38.94	<.0001
Error		26	4234.95705	162.88296	
Total correcto	38	80350.82740			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Rep Media
0.947294	11.89375	12.76256	107.3048

Cuadrado de Fuente	DF	Anova SS	la media	F-Valor	Pr > F
Tiempo	12	76115.87036	6342.98920	38.94	<.0001

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Rep

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	26
Error de cuadrado medio	162.883
Valor crítico del rango estudentizado	5.13931
Diferencia significativa mínima	37.869

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	Tiempo		
		A	163.31	3	30
		A	160.04	3	36
B		A	149.20	3	48
B		A	140.55	3	24
B	D	A	134.70	3	54
B	D	E	114.43	3	72
		D	108.59	3	42
		D	101.34	3	18
		D	100.25	3	66
		E	87.77	3	60
F		E	85.05	3	12
F			49.73	3	6
		G	0.00	3	