

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y ALIMENTOS



**ESTUDIO PRELIMINAR DE LAS CONDICIONES DE PRODUCCIÓN
DE QUERATINASA FÚNGICA CON SUSTRATO NO
CONVENCIONAL**

TESIS

Presenta:

RAFAEL IMIR VÁZQUEZ MONJE

Para obtener el grado de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS



UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA

“ANTONIO NARRO”

La Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” a través del jurado
examinador

Hace constar que la tesis titulada:

**ESTUDIO PRELIMINAR DE LAS CONDICIONES DE PRODUCCIÓN DE
QUERATINASA FÚNGICA CON SUSTRATO NO CONVENCIONAL**

Presentada por:

RAFAEL IMIR VÁZQUEZ MONJE

Ha sido aceptada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

En virtud de haber cumplido íntegramente los requisitos de la
comisión de Tesis y Monografías:

A T E N T A M E N T E
“Alma Terra Mater”

M.C. Antonio F. Aguilera Carbó
Presidente

Dr. Cristóbal Noé Aguilar González
1^{er} Vocal

Lic. Laura Olivia Fuentes Lara
2^o Vocal

Dra. Rosalinda Mendoza Villareal
Vocal Suplente

Dr. Ramón F. García Castillo
Coordinador de la División de Ciencia Animal



UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA

“ANTONIO NARRO”

La Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” a través del
comité de asesor

Hace constar que la tesis titulada:
**ESTUDIO PRELIMINAR DE LAS CONDICIONES DE PRODUCCIÓN
DE QUERATINASA FÚNGICA CON SUSTRATO NO
CONVENCIONAL**

Presentada por:

RAFAEL IMIR VÁZQUEZ MONJE

Ha sido aceptada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

El trabajo presentado ha sido dirigido por el siguiente comité:

Dr. Cristóbal Noe Aguilar González
Director

M.C. Antonio Aguilera Carbó.
Co-director

Lic. Laura Olivia Fuentes Lara
Asesor

Dr. Juan Carlos Contreras Esquivel
Asesor

Dr. Raúl Rodríguez Herrera
Asesor

INDICE DE CONTENIDO

	Página
RESUMEN	iX
ABSTRACT	X
CAPITULO 1 INTRODUCCIÓN	1
2.2 JUSTIFICACIÓN	4
2.3 OBJETIVOS	6
2.3.1 OBJETIVO GENERAL	6
2.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
2.4 HIPÓTESIS	8
CAPITULO 2 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	9
2.2 Composición química y biodegradación del pelo de cerdo	11
2.3 Enzimas proteolíticas	13
2.4 Microorganismos utilizados en la producción de proteasas	16
2.5 Procesos biotecnológicos	20
2.5.1 Fermentación	20
2.5.2 Fermentación continua	20
2.5.3 Fermentación discontinua	22
2.5.4 Fermentación alimentada	23
2.5.5 Fermentación líquida	23
2.5.6 Fermentación sólida	25
2.6 Diferencias entre fermentación líquida y sólida	28
2.7 Soportes utilizados en cultivo en estado sólido	29
CAPITULO 3 PARTE EXPERIMENTAL	31
3.1 Materia prima	31
3.2 Reducción de partícula	31
3.3 Desgrasado de la materia prima	31
3.4 Caracterización de la materia prima	32
3.5 Determinación de materia seca total	32
3.6 Determinación de humedad	32
3.7 Determinación de cenizas	33
3.8 Determinación de proteínas por el método kjeldhal	33
3.9 Determinación de grasas por el método Soxleth	34
3.10 Determinación de fibra cruda	35
3.11 Selección del microorganismo	36
3.12 Propagación del inóculo	36
3.13 Medios de cultivo	37
3.13.1 Medio de propagación	37
3.13.2 Medio de producción	37

3.13.3	Medio de cultivo en estado sólido	38
3.13.4	Medio de cultivo en estado líquido	39
3.14.	Ensayo de la actividad enzimática	39
3.15	Definición de unidad enzimática	40
CAPITULO 4	RESULTADOS Y DISCUSIONES	41
4.1	PRIMERA ETAPA	41
4.1.1	Caracterización físico-química del pelo de cerdo	41
4.2	SEGUNDA ETAPA	43
4.2.1	Selección del microorganismo y caracterización de la cepa	43
4.3	TERCERA ETAPA	43
4.3.1	Condiciones preliminares para la producción de enzima queratinasa en medio líquido	44
4.3.2	Condiciones preliminares para la producción de la enzima queratinasa en medio sólido	49
CAPITULO 5	CONCLUSIONES	54
CAPITULO 6	RECOMENDACIONES	55
CAPITULO 7	BIBLIOGRAFÍA	56

INDICE DE CUADROS

		Pagina
Cuadro 1	Perfil aminoacídico (%) de proteína bruta en el pelo de cerdo.	10
Cuadro 2	Composición del pelo de cerdo en porcentaje.	12
Cuadro 3	Composición del medio de cultivo utilizado.	38
Cuadro 4	Caracterización físico química en porcentaje del pelo de cerdo	42

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Valores de pH durante el proceso de la producción de la enzima queratinasa	46
Figura 2	Actividad enzimática queratinasa en fermentación en medio líquido	47
Figura 3	Valores de pH durante la producción de la enzima queratinasa en fermentación en medio sólido de material con grasa	50
Figura 4	Valores de pH durante la fermentación en medio sólido de material sin grasa.	50
Figura 5	Valores de la actividad queratinasa en fermentación en medio sólido de material con grasa.	51
Figura 6	Valores de la actividad queratinasa en fermentación en medio sólido de material sin grasa	51

AGRADECIMIENTOS

Principalmente a Dios por haberme puesto en este camino.

A mis padres María del Rocío Monje Bacsa y Jesús Vázquez Monroy, que nunca escatimaron esfuerzo alguno para la educación de sus hijos, y por todos los consejos y sabiduría otorgada.

A mis abuelos maternos Ma. del Pilar Bacsa Flores y Dr. Roberto Monje Lomelí así como a los paternos Guadalupe Monroy Viveros y Andrés Vázquez Tapia. Ya que con su ejemplo y respaldo moral lo he logrado.

A mis asesores Dr. Cristóbal Noé Aguilar y M.C. Antonio Aguilera Carbó por darme la pauta y unos cuantos jalones de oreja en el desarrollo de este trabajo, además de brindarme su mas sincera amistad y contribuir a mi formación como profesionista.

A la familia Arroyo Valero en especial a Alejandro Valero Arroyo , por dejarme ser uno mas de su familia .

A la familia Aldaco, por todas las atenciones brindadas y su incondicional apoyo.

A Sandra, por estar siempre ahí, cuando más te he necesitado.

A mis amigos de la escuelita, Ing. Hugo Javier González Sánchez , Ing. Francisco Dávila Gómez, Ing. Alexander Calvo Grajales y a Ramiro García Villa, por todas las experiencias, que juntos, recordaremos algún día.

A mis compañeros del DIA, UAdeC, por sus conocimientos y amistad.

A mi Alma Mater, por haberme forjado como Profesionista.

DEDICATORIA

A mis padres y mis hermanas , en especial, ya que sin su incondicional apoyo no hubiera sido posible todo esto.

A mis abuelos, que aun son jóvenes y alcanzaran a vivir conmigo muchos de mis logros.

A Sandra por su incondicional apoyo y a Carlitos Unai, por ser una buena razón.

A toda la gente que no creyó en mi. ¡Ya ven , si pude!

RESUMEN En el presente trabajo se establecen las condiciones preliminares de producción de la enzima queratinasa del hongo *Rhizopus oryzae*, utilizando pelo de cerdo como única fuente de carbono-nitrógeno e inductor de la actividad enzimática. Como paso inicial se seleccionó la cepa fúngica a partir de una colección de microorganismos degradadores de este material, posteriormente, se seleccionaron las mejores condiciones de cultivo. Dos sistemas de fermentación fueron evaluados, el cultivo sumergido y el cultivo en medio sólido. La producción de la enzima queratinasa se evaluó cinéticamente en ambos sistemas de cultivo y los resultados obtenidos fueron comparados entre sí y con la literatura citada. Se usó el medio de cultivo Czapek-Dox, para ambos sistemas de cultivo. Las cinéticas fueron monitoreadas cada 24 horas durante un periodo de incubación de 120 h. La actividad queratinasa fue ensayada por el método de la azocaseína y la producción de la biomasa fue estimada por el método gravimétrico. *Rhizopus oryzae* fue el microorganismo capaz de utilizar el pelo de puerco como única fuente de carbono-nitrogeno., produciendo en cultivo sumergido los mayores títulos de actividad queratinasa (915 U/L) mostrándose un menor resultado en el cultivo en medio sólido (890 U/L). En el presente estudio se demostró también el efecto que tiene el pH, el pretratamiento del sustrato y la adición de diferentes niveles de material queratinoso sobre el crecimiento fúngico y la actividad enzimática. Al final se lograron establecer las condiciones preliminares de producción de la enzima queratinasa por cultivos sumergidos de *Rhizopus oryzae*.

ABSTRACT In this work preliminary conditions of keratinase production by

fungus *Rhizopus oryzae* are described, using pig hair as carbon and nitrogen source.

Two fermentations systems were evaluated. In the first step, fungus strain was chosen of keratine-degrading microorganisms collection. Then better culture conditions were selected. After, several kinetics of comparative production were carried out. Solid state and liquid fermentation were used as production systems.

Culture medium was Czapek-Dox, for both cultures. Kinetics were monitored every 24 hours during period of incubation of 120 hours. Keratinase activity was essayed with the Azo-caseine method. Biomass production was estimated gravimetrically *Rhizopus oryzae* was the able microorganism who grows up better in the pig hair like only carbon and nitrogen source, producing in submerged culture high titles of keratinase activity.

In this study, the effect of pH, substrate pretreatment and the addition of different quantities of keratinolytic material was demonstrated. Data of the enzymatic activity shows a higher production (915 U/L) in submerged culture at 120 hours of incubation, in contrast, with solid state culture, protease activity was lower (890 U/L).

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

Las enzimas son proteínas que aceleran la velocidad con que las reacciones se llevan a cabo, también son las responsables de las transformaciones metabólicas en los seres vivos, pero también pueden considerarse como aditivos altamente específicos para aplicaciones diversas en procesos químicos, físicos, y biológicos. Tienen una gran importancia en diversas áreas que permiten traducir los costos de producción, mejora en la calidad de productos, desarrollo de procesos más eficientes y generación de ganancias al igual que mayores rendimientos.

Las proteasas son un grupo de enzimas que contienen la capacidad de degradar total o parcialmente las proteínas. Se tienen identificadas varias proteasas que intervienen en procesos específicos tales como la esporulación; la utilización de péptidos exógenos y la biosíntesis de otros subproductos. También, intervienen en diferentes procesos bioquímicos, aunque no han sido identificadas como la síntesis de proteínas, la inactivación catabólica, el crecimiento celular, la reparación del ADN (Chávez-Camarillo,1995).

En recientes años se han estado realizando estudios para producir diferentes tipos de proteasa (ácida, neutra y alcalina) a través de fermentación en estado sólido, usando como sustrato residuos

agroindustriales. Es interesante notar que se han utilizado varios tipos de material queratinoso de desecho plumas de ave (Ferreira et al., 2002), lana de oveja (Ignatova et al.,1999), desechos de camarón (Rojas-avelizapa.,1999) y uñas), como sustrato para producción de proteasa, en otros países como India, Brasil y Francia.

En todo el mundo, se producen desechos agroindustriales, en altas cantidades, esto causa la contaminación del medio ambiente y la generación de enfermedades.

En México se producen toneladas de estos desechos, resaltando los de origen animal, que en muchos de los casos no tienen un segundo uso, tal es el caso de los desechos de los rastros y de la industria peletera, (pelo de animales de sacrificio y restos de piel).

Por esta razón se propone como alternativa este trabajo. El uso del pelo de cerdo como sustrato para obtener enzima queratinasa a través del hongo *Rhizopus oryzae*, y así utilizar este producto residual desarrollando un proceso biotecnológico rentable, económico, de fácil manejo y considerándolo como una tecnología limpia, mediante los procesos de fermentación en medio sólido y sumergido.

El desarrollo de este trabajo consta desde la caracterización de la materia prima (pelo de cerdo) así como la identificación de las cepas de los microorganismos degradadores tales como, *Aspergillus niger*,

Penicillium sp , y *Rhizopus orizae*, en base a la capacidad de invasión sobre el sustrato queratinoso y posteriormente su desarrollo en los diferentes sistemas de fermentación evaluando la actividad de la enzima inducida bajo las condiciones de fermentación que se evaluaron. Para establecer las condiciones de fermentación se tomaron en cuenta los siguientes factores: La cantidad de sustrato, así como los niveles de pH y la cantidad de glucosa como activador de la biomasa.

2.2 JUSTIFICACION

El siguiente trabajo fue elaborado a partir de la idea de reducir los desechos agroindustriales, debido a que son generados en gran cantidad, son una fuente representativa de contaminación en el planeta y por lo tanto, se tomo la opción de las fermentaciones con microorganismos ya que son los únicos que pueden degradar tales

desechos agroindustriales debido a su metabolismo y así obtener subproductos que sean para el beneficio de la humanidad.

Los desechos agroindustriales son en su mayoría desechos orgánicos que no tienen un empleo secundario, generalmente contienen grandes cantidades de carbono o péptidos, los cuales pueden ser degradados favorablemente por microorganismos.

Como se mencionó anteriormente, en México se producen miles de toneladas de estos desechos, resaltando los de origen animal, que en muchos de los casos no tienen un segundo uso, tal es el caso de los desechos de los rastros y de la industria peletera, (pelo de animales de sacrificio y restos de piel).

Por esta razón en el presente estudio se propone como alternativa el uso del pelo de cerdo como sustrato para obtener enzima queratinasa a través del hongo *Rhizopus oryzae*, y así utilizar este producto residual desarrollando un proceso biotecnológico rentable, económico, de fácil manejo y considerándolo como una tecnología limpia, mediante los procesos de fermentación en medio sólido y sumergido.

2.3OBJETIVOS

2.3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar las condiciones preliminares de producción de proteasas en sistemas de cultivo en medio sólido y sumergido, usando pelo de cerdo como sustrato (material queratinoso) y el microorganismo *Rhizopus orizae*

2.3.2 OBEJTIVOS ESPECIFICOS

- Seleccionar la cepa adecuada para la degradación del material queratinoso (MQ) por su grado de invasión.
- Determinar la velocidad de crecimiento a diferentes concentraciones de MQ.

- Evaluar el efecto del pH del medio sobre la formación de producto, producción de biomasa y degradación del MQ.
- Evaluar la producción de la enzima proteolítica a diferentes concentraciones de MQ en sistemas de cultivo en medio sólido (CMS) y líquido (CML).
- Evaluar el consumo de sustrato (MQ) a diferentes concentraciones en CMS y CML.
- Determinar el efecto de la capa cerosa del MQ en el proceso de degradación de sustrato y rendimiento de producto (enzimas) en ambos sistemas de cultivo.

- Evaluar la producción de la enzima queratinasa en cultivo en medio líquido utilizando concentraciones de 30%, 40%, 50%. De sustrato con material tratado y no tratado.

- Evaluar la producción de la enzima queratinasa en cultivo en medio sólido utilizando concentraciones de .25%, .50%, .70%, 10%, 20% 30% con material tratado y no tratado.

2.4 HIPÓTESIS

El material queratinoso (pelo de cerdo) por su alto contenido proteico, es una fuente potencial de carbono-nitrógeno e inductor para la producción de enzima queratinasa por medio del metabolismo del microorganismo *Rhizopus oryzae*.

CAPITULO 2

ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

En trabajos antes realizados, se ha utilizado a manera de sustrato material queratinoso como plumas de gallina, pelo de perro, pelo humano, escamas de peces, cuerno, pezuñas, estos, en su mayoría están formados por queratina, la cual es degradada por varias especies de microorganismos dando como resultados enzimas de diferentes orígenes.

El material queratinoso abunda en la naturaleza tal como, tal como se menciono anteriormente. En el caso de los cerdos, el pelo que lo protege (cerdas) llega a constituir entre un 6% del peso total del cerdo maduro, esto produce una gran cantidad de desechos por año, a pesar de que en su mayoría están formados por (90%) queratina. El material keratinoso tienen aplicaciones limitadas, debido a que son insolubles y resistentes a la degradación por enzimas proteolíticas comunes como tripsina, pepsina y papaina, debido a que tienen un alto grado de ligaduras cruzadas por enlaces de disulfuro, enlace de hidrogeno, e interacciones hidrofóbicas .

HIDROLIZADO DE PELO DE CERDO

El pelo de cerdo es mas difícil de hidrolizar que las plumas, las fibras del pelo se desintegran cuando se cuecen a presión (3,5kg/cm²) a 148°C, durante 30 minutos. El producto elaborado es un pienso valioso a causa

de su elevada concentración de proteína, pero tiene graves carencias de metionina, lisina y triptófano. La cantidad de harina que puede utilizarse eficazmente en la práctica es limitada. No se aconseja suministrar a las aves de corral más del 2-2.5%. También se ha empleado la lana hidrolizada de 2-5%, con buenos resultados. El pelo hidrolizado no es adecuado, al parecer, para la alimentación de los cerdos, principalmente por su perfil aminoacídico que se presenta en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Perfil aminoacídico (%) de proteína bruta en el pelo de cerdo hidrolizado

Aminoácido	Porcentaje
Arginina	9.2
Cisteína	4.0
Glicina	7.4
Histidina	1.3
Isoleucina	4.9
Leucina	9.2
Lisina	3.3
Metionina	0.8
Fenilalanina	3.9
Treonina	7.1
Triptófano	0.8
Tirosina	3.8
Valina	7.5

Fuente: (<http://www.fao.org/livestock/agap/frg/afris/español/document/feed8/Data/7.HTM>)

2.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA Y BIODEGRADACIÓN ENZIMÁTICA DEL PELO DE CERDO

La biodegradación del material queratinoso por microorganismos que poseen actividad queratinolítica representa un método alternativo para aumentar el valor nutricional de los desechos queratinosos. La proteína estructural (queratina) puede ser degradada por queratinasa, producida por especies de hongos parásitos saprófitos (Asahi et al 1985; Lee et al. 1987; Kunert 1972; Safranek y Goos 1982; Siesenop and Bohm 1995; Takiuchi et al. 1982). Algunas cepas de *Bacillus* (Atalo y Gashe 1993; Cheng et al. 1995; Linetal.1992) y algunos actinomicetos (Bockle et al. 1995; Muckho padhyay y Ehandra 1990; Noval y Nickerson 1959; Young y Smith 1975). El cuadro 2 presenta la composición química del pelo de cerdo reportada en estudios de Chipre y Taiwan.

Las enzimas proteolíticas pueden ser usadas después de un pretratamiento químico o de cocimiento con vapor de los desechos como las plumas.

A propósito, este proceso requiere cantidades significantes de energía y algunas veces se destruyen aminoácidos valiosos tales como la valina y el triptófano (Chandrasedi Karan and Dhar 1986; Papadopoulos 1989; Papadopoulos et al.1986).

Los enlaces disulfuro en la queratina inciden en su degradación, además, la desnaturalización del sustrato insoluble y el rompimiento de los enlaces del disulfuro parece ser necesario para hacer accesible la queratina a la enzima hidrolítica excretada (Bokle y Muller 1997; Kuner 1989).

Cuadro 2. Composición química del pelo de cerdo en porcentaje.

Componente	Material hidrolizado en Chipre	Material hidrolizado en Taiwan
Materia Seca	36.90	80.00
Proteína bruta	70.00	55.1
Cenizas	1.00	6.12
Extracto etéreo	2.30	2.26
Calcio	0.34	0.20
Fósforo	0.14	0.00

Ignatova et al.,1999, reportaron la producción y caracterización de una queratinasa termofílica demostrando que las propiedades de las enzimas degradadoras de queratina difieren en las diferentes especies. En el estudio se empleo una cepa termofílica del actinomiceto (*Thermoactinomyces candidus*) aislada de su medio (lodos de alcantarillado).

2.3 ENZIMAS PROTEOLITICAS

Las proteasas constituyen uno de los grupos más importantes de las enzimas industriales. En los años recientes, el uso de la proteasa alcalina en una variante del proceso industrial envuelve detergentes, comidas piel y seda (kembhavi et al., 1993).

Actualmente una gran proporción disponible de las proteasas comerciales son derivadas de cepas de *Bacillus* (Manachini y Fortina, 1998; Jacobs, 1995; Yang et al., 2000; Ito et al., 1998). Aunque también las de origen fúngico han sido empleadas (Samal et al., 1990; Phadatare et al., 1993; Banerjee et al., 1999; Tunlid et al., 1994) y representan 30 del 40% del costo de producción de las enzimas industriales .

Considerando este hecho, resulta interesante el uso del cultivo en medio sólido para la producción de proteasa alcalina empleando una especie alcalina de *Bacillus*. cepa especialmente importante, porque producen enzimas que representan el 25% del consumo mundial aproximadamente .

Para la producción de keratinasa, se ha empleado el medio a base de harina de soya reportado por Han-Seung et al (2002) el cual Glicine Max, un reconocido ingrediente potencialmente utilizable y rentable; ya que este es ampliamente producido como un subproducto

durante la extracción de aceite de canola (Gattinger et al., 1990) y además el análisis químico del mismo, mostró que contiene un 40% de proteína y es rico en otros compuestos orgánicos e inorgánicos (Kinsella et al., 1985).

Las proteasas son enzimas de importancia central debido a que ocupan una posición primaria en ambos campos; tanto el fisiológico como el comercial ya que son ampliamente usadas en alimentos; bebidas, panificaciones, ablandamiento de carne, síntesis del aspartame, detergente e industrias peleteras (Kalisz, 1988 ; Kumar y Takagi, 1999; Rao et al ., 1998). Adicionalmente, una variedad de proteasas contienen importantes aplicaciones farmacéuticas.

Los microorganismos termofílicos representan una fuente muy atractiva para la producción de actividades proteolíticas tal como lo sugieren diversos reportes (Burlini et al ., 1992; Fujiwara et al ., 1993; Halio et al., 1996; Hutadilok et al., 1999; Klingeberg et al., 1995; Morikawa et al ., 1994; Sako et al.,1997). Las proteasas obtenidas de microorganismos termofílicos muestran temperaturas óptimas para su actividad en el rango de 70-100 °C y un alto grado de termo-estabilidad .

Las enzimas de microorganismos termofilos , han despertado una creciente atención entre los investigadores por 2 razones fundamentales: primero, sus propiedades únicas y, especialmente la

alta estabilidad estructural, es lo que han hecho que estas enzimas sean consideradas como extremadamente importantes en muchos procesos industriales. Segundo, éstas son de interés considerable para procesos donde su característica de termo-estabilidad sea necesaria (Kocabiyik y Erdem , 2002).

Las proteasas inmovilizadas tienen muchas aplicaciones como la hidrólisis de proteínas a aminoácidos así como la estabilidad de la estructura proteínica y la evaluación de la digestibilidad de la misma. La inmovilización de proteasas en una matriz sólida ha sido demostrada con tripsina, subtilisina y queratinasa. Otro método desarrollado ha sido el del uso de la estreptavidina –biotina, para inmovilización (Farag y Hassan, 2004).

La queratina es el mayor componente del pelo, plumas y lana. Una característica distintiva de la queratina es que tiene un alto contenido de sulfuro debido al alto contenido de aminoácidos cistina, cisteína y metionina. De este modo los enlaces disulfuro son considerados como responsables de la estabilidad de la queratina y su resistencia a la degradación enzimática (Ingatova et al., 1999).

2.4 MICROORGANISMOS UTILIZADOS EN LA PRODUCCIÓN DE PROTEASAS

Los organismos productores de enzimas mas útiles y mejor conocidos son los *Aspergillus niger*, *A oryzae* y *Bacillus subtilis*. En general las enzimas fúngicas tienen un pH óptimo ácido o neutro y no son termoestables, en tanto que las enzimas bacterianas tienden a tener un pH óptimo alcalino o neutro y con frecuencia, son termoestables.

Es bien conocida la habilidad de muchas especies diferentes de *Aspergillus* para producir proteasas. Algunos estudios recientes han revelado la habilidad de *Aspergillus tamari*, un hongo filamentoso xilanolítico, que se aisló del suelo para producir proteasa alcalina en fermentación en estado sólido. (Ferreira et al, 1999).

Siempre que sea posible, es preferible emplear cepas no esporulantes y que no formen toxinas. También es una ventaja el utilizar mutantes constitutivos en el caso de células que requieran normalmente un inductor para producir una enzima particular, y mutantes resistentes a los catabolitos para que puedan emplearse glucosa y otros azúcares en el medio de cultivo sin que causen la represión de la enzima deseada.

Fukumoto, 1967, aisló una proteasa ácida de *Rhizopus chinensis*. La enzima es estable entre un valor de pH de 2.8 a 6.5, además, se exhibe actividad óptima a pH 2.9 a 3.3, en el filtrado de *Rhizopus oligosporus*, se encontraron dos enzimas proteolíticas con actividad óptima a pH 3.0 y 5.5.

Las proteasas microbianas pueden ser producidas por bacterias y hongos (por ejemplo *Bacillus sp*). Por otro lado, las proteasas microbianas, son por lo general, en la formulación de los llamados detergentes biológicos, pero también es utilizado en productos fermentados. Estas se producen por fermentación sumergida aerobia convencional, que permite un mayor control de las condiciones de crecimiento que la fermentación en medio sólido. Se sabe mucho acerca de la selección de cepas de organismos y condiciones de cultivo, aunque menos sobre la regulación de la síntesis, degradación y secreción del enzima por el organismo productor.

En los últimos once años se ha estudiado la producción de una misma enzima producida por *Streptomyces rimosus*, encontrándose que los títulos de actividad son mayores en cultivo medio sólido que en cultivo sumergido. Tal es el caso de la α -amilasa (Ramesh y Lonsane, 1991; Nandakumar et al., 1996).

En años recientes, se han estado realizando varios estudios para producir diferentes tipos de proteasas (ácida, neutra y alcalina) a través de fermentación en estado sólido usando como sustrato residuos agro-industriales. Es interesante notar que aunque varios sustratos han sido empleado para cultivar microorganismos diferentes, el salvado del trigo ha sido la opción preferida en la mayoría de los estudios.

En Taiwán y otros países asiáticos, el proceso Koji (cultivo sólido) se ha usado para producir varias enzimas, creciendo en moldes en cereales o salvado. Aunque la proteasa y amilasa son principalmente fúngicos y productos de eubacterias; la posibilidad de usar *Streptomyces* para la producción de enzimas, se ha investigado recientemente. Especies de *Streptomyces* que producen proteasas incluyen, *S. clavuligerus*, *S. griseus*, *S. moderatus*, *S. rimosus*, *S. thermoviolaceus*, y *S. thermovulgaris*. (Pokorny et al., 1979; Renko et al., 1981,1989; Chandrasekaran y Dhar, 1987; Bascaran et al. ,1990, James et al., 1991; Muro et al., 1991; Yeoman y Edwards, 1994).

Otras enzimas hidrolasas de especies de *Streptomyces* estudiados incluyen aminopeptidasas por *S. fradiae*, *S. Griseus*, *S. lividans*, *S. peptidofaciens*, y *S. rimosus*. (Vitale et al., 1986; Aphale y Strohl, 1993). Quitinasa por *S. viridificans* (Gupta et al. ,1995), alfa-amilasa por *S. aureofaciens* y *S. Rimosus*. (Vukelic et al., 1992; Cheng y Yang, 1995;; Yang y Cheng, 1996), y beta-glucosidase por *Streptomyces* sp. (Ozaki y Yamada, 1991).

Las especies de *Streptomyces* se alimentan de forma heterotrófica, y ellos pueden utilizar moléculas simples y complejas como nutrientes. Sobre tres-cuartas partes de las especies de *Streptomyces* pueden

producir antibióticos. Además de los antibióticos, las especies de *Streptomyces* liberan enzimas extracelulares (Gupta et al., 1995).

Malathi y Chakraborty, 1991 evaluaron varias fuentes de carbono para la producción de proteasa alcalina y utilizando *Aspergillus flavus* IMI 327634; informando que el mejor sustrato para el cultivo fue el salvado de trigo. Los estudios se llevaron a cabo para comparar la producción de proteasa alcalina en sistemas de fermentación líquida y sistemas de fermentación sólida. Un estudio de cultivo en lote para el proceso de fermentación en estado sólido, se describió para la producción de proteasa alcalina, en la que el poliuretano se usó como apoyo para soporte sólido inerte. Una proteasa alcalina termoestable fue estudiada para ser producida por nuevas cepas de *Pseudomonas* sp. en sistema de fermentación en estado sólido.

Un nuevo proceso se ha desarrollado en Chennai (India), para la producción comercial de proteasas alcalinas (Clarizyme) que fue producido por *A. flavus* en fermentación en estado sólido, utilizando como sustrato salvado de trigo.

2.5 PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS

2.5.1 FERMENTACIÓN

En líneas generales, un proceso típico de fermentación comienza con la formulación y esterilización del medio de cultivo, así como la esterilización del equipo a utilizar. Las células se crecen primero en un cultivo de mantenimiento (5 a 10 mL), posteriormente, en un matraz (200 a 1.000 mL) y de ahí en un prefermentador (10 a 100 L) para finalmente inocular el fermentador de producción (1.000 a 100.000 L). Una vez que la fermentación se ha completado, las células se separan del cultivo líquido. Si el producto es intracelular, se rompen las células, se eliminan los restos celulares y se recupera el producto del fluido libre de restos celulares. Si el producto es extracelular, se purifica a partir del sobrenadante libre de células.

2.5.2 FERMENTACIÓN CONTINUA

En la fermentación continua, se establece un sistema abierto. La solución nutritiva estéril se añade continuamente al biorreactor y una cantidad equivalente de solución utilizada de los nutrientes, con los microorganismos, se saca simultáneamente del sistema.

El objetivo fundamental de la industria de las fermentaciones, es minimizar costos e incrementar los rendimientos. Este objetivo puede alcanzarse, si se desarrolla el tipo de fermentación más adecuado para cada paso en particular. Si bien los procesos de fermentación continua, no se utilizan de forma general en la industria, debido fundamentalmente al mayor nivel de experiencia que se tiene en el crecimiento de células en fermentación discontinua, el costo de

producción de biomasa mediante cultivo continuo, es potencialmente inferior al de cultivo discontinuo. De este modo se han instalado plantas de producción, continua de proteína de origen unicelular a partir de n-alcanos, compuestos C1 y almidones.

Aunque muchas fermentaciones para la producción de metabolitos funcionan bien como procesos continuos, sólo unos pocos procesos han resultado útiles para la aplicación práctica por varias razones:

a.- Muchos métodos de laboratorio operan continuamente durante solamente 20 a 200 horas; para que sea de utilidad industrial el sistema debe ser estable durante al menos 500 a 1,000 horas.

b.- Mantener las condiciones estériles a escala industrial a través de un largo período de tiempo es difícil.

c.- La composición de los sustratos debe ser constante a fin de obtener una producción máxima. La composición de las soluciones de nutrientes industriales son variables (líquido de maceración del maíz, peptona, etc.) lo que puede originar cambios en la fisiología de la célula y disminuir la productividad.

d.- Cuando se utilizan cepas de alto rendimiento se producen mutantes degenerados, los cuales pueden crecer en cultivo continuo más de

prisa que las cepas de producción por lo que el rendimiento disminuye con el tiempo ya que cada vez son menos células las que sintetizan el producto de interés.

2.5.3 FERMENTACIÓN DISCONTINUA

Una fermentación discontinua, puede ser considerada como un "sistema cerrado". Al inicio de la operación se añade la solución esterilizada de nutrientes y se inocula con el microorganismo, permitiendo que se lleve a cabo la incubación en condiciones óptimas de fermentación. A lo largo de toda la fermentación no se añade nada, excepto oxígeno (en forma de aire), un agente antiespumante y ácidos o bases para controlar el pH. La composición del medio de cultivo, la concentración de la biomasa y la concentración de metabolitos, cambia generalmente como resultado del metabolismo de las células, observándose las cuatro fases típicas de crecimiento: fase de latencia, fase logarítmica, fase estacionaria y fase de muerte.

En los procesos comerciales, la fermentación frecuentemente se interrumpe al final de la fase logarítmica (metabolitos primarios) o antes de que comience la fase de muerte (metabolitos secundarios).

2.5.4 FERMENTACIÓN ALIMENTADA

En los procesos convencionales discontinuos, que acabamos de describir, todos los sustratos se añaden al principio de la fermentación.

Una mejora del proceso cerrado discontinuo, es la fermentación alimentada, que se utiliza en la producción de sustancias como la penicilina. En los procesos alimentados, los sustratos se añaden escalonadamente a medida que progresa la fermentación. La formación de muchos metabolitos secundarios, está sometida a represión catabólica (efecto glucosa). Por esta razón, en el método alimentado los elementos críticos de la solución de nutrientes se añaden, en pequeñas concentraciones al principio de la fermentación y continúan añadiéndose a pequeñas dosis durante la fase de producción.

2.5.5 FERMENTACIÓN LÍQUIDA.

El desarrollo de las técnicas de matraz agitado, han sido importantes por que han permitido el cultivo de organismos aeróbicos en condiciones homogéneas con una densidad moderada de biomasa y ha simplificado el estudio de la fisiología de los organismos. A su vez, el cultivo de suspensiones de células en fermentadores agitados ha evolucionado a gran escala, pues no es raro ver fermentadores con volúmenes superiores a 10 mil litros, en los cuales se producen todo tipo de compuestos derivados del metabolismo microbiano. En estos sistemas, la agitación mecánica permite aumentar la transferencia del gas a la biomasa de tres formas básicas: Primero, dispersa el gas en burbujas mas pequeñas incrementando el área de interfase gas-liquido. Segundo, incrementa el tiempo de contacto de líquido con las burbujas

de gas. Y, tercero, disminuye el grueso de la capa estacionaria del líquido, al aumentar la turbulencia del cultivo. Además, la agitación mezcla el cultivo manteniéndolo homogéneo. Esto es particularmente importante para la dispersión de la biomasa y la transferencia de calor (Henzler y Schedel, 1991).

En resumen, la fermentación líquida (FL) o Fermentación sumergida (abreviada en inglés como SmF) ocurre en un medio homogéneo, que facilita el control de la fermentación. Además, los productos metabólicos y el calor se dispersan fácilmente, por lo que, no son un factor limitante para el crecimiento del microorganismo. La barrera principal de transferencia del O₂ en la fermentación líquida, es su baja solubilidad en el agua y, al hacerse mayor la capa de agua que debe cruzar, aumenta la dificultad para que llegue a la célula. Gran parte del gasto energético que debe realizarse en la FL está relacionado con la necesidad de satisfacer la demanda de oxígeno en el crecimiento de los microorganismos. Esto es muy claro en el caso de *Aspergillus niger*, que es un organismo aeróbico estricto y necesita una alta tasa de transferencia de oxígeno para mantener su crecimiento y producir muchos de los metabolitos de interés (Righelato, 1975, Solomón et al, 1975, Raimbault, 1998).

2.5.6 FERMENTACIÓN SÓLIDA.

La fermentación en medio sólido, consiste en el crecimiento de microorganismos en materiales sólidos sin la presencia de líquido libre. Sin embargo, esto no quiere decir que este proceso se lleve a cabo en la ausencia total de agua. Los límites superiores de humedad son de 40 a 70 % y como límite inferior 12%, ya que por debajo de este valor cesa la actividad biológica.

Bajo estas condiciones, los microorganismos que se ven favorecidos son los hongos, debido a su capacidad de crecer en medios con baja actividad de agua (Canel y Moo-Young, 1980).

La fermentación en estado sólido, es un sistema heterogéneo complejo, ya que coexisten las fases sólidas, líquida y gaseosa (Gowthman et al., 1995).

Este sistema, se ha usado para la producción de diversos metabolitos de interés comercial: antibióticos, enzimas, alcohol, metano y ácido cítrico.

Es importante elegir un sustrato adecuado para una eficiente fermentación, el cual puede suplementarse con nutrientes tales como glucosa, extracto de levadura, sales minerales y citrato de sodio entre otros (Christen et al., 1994).

Esta fermentación involucra transporte de oxígeno del aire inyectado, que llega a la superficie del microorganismo, consumo de oxígeno,

generación de calor y bióxido de carbono a través de la respiración. Estos gases son transportados del interior de la fase sólida a la fase gaseosa que lo rodea. Aquí, la transferencia de oxígeno depende de la delgada capa de agua que rodea al sustrato, que es el sitio en donde se desarrollan los microorganismos; de ahí la importancia de que haya buena difusión de oxígeno en el medio (Ghidyal et al., 1992). Por tanto, la disponibilidad del oxígeno se convierte en el factor limitante del crecimiento de los microorganismos. Debido a la falta de agitación en este medio heterogéneo, ocurren variaciones tanto en la concentración de gases como en la temperatura (Ghidyal et al., 1992).

La temperatura óptima de crecimiento de los hongos, es alrededor de 24 a 35 °C, sin embargo, por el diseño del sistema, no es posible utilizar agitación para la remoción del calor metabólico, ocasionando represión del crecimiento microbiano por deshidratación (Gutiérrez-Rojas et al., 1996).

El pH depende en gran medida del producto deseado, así que no se puede hablar de un valor óptimo, como en el caso de la humedad. El control de este factor no es posible, ya que no es un medio homogéneo.

Cuándo se tiene mayor contenido de agua, puede haber contaminación bacteriana. Por otro lado, al disminuirla se controla la contaminación, evitando así la obtención de productos no deseados,

pero también es un factor limitante en el crecimiento de los hongos (Roukas, 1994).

La presencia de un alto contenido de humedad, provoca que el sustrato se compacte y, por lo tanto, no haya una adecuada penetración de oxígeno (Chatterjee et al., 1996).

Los efectos que se derivan de la utilización de fermentación sólida, sobre los microorganismos son múltiples modificaciones en el transporte de azúcares, la composición de la pared celular, membrana celular y en la actividad enzimática (Grajek, 1987 ; Pandey , 1992).

2.6 DIFERENCIA ENTRE FERMENTACIÓN LÍQUIDA Y SÓLIDA.

La fermentación sólida requiere de una tecnología menos sofisticada comparada con la fermentación en medio sumergido, así como menor volumen del reactor por unidad de peso del sustrato utilizado, teniendo como resultado altas concentraciones del producto de interés y un costo reducido para el tratamiento de sus efluentes, debido al reducido uso de agua (Ghidyal et al., 1992).

Respecto a la fermentación en estado sólido, existen ventajas y desventajas en relación con el proceso de fermentación en estado líquido, se dice que la primera no requiere de mucho control, es económica, con pocos gastos de energía, fácil de implementar y se obtienen altos rendimientos en la producción. Los costos se elevan en el proceso de extracción del producto final y en su purificación, ya que se requiere la aplicación de técnicas caras para reducir los volúmenes. La segunda es mas costosa, ya que su control es mas sofisticado, la solubilidad de O_2 en el agua es poca, lo que hace necesario el uso de equipo para la agitación y la aireación forzada, con mayor necesidad de energía, además, ocupa mas espacio, debe evitarse la contaminación por hongos y levaduras mediante técnicas de esterilización de aire y de los desechos, debido a que muchos metabolitos tales como antibióticos, se producen por un crecimiento lento en medios ricos que pueden ser contaminados. Las concentraciones de reactivos y productos son bajas, los procesos de recuperación, son caros al igual que en el cultivo sólido lo que representa un factor clave en la economía total de ambos procesos. (Aguilar, 1998).

Por otro lado, el cultivo en estado sólido parece tener ventajas teóricas sobre la fermentación en estado líquido respecto a los siguientes factores.

El bajo contenido de actividad de agua, en la fermentación en estado sólido da ventajas ecológicas para el crecimiento lento de los hongos, sobre bacterias y levaduras, reduciendo las necesidades de operaciones de esterilización.

El oxígeno, no es un factor limitante ya que es soluble en el aire, por lo que tendrá costos mas bajos de energía, comparadas con la fermentación en estado líquido.

2.7 SOPORTES UTILIZADOS EN CULTIVO EN ESTADO SÓLIDO.

En los últimos años se ha difundido el uso de soportes inertes, como la amberlita IRA 900 (Christen et al., 1994; Gutiérrez-Rojas et al., 1995), el poliestireno, el uretano (Ozawa et al., 1996) y el poliuretano (Zhu et al., 1996).

Un tamaño pequeño de partícula representa mayor área de contacto, facilitando al microorganismo el acceso a los nutrientes. Por otro lado, si es muy pequeño no permitirá la aireación (Nanadakumar et al., 1996). Estudios realizados por (Nampoorthiri y Pandey, 1996) indican que la mezcla de partículas pequeñas y grandes proporciona un buen espacio inter-partícula.

CAPITULO 3

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIA PRIMA

El material queratinoso (pelo de cerdo) fue proporcionado por el rastro municipal de la ciudad de Coahuila, este fue lavado para limpiar restos de contaminantes, posteriormente fue sometido a una esterilización en auto clave a (121 °C por 15 min.) para eliminar los microorganismos presentes, de esta forma se obtuvo la materia prima para la investigación.

3.2 REDUCCION DE PARTICULA DE LA MATERIA PRIMA

El material queratinoso esterilizado fue sometido a una reducción de tamaño de partícula, para cortar el pelo en un rango de 0.5 a 1.0 cm de longitud, posteriormente se utilizó un molino de martillo para reducir aún más el tamaño de partícula hasta quedar en una medida de 0.1 y 0.2 cm de longitud.

3.3 DEGRASADO DE LA MATERIA PRIMA

Para el desgrasado del material queratinoso o eliminación de la capa de cera que lo cubre se utilizaron dos solventes, hexano y éter de petróleo. Se aplicó el método del AOAC (1980) usando un equipo Soxhlet, para este fin, la técnica es descrita en el paso para la determinación de grasa.

3.4 CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

El material queratinoso se caracterizó aplicando un análisis bromatológico y otros parámetros físico químicos descritos a continuación: los procedimientos descritos son los propuestos en el AOAC (1980).

3.5 DETERMINACION DE LA MATERIA SECA TOTAL

Se pesó un gramo de muestra en un crisol de porcelana (el cual, previamente, se colocó en una estufa a una temperatura de 100°C

hasta obtener un peso constante), posteriormente se introdujo a una estufa a una temperatura de 85 °C por 24 h., se enfrió en un desecador y se registró el peso, la materia seca total obtenida fue calculada de la siguiente manera:

$$\% \text{ de materia seca} = \frac{\text{peso del crisol con muestra} - \text{crisol}}{\text{gramos de muestra}} * 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

3.6 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

Se determinó por diferencia de peso de los resultados obtenidos en el análisis de materia seca total

3.7 DETERMINACION DE CENIZAS

Se pesó 1gr de muestra en un crisol de porcelana (previamente a peso constante) en seguida se introdujo en una mufla marca termolyne 2000 a una temperatura de 600°C por 3 h. El porcentaje de cenizas en la muestra se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ de cenizas} = \frac{\text{peso del crisol con ceniza} - \text{crisol}}{\text{gramos de muestra}} * 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

3.8 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE KJELDHAL

La determinación de la proteína se realizó por el método kjeldhal, el cual se describe a continuación brevemente: se colocó 1 g. de muestra y 30 ml de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado, estos reactivos fueron adicionados en otro matraz excepto la muestra de pelo. Los matraces se colocaron en el digestor del kjeldhal a una temperatura de 100°C hasta obtener una mezcla de color verde traslúcida y un color cristalino en el matraz sin muestra (blanco). Una vez frías a temperatura ambiente las muestras, enseguida, se adicionaron 300 ml de agua destilada, 110 ml de hidróxido de sodio (NaOH) al 45% y al 5% y 5 granallas de zinc. Posteriormente se obtuvieron 250 ml destilados de cada muestra en un matraz Erlenmeyer de 250 ml de capacidad y se tituló con ácido sulfúrico 0.099 normal (N) el nitrógeno obtenido se calculo mediante la formula:

$$\% \text{ de nitrógeno} = \frac{(ml \text{ H}_2\text{SO}_4 * N) - (ml \text{ gastados Bco} * N)}{\text{gramos de muestra}} * 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

Finalmente el porcentaje de la proteína cruda se calculó multiplicando el porcentaje del nitrógeno obtenido por el factor 6.25

3.9 DETERMINACIÓN DE GRASA POR EL MÉTODO DE SOXHLET

En esta determinación se pesaron 5 g de muestra colocados en un dedal de celulosa e introducido a un sifón unidos a un matraz bola

fondo plano (previamente sometido a peso constante y adicionando 150 ml de hexano, éter de petróleo). Enseguida, se insertó la parte superior del sifón a un refrigerante y la muestra se reflujo por 8 h. a temperatura de 80°C (éter de petróleo a 26°C) después de este tiempo se evaporó el solvente contenido en el matraz y enseguida se metió a una estufa a temperatura de 105°C por 24 h., se enfrió en un desecador de vidrio y se registró el peso. El porcentaje de grasa fue calculado de la siguiente manera:

$$\% \text{ de grasa} = \frac{\text{peso del matraz con grasa} - \text{peso del matraz sin grasa}}{\text{gramos de muestra}} * 100$$

Ecuación

4

3.10 DETERMINACIÓN DE FIBRA CRUDA Este análisis consistió en 2 etapas, en la primera, se colocaron 2 g de muestra desgrasada en un vaso de Berzelius y 100 ml de ácido sulfúrico 0.255N. Este se sometió a ebullición por 30 minutos y después se lavó con agua destilada caliente hasta eliminación de reacción àcida. En la segunda etapa, se midieron 100 ml de NaOH 0.313 N y se colocaron en el mismo vaso, enseguida se calentó a ebullición por 30 min. y se lavó con agua destilada caliente hasta reacción alcalina. La fibra cruda se colocó en un crisol de porcelana y se introdujo en una estufa a una temperatura de 105°C por 24 h. Después de este tiempo se registró el peso del crisol y finalmente la muestra se

calcinó a 600° C por 3 h en una mufla marca Thermolyne 200 y el porcentaje de fibra se calculó según la ecuación 5.

$$\% \text{ de fibra cruda} = \frac{\text{crisol con muestra seca} - \text{crisol con cenizas}}{\text{gramos de muestra}} * 100$$

Ecuación

5

3.11 SELECCION DE MICROORGANISMOS

Los microorganismos evaluados miembros de *Aspergillus niger*, *Penicillium sp* y *Rhizopus oryzae*, pertenecientes a colecciones de la UAMI-IRD y de la UAdeC, los cuales han sido previamente reportados por Cruz-Hernández (2002) y Acevedo, (1998). *R. oryzae* fue el microorganismo que demostró una mayor capacidad de adaptación al medio, cuando fueron sometidos a crecimiento en sistemas cuya única fuente de carbono y energía era el pelo de cerdo en cultivos sumergido. Adicionalmente este hongo se sometió a una análisis de la capacidad de invasión y determinación de su velocidad de crecimiento radial. El experimento se llevó a cabo en cajas petri de 8 cm de diámetro, conteniendo agar PDA y el material queratinoso, previamente autoclavado se inoculó en el centro con las esporas del hongo y se incubo a 30°C, haciendo evaluaciones cada 12 h por los días que fuera necesario.

3.12 PROPAGACIÓN DEL INOCULO

Las esporas de *Rhizopus oryzae* se inocularon sobre 30 ml de agar papa dextrosa (PDA) contenidos en matraces Erlenmeyer de 250 ml y estos se incubaron a 30°C por 5 días y las esporas producidas se cosecharon con una solución de Tween 80 al 0.01% , enseguida 1ml de estas esporas fueron añadidas a un tubo de ensayo que contenía 19 ml de agua destilada, posteriormente se homogenizó por un minuto y finalmente fue añadida una gota de esta solución en una cámara de

Neubauer donde fueron considerados 13 cuadros de esta (4 de la esquina y 9 del centro). Las esporas se contaron en la cuadrícula de glóbulos rojos en un microscopio Olympus modelo ck2 ulwc de 0.30 . El número de esporas presentes en un mililitro se calculo según la ecuación 6:

$$\text{Esporas/ml} = \text{promedio de esporas} * 25 * 1 \times 10^4 * 20 \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde:

25, es el número total de cuadros

1×10^4 , es el factor de conversión volumétrico

20, es el factor de dilución

3.13 MEDIOS DE CULTIVO

3.13.1 MEDIOS DE PROPAGACIÓN

Durante todo el experimento las esporas crioconservadas de *R. oryzae* fueron activadas y propagadas en medios de agar PDA.

3.13.2 MEDIO DE PRODUCCIÓN

Para evaluar la producción de la enzima queratinasa fúngica se empleo el medio mínimo Czapek Dox tanto en cultivo en medio sólido (CMS) como en cultivo en estado líquido (CML). La composición del medio se presenta en el cuadro 3. La fuente de carbono fue el pelo de cerdo añadido como inductor de la actividad queratinasa y en algunos experimentos se utilizó además, glucosa como activador de crecimiento.

Cuadro 3. Composición del medio de cultivo usado

COMPONENTE	%
NaNO ₃	0.25
KH ₂ PO ₄	0.10
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5
KCl	0.5
pH	6.0
Fuente de carbono	Pelo de cerdo y/o glucosa

3. 13. 3 MEDIO DE CULTIVO EN ESTADO SÓLIDO

Se utilizaron concentraciones de sustrato con 0.25%, 0.50%, 0.70%, 10%, 20% 30% de material con y sin grasa como soporte e inductor para la producción de la enzima queratinasa. Se utilizaron cajas de petri de 8cm con una cantidad de 10 ml de medio Czapek-Dox y agar ajustados a un pH de 6.0 en las concentraciones de 30%, 40% y 50% respectivamente.

Enseguida estas fueron esterilizadas a 15 psi por 15 minutos en un autoclave modelo No.25X. Una vez fríos, bajo condiciones estériles, fueron inoculados con 20µl de esporas de *Rhizopus oryzae*, ajustadas a una concentración de esporas por gramo de soporte de 4.64×10^7 para las respectivas concentraciones. Finalmente se sometieron a una temperatura de 30°C por 120 h. en una incubadora Napco modelo 322.

3.13.4 MEDIO DE CULTIVO EN ESTADO LIQUIDO Se utilizaron concentraciones de 30%, 40%, 50%. De material queratinoso como soporte para producción de la enzima queratinasa, se emplearon como reactores 6 matraces Erlenmeyer estériles de 250 ml de capacidad, con 50 ml medio de cultivo, Czapek Dox ajustado a pH de 6.0, en seguida se esterilizaron en un autoclave modelo No. 25X a 15 psi. Por 15 minutos, Una vez fríos, bajo condiciones estériles se inocularon con 20µl de esporas de *R. Oryzae*, ajustadas a una concentración de esporas 4.64×10^7 por ml de medio Czapek Dox., fueron incubados a una temperatura de 26°C por un periodo de 120 h en agitación constante de 220 rpm.

3.14 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD QUERATINASA

La enzima fue ensayada por la técnica de la azocaseína. Se colocan 10 mg de azocaseína en tubos de ensaye, luego se agrega 1ml de solución buffer fosfato de pH 7 y 3 ml de agua destilada, enseguida se incuban a 37°C en baño maría, con agitación constante a cada 5 minutos. Previamente se prepara el espectrofotómetro a $\lambda = 520$ nm, después de los 30 minutos se prepara un papel filtro No. 4, esto con el fin de detener la reacción, finalmente el líquido filtrado se recibe en tubos de ensayo y se lee en el espectrofotómetro. Para el testigo, control o blanco, se realizan los mismos procedimientos, pero la única

diferencia es la que de en los tubos no se les agrega la solución del extracto enzimático.

3.15 DEFINICIÓN DE UNIDAD ENZIMATICA

Una unidad enzimática queratinasa es definida como la cantidad de enzima que produce una absorbancia de 0.1 bajo las condiciones descritas anteriormente.

CAPITULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIONES.

En el presente estudio se evaluaron las condiciones preliminares de producción de la enzima queratinasa de *Rhizopus oryzae* sobre pelo de

cerdo. Los resultados obtenidos se presentan en tres etapas, en la primera se incluyen los resultados obtenidos de la caracterización fisicoquímica y de caracterización del material queratinoso, en la segunda etapa se reportan los resultados de la selección de los microorganismos y de la caracterización de *R. oryzae* y en última etapa se reportan los resultados de las condiciones preliminares de producción de la queratinasa fúngica en cultivo sólido y cultivo líquido.

4.1 PRIMERA ETAPA.

4.1.1 CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DEL PELO DE CERDO

Los resultados obtenidos de la caracterización fisicoquímica del pelo de cerdo se presenta en el cuadro 4, en donde se puede observar claramente que el material posee un alto porcentaje de proteína (88%), sin embargo, no posee carbohidratos o azúcares simples de fácil asimilación por los microorganismos lo que probablemente genere la necesidad de complementar el medio cuando el pelo de cerdo se utilizado como inductor de la actividad queratinasa.

Los resultados del contenido proteico obtenidos en la presente investigación son mayores que los reportados en la literatura, (<http://www.fao.org/livestock/agap/frg/afris/español/document/tfeed8/Data/7.HTM>), en donde se reportaron niveles de 55 a 70% de proteína contenida en el pelo del cerdo.

Cuadro 4. Caracterización físico-química en porcentaje del pelo de cerdo

PRUEBAS REALIZADAS	%
Materia seca total	94.833
Humedad	3.455
Cenizas	0.726
Proteína Cruda	87.82025
Grasa	7.26%*
Fibra Cruda	0.4186

* usando hexano como solvente.

Adicionalmente es importante añadir que los resultados obtenidos para el resto de los componentes concuerdan con la literatura citada, ya que los niveles de minerales están alrededor de 1% y la grasa entre 2 al 7%. Además, este es el primer reporte de los niveles de fibra cruda en el material, el cual es de alrededor de 0.4% y de humedad cercada al 3.5%.

4.2 SEGUNDA ETAPA

4.2.1 SELECCIÓN DEL MICROORGANISMO Y CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA SELECCIONADA.

La selección del microorganismo incluyó el crecimiento de cepas fúngicas sobre medios de cultivo en estado sólido y líquido con medio Czapek-Dox cuya fuente de carbono y nitrógeno, fue el pelo de cerdo.

Las condiciones de cultivo incluyeron una temperatura de 30°C, agitación en el caso de los cultivos líquidos y un monitoreo constante del crecimiento micelar.

Las 13 cepas evaluadas pertenecientes a la colección DIA/UadeC descrita por Cruz-Hernández, (2002) y caracterizadas por Padilla, (2003) y Lafuente-Castañeda (2004) fueron incapaces de utilizar al material queratinoso en prueba como sustrato o fuente de carbono y nitrógeno, a excepción de los microorganismos *Aspergillus niger*, *Penicillium commune* y *Rhizopus oryzae*. Sin embargo, este último fue capaz de crecer en los diferentes sistemas de cultivo empleados, tanto en estado sólido como en líquido de una manera diferentemente significativa sobre los otros dos microorganismos, por lo que se decidió utilizar la cepa de *R. oryzae* como fuente de la enzima queratinasa en este estudio.

R. oryzae se caracterizó por mostrar un crecimiento rápido e invasivo sobre el material queratinoso, dependiente fuertemente de la disponibilidad de oxígeno ya que solo sobre superficies donde el material se encontraba en contacto directo con el aire produjo un micelio aéreo característico.

4.3 TERCERA ETAPA

4.3.1 CONDICIONES PRELIMINARES DE PRODUCCIÓN DE LA QUERATINASA POR FERMENTACION EN ESTADO LÍQUIDO

La figura 1 presenta los resultados de pH durante la producción de la enzima queratinasa en cultivo en medio líquido. La adición de glucosa a las muestras con y sin grasa tuvo un efecto muy significativo en el comportamiento del pH durante la cinética de producción de la enzima queratinasa, ya que en las muestras sin el azúcar los valores de pH alcanzaron niveles de hasta 9 en las primeras 45 h de cultivo, incrementándose hasta alcanzar valores de pH de 11 al final de cultivo. Bajo estas condiciones de cultivo el crecimiento fúngico fue menor y más lento que en aquellas muestras complementadas con glucosa. Aparentemente el microorganismo produce carboxipeptidasas que generan una gran cantidad de grupos aminos que tienden a incrementar los valores de pH, además, la adición de un carbohidrato de fácil asimilación como lo es la glucosa modifica la fisiología del microorganismo, ya que a medida que se incrementa este azúcar en el medio los valores de pH tienden a ser menores, lógicamente es por la no producción de las carboxipeptidasas.

Adicionalmente, es importante señalar que las muestras con grasa tendieron a alcalinizar más el medio de cultivo que las muestras sin grasas, y la utilización de la grasa a través de lipasas también puede tener un efecto serio y significativo sobre el comportamiento del pH del cultivo.

Los valores obtenidos en la presente investigación concuerdan con los reportados por Santos et al (1996) quienes obtuvieron los mismos patrones de incremento en los valores de pH cuando hicieron crecer a la cepa de *Aspergillus fumigatus* en medios cuya única fuente de carbono y energía eran plumas de gallina. Similares resultados obtuvieron Muhsin y Hadi (2001) con cepas fúngicas degradadoras de substratos queratinosos tales como las plumas de pollo y la lana de cordero.

Este mismo comportamiento se obtuvo recientemente en los estudios reportados por Suntornsuk y Suntornsuk (2003) cuando evaluaron la degradación de las plumas de pollo por la cepa *Bacillus sp* Fk 46, ya que obtuvieron valores de hasta 9 de pH cuando el crecimiento alcanzó sus máximos niveles.

Por otro lado, las cinéticas tuvieron una duración de 120 h en las cuales a cada 24 h se tomaron muestras y se determinó la producción de la enzima queratinasa, posteriormente se realizaron comparaciones de los resultados obtenidos en cultivo líquido con los obtenidos en los cultivos en estado sólido.

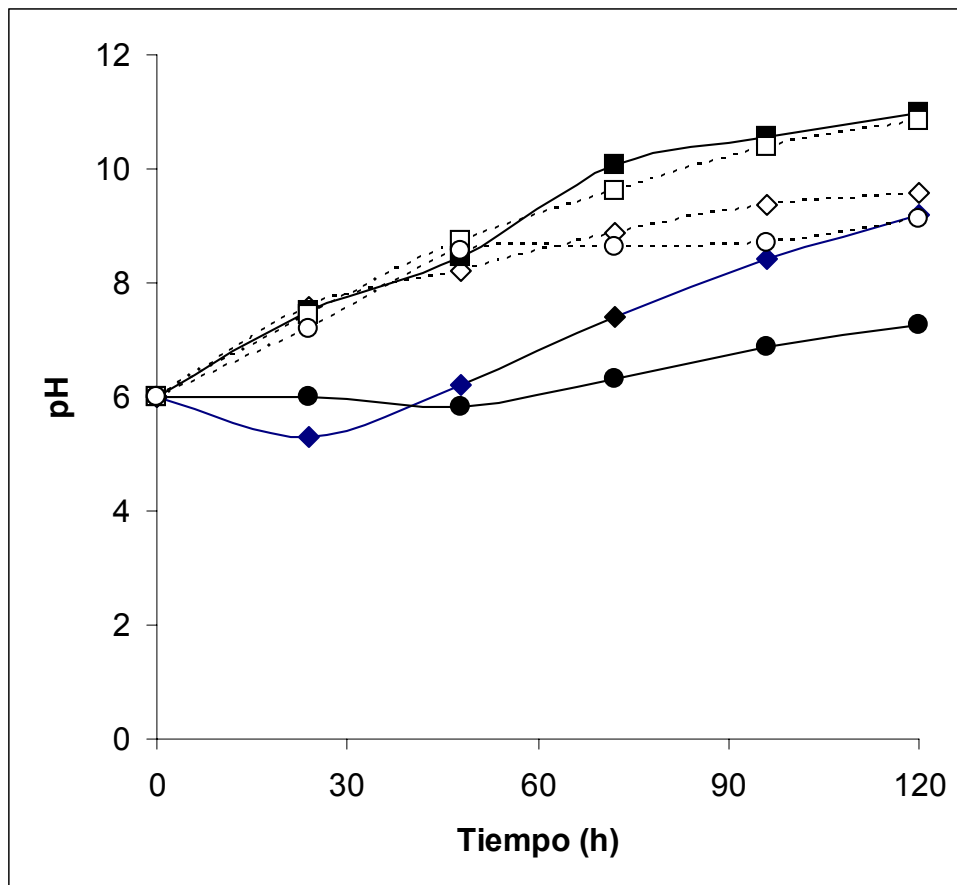


Figura 1. Valores de pH durante la producción cinética de la enzima queratinasa fúngica en cultivo en medio líquido. (O) sin glucosa, (□) 5% de glucosa (◇) 10% glucosa. La línea continua representa las muestras sin grasa y la punteada a las muestras con grasa.

Los datos de la actividad enzimática obtenidos en cultivo líquido se presentan en la figura 2. Los resultados obtenidos muestran una mayor producción de la enzima queratinasa cuando no se usa glucosa como activador del crecimiento en muestras con grasa. La adición de glucosa promueve un retardo significativo en la producción de la enzima, siendo este efecto mayor a niveles superiores de glucosa en el medio. Los mejores resultados se obtienen con muestras sin tratar y sin adición de azúcar, ya que en las primeras 20 horas de cultivo se alcanzan niveles

de hasta 800 U/mL, Aunque los mayores títulos de actividad queratinasa (945 U/L) se alcanzaron a las 120 h de fermentación.

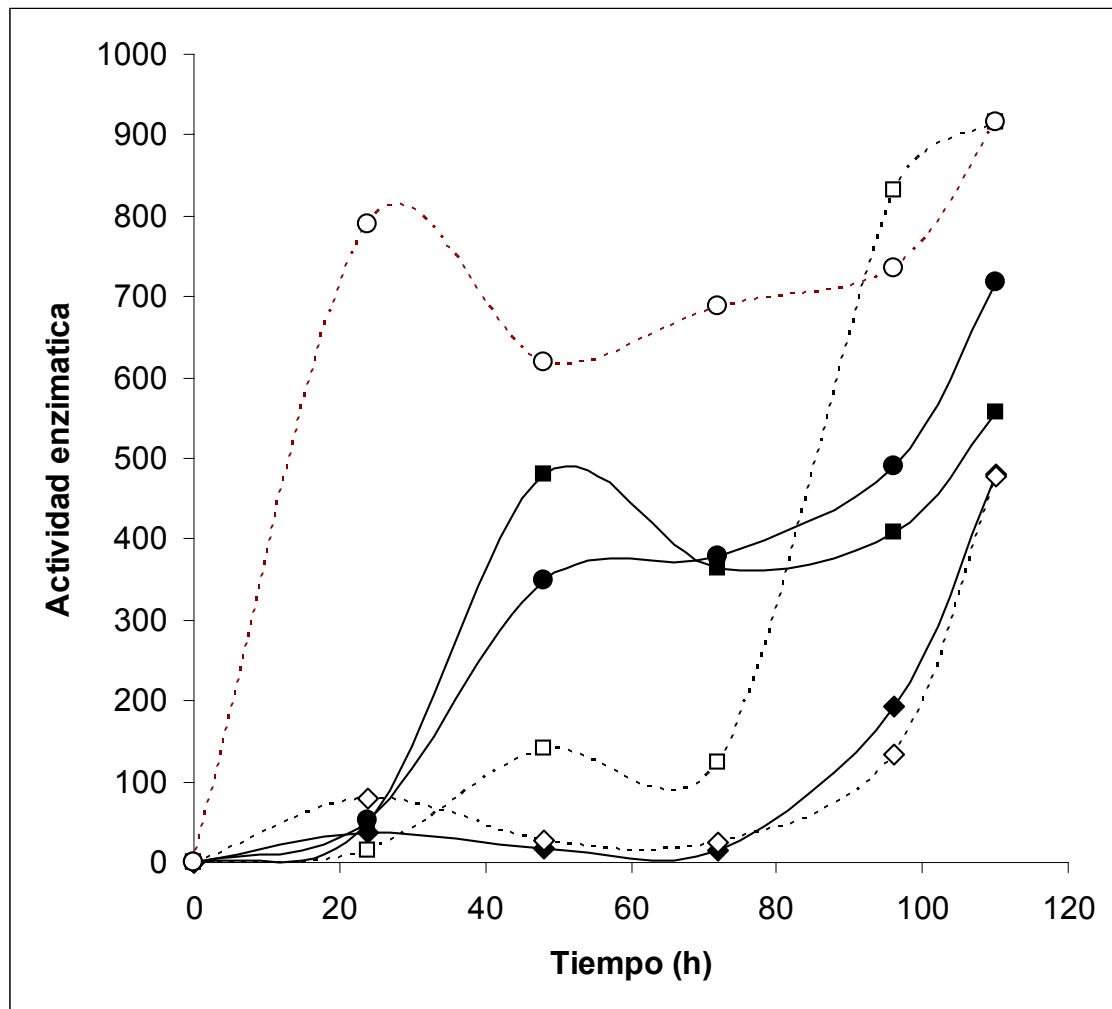


Figura 2. Valores de actividad enzimática queratinasa (U/L) durante su producción fúngica en cultivo en medio líquido. (O) sin glucosa, (◻) 5% de glucosa (◊) 10% glucosa. La línea continua representa las muestras sin grasa y la punteada a las muestras con grasa.

Estos resultados son mayores que los obtenidos por Santos et al (1996) para *A. fumigatus* quien produjo la actividad hasta valores de 250 U/L y concuerdan con los reportados por Suntornsuk y Suntornsuk (2003) para

Bacillus sp FK 46 quien produjo niveles de hasta 1000 U/L. y con lo reportado por Han-Seng et al (2002) para *Bacillus horikoshii* quien produjo niveles de 800 U/L.

Los resultados obtenidos en la investigación son menores que los niveles reportados por Mushin y Hadi (2001) por *Trichophyton metagrophytes* (8000 U/L), *Aspergillus flavus* (300 U/L), *Microsporum gryseum* (14000 u/L) y *Chrysosporium pannicola* (16000 U/L), sin embargo los anteriores usaron plumas de avicultura como sustrato.

4.3.2 CONDICIONES PRELIMINARES DE PRODUCCIÓN DE LA QUERATINASA POR FERMENTACION EN ESTADO SÓLIDO

En las figuras 3 y 4 , se presentan los resultados de pH durante la producción de la enzima queratinasa en cultivo en medio sólido, La

aplicación del tratamiento de desgrasado representó un cambio drástico en cuanto a la elevación de los niveles de pH con respecto al tiempo , aunque el factor que tuvo mas representación fue la concentración del sustrato; ya que en este caso la concentración del 30% logró elevar el pH hasta 8.7 en las primeras 40h de cultivo, logrando alcanzar niveles de pH de 9.0 al finalizar el cultivo.

Observando que con las concentraciones menores de 0.25% y 0.50% el pH se mantiene estable al inicial durante las primeras 45h de cultivo , logrando una elevación no tan significativa del nivel de pH en las horas siguientes , hasta el final del cultivo, por otro lado los resultados obtenidos se compararon con los resultados de la fermentación en estado líquido, dejando observar que la influencia del tratamiento de desgrasado hace que los niveles de pH se eleven y tiendan a la alcalinidad en un tiempo menor que en los experimentos que contienen las muestras con grasa y la cantidad de sustrato utilizado en el experimento también influye, ya que a menores concentraciones de sustrato, el pH tardara en elevarse, a comparación con las concentraciones mayores.

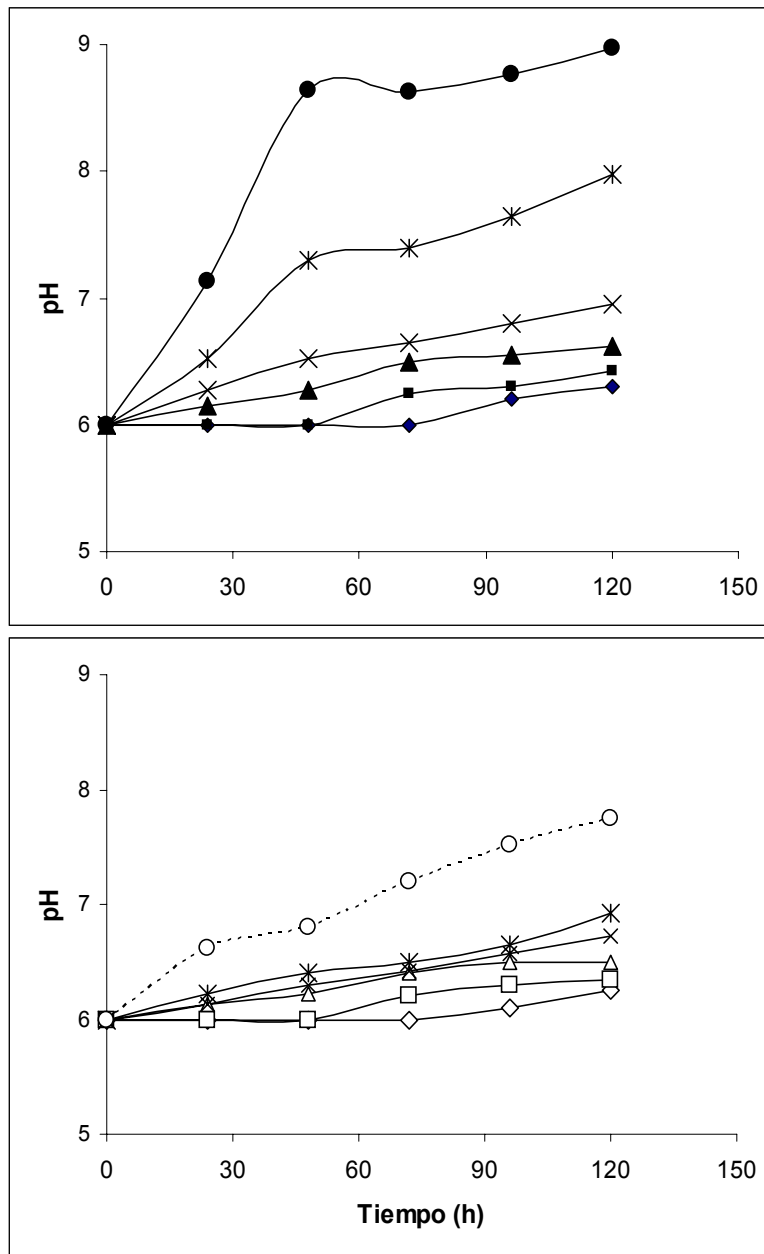


Figura 3 y 4. Valores de pH durante la producción cinética de la enzima queratianasa fúngica en cultivo en medio sólido con variación de concentraciones (○) 30%, (✱) 20%, (x) 10%, (△) 0.75% (□) 0.50% (◇) 0.25% de sustrato. La línea continua representa las muestras sin grasa y la punteada a las muestras con grasa.

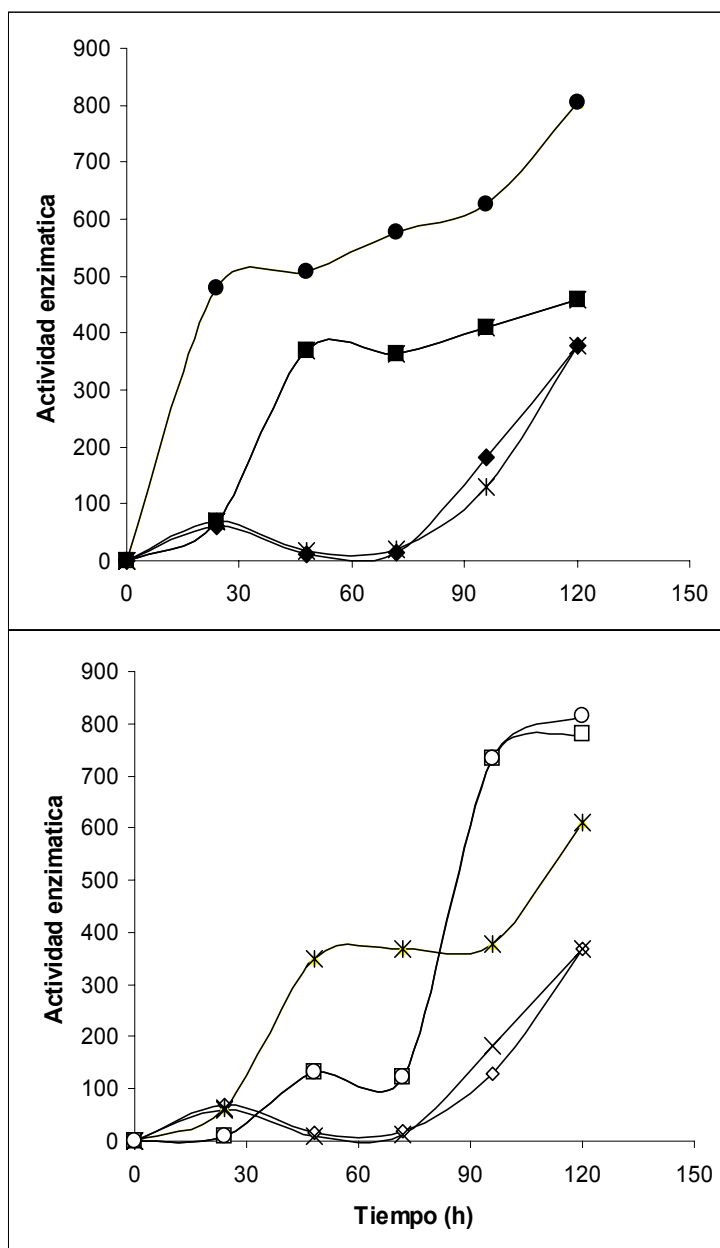


Figura 5 y 6. actividad enzimática durante la producción cinética de la enzima queratianasa fúngica en cultivo en medio sólido con variación de concentraciones (O) 30%, (⌘) 20%, (x) 10%, (Δ) 0.75% (□) 0.50% (◇) 0.25% de sustrato. La línea continua representa las muestras sin grasa y la punteada a las muestras con grasa.

Los datos obtenidos para la producción de la actividad enzimática en fermentación en estado sólido son mostrados en las figuras 5 y 6 . Donde la fig. 5 representa la actividad enzimática para las muestras de

concentración mayor (30%, 20%, 10%) y menor (0.75%, 0.50%, 0.25%) con grasa. En esta figura podemos observar que los niveles de producción de la enzima se elevan hasta 800 U/L con la concentración del sustrato al 30%, siendo que en las primeras 25 horas del cultivo alcanza un nivel de 500 U/L en comparación con las otras concentraciones ya antes mencionadas, con las concentraciones menores de sustrato, se logra un nivel de producción de 50 U/L en las primeras 25 h del cultivo, posterior a esas 25 h de cultivo, la muestra con la concentración de sustrato al 20% logra un aumento de hasta 350 U/L en comparación con las concentraciones de menor denominación.

En la fig. 6, se muestran los resultados de la actividad enzimática para las concentraciones mayores y menores de sustrato (30%,20%,10%,0.75%,0.50% y 0.25%) del material sin grasa, donde se observa que la mayor actividad enzimática se da en las concentraciones de 30% y 20% dando un nivel de actividad enzimática de 750 U/L a las 96 h del cultivo, en comparación a las demás concentraciones a las primeras 25 horas del cultivo todas presentan 50 U/L Logrando un aumento hasta las 48 horas de cultivo, pero a las 120 h del cultivo se logró un aumento significativo para las concentraciones menores de 350 U/L. Los resultados fueron comparados con los obtenidos anteriormente para fermentación en estado líquido, siendo que estos presentan una menor producción de actividad enzimática comparada con los de la FML.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

El presente trabajo de investigación ha sido desarrollado para evaluar el potencial del pelo de cerdo como fuente de inductores de la enzima queratinasa y precursores de compuestos aminados en dos sistemas de cultivo microbiano.

El pelo de cerdo puede ser utilizado como una fuente de carbono y nitrógeno debido a las altas cantidades que contiene.

El microorganismo *Rhizopus orizae* es el único capaz de crecer en el medio de fermentación utilizando como única fuente al pelo de cerdo, además de producir la enzima queratinasa.

La producción de la enzima se da mejor en el cultivo líquido ya que se alcanzan a producir hasta (915 U/L) en las primeras 24 h de cultivo, siendo que para el cultivo en medio sólido, se producen (890 U/L) en un periodo de 120.

La mayor concentración de sustrato(30%) fue la que presentó títulos más altos de actividad enzimática.

El pretratamiento para desgrasar el MQ afecta negativamente a la producción, esto se debe a que en las primeras horas del cultivo, el medio tiende a alcalinizarse.

Se lograron establecer las condiciones de fermentación en las cuales se obtienen los mayores títulos de producción de la enzima queratinasa en medio líquido (915 U/L), comparados con los de medio sólido(890 U/L), entre los cuales solo se observa una diferencia mínima.

CAPITULO 6

RECOMENDACIONES

- Este trabajo se puede mejorar, aplicando otro tipo de tratamiento al material queratinoso en uno de los casos se

sugiere reducir el tamaño de la partícula hasta lograr un polvo fino.

- La queratinasa fúngica producida se puede purificar y así determinar sus propiedades catalíticas y funcionales.
- Se sugiere llevar a cabo estudios de producción de aminoácidos a partir del pelo de cerdo empleando la enzima purificada, producida por *R. Oryzae*.

CAPITULO 7

BIBLIOGRAFIA Aguilar, C N. 1998. Producción de enzimas en sistemas de fermentación. *Reporte interno*. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México, D.F

Bascaran, V., V. Hardisson, and A. Brana. 1990. Regulation of extracellular protease production in *Streptomyces clavuligerus*. *App. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 208-213

Cannel, E. Y Moo-Young. 1980. "Solid state fermentation system". *Process Biochem.* **15**:2-7

Chandrasekaran, S. And S.C Dhar, 1987. Multiple protease from *Streptomyces moderatus*. 1. Isolation and purification of five extracellular protease. *Arch. Biochem. Biophys.* **257**: 395-401.

Chatterjee, R., A Dutta, R. Banerjee y B. Bhattacharya. 1996 "Production of tannase by solid state fermentation". *Bioprocess Eng.* **14**:159-162.

Chavez-Camarillo, G.M. 1995. *Estudios de la X-prolil dipeptidil aminopeptidasa en levaduras*. Tesis Doctoral Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN

Cheng, C. W. and S. S. Yang. 1995. Amylase production of *Streptomyces rimosus* TM-55 and their 2-deoxyglucose mutants. *Chin. J. Microbiol. Immunol.* **28**: 109-116

Christen, P., E. Villegas y S. Revah. 1994. "growth and aroma production by *Ceratocytis fimbriata* in various fermentation media". *Biotechnol. Letters.* **11**: 1183-1188

Farag, A. M. y Hassan, M. A. 2003. "Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*". *Enzyme and Microbial Technology.* **34**:85-93.

García -Garibay, M., Quintero R. R., López-Murguía, C. A., 1993. *Biología Alimentaria*, Ed. Limusa, S.A de C.V. México, D.F. Pàg., 103, 144-145, 189, 195, 229-230, 610-611.

Ghildyal, P., M Ramakrishna, B. Losane y N. G. Karanth. 1992. & K. "Gaseous concentration gradients in try type solid state fermentors effect on yields productivities". *Bioprocess Eng.* **8**:67-72.

Gowthman, M.K., S.M.S.R. Rao, N.P. Ghildyal y N G. Karanth. 1995. "Estimation of k_{la} in solid solid-state fermentation using a packed-bed bioreactor". *Process Bioprocess.* **29**: 9-15.

Grajek, W. P., Gervais, H. (1987). Influence of water activity on the enzyme biosynthesis and enzyme activities produced by *Tricho derma Viride*. TS in solid state fermentation. *Enzyme and microbial technology* **9**: 658-662.

Gupta, R., R. K. Saxena, P. Chaturvedi, and J.s. Viridi. 1995. Chitinase production by *Streptomyces viridificans*: its potential of fungal cell wall lysis. *J. Appl. Bacteriol.* **78**: 378-383.

Gutierrez-Rojas, M.,A.A Hosn, R Auria, S. Revah y E. Favela Torres. 1996. "Heat transfer in citric acid production by solid-state fermentation". *Process Biochem.***4**: 336-339

Henzler, H. J., Schedel, M. (1991). Suitability of the shaking flask for oxygen supply to microbial cultures. *Bioprocess Engineering.* **7**:123-131.

Ignatova, Z . G. Spassov, and P. Nedkov. 1999. Isolation and partial characteriation of extracellular keratinasa from a wool degrading

thermophilic actinomycete strain *Thermoactinomyces candidus*. Can, J. Microbiol. **45**: 217-222

Kembhavi AA, Kulkarni A, Pant. Salt Tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM No 64. Appl Biochem. Biotechnol 1993; 38; 83; 92)

Kokabiyyik, S. y Erdem, Bilge. Intracellular alkaline proteases produced by thermoacidophiles: detection of protease heterogeneity by gelatin zymography and polymerase chain reaction (PCR). Bioresource Technology . **84**: 29-33

Malathi, S. and Chakraborty, R., 1991. Production of alkaline protease by a new *Aspergillus flavus* isolate under solid-substrate fermentation conditions for use as a depilation agent. Appl. Environ. Microbiol., **57**, 712-716.

Muro, T., T. Murakami, Y. Tominaga, T. Tokuyama, and S. Okada, 1991. Purification and some properties of protease 1 having transfer actin from *Streptomyces griseus* var. *alcalophilus*. Agric. Biol. Chem. **55**:307-314

Nampoorthiri, K.M. y A. Pandey. 1996 "Solid-state fermentation for L-glutamic acid production using *Brevibacteriumn sp*". Biotechnol. Letters **18**: 199-204.

Nanadakumar, M. P., M.S. Thakur, K.S. Raghvarao y N.P. Ghidyal. 1996. "Substrate particle size reduction by *Bacillus coagulans* in solid state fermentation". Process Biochem. **18**:121-125

Ozaki, H. and K. Yamada. 1991. Isolation of *Streptomyces sp*. Producing glucosetolerant β -glucosidases and properties of the enzymes. Agric. Biol. Chem. **55**:979-987

Ozawa, S., K. Sato. Y. Endo 1996. " Repeated batch production of alkaline protease by solid-state fermentation using urethane foam as carriers". Process Biochem. **14**: 63-68

Pandey, A., Process Biochem., 1992, **27**, 109-117.

Pokorny, M., M. Lj. Vitale, V Turk, M. Renko and J. Zuvanic. 1979. *Streptomyces rimosus* extracellular proteases. 1. Characterization and evaluation of various crude preparations. Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. **8**:81-90

Raimbault, M. (1998). General and microbiological aspects of solid-state fermentation. Process Biochemistry, 1 (3) in **Electronic journal of biotechnology** . www.ejb.org

Ramesh, M. V. & B. K. Lonsane. 1991. Ability of a solid state fermentation technique to significantly minimize catabolic repression of α -amylase production by *Bacillus licheniformes* M27. Appl. Microbiol. Biotechnol. **35**: 591-593

Renko, M., M. Pokorny, Lj. Vitale, and V. Turk. 1981 *Streptomyces rimosus* extracellular proteases. 2. Isolation and characterization of serine alkaline proteinase. Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. **11**: 166-171

Renko, M., Lj. Vitale. M. Kokalj, and M. Pokorny, 1989. *Streptomyces rimosus* extracellular proteases. 4 , Trypsin-like proteinase. Appl. Microbiol. Biotechnol. **31**: 38-44

Righelato, R. C. growth kinetics of mycelial fungi. En **Filamentous fungi. Vol. 1 (industrial mycology)**. Smith, J E., Berry D. (Eds.) Edward Arnold, London, 1975.

Rojas-Avelizapa, L.I, R. Cruz-Camarillo, M.I Guerrero, R. Rodríguez-Vázquez y J.E. Ibarra. 1999. Selection and characterization of a proteo-Chitinolytic strain of *Bacillus thuringensis*, able to grow in shrimp waste media. World Journal of Microbiology & Biotechnology. **15**: 261-268.

Roukas, T. 1994. "Solid-state fermentation of carob pods for ethanol production". Appl. Microb. Biotechnol. **41**: 296-301.

Santos , R. M.D.B., Alexandre A.P Firmino, Cezar M. De Sà, Carlos R. Felix. 1996. Keratinolytic Activity of *Aspergillus Fumigatus* Fresenius. Current Microbiology . **33**: 364-370.

Solomon , R. Growth of *Aspergillus*, in liquid fermentors. En *Filamentous fungi*. Vol. 1 (Industrial mycology). Smith, J. E., Berry, D. (Eds.) Edward Arnold, London, 1975.

Suntornsuk, W & Suntornsuk, L. 2003. Feather degradation by *Bacillus* sp FK 46 in submerged cultivation. Bioresource Technology. 86, 239-243.

Mushin, Tawfik M. & Rawa B. Hadi. 2001. Degradation of keratin substrates by fungi isolated from sewage sludge. Mycopatologia. **154**: 185 – 189.

Vitale, Lj., M. Renko, B. Lenarcic, V. Turk, and M. Pokorny. 1986. *Streptomyces rimosus* extracellular proteases. 3. Isolation and characterization of leucine aminopeptidase. Appl. Microbiol. Biotechnol. **23**: 449-455

Vukelic, B., A. Ritonja, M. Renko, M. Pokorny, and Lj. Vitale. 1992. Extracellular α -amylase from *Streptomyces rimosus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **37**: 202-204.

Yang, S.S. and C.W. Cheng. 1996. Production, purification and characterization of α - amylase by *Streptomyces rimosus*. J. Chin. Agric. Chem. Soc. **35**: 649-654.

Yeoman, K. H. and C. Edwards. 1994. Protease production by *Streptomyces thermovulgaris* grown on repemeal-derived media. J. Appl. Bacteriol. **77**:264-270.

Zhu, Y., W. Knol, J.P. Smits y J. Bol. 1996. "medium optimization for nuclease P1 production by *Penicillium cintrinum* in solid-state fermentation using polyurethane foam as inert carrier". Process Biochem. **18**: 108-112.

DIRECCIONES ELECTRONICAS

(www.fao.org/livestock/agap/frg /afri/espainol/document/tfeed8/Data/7.HTM),

RESUMEN En el presente trabajo se establecen las condiciones preliminares de producción de la enzima queratinasa del hongo *Rhizopus oryzae*, utilizando pelo de cerdo como única fuente de carbono-nitrógeno e inductor de la actividad enzimática. Como paso inicial se seleccionó la cepa fúngica a partir de una colección de microorganismos degradadores de este material, posteriormente, se seleccionaron las mejores condiciones de cultivo. Dos sistemas de fermentación fueron evaluados, el cultivo sumergido y el cultivo en medio sólido. La producción de la enzima queratinasa se evaluó cinéticamente en ambos sistemas de cultivo y los resultados obtenidos fueron comparados entre sí y con la literatura citada. Se usó el medio de cultivo Czapek-Dox, para ambos sistemas de cultivo. Las cinéticas fueron monitoreadas cada 24 horas durante un periodo de incubación de 120 h. La actividad queratinasa fue ensayada por el método de la azocaseína y la producción de la biomasa fue estimada por el método gravimétrico. *Rhizopus oryzae* fue el microorganismo capaz de utilizar el pelo de puerco como única fuente de carbono-nitrogeno., produciendo en cultivo sumergido los mayores títulos de actividad queratinasa (915 U/L) mostrándose un menor resultado en el cultivo en medio sólido (890 U/L). En el presente estudio se demostró también el efecto que tiene el pH, el pretratamiento del sustrato y la adición de diferentes niveles de material queratinoso sobre el crecimiento fúngico y la actividad enzimática. Al final se lograron establecer las condiciones preliminares de producción de la enzima queratinasa por cultivos sumergidos de *Rhizopus oryzae*.

ABSTRACT In this work preliminary conditions of keratinase production by

fungus *Rhizopus oryzae* are described, using pig hair as carbon and nitrogen source.

Two fermentations systems were evaluated. In the first step, fungus strain was chosen of keratine-degrading microorganisms collection. Then better culture conditions were selected. After, several kinetics of comparative production were carried out. Solid state and liquid fermentation were used as production systems.

Culture medium was Czapek-Dox, for both cultures. Kinetics were monitored every 24 hours during period of incubation of 120 hours. Keratinase activity was essayed with the Azo-caseine method. Biomass production was estimated gravimetrically *Rhizopus oryzae* was the able microorganism who grows up better in the pig hair like only carbon and nitrogen source, producing in submerged culture high titles of keratinase activity.

In this study, the effect of pH, substrate pretreatment and the addition of different quantities of keratinolytic material was demonstrated. Data of the enzymatic activity shows a higher production (915 U/L) in submerged culture at 120 hours of incubation, in contrast, with solid state culture, protease activity was lower (890 U/L).