



Universidad Nacional
Federico Villarreal

Vicerrectorado de
INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

**IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN PROTEOLÍTICA DE HONGOS
QUERATINOLÍTICOS AISLADOS DE SUELOS DE GRANJA DE BOVINOS, EN
ABRIL DEL 2014 EN LIMA-PERÚ**

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en Biología

AUTORA

Correa Vásquez, Yesenia Del Milagro

ASESORES

Mg. Gutiérrez Román, Ana Isabel Flor

PhD. Castellanos Sánchez, Pedro Luis

JURADOS

Mg. Santa Cruz Carpio Carlos M.

Blga. Bravo Cruz Nora B.

Mg. Helmer H. Lezama Vigo

Mg. Gisela F. Yupanqui Siccha

Lima – Perú

2018

DEDICATORIA

A Yrma, Leopoldo, David, Rafael, Gumi y Vainilla por ser las personas más importantes en mi vida, por brindarme la oportunidad de ser profesional, y por lo orgullosa que me siento de llamarlos mi familia.

A Paulo Manrique, por haberme dado tanto amor, por ayudarme incondicionalmente, por las hermosas sonrisas y las palabras de ánimo.

A mis asesores Ana Gutiérrez y Pedro Castellanos, por su paciencia y dedicación. Por sus consejos y enseñanzas.

INDICE

	Pag.
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCION	3
II. MARCO TEÓRICO	5
2.1 ANTECEDENTES.....	5
2.1.1 Aislamiento e identificación de Hongos Queratinofílicos.....	5
2.1.2 Los Hongos Queratinolíticos y su actividad proteolítica.	6
2.2 GENERALIDADES.....	7
2.2.1 Hongos queratinolíticos.....	7
2.2.1.1 Hongos Dermatofitos.....	8
2.2.1.2 Hongos Saprófitos.....	8
2.2.2 Queratina y la enzima Queratinasa.....	8
2.2.3 Proceso de queratinolisis producido por hongos.....	9
III. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1 Origen y Colecta de Suelo.....	11
3.2 Medición de pH del suelo colectado.....	12
3.3 Aislamiento de hongos Queratinofílicos.....	12
3.3.1 Identificación macroscópica y microscópica de la morfología fúngica.....	13
3.3.1.1 Microcultivo.....	14
3.4 Selección de cepas proteolíticas.....	14
3.4.1 Medición de Difusión de Enzima.....	15
3.5 Evaluación de la actividad proteolítica de la queratinasa producido por hongos.....	15
3.5.1 Medición de pH y conteo de esporas	16
3.5.2 Cuantificación de la degradación de material queratinoso	16

3.5.3	Medición de la producción de Proteínas Totales	17
3.5.4	Cuantificación de la Actividad enzimática de la queratinasa.....	17
3.6	Análisis estadístico de los datos.....	18
IV.	RESULTADOS.....	20
4.1	Condiciones de colecta, pH y Temperatura del suelo.....	20
4.2	Aislamiento de hongos Queratinofílicos.....	20
4.2.1	Características macroscópicas y microscópicas de los géneros aislados.....	20
4.2.1.1	Género <i>Absidia</i> sp.....	21
4.2.1.2	<i>Acremonium</i> sp.....	21
4.2.1.2.1	<i>Acremonium</i> sp. 1.....	21
4.2.1.2.2	<i>Acremonium</i> sp. 2.....	21
4.2.1.3	<i>Aspergillus</i> sp.....	22
4.2.1.3.1	<i>Aspergillus</i> sp. 1.....	22
4.2.1.3.2	<i>Aspergillus</i> sp. 2.....	22
4.2.1.3.3	<i>Aspergillus</i> sp. 3.....	23
4.2.1.3.4	<i>Aspergillus</i> sp. 4.....	23
4.2.1.4	<i>Circinella</i> sp.....	24
4.2.1.5	<i>Fusarium</i> sp.....	24
4.2.1.5.1	<i>Fusarium</i> sp. 1.....	24
4.2.1.5.2	<i>Fusarium</i> sp. 2.....	25
4.2.1.5.3	<i>Fusarium</i> sp. 3.....	25
4.2.1.5.4	<i>Fusarium</i> sp. 4.....	26
4.2.1.5.5	<i>Fusarium</i> sp. 5.....	26
4.2.1.6	<i>Paecilomyces</i> sp.	27
4.2.1.7	<i>Penicillium</i> sp.	27
4.2.1.8	<i>Scedosporium</i> sp. (= Sinonimia <i>Graphium</i> sp.)	27
4.2.1.9	<i>Scopulariopsis</i> sp.	28
4.2.1.9.1	<i>Scopulariopsis</i> sp. 1.....	28
4.2.1.9.2	<i>Scopulariopsis</i> sp. 2.....	28
4.2.1.9.3	<i>Scopulariopsis</i> sp. 3.....	29
4.3	Selección de cepas proteolíticas.....	29

4.4	Evaluación de la actividad proteolítica de la queratinasa.....	32
4.4.1	Medición de pH y conteo de esporas.....	32
4.4.2	Cuantificación de la degradación de material queratinoso.....	33
4.4.3	Medición de la producción de Proteínas Totales.....	34
4.5	Cuantificación de la Actividad Proteolítica de la queratinasa.....	35
V.	DISCUSIÓN.....	40
5.1	Aislamiento de hongos Queratinofílicos.....	40
5.2	Selección de Hongos proteolíticos.....	41
5.3	Parámetros proteolíticos de la queratinasa en las cepas fúngicas seleccionadas.....	42
5.4	Cuantificación de la actividad proteolítica de la queratinasa en las cepas fúngicas seleccionadas.....	44
VI.	CONCLUSIONES.....	46
VII.	RECOMENDACIONES.....	47
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
IX.	ANEXOS.....	57

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Fig. 1: Granja de Bovinos ubicada en la Universidad Agraria La Molina, Lima-Perú.....	11
Fig. 2: Colecta de suelo de granja de bovinos.....	12
Fig. 3: Método del anzuelo. Placas conteniendo suelo de granja junto a material queratinoso de bovino estéril.....	13
Fig. 4: Mediciones de la difusión de la enzima de un hongo en agar milk. Las flechas negras muestran las mediciones del crecimiento fungal (Dcf), mientras que las flechas en rojo muestra las mediciones realizadas del halo de degradación de la caseína (Dhd)	15
Fig. 5: Sistema de inducción de la enzima queratinasa por las cepas fúngicas seleccionadas.....	17
Fig. 6: Cepas fúngicas con mayor difusión de enzima proteolítica en Agar Leche, se muestra el reverso de cada placa junto al halo de degradación producido. A: Cepa M-5(3)ab (<i>Aspergillus</i> sp 1), B: Cepa M-1(4)a (<i>Aspergillus</i> sp. 2), C: Cepa M-4(2)a (<i>Scopulariopsis</i> sp 2), D: M-4(4)a (<i>Scopulariopsis</i> sp 2), E: Cepa M-8(6)b (<i>Penicillium</i> sp)	30
Fig. N° 7: Presencia y medición de la difusión de enzimas proteolíticas de las cepas fúngicas aisladas a partir de suelos de granja de bovinos al 7mo día de incubación.....	31
Fig. 8: Medición de pH en el medio de cultivo de las 5 cepas seleccionadas por un período de 8 días.	32
Fig. 9: Conteo de esporas durante 8 días de experimentación.....	33
Fig. 10: Porcentajes de degradación de queratina a partir del pesaje de pelo de bovino restante de cada experimento en períodos de 2 días, 4 días, 6 días y 8 días utilizando 5 cepas fúngicas seleccionadas.....	34

Fig. 11: Concentración de proteínas producidas en medio líquido a los 2, 4, 6 y 8 días por cinco cepas fúngicas	35
Fig. 12: Concentración de producto generado por enzimas de 5 cepas fúngicas utilizando el método de la Azocaseína a los 2, 4, 6 y 8 días.....	36
Fig. 13: Actividad enzimática generada por enzimas proteolíticas de 5 cepas fúngicas durante 2, 4, 6 y 8 días.....	37
Fig. 14: Actividad específica generada por enzimas proteolíticas de 5 cepas fúngicas durante 2, 4, 6 y 8 días.....	39

LISTA DE ANEXOS

	Pag.
<i>Anexo 1: Clasificación taxonómica de los hongos queratinofílicos aislados de suelos de granja de bovinos.....</i>	57
<i>Anexo 2: Pruebas estadísticas: Test de Friedman y Signo-Rango de Wilcoxon para la comparación de la concentración de Proteínas a través de los días por cada cepa de manera individual.....</i>	63
<i>Anexo 3: Pruebas estadísticas: Test de Friedman y Signo-Rango de Wilcoxon para la comparación de la Actividad enzimática de la queratinasa a través de los días por cada cepa de manera individual.....</i>	66
<i>Anexo 4: Pruebas estadísticas: Test de Friedman y Signo-Rango de Wilcoxon para la comparación de la Actividad específica de la queratinasa a través de los días por cada cepa de manera individual.....</i>	69
<i>Anexo 5: Pruebas estadísticas: Test de Kruskal Wallis para la comparación de la concentración de proteínas entre cepas.....</i>	72
<i>Anexo 6: Pruebas estadísticas: Test de Kruskal Wallis para la comparación de la actividad enzimática entre cepas.....</i>	74
<i>Anexo 7: Pruebas estadísticas: Test de Kruskal Wallis para la comparación de la actividad específica entre cepas.....</i>	76

ABREVIATURAS

%	Porcentaje
°C	Grados Celsius
μL	Microlitro
A ₂₆₀	Absorbancia a 260 nanómetros
A ₂₈₀	Absorbancia a 280 nanómetros
BT	Buffer Tris
cm	Centímetros
Dcf	Diámetro del crecimiento fungal
Dhd	Diámetro de halos de degradación
e	Coefficiente de extinción
g	Gramos
kDa	Kilo Dalton
L	Litro
M	Molar
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitros
mm	Milímetro
mU	Microunidades
N	Normalidad
nm	Nanómetro
NMP	Número más probable
p/v	peso/volumen
PBI	Producto bruto interno
pH	Potencial de hidrogeniones
TCA	Ácido tricloroacético
TCA	Ácido tricloroacético
U	Unidades
UHT	Ultra High Temperature
μM	Micromolar

RESUMEN

El manejo de residuos queratinosos producidos por las industrias pecuarias, es actualmente uno de los problemas que enfrentan las empresas de este rubro ya que ellos cuentan con una estructura molecular difícil de degradar, por lo que una de las opciones más atractivas son los tratamientos biológicos considerados como alternativa limpia, rentable y de fácil manejo. Entre los organismos que podrían biodegradar estos residuos se encuentran los hongos, productores de diversas enzimas proteolíticas que podrían disminuir la carga contaminante y bioconvertir el material queratinoso. Por este motivo, nuestro objetivo principal fue el aislamiento de hongos a partir de suelos de granja de bovinos que tuvieran actividad queratinolítica. Nuestros resultados fueron el aislamiento de 75 cepas de hongos filamentosos queratinofílicos, dentro de los cuales se encontraron 9 géneros diferentes: *Scopulariopsis* (40%), *Fusarium* (23%), *Aspergillus* (17%), *Scedosporium* (8%), *Paecilomyces* (4%), *Acremonium* (3%), *Circinella* (3%), *Absidia* (1%) y *Penicillium* (1%). Posteriormente, utilizando como prueba indirecta la degradación de caseína en agar leche, se realizó la selección de las 5 mejores cepas proteolíticas: las especies de *Aspergillus* sp. (Cepas M-1(4)a y M-5(3)ab), *Scopulariopsis* sp. (Cepas M-4(2)a y M-4(4)a) y *Penicillium* sp. (Cepa M-8(6)b). Así mismo, se determinó las cepas que exhibían de manera visible un gran porcentaje de degradación de material queratinoso de bovino al día 8 de incubación, estas fueron la cepa M-4(2)a (hasta un 85% de degradación) con una actividad enzimática de 1.14 U/mL y la cepa M-4(4)a (hasta un 72% de degradación) con una actividad enzimática de 1.38 U/mL, ambas de la especie *Scopulariopsis* sp. Estas dos últimas presentaron a su vez una alcalinización del medio de cultivo líquido con rangos de pH que van desde 7.5 a 9 y que se incrementan según el tiempo de incubación. Las cepas fúngicas M-4(2)a y M-4(4)a, pertenecientes al género de *Scopulariopsis* sp.2, podrían ser unas buenas candidatas para la producción de enzimas queratinolíticas para utilizarse en la biodegradación de desechos queratinosos.

Palabras clave: Residuos queratinosos, pelo de bovino, hongos queratinofílicos, actividad queratinolítica, *Scopulariopsis* sp.

ABSTRACT

The management of keratinous waste produced by livestock industries, is currently one of the problems that companies in this sector face because they, the keratinous waste, have a difficult molecular structure to degrade, so one of the most attractive options are biological treatments considered a clean alternative, profitable and easy to use. One group of organisms that could biodegrade these residues are fungi, they are experts producers of different proteolytic enzymes that could reduce the pollutant load and bioconvert keratinous material. For this reason, our main objective was the isolation of fungi from soil of bovine farm that had keratinolytic activity. Our results were the isolation of 75 strains of filamentous fungi keratinophylic, in which 9 different genera were found: *Scopulariopsis* (40%), *Fusarium* (23%), *Aspergillus* (17%), *Scedosporium* (8%), *Paecilomyces* (4 %), *Acremonium* (3%), *Circinella* (3%), *Absidia* (1%) and *Penicillium* (1%). Later, using the degradation of casein in milk agar as indirect test, we select the top 5 proteolytic strains: The species of *Aspergillus* sp. (M-1(4)a and M-5(3)ab strains), *Scopulariopsis* sp. (M-4(2)a and M-4(4)a strains) and *Penicillium* sp. (M-8(6)b strain). Likewise, strains which exhibited a conspicuously large percentage degradation of bovine keratinous material at 8th day of incubation were determined, these were strain M-4(2)a (up to 85% degradation) with an enzymatic activity of 1.14 U/mL and strain M-4(4)a (up to 72% degradation) with an enzymatic activity of 1.38 U/mL, both species belongs to *Scopulariopsis* sp. In the last two incubated strains, the liquid culture medium presents an alkalinization with ranges from pH 7.5 to 9 and which increased according to the incubation time. The fungal strains M-4(2)a and M-4(4)a, belonging to the genus *Scopulariopsis* sp.2, could be a good candidates for the production of keratinolytic enzymes to be used in keratinous waste biodegradation.

Keywords: keratinous waste, bovine hair, keratinophylic fungi, keratinolytic activity, *Scopulariopsis* sp.

I. INTRODUCCION

El sector agroindustrial está adquiriendo gran importancia en nuestro país, su expansión ha incrementado la generación de desechos agroindustriales presentando una contaminación de alto impacto ecológico. Tal es el caso de la industria pecuaria que elimina restos de pelo de ganado, con la característica de una lenta biodegradación, por lo que se hace necesario realizar un tratamiento para disminuir su potencial carga contaminante (Bertsch & Coello, 2005).

Dentro de las industrias pecuarias encontramos a las curtiembres que en una de sus primeras etapas (el pelambre), se prepara, limpia y acondicionan las pieles antes de empezar con el proceso de curtido (Galarza *et al.*, 2012). Esta actividad se denomina “Proceso de ribera” y es la que genera preocupación, por la gran carga orgánica eliminada en el efluente cuyos residuos queratinosos no se han degradado y son poco aprovechables en dicho estado (Vargas, 2013). Se ha reportado que se procesan aproximadamente 1'300,000 pieles de vacunos al año, habiendo tenido un PBI promedio de 55,5 millones de soles en el 2012. Por este motivo, es que constituye un importante problema en la industria de las curtiembres peruanas (Vargas, 2013; Campos, 2013).

En la actualidad con las crecientes exigencias legales y requerimientos ambientales algunas curtiembres se han visto obligadas a cerrar sus industrias tanto en países desarrollados como en los que se encuentran en vías de desarrollo (Wang *et al.*, 2009), así también han aparecido curtiembres informales que evitan el cumplimiento de estas normas por no tener noción de cómo reducir esta carga de contaminación. Durante las últimas tres décadas se han llevado a cabo investigaciones para la mejora en la utilización de residuos animales, incluyendo los desperdicios del beneficio de aves y bovinos, en el procesamiento de cuero, y en los desechos humanos en general (Deivasigamani & Alagappan, 2008). De igual manera se han realizado investigaciones para el manejo de residuos queratinosos, los cuales son el componente principal del pelo, plumas y lana, así como también constituyen parte de las células epiteliales (Latkowski & Freedberg, 1999). Estos residuos queratinosos presentan gran estabilidad y fortaleza, por lo que muy pocos organismos son capaces de utilizarla y descomponerla.

Una de las opciones más atractivas son los tratamientos biológicos o bioprocesos, los cuales son considerados como una tecnología alternativa, limpia, rentable y de fácil manejo que utilizan los desechos como posibles fuentes inductoras del crecimiento y desarrollo de hongos productores de proteasas fúngicas (Vázquez *et al.*, 2008). Estas constituyen una alternativa de biodegradación del material queratinoso (pelo) a través de organismos que poseen una enzima denominada “Queratinasa”, que aumentarían el valor nutricional de estos desechos degradados para utilizarse como fertilizantes (Galarza *et al.*, 2012; Sharma & Sharma, 2011b).

En este contexto, los hongos queratinolíticos son una excelente opción y constituyen un gran beneficio para la biodegradación de la queratina proveniente de dichas industrias (Ganaie *et al.*, 2010), sin embargo, en nuestro país no existen investigaciones publicadas donde provean información acerca de la biodegradación de residuos queratinosos de estas industrias, que podrían ayudar a disminuir la contaminación de los efluentes y darle a este residuo un valor agregado con una utilización más rentable.

Por este motivo, en esta tesis de licenciatura se planteó como objetivo general identificar y evaluar la actividad proteolítica de hongos queratinolíticos aislados a partir de suelos de granja de bovinos, teniendo como objetivos específicos el aislamiento de hongos queratinofílicos a partir de suelos de granja de bovino, así como el determinar los géneros de hongos que tienen capacidad proteolítica a partir de un método indirecto utilizando la degradación de caseína para posteriormente seleccionar los hongos con degradaciones altas de caseína, y evaluar y cuantificar de la actividad proteolítica de la queratinasa producida por dichos hongos utilizando la metodología de la azocaseína.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES

2.1.1 Aislamiento e identificación de Hongos Queratinofílicos.

El aislamiento e identificación de Hongos queratinofílicos se viene reportando desde la década de los 50, utilizando generalmente la técnica del anzuelo donde se aíslan especies de microorganismos relacionados con el tipo de sustrato o anzuelo utilizado (Vanbreuseghem, 1952). Esta metodología posteriormente fue estandarizada a favor de las necesidades experimentales de los investigadores, utilizándose tanto para el aislamiento de hongos queratinofílicos como para hongos queratinolíticos en diferentes hábitats, ya sean lodos de aguas residuales, desperdicios orgánicos, suelos u otros hábitats contaminados. Otro método menos utilizado es la técnica de dilución en placa, la cual no proporciona suficientes datos específicos para el aislamiento de hongos queratinofílicos y queratinolíticos. También, existe la metodología del Número Más Probable (NMP), que permite determinar las cantidades fungales con mejor exactitud a comparación de la técnica del anzuelo, por lo que se le utiliza exitosamente para propósitos semicuantitativos. (Kushwaha & Guarro, 2000; Vanbreuseghem, 1952; Ulfing *et al.*, 2010).

Siendo el suelo la principal fuente de hongos dermatofitos y hongos queratinofílicos, las primeras investigaciones se centraron en identificar los lugares propicios para la colecta, reportando que el mayor número de estos hongos se encontraban en los suelos con gran cantidad de humus y que para el aislamiento la profundidad propicia sería de 1-10 cm. y 11-25 cm (Sharma & Swati, 2012; Chmel & Vlácilíková, 1975).

Posteriormente, en distintos países las investigaciones se centraron en la identificación de hongos queratinofílicos aislados a partir de tierra de granjas, bosques, parques públicos y suelos con presencia de basura, aquí destacan los países de Irán (Malek *et al.*, 2013; Moallaei *et al.*, 2006; Pakshir *et al.*, 2013; Zarei Mahmoudabadi & Zarrin, 2008), Pakistán (Soomro *et al.*, 2007), Egipto (El-Said *et al.*, 2009) y La India (Ganaie *et al.*, 2010; Jain & Sharma, 2012; Kumar *et al.*, 2013). La identificación de dichos hongos serviría para incrementar la información médica, ya que muchos de ellos podrían ser dermatofitos y causar mucho daño a la salud

humana y animal, mientras que algunos géneros de hongos también podrían ser saprófitos del suelo (Avasn Maruthi et al., 2012; Kumar et al., 2013; Ajello, 1953).

Finalmente, se verificó que la distribución de los hongos Queratinofílicos dependía mucho de la presencia humana y/o animal, factores climáticos, material orgánico, pH y la Humedad (Sharma & Swati, 2012; Bhadauria & Sharma, 2001; Gupta & Garg, 1991; Kaul & Sumbali, 1998).

2.1.2 Los Hongos Queratinolíticos y su actividad proteolítica.

Se han reportado diferentes especies de hongos queratinolíticos entre parásitos, saprofitos, algunas cepas de *Bacillus* y algunos Actinomicetos que poseen la capacidad de degradar la Queratina (Bascarán et al., 1990; Friedrich et al., 1999; Galarza et al., 2012; Pokorny et al., 1979; Renko et al., 1981; Renko et al., 1989; Vitale et al., 1986; Yeoman & Edwards, 1994). Esto ha conducido a distintas investigaciones en países como Irak, donde Muhsin & Hadi (2002) decidieron probar la habilidad degradativa de los hongos queratinolíticos con tres tipos de sustratos de queratina (pelo humano, plumas de pollo y lana). Entre los resultados se obtuvo que el pelo humano tiene la mayor velocidad de degradación, coincidiendo con Sharma & Sharma (2011b) quienes realizaron un ensayo parecido pero utilizando pelo humano y de animal (búfalo y vacas).

La queratinasa es producida por diferentes hongos entre los que se encuentran las especies del género *Aspergillus*, *Onygena*, *Absidia*, *Rhizomucor*, *Chrysosporium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Trichoderma*, *Curvularia*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geomyces*, *Gliomastix*, *Paecilomyces*, *Scopulariopsis*, *Penicillium* y *Doratomyces* (Friedrich et al., 1999; Kushwaha et al., 2000; Simpanya, 2000). También se pueden mencionar algunas especies de dermatofitos que están incluidas en este grupo como *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. gallinae*, *Microsporum canis* y *M. gypseum* (Wawrzkievicz et al., 1991). Según Kunert (1989), la mayoría de organismos que son capaces de producir la queratinasa son los hongos filamentosos; reportándose su aislamiento e identificación a través de los años en países como España (Ulfig et al., 1997), Irán (Moallaei et al., 2006), Polonia (Ulfig et al., 2010), entre otros.

La verificación de la actividad proteolítica que poseen estos hongos es realizada previamente mediante placas de agar leche, donde las cepas con actividad enzimática proteolítica presentan alrededor de su crecimiento un halo de degradación de la caseína, mostrando indirectamente que la cepa libera enzimas queratinolíticas (Awasthi, 2011); este tipo de sustrato se utiliza ya que la queratinasa puede degradar no sólo material queratinoso sino también caseína (Gupta & Ramnani, 2006).

Por otro lado, la cuantificación de la actividad proteolítica se realiza con diversas técnicas entre la que destaca la técnica de la azocaseína, utilizada frecuentemente como una metodología indirecta (Awasthi, 2011; Galarza *et al.*, 2012; Vázquez *et al.*, 2008), donde la enzima presente en el medio es cuantificada por espectrofotometría a 440 nm. La importancia de cuantificar la actividad proteolítica se basa en que con ella es posible seleccionar la especie de hongo con mayor capacidad de segregación de enzima queratinasa al medio, la cual favorece a la degradación del sustrato queratinoso.

2.2 GENERALIDADES

2.2.1 Hongos queratinolíticos

Son organismos pertenecientes al reino fungi con la capacidad enzimática para atacar, destruir y utilizar la queratina por medio de enzimas específicas llamadas queratinasas (Sharma *et al.*, 2011a; Ulfing, 2003; Muhsin & Hadi, 2002). Por esto, juegan un papel ecológico importante en la descomposición de α -queratinas (proteínas fibrosas), las cuales son insolubles y se consideran poco biodegradables (Kunert *et al.*, 2000).

La denominación de estos hongos “Queratinolíticos” ha sido discutida en muchas ocasiones, y la confunden muchas veces con el término “Queratinofílico”; sin embargo, no son lo mismo (Sharma *et al.*, 2011a; Ulfing *et al.*, 1997). Los hongos queratinofílicos tienen la habilidad de crecer y reproducirse en medios queratinosos pero no siempre los degradan, sino que utilizan sólo los componentes no queratinosos del sustrato o los productos de la descomposición de la queratina por lo que son considerados como organismos acompañantes de los hongos

Queratinolíticos (Ulfig, 2003, Kumar *et al.*, 2013; Sharma & Swati, 2012; Kunert *et al.*, 2000)

Los Hongos Queratinolíticos pueden presentarse como:

2.2.1.1 Hongos Dermatofitos:

Hongos filamentosos causantes de enfermedades micóticas, los cuales pueden directamente contaminar y parasitar a animales y a seres humanos. A estos hongos se les puede encontrar en ambientes como suelos, de donde pueden directamente contaminar y parasitar al hombre (Mendo, 2013).

2.2.1.2 Hongos Saprófitos:

Hongos que obtienen sus nutrientes y energía degradando materia orgánica que proviene de organismos muertos y que pocas veces pueden ocasionar daño al hombre (Cisterna, 2003).

2.2.2 Queratina y la enzima queratinasa

La queratina es una proteína insoluble que posee una estructura helicoidal fibrosa y un gran número de enlaces disulfuro que estabiliza su estructura cuaternaria proporcionándole la resistencia hacia numerosas proteasas como la tripsina, pepsina y papaína por lo que podría considerarse poco biodegradable, (Grant & Long, 1981; Kunert *et al.*, 2000; Soomro *et al.*, 2007) .

Constituye el principal componente del pelo de animales y plumas, cuya degradación se realiza por enzimas proteolíticas específicas para la queratina llamadas queratinasas (Friedrich *et al.*, 1999; Riffel *et al.*, 2003); y que son enzimas potenciales de remoción de pelo y plumas en las industrias que trabajan con este material (Takami *et al.*, 1992).

El grupo de enzimas proteolíticas que son capaces de hidrolizar la queratina insoluble de una manera más eficiente que otras proteasas son llamadas queratinasas (Onifade, 1998; El-Refai *et al.*, 2005). La mayoría de ellas tienen características comunes a pesar de su diferencia de origen, son en gran medida serin o metalo proteasas (Kunert, 1989; 1995), cuentan con una masa molecular

cuyo rango va desde 20 kDa a 60 kDa y mayormente son más activas en ambientes alcalinos (Gradisar *et al.* 2005; Gopinath *et al.*, 2015).

Las enzimas queratinasas poseen una amplia especificidad de sustrato ya que no sólo pueden hidrolizar sustratos proteínicos insolubles como es el caso de la queratina en plumas, lana, pelo, uñas, etc, sino también puede hidrolizar sustratos proteínicos solubles entre los que se encuentran la caseína, gelatina, albumina de suero bovino y hemoglobina (Gupta & Ramnani, 2006).

El uso potencial de estas enzimas se encuentra distribuidas en diferentes aplicaciones tales como las industrias de detergentes, textiles, bioconversión de desechos, medicina y cosméticos (Gradisar *et al.* 2005).

2.2.3 Proceso de queratinolisis producida por hongos

La queratinolisis producida por enzimas secretadas por hongos no sólo es un evento proteolítico sino que incluye además la denaturación del sustrato a partir de la separación de los enlaces disulfuro que ocasionan su resistencia (Kunert, 1972a, 1972b, 1973, 1976; Ruffin *et al.*, 1976; Safranek & Goos, 1982; Takami *et al.*, 1992). El sulfito en medios neutros y alcalinos, separa a la cistina (unión entre dos cisteínas por enlaces disulfuro) en S-sulfocisteína (R-S.SO₃H) y cisteína (“sulfitolisis”). La queratina degradada por sulfitolisis puede luego ser hidrolizada por proteasas extracelulares de los hongos. Al mismo tiempo, los hongos eliminan el exceso de nitrógeno en el sustrato proteico por deaminación y liberación del amonio. Al hacer esto, ellos crean un ambiente alcalino alrededor del micelio acelerando la sulfitolisis y desestabilizando el sustrato (Kunert, 1989).

Este proceso de queratinolisis por hongos propuesto por Kunert también fue demostrada por Stipanuk *et al.* en el año 2006 y no es hasta el año 2013 donde Grumbt *et al.* proveen de un soporte molecular para la hipótesis que fue formulada hace mucho tiempo por Kunert (1972 a, b), poniendo de manifiesto que el aminoácido cisteína encontrado abundantemente en la queratina, sirve como un sustrato para la formación de sulfito, y que este proceso implica una enzima llamada Cisteína dioxigenasa Cdo1 y una bomba de flujo de sulfito SSU1 (Grumbt *et al.*, 2013). Sin embargo, tanto Cdo1 y SSU1 se identificaron en dermatofitos unos

años antes y desde ese momento se discutió una supuesta contribución de estos factores en la degradación de la queratina (Kasperova *et al.*, 2011; Léchenne *et al.*, 2007).

Por otro lado los hallazgos *in vitro* sugieren un mecanismo en los dermatofitos, que integra hábilmente dos requisitos fundamentales para la infección de las estructuras queratinizadas; la primera es la formación de sulfito para la degradación de la queratina, lo que resulta en la generación de oligopéptidos y aminoácidos accesibles para el crecimiento y la segunda, la tolerancia a la cisteína ya que a concentraciones altas se vuelve tóxico tanto para procariontas como para eucariotas, este aumento de los niveles de cisteína se controla por el mismo proceso de formación de sulfito y de flujo de salida, ocasionando que no exista un elevado nivel de cisteína (Grumbt *et al.*, 2013).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos de esta tesis de licenciatura fueron realizados en dos laboratorios pertenecientes a Universidades Nacionales: El Laboratorio de Micología Aplicada de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM) donde se efectuó el aislamiento, identificación y cultivo de hongos; y el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular (LBBM) de la Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV) donde se realizó la cuantificación de la enzima utilizando el método de la Azocaseína.

3.1 Origen y Colecta de Suelo

Se colectó 10 muestras de suelo de aproximadamente 200 g cada una, provenientes de una granja de Bovinos ubicada en la Universidad Agraria La Molina (ver fig. 1), se eligió lugares de muestreo húmedos y que no presentaran exposición directa a la luz solar. Se utilizó una cuchara pequeña estéril para la colecta removiendo primero los residuos superficiales y otros materiales, teniendo como límite una profundidad máxima de 5 cm (ver fig. 2). Dichas muestras fueron almacenadas en bolsas Ziploc de primer uso debidamente rotuladas, y fueron transportadas a una temperatura menor de 10°C hacia el Laboratorio de Micología Aplicada de la UNMSM para su procesamiento inmediato. En paralelo se midió la temperatura ambiental en °C y la Humedad relativa ambiental del lugar de colecta con un termohigrómetro, para usarlo como referencia en el aislamiento de las cepas.



Fig. 1: Granja de Bovinos ubicada en la Universidad Agraria La Molina, Lima-Perú



Fig. 2: Colecta de suelo de granja de bovinos

3.2 Medición de pH del suelo colectado

Se pesó y mezcló 1 g de la muestra de suelo colectada con 5 mL de agua destilada y se dejó reposar por 30 minutos. Pasado este tiempo se midió el pH de la muestra con un multiparámetro Hanna, se registró el promedio de las medidas de tres repeticiones para cada una de las muestras de suelo colectadas.

3.3 Aislamiento de hongos Queratinofílicos

La recuperación de hongos queratinofílicos cultivables presentes en la muestra de suelo se realizó utilizando la técnica del anzuelo (Vanbreuseghem, 1952), la cual consiste en depositar porciones del suelo colectado (no esterilizado) dentro de placas Petri de 100 x 15 mm formando aproximadamente un centímetro de altura. Posteriormente se agregó 3 mL de agua bidestilada estéril que permitió un grado de humedad óptimo para el crecimiento de los hongos y por último se colocó 1 g de material queratinoso (pelo de bovino) de 2-3 cm de largo debidamente esterilizados tres veces en autoclave. Se utilizó una placa por cada muestra de suelo colectado, en total fueron 10 placas (ver fig. 3) y un blanco que consistía en una muestra de suelo estéril para verificar que los hongos aislados no presentaban contaminación externa o ambiental. Las placas se incubaron en un ambiente con

27°C de temperatura, 60% de humedad relativa y en oscuridad por 2 meses, una vez por semana se añadió 3 mL de agua estéril a cada una de las placas para mantener la humedad del sistema. Los cultivos fueron observados en el transcurso de estos meses utilizando un estereoscopio para detectar el crecimiento fúngico.



Fig. 3: Método del anzuelo. Placas conteniendo suelo de granja junto a material queratinoso estéril de bovino.

Los hongos que presentaron crecimiento de micelio alrededor y sobre el pelo fueron considerados como hongos queratinofílicos y se aisló tomando las hifas con una asa de siembra e inoculándolos en placas Petri de 60 x 15 mm de diámetro que contenían medio sólido Czapeck glucosado. La incubación fue a temperatura ambiente (27°C) y en oscuridad por 5 a 7 días; este proceso fue repetido hasta que se obtuvo cultivos puros para poder identificar y seleccionar las cepas queratinolíticas. Todos los hongos aislados fueron inoculados individualmente en tubos con Agar Czapeck en plano inclinado y luego de su crecimiento fueron almacenados a 4°C conformando el cepario.

3.3.1 Identificación macroscópica y microscópica de la morfología fúngica.

Para la identificación macroscópica de las colonias aisladas, se describió la pigmentación y morfología macroscópica de cada una de las cepas, utilizando un estereoscopio.

Para el caso de la identificación microscópica se procedió a realizar microcultivos para preparar la fijación de muestras de cada una de ellas.

El código que se le dio a cada cepa aislada fue referido a la procedencia de muestra de suelo de donde fue aislado (M-1, M-2, etc.) seguido por números y letras para diferenciar cepas diferentes.

3.3.1.1 Microcultivo

Se utilizó una placa Petri que contenía un cubre y porta objetos debidamente esterilizados. A continuación se cortó asépticamente dos bloques de 7-8 mm del medio de cultivo Agar Czapeck y se los colocó en la superficie del portaobjeto dentro de la placa Petri dejando distancia entre ellos. Posteriormente el hongo a identificar fue inoculado en las cuatro aristas laterales de ambos bloques de agar y fueron cubiertos con cubreobjetos. Por último se le añadió un algodón humedecido con agua estéril para darle el ambiente húmedo que ayude en su crecimiento. Este cultivo se incubó por 4 a 5 días a temperatura ambiente y en oscuridad. Pasado este tiempo se procedió a separar los cubreobjetos de los bloques de agar y fueron depositados en un portaobjetos limpio al que previamente se le ha colocado una gota de azul de Lactofenol para el montaje del hongo.

La identificación microscópica del género de cada cepa fúngica se realizó utilizando las claves de Barnett & Barry (1972) y Watanabe (2010).

3.4 Selección de cepas proteolíticas

Para la selección de cepas proteolíticas se utilizó un medio de agar de leche, constituido por una solución "A": 5 g/L Peptona; 3 g/L extracto de levadura; 1 g/L dextrosa y 15 g/L agar con un pH de 7,2; los cuales fueron esterilizados en autoclave a 121°C por 15 minutos. La solución B consta de: 100 mL/L de Leche UHT descremada estéril, la cual fue mezclada con la solución "A" estéril al alcanzar una temperatura de 45°C aproximadamente y se vertió en placas petri estériles, donde se inoculó por puntura central a los hongos anteriormente aislados. Se incubó a temperatura ambiente por 7 días y posteriormente se realizó la selección de hongos que liberaban la enzima a su medio externo y degradaban el sustrato.

3.4.1 Medición de Difusión de Enzima

Todos los hongos que mostraron degradación visible de la caseína fueron seleccionados como queratinolíticos. Se realizó la medición del diámetro (mm) del crecimiento fungal (Dcf) y el diámetro (mm) de los halos de degradación (Dhd) por separado y en tres direcciones diferentes (ver fig. 4), aquellos hongos que no presentaban degradación visible de caseína se les valorizó con un diámetro de cero milímetros.

La medición de difusión de la enzima se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\text{Difusión de la Enzima: } Dhd - Dcf$$

Por último se seleccionaron las cinco mejores cepas cuya difusión de enzima eran las más altas para evaluar su actividad proteolítica de la queratinasa.

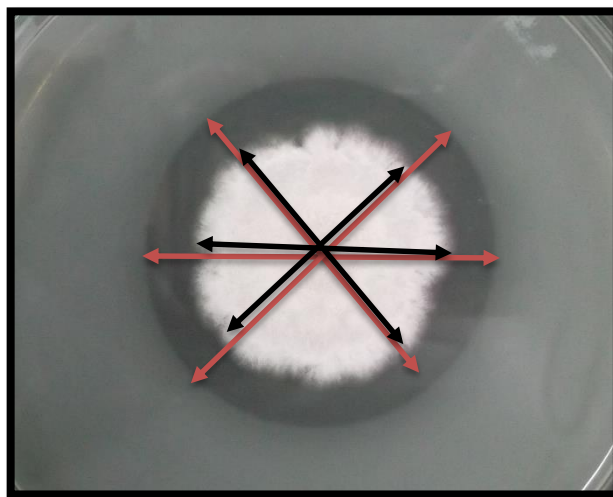


Fig. 4: Mediciones de la difusión de la enzima de un hongo en agar milk. Las flechas negras muestran las mediciones del crecimiento fungal (Dcf), mientras que las flechas en rojo muestra las mediciones realizadas del halo de degradación de la caseína (Dhd)

3.5 Evaluación de la actividad proteolítica de la queratinasa producida por hongos.

Cada cepa seleccionada fue sembrada y cultivada en Agar Czapeck por 7 días a temperatura ambiente, pasado este tiempo se cosechó las esporas producidas

por el hongo utilizando 10 mL de una solución de Tween 80 al 0.01 %. Posteriormente se realizó el conteo de esporas en la cámara de Neubauer para obtener una concentración uniforme de 10^6 esporas en 100 μ L del inóculo a utilizar.

Para evaluar la producción de la enzima queratinasa fúngica se empleó erlenmeyers conteniendo 20 mL del medio mínimo Czapeck sin glucosa esterilizado a 121°C por 30 minutos, constituido por NaNO_3 (2 g/L), KH_2PO_4 (1 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5 g/L), KCL (0.5 g/L) y FeSO_4 (0.01 g/L) a pH 7.0, cuya única fuente de carbono fue el pelo de bovino al 1% (0.2 g por cada erlenmeyer) esterilizado en autoclave hasta 3 veces. Se inoculó el medio con 100 μ L de la solución de esporas anteriormente realizada (ver fig. 5), incubándolo a temperatura ambiente (27°C) por 8 días en agitación constante a 160 rpm en un agitador orbital marca Gemmy. A las muestras de cultivo de los días 2, 4, 6 y 8 días se les realizó la medición de pH y el conteo de esporas de manera directa, así como también se cuantificó la degradación visible del material queratinoso.

3.5.1 Medición de pH y conteo de esporas:

Se procedió a la medición de pH utilizando tiras de indicador de pH de marca Whatman ® Panpeha™ con rango de 0 a 14 y con una sensibilidad de 0.5 unidades de pH, para tener una referencia de la variación del mismo a través del tiempo.

A su vez se efectuó el conteo de esporas utilizando una cámara de Neubauer con la ayuda de un microscopio óptico.

3.5.2 Cuantificación de la degradación de material queratinoso

Se pesó el pelo bovino antes de agregarlo al medio Czapeck, luego de la obtención del extracto enzimático, se procedió a la separación del material queratinoso a los 2, 4, 6 y 8 días. Se colocó en una estufa para eliminar la humedad y posteriormente se realizó el pesaje en seco en una balanza analítica.

Finalmente se realizó la medición de la cantidad de proteínas totales y la actividad enzimática de cada cultivo, por lo que se tomaron muestras de 12 mL de cada cultivo a los 2, 4, 6 y 8 días con cuatro repeticiones cada una; además se incluyó 1 control negativo o blanco el cual no fue inoculado con la cepa fúngica. Cada cultivo se centrifugó a 3000 rpm por 30 minutos, se extrajo el sobrenadante y se mantuvo bajo refrigeración hasta el momento de su utilización. A este sobrenadante se le denominó extracto enzimático (Cavello *et al.*, 2012).

Fig. 5: Sistema de inducción de la enzima queratinasa por las cepas fúngicas seleccionada



3.5.3 Medición de la producción de Proteínas Totales:

Se realizó la medición de proteínas totales utilizando el extracto enzimático. Se hizo una medición a 280 nm y 260 nm en un espectrofotómetro de marca SHIMADZU UV-1700 Pharmaspec. Los resultados fueron reemplazados en la siguiente fórmula:

$$\text{Proteínas totales (mg/mL)} = [1.55 (A_{280}) - 0.76 (A_{260})]$$

3.5.4 Cuantificación de la Actividad enzimática de la queratinasa

La cuantificación de la actividad enzimática de la queratinasa se efectuó en las instalaciones del Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular (LBBM) de la UNFV, utilizándose la técnica de la azocaseína (Liggieri *et al.*, 2004) modificada, donde a 250 μ L de una solución de azocaseína al 0.5 % p/v en Buffer Tris-HCl (BT) 0.1 M-pH 9.0 se le agregó 50 μ L del extracto enzimático. Luego de 60 minutos de incubación en baño termostático a 37 °C, la mezcla de reacción se detuvo por el

agregado de 500 μL de ácido tricloroacético (TCA, 10 % p/v). Para favorecer la precipitación del sustrato no hidrolizado se dejó reposar por 15 minutos y posteriormente se centrifugó por 15 minutos a 5000 g. Finalmente, 500 μL del sobrenadante se mezcló con 500 μL de una solución de NaOH 1N y se registró la liberación del grupo AZO a 440 nm, utilizando su coeficiente de extinción $e = 98\text{M/cm}$ (Sigma 1999). En todos los casos se realizó un blanco del extracto enzimático al que se le agregó TCA antes del agregado de la enzima. La fórmula utilizada para determinar la actividad proteolítica o enzimática de la queratinasa se detalla a continuación:

Ecuación 1:

$$\text{Concentración de producto generado en reacción } (\mu\text{M}) = \frac{\text{Absorbancia a } 440\text{nm/min}}{\text{Longitud de la cubeta (cm)} * \text{Coeficiente de extinción (AZO)}}$$

Ecuación 2:

$$\text{Actividad enzimática } \left(\frac{U}{\text{mL}}\right) = \frac{\text{Concentración de producto generado en reacción } (\mu\text{M}) * \text{Volumen de reacción (mL)}}{\text{Tiempo de reacción (minutos)}}$$

Se define como Unidad/mL a la cantidad de enzima que libera 1 μmol de grupo AZO por minuto a pH 9.0 y a 37°C. Para expresar la actividad específica se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad específica } (U/\text{mg}) = \frac{\text{Actividad enzimática de la queratinasa (U/mL)}}{\text{Proteínas totales (mg/mL)}}$$

3.6 Análisis estadístico de los datos

Los datos fueron recolectados utilizando una hoja de Microsoft Excel. El análisis estadístico se realizó con el STATA 13 (StataCorp. 2013. Stata Statistical Software:

Release 13. College Station, TX: StataCorp LP). Las variables dependientes fueron el porcentaje de esporulación, el porcentaje de degradación del material queratinosos, la concentración de proteínas totales, la actividad enzimática y la actividad específica de la enzima. Mientras que la Cepa fúngica (especie), tiempo de incubación (en días) fueron las variables independientes. Para diferenciar en la concentración de proteínas totales, actividad enzimática y en la actividad en cada una de las cepas a lo largo del periodo de incubación se usó la prueba no paramétrica de Friedman para el análisis multivariado de medidas repetidas, y se utilizó la prueba de signo-rango de Wilcoxon como test "Post Hoc" para examinar las diferencias significativas existentes entre las comparaciones.

Para analizar diferencias en la concentración de proteínas totales, actividad enzimática y en la actividad entre una de las cepas a lo largo de los distintos periodos de incubación se usó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para el análisis multivariado de observaciones independientes, y se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney como test "Post Hoc" para examinar las diferencias significativas entre las comparaciones de pares de cepas. Todos los valores p reportados son de dos colas y se consideró estadísticamente significativo si es <0.05 . Para las Pruebas Post Hoc se realizó una corrección de Bonferroni a los valores p en base al número de comparaciones realizadas.

IV. RESULTADOS

4.1 Condiciones de colecta, pH y Temperatura del suelo.

Las condiciones del día de colecta fueron de 28.5 °C con una Humedad Relativa de 54%. Los parámetros de pH y temperatura de las 10 muestras de suelo que se obtuvieron presentaban un rango de pH entre 9.43 a 9.67 con un promedio de 9.49 y una temperatura de 27.5°C.

4.2 Aislamiento de hongos Queratinofílicos

Se aislaron 75 cepas de hongos filamentosos queratinofílicos, identificándose 9 géneros diferentes: *Absidia sp.*, *Acremonium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Circinella sp.*, *Fusarium sp.*, *Paecilomyces sp.*, *Penicillium sp.*, *Scedosporium sp.* y *Scopulariopsis sp.*; pertenecientes a cuatro familias: Microascaceae, Trichocomaceae, Nectriaceae y Mucoraceae, referentes a dos phylum distintos: Ascomycota y Zygomycota. Los hongos del género *Aspergillus*, fueron subdivididos en 4 especies, de acuerdo a las características macroscópicas y microscópicas que difieren entre ellos. Así mismo *Acremonium spp.* en 2, *Fusarium spp.* en 5 y *Scopulariopsis spp.* con 3 especies diferentes. Mientras que para *Absidia sp.*, *Circinella sp.*, *Paecilomyces sp.*, *Penicillium sp.* y *Scedosporium sp.* se encontraron características iguales entre organismos del mismo género. (Anexo 1)

Por otro lado el género predominante fue *Scopulariopsis* (40%), seguidos por los géneros *Fusarium* (23%), *Aspergillus* (17%), *Scedosporium* (8%), *Paecilomyces* (4%), *Acremonium* (3%), *Circinella* (3%), *Absidia* (1%) y *Penicillium* (1%).

4.2.1 Características macroscópicas y microscópicas de los géneros aislados

Los nueve géneros aislados fueron detallados de acuerdo a las características macroscópicas y microscópicas observadas en Agar Czapeck glucosado; describiendo el color de la colonia, reverso de la placa, textura, elevación, tipo de bordes y velocidad de crecimiento de la colonia macroscópica; también se describió el tipo de hifas y estructura reproductiva de cada subgrupo aislado como parte de las características microscópicas.

4.2.1.1 *Absidia* sp:

Se aisló una cepa identificada dentro del género *Absidia*, cuyas características macroscópicas muestran el desarrollo de una colonia translúcida con reverso transparente, de textura vellosa que abarca toda la placa sin elevación, con bordes irregulares y de un crecimiento rápido dentro del medio sólido Czapeck. Microscópicamente se observó el desarrollo de Hifas hialinas cenocíticas con estructuras reproductivas que inician en un esporangióforo hialino recto de paredes lisas, con columelas finales que se encuentran dentro del esporangio globoso y que presentan un apófisis que se colapsa desde el ápice tomando forma de embudo. Internamente se encuentran las esporangiosporas de forma elipsoidales lisas con coloración amarilla (Cepa M-7(2)a).

4.2.1.2 *Acremonium* sp.

Se aislaron 2 cepas identificadas en el género *Acremonium*, divididas en dos especies.

4.2.1.2.1 *Acremonium* sp. 1

Las características macroscópicas muestran el desarrollo de una colonia transparente que crece principalmente dentro del agar de manera ramificada, no presenta mucha elevación y sus bordes son irregulares, de crecimiento radial. Microscópicamente se observó el desarrollo de hifas hialinas septadas con estructuras reproductivas que inician en un conidióforo largo que se encuentra ramificado por fialides rectas, de paredes lisas y hialinas en cuyo ápice se encuentran agrupaciones o masas mucosas de microconidios elipsoidales o cilíndricos, hialinos del tipo amerospora (sin presencia de septos por lo que es unicelular) (Cepa M-9(4)b).

4.2.1.2.2 *Acremonium* sp. 2

Las características macroscópicas muestran el desarrollo de una colonia blanca con reverso de color blanco a crema sin estrías, de textura vellosa algodonosa con elevación en los bordes, su crecimiento es rápido y

radial. Microscópicamente se observó el desarrollo de hifas hialinas septadas con estructuras reproductivas que inician en un conidióforo largo que se encuentra ramificado por fialides rectas, de paredes lisas y hialinas en cuyo ápice se encuentran agrupaciones o masas mucosas de microconidios elipsoidales o cilíndricos, hialinos del tipo amerospora (Cepa M-9(1)a).

4.2.1.3 *Aspergillus sp.*

Se aislaron 13 cepas identificadas con el género *Aspergillus*, divididas en cuatro especies diferentes.

4.2.1.3.1 *Aspergillus sp. 1*

Las características macroscópicas muestran el desarrollo de colonias amarillas que con el tiempo se tornan verdes oscuras o pardas en los bordes, presentan reverso de color crema amarillento cuyo centro es más oscuro con estrías pequeñas, de textura pulverulenta con elevación, presentan bordes irregulares y su crecimiento es regular a rápido. Microscópicamente se observó el desarrollo de hifas hialinas septadas con estructuras reproductivas que inician en un conidióforo largo, recto, de paredes lisas y hialinas, poseen vesículas globosas al final del conidióforo las cuales se encuentran radiadas por fialides cortas que se unen a las cadenas de conidios unicelulares pequeños, globosos seriados hialinos o de una coloración amarilla (Cepas M-1(2)a, M-1(2)b, M-5(3)ab, M-10(4)a).

4.2.1.3.2 *Aspergillus sp. 2:*

Las características macroscópicas muestran el desarrollo de colonias blancas con centro crema o amarillo, presentan reverso de color blanco a crema sin estrías, de textura aterciopelada con poca elevación, presentan bordes irregulares y ondulados y su crecimiento es regular a rápido. Microscópicamente se observó el desarrollo de hifas hialinas septadas con estructuras reproductivas que inician en un conidióforo largo, recto, de paredes lisas y hialinas, poseen vesículas globosas al final del conidióforo

las cuales se encuentran radiadas por fialides medianas que se unen a las cadenas de conidios unicelulares pequeños, globosos seriados y hialinos (Cepas M-1(4)a, M-9(5)a, M-7(5)a).

4.2.1.3.3 Aspergillus sp. 3:

Las características macroscópicas muestran el desarrollo de colonias cremas con centro café que con el tiempo se tornan pardas o marrones claros, presentan reverso de color blanco con centro crema o café sin estrías, de textura pulverulenta sin elevación, presentan bordes irregulares estrellados y su crecimiento es regular. Microscópicamente se observó el desarrollo de hifas hialinas septadas con estructuras reproductivas que inician en un conidióforo largo, recto, de paredes lisas y hialinas o con una coloración oscura tenue, poseen vesículas en forma de clava encontradas al final del conidióforo las cuales se encuentran semi cubiertas por fialides medianas que se unen a las cadenas de conidios de manera columnar, estas esporas son unicelulares medianas, globosas seriadas y hialinas o también pueden presentar coloración amarilla o café (Cepas M-2(1)c, M-2(4)a, M-3(5)a, M-5(2)a, M-5(4)b).

4.2.1.3.4 Aspergillus sp. 4:

Las características macroscópicas muestran el desarrollo de colonias blancas con centro amarillo, presentan reverso de crema sin estrías, de textura pulverulenta con poca elevación, presentan bordes irregulares y su crecimiento es lento. Microscópicamente se observó el desarrollo de hifas hialinas septadas con estructuras reproductivas que inician en un conidióforo mediano, recto, de paredes lisas y hialinas o con una coloración tenue, poseen vesículas pequeñas globosas al final del conidióforo las cuales se encuentran semi cubiertas por fialides pequeñas ligeramente separadas entre ellas que se unen a largas cadenas ondulantes de conidios unicelulares, medianos, subglobosos seriados y hialinos o con coloración amarilla o café. Presentan cleistotecios en su interior se observan gran número de ascas y ascosporas (Cepa M-3(1)ba).

4.2.1.4 *Circinella* sp.

Se aisló 2 cepas identificadas con el género *Circinella*, cuyas características macroscópicas muestran el desarrollo de una colonia blanca con tonalidades débiles de marrones cuyo reverso es de color crema sin estrías, las cepas presentan textura algodonosa que abarca toda la placa con mucha elevación, bordes irregulares y de un crecimiento rápido. Microscópicamente se observó el desarrollo de Hifas hialinas cenocíticas con estructuras reproductivas que inician en un esporangióforo hialino curvo de paredes lisas, con columelas finales que se encuentran dentro del esporangio globoso. Internamente se encuentran las esporangiosporas de forma elipsoidales lisas con coloración amarilla (Cepas M-9(2)a, M-10(2)a).

4.2.1.5 *Fusarium* sp.

Se aislaron 17 cepas identificadas con el género *Fusarium*, divididas en cinco especies diferentes.

4.2.1.5.1 *Fusarium* sp. 1

Las características macroscópicas de este subgrupo muestran el desarrollo de colonias blancas con centro púrpura, presentan reverso de color crema cuyo centro es púrpura azulado o verdoso sin estrías, de textura vellosa algodonosa con elevación, presentan bordes de crecimiento rápido y radial. Microscópicamente se observó el desarrollo de hifas hialinas septadas con estructuras reproductivas que inician en un conidióforo con fialides cortas, rectas, de paredes lisas y hialinas que forman agrupaciones de conidios en sus ápices, pudiendo presentarse microconidios ovales, hialinos y abundantes o con forma de búmeran del tipo amerospora (sin presencia de septos por lo que es unicelular) o didinospora (con un septo que separa en dos células), también pueden presentar macroconidios ovales o conforma de búmeran con dos septos internos (fragmosporas). No presentan clamidosporas (Cepas M-8(3)a, M-8(7)a, M-10(6)a).

4.2.1.5.2 Fusarium sp. 2

Las características macroscópicas de este subgrupo muestran el desarrollo de colonias blancas puras, con reverso de color blanco sin estrías, de textura vellosa algodonosa con mucha elevación, presentan bordes irregulares de crecimiento rápido y radial. Microscópicamente se observó el desarrollo de hifas hialinas septadas con estructuras reproductivas que se inician en un conidióforo con fialides cortas, rectas, de paredes lisas y hialinas que forman agrupaciones de microconidios en sus ápices presentes en poca cantidad, de tipo ovales, hialinos o con forma de búmeran que pueden ser amerosporados (sin presencia de septos - unicelular) o didinosporados (con un septo que separa en dos células), no se observa presencia de macroconidios, sin embargo presentan un gran número clamidosporas terminales e intercalares de forma globosa con paredes lisas o rugosas, que pueden ser simples, en pares o en más números (Cepa M-8(1)a).

4.2.1.5.3 Fusarium sp. 3

Las características macroscópicas de este subgrupo muestra el desarrollo de colonias blancas con centro morado que puede variar en tonalidades, presentan reverso de color crema cuyo centro es púrpura azulado o verdoso sin estrías, de textura vellosa algodonosa con elevación, presentan bordes de crecimiento rápido y radial. Microscópicamente se observó el desarrollo de hifas hialinas septadas con estructuras reproductivas que se inician en un conidióforo con fialides cortas, rectas, de paredes lisas y hialinas que forman agrupaciones de conidios en sus ápices, pudiendo presentarse microconidios con forma de búmeran largos, hialinos y abundantes del tipo didinospóra en su mayoría, sin embargo también pueden presentarse amerosporas, los macroconidios son escasos y tienen forma de búmeran con dos septos internos (fragmosporas). No presentan clamidosporas (Cepas M-1(3)a, M-10(3)a, M-3(1)bb, M-5(5)a, M-10(4)b, M-10(4)c, M-10(4)d, M-10(5)a).

4.2.1.5.4 Fusarium sp. 4

Las características macroscópicas de este subgrupo muestran el desarrollo de colonias blancas con centro púrpura, presentan reverso de color crema cuyo centro es púrpura azulado o verdoso sin estrías y produce pigmento de color amarillo, de textura vellosa algodonosa con elevación, presentan bordes de crecimiento rápido y radial. Microscópicamente se observó el desarrollo de hifas hialinas septadas con estructuras reproductivas que se inician en un conidióforo con fialides cortas, rectas, de paredes lisas y hialinas que forman agrupaciones de conidios en sus ápices, pudiendo presentarse microconidios ovales, hialinos y abundantes o con forma de búmeran del tipo amerospora o didinospora, también pueden presentar macroconidios ovales o conforma de búmeran con dos septos internos (fragmosporas). Puede presentar clamidosporas en algunos casos. (Cepas M-3(6)a, M-5(1)a, M-6(5)a, M-6(6)a).

4.2.1.5.5 Fusarium sp. 5

Las características macroscópicas de este subgrupo muestran el desarrollo de colonias blancas con centro púrpura, presentan reverso color blanco a crema sin estrías, de textura vellosa algodonosa con elevación, presentan bordes de crecimiento rápido y radial. Microscópicamente se observó el desarrollo de hifas hialinas septadas con estructuras reproductivas que se inician en un conidióforo largo ramificado con fialides cortas, rectas, de paredes lisas y hialinas que forman agrupaciones de conidios en sus ápices, pudiendo presentarse microconidios ovales, hialinos y abundantes o con forma de búmeran del tipo amerospora o didinospora, también pueden presentar macroconidios ovales o conforma de búmeran con dos septos internos (fragmosporas). Puede presentar clamidosporas en algunos casos (Cepa M-10 (1)a).

4.2.1.6 *Paecilomyces sp.*

Se aislaron tres cepas identificadas con el género *Paecilomyces* cuyas características macroscópicas muestran el desarrollo de colonias blancas con centro púrpura pálido, presentan reverso de color crema a rosa sin estrías, de textura vellosa algodonosa con poca elevación, presentan bordes de crecimiento rápido y radial. Microscópicamente se observó el desarrollo de hifas hialinas septadas con estructuras reproductivas que se inician en un conidióforo corto ramificado con fialides cortas que se adelgazan en el ápice, rectas, de paredes lisas y hialinas que forman cadenas de conidios en sus ápices del tipo amerosporas con forma de limón, hialinos y abundantes. (Cepas M-8(3)b, M-4(1)ba, M-4(3)a).

4.2.1.7 *Penicillium sp.*

Se aisló una cepa identificada en el género *Penicillium*, su características macroscópicas muestran el desarrollo de una colonia con desarrollo hifal de color blanco que cuando esporula se torna de color verde oscuro o verde oliva, presentan reverso de color mostaza sin estrías, de textura pulverulenta con poca elevación, presenta borde circular y su crecimiento es lento a regular. Microscópicamente se observó el desarrollo de hifas hialinas septadas con estructuras reproductivas que inician en un conidióforo largo, recto, de paredes lisas y hialinas, poseen métulas ensanchadas con fialides en grupos de 3 a 6 de forma cilíndrica con el ápice inflado de donde se desarrollan cadenas cortas o largas de pequeños conidios unicelulares, globosos seriados y hialinos (Cepas M-8(6)b).

4.2.1.8 *Scedosporium sp. (= Sinonimia *Graphium sp.*)*

Se aislaron 6 cepas identificadas con el género *Scedosporium*, cuyas características macroscópicas muestran el desarrollo de una colonia blanca con centro crema que con el tiempo presentan tonalidades de grises claros, posee reverso de color crema con centro color café sin estrías, de textura algodonosa con elevación convexa, presenta borde ondulado y su crecimiento es regular a rápido. Microscópicamente se observó el desarrollo de hifas hialinas septadas con dos tipos de estructuras reproductivas asexuales, la primera se inicia en un conidióforo

pequeño, recto y solitario que puede llegar a ramificarse, de paredes lisas y hialinas, con células conidiogénicas laterales de donde se desarrollan aneloconidios hialinos, ovoidales y solitarios. La segunda estructura reproductiva asexual inicia en conidióforos largos, rectos y hialinos o con un tenue color oliva, que se unen entre ellos cementándose y formando sinematas (Coremios) que terminan en aneloconidios hialinos, de forma obovoidal o cilíndricos que se encuentran acumulados (Cepas M-2(1)a, M-2(2)a, M-2(3)b, M-2(4)b, M-2(4)d, M-6(2)a).

4.2.1.9 *Scopulariopsis* sp.

Se aislaron 30 cepas identificadas con el género *Scopulariopsis*, divididas en tres especies.

4.2.1.9.1 *Scopulariopsis* sp. 1

Las características macroscópicas muestran el desarrollo de colonias blancas, presentan reverso de coloración interna crema o amarilla, con pequeñas estrías, de textura polvorosa o pulverulenta con poca elevación, presentan bordes irregulares y su crecimiento es regular a rápido. Microscópicamente se observó el desarrollo de hifas hialinas septadas con estructuras reproductivas que inician en un conidióforo corto, recto y ramificado de paredes lisas y hialinas con tenues anillos terminales cerca a los conidios los cuales no presentan coloración (hialinos) y cuya forma es subesférica con base trunca (piriformes), verrugosos que forman cadenas cortas (Cepas M-1(1)a, M-2(2)b, M-2(3)a, M-2(4)c, M-3(2)b, M-3(3)a, M-3(4)a, M-3(5)b, M-4(1)a, M-5(3)b, M-6(1)b, M-6(4)a, M-7(1)a, M-7(3)a, M-7(4)a, M-8(2)a, M-8(4)a, M-8(5)a, M-8(6)a, M-9(1)c, M-9(2)b, M-9(3)a, M-9(5)b, M-10(1)b, M-10(3)b.).

4.2.1.9.2 *Scopulariopsis* sp. 2

Las características macroscópicas muestran el desarrollo de colonias blancas, presentan reverso de coloración interna crema sin estrías, de textura polvorosa o pulverulenta con poca elevación, presentan bordes

irregulares y su crecimiento es regular a rápido. Microscópicamente se observó el desarrollo de hifas hialinas septadas con estructuras reproductivas que inician en un conidióforo mediano, recto y ramificado de paredes lisas y hialinas con tenues anillos terminales cerca a los conidios, los cuales no presentan coloración (hialinos) y cuya forma es subesférica con base trunca (piriformes), no verrugosos que forman cadenas largas (Cepas M-4(2)a, M-4(4)a).

4.2.1.9.3 Scopulariopsis sp. 3

Las características macroscópicas muestran el desarrollo de colonias cafés de tonalidades claras que con el paso de tiempo se vuelven más oscuras o grises, presentan reverso de coloración café oscuro sin estrías, de textura aterciopelada con poca elevación, presentan bordes irregulares y su crecimiento es lento. Microscópicamente se observó el desarrollo de hifas hialinas septadas con estructuras reproductivas que inician en un conidióforo corto, recto y ramificado de paredes lisas y hialinas con tenues anillos terminales cerca a los conidios, los cuales presentan una coloración oscura parecida a un café claro o también pueden presentar conidios hialinos, su forma es subesférica con base trunca (piriformes), no verrugosos que forman cadenas cortas (Cepas M-3(1)a, M-6(3)b, M-8(5)b).

4.3 Selección de cepas proteolíticas

Se seleccionó cinco cepas que presentaban la mayor difusión de la enzima proteolítica en el medio de Agar leche (fig. 6). Las cepas seleccionadas fueron M-5(3)ab (*Aspergillus* sp. 1) con 16.3 mm de difusión de su enzima en el medio sólido, M-1(4)a (*Aspergillus* sp. 2) con 16 mm de difusión, M-4(2)a (*Scopulariopsis* sp. 2) con 14.7 mm de difusión de la enzima, M-4(4)a (*Scopulariopsis* sp. 2) con 12 mm de difusión y M-8(6)b (*Penicillium* sp.) con 11.7 mm (Ver barras de color rojo en fig. 7). No se seleccionó la cepa M-10(4)a, debido a que era muy parecida a la cepa M-5(3)ab.

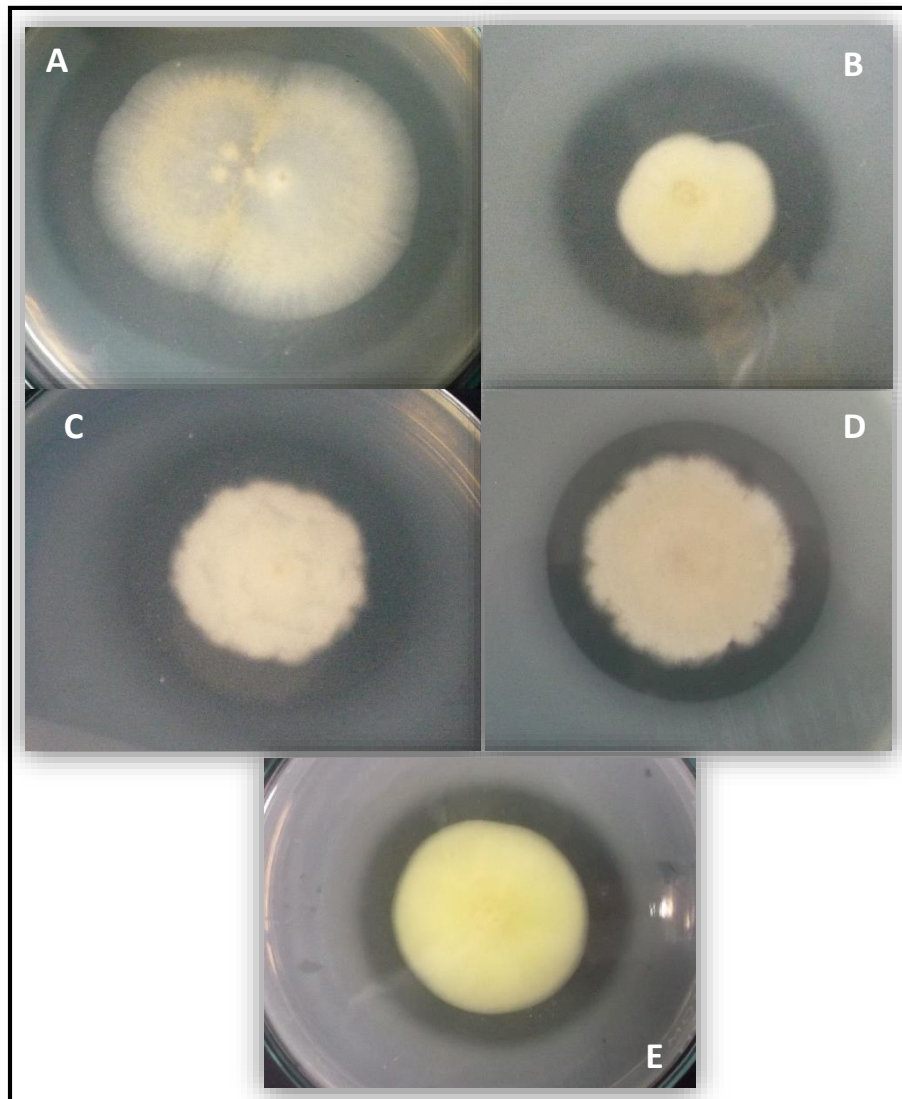


Fig. 6: Cepas fúngicas con mayor difusión de enzima proteolítica en Agar Leche, se muestra el reverso de cada placa junto al halo de degradación producido. A: Cepa M-5(3)ab (*Aspergillus* sp. 1), B: Cepa M-1(4)a (*Aspergillus* sp. 2), C: Cepa M-4(2)a (*Scopulariopsis* sp. 2), D: M-4(4)a (*Scopulariopsis* sp. 2), E: Cepa M-8(6)b (*Penicillium* sp.)

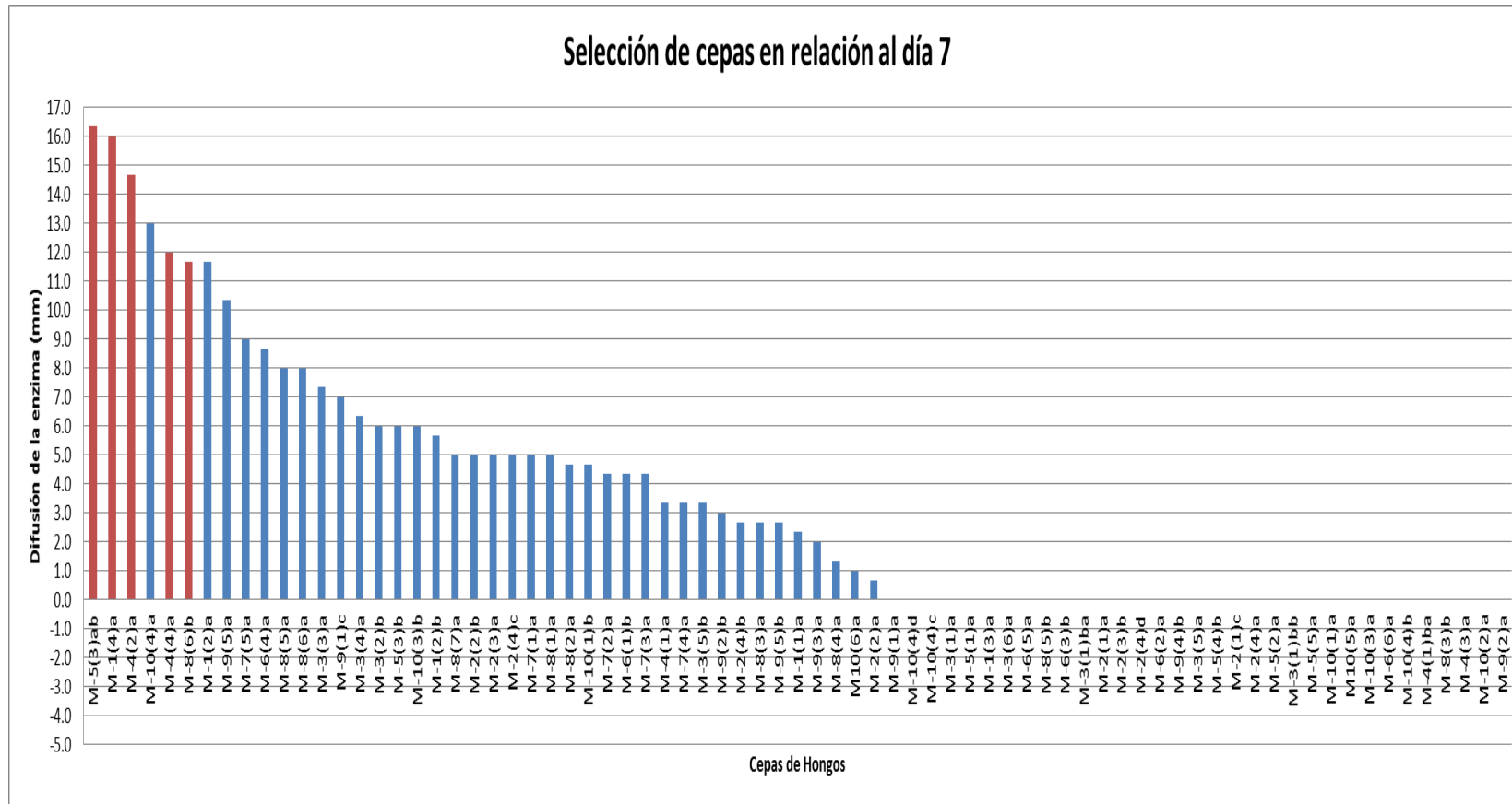


Fig. 7: Presencia y medición de la difusión de enzimas proteolíticas de las cepas fúngicas aisladas a partir de suelos de granja de bovinos al 7mo día de incubación. Las cepas seleccionadas son aquellas que presentan barras de color rojo.

4.4 Evaluación de la actividad proteolítica de la queratinasa

4.4.1 Medición de pH y conteo de esporas

Las cinco cepas fúngicas seleccionadas presentaron una alcalinización del pH en el medio de cultivo acorde con el paso del tiempo. Al término de los 8 días, la cepa M-4(2)a incrementó su pH a 9 con una mayor rapidez que las otras cepas, seguida por las cepas M-5(3)a y M-4(4)a que llegaron a un pH de 8.5. Así mismo, la cepa M-8(6)b incrementó su pH hasta un máximo de 8 en el octavo día (Ver fig. 8)

Por último la cepa M-1(4)a no presentó la misma alcalinización en el medio de cultivo que las anteriores cepas a pesar del tiempo incubado.

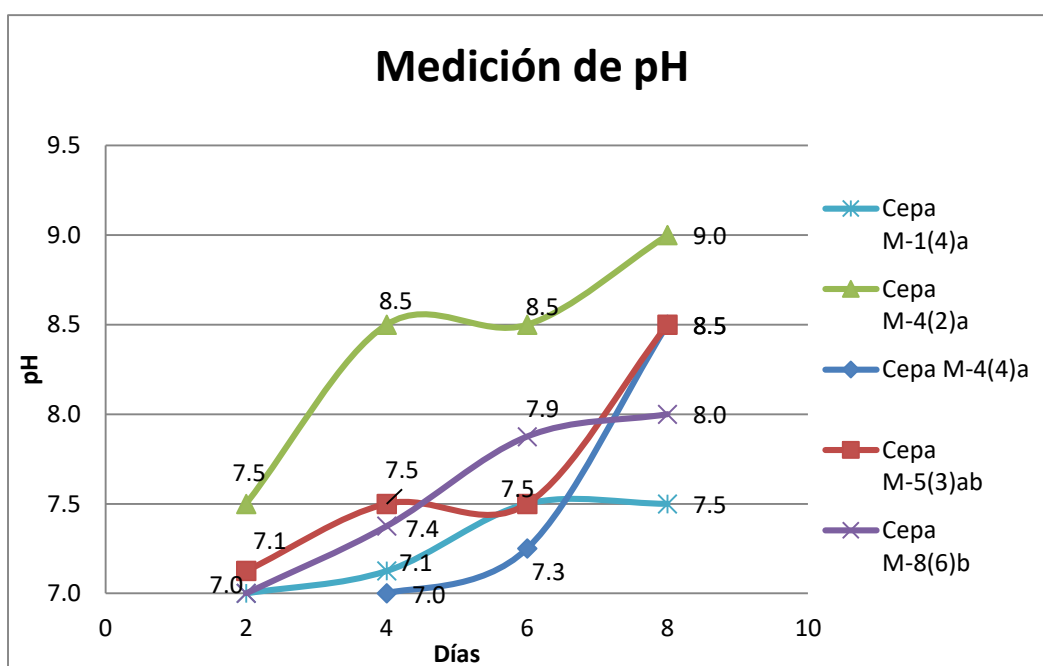


Fig. 8: Medición de pH en el medio de cultivo de las 5 cepas seleccionadas por un período de 8 días.

El conteo de esporas realizado a cada cepa en períodos consecutivos de 2 días, mostró como primera instancia que la esporulación de cada cepa fúngica es

mínima en los primeros días de incubación, posteriormente se observa el crecimiento gradual esporogénico de la cepa M-4(4)a a partir del día 4. Las demás cepas incrementan su esporulación a partir del día 6. Teniendo a la cepa M-4(2)a como la poseedora de la mayor esporulación al 8vo día (Ver fig. 9).

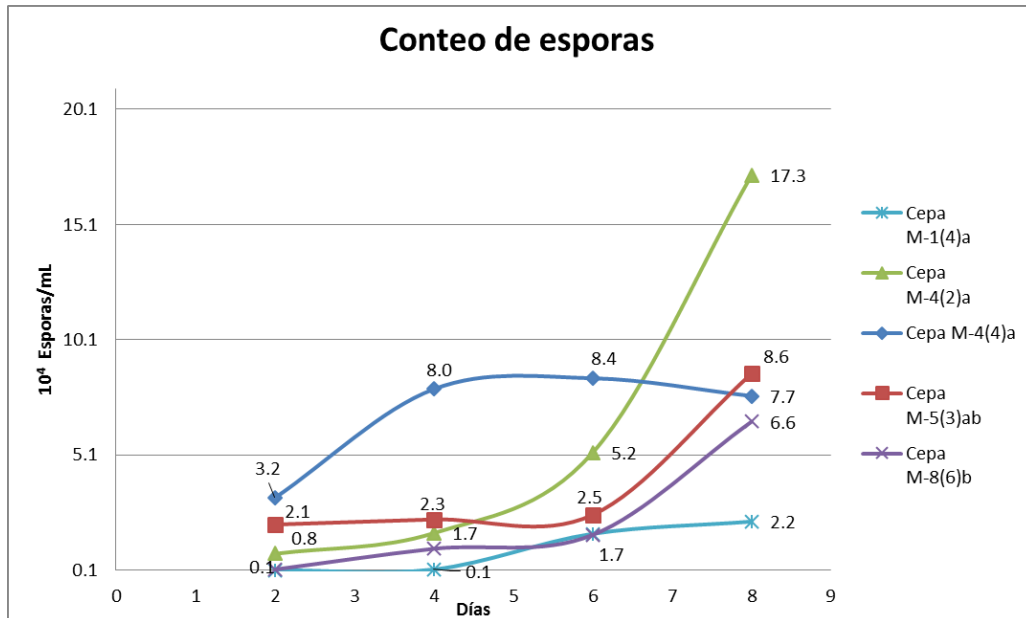


Fig. 9: Conteo de esporas durante 8 días de experimentación.

4.4.2 Cuantificación de la degradación de material queratinoso

Las cinco cepas estudiadas han logrado degradar de manera visible el material queratinoso incorporado como única fuente de carbono. En la Fig. 10 se observa que las cepas M-4(4)a y M-4(2)a son las opciones más atractivas para la degradación de queratina, teniendo un 72% y 85% de degradación respectivamente. Las 3 cepas restantes no muestran una degradación de queratina de manera significativa.

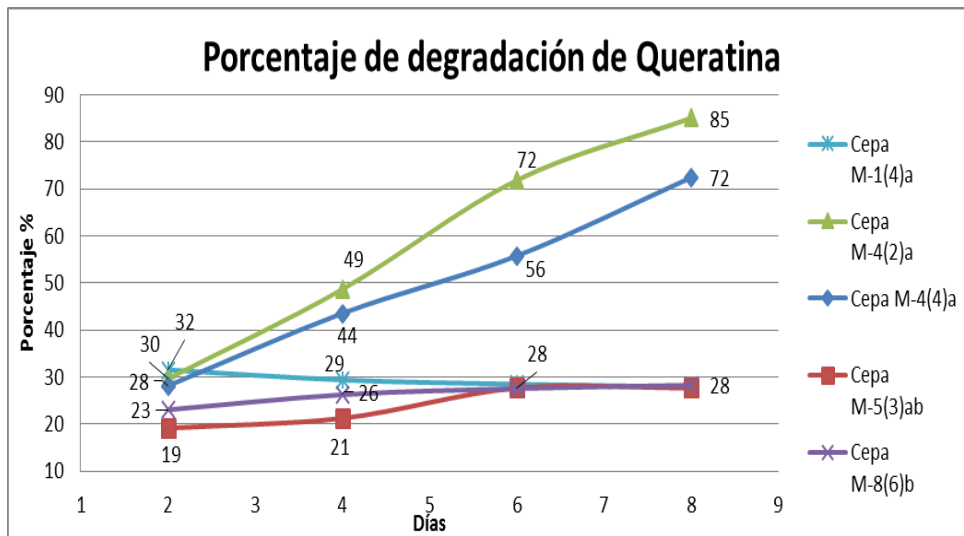


Fig. 10: Porcentajes de degradación de queratina a partir del pesaje de pelo de bovino restante de cada experimento en períodos de 2 días, 4 días, 6 días y 8 días utilizando 5 cepas fúngicas seleccionadas.

4.4.3 Medición de la producción de Proteínas Totales

Las cepas fúngicas muestran una producción de proteínas totales que incrementan de manera gradual con el paso de los días, los resultados fueron determinados en mg/mL. El test de Kruskal wallis mostró diferencias significativas en la producción de proteínas totales entre las distintas cepas comparadas en cada uno de los 4 días ($\chi^2_{(4)}= 14.386$, $p=0.0062$). La cepa con mayor producción de proteínas totales a los 8 días fue la cepa M-4(4)a con un total de 5.1 mg/mL, la que le sigue es la cepa M-4(2)a con 4.2 mg/mL. Las demás cepas presentan valores iguales o menores a 2 mg/mL a lo largo de todo el proceso de incubación (Ver fig. 11).

Se realizó el test de Friedman, mostrando que las cepas M-4(2)a, M-4(4)a, M-5(3)ab, M-8(6)b tienen diferencias significativas en la producción de proteínas totales a través de los días, $\chi^2_{(3)}=12$, $p=0.0074$. La prueba de signo-rango de Wilcoxon reporta un nivel de significancia de $p<0.0083$, existiendo diferencias significativas entre los días 2, 4, 6 y 8 ($Z=-1.826$, $p=0.0679$) y sus comparaciones.

La cepa M-1(4)a no presenta un nivel estadísticamente significativo para el test de Friedman en la comparación de la producción de proteínas totales a través de los días. (Anexo 2)

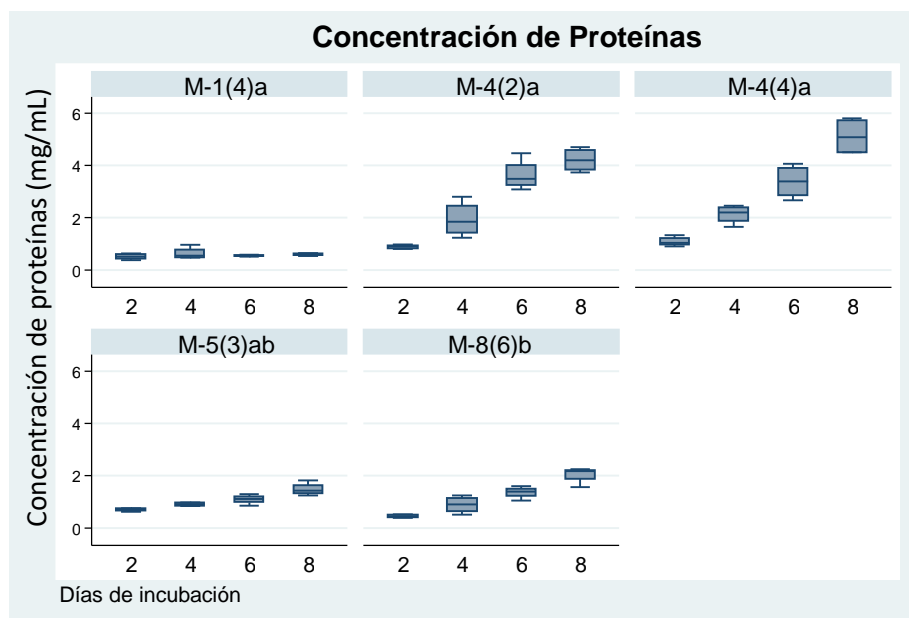


Fig. 11: Concentración de proteínas producidas en medio líquido a los 2, 4, 6 y 8 días por cinco cepas fúngicas.

4.5 Cuantificación de la Actividad Proteolítica de la queratinasa

Se cuantificó la actividad enzimática utilizando la metodología de la Azocaseína, los resultados se muestran en la Fig. 12, donde claramente se observa la capacidad de las cepas M-4(2)a y M-4(4)a para degradar la azocaseína en medio líquido. La cepa M-4(2)a generó 17,567 μM , 50,795 μM , 64,159 μM y 68,144 μM a los 2, 4, 6 y 8 días respectivamente. Mientras que la cepa M-4(4)a produjo 16,527 μM , 49,367 μM , 74,416 μM y 82,662 μM , a los 2, 4, 6 y 8 días respectivamente. Las demás cepas presentan una actividad enzimática que genera un producto menor a 23,000 μM durante los 8 días que duró el experimento.

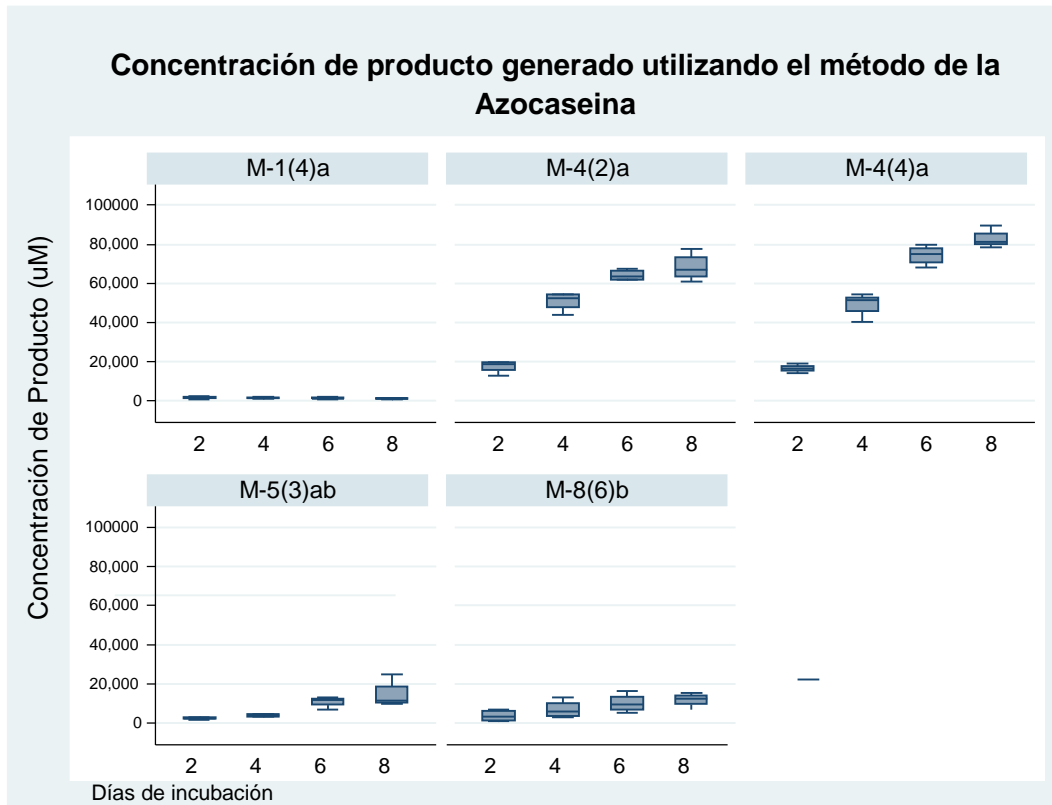


Fig. 12: Concentración de producto generado por enzimas de 5 cepas fúngicas utilizando el método de la Azocaseína a los 2, 4, 6 y 8 días.

Posteriormente, se obtuvo los resultados de las actividades enzimáticas de la queratinasa generada en medio líquido por cada cepa, donde se observa que la actividad enzimática está directamente relacionada a la generación de producto utilizando el método de la Azocaseína (Fig. 13). El test de Kruskal wallis mostró diferencias significativas en la producción de actividades enzimáticas entre las distintas cepas comparadas en cada uno de los 4 días ($\chi^2_{(4)} = 14.371$, $p = 0.0062$). Por lo que, nuevamente las cepas M-4(2)a y M-4(4)a cuentan con una actividad enzimática mayor que las tres cepas restantes. La cepa M-4(2)a generó 0.3 U/mL, 0.8 U/mL, 1 U/mL y 1.1 U/mL a los 2, 4, 6 y 8 días respectivamente. Mientras que la cepa M-4(4)a produjo 0.3 U/mL, 0.8 U/mL, 1.2 U/mL y 1.4 U/mL, a los 2, 4, 6 y 8 días respectivamente. Las demás cepas presentan una actividad enzimática menor a 0.3 U/mL durante los 8 días que duró el experimento.

Se realizó el test de Friedman, mostrando que la cepa M-4(2)a tiene diferencias significativas en su actividad enzimática a través de los días, $X^2_{(3)}=10.8$, $p=0.0129$. La prueba de signo-rango de Wilcoxon reporta un nivel de significancia de $p<0.008$, existiendo diferencias significativas entre los días 2, 4, 6 y 8 ($Z=-1.826$, $p=0.0679$) y sus comparaciones, sin embargo no existe diferencia significativa en la comparación de actividades enzimáticas producidas entre los días 6 y 8 ($Z= -0.73$, $p=0.4652$).

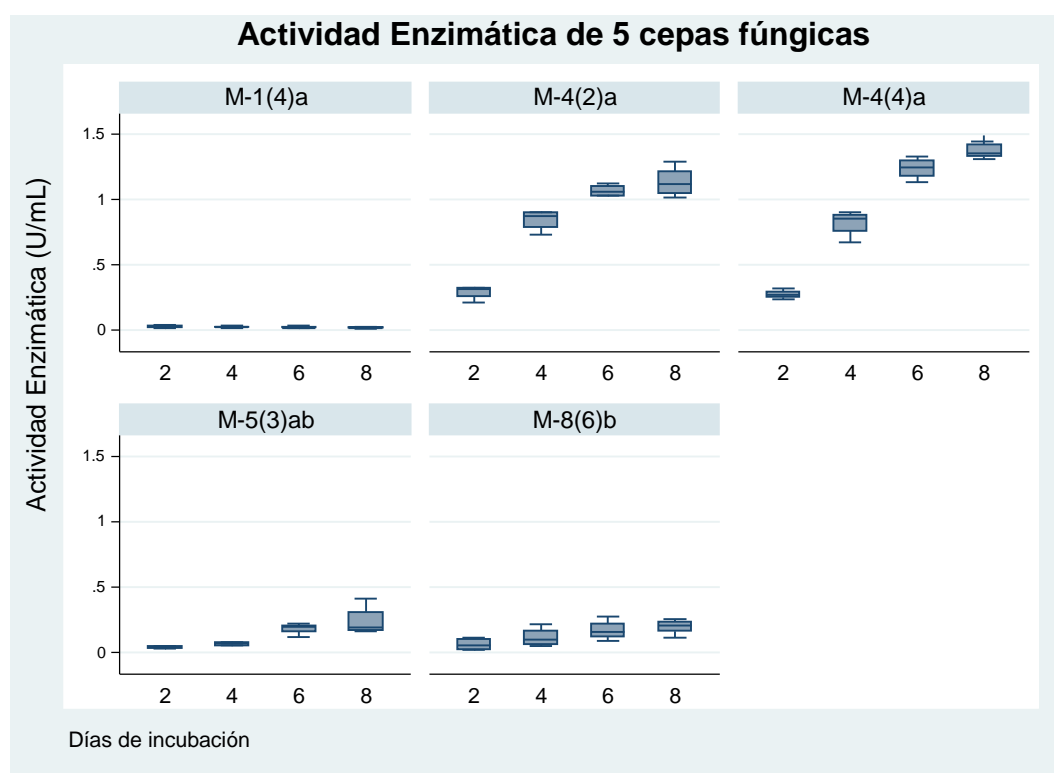


Fig. 13: Actividad enzimática generada por enzimas proteolíticas de 5 cepas fúngicas durante 2, 4, 6 y 8 días.

La cepa M-4(4)a también muestra diferencias significativas en el test de Friedman en su actividad enzimática a través de los días, $X^2_{(3)}=11.1$, $p=0.0112$. La prueba de signo-rango de Wilcoxon reporta un nivel de significancia de $p<0.0083$, existiendo diferencias significativas entre los días 2, 4, 6 y 8 ($Z=-1.826$, $p=0.0679$) y sus comparaciones, sin embargo no existe diferencia significativa en

la comparación de actividades enzimáticas producidas entre los días 6 y 8 ($Z = -0.715$, $p = 0.365$).

Las demás cepas no presentan un nivel estadísticamente significativo para el test de Friedman en la comparación de la actividad enzimática a través de los días. (Anexo 3)

Por otro lado, la actividad específica de la enzima queratinasa generada en medio líquido por cada cepa muestra lo siguiente (ver fig. 14), el test de Kruskal wallis mostró diferencias significativas en la actividad específica de la enzima entre las distintas cepas comparadas en cada uno de los 4 días ($\chi^2_{(4)} = 13.786$, $p = 0.008$). Las cepas M-4(2)a y M-4(4)a cuentan con una actividad específica mayor que las tres cepas restantes. La cepa M-4(2)a generó 1.1 mU/mg, 1.5 mU/mg, 1 mU/mg y 0.9 mU/mg a los 2, 4, 6 y 8 días respectivamente. Mientras que la cepa M-4(4)a produjo 0.9 mU/mg, 1.3 mU/mg, 1.3 mU/mg y 0.9 mU/mL, a los 2, 4, 6 y 8 días respectivamente. Las demás cepas presentan una actividad específica menor a 0.5 mU/mg durante los 8 días que duró el experimento.

Se realizó el test de Friedman, mostrando que la cepa M-4(4)a tiene diferencias significativas en la actividad específica de la enzima a través de los días, $X^2_{(3)} = 9.6$, $p = 0.0223$. La prueba de signo-rango de Wilcoxon reporta un nivel de significancia de $p < 0.0083$, existiendo diferencias significativas entre los días 2 y 4; 2 y 6; 4 y 8; 6 y 8 ($Z = -1.826$, $p = 0.0679$), sin embargo no existe diferencia significativa en la comparación de actividades específicas de la enzima entre los días 6 y 4; 8 y 2 ($Z = 0$, $p = 1$).

La cepa M-5(3)ab también muestra diferencias significativas en el test de Friedman en la actividad específica de la enzima a través de los días, $X^2_{(3)} = 11.1$, $p = 0.0112$. La prueba de signo-rango de Wilcoxon reporta un nivel de significancia de $p < 0.0083$, existiendo diferencias significativas entre los días 2, 4, 6 y 8 ($Z = -1.826$, $p = 0.0679$) y sus comparaciones, sin embargo no existe diferencia significativa en la comparación de la actividad específica de la enzima producida entre los días 6 y 8 ($Z = 0.365$, $p = 0.715$).

Las cepas M-1(4)a, M-4(2)a y M-8(6)b no presentan un nivel estadísticamente significativo para el test de Friedman en la comparación de la actividad específica de la enzima a través de los días. (Anexo 4)

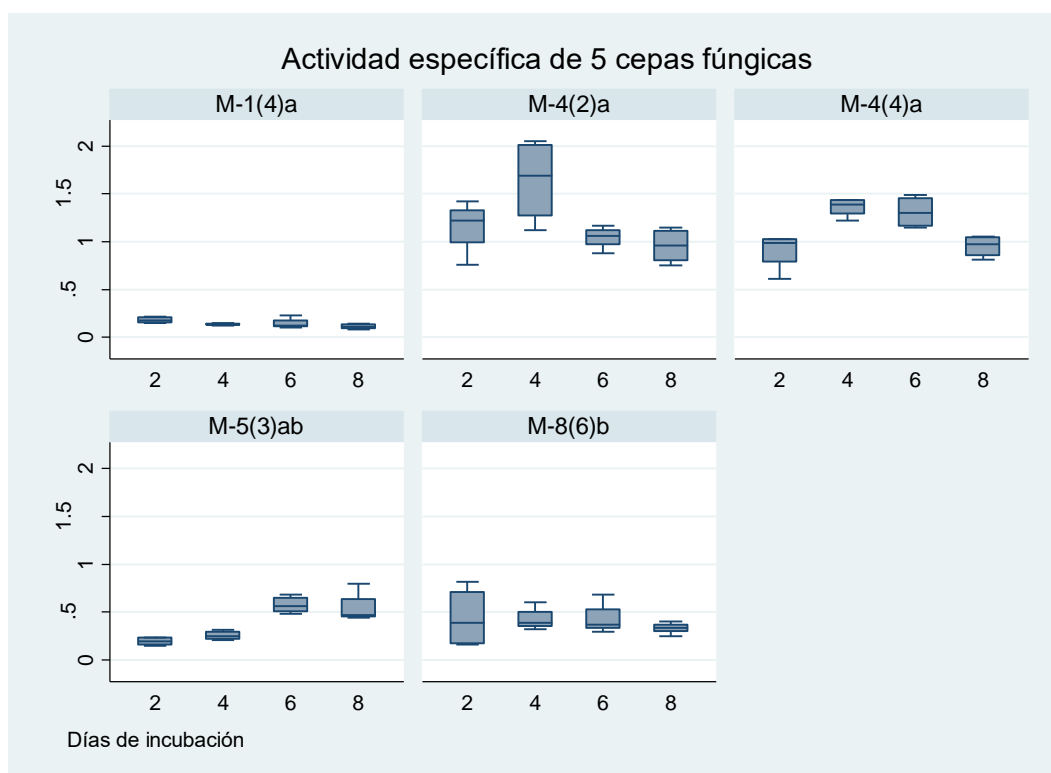


Fig. 14: Actividad específica generada por enzimas proteolíticas de 5 cepas fúngicas durante 2, 4, 6 y 8 días.

V. DISCUSION

5.1 Aislamiento de hongos Queratinofílicos

Este trabajo buscó el aislamiento e identificación de hongos a partir de suelos de granja de bovinos y la medición de su actividad queratinolítica, con el objetivo de aislar hongos queratinofílicos que ayuden en la biodegradación de los desechos queratinosos generados en el proceso de la curtiembre.

Se logró aislar un total de 75 cepas pertenecientes a 9 géneros diferentes. El género predominante es *Scopulariopsis* (40%), seguidos por los géneros *Fusarium* (23%), *Aspergillus* (17%), *Scedosporium* (8%), *Paecilomyces* (4%), *Acremonium* (3%), *Circinella* (3%), *Absidia* (1%) y *Penicillium* (1%).

Los géneros considerados como agentes micóticos para el hombre son *Aspergillus*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Scedosporium* (Somocurcio *et al.*, 2009), *Paecilomyces* (Moallaei *et al.*, 2006) y algunas especies de *Penicillium* (Thomas, 1994). Mientras que los géneros como *Scopulariopsis*, *Absidia* y *Circinella* son caracterizados en su mayoría como saprófitos de suelos, a pesar de esto existen casos de micosis por parte de algunas especies en personas inmunodeprimidas (Richardson y Koukila, 2007).

Los géneros reportados coinciden con algunos autores como Moallaei *et al.* (2006) encontrando agentes micóticos como *Geotricum candidum*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum* y *Paecilomyces lilacinus*. Y Algunas especies como *Penicillium sp.*, *Acremonium sp.*, a partir de muestras de suelo de granjas y bosques (Moallaei *et al.*, 2006). Mientras que Pakshir *et al.* (2013) lograron identificar con ayuda de técnicas moleculares, 22 géneros diferentes entre los que se encuentran *Fusarium* (25.30%), *Penicillium* (13.13%), *Chrysosporium* (13.13%), *Acremonium* (12.65%), *Aspergillus* (11.92%), *Mucor* (9.48%), *Paecilomyces* (4.13%), *Microsporum* (2.42%), *Bipolaris* (1.45%), *Bionectria* (1.21%), *Pseudallescheria* (0.73%), *Phialophora* (0.73%), *Alternaria* (0.73%), *Nectria* (0.48%), *Cephalosporium* (0.48%), *Chaetomium* (0.48%), *Scopulariopsis* (0.24%), *Scedosporium* (0.24%), *Verticillium* (0.24%), *Malbranchea* (0.24%), *Tritirachium* (0.24%), y *Ochroconis* (0.24%) obteniendo mayor cantidad de hongos

queratinofílicos que dermatofitos (Pakshir *et al.*, 2013). Como se puede observar a pesar de haber sido aislados en distintas regiones, el ecosistema del suelo, tiende a mostrar géneros fúngicos repetitivos en cada investigación.

El aislamiento de hongos queratinofílicos reportados en este estudio muestra una pobre diversidad de cepas fúngicas filamentosas queratinofílicas encontradas en suelo de granja de bovinos a temperatura ambiente, según lo reportado por Chmel y Vlácilíková en 1975, el mayor número de hongos queratinofílicos se encuentran en suelos con mayor cantidad de humus y con una profundidad de 1-10 cm. y 11-25 cm. Otros factores climáticos así como el pH y la humedad del ambiente a colectar (Bhadauria y Sharma, 2001; Gupta y Garg, 1991; Kaul y Sumbali, 1998) son claves para el aislamiento exitoso de estos microorganismos; es por esto que los suelos son los principales fuentes de dermatofitos y hongos queratinofílicos (Sharma y Swati, 2012). A pesar de esto, son pocos los géneros que se han encontrado en este estudio, y podría deberse al pH que presenta.

El suelo colectado en este estudio, contaba con un pH promedio de 9.49, este tipo de suelo alcalino podría presentar un ecosistema muy difícil para un hongo, ya que según lo reportado, los hongos queratinofílicos prefieren más que nada suelos un poco ácidos y alcalinos variando desde 4.5 a 8.0, donde la mayoría de los hongos aislados por Malek *et al.* en el 2013 presentaban un crecimiento óptimo a un pH neutro, y fuera de este rango no existió crecimiento reportable. Otros autores como Jain y Sharma (2011) reportaron que la mayoría de aislamientos se obtuvo en un rango de pH de 6.5-8.5; mientras que Pakshir *et al.* (2013) reportaron que el rango óptimo era pH 7 y 8 y que ninguna cepa había crecido en un pH mayor a 9. Esto podría sustentar la poca diversidad de géneros encontrados en el suelo alcalino colectado.

5.2 Selección de Hongos proteolíticos

De las 75 cepas fúngicas aisladas, el 56% de ellas (42 cepas) tuvieron capacidad proteolítica extracelular. Las especies con actividad proteasa positiva son todas las cepas de *Scopulariopsis* sp. 1 con una predominancia del 60% del total de cepas proteolíticas.

Los géneros que no presentaron actividad proteolítica visible en el agar leche representan el 44% de las cepas aisladas entre los que se encuentran algunas especies de *Scedosporium* sp. Y todas la pertenecientes a las especies *Acremonium* sp.1 y 2, *Aspergillus* sp. 3 y 4, *Circinella* sp., *Fusarium* sp. 3, 4 y 5; *Paecilomyces* sp., *Scopulariopsis* sp. 3.

La mayoría de los hongos que hemos aislado son filamentosos, lo cual es sustentado por Kunert (1989) quien afirma que la mayoría de organismos que son capaces de producir la enzima queratinasa son los hongos filamentosos. Existen otros estudios que reportan que la actividad proteolítica extracelular de la queratinasa es producida por diferentes hongos entre los que se encuentran algunas de las especies preseleccionadas como las especies de *Aspergillus*, *Onygena*, *Absidia* y *Rhizomucor*. Además otros hongos pertenecientes al género *Dermatophyton* (Kunert *et al.* 2000; Simpanya, 2000) y otros géneros pertenecientes al género de los fungi imperfecti han sido reportados como buenos productores de enzimas queratinolíticas (*Chrysosporium*, *Aspergillus*, *Alternaria*; *Trichuris*, *Curvularia*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geomyces*, *Gliomastix*, *Paecilomyces*, *Scopulariopsis*, *Penicillium* y *Doratomyces*) (Friedrich *et al.* 1999).

La selección de 5 cepas fúngicas (*Aspergillus* sp. 1 (cepas M-1(4)a y M-5(3)ab), *Scopulariopsis* sp. 2 (cepas M-4(2)a y M-4(4)a) y *Penicillium* sp. (Cepa M-8(6)b)) que podrían ser buenos candidatos de enzimas queratinolíticas, coincide con los reportes de otros autores como, Friedrich *et al.* 1999, quienes consideran a estos géneros como queratinolíticos.

5.3 Parámetros proteolíticos de la queratinasa en las cepas fúngicas seleccionadas.

La enzima queratinasa es una serin proteasa cuya característica se basa en la presencia de un grupo serina en su sitio activo, teniendo como rango óptimo de pH de 7 -11 (Gupta *et al.*, 2002; De Souza *et al.*, 2015), siendo el pH 8.0 el óptimo para generar la mayor actividad queratinolítica (Kim, 2007). Nuestro estudio indica que las 5 cepas fúngicas incrementaron el pH del medio externo teniendo como única fuente de carbono el material queratinoso de bovino, esto probablemente debido a que al secretar enzimas proteolíticas, los productos de la reacción

alcalinizan el medio externo. La presencia de sustratos similares puede inducir la secreción de proteasas, mientras que niveles altos de productos finales como aminoácidos, NH_4^+ y otras fuentes metabolizables de carbono pueden reprimir esta producción (Geisseler & Horwath, 2008).

Las cepas que presentaban un gran porcentaje de degradación de material queratinoso de bovino como la cepa M-4(2)a (hasta un 85% de degradación) y cepa M-4(4)a (hasta un 72% de degradación), ambas de la especie *Scopulariopsis* sp. 2; presentan una alcalinización del medio de cultivo líquido con rangos de pH que van desde 7.5 a 9, el cual se incrementó de acuerdo al tiempo de incubación. Mientras que las cepas que presentaba el menor porcentaje de degradación de material queratinoso, la cepa M-1(4)a, M-5(3)ab y M-8(6)b (hasta un 28% de degradación), identificadas como *Aspergillus* sp. 1, *Aspergillus* sp. 1 y *Penicillium* sp., presentaron un bajo incremento de pH en el medio externo que no sobrepasó los 7.5. Con estos resultados podemos inferir que la cantidad de queratinasa secretada en el medio externo produce un aumento significativo en su pH final. Este hecho también fue corroborado por Kim en el 2003, utilizando 5 cepas de *Aspergillus* observó que la cepa con una habilidad queratinolítica fuerte, alcalinizaba el medio de cultivo en mayor proporción que aquellas cepas con poca habilidad queratinolítica sugiriendo que la base de la queratinólisis tiene niveles altos de deaminación, alcalinizando el medio (Yu *et al.*, 1968). A pesar de que la deaminación y la alcalinización del medio juegan roles importantes en la keratinolisis, no pueden causar por sí solas una denaturación importante en el sustrato (Kunert, 1995).

A su vez el aumento de pH en el medio también coincide con la capacidad de esporulación de las cepas, generando así una relación directa entre tres factores: el crecimiento fúngico junto a su consiguiente esporulación, la capacidad de secreción de proteasas por la alcalinización del medio externo y su poder de degradación de material queratinoso.

Los resultados de degradación del sustrato queratinoso obtenidos en este estudio sobrepasan a los reportados utilizando otros géneros de hongos por Muhsin y Hadi en el 2002, donde logran la degradación de pelo humano con la ayuda de

proteasas de hongos como *Chrysosporium pannicola* y *Microsporium gypsum* a una tasa del 62% y 48% respectivamente, luego de tres semanas de incubación utilizando un medio de cultivo líquido. Nuestros resultados, aventajan la tasa de degradación en un tercio del tiempo utilizado por Muhsin y Hadi (2002).

5.4 Cuantificación de la actividad proteolítica de la queratinasa en las cepas fúngicas seleccionadas.

Ya que las 5 cepas fúngicas mostraron capacidad para utilizar la queratina evaluamos la eficiencia de sus queratinasas utilizando un método de cuantificación indirecta llamado técnica de la Azocaseína. El pico máximo de actividad enzimática de la queratinasa para las cepas M-4(2)a, M-4(4)a, M-5(3)ab y M-8(6)b fueron a los 8 días de incubación, mientras que en la cepa M-1(4)a no se obtuvo aumento de actividad enzimática en ninguno de los días incubados. La máxima actividad enzimática en condiciones de cultivo líquido para las cepas M-1(4)a, M-4(2)a, M-4(4)a, M-5(3)ab y M-8(6)b fueron de 0.028 U/mL (día 2); 1.14 U/mL (día 8); 1.38 U/mL (día 8); 0.24 U/mL (día 8) y 0.20 U/mL (día 8) respectivamente. Al término del experimento se obtuvo que las cepas M-4(2)a y M-4(4)a son las cepas con más actividad enzimática de la queratinasa, ambas pertenecientes al género *Scopulariopsis* sp. 2. Los resultados de la actividad enzimática mostrados por las cepas M-4(2)a y M-4(4)a son mayores comparándolos con los estudios realizados por Awasthi (2011) donde reportan una actividad de 0.34 U/mL utilizando al género *Scopulariopsis stercoraria* aislado de plumas de aves, o los reportados por Vázquez *et al.* (2008) en el que se evaluó la actividad de proteasas fúngicas inducidas con pelo de cerdo, utilizando la especie *Rhizopus oryzae* que produjo niveles máximos de 0.975 U/mL a las 120 horas o los reportados por Muhsin y Hadi (2002), donde obtienen una actividad enzimática de 0.003 U/mL utilizando *Aspergillus flavus*; 0.016 U/mL utilizando *Chrysosporium pannicola*, 0.014 U/mL utilizando *Microsporium gypseum* y 0.008 U/mL utilizando *Trichophyton mentagrophytes*. Cavello *et al.* (2012) también reporta una actividad en cepas de la especie *Paecilomyces lilacinus* en un medio básico con pelo como material queratinoso, reportando actividades de hasta 2.46 U/mL.

Las cepas identificadas como *Aspergillus* sp. (Cepa M-1(4)a y M-5(3)ab) obtuvieron valores similares a los reportados por Santos *et al.* (1996) quienes utilizaron a la especie *Aspergillus fumigatus* evaluando la actividad de proteasas fúngicas inducidas con pelo, obteniendo valores de actividad enzimática de 0.25 U/mL.

Para poder verificar la facultad que tienen los hongos estudiados de generar la enzima a través de los días, se discutió con los datos obtenidos sobre la actividad específica de las enzimas queratinolíticas. Se puede deducir que para las cepas M-4(2)a y M-4(4)a, la máxima actividad específica de la enzima se da al 4to día, posteriormente a esto, las cepas incrementan la concentración de proteínas, pero ya no incrementan de manera significativa la actividad enzimática de queratinasas.

Se asume que las enzimas queratinasas empiezan a trabajar de mejor manera a pH alcalinos, dado que existe un incremento de pH desde el día 4 al 8, generando una mejor actividad enzimática de la queratinasa para cada cepa fúngica. El hecho de que ya no se encuentre actividad queratinasa de manera significativa en el medio líquido, no quiere decir que no existan, sólo que debe existir algunos factores que estén limitando esta actividad, como por ejemplo, la presencia de sustratos similares que puede inducir la secreción de otras proteasas, ó niveles altos de productos finales como aminoácidos, NH^{+4} y fáciles fuentes metabolizables de carbono que pueden reprimir su actividad (Geisseler & Horwath, 2008).

La gradiente de resultados mostrados en las cepas que presentan una actividad proteolítica de la caseína en medio leche (medio sólido), no concuerdan con los resultados obtenidos en medios líquidos. Esto puede deberse a que la mayoría de enzimas de las cepas M-1(4)a , M-5(3)ab y M-8(6)b no eran del tipo queratinasas, sino una enzima capaz de degradar sólo la caseína.

VI. CONCLUSIONES

Se logró aislar con éxito un total de 75 cepas queratinofílicas pertenecientes a 9 géneros diferentes a partir del suelo de granja de bovinos perteneciente a la Universidad Nacional Agraria la Molina de Lima -Perú. El género predominante fue *Scopulariopsis* (40%), seguido de los géneros *Fusarium* (23), *Aspergillus* (17%), *Scedosporium* (8%), *Paecilomyces* (4%), *Acremonium* (3%), *Circinella* (3%), *Absidia* (1%) y *Penicillium* (1%).

Las Cepas fúngicas proteolíticas pertenecían a los géneros *Scopulariopsis* sp. 1 con una predominancia del 60% del total de cepas proteolíticas; seguido de *Aspergillus* sp. 1 (10%), *Aspergillus* sp. 2 (7%), *Scedosporium* sp. (5%), *Scopulariopsis* sp. 2 (5%), *Fusarium* sp. 1 (7%), la especie *Absidia* sp (2%), todas las cepas de *Fusarium* sp. 2 (2%) y la especie *Penicillium* sp. (2%).

La degradación de material queratinoso por parte de cada cepa fúngica estudiada se correlaciona positivamente con el aumento de pH en el medio de cultivo y con la generación de conidias.

Las cepas que presentaban un gran porcentaje de degradación de material queratinoso de bovino fue la cepa M-4(2)a (hasta un 85% de degradación) y la cepa M-4(4)a (hasta un 72% de degradación), ambas de la especie *Scopulariopsis* sp. 2. Con una actividad enzimática final de 1.14 U/mL (día 8) y 1.38 U/mL (día 8), respectivamente.

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar una identificación molecular de las cepas fúngicas activas para brindar la especie específica y dar sustento a la identificación macroscópica y microscópica.
- Realizar la optimización del cultivo líquido de la cepa fúngica con mayor actividad enzimática, variando las condiciones de pH, de temperatura, de medio de cultivo e incluso variar las condiciones de rotación con la que se cultiva; todo esto con la finalidad de obtener el mejor sistema de cultivo con el que la cepa fúngica pudiera producir la mayor cantidad de la enzima.
- Tratar de iniciar metodologías nuevas para el aislamiento de cepas fúngicas que no son cultivables con los métodos tradicionales, ya que dichas cepas fúngicas podría tener comportamientos enzimáticos interesantes y útiles para la biodegradación de materiales queratinosos.
- Iniciar con los experimentos in situ para verificar si la actividad queratinolítica que presenta el hongo en condiciones de laboratorio puede ser utilizada también en la biodegradación del material queratinoso de las curtiembres bajo las condiciones que se presenten in situ.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ajello, L. 1953. The dermatophyte, *Microsporum gypseum*, as a saprophyte and parasite. *Journal of Investigative Dermatology*, 21(3): 157-171.
- Avasn Maruthi, Y., Hossain, K., Hari Priya, D. & Tejaswi, B. 2012. Prevalence of Keratinophilic fungi from Sewage Sludge at Some Wastewater out lets along the coast of Visakhapatnam: A case study. *Advances in Applied Science Research*, 3(1): 605-610.
- Awasthi, P. 2011. Keratinase Activity of Some Hyphomycetous Fungi from Dropped Off Chicken Feathers. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archive*, 2(6): 1745-1750.
- Barnett H.L. & Barry B. H. 1972. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 3th edition. Burgess Publishing Company.
- Basarán, V., Hardisson, C. & Braña, A. F. 1990. Regulation of extracellular protease production in *Streptomyces clavuligerus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34(2): 208-213.
- Bertsch, A. & Coello, N. 2005. A biotechnological process for treatment and recycling poultry feathers as a feed ingredient. *Bioresource technology*. 96(15): 1703-1708.
- Bhadauria, S. & Sharma, M. 2001. Soil borne keratinophilic fungi in relation to habitat pH. *Journal of Environment and Pollution*, 8(3): 245-248.
- Campos, V. J. J. 2013. Análisis y mejora de procesos de una curtiembre ubicada en la ciudad de Trujillo (Tesis de Licenciatura). Pontificia Universidad Católica del Perú.
- Cavello, I., Cavalitto, S. & Hours, R. 2012. Biodegradation of a keratin waste and the concomitant production of detergent stable serine proteases from *Paecilomyces lilacinus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167(5): 945-958.

- Cisterna Lagos, C. 2003. Clasificación Ecofisiológica de los Hongos Comestibles. *Micotec.* (leído el 02 de Abril del 2014) from <http://www.micoteconline.com/Hongos%20Ecofisiologia.pdf>
- Chmel, L. & Vlácilíková, A. 1975. The ecology of keratinophilic fungi at different depths of soil. *Medical Mycology*, 13(2), 185-191.
- Deivasigamani, B. & Alagappan, K. 2008. Industrial application of keratinase and soluble proteins from feather keratins. *Journal of Environmental Biology*, 29(6), 933-936.
- De Souza PM, Bittencourt ML de A, Caprara CC, *et al.* 2015. A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*. 46(2):337-346.
- El-Refai, H., AbdelNaby, M., Gaballa, A., El-Araby, M. & Fattah, A. A. 2005. Improvement of the newly isolated *Bacillus pumilus* FH9 keratinolytic activity. *Process Biochemistry*, 40, 2325-2332.
- El-Said, A., Sohair, T. & El-Hadi, A. 2009. Fungi associated with the hairs of goat and Sheep in Libya. *Mycobiology*, 37(2), 82-88.
- Friedrich, J., Gradišar, H., Mandin, D. & Chaumont, J. P. 1999. Screening fungi for synthesis of keratinolytic enzymes. *Letters in Applied Microbiology*, 28(2), 127-130.
- Galarza, B., Cavello, I., Garro, L., Gortari, C., Hours, R. & Cantera, C. 2012. Evaluación del Incremento en la Producción de Enzimas Queratinolíticas. *Journal of AQUEIC*, 63(3), 70-74.
- Ganaie, M., Sood, S., Rizvi, G. & Khan, T. 2010. Isolation and identification of keratinophilic fungi from different soil samples in Jhansi city (India). *Plant Pathology Journal*, 9(4), 194-197.
- Geisseler D., Horwath W. 2008. Regulation of extracellular protease activity in soil in response to different sources and concentrations of nitrogen and carbon. *Soil Biology & Biochemistry* 40. 3040–3048.

- Gopinath S., Anbu P., Lakshmipriya T., Tang T., Chen Y., Hashim U., Ruslinda R., Arshad M. 2015. Biotechnological Aspects and Perspective of Microbial Keratinase Production. *BioMed Research International*, vol. 2015: 10 pag.
- Gradisar H., Friedrich J., Krizaj I., Jerala R. 2005. Similarities and Specificities of Fungal Keratinolytic Proteases: Comparison of Keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microsporus* to Some Known Proteases. *Applied and environmental microbiology*. 71 (7): 3420–3426
- Grant, W. D. & Long, P. E. 1981. *Environmental microbiology*: Blackie & Son, Ltd.
- Grumbt, M., Monod, M., Yamada, T., Hertweck, C., Kunert, J. & Staib, P. 2013. Keratin degradation by dermatophytes relies on cysteine dioxygenase and a sulfite efflux pump. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(6), 1550-1555.
- Gupta, R. & Garg, A. 1991. Isolation of keratinophilic fungi from meerut with particular reference of soil pH. *Acta Botanica Indica*, 1: 283-285.
- Gupta R, Beg QK, Lorenz P. 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol. Jun*; 59(1):15-32.
- Gupta, R., & Ramnani, P. 2006. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(1): 21-33.
- Jain, N. & Sharma, M. 2011. Distribution of dermatophytes and other related fungi in Jaipur city, with particular reference to soil pH. *Mycoses*, 54(1): 52-58.
- Jain, N. & Sharma, M. 2012. A descriptive study of keratinophilic fungal flora of animal and bird habitat, Jaipur, Rajasthan. *African Journal of Microbiology Research*, 6(42): 6973-6977.
- Kasperova, A., Kunert, J., Horynova, M., Weigl, E., Sebel, M., Lenobel, R. & Raska, M. 2011. Isolation of recombinant cysteine dioxygenase protein from *Trichophyton mentagrophytes*. *Mycoses*, 54(5): e456-e462.

- Kaul, S. & Sumbali, G. 1998. Impact of some ecological factors on the occurrence of poultry soil-inhabiting keratinophiles. *Mycopathologia*, 143(3), 155-159.
- Kim Jeon-Dong. 2003. Keratinolytic Activity of Five *Aspergillus* Species Isolated from Poultry Farming Soil in Korea. *Mycobiology* 31(3): 157-161
- Kim Jeon-Dong. 2007. Purification and Characterization of a Keratinase from a Feather-Degrading Fungus, *Aspergillus flavus* Strain K-03. *Mycobiology*. 35(4): 219-225.
- Kumar, R., Mishra, R., Maurya, S. & Sahu, H. 2013. Isolation and identification of keratinophilic fungi from garbage waste soils of Jharkhand region of India. *European Journal of Experimental Biology*, 3(3), 600-604.
- Kunert, J. 1972a. Keratin decomposition by dermatophytes: evidence of the sulphitolysis of the protein. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 28(9), 1025-1026.
- Kunert, J. 1972b. Thiosulphate esters in keratin attacked by dermatophytes in vitro. *Medical Mycology*, 10(1), 6-13.
- Kunert, J. 1973. Keratin decomposition by dermatophytes. I. Sulfite production as a possible way of substrate denaturation. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie*, 13(6), 489-498.
- Kunert, J. 1976. Keratin decomposition by dermatophytes II. Presence of S-sulfocysteine and cysteic acid in soluble decomposition products. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie*, 16(2), 97-105.
- Kunert, J. 1989. Biochemical mechanism of keratin degradation by the Actinomycete *Streptomyces fradiae* and the fungus *Microsporium gypseum*: A comparison. *Journal of Basic Microbiology*, 29(9), 597-604.
- Kunert, J. 1995. Biochemical mechanism of keratin degradation by keratinolytic fungi. *Journal Indian Botanical Society*, 74, 89-98.

- Kunert, J., Kushwaha, R. & Guarro, J. 2000. Antimicrobial and biochemical studies on plants. *Revista Iberoamericana de Micología*, 9: 77-85.
- Kushwaha, R. K. & Guarro, J. 2000. *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 2000: 174.
- Latkowski, J. & Freedberg, I. 1999. Epidermal cell kinetics, epidermal differentiation, and keratinization. *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*. 5th ed. McGraw-Hill, New York, 133-143.
- Léchenne, B., Reichard, U., Zaugg, C., Fratti, M., Kunert, J., Boulat, O. & Monod, M. 2007. Sulphite efflux pumps in *Aspergillus fumigatus* and dermatophytes. *Microbiology*, 153(3): 905-913.
- Liggieri, C., Arribére, M. C., Trejo, S. A., Canals, F., Avilés, F. X. & Priolo, N. S. 2004. Purification and Biochemical Characterization of *Asclepain c I* from the Latex of *Asclepias curassavica L.* *The Protein Journal*, 23(6): 403-411.
- Malek, E., Moosazadeh, M., Hanafi, P., Nejat, Z. A., Amini, A., Mohammadi, R., . . . Niknejad, F. 2013. Isolation of Keratinophilic Fungi and Aerobic Actinomycetes From Park Soils in Gorgan, North of Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 6(10).
- Mendo, M. 2013. *Micología Médica* (Primera ed.). Perú: Ebisa Ediciones.
- Moallaei, H., Zaini, F., Pihet, M., Mahmoudi, M. & Hashemi, J. 2006. Isolation of Keratinophilic Fungi from Soil Samples of Forests and Farm Yards. *Iranian Journal of Public Health*, 35(4): 62-69.
- Muhsin, T. M. & Hadi, R. B. 2002. Degradation of keratin substrates by fungi isolated from sewage sludge. *Mycopathologia*, 154(4): 185-189.
- Onifade, A. 1998. A review: potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. *Bioresour. Technol.* 66:1-11.

- Pakshir, K., Rahimi, G. M., Zomorodian, K. & Gharavi, A. 2013. Isolation and molecular identification of keratinophilic fungi from public parks soil in Shiraz, Iran. *Biomed Reserarch International*, 2013, 619576.
- Pokorny, M., Lj, V., Turk, V., Renko, M. & J, u. 1979. *Streptomyces rimosus* extracellular proteases. 1. Characterization and evaluation of various crude preparations. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 8, 81-90.
- Renko, M., Pokorny, M., Vitale, L. & Turk, V. 1981. *Streptomyces rimosus* extracellular proteases. 2. Isolation and characterization of serine alkaline proteinase. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 11(1), 166-171.
- Renko, M., Vitale, L., Kokalj, M. & Pokorny, M. 1989. *Streptomyces rimosus* extracellular proteases. 4. Trypsin-like proteinase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31(1), 38-44.
- Richardson M, Koukila-Kähkölä P. 2007. Rhizopus, Rhizomucor, Absidia, and other agents of systemic and subcutaneous zygomycoses. En: Murray P, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. Manual of Clinical Microbiology. 9th Edition, 1. Washington: ASM Press; p. 1839-5
- Riffel, A., Ortolan, S. & Brandelli, A. 2003. De-hairing activity of extracellular proteases produced by keratinolytic bacteria. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 78(8), 855-859.
- Ruffin, P., Andrieu, S., Biserte, G. & Biguet, J. 1976. Sulphitolysis in keratinolysis. Biochemical proof. *Medical Mycology*, 14(2), 181-184.
- Safranek, W. W. & Goos, R. D. 1982. Degradation of wool by saprotrophic fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, 28(1), 137-140.
- Santos R., Firmina A, de Sá C., Felix C. 1996. Keratinolytic activity of *Aspergillus fumigatus* fresenius. *Curr Microbiol.* 33(6):364-70.

- Sharma, M., Sharma, M. & Rao, V. M. 2011a. In vitro biodegradation of keratin by dermatophytes and some soil keratinophiles. *African Journal of Biochemistry Research*, 5(1): 1-6.
- Sharma, R. & Sharma, M. 2011b. Keratinase activity of dermatophytes and yeast species for poultry waste and waste water treatment. *IIOAB Journal*, 2(3): 19-22.
- Sharma, R. & Swati. 2012. Effect of keratin substrates on the growth of keratinophilic fungi. *Journal of Academia and Industrial Research*. 1(4): 170-172.
- Sigma Technical Service Sigma-techserv@sial.com. 1999
- Simpanya, M. F. 2000. Dermatophytes: their taxonomy, ecology and pathogenicity. *Revista Iberoamericana de Micología*, 2: 1-12.
- Soomro, I. H., Kazi, Y. F., Zardari, M. & Shar, A. H. 2007. Isolation of Keratinophilic Fungi from Soil in Khairpur City, Sindh, Pakistan. *Bangladesh Journal of Microbiology*, 24(1): 79-80.
- Somocurcio J., Sotomayor A., Álvarez G., Acurio V., Casquero J., Luna L. 2009. Micetoma pulmonar por *Scedosporium* sp, reporte de dos casos. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*; 26(3): 395-99.
- Stipanuk, M. H., Dominy, J. E., Lee, J.-I. & Coloso, R. M. 2006. Mammalian cysteine metabolism: new insights into regulation of cysteine metabolism. *Journal of Nutrition*, 136(6): 1652S-1659S.
- Takami, H., Nakamura, S., Aono, R. & Horikoshi, K. 1992. Degradation of human hair by a thermostable alkaline protease from alkaliphilic *Bacillus* sp. No. AH-101. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 56(10): 1667-1669.
- Thomas PA. 1994. Mycotic keratitis-an underestimated mycosis. *J Med Vet Mycol*; 32:235-256.

- Ulfig, K. 2003. Studies of Keratinolytic and Keratinophilic Fungi in Sewage Sludge by Means of a Multi-Temperature Hair Baiting Method. *Polish Journal of Environmental Studies*, 12(4), 461-466.
- Ulfig, K., Guarro, J., Cano, J., Gene, J., Vidal, P., Figueras, M. & Łukasik, W. 1997. The occurrence of keratinolytic fungi in sediments of the river Tordera (Spain). *FEMS Microbiology Ecology*, 22(2), 111-117.
- Ulfig, K., Plaza, G., Markowska-Szczupak, A., Janda, K. & Kirkowska, S. 2010. Keratinolytic and non-keratinolytic fungi in sewage sludge. *Polish Journal of Environmental Studies*, 19(3), 635-624.
- Vanbreuseghem, R. 1952. *Biological technique for isolating dermatophytes from soil*. Paper presented at the Annales de la Société belge de médecine tropicale.
- Vargas, R. 2013. RESIDUOS SOLIDOS EN LA INDUSTRIA DE LA CURTIEMBRE. IISRRSSP. (Leído el 16 de Marzo del 2014) from http://www.lamolina.edu.pe/Investigacion/ciqtobia/Presentaciones/IISRRSSP/Manejo%20de%20Residuos%20de%20Ambito%20no%20Municipal/Manejo_Residuos_Solidos_Industria_Curtiembre.pdf
- Vázquez, I. R., Aguilera, A. F., Prado-Barragán, L. A. & Aguilar, C. N. (2008). Producción fúngica de proteasas inducidas con pelo de cerdo. *Información tecnológica*, 19(2), 33-40.
- Vitale, L., Renko, M., Lenarčič, B., Turk, V. & Pokorny, M. 1986. *Streptomyces rimosus* extracellular proteases 3. Isolation and characterization of leucine aminopeptidase. *Applied Microbiology Biotechnology*, 23(6), 449-455.
- Wang, R., Min, C., Haiming, C. & Li, Z. 2009. Enzyme unhairing: an Eco-Friendly Biotechnological Process. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 93(2), 51-55.

- Watanabe, T. 2010. Pictorial Atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species. 3rd edition. CRC Press Taylor & Francis Group. 13-22.
- Wawrzekiewicz, K., Wolski, T. & Łoborzewski, J. 1991. Screening the keratinolytic activity of dermatophytes in vitro. *Mycopathologia*, 114(1): 1-8.
- Yeoman, K. & Edwards, C. 1994. Protease production by *Streptomyces thermovulgaris* grown on repemeal-derived media. *Journal of Applied Bacteriology*, 77(3): 264-270.
- Yu, R. J., Hormon, S. R. and Blank, F. 1968. Isolation, purification of an extracellular keratinase of Trichophyton mentagrophytes. *J. Bacteriol*, 96: 1435-1436.
- Zarei Mahmoudabadi, A. & Zarrin, M. 2008. Isolation of dermatophytes and related keratinophilic fungi from the two public parks in Ahvaz. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 1(1): 20-23.

IX. ANEXOS

Anexo 1: Clasificación taxonómica de los hongos queratinofílicos aislados de suelos de granja de bovinos.

Clasificación taxonómica						
Reino	Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	Cepa
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i> sp. 1	M-1(1)a
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i> sp. 1	M-1(2)a
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i> sp. 1	M-1(2)b
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i> sp. 3	M-1(3)a
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i> sp. 2	M-1(4)a
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	Microascaceae	<i>Scedosporium</i> sp.	M-2(1)a
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i> sp. 3	M-2(1)c
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	Microascaceae	<i>Scedosporium</i> sp.	M-2(2)a
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i> sp. 1	M-2(2)b
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i> sp. 1	M-2(3)a

Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	Microascaceae	<i>Scedosporium</i> sp.	M-2(3)b
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i> sp. 3	M-2(4)a
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	Microascaceae	<i>Scedosporium</i> sp.	M-2(4)b
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i> sp. 1	M-2(4)c
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	Microascaceae	<i>Scedosporium</i> sp.	M-2(4)d
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i> sp. 3	M-3(1)a
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i> sp. 4	M-3(1)ba
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i> sp. 3	M-3(1)bb
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i> sp. 1	M-3(2)b
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i> sp. 1	M-3(3)a
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i> sp. 1	M-3(4)a
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i> sp. 3	M-3(5)a
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i> sp. 1	M-3(5)b
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i> sp. 4	M-3(6)a
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i> sp. 1	M-4(1)a

Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Paecilomyces</i> sp.	M-4(1)ba
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i> sp. 2	M-4(2)a
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Paecilomyces</i> sp.	M-4(3)a
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i> sp. 2	M-4(4)a
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i> sp. 4	M-5(1)a
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i> sp. 3	M-5(2)a
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i> sp. 1	M-5(3)ab
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i> sp. 1	M-5(3)b
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i> sp. 3	M-5(4)b
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i> sp. 3	M-5(5)a
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i> sp. 1	M-6(1)b
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	Microascaceae	<i>Scedosporium</i> sp.	M-6(2)a
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i> sp. 3	M-6(3)b
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i> sp. 1	M-6(4)a
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i> sp. 4	M-6(5)a

Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i> sp. 4	M-6(6)a
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i> sp. 1	M-7(1)a
Fungi	Zygomycota	Zygomycetes	Mucorales	Mucoraceae	<i>Absidia</i> sp.	M-7(2)a
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i> sp. 1	M-7(3)a
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i> sp. 1	M-7(4)a
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i> sp. 2	M-7(5)a
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i> sp. 2	M-8(1)a
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i> sp. 1	M-8(2)a
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i> sp. 1	M-8(3)a
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Paecilomyces</i> sp.	M-8(3)b
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i> sp. 1	M-8(4)a
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i> sp. 1	M-8(5)a
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i> sp. 3	M-8(5)b
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i> sp. 1	M-8(6)a
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Penicillium</i> sp.	M-8(6)b

Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i> sp. 1	M-8(7)a
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales		<i>Acremonium</i> sp. 2	M-9(1)a
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i> sp. 1	M-9(1)c
Fungi	Zygomycota	Zygomycetes	Mucorales	Mucoraceae	<i>Circinella</i> sp.	M-9(2)a
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i> sp. 1	M-9(2)b
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i> sp. 1	M-9(3)a
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales		<i>Acremonium</i> sp. 1	M-9(4)b
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i> sp. 2	M-9(5)a
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i> sp. 1	M-9(5)b
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i> sp. 5	M-10(1)a
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i> sp. 1	M-10(1)b
Fungi	Zygomycota	Zygomycetes	Mucorales	Mucoraceae	<i>Circinella</i> sp.	M-10(2)a
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i> sp. 3	M-10(3)a
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i> sp. 1	M-10(3)b
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i> sp. 1	M-10(4)a

Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i> sp. 3	M-10(4)b
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i> sp. 3	M-10(4)c
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i> sp. 3	M-10(4)d
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i> sp. 3	M10(5)a
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i> sp. 1	M10(6)a

Anexo 2: Pruebas estadísticas: Test de Friedman y Signo-Rango de Wilcoxon para la comparación de la concentración de Proteínas a través de los días por cada cepa de manera individual.

1. Cepa M-1(4)a

Test de Friedman

$$X^2(3) = 0.9$$

$$p\text{-valor} = 0.8254$$

Signo-Rango de Wilcoxon

$$p\text{-valor} < 0.00833333$$

		Día 4	Día 6	Día 8
Día 2	Valor Z	-0.73	-0.73	-0.73
	P(z)	0.4652	0.4652	0.4652
Día 4	Valor Z		0.73	0
	P(z)		0.4652	1
Día 6	Valor Z			-0.73
	P(z)			0.4652

2. Cepa M-4(2)a

Test de Friedman

$$X^2(3) = 12$$

$$p\text{-valor} = \mathbf{0.0074}$$

Signo-Rango de Wilcoxon

$$p\text{-valor} < 0.00833333$$

		Día 4	Día 6	Día 8
Día 2	Valor Z	-1.826	-1.826	-1.826
	P(z)	0.0679	0.0679	0.0679
Día 4	Valor Z		-1.826	-1.826
	P(z)		0.0679	0.0679
Día 6	Valor Z			-1.826
	P(z)			0.0679

3. Cepa M-4(4)a

Test de Friedman

$$X^2(3) = 12$$

$$p\text{-valor} = \mathbf{0.0074}$$

Signo-Rango de Wilcoxon

$$p\text{-valor} < 0.00833333$$

		Día 4	Día 6	Día 8
Día 2	Valor Z	-1.826	-1.826	-1.826
	P(z)	0.0679	0.0679	0.0679
Día 4	Valor Z		-1.826	-1.826
	P(z)		0.0679	0.0679
Día 6	Valor Z			-1.826
	P(z)			0.0679

4. Cepa M-5(3)ab

Test de Friedman

$$X^2(3) = 9.9$$

$$p\text{-valor} = \mathbf{0.0194}$$

Signo-Rango de Wilcoxon

$$p\text{-valor} < 0.00833333$$

		Día 4	Día 6	Día 8
Día 2	Valor Z	-1.826	-1.826	-1.826
	P(z)	0.0679	0.0679	0.0679
Día 4	Valor Z		-1.461	-1.826
	P(z)		0.1441	0.0679
Día 6	Valor Z			-1.461
	P(z)			0.1441

5. Cepa M-8(6)b

Test de Friedman

$$X^2(3) = 12$$

$$p\text{-valor} = \mathbf{0.0074}$$

Signo-Rango de Wilcoxon

$$p\text{-valor} < 0.00833333$$

		Día 4	Día 6	Día 8
Día 2	Valor Z	-1.826	-1.826	-1.826
	P(z)	0.0679	0.0679	0.0679
Día 4	Valor Z		-1.826	-1.826
	P(z)		0.0679	0.0679
Día 6	Valor Z			-1.826
	P(z)			0.0679

Anexo 3: Pruebas estadísticas: Test de Friedman y Signo-Rango de Wilcoxon para la comparación de la Actividad enzimática de la queratinasa a través de los días por cada cepa de manera individual.

1. Cepa M-1(4)a

Test de Friedman

$X^2(3) = 0.3$

p-valor = 0.96

Signo-Rango de Wilcoxon

p-valor < 0.00833333

		Día 4	Día 6	Día 8
Día 2	Valor Z	-0.365	0.73	0.73
	P(z)	0.715	0.4652	0.4652
Día 4	Valor Z		0.365	0.73
	P(z)		0.715	0.4652
Día 6	Valor Z			1.095
	P(z)			0.2733

2. Cepa M-4(2)a

Test de Friedman

$X^2(3) = 10.8$

p-valor = **0.0129**

Signo-Rango de Wilcoxon

p-valor < 0.00833333

		Día 4	Día 6	Día 8
Día 2	Valor Z	-1.826	-1.826	-1.826
	P(z)	0.0679	0.0679	0.0679
Día 4	Valor Z		-1.826	-1.826
	P(z)		0.0679	0.0679
Día 6	Valor Z			-0.73
	P(z)			0.4652

3. Cepa M-4(4)a

Test de Friedman

$$X^2(3) = 12$$

$$p\text{-valor} = \mathbf{0.0074}$$

Signo-Rango de Wilcoxon

$$p\text{-valor} < 0.00833333$$

		Día 4	Día 6	Día 8
Día 2	Valor Z	-1.826	-1.826	-1.826
	P(z)	0.0679	0.0679	0.0679
Día 4	Valor Z		-1.826	-1.826
	P(z)		0.0679	0.0679
Día 6	Valor Z			-1.826
	P(z)			0.0679

4. Cepa M-5(3)ab

Test de Friedman

$$X^2(3) = 11.1$$

$$p\text{-valor} = \mathbf{0.0112}$$

Signo-Rango de Wilcoxon

$$p\text{-valor} < 0.00833333$$

		Día 4	Día 6	Día 8
Día 2	Valor Z	-1.826	-1.826	-1.826
	P(z)	0.0679	0.0679	0.0679
Día 4	Valor Z		-1.826	-1.826
	P(z)		0.0679	0.0679
Día 6	Valor Z			0.365
	P(z)			0.715

5. Ceba M-8(6)b

Test de Friedman

$$X^2(3) = 2.4$$

$$p\text{-valor} = 0.4936$$

Signo-Rango de Wilcoxon

$$p\text{-valor} < 0.00833333$$

		Día 4	Día 6	Día 8
Día 2	Valor Z	-0.73	-1.461	-1.461
	P(z)	0.4652	0.1441	0.1441
Día 4	Valor Z		-1.095	-1.461
	P(z)		0.2733	0.1441
Día 6	Valor Z			-0.73
	P(z)			0.4652

Anexo 4: Pruebas estadísticas: Test de Friedman y Signo-Rango de Wilcoxon para la comparación de la Actividad específica de la queratinasa a través de los días por cada cepa de manera individual.

1. Cepa M-1(4)a

Test de Friedman

$$X^2(3) = 7.5$$

$$p\text{-valor} = 0.0576$$

Signo-Rango de Wilcoxon

$$p\text{-valor} < 0.00833333$$

		Día 4	Día 6	Día 8
Día 2	Valor Z	1.826	1.095	1.826
	P(z)	0.0679	0.2733	0.0679
Día 4	Valor Z		0.365	1.095
	P(z)		0.715	0.2733
Día 6	Valor Z			1.826
	P(z)			0.0679

2. Cepa M-4(2)a

Test de Friedman

$$X^2(3) = 6.9$$

$$p\text{-valor} = 0.0752$$

Signo-Rango de Wilcoxon

$$p\text{-valor} < 0.00833333$$

		Día 4	Día 6	Día 8
Día 2	Valor Z	-1.461	0.365	1.095
	P(z)	0.1441	0.715	0.2733
Día 4	Valor Z		1.826	1.826
	P(z)		0.0679	0.0679
Día 6	Valor Z			1.095
	P(z)			0.2733

3. Cepa M-4(4)a

Test de Friedman

$$X^2(3) = 9.6$$

$$p\text{-valor} = \mathbf{0.0223}$$

Signo-Rango de Wilcoxon

$$p\text{-valor} < 0.00833333$$

		Día 4	Día 6	Día 8
Día 2	Valor Z	-1.826	-1.826	0
	P(z)	0.0679	0.0679	1
Día 4	Valor Z		0	1.826
	P(z)		1	0.0679
Día 6	Valor Z			1.826
	P(z)			0.0679

4. Cepa M-5(3)ab

Test de Friedman

$$X^2(3) = 11.1$$

$$p\text{-valor} = \mathbf{0.0112}$$

Signo-Rango de Wilcoxon

$$p\text{-valor} < 0.00833333$$

		Día 4	Día 6	Día 8
Día 2	Valor Z	-1.826	-1.826	-1.826
	P(z)	0.0679	0.0679	0.0679
Día 4	Valor Z		-1.826	-1.826
	P(z)		0.0679	0.0679
Día 6	Valor Z			0.365
	P(z)			0.715

5. Ceba M-8(6)b

Test de Friedman

$$X^2(3) = 2.1$$

$$p\text{-valor} = 0.5519$$

Signo-Rango de
Wilcoxon

$$p\text{-valor} < 0.00833333$$

		Día 4	Día 6	Día 8
Día 2	Valor Z	0.365	0	0.73
	P(z)	0.715	1	0.4652
Día 4	Valor Z		0	1.826
	P(z)		1	0.0679
Día 6	Valor Z			1.095
	P(z)			0.2733

Anexo 5: Pruebas estadísticas: Test de Kruskal Wallis para la comparación de la concentración de proteínas entre cepas.

1. Día 2

Test de Kruskal Wallis

$X^2(4) = 16.729$

p-valor = **0.0022**

U de Mann-Whitney

p-valor < 0.005

		Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4	Cepa 5
Cepa 1	Valor Z	-2.309	-2.309	-2.021	0.577
	P(z)	0.0209	0.0209	0.0433	0.5637
Cepa 2	Valor Z		-1.732	2.309	2.309
	P(z)		0.0833	0.0209	0.0209
Cepa 3	Valor Z			2.309	2.309
	P(z)			0.0209	0.0209
Cepa 4	Valor Z				2.309
	P(z)				0.0209

2. Día 4

Test de Kruskal Wallis

$X^2(4) = 14.386$

p-valor = **0.0062**

U de Mann-Whitney

p-valor < 0.005

		Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4	Cepa 5
Cepa 1	Valor Z	-2.309	-2.309	-1.443	-1.443
	P(z)	0.0209	0.0209	0.1489	0.1489
Cepa 2	Valor Z		-0.577	2.309	2.021
	P(z)		0.5637	0.0209	0.0433
Cepa 3	Valor Z			2.309	2.309
	P(z)			0.0209	0.0209
Cepa 4	Valor Z				0
	P(z)				1

3. Día 6

Test de Kruskal Wallis

$X^2(4)$ 16.871

p-valor **0.002**

U de Mann-Whitney

p-valor < 0.005

		Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4	Cepa 5
Cepa 1	Valor Z	-2.309	-2.309	-2.309	-2.309
	P(z)	0.0209	0.0209	0.0209	0.0209
Cepa 2	Valor Z		0.577	2.309	2.309
	P(z)		0.5637	0.0209	0.0209
Cepa 3	Valor Z			2.309	2.309
	P(z)			0.0209	0.0209
Cepa 4	Valor Z				-1.443
	P(z)				0.1489

4. Día 8

Test de Kruskal Wallis

$X^2(4)$ 17.671

p-valor **0.0014**

U de Mann-Whitney

p-valor < 0.005

		Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4	Cepa 5
Cepa 1	Valor Z	-2.309	-2.309	-2.309	-2.309
	P(z)	0.0209	0.0209	0.0209	0.0209
Cepa 2	Valor Z		-1.732	2.309	2.309
	P(z)		0.0833	0.0209	0.0209
Cepa 3	Valor Z			2.309	2.309
	P(z)			0.0209	0.0209
Cepa 4	Valor Z				-2.021
	P(z)				0.0433

Anexo 6: Pruebas estadísticas: Test de Kruskal Wallis para la comparación de la actividad enzimática entre cepas.

1. Día 2

Test de Kruskal Wallis

X²(4) 14.371

p-valor **0.0062**

U de Mann-Whitney

p-valor < 0.005

		Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4	Cepa 5
Cepa 1	Valor Z	-2.309	-2.309	-1.155	-0.866
	P(z)	0.0209	0.0209	0.2482	0.3865
Cepa 2	Valor Z		0.866	2.309	2.309
	P(z)		0.3865	0.0209	0.0209
Cepa 3	Valor Z			2.309	2.309
	P(z)			0.0209	0.0209
Cepa 4	Valor Z				0
	P(z)				1

2. Día 4

Test de Kruskal Wallis

X²(4) 16.6

p-valor **0.0023**

U de Mann-Whitney

p-valor < 0.005

		Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4	Cepa 5
Cepa 1	Valor Z	-2.309	-2.309	-2.309	-2.309
	P(z)	0.0209	0.0209	0.0209	0.0209
Cepa 2	Valor Z		0.289	2.309	2.309
	P(z)		0.7728	0.0209	0.0209
Cepa 3	Valor Z			2.309	2.309
	P(z)			0.0209	0.0209
Cepa 4	Valor Z				-0.866
	P(z)				0.3865

3. Día 6

Test de Kruskal Wallis

X²(4) 17.429

p-valor **0.0016**

U de Mann-Whitney

p-valor < 0.005

		Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4	Cepa 5
Cepa 1	Valor Z	-2.309	-2.309	-2.309	-2.309
	P(z)	0.0209	0.0209	0.0209	0.0209
Cepa 2	Valor Z		-2.309	2.309	2.309
	P(z)		0.0209	0.0209	0.0209
Cepa 3	Valor Z			2.309	2.309
	P(z)			0.0209	0.0209
Cepa 4	Valor Z				0.577
	P(z)				0.5637

4. Día 8

Test de Kruskal Wallis

X²(4) 17.386

p-valor **0.0016**

U de Mann-Whitney

p-valor < 0.005

		Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4	Cepa 5
Cepa 1	Valor Z	-2.309	-2.309	-2.309	-2.309
	P(z)	0.0209	0.0209	0.0209	0.0209
Cepa 2	Valor Z		-2.309	2.309	2.309
	P(z)		0.0209	0.0209	0.0209
Cepa 3	Valor Z			2.309	2.309
	P(z)			0.0209	0.0209
Cepa 4	Valor Z				-0.289
	P(z)				0.7728

Anexo 7: Pruebas estadísticas: Test de Kruskal Wallis para la comparación de la actividad específica entre cepas.

1. Día

Test de Kruskal Wallis

X²(4) 13.786

p-valor **0.008**

U de Mann-Whitney

p-valor < 0.005

		Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4	Cepa 5
Cepa 1	Valor Z	-2.309	-2.309	-0.577	-1.155
	P(z)	0.0209	0.0209	0.5637	0.2482
Cepa 2	Valor Z		1.443	2.309	2.021
	P(z)		0.1489	0.0209	0.0433
Cepa 3	Valor Z			2.309	2.021
	P(z)			0.0209	0.0433
Cepa 4	Valor Z				-0.866
	P(z)				0.3865

2. Día 4

Test de Kruskal Wallis

X²(4) 17.429

p-valor **0.0016**

U de Mann-Whitney

p-valor < 0.005

		Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4	Cepa 5
Cepa 1	Valor Z	-2.309	-2.309	-2.309	-2.309
	P(z)	0.0209	0.0209	0.0209	0.0209
Cepa 2	Valor Z		0.577	2.309	2.309
	P(z)		0.5637	0.0209	0.0209
Cepa 3	Valor Z			2.309	2.309
	P(z)			0.0209	0.0209
Cepa 4	Valor Z				-2.309
	P(z)				0.0209

3. Día 6

Test de Kruskal Wallis

$X^2(4)$ 17.514

p-valor **0.0015**

U de Mann-Whitney

p-valor < 0.005

		Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4	Cepa 5
Cepa 1	Valor Z	-2.309	-2.309	-2.309	-2.309
	P(z)	0.0209	0.0209	0.0209	0.0209
Cepa 2	Valor Z		-2.021	2.309	2.309
	P(z)		0.0433	0.0209	0.0209
Cepa 3	Valor Z			2.309	2.309
	P(z)			0.0209	0.0209
Cepa 4	Valor Z				1.443
	P(z)				0.1489

4. Día 8

Test de Kruskal Wallis

$X^2(4)$ 17.043

p-valor **0.0019**

U de Mann-Whitney

p-valor < 0.005

		Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4	Cepa 5
Cepa 1	Valor Z	-2.309	-2.309	-2.309	-2.309
	P(z)	0.0209	0.0209	0.0209	0.0209
Cepa 2	Valor Z		0.289	2.021	2.309
	P(z)		0.7728	0.0433	0.0209
Cepa 3	Valor Z			2.309	2.309
	P(z)			0.0209	0.0209
Cepa 4	Valor Z				2.309
	P(z)				0.0209