



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE HIDALGO  
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

**MAESTRÍA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA  
AGRÍCOLA Y FORESTAL SUSTENTABLE**

**TESIS DE MAESTRÍA**

**VALORIZACIÓN DE HIDROLIZADOS DE PROTEÍNA DE LANA DE  
OVEJA PARA EL CULTIVO DE *Trichoderma harzianum* Y SU USO  
COMO BIOESTIMULANTE EN FORRAJES VERDES**

Para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias y Tecnología Agrícola y Forestal Sustentable

**PRESENTA**

**Ing. Carlos Farfán Flores**

Director

Dr. Oscar Arce Cervantes

Codirector

Dr. Pablo Antonio López Pérez

Asesores

Dra. Silvia Armenta Jaime

Dra. Dulce Jazmín Hernández Melchor

Dr. Sergio Hernández León

Tulancingo de Bravo, Hgo., México., agosto de 2025



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Instituto de Ciencias Agropecuarias

School of Forestry and Environmental Studies

Maestría en Ciencias y Tecnología Agrícola y Forestal Sustentable

Master's in Sciences and Technology of Agriculture and Forestry

ICAP-MCTAFS/005/2025

**MTRA. OJUKY DEL ROCÍO ISLAS MALDONADO**  
DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR

P R E S E N T E

Por este conducto se le comunica que el Comité Revisor asignado al alumno **Carlos Farfán Flores**, de la Maestría en Ciencias y Tecnología Agrícola y Forestal Sustentable, con número de cuenta **No. 383820**, que presenta el manuscrito de tesis titulado **"VALORIZACIÓN DE HIDROLIZADOS DE PROTEÍNA DE LANA DE OVEJA PARA EL CULTIVO DE *Trichoderma harzianum* Y SU USO COMO BIOESTIMULANTE EN FORRAJES VERDES"**, ha autorizado la impresión del mismo.

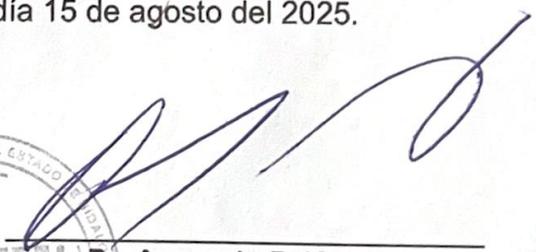
Sin otro particular, reitero a Usted la seguridad de mi atenta consideración.

ATENTAMENTE

*"Amor, Orden y Progreso"*

Tulancingo de Bravo, Hgo. al día 15 de agosto del 2025.

  
**Dr. Sergio Hernández León**  
Coordinador de la Maestría en  
Ciencias y Tecnología Agrícola y  
Forestal Sustentable

  
**Dr. Armando Peláez Acero**  
Director del ICAP



Avenida Universidad Km. 1 s/n, Exhacienda Aquetzalpa  
Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México; C.P. 43600  
Teléfono: 771 71 72000 ext 2430  
maestria\_agricola\_forestal@uaeh.edu.mx

[www.uaeh.edu.mx](http://www.uaeh.edu.mx)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Instituto de Ciencias Agropecuarias

School of Forestry and Environmental Studies

Maestría en Ciencias y Tecnología Agrícola y Forestal Sustentable

Master's in Sciences and Technology of Agriculture and Forestry

**COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO DEL ICAP**

Actas de la reunión del Comité de Tesis de Maestría en Ciencias y Tecnología Agrícola y Forestal Sustentable

**Apertura:**

La reunión ordinaria para evaluar los avances de la tesis intitulada: "Valorización de hidrolizados de proteína de lana de oveja para el cultivo de *Trichoderma harzianum* y su uso como bioestimulante en forrajes verdes", que desarrolla el estudiante **Carlos Farfán Flores**.

**Asistentes:**

**Dr. Oscar Arce Cervantes**

**Dr. Pablo Antonio López Pérez**

**Dra. Dulce Jazmín Hernández Melchor**

**Dra. Silvia Armenta Jaime**

**Dr. Sergio Hernández León**

**A. Revisión de Trabajo de Tesis**

**Observaciones:**

El comité revisó con antelación el trabajo de tesis en extenso propuesto por **Carlos Farfán Flores**, comunicando al estudiante, el cual realizó oportunamente las correcciones, adiciones y/o modificaciones que debería considerar para mejorar su trabajo y poder continuar con el proceso de obtención de grado. El estudiante atendió de forma conveniente las sugerencias del comité.

**B. Acuerdos**

En esta fecha, se comunica atentamente que el comité conformado por los profesores firmantes, otorgamos nuestra autorización para que el estudiante imprima su trabajo final de tesis, y continúe con los trámites necesarios para la obtención del grado de maestría respectivo.

ATENTAMENTE  
"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"  
Tulancingo de Bravo, Hidalgo a 15 de agosto de 2025

Dr. Oscar Arce Cervantes

Dr. Pablo Antonio López Pérez

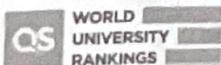
Dra. Dulce Jazmín Hernández Melchor

Dra. Silvia Armenta Jaime

Dr. Sergio Hernández León



Four horizontal lines with handwritten signatures in blue ink, corresponding to the names listed on the left.



Avenida Universidad Km. 1 s/n, Exhacienda Aquetzalpa  
Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México; C.P. 43600  
Teléfono: 771 7172000 ext 2430  
maestria\_agricola\_forestal@uaeh.edu.mx

[www.uaeh.edu.mx](http://www.uaeh.edu.mx)

## Agradecimientos

Quisiera dar gracias a Dios por permitirme lograr esta meta en mi vida, el proceso muchas veces no fue como esperaba, pero hoy sé que tenía que aprender a confiar en tus planes...

También quiero reconocer mi esfuerzo, confianza y obediencia para no rendirme, en el fondo sabía que esto era para mí y tenía que hacer todo lo que estuviera en mi para hacerlo posible.

Aunque definitivamente este logro no solo es mío, gracias a mi familia por siempre estar conmigo y apoyarme, a mis padres gracias por su amor, educación y por darme todas oportunidades para hoy horrarlos... a mis mejores amigos en el mundo mis hermanos los amo... muchas gracias por tantas risas y aventuras juntos.

A mi mejor amiga y novia Rox por siempre escuchar mis problemas a pesar de a veces estar peor que yo, siempre creíste en mi aun cuando yo no lo hacía, te amo...

También quiero agradecer a mis asesores Dr. Oscar, Dr. Pablo, Dra. Silvia y Dra. Dulce, sus consejos, críticas y asesorías que me permitieron desarrollar esta idea, son personas con una excelente humanidad gracias por las oportunidades.

A las personas que encontré en este proceso, a mis compañeros de laboratorio y de la MCTAyFS aprendí mucho de ustedes, a las chicas del LAB ARJAI Biotech, al laboratorio de Biotecnología de alimentos del Dr. Luis Guillermo, por recibir a mi hermano y a mi posteriormente para aprender más sobre los hidrolizados de proteína.

A mi partner de crossfit Enna y al Box de Evolution Crossfit y Evolution Xtreme Fitness por ayudarme a desestresarme cuando la tesis me consumía...

Claro que no podría faltar mi amiga la Biol. Josefina por todas esas veces que me echo ánimos cuando estaba decidiendo hacer mi maestría, las horas de llamadas interminables en la inspección, gracias infinitas.

A la Secretaria de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI), por la beca de manutención otorgada al No. CVU: 1316956.

# Contenido

Índice de tablas .....	v
Índice de figuras .....	v
Glosario de términos, abreviaturas y símbolos .....	viii
Resumen .....	1
Abstract .....	2
Capítulo I: Introducción y Antecedentes .....	3
1.1.    Introducción general .....	3
1.2.    Antecedentes .....	4
1.2.1.    La crianza de ganado ovino .....	4
1.2.2.    Producción de lana .....	4
1.2.3.    Propiedades fisicoquímicas de la lana de oveja .....	6
1.2.4.    Valorización de la lana de oveja en la agricultura .....	7
1.2.5.    Lana como sustrato orgánico .....	7
1.2.6.    Hidrolizados de lana de oveja .....	10
1.3.    Justificación .....	14
1.4.    Objetivos .....	15
1.4.1.    Objetivo general .....	15
1.4.2.    Objetivos específicos .....	15
1.5.    Hipótesis .....	15
Capítulo II. Hidrólisis alcalino-enzimático de lana de oveja. ....	16
Resumen .....	16
Abstract .....	17
2.1.    Introducción .....	18
2.2.    Materiales y métodos .....	19
2.2.1.    Obtención de la lana de oveja .....	19

2.2.2.	Principales propiedades de la lana de oveja .....	19
2.2.3.	Pretratamiento de la lana .....	20
2.2.4.	Hidrólisis alcalino-enzimática .....	21
2.2.5.	Caracterización fisicoquímica y bioquímicas de los hidrolizados.....	21
2.2.6.	Análisis estadístico .....	24
2.3.	Resultados y Discusión .....	24
2.3.1.	Propiedades de la lana de oveja.....	24
2.3.2.	Evaluación preliminar del pretratamiento .....	25
2.3.3.	Hidrolizados alcalino y alcalino-enzimáticos .....	27
2.3.4.	Caracterización fisicoquímica y bioquímica de los hidrolizados .....	28
2.4.	Conclusiones.....	32
Capítulo III: Hidrolizados de lana como fuente de peptona.....		33
Resumen .....		33
Abstract .....		34
3.1.	Introducción.....	35
3.2.	Materiales y métodos .....	36
3.2.1.	Material biológico.....	36
3.2.2.	Prueba de compatibilidad .....	36
3.2.3.	Preparación de los medios de cultivo peptonados .....	36
3.2.4.	Cinética de crecimiento.....	36
3.2.5.	Extracción de conidios.....	37
3.2.6.	Evaluación de la actividad enzimática cualitativa .....	38
3.2.7.	Análisis estadístico .....	38
3.3.	Resultados y Discusión .....	39
3.3.1.	Crecimiento del hongo en hidrolizados de lana.....	39
3.3.2.	Hidrolizados como peptona .....	40
3.3.3.	Evaluación de la conidiación.....	42

3.3.4.	Evaluación actividad enzimática cualitativa.....	44
3.4.	Conclusiones.....	52
Capítulo IV: Evaluación de hidrolizados de lana como bioestimulante .....		53
Resumen .....		53
Abstract .....		54
4.1.	Introducción.....	55
4.2.	Materiales y métodos .....	56
4.2.1.	Ubicación y condiciones experimentales .....	56
4.2.2.	Material vegetal .....	56
4.2.3.	Instalación del experimento .....	56
4.2.4.	VARIABLES DE ESTUDIO .....	57
4.2.5.	Análisis estadístico .....	57
4.3.	Resultados y Discusión .....	57
4.4.	Conclusiones.....	61
Conclusiones generales.....		62
Literatura citada.....		63
Apéndices.....		76
Apéndice A.....		76
Apéndice B.....		76
Apéndice C .....		77
Anexos.....		78
Anexo 1: SDS-PAGE (Laemmli, 1970) .....		78
Anexo 2: T-SDS-PAGE (Schagger y Jagow, 1987).....		79
Anexo 3: Pruebas de actividad enzimática cualitativa .....		80

## Índice de tablas

<b>Tabla 1</b> Principales métodos de compostaje de la lana de oveja. ....	7
<b>Tabla 2</b> Principales usos de la lana de oveja como enmienda del suelo. ....	9
<b>Tabla 3</b> Métodos de hidrólisis de lana de oveja y el efecto de los productos en plantas. ...	11
<b>Tabla 4</b> Análisis elemental de la lana de oveja después del lavado. ....	25
<b>Tabla 5</b> Evaluación del efecto de tensioactivos en la hidrólisis alcalina de lana. ....	26
<b>Tabla 6</b> Eficiencia del proceso hidrólisis de lana de oveja. ....	28
<b>Tabla 7</b> Características fisicoquímicas de los hidrolizados de lana de oveja. ....	28
<b>Tabla 8</b> Contenido elemental de los hidrolizados de lana de oveja. ....	29
<b>Tabla 9</b> Características bioquímicas de los hidrolizados de lana de oveja. ....	30
<b>Tabla 10</b> Análisis químico-proximal de los FVH de avena con una aplicación de 3 g/L de hidrolizados de lana. ....	60
<b>Tabla 11</b> Parámetros estimados al modelo de Gompertz de las cinéticas de crecimiento micelial de <i>T. harzianum</i> . ....	77
<b>Tabla 12</b> La composición de los geles de T-SDS-PAGE. ....	79
<b>Tabla 13</b> Formulación de la solución Winogradski. ....	81
<b>Tabla 14</b> Formulación de la solución de micronutrientes. ....	81

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> Producción nacional de lana (%), y precio (MXN\$/Kg) en los últimos 10 años por estado de la República Mexicana (SIAP, 2023). ....	5
<b>Figura 2</b> Representación estructural de la fibra de lana de oveja desde la macroescala hasta la nanométrica (Lazarus et al., 2021; Wang et al., 2016). ....	6
<b>Figura 3</b> Principales métodos de solubilización y/o extracción de queratina de lana de oveja (Giteru et al., 2023). ....	11
<b>Figura 4</b> Valorización de lana de oveja en la bioestimulación de microorganismos y cultivos de interés agrícola. ....	14
<b>Figura 5</b> Microscopía óptica de la lana de oveja: A) observada a 10x, B) 40 x y C) 100x. 25	
<b>Figura 6</b> SEM de las muestras de lana lavadas con diferentes tensioactivos y su efecto en la morfología de los hidrolizados alcalinos. ....	26

<b>Figura 7</b> SEM de los hidrolizados de lana de oveja obtenidos a través de diferentes procesos.....	27
<b>Figura 8</b> Apariencia de los hidrolizados de lana de oveja; A) hidrolizado alcalino, B) Hidrolizado alcalino-enzimático con Esperase® (HK+E), y C) Hidrolizado alcalino-enzimático con Papaína (HK+P).....	27
<b>Figura 9</b> Perfiles electroforéticos de los hidrolizados alcalino-enzimáticos en SDS-PAGE. ....	31
<b>Figura 10</b> Perfil electroforético de los hidrolizados de lana mediante T-SDS-PAGE. ....	32
<b>Figura 11</b> <i>T. harzianum</i> creciendo en <b>A)</b> M9, <b>B)</b> HK, <b>C)</b> HK+E, <b>D)</b> HK+P (16 d). ....	39
<b>Figura 12</b> <i>T. harzianum</i> <b>A)</b> Velocidad promedio y <b>B)</b> Cinética de crecimiento micelial ....	39
<b>Figura 13</b> Cinéticas de crecimiento de <i>T. harzianum</i> ajustadas al modelo de Gompertz; <b>A)</b> comportamiento del desarrollo micelial a 4 g/L de peptona, <b>B)</b> 6 g/L y <b>C)</b> 8 g/L. ....	41
<b>Figura 14</b> Tasa de crecimiento estimada a partir del modelo de Gompertz de <i>T. harzianum</i> en diferentes fuentes y concentraciones de peptona. <sup>a, b, c</sup> diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre la interacción Tratamiento: Concentración. ....	42
<b>Figura 15</b> Contenido de conidios de <i>T. harzianum</i> en diferentes fuentes y concentraciones de peptona. <sup>a, b, c</sup> diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre la interacción Tratamiento: Concentración.....	43
<b>Figura 16</b> <i>T. harzianum</i> cultivado en diferentes medios de cultivo (10 d).....	44
<b>Figura 17</b> Actividad enzimática cualitativa de <i>T. harzianum</i> después de ser cultivado a 4 g/L de peptona.....	45
<b>Figura 18</b> Actividad enzimática cualitativa de <i>T. harzianum</i> después de ser cultivado a 6 g/L de peptona.....	45
<b>Figura 19</b> Actividad enzimática cualitativa de <i>T. harzianum</i> después de ser cultivado a 8 g/L de peptona.....	46
<b>Figura 20</b> Diámetro del halo de actividad amilolítica de <i>T. harzianum</i> a concentraciones de 4 g/L de fuente de peptona. <sup>a, b, c</sup> diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre la interacción tratamiento: concentración.....	47
<b>Figura 21</b> Diámetro del halo de actividad celulolítica de <i>T. harzianum</i> a concentraciones de 4 g/L de fuente de peptona. <sup>a, b, c</sup> diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre la interacción tratamiento: concentración.....	48
<b>Figura 22</b> Diámetro del halo de actividad quitinolítica de <i>T. harzianum</i> a concentraciones de 4 g/L de fuente de peptona. <sup>a, b, c</sup> diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre la interacción tratamiento: concentración.....	49

<b>Figura 23</b> Diámetro del halo de actividad lipolítica de <i>T. harzianum</i> a concentraciones de 4 g/L de fuente de peptona. <sup>a, b, c</sup> diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre la interacción tratamiento: concentración.....	50
<b>Figura 24</b> Actividad proteolítica de <i>T.harzianum</i> en diferentes fuentes de peptona y a diferentes concentraciones. ....	51
<b>Figura 25</b> Actividad pectinoítica de <i>T. harzianum</i> en diferentes fuentes de peptona y a diferentes concentraciones. ....	51
<b>Figura 27</b> Altura del tallo de los FVH de Avena a los 15 dds. <sup>a, b, c</sup> representan diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre la interacción tratamiento: concentración. ....	58
<b>Figura 26</b> Forraje verde hidropónico de avena a 15 d, tratados en la última etapa de germinación con hidrolizados de lana de oveja.....	58
<b>Figura 28</b> Producción de biomasa fresca de los FVH de Avena a los 15 dds. <sup>a</sup> sin diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre la interacción tratamiento: concentración. ....	59
<b>Figura 29</b> Producción de biomasa seca de los FVH de Avena a los 15 dds. <sup>a, b, c</sup> diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre la interacción tratamiento: concentración. ....	60

Anexo 1 Curva de calibración para determinación de grupo amino primario por el método de TNBS con glicina. ....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Anexo 2 Curva de calibración para determinación de proteína total por el metodo de Bradford con abumina de huevo. ....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

## Glosario de términos, abreviaturas y símbolos

### Abreviaturas

**CE:** conductividad eléctrica

**FI:** Filamentos intermedios

**FVH:** Forraje Verde Hidropónico

**HK:** Hidrolizado alcalino de lana de oveja

**HK+E:** Hidrolizado alcalino-enzimático con Esperase®

**HK+P:** Hidrolizado alcalino-enzimático con Papaína

**HP:** Hidrolizados de proteínas

**MO:** Materia orgánica

**RA:** Residuos agropecuarios

**Ct:** Carbono total

**S-SO<sub>4</sub>:** Azufre en forma de sulfato

**SEM:** Microscopía Electrónica de Barrido (*Scanning Electron Microscopy*)

**SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

**T-SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida con Tricina

**ANOVA:** Análisis de varianza

**TNBS:** Ácido trinitrobencenosulfónico

### Símbolos y unidades

**dS/m:** deciSiemens por metro

**p/v:** Relación peso/volumen

**p/p:** Relación peso/peso

**µg/mL:** Microgramos por mililitro

**mg/cm<sup>3</sup>**: Miligramos por centímetro cúbico

**g/L**: Gramos por litro

**%**: Porcentaje

**°C**: Grados Celsius

**rpm**: Revoluciones por minuto

**μm**: Micrómetro

**MXN**: Moneda nacional mexicana

**nm**: Nanómetro

**kDa**: Kilodalton (unidad de masa molecular)

**t**: toneladas

**GH**: Grado de hidrólisis

**μ<sub>max</sub>**: Velocidad máxima de crecimiento específico

**λ (lambda)**: Fase de latencia o tiempo de adaptación

**A**: Asintótica, crecimiento máximo alcanzado (diámetro radial)

## Resumen

Los residuos ricos en queratina derivados de los sistemas de producción agropecuarios como la lana de oveja representan un riesgo de contaminación ambiental, al ser materiales resistentes a la degradación por factores ambientales, en la mayoría de los casos su eliminación o gestión es limitada y/o inadecuada. Estos residuos representan un reservorio de moléculas de interés biotecnológico, su hidrólisis parcial genera la liberación de moléculas bioactivas como proteínas, péptidos, oligopéptidos y aminoácidos libres. Por lo que, su valorización en aplicaciones agrícolas contribuye al desarrollo sustentable de los sistemas de crianza de ganado ovino. Esta investigación evaluó la liberación de proteínas de bajo peso molecular, péptidos y aminoácidos libres, de un proceso de hidrólisis alcalino-enzimática de lana de oveja. La hidrólisis de este residuo agropecuario mediante un proceso de dos fases genera una solubilización del 90-92% del material, además de favorecer la liberación de moléculas bioactivas como péptidos de 17-11 kDa, con grado de hidrólisis de entre el 39-29%. Posteriormente los hidrolizados de proteína (HP) de lana de oveja se valorizaron como fuente de peptona para el cultivo de *Trichoderma harzianum* y la producción cualitativa de enzimas extracelulares como amilasas, celulasas, quitinasas, lipasas, pectinasas y proteasas del hongo. Su aplicación presenta un alto potencial fuente de N y C para el crecimiento micelial, conidición y estimulación de la actividad enzimática, sin presentar efectos negativos en hongo. Además, se evaluó el efecto de los HP de lana de oveja para promover el crecimiento y mejorar la calidad nutritiva mediante su aplicación foliar en etapa postgerminativa en plántulas de *Avena sativa* L., bajo un sistema de producción de forraje verde hidropónico (FVH). El uso de HP de lana de oveja favoreció el crecimiento vegetal, las plantas tratadas presentaron una longitud del tallo hasta un 8.2 y 9.6 % mayor al control (sin HP), favoreciendo la producción de materia seca, así como mejorar el valor nutritivo del forraje al aumentar el contenido de proteína y cenizas totales. Se concluye que la generación de HP de lana de oveja mediante procesos de hidrólisis alcalino-enzimática representa una estrategia biotecnológica compatible con los modelos de economía circular y desarrollo sostenible para la valorización de este residuo como fuente de peptona en el cultivo de microorganismos de interés agrícola como *T. harzianum* así como su uso en la bioestimulación de FVH de avena.

**Palabras clave:** Hidrolizado de proteína, queratina, bioeconomía, peptonas microbianas y bioestimulantes.

## Abstract

Keratin-rich waste derived from agricultural production systems, such as sheep wool, poses a risk of environmental contamination, as these materials are resistant to degradation by environmental factors. In most cases, their disposal or management is limited and/or inadequate. This waste represents a reservoir of molecules of biotechnological interest, and its partial hydrolysis generates the release of bioactive molecules such as proteins, peptides, oligopeptides, and free amino acids. Therefore, its valorization in agricultural applications contributes to the sustainable development of sheep farming systems. This research evaluated the release of low molecular weight proteins, peptides, and free amino acids from an alkaline-enzymatic hydrolysis process of sheep wool. The hydrolysis of this agricultural waste through a two-phase process generates a solubilization of 90-92% of the material, in addition to promoting the release of bioactive molecules such as 17-11 kDa peptides, with a degree of hydrolysis between 39-29%. Subsequently, sheep wool protein hydrolysates (HP) were valued as a source of peptone for the cultivation of *Trichoderma harzianum* and the qualitative production of extracellular enzymes such as amylases, cellulases, chitinases, lipases, pectinases, and proteases from the fungus. Its application presents a high potential source of N and C for mycelial growth, conidiation, and stimulation of enzymatic activity, without presenting negative effects on the fungus. In addition, the effect of sheep wool HP on promoting growth and improving nutritional quality was evaluated through its foliar application in the post-germination stage in *Avena sativa* L. seedlings under a hydroponic green forage (FVH) production system. The use of sheep wool HP favored plant growth, with treated plants showing stem lengths up to 8.2 and 9.6% greater than the control (without HP), favoring dry matter production and improving the nutritional value of the forage by increasing the protein and total ash content. It is concluded that the generation of sheep wool HP through alkaline-enzymatic hydrolysis processes represents a biotechnological strategy compatible with circular economy and sustainable development models for the valorization of this waste as a source of peptone in the cultivation of microorganisms of agricultural interest such as *T. harzianum*, as well as its use in the biostimulation of oat FVH.

**Key words:** Protein hydrolysate, keratin, bioeconomy, microbial peptones, and biostimulants.

# Capítulo I: Introducción y Antecedentes

## 1.1. Introducción general

La producción de alimentos de manera sostenible es una problemática global, esto se debe a que, la mayoría de los sistemas de producción de alimentos generan una producción de residuos agropecuarios (RA) de los cuales la gestión es limitada y/o inadecuada (FAO, 2024; Koul et al., 2022). El aprovechamiento de RA para la recuperación de proteínas representa una estrategia novedosa en la búsqueda del desarrollo de sistemas de producción más resilientes y sostenibles (Kamal et al., 2021). La lana de oveja que no cumple con las características de calidad como fibra textil se considera un RA de alta disponibilidad. Sin embargo, este material presenta una alta resistencia a la degradación por factores ambientales, así como por ácidos y bases débiles (Shavandi et al., 2017).

La hidrólisis de lana de oveja es una estrategia innovadora que permite el aprovechamiento de este material en distintas áreas de interés biotecnológico; en el sector biomédico como coadyuvantes para la cicatrización de heridas (Ranjit et al., 2022), en la industria alimentaria como suplementos nutricionales (Giteru et al., 2023), en ingeniería de materiales como biopolímeros para el desarrollo de plataformas bioeléctricas (Zhu et al., 2023), así como aplicaciones agrícolas como biofertilizantes y bioestimulantes (Perça-Crişan et al., 2021). Por lo que, el establecimiento de procesos de hidrólisis promueve soluciones ecológicas que permiten la valorización de este material a través de su transformación en un producto con valor agregado.

Una de las aplicaciones poco estudiadas de los hidrolizados de lana de oveja es su uso como peptona en la formulación de sustratos para el cultivo de microorganismos de interés, debido a su alto contenido de compuestos nitrogenados (proteínas, péptidos, oligopéptidos y aminoácidos libres; Taskin et al., 2016). Las peptonas comerciales suelen derivarse del pescado, la leche, carne o soya, presentando altos costos de producción debido su demanda como fuentes de proteína de consumo humano. De acuerdo con Omeroglu et al., (2023), el uso de hidrolizados de lana como fuente de peptona representan una alternativa viable en como sustitutos a los productos comerciales.

Así mismo, el contenido de compuestos (C, N y S) de la lana de oveja (Bhavsar et al., 2017) presenta un alto potencial para ser usado en la producción de cultivos agrícolas. Los HP, son una herramienta biotecnológica emergente en la agricultura ya que sus efectos bioestimulantes como la promoción del crecimiento vegetal, aumento en las características

de calidad y conferir resistencia al estrés abiótico, favorecen el compatible con los sistemas agricultura orgánica (Malécange et al., 2023).

En este trabajo se desarrolló y validó un proceso de hidrólisis de dos fases utilizando lana de oveja, para la obtención de hidrolizados con aplicaciones biotecnológicas como fuente de peptona en el cultivo de *Trichoderma harzianum*, así como bioestimulante en la promoción del crecimiento y mejoramiento de las características de calidad nutricional en la producción de forrajes verdes hidropónicos (FVH).

## **1.2. Antecedentes**

### **1.2.1. La crianza de ganado ovino**

Las ovejas o borregos son animales domésticos criados para la obtención de carne, leche y lana, se estima que en 2023 la población mundial de ganado ovino fue de 1,285 millones de cabezas (IWTO, 2024). La principal actividad que genera ingresos en la crianza de ovinos es producción de corderos para la obtención de carne (Huéscar, 2024).

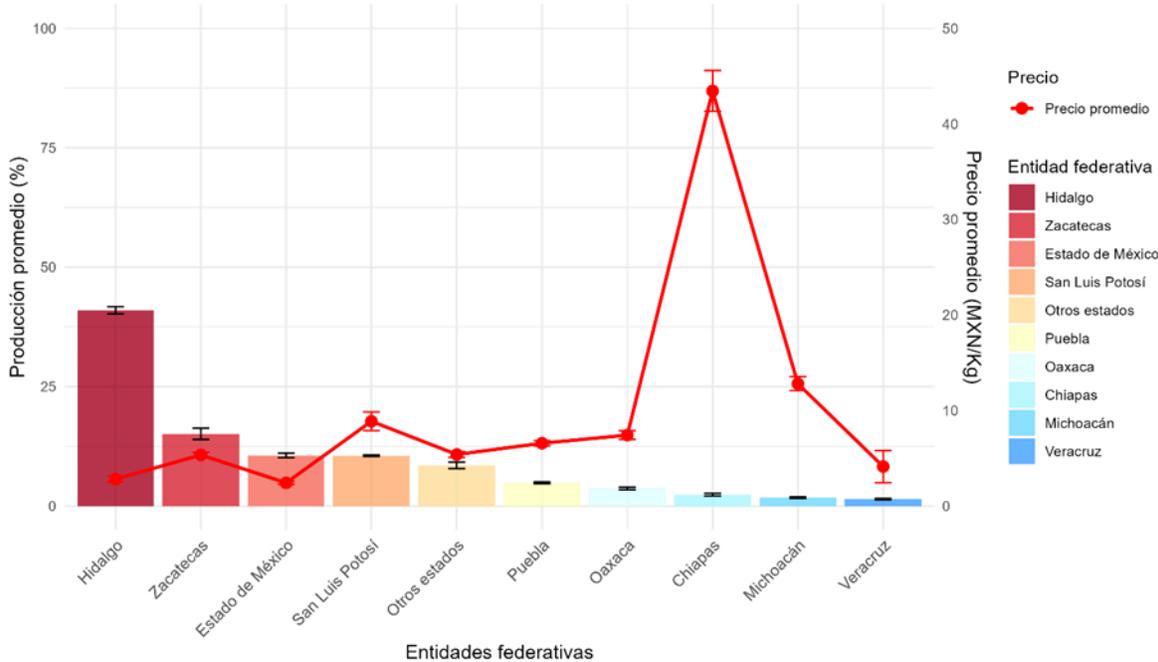
La carne de ganado ovino representa una de las principales fuentes de proteína animal de consumo humano a nivel mundial (Ahmed et al., 2018). En 2023 la producción mundial de esta proteína fue de 11,532,800.89 t de carne fresca o refrigerada, siendo China y Australia los principales productores (FAO, 2024). En México la producción de carne representa una actividad de importancia económica, social y cultural. En 2023 se registró una producción de 68,451.27 t de carne de ganado ovino con un aumento del 1.8% respecto al año anterior, representando el 1% de la carne total producida en el país (SADER, 2024). El estado de México y el estado Hidalgo son los principales productores de esta proteína los cuales aportan el 13 y 10% de la producción total (SIAP, 2024). Por otra parte, la crianza de ganado ovino genera la producción la lana, la cual es una fibra natural con aplicaciones textiles (SADER, 2017).

### **1.2.2. Producción de lana**

La creciente población de ganado ovino para satisfacer el mercado produce miles de toneladas al año de lana de oveja. La valoración de este material se determina por la medida el diámetro del vellón, la cual confiere características deseadas como la finura, suavidad, flexibilidad y resistencia (Russell, 2009). Por lo que, la fibra que no cumple con los estándares de confección, según la legislación europea se considera un residuo de categoría especial 3 (Reglamento (CE) n.º 1069/2009; Tummino et al., 2024).

En 2021 a nivel mundial alrededor de 1200 millones de ovejas produjeron aproximadamente 1,945,200 t de lana cruda para textiles (IWTO, 2024). Los principales países productores de lana son Australia (467,139.57 mil t), China (355,920.84 mil t), y Nueva Zelanda (196,847.71 mil t) (FAO, 2023).

Sin embargo, el mercado para este material refleja un aumento en la oferta de lana de oveja, así como una menor demanda, por lo que, el precio de este material disminuyó, tanto para las fibras finas de merino (17 micras bajaron un 13% en dólares, 19 micras bajaron un 10% y 21 micras bajaron un 6%), como para la lana cruzada (30 a 21 micras) (IWTO, 2024). Para México la producción de lana sucia en 2023 fue de 3,797.227 t, de las cuales el estado de Hidalgo aportó el 41% de la producción total, no obstante, el precio por kilogramo de lana es bajo, siendo un comportamiento similar en los últimos 10 años (**Figura 1**).

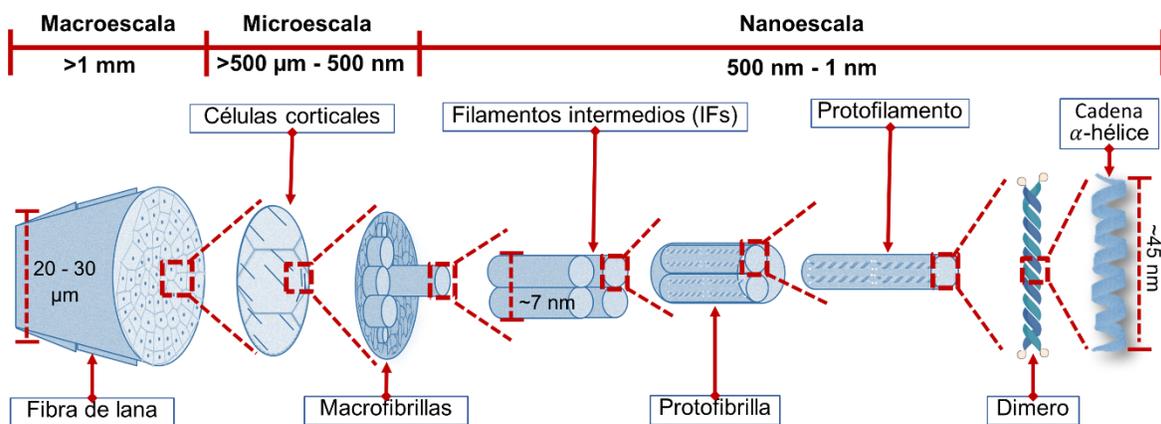


**Figura 1** Producción nacional de lana (%), y precio (MXN\$/Kg) en los últimos 10 años por estado de la República Mexicana (SIAP, 2023).

Debido a lo anterior una gran cantidad de lana de oveja (entre un 95%), que no es apta para su confección, y supone un coste para los ganaderos, se vuelve un residuo (Parlato et al., 2022); el cual al no ser eliminado de manera adecuada es vulnerable a integrarse a los residuos municipales y/o a su incineración al aire libre, generando un riesgo de contaminación ambiental (Russell, 2009).

### 1.2.3. Propiedades fisicoquímicas de la lana de oveja

La fibra de lana es un material biológico que presenta múltiples niveles de organización estructural debido a las interacciones bioquímicas entre sus propiedades fisicoquímicas que la componen (**Figura 2**). Generalmente, entre el 95-98% peso/peso (p/p) de este material son proteínas, siendo las queratinas (proteínas fibrosas con alto contenido en cisteína) el grupo más abundante de esta fibra (hasta un 82% p/p), el resto está formado por proteínas con alto contenido en glicina y tirosina (~17%), y una fracción muy pequeña en compuestos no proteicos (~1%) como lípidos serosos y polisacáridos (Giteru et al., 2023; Ranjit et al., 2022; Rippon, 2013).



**Figura 2** Representación estructural de la fibra de lana de oveja desde la macroescala hasta la nanométrica (Lazarus et al., 2021; Wang et al., 2016).

El alto contenido de queratina proporciona al material una gran estabilidad y propiedades mecánicas específicas debido a la presencia de enlaces disulfuro (S-S) formados por la unión de aminoácidos de cisteína (Su et al., 2020). Esta propiedad genera la formación de matrices poliméricas definidas de materiales ricos en queratina desde la escala nanométrica hasta la macroescala en milímetros (Mattiello et al., 2022).

La unidad más pequeña a nanoescala de la fibra de lana es un grupo de queratinas denominadas α-queratinas, tienen una estructura secundaria en forma de α-hélice (Lazarus et al., 2021). Dependiendo del contenido de azufre, estas estructuras se pueden clasificar en bajo azufre <3% p/p y alto azufre >3% p/p (Ranjit et al., 2022). En la fibra de lana, las queratinas de bajo contenido en azufre se ensamblan en filamentos intermedios (FIs), antes de incrustarse en una matriz interfilamentosa que contiene proteínas asociadas a la queratina (Gong et al., 2016).

Los FIs se forman por la unión de dos moléculas de queratina en conformación  $\alpha$ -hélice mediante enlaces disulfuro, que se agrupan cola con cola formando protofilamentos (de 2 nm de diámetro); dos protofilamentos se asocian lateralmente para formar una protofibrilla; cuatro protofibrillas forman un filamento intermedio (Wang et al., 2016). Los FIs, o microfibrillas, están incrustados en una matriz amorfa de proteínas con alto contenido en azufre, es decir, proteínas con alto contenido de cisteína, prolina, serina y treonina (Huson, 2018). Actuando como estructura básica para las macrofibrillas (~400-500 nm de diámetro), a partir de esta estructura cada sistema queratinoso diverge para cumplir mejor su función específica (Lazarus et al., 2021). La fibra de lana de oveja tiene un alto contenido en FIs (hasta un 95% de queratinas), por lo que se considera un reservorio natural de FIs, que podría tener un gran número de aplicaciones biotecnológicas (Cardamone et al., 2009).

#### **1.2.4. Valorización de la lana de oveja en la agricultura**

La lana de oveja tiene un alto contenido de C (44 %) y N (10-11 %), lo que la convierte en un importante recurso para aportar estos macronutrientes al suelo (Dal Prà et al., 2024). Por lo tanto, sus aplicaciones en la fertilización de cultivos agrícolas van desde; la generación de compost, enmiendas del suelo, fertilizantes orgánicos y bioestimulantes vegetales (Chen et al., 2022).

Por lo que se promueve la reintegración de estos residuos y el aprovechamiento de sus propiedades físicas y químicas para favorecer la producción de cultivos agrícolas (Peřa-Criřan et al., 2021). Sin embargo, este material biológico es susceptible a una biodegradación lenta (Shavandi et al., 2017).

#### **1.2.5. Lana como sustrato orgánico**

El uso de lana de oveja como sustrato tiene un alto potencial para mejorar las propiedades de los suelos cultivados, afectando positivamente al rendimiento de los cultivos (Garbowski et al., 2023; Abdallah et al., 2019a). La fibra de lana es un material rico en nitrógeno que no se descompone fácilmente en el suelo (Tiwari et al., 1989). Por lo que, el proceso de fermentación aeróbica en estado sólido mediado por microorganismos genera compuestos más estables (compost), lo que favorece la formación de niveles aceptables de materia orgánica (MO), para su uso en horticultura y agricultura (Hustvedt et al., 2016; Sánchez et al., 2017). Sin embargo, una de las principales limitaciones de este proceso es la resistencia a la degradación del material (**Tabla 1**).

**Tabla 1** Principales métodos de compostaje de la lana de oveja.

Compostaje de lana de oveja	Características del compost	Fuente
Las pilas, con dimensiones de 1.5 m x 2 m, fueron conformadas mediante la mezcla de lana de oveja (25% p/p), estiércol de caballo o gallina (25% p/p) y paja (50% p/p).	La lana es una fuente rica en N (9.5-10%) y C (44%). Su compostaje presenta temperaturas superiores a 65 °C, ideales para asegurar la higienización del compost. La lana de oveja en proceso de degradación, favorece una relación C/N más equilibrada en comparación al control.	(Lechuga Ardeo, 2022)
Las pilas establecidas consistían en una fuente de N: Lana de oveja (25%), fuente de C: residuos vegetales (50%), y fuente adicional de N: estiércol de caballo, residuos de comida, restos de hiervas (25%).	El proceso de compostaje duro 3 meses, el compost contenía cantidades aceptables de MO (25.3-31.2%) y N (0.9-1-1%), apto para su uso en la horticultura y en la agricultura. Este estudio sugiere que la lana, por si sola, no representa una fuente suficiente de N debido a su lenta degradación.	(Hustvedt et al., 2016)
Las mezclas de lana de oveja (en concentraciones de 1, 2, 3, 4 y 5 % p/p), estiércol fresco de vacuno (10 % p/p) y fosfato (5 % p/p) fue dispuesta en fosas cúbicas cementadas de 0.3 m de lado.	Después de 3 meses el compost tenía un 20.6% de carbono orgánico, un 10% de nitrógeno total y un 2.06% de fosfato. Mostrando una pérdida de peso inicial de 27.3% lo que se consideró un alto nivel de materia descompuesta.	(Tiwari et al., 1989)

El uso de la lana de oveja como una enmienda del suelo tiene diferentes efectos beneficios en la agricultura (**Tabla 2**). Su aplicación ha demostrado una correlación entre la presencia de compuestos nitrogenados en el suelo con respecto al proceso de biodegradación de la lana (Broda et al., 2023). Por lo que, su uso representa una práctica ecológica y de bajo coste para la gestión de estos residuos, que permite la recuperación y reutilización de nutrientes (Palansooriya et al., 2023; Petek y Marinšek Logar, 2021).

El uso de residuos de lana como enmienda en suelos franco-arenosos ha demostrado tener efecto sobre las propiedades físicas como densidad aparente, porosidad y retención de agua (Abdallah et al., 2019b). Así mismo, promueve el crecimiento de las plantas y aumenta el contenido de materia orgánica (MO)(Abdallah et al., 2019a). El uso de este material favorece a las comunidades microbianas benéficas del suelo como los hongos micorrízicos arbusculares, los cuales han demostrado un crecimiento significativo en presencia de residuos de lana y un mayor aporte en el crecimiento de cultivos agrícolas (Palla et al., 2022).

**Tabla 2** Principales usos de la lana de oveja como enmienda del suelo.

<b>Aplicación</b>	<b>Efecto observado</b>	<b>Fuente</b>
Lana de oveja pulverizada con longitud de 2 mm y paletizada con aserrín de abeto (relación 2:1 y 1:1 (v/v)).	Los pellets muestran altos contenidos de N total (1.79 %) y Carbono Orgánico Total (COT) (44.43 %), además de una mayor capacidad de retención de agua. Lo que favorece el rendimiento en el cultivo de tomate y espinaca siendo similar al uso de fertilizantes orgánicos aplicados.	(Dal Prà et al., 2024; Bradshaw y Hagen, 2022)
Residuos de lana procedentes de procesos industriales (lavado y carbonización) agregados en diferentes proporciones residuo/sustrato de 0, 0.5, 1 y 2% p/p.	Los residuos de lana de oveja no presentan un impacto negativo en las comunidades bacterianas del suelo ni en la actividad de los hongos micorrízicos arbusculares nativos del cultivo de olivo. La proporción lana/suelo del 2% p/p reduce la densidad aparente del suelo, aumentando la porosidad total lo que, mejora la capacidad de retención de agua.	( Abdallah et al., 2019b; Palla et al., 2022)
Residuos de lana de oveja (RLO), carbonizados y no carbonizados; en mezclas de suelo con concentraciones de lana (0, 0.5, 1 y 2% p/p).	Todas las mezclas RLO-suelo, mostraron beneficios para el crecimiento en plantas de girasol y la producción de biomasa. En el maíz, lana carbonizada (al 1%), dio lugar a un estado fisiológico óptimo de la planta y la producción, en comparación con el control.	(Abdallah et al., 2019a)

Lana de oveja sin compostar para la formulación de sustratos a concentraciones de 0.67, 1.33 y 2 % p/p lana/sustrato en macetas.	Aumento el rendimiento de 1.7 a 3.5 veces en relación con el control en cultivos de alto valor; caléndula ( <i>Calendula officinalis</i> L.) y la valeriana ( <i>Valeriana officinalis</i> L.). Reportando un mayor contenido de N en los tejidos vegetales y biomasa microbiana.	(Zheljazkov et al., 2008)
Lana de oveja como acolchado 10 g por cada dm <sup>3</sup> de sustrato con un espesor de 5 cm.	Favoreció el número de frutas de tomate por planta hasta un 24.2 % respecto al control, favoreciendo el rendimiento total hasta en un 33%.	(Górecki y Górecki, 2010)

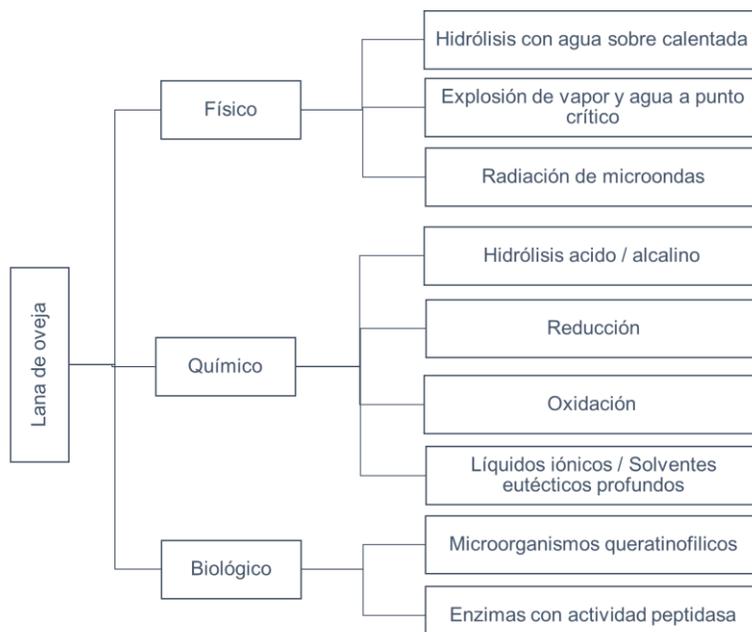
### 1.2.6. Hidrolizados de lana de oveja

La conversión de residuos de lana de oveja en hidrolizados de proteína (HP), a través de procesos respetuosos con el ambiente, representa una estrategia innovadora para la generación de fertilizantes en la agricultura (Sharma et al., 2019). Los residuos ricos en queratina representan una fuente de nutrientes para las plantas (Korniłowicz-Kowalska y Bohacz, 2011); debido al contenido de moléculas bioactivas (proteínas, péptidos y aminoácidos), así como el aporte de macronutrientes (C, N, y S) (Metomo et al., 2024a).

Sin embargo, debido a sus propiedades fisicoquímicas e interacciones bioquímicas es un material resistente a la biodegradación por factores ambientales, es insoluble en agua y, en soluciones ácidas y alcalinas débiles, también, es resistente a la lisis enzimática por proteasas (Shavandi et al., 2017). Por lo anterior, sus usos directos en la agricultura presentan una bioconversión lenta del nitrógeno orgánico en formas disponibles, generando un desajuste en los procesos de absorción de las plantas durante los periodos óptimos (Metomo et al., 2024b).

Actualmente, existe un gran interés en establecer procesos de extracción y/o solubilización de la queratina de la lana de oveja mediante procesos químicos, físicos y biológicos (**Figura 3**), que permitan el uso de los componentes de este material en múltiples aplicaciones biotecnológicas (Giteru et al., 2023). Estos procesos de hidrólisis pueden ser a través de la escisión específica (utilizando enzimas) e inespecífica (métodos químicos y físicos) de los

enlaces intermoleculares o intramoleculares presentes en las moléculas, provocando la solubilización del material (Perça-Crişan et al., 2021).



**Figura 3** Principales métodos de solubilización y/o extracción de queratina de lana de oveja (Giteru et al., 2023).

La hidrólisis de la lana se considera un tratamiento validado, ya que se necesitan reactivos suaves y se registran buenos rendimientos del extracto (Vouvoud et al., 2024). El uso de métodos de solubilización térmica y química de la lana de oveja genera la liberación de compuestos nutricionales, y estos productos han demostrado tener beneficios en la promoción del crecimiento de las plantas para diferentes cultivos (Berechet et al., 2020; Bhavsar et al., 2016; Holkar et al., 2016).

Los procesos de hidrólisis de la lana de oveja y su respuesta en los cultivos se muestran en la **Tabla 3**. Aunque su uso en fertilización ha demostrado tener beneficios en algunos cultivos, cuando se utilizan procesos químicos y térmicos se debe considerar la formación de compuestos no nutritivos a altas temperaturas y el agotamiento de nutrientes por reacciones químicas, como se ha reportado en la solubilización de plumas de pollo (Bhari et al., 2021). Recientes investigaciones sobre hidrólisis microbiana y/o enzimática han hecho posible la solubilización de este material. La liberación de moléculas bioactivas precursoras del metabolismo vegetal, proveen su valorización como bioestimulantes en plantas (Constantin et al., 2022; Gaidau et al., 2021; Calin et al., 2019).

**Tabla 3** Métodos de hidrólisis de lana de oveja y el efecto de los productos en plantas.

Método de hidrólisis	Efecto observado	Fuente
Hidrólisis alcalina con 8% p/p KOH a 85° C en agitación constante durante 3 h.	Las plantas de trigo fueron tratadas con 3 y 5 % (p/v) de los hidrolizados, se observó un aumento de la longitud en las plantas tratadas con la concentración de 5 % de entre el 10.7 y el 18.3%, además de presentar un alto contenido de N (14.39 %) respecto al control con agua.	(Berechet et al., 2020)
Hidrólisis en agua sobrecalentada: rendimiento de hidrólisis de hasta el 98.94% a 187.5 °C durante 367.5 min.	La fitotoxicidad de los productos de la hidrólisis se evaluó mediante una prueba de germinación de semillas de <i>Lepidium Sativum</i> , que mostró una tasa de germinación cercana al 100%. El hidrolizado mostró efectos significativos sobre la biomasa foliar fresca y seca, y el área foliar del maíz a dosis de 1.5 mL administradas en el momento del trasplante.	(Metomo et al., 2024; Bhavsar, et al., 2016)
Hidrólisis alcalina con KOH: NaOH en proporción 14:1, asistida por cavitación acústica frente a un método convencional en autoclave a 120°C a 5 bar durante 15 min de hidrólisis térmica.	La germinación de semillas de trigo aumento hasta un 8.4 % con hidrolizados alcalinos, además, las plántulas presentaron peso seco (84- 34%), superior al control con los productos generados con el método convencional,	(Holkar et al., 2016)
Hidrólisis en dos fases: 1) alcalina (80 °C, 2.5 p/v NaOH, 4 h, agitación, relación sólido-líquido 1:3), 2) enzimática.	Favoreció el crecimiento de las plantas de maíz entre un 8.4-19%. Se observó una buena resistencia frente a <i>Fusarium</i> spp.	(Gaidau et al., 2019, 2021)
La fuente de queratina (Lana de oveja y plumas de pollo), fueron hidrolizados con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 30% durante 4h a 80	Los filtrados del <i>Trichoderma</i> sp cultivado en HP, no presenta efectos negativos en la germinación de semillas de tomate, la aplicación foliar favorece la producción de	(Calin et al., 2019)

°C, posteriormente los hidrolizados obtenidos fueron utilizados para cultivar cepas aisladas de <i>Trichoderma</i> spp.	los	biomasa hasta un 30% superior al control, y promueve una mayor altura en la planta hasta un 96%, así como diámetro de tallo y número de hojas superior hasta un 20%.	
Hidrólisis utilizando <i>Paecilomyces lilacinus</i> 112	microbiana con	El hongo fue capaz de hidrolizar los residuos de queratina. Además de tener un efecto inhibidor frente a hongos fitopatógenos y la producción de metabolitos secundarios que favorecieron el crecimiento de las plantas de tomate.	(Constantin et al., 2022)
Se evaluó la combinación de diferentes geles proteicos; HK-UB obtenido mediante hidrólisis alcalino-enzimática de lana de oveja, HCE-B hidrolizado alcalino-enzimáticamente de cuero bovino y GPU-B mediante hidrólisis térmica de cuero sin curtir.		La combinación de los hidrolizados de; 40 % HK-UB, 40 % HCE-B y 20 % GPU-B, a la concentración de 1 % presento el mayor efecto estimulante donde el índice de germinación fue <100% en el tomate, mientras que el pimiento fue esta concentración la que no presento un efecto inhibitorio.	(Cristea, et al., 2024)

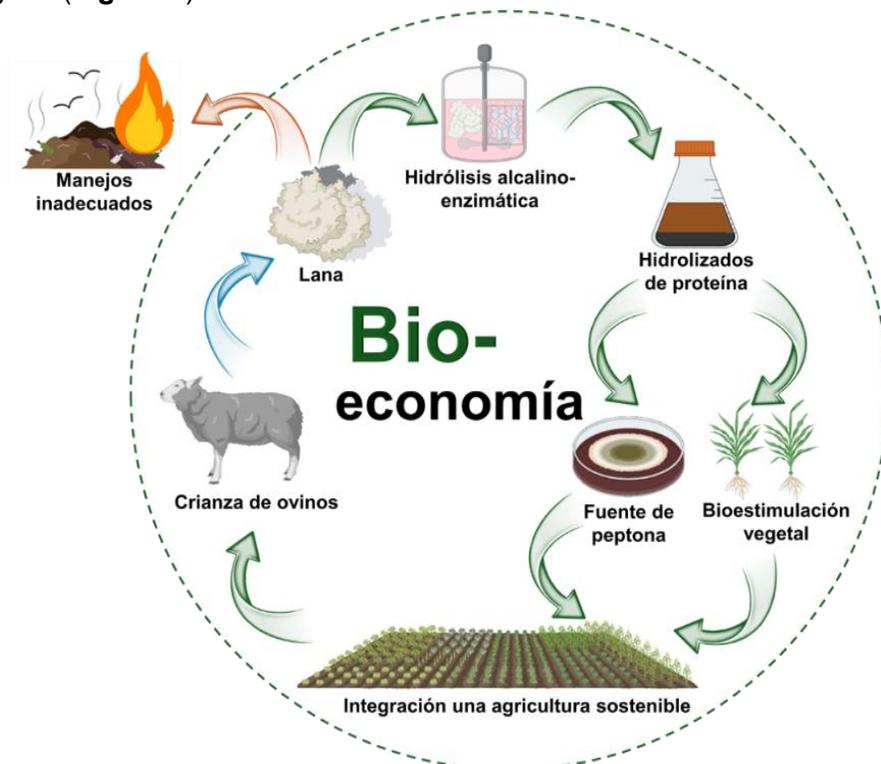
Los hidrolizados de proteínas (HP) de origen animal o vegetal son un grupo de bioestimulantes vegetales (Sani y Yong, 2022). Pueden contener una mezcla de polipéptidos, oligopéptidos y aminoácidos (Schaafsma, 2009). Según el Reglamento (UE) 2019/1009 del Parlamento Europeo y del Consejo, un bioestimulante vegetal es un producto que, independientemente de su contenido en nutrientes, promueve una o más de las siguientes características: 1) eficiencia en el uso de nutrientes, 2) tolerancia al estrés abiótico, 3) características de calidad y 4) disponibilidad de nutrientes inmovilizados en el suelo y/o en la rizosfera.

La hidrólisis de la lana de oveja ha permitido la valorización de esta fibra para la generación de un biofertilizante convencional (aporte mineral). Además, los hidrolizados con fracciones proteicas de menor peso molecular, moléculas aún organizadas (aminoácidos) y ricas en nitrógeno orgánico tienen un efecto bioestimulante que promueve el crecimiento de las

plantas (Gaudau et al., 2021). Algunos hidrolizados microbianos no sólo permiten la solubilización del material, sino que también producen compuestos bioactivos liberados por los microorganismos (fitohormonas), favoreciendo el rendimiento de los cultivos (Constantin et al., 2022; Calin et al., 2019). El uso de HP para la bioestimulación vegetal promete ser una herramienta respetuosa con el ambiente que mejore la sostenibilidad y resiliencia de los sistemas de producción de alimentos (Malécange et al., 2023).

### 1.3. Justificación

La lana de oveja ha sido valorada en los últimos años en la industria textil, sin embargo, la subproducción de por los sistemas de producción de carne ovina, no presentan la calidad suficiente para su uso en la industria considerándose un residuo agropecuario. Este material presenta una alta resistencia a la degradación por factores ambientales, por lo que, su reintegración al suelo es lenta. Debido a esto, es susceptible a manejos inadecuados para su eliminación lo que representa un riesgo de contaminación ambiental. Por lo que, su valoración en la obtención de hidrolizados de proteína representa una estrategia novedosa para el aprovechamiento de este material a través de su transformación en un producto de valor agregado (**Figura 4**).



**Figura 4** Valorización de lana de oveja en la bioestimulación de microorganismos y cultivos de interés agrícola.

El uso de estos hidrolizados de lana de oveja para el cultivo de microorganismos de interés promueve su valoración como fuente de peptona. Las peptonas son una de las principales fuentes de N en la producción de biomasa, por lo que, su uso en la formulación de sustratos para la producción de microorganismos de interés agrícola presenta un potencial económicamente viable. Por otra parte, el uso de los hidrolizados de lana de oveja ha demostrado tener efecto bioestimulante al promover el crecimiento vegetal, sin embargo, la dosis y tiempo de aplicación en cultivos es poco estudiado. Por lo que la evaluación de la concentración y el tiempo de aplicación permitirán promover una agricultura sostenible.

## **1.4. Objetivos**

### **1.4.1. Objetivo general**

- Evaluar el uso de hidrolizados de proteína de lana de oveja obtenidos de un proceso de hidrólisis alcalino-enzimático sobre el crecimiento de *Trichoderma harzianum* y el efecto bioestimulante en la producción de forraje verde hidropónico.

### **1.4.2. Objetivos específicos**

- Implementar un proceso de hidrólisis alcalino-enzimático de lana de oveja para la generación de hidrolizados de proteína con aplicaciones de interés agrícola.
- Caracterizar las propiedades fisicoquímicas y bioquímicas de los hidrolizados de proteína obtenidos a partir de la hidrólisis alcalino-enzimática de lana de oveja.
- Estudiar el efecto de hidrolizados alcalino-enzimáticos de lana de oveja sobre el crecimiento y capacidad enzimática de *Trichoderma harzianum*.
- Evaluar el efecto bioestimulante de hidrolizados alcalino-enzimáticos en la producción de forraje verde hidropónico de *Avena sativa* L. variedad Turquesa.

## **1.5. Hipótesis**

- La obtención de hidrolizados de proteína a partir un residuo agrícola como la lana de oveja mediante un proceso de hidrólisis alcalino-enzimática, generara la liberación de moléculas bioactivas como proteínas solubles, péptidos y aminoácidos.
- El uso de hidrolizados de lana de oveja obtenidos mediante hidrólisis alcalino-enzimática favorecerá el crecimiento de *Trichoderma harzianum*.
- La aplicación de hidrolizados alcalino-enzimáticos de lana de oveja tendrá un efecto bioestimulante en producción de forrajes verdes hidropónicos.

## Capítulo II. Hidrólisis alcalino-enzimático de lana de oveja.

### Resumen

En aumento en la producción de carne ovina para satisfacer la demanda de alimentos saludables y nutritivos, genera la subproducción de lana de oveja en los sistemas de crianza de ganado. La cual, al carecer de propiedades requeridas para su transformación en fibra textil, la lana se acumula en grandes cantidades, lo que plantea un desafío para su manejo y aprovechamiento sustentable. El aprovechamiento de residuos queratinosos mediante la extracción y/o solubilización del material a través de métodos de hidrólisis permite la liberación de compuestos de interés, como proteínas, péptidos y aminoácidos. En este capítulo se evaluó la implementación de un proceso de hidrólisis en dos fases: una fase alcalina (HK), empleando NaOH, y una segunda fase enzimática. En esta última se probaron dos enzimas: Esperase®, proveniente de *Bacillus* sp. con una actividad  $\geq 8$  U/g (HK+E), y una papaína con una actividad  $\geq 10$  U/g (HK+P). Ambas son endopeptidasas de amplia especificidad. El uso de un proceso bifásico presentó un alto grado de hidrólisis de la lana de oveja (29-39%), en comparación con la hidrólisis alcalina (21.1 %), favoreciendo así la actividad de las enzimas endopeptidasas sobre el sustrato parcialmente hidrolizado. Lo que resultó en una mayor presencia de grupos  $-NH_2$  libres en los hidrolizados alcalino enzimáticos ( $10 \pm 0.42$  mg/cm<sup>3</sup> y  $7.52 \pm 0.8$  mg/cm<sup>3</sup>, respectivamente), correspondientes a la presencia de aminoácidos libres o péptidos. El perfil proteolítico de los hidrolizados observado en los geles de SDS-PAGE y Tricina-SDS-PAGE, confirmó la presencia de proteínas de bajo peso molecular entre 17-11 kDa, por lo que, el proceso de hidrólisis de dos fases representa una estrategia viable para hidrólisis de la queratina de lana de oveja, generando la obtención de compuestos bioactivos como proteínas de bajo peso molecular, péptidos, oligopéptidos y aminoácidos libres con potenciales aplicaciones biotecnológicas en la agricultura. Esto contribuye al desarrollo de una bioeconomía basada en el aprovechamiento integral del residuo de la crianza de ganado ovino.

**Palabras clave:** Hidrolizados de proteína, residuos agroalimentarios, bioeconomía, hidrólisis enzimática y compuestos bioactivos.

## Alkaline-enzymatic hydrolysis of sheep wool.

### Abstract

The raising of sheep to satisfy the demand for meat generates wool as a by-product, which, not having suitable characteristics for use as a textile fiber, becomes a highly available waste. The use of keratinous residues by extraction and/or solubilization of the material through hydrolysis methods allows the release of compounds of interest, such as proteins, peptides and amino acids. In this chapter, the implementation of a two-phase hydrolysis process was evaluated: an alkaline phase (HK), using NaOH, and a second enzymatic phase. In the latter, two enzymes were tested: Esperase®, from *Bacillus* sp. with an activity  $\geq 8$  U/g (HK+E), and papain with an activity  $\geq 10$  U/g. Both are endopeptidases of broad specificity. The use of a two-phase process resulted in a high degree of hydrolysis (29-39%) of sheep wool compared to alkaline hydrolysis (21.1%), which favored the activity of endopeptidase enzymes on the partially hydrolyzed substrate. This led to a higher presence of free  $-\text{NH}_2$  groups in the alkaline enzymatic hydrolysates ( $10 \pm 0.42$  mg/ml and  $7.52 \pm 0.8$  mg/ml, respectively), corresponding to the presence of free amino acids or peptides. Subsequently, SDS-PAGE and Tricine-SDS-PAGE confirmed the presence of low molecular weight peptides between 17 and 11 kDa. Therefore, it can be concluded that the two-phase hydrolysis process represents a viable strategy for the recovery of this waste, through the obtaining of bioactive compounds such as low molecular weight proteins, peptides, oligopeptides, and free amino acids with potential biotechnological applications in agriculture. This contributes to the development of a bioeconomy based on the comprehensive use of waste from sheep farming.

**Keywords:** Protein hydrolysates, agri-food waste, bioeconomy, enzymatic hydrolysis, and bioactive molecules.

## 2.1. Introducción

Existen diversos métodos físicos, químicos y/o enzimáticos para la extracción y/o solubilización de queratina de lana de oveja, pueden ser de forma protegida (mayormente específica sin causar daño intramolecular) o desprotegida (poco específica causa daño intermolecular e intramolecular) (Giteru et al., 2023). El establecimiento de un proceso de hidrólisis depende del área de interés biotecnológico como la medicina, alimentación, agrícola y ambiental, entre otras (Zhu et al., 2023; Chen et al., 2022; Perța-Crișan et al., 2021).

Los procesos de hidrólisis para la reintegración al suelo de este RA, generalmente se basan en métodos de hidrólisis físicos y químicos los cuales son perjudiciales para el medio ambiente, ya que en condiciones extremas se genera la destrucción de algunos aminoácidos y representan un gasto energético elevado (Petek y Marinšek Logar, 2021). El uso de enzimas queratinasas provenientes de hongos o bacterias representan una estrategia más ecológica, sin embargo, su producción es limitada, representa un proceso más lento (semanas) en comparación con los métodos fisicoquímicos (días) y la eficiencia en algunos casos es menor debido a la dificultad de estas enzimas proteolíticas de amplia especificidad para romper los enlaces disulfuro (Moktip et al., 2025).

Por lo anterior, se buscan estrategias eficientes y accesibles para la hidrólisis de la lana de oveja. Los procesos de hidrólisis de dos fases como la hidrólisis alcalino-enzimática en donde durante la fase alcalina en condiciones moderadas de NaOH (2.5 %) se rompen los enlaces disulfuro, que posteriormente permiten una mayor actividad de enzimas proteolíticas de amplia especificidad sobre las cadenas peptídicas, resultan ser una alternativa ante la problemática (Gaidau et al., 2019). Estos procesos han demostrado la liberación de compuestos bioactivos como aminoácidos libres y proteínas de bajo peso molecular (Gaidau et al., 2021).

Con base a lo anterior, el objetivo de esta sección es implementar un proceso de hidrólisis de dos fases; la primera fase alcalina generó una hidrólisis parcial de la lana de oveja volviéndola soluble, en la segunda fase se empleó el uso de enzimas proteolíticas como la Esperase® de *Bacillus* spp. y la Papaína, ambas endopeptidasas de amplia especificidad, las cuales hidrolizaron las proteínas de lana de oveja permitiendo la liberación de péptidos, oligopéptidos y aminoácidos con propiedades bioactivas. Además, en esta sección se

caracterizaron las propiedades fisicoquímicas y bioquímicas de los hidrolizados de proteína obtenidos para su valorización en aplicaciones de interés agrícola.

## 2.2. Materiales y métodos

### 2.2.1. Obtención de la lana de oveja

La lana de oveja fue proporcionada por criadores de ganado ovino de raza criolla en el municipio de Emiliano Zapata (19°39'09.15" N; 95°32'08.58" O), estado de Hidalgo, durante el ciclo de esquila realizado en primavera del año 2024. El material no presentó un valor económico para los productores por lo que se consideró un residuo. Se transportó al Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH), ubicado en el municipio de Tulancingo de Bravo, Hidalgo en bolsas de plástico y se almacenó a temperatura ambiente en un lugar fresco y sin humedad.

### 2.2.2. Principales propiedades de la lana de oveja

**Contenido de humedad:** Se pesaron 30 g de lana sucia y se secó en una estufa ventilada a 110 °C durante 4 h, posteriormente se colocó en un desecador por 20 min, y se pesó, el proceso se repitió hasta alcanzar peso constante (Bhavsar, 2018a), los resultados se calcularon utilizando la ecuación (1);

$$\text{Humedad (\%)} = \left( \frac{P_i - P_f}{P_i} \right) \times 100 \quad (1)$$

Donde:

$P_i$  = Peso inicial de la lana

$P_f$  = Peso final de la lana

**Rendimiento de lavado:** Se realizó un lavado con agua de la llave para eliminar restos de excremento, materia vegetal, tierra e insectos, realizándose un secado durante 3-4 días a 40 °C en una estufa con ventilación hasta alcanzar peso constante.

**Contenido de cenizas:** Se pesó 1 g de lana lavada y a peso constante en un crisol de porcelana, posteriormente se carbonizó con un mechero Bunsen, posteriormente se calentaron en una mufla a 800 °C por 4 h hasta obtener cenizas de color blanco grisáceo, a peso constante y se calculó el porcentaje utilizando la ecuación (2).

$$\% \text{ de cenizas} = \left( \frac{W_1 - W_2}{W} \right) * 100 \quad (2)$$

**Donde:**

$W_1$  = Peso del crisol con la muestra calcinada

$W_2$  = Peso del crisol vacío

$W$  = Peso inicial de la muestra

**Análisis elemental:** La determinación de la composición elemental de lana de oveja lavada se realizó por el Laboratorio de Fertilidad de Suelos y Química ambiental del Colegio de Posgraduados Campus Montecillo, donde se determinó por duplicado el porcentaje de nitrógeno total (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), sodio (Na), azufre en forma de sulfato S-SO<sub>4</sub> y carbono total (C<sub>t</sub>).

La determinación de N se realizó mediante la digestión de la muestra con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, arrastre de vapor y destilación. Para el caso de P, K, Ca, Mg, Na y S mediante digestión con HNO<sub>3</sub>+HClO<sub>2</sub> 2:1, la determinación para P se realizó le técnica colorimétrica complejo amarillo de vanadomolibdato. El K y Na se determinó por emisión atómica y para el Ca y Mg por absorción atómica. Mientras que para el S se determinó en forma de S-SO<sub>4</sub> mediante turbidimetría. Para la determinación de C total se realizó una digestión seca a 900 °C en el determinador automático de C (TOC SSM 5050A Shimadzu).

**Morfología lana enjuagada:** Se observaron las estructuras de la lana en un microscopio óptico a 10x, 40x y 100x, posteriormente se utilizó el programa de procesamiento digital ImageJ para medir el diámetro de la fibra.

### 2.2.3. Pretratamiento de la lana

**Enjuague:** Se realizó un enjuague con agua de la llave a una relación (1:50) a 55 °C, en un vaso de precipitado de 2 L con agitación constante durante 5 min, posteriormente se decantó el agua y expreso el exceso de agua.

**Lavado:** Se evaluaron dos tensioactivos: uno aniónico dodecibencenosulfonato sódico (SDBS) y otro aniónico Tween 80, a una concentración de 0.03 mol/L, además de un control con agua. El lavado se realizó a 55 °C en agitación constante durante 60 min, se secaron a 40 °C hasta peso constante y se calculó el rendimiento de lana limpia.

**Hidrólisis alcalina:** Para la determinación del tensioactivo se implementó una prueba de hidrólisis con NaOH al 2.5% p/v, durante 4h a 80 °C en agitación, se decantó durante 24 h, se midió el pH y conductividad eléctrica (CE) utilizando el equipo Thermo Scientific Orion VERSA STAR Advanced Electrochemistry Meter, posteriormente se centrifugó a 6000 rpm durante 15 min.

**Contenido de materia soluble:** El hidrolizado se centrifugó a 6000 rpm durante 15 min, el sobrenadante y el precipitado se separaron para determinar el contenido de materia seca de la fase insoluble secándose a 40 °C durante 2-3 días hasta peso constante.

**Morfología de la lana pretratada:** La lana lavada con los diferentes tensioactivos y la fase insoluble de los hidrolizados fue observada en microscopía electrónica de barrido (SEM) utilizando el equipo Jeol JSM-IT300, para posteriormente evaluar el tamaño y diámetro con ImageJ.

#### **2.2.4. Hidrólisis alcalino-enzimática**

El proceso de hidrólisis consiste en dos fases una alcalina y otra enzimática (Gaidau et al., 2019). La hidrólisis alcalina se realizó con NaOH al 2.5% p/v, durante 4h a 80 °C en agitación y decantó durante 24 h. El pH fue ajustado a 8 con ácido acético (1:10), y se filtró a través de un tamiz de aluminio de No. 32 (tamaño de poro 0.5 mm x 0.5 mm), por lo que el material superior al tamaño de poro se separó (residuos de lana no hidrolizada e impurezas), para su secado a 80 °C hasta peso constante. Mientras que, la fase soluble de la hidrólisis alcalina (HK), se hidrolizo enzimáticamente. Las enzimas evaluadas fueron proteasas: una serina proteasa de *Bacillus* sp. (Esperase®) con actividad  $\geq 8$  U/g a pH 8, y papaína con actividad de  $\geq 10$  U/mg a pH 7. Las condiciones de hidrólisis fueron a 55 °C en agitación constante durante 4 h. Posteriormente se ajustó el pH a 7 con ácido sulfúrico (1:10) y se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 min, el sobrenadante se denominó HK+E para Esperase y HK+P para la papaína, el precipitado se secó a 80 °C hasta peso constante.

#### **2.2.5. Caracterización fisicoquímica y bioquímicas de los hidrolizados**

**Contenido de materia seca:** En cajas Petri de vidrio de 90 mm de diámetro secas a peso constante se agregaron 10 mL de los hidrolizados para su secado a 40 °C en una estufa con ventilación durante 3-4 días hasta alcanzar peso constante.

**Cenizas:** Se determinó conforme al protocolo descrito en el apartado 1.2.2

**Densidad:** Se determinó mediante el uso de un picnómetro de 25 mL seco y a peso constante, el líquido de referencia fue agua destilada a 25 °C, después de pesar el picnómetro con el agua destilada el líquido fue retirado y secado para añadir el líquido a investigar  $m_2$ , la densidad se calculó con la ecuación (3):

$$\rho = \left( \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \right) \rho_{agua} \quad (3)$$

Donde:

$m_0$  = Masa del picnómetro vacío

$m_1$  = Masa del picnómetro con agua

$m_2$  = Masa del picnómetro con el líquido a investigar

$\rho_{agua}$  = Densidad del agua a la temperatura experimental (25 °C)

**Análisis elemental:** La determinación de la composición elemental de los hidrolizados de lana de oveja se realizó por el Laboratorio de Fertilidad de Suelos y Química ambiental del Colegio de Posgraduados Campus Montecillo, donde se determinó por duplicado el porcentaje de nitrógeno total (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), sodio (Na), azufre en forma de sulfato S-SO<sub>4</sub> y carbono total (C<sub>t</sub>) como se describe en el apartado **2.2.2.**

**Proteína total:** Por el método de Bradford (1976), se realizó la curva de calibración utilizando albúmina de huevo como estándar, por lo que se prepararon diluciones al 0, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 µg/mL. Se utilizaron cubetas desechables de plástico de 2.5 mL, se tomaron 800 µL de la dilución y se añadieron 200 µL de reactivo de Bradford, posteriormente se añadió 1 mL de agua destilada, y se incubó por 5 min a temperatura ambiente (25 ± 2 °C). La lectura se realizó en un espectrofotómetro de UV-vis, a 595 nm. Se muestra la curva de calibración (**Apéndice A**). Para la medición de los hidrolizados se realizaron diluciones a 1:100 para tener lecturas dentro de la curva de calibración.

**Grado de hidrólisis (GH):** Se determinó mediante la medición del nitrógeno soluble en ácido tricloroacético (TCA), de acuerdo con el procedimiento descrito por Adler-Nissen (1979). Para la determinación del contenido de proteína hidrolizada se tomaron 500 µL de los hidrolizados y colocaron en un tubo para microcentrífuga de 1.5 mL, posteriormente se centrifugó a 10, 000 rpm durante 10 min. Se tomó una alícuota de 100 µL y se añadieron 100 µL de TCA al 0.44 M, se mezclaron en un vortex durante 30s. Para la determinación

del contenido de proteína total se preparó una dilución 1:1 por lo que, se tomaron 100 µL de agua desionizada y se añadieron 100 µL de la muestra centrifugada, se mezclaron en un vortex durante 30s, a partir de esta dilución se tomó una alícuota de 100 µL y se añadieron 100 µL de agua desionizada y se mezclaron en un vortex durante 30s. Las concentraciones de proteína se midieron utilizando el equipo NanoDrop™ One/One<sup>c</sup> Espectrofotómetro de microvolúmenes de UV-Vis. Posteriormente se calculó el grado de hidrólisis utilizando la ecuación (4):

$$GH(\%) = \left( \frac{\text{Proteína (TCA+Sobrenadante)}}{\text{Proteína (Suspensión hidrolizada)}} \right) \times 100 \quad (4)$$

**Determinación de grupo amino libre:** Previamente a la determinación se preparó una dilución de las muestras hidrolizadas líquidas 1:100 en agua desionizada. El método por el cual se determinaron los grupos aminos primarios (-NH<sub>2</sub>), fue el del ácido trinitrobencensulfónico (TNBS) (Adler-Nissen, 1979).

Se preparó un buffer de fosfatos el cual se componía de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> al 0.019 M y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> al 0.191 M a pH 8.2, posteriormente en tubos de ensayo cubiertos con aluminio se agregaron 2 mL del buffer de fosfatos más 250 µL de la muestra diluida y se mezclaron en un vortex durante 30 s.

El TNBS se preparó al último en un lugar con poca iluminación debido a que el reactivo es fotosensible. Se utilizó al 0.1% (v/v) a partir de una solución comercial al 5 % (p/v), disuelta en buffer de fosfatos en un matraz ámbar aforado de 25 mL. Posteriormente se añadieron 2 mL de la solución TNBS a los tubos de ensayo con la muestra y se incubaron a 50° C durante 1 h. La reacción se detuvo utilizando 4 mL de HCl al 0.1 N y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro UV-vis (Thermo Fisher Scientific) a 340 nm y la concentración de aminoácidos libres se obtuvo a partir de una curva de calibración con glicina la cual se presenta en el (Apéndice B).

**Proteínas de alto peso molecular:** Se determinó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). El gel separador se realizó a una concentración del 15 % T como se describe en el **Anexo 1**, Se utilizó el marcador de peso molecular NZYColour Protein Marker II (adecuado para proteínas con pesos moleculares comprendidos entre 11 a 245 kDa). Las muestras fueron centrifugadas a 10, 000 rpm y se prepararon diluciones 1:20, a partir de ahí se prepararon las muestras utilizando 20 µL de buffer colorante, 40 µL de la dilución de la muestra y 3 µL de β-mercaptoetanol, para ser

desnaturalizadas a 95 °C durante 5 min, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se cargaron 15 µL en cada pozo, las condiciones de corrida fueron de 200 V durante 2 h, y posteriormente se generó la imagen del gel utilizando el equipo Gel Doc™ EZ Imager de BIO-RAD, y se analizó mediante el software Image Lab 6.1.

**Proteínas de bajo peso molecular:** Se determinó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con Tricina-dodecil-sulfato-sódico (Tricina-SDS-PAGE) (Shagger y Jagow, 1987), con un gel separador y espaciador del 15% y 10% de acrilamida, respectivamente (**Anexo 2**). Las muestras se disolvieron (5 µL de hidrolizado y mezclaron con 15 µL de buffer de carga) y se calentaron a 90 °C por 10 min, finalmente se cargaron en los pozos. Se utilizó Tricina en el buffer de corrida, a 75 V durante 3 h.

#### **2.2.6. Análisis estadístico**

Para la caracterización de los hidrolizados fue establecido un diseño experimental completamente al azar, con tres tratamientos (HK, HK+E y HK+P). Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de la confianza del 95%, posteriormente para determinar las diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ), se aplicó una prueba de comparación de medias de Tukey (HSD).

El análisis estadístico fue realizado utilizando el software RStudio (versión 4.4.2), empleando la paquetería agricolae para la prueba de Tukey y ggplot2 para la visualización gráfica de los resultados.

### **2.3. Resultados y Discusión**

#### **2.3.1. Propiedades de la lana de oveja**

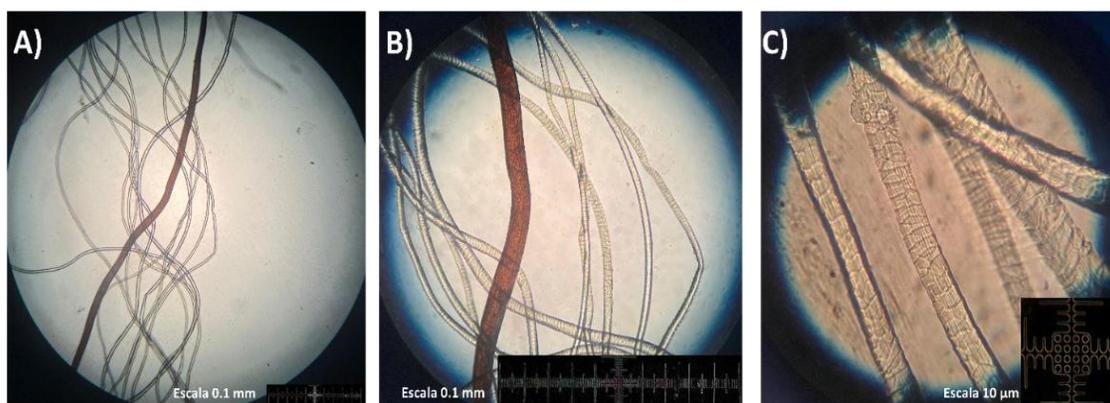
La lana de oveja presentó un contenido de humedad de 6.98 %, lo que es deseable para su almacenamiento (Bhavsar, 2018). El lavado de la lana con agua obtuvo un rendimiento variable ( $56.26 \% \pm 6.71$ ), esto se debe principalmente a las condiciones de crianza, ya que el contenido de impurezas del material como restos vegetales, tierra, y heces acumuladas son variables que adicionan peso a la lana debido a la actividad del animal (Carrillo-Pillajo, 2017). Además, la cantidad de cenizas totales en la lana de oveja lavada ( $1.59 \pm 0.10 \%$ ), representa un bajo contenido de materia inorgánica, lo que corresponde con el análisis elemental (**Tabla 4**), en donde se observa que la mayor composición de la lana de oveja es por materia orgánica (C, N y S), presentando en menor cantidad de materia inorgánica (P, K, Na, Ca y Mg).

**Tabla 4** Análisis elemental de la lana de oveja después del lavado.

Muestra	N	P	K	Ca	Mg	Na	S-SO <sub>4</sub>	C <sub>t</sub>
Lana	14.4	0.02	0.02	0.21	0.07	0.04	1.8	49

\* Los datos son presentados en promedio

El diámetro de esta fibra es un indicador crucial para determinar la calidad y rentabilidad del material por lo que lana >20  $\mu\text{m}$  no presenta un valor en el mercado para cubrir los costes de esquila (IWTO, 2024). La lana empleada en este estudio presentó un diámetro de  $41.99 \pm 6.57 \mu\text{m}$  lo que corresponde a un tipo de lana gruesa (**Figura 5**), debido a esto su comercialización como fibra textil, no representa un rentabilidad por el bajo costo de compra (\$ 6.99 MXN/Kg) (SIAP, 2024).



**Figura 5** Microscopía óptica de la lana de oveja: A) observada a 10x, B) 40 x y C) 100x.

### 2.3.2. Evaluación preliminar del pretratamiento

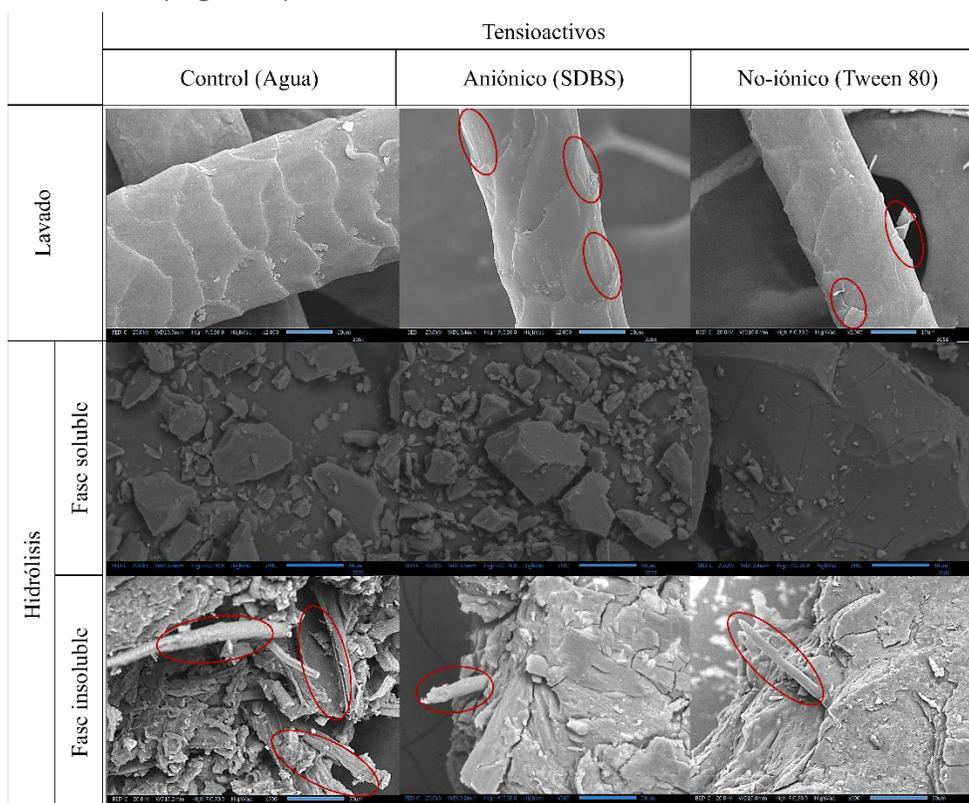
La determinación del pretratamiento se realizó mediante un ensayo utilizando diferentes tensioactivos por duplicado. El tensioactivo con mayor eliminación de impurezas de la lana fue el SDBS ( $23.33 \pm 1.33\%$ ), seguido del Tween 80 ( $23 \pm 3\%$ ) en comparación con el agua ( $14.66 \pm 0.66\%$ ). Además, se observó un daño estructural en la cutícula de la fibra tratada con SDBS, esto se debe a que los tensioactivos aniónicos hidrolizan la cutícula en la corteza la lana (Yoshimura et al., 2003), como se observa en la microscopía electrónica de barrido (**Figura 6**), permitiendo un mayor grado de limpieza y una hidrólisis parcial del sustrato favoreciendo los procesos posteriores. La prueba de hidrólisis alcalina demostró que el uso de tensioactivos aniónicos como el SDBS favorecen el rendimiento de materia soluble ( $98.32 \pm 0.44$ ) (**Tabla 5**).

**Tabla 5** Evaluación del efecto de tensioactivos en la hidrólisis alcalina de lana.

Pretratamiento	pH	CE (mS/cm)	Materia soluble (%)
Agua	7.97 ± 2.13	20.04 ± 1.67	96.93 ± 0.65
SDBS	7.69 ± 4.81	19.48 ± 4.33	98.32 ± 0.44
Tween 80	7.74 ± 6.85	18.25 ± 0.10	97.47 ± 1.38

± representa la desviación estándar

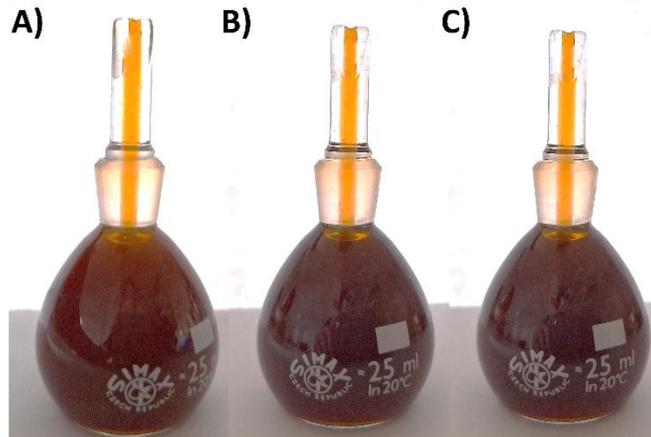
Lo que representa una hidrólisis más eficiente al utilizar tensioactivos aniónicos como pretratamiento a la hidrólisis de lana (Yoshimura y Ohe, 2012). Lo que concuerda con la microscopía electrónica de barrido (SEM) de la fase insoluble de los hidrolizados, en donde el control (agua) presenta una mayor cantidad de estructuras fibrosas en comparación con los tensioactivos (**Figura 6**).



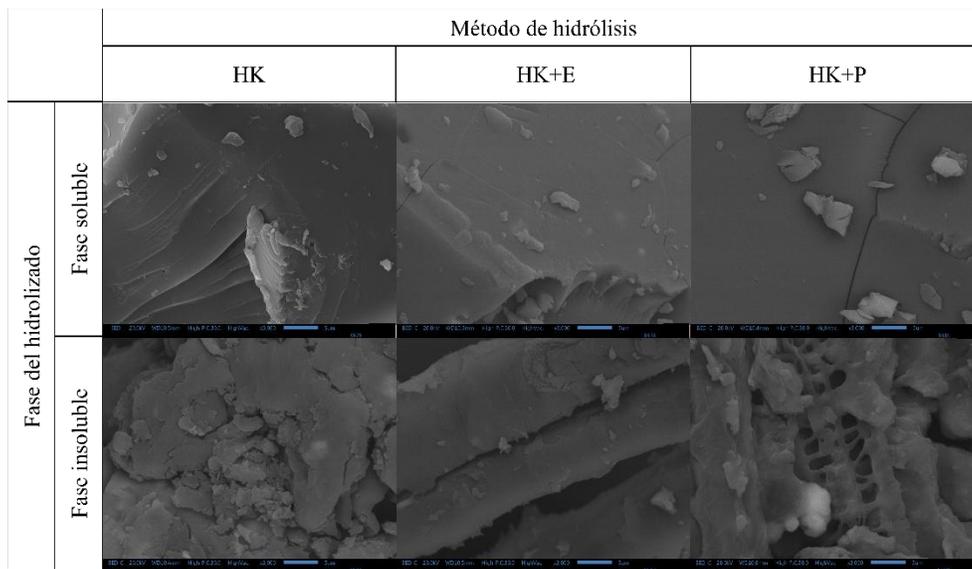
**Figura 6** SEM de las muestras de lana lavadas con diferentes tensioactivos y su efecto en la morfología de los hidrolizados alcalinos.

### 2.3.3. Hidrolizados alcalino y alcalino-enzimáticos

El presente estudio se enfocó en obtener la mayor cantidad de materia soluble de lana de oveja, por lo que se obtuvieron por triplicado los hidrolizados, los cuales se etiquetaron como HK: hidrolizado alcalino (SDBS), HK+E: hidrolizado alcalino-enzimático con Esperase®, HK+P: con Papaína (**Figura 7**).



**Figura 8** Apariencia de los hidrolizados de lana de oveja; A) hidrolizado alcalino, B) Hidrolizado alcalino-enzimático con Esperase® (HK+E), y C) Hidrolizado alcalino-enzimático con Papaína (HK+P).



**Figura 7** SEM de los hidrolizados de lana de oveja obtenidos a través de diferentes procesos.

Los hidrolizados fueron centrifugados y se obtuvieron dos fases con diferente peso, por lo que se secaron las muestras a 40° C y se analizaron mediante SEM (**Figura 8**). Se observó que la fase no soluble prestaba una mayor cantidad de estructuras fibrosas, lo que

representa el material no hidrolizado el cual puede ser aprovechado para aplicaciones de compostaje o como enmienda del suelo. La hidrólisis alcalino-enzimática obtuvo la mayor cantidad de materia soluble hasta el 90 a 92 %, en comparación con la hidrólisis alcalina la cual obtuvo el 87% (**Tabla 6**). El tratamiento HK+E presentó una mayor cantidad de materia seca (17.6 %), en comparación con la reportada por Gaidau et al., (2019) del 10-11 %, lo que se puede atribuir al uso un tensioactivo aniónico, ya que Yoshimura y Ohe, 2012, mencionan que el uso de un pretratamiento con tensioactivos aniónicos como el SDBS en comparación con los no iónicos favorecen la actividad enzimática de las proteasas en la hidrólisis de lana.

**Tabla 6** Eficiencia del proceso hidrólisis de lana de oveja.

Contenido	HK	HK+E	HK+P
<b>Materia soluble (%)</b>	87.36 ± 0.59 <sup>b</sup>	92.19 ± 1.05 <sup>a</sup>	90.62 ± 1.05 <sup>a</sup>
<b>Materia seca (%)</b>	16.9 ± 0.04 <sup>b</sup>	17.6 ± 0.069 <sup>a</sup>	16.8 ± 0.005 <sup>b</sup>

<sup>a, b</sup> Literales en la misma fila representan diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre tratamientos.

#### 2.3.4. Caracterización fisicoquímica y bioquímica de los hidrolizados

Los resultados fisicoquímicos de los hidrolizados obtenidos mediante hidrólisis alcalina (HK) y alcalino-enzimática (HK+E y HK+P) se presentan en la **Tabla 7**. El contenido de cenizas totales de los hidrolizados alcalino-enzimáticos fue menor al contenido de la fase alcalina, lo que se puede deber al bajo contenido de elementos alcalinotérreos como el Ca y Mg los cuales se encuentran presentes en bajas cantidades (**Tabla 8**), generando que el S y P solubles presentes conviertan a sus óxidos y se pierdan por volatilización (FAO, 1994).

**Tabla 7** Características fisicoquímicas de los hidrolizados de lana de oveja.

Característica	HK	HK+E	HK+P
<b>Cenizas totales (%)</b>	11.8 ± 0.28 <sup>a</sup>	10.3 ± 0.49 <sup>b</sup>	10.2 ± 0.14 <sup>b</sup>
<b>Densidad a 25° C (g/cm<sup>3</sup>)</b>	1.06 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.05 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.050 ± 01 <sup>a</sup>
<b>pH</b>	8.05 ± 0.02 <sup>a</sup>	8.13 ± 0.47 <sup>a</sup>	7.46 ± 0.32 <sup>a</sup>
<b>CE (dS/m) a 25° C</b>	2.79 ± 0.13 <sup>a</sup>	3.20 ± 0.27 <sup>a</sup>	3.10 ± 0.18 <sup>a</sup>

<sup>a, b</sup> Literales en la misma fila representan diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre tratamientos.

En general los hidrolizados presentaron un mayor contenido de materia inorgánica con respecto a la lana de oveja ( $1.59 \pm 0.10$  %), lo que resulta similar con los valores reportados por Gaidau et al. (2021). El análisis elemental (**Tabla 8**) reportó un alto contenido de Na (5.6 %), en los hidrolizados el cual aumentó en comparación con las muestras de lana sin hidrolizar (0.04 %), esto debido al uso de NaOH en la hidrólisis alcalina. Por otra parte, se observa que los hidrolizados de lana presentan un alto contenido de macroelementos totales como lo es el C (45 %) en donde se observó un contenido similar para todos los tratamientos, para el caso del nitrógeno HK presento un valor más alto (12.2 %) similar al HK+E (12 %), así mismo para HK y HK+E obtuvieron el mayor contenido de S (1.3%), la presencia e P y K fue menor y similar para todos los tratamientos, así como también presenta microelementos como Ca en donde los hidrolizados HK+E y HK+P presentan un mayor contenido (0.22 %) en comparación con HK (0.19 %), lo que puede ser resultado de la liberación de péptidos con potencial quelante debido a la presencia de pares de electrones solitarios para combinarse con iones metálicos (Tian et al., 2021), como los es el Ca y Mg.

**Tabla 8** Contenido elemental de los hidrolizados de lana de oveja.

Muestra	N	P	K	Ca	Mg	Na	S-SO <sub>4</sub>	C <sub>t</sub>
HK	12.2	0.02	0.02	0.19	0.04	5.62	1.3	45
HK+E	12.0	0.01	0.02	0.22	0.05	5.60	1.3	45
HK+P	11.4	0.01	0.04	0.23	0.06	5.85	0.9	45

Datos reportados en promedio

La densidad de los hidrolizados (**Tabla 7**) indica una concentración moderada de compuestos solubles generados durante el proceso de hidrólisis. Estos valores son similares a los reportados en un proceso de hidrólisis de lana de oveja mediante hidrólisis térmica por Nelly Noah Metomo et al. (2024), estos valores sugieren que los hidrolizados poseen densidad adecuada para su aplicación en formulaciones líquidas. En cuanto al pH, los hidrolizados presentaron valores alcalinos, con valores entre 7.46 y 8.13, estos valores son aceptables para aplicaciones agrícolas, según lo establecido por la NOM-021-SEMARNAT-2002. Sin embargo, la conductividad eléctrica (CE) fue alta en todos los tratamientos lo que indica una elevada concentración de sales solubles. Nelly Noah Metomo et al. (2024)a, sugiere que esto se debe al contenido de aminoácidos libres, péptidos y

oligopéptidos con carga positiva y negativa de los hidrolizados, lo que les permite formar iones en solución. Dado que este valor no excede el umbral de salinidad del suelo (4 dS/m) establecido por la NOM-021-SEMARNAT-2002, su uso como biofertilizante o bioestimulante es aceptable ya que no genera un riesgo de salinización (Gaidau et al., 2021; Nelly Noah Metomo et al., 2024b).

La caracterización bioquímica de los hidrolizados (**Tabla 9**), confirma la presencia de un alto contenido de proteína (24-33 mg/mL), siendo HK el cual presentó el mayor contenido de proteína total ( $33.34 \pm 1.12$  mg/mL), mientras que los hidrolizados alcalino-enzimáticos presentaron el menor contenido proteico (HK+E;  $24.13 \pm 0.37$  mg/mL y HK+P;  $25.41 \pm 0.58$  mg/mL), lo que sugiere que uso de enzimas endopeptidasas como la Esperase® y la papaína favorecieron el proceso de hidrólisis de la proteína total.

**Tabla 9** Características bioquímicas de los hidrolizados de lana de oveja.

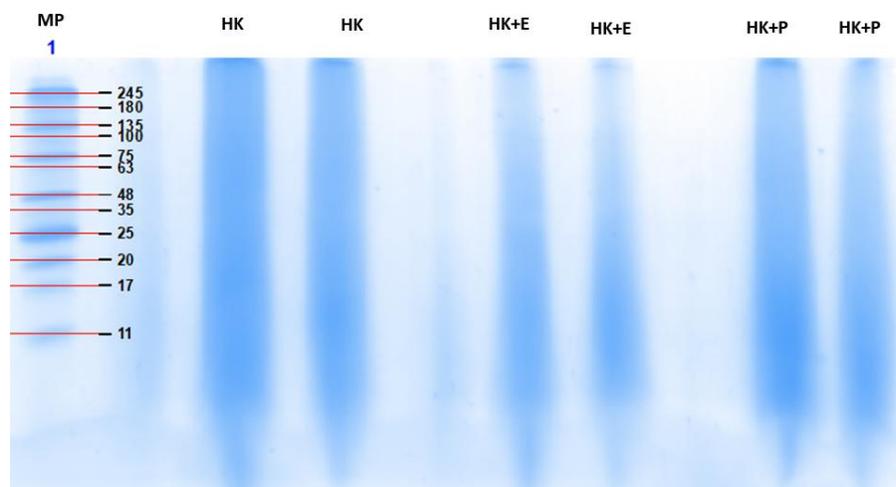
Característica	HK	HK+E	HK+P
<b>Proteína total (mg/mL)</b>	$33.34 \pm 1.12^a$	$24.13 \pm 0.37^b$	$25.41 \pm 0.58^b$
<b>Nitrógeno soluble (mg/mL)</b>	$2.52 \pm 0.27^b$	$6.21 \pm 0.62^a$	$4.97 \pm 0.58^a$
<b>Grado de hidrólisis (%)</b>	$21.1 \pm 2.91^c$	$39.9 \pm 0.93^a$	$29.9 \pm 3.8^b$
<b>Grupo amino primario (mg/mL)</b>	$6.11 \pm 0.82^b$	$10 \pm 0.42^a$	$7.52 \pm 0.82^b$

a, b, c Literales en la misma fila representan diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre tratamientos.

Al realizar la precipitación de las proteínas por TCA, el contenido de nitrógeno soluble fue mayor en los hidrolizados alcalino-enzimáticos ( $6.21 \pm 0.62$  mg/mL y  $4.97 \pm 0.58$  mg/mL, HK+E y HK+P respectivamente) respecto a HK. El tratamiento con Esperase® (HK+E), presentó hasta un 89.09 % mayor grado de hidrólisis en comparación a la hidrólisis alcalina (HK), por otra parte, el uso de la papaína generó grado de hidrólisis del 41.7 % superior a HK. La técnica de TNBS permitió la cuantificación de grupos amino primarios libres ( $-NH_2$ ) presentes en aminoácidos y cadenas peptídicas, siendo los hidrolizados alcalino-enzimáticos los cuales presentaron el mayor contenido de grupo amino primario, confirmando una liberación de compuestos como aminoácidos, péptidos y oligopéptidos, debido a que las enzimas proteolíticas interactúan sobre el sustrato (Islas-Martínez et al., 2023).

La hidrólisis con HK+E fue el tratamiento con mayor grado de hidrólisis igual a  $39.9 \% \pm 0.93$ , además de presentar un alto contenido de aminoácidos libres ( $10 \pm 0.42 \text{ mg/mL}$ ), esto se debe a que la enzima Esperase® es una enzima endopeptidasa de amplia especificidad con actividad alcalófila (pH de 8-12), que incide en aminoácidos como la fenilalanina (Phe), la alanina (Ala) y la Leucina (Leu) (Georgieva et al., 2001). La lana de oveja presenta un mayor contenido de estos aminoácidos (2.9 %, 5.4 % y 7.7 %), respectivamente (Huson, 2018; Lewis & Rippon, 2013). Por lo que, a mayor grado de hidrólisis existe un mayor contenido de grupos amino primarios libres y un menor contenido de proteína total.

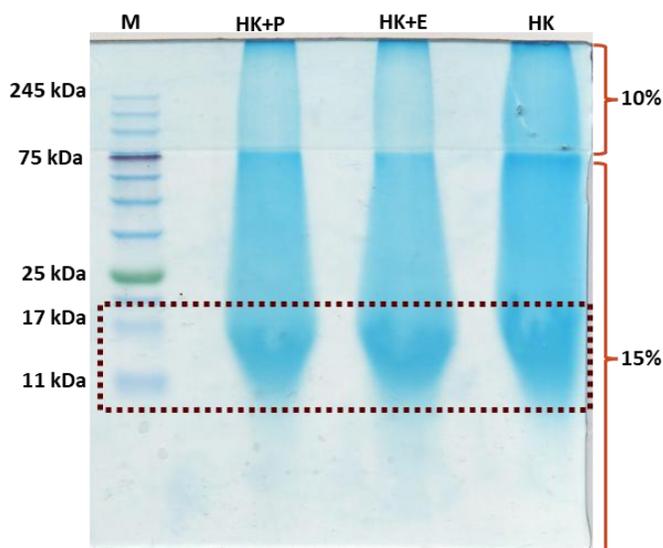
Por otra parte, el grado de hidrólisis con Papaína fue significativamente menor en comparación con la Esperase ( $29.9 \% \pm 3.8$ ) y presentó un menor contenido de aminoácidos libres ( $7.52 \pm 0.82 \text{ mg/mL}$ ), los cuales fueron estadísticamente similares a la hidrólisis alcalina ( $6.11 \pm 0.82 \text{ mg/mL}$ ). Esto se debe a que la enzima papaína es una enzima endopeptidasa con actividad preferente en pH ácidos de 6.5, la cual escinde preferentemente enlaces peptídicos que involucran aminoácidos básicos, como la arginina (Arg) o la lisina (Lys), que llevan una gran cadena lateral hidrofóbica en la posición P2 (Tacias-Pascacio et al., 2021). Sin embargo, la lana de oveja presenta un menor contenido de estos aminoácidos 6.9% y 0.9%, respectivamente (Nelly Noah Metomo et al., 2024). Por lo que, el uso de la enzima papaína no presentó alta eficiencia en la hidrólisis de la fase alcalina, posteriores investigaciones deberán de considerar el uso de enzimas serinas endopeptidasas comerciales, como las subtilisinas (Giteru et al., 2023).



**Figura 9** Perfiles electroforéticos de los hidrolizados alcalino-enzimáticos en SDS-PAGE.

El perfil proteolítico de los hidrolizados en SDS-PAGE (**Figura 9**), muestra que la presencia de barridos de proteínas, siendo la hidrólisis alcalino-enzimática con Esperase® (HK+E), en

donde se observó la presencia de proteínas de pesos moleculares entre 60-30 kDa, así como con papaína (HK+P), los cuales corresponden a los monómeros de queratina de lana de oveja reportados por Clerens et al. (2010). Además, se observaron proteínas de bajo peso molecular ( $\leq 11$  kDa), lo que coincide con la Tricina-SDS-PAGE (**Figura 10**) de los hidrolizados en donde se observó un barrido con pesos moleculares de entre 17 a 11 kDa, similares a los observados en la SDS-PAGE. Estos valores corresponden a los valores obtenido por Verdnik et al. (2021), mediante un proceso de hidrólisis térmico de lana de oveja con pesos de entre 14-4 kDa, consecuencia de la degradación de la proteína a péptidos de bajo peso molecular.



**Figura 10** Perfil electroforético de los hidrolizados de lana mediante T-SDS-PAGE.

## 2.4. Conclusiones

El proceso de hidrólisis alcalino-enzimática en dos fases mostró ser una estrategia viable para la degradación de lana de oveja, logrando una alta solubilización (90-92 %) y liberación de compuestos proteicos bioactivos. El pretratamiento con un tensioactivo biodegradable aniónico facilitó la eliminación de impurezas y preparó la estructura de la lana para una posterior hidrólisis enzimática más efectiva. Los hidrolizados contienen péptidos y aminoácidos libres, los cuales presentan un alto potencial para su investigación y aplicación en biotecnología, como lo es la determinación de bioactividades y su uso en la bioestimulación de cultivos agrícolas, así como, como fuente de peptonas para microorganismos de interés agrícola. Estos resultados respaldan el potencial del enfoque del presente proyecto para valorizar residuos agropecuarios, contribuyendo así a la sostenibilidad y economía circular en el sector agrícola.

## Capítulo III: Hidrolizados de lana como fuente de peptona

### Resumen

Las fuentes de nitrógeno orgánico utilizadas en la producción de biomasa microbiana suelen representar un costo significativo en la formulación de medios de cultivo. En este contexto, el aprovechamiento de residuos agropecuarios ricos en proteínas de alta disponibilidad, como la lana de oveja, se presenta como una alternativa viable para la obtención de peptonas accesibles para uso microbiano. En este capítulo se evaluó el efecto de hidrolizados alcalinos (HK) y alcalino-enzimáticos (HK+E y HK+P) de lana de oveja sobre el crecimiento de *Trichoderma harzianum*, como fuente única de carbono y nitrógeno en medio sólido, así como fuente de peptona en medios de cultivo suplementados con 4, 6 y 8 g/L de hidrolizados de lana. Los resultados indican que dichos hidrolizados favorecen la producción de biomasa y estructuras reproductivas asexuales (conidios), además de estimular la actividad enzimática amilolítica, celulolítica y lipolítica de la cepa evaluada. La valorización de la lana de oveja para la obtención de peptonas para el cultivo de microorganismos de interés agrícola representa una estrategia de bioeconomía para la generación de productos con valor agregado aplicados al desarrollo de insumos agrícolas.

**Palabras clave:** Peptona, Hidrolizados de proteína, *Trichoderma* y enzimas extracelulares.

## Wool hydrolysates as a source of peptone

### Abstract

The sources of organic nitrogen used in the production of microbial biomass usually represent a significant cost in the formulation of culture media. In this context, the utilization of agricultural residues rich in highly available proteins, such as sheep wool, is presented as a viable alternative for obtaining accessible microbial peptones. In this chapter, the effect of alkaline (HK) and alkaline-enzymatic (HK+E and HK+P) sheep wool hydrolysates on the growth of *Trichoderma harzianum*, as a sole source of carbon and nitrogen in solid medium, as well as a source of peptone in culture media supplemented with 4, 6 and 8 g/L of wool hydrolysates, was evaluated. The results indicate that these hydrolysates favor the production of biomass and asexual reproductive structures (conidia), in addition to stimulating the amylolytic, cellulolytic and lipolytic enzymatic activity of the strain evaluated. The valorization of sheep wool to obtain peptones for the cultivation of microorganisms of agricultural interest represents a bioeconomy strategy for the generation of value-added products applied to the development of agricultural inputs.

**Key words:** Peptone, Protein hydrolysates, *Trichoderma* and extracellular enzymes.

### 3.1. Introducción

El uso de microorganismos en la agricultura ha incrementado en los últimos años, debido a su uso como biofertilizantes para promover el crecimiento vegetal, así como para el control biológico de plagas y enfermedades (Avila et al., 2021). No obstante, la formulación de bioinoculantes que aseguren la estabilidad funcional del microorganismo y, al mismo tiempo, resulten rentables representa un aspecto clave en su producción (Kumar et al., 2022). En las últimas décadas el uso de bioinsumos en la agricultura ha aumentado y se prevé que en 2026 se alcanzará los 18,500 millones de USD, siendo los bioplaguicidas (54%), bioestimulantes (28%) y biofertilizantes (18%) los principales insumos utilizados en las prácticas agrícolas (Bullor et al., 2023).

*Trichoderma harzianum* es el hongo mayormente utilizado en la agricultura como agente de biocontrol, promotor del crecimiento vegetal e inductor de una respuesta favorable a estrés abiótico (Jin y Alberti, 2025; Saha et al., 2025). Debido a esto existe un gran interés en la utilización de productos eficientes y rentables a base de *Trichoderma*. Las condiciones de cultivo de *Trichoderma* son un factor clave que influye en la producción de biomasa y enzimas extracelulares (Hernández-Melchor et al., 2019).

Las fuentes de nitrógeno orgánico, como la peptona, el extracto de levadura y el extracto de malta, suelen ser uno de los componentes más costosos de los medios de crecimiento microbiano (Li et al., 2009; Vázquez et al., 2020). Sin embargo, su uso es fundamental para el crecimiento y la producción de energía, ya que desempeñan un papel fundamental en el metabolismo celular y transporte de electrones (Saeed et al., 2025).

Algunas especies de *Trichoderma* como *asperellum* y *atroviride* han demostrado tener la capacidad de crecer sobre queratina hidrolizada como única fuente de C y N (Calin et al., 2019). Además, el uso de hidrolizados de lana de oveja en el crecimiento de hongos como *Aspergillus niger* han demostrado un alto potencial sobre la producción de enzimas extracelulares como amilasas, celulasas y lipasas (Omeroglu et al., 2023). Algunas de estas enzimas son producidas por *T. harzianum*, las cuales se encuentran involucradas en mecanismos de actividad antagonista del hongo (Ordoñez-Valencia, 2014).

En este contexto, la implementación de fuentes de peptona alternativas como los hidrolizados de lana de oveja resultan una opción para la producción de microorganismos de interés agrícola. Por lo que el objetivo de este capítulo fue estudiar el uso de hidrolizados de lana de oveja como fuente de peptona para el cultivo de *T. harzianum*, así como su

efecto en la producción de enzimas extracelulares (amilasas, celulasas, quitinasas, lipasas, proteasas y pectinasas).

## **3.2. Materiales y métodos**

### **3.2.1. Material biológico**

La cepa *Trichoderma harzianum* SIC 5 fue donada por el Colegio de Posgraduados Campus Montecillo del Departamento de Edafología. La reactivación del hongo se realizó tomando un bocado de 5mm de diámetro aproximadamente de crecimiento activo del hongo para ser inoculado en cajas Petri de 90 mm de diámetro con medio de cultivo PDA, posteriormente fue incubado a 28 ° C durante 8 días.

### **3.2.2. Prueba de compatibilidad**

Se realizó una prueba para determinar si el hongo era capaz de utilizar como única fuente de C y N los hidrolizados de lana de oveja, por lo que se utilizaron medios de cultivo sólidos en donde el medio mínimo de sales (M9) fue el control negativo donde la fuente de N fue  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a 5 g/L, posteriormente se prepararon los medios con hidrolizados de lana de oveja (HK, HK+E y HK+P), como única fuente de C y N a una concentración de 5 % (v/v), y 15 g/L de agar (Calin et al., 2019). Se tomó un bocado de crecimiento activo del hongo y se inoculó al centro de la caja Petri de 90 mm de diámetro. A continuación, al reverso de la caja se trazaron 3 vectores y se midió el tamaño inicial de inóculo, posteriormente se inoculó a 28 ° C durante 11 días midiendo cada 24h el crecimiento micelial.

### **3.2.3. Preparación de los medios de cultivo peptonados**

Se utilizaron cuatro fuentes de peptona; como control positivo, peptona de caseína (P); el HK, Hidrolizado alcalino; HK+E, Hidrolizado alcalino-enzimático con Esperase® y HK+P con Papaína a tres concentraciones 4, 6 y 8 g/L, el medio de cultivo se constituían de 20g/L de dextrosa más la fuente de peptona, además, se consideró como blanco el medio de cultivo PDA. Se midió el pH de los medios de cultivo ( $6.62 \pm 0.22$ ), posteriormente se añadieron 15 g/L de agar, se esterilizaron a 121 ° C durante 15 min y se vaciaron en cajas Petri de 90 mm.

### **3.2.4. Cinética de crecimiento**

El experimento se realizó con cuatro repeticiones por tratamiento, se tomó un bocado de crecimiento activo del hongo y se inoculó en los medios de cultivo. Posteriormente se

trazaron 3 vectores como referencia y se midió el diámetro del bocado con un Bernier, posteriormente se incubaron a 28° C y se tomaron las medidas del crecimiento micelial cada 24 h durante 7 días.

Para describir la cinética de crecimiento, los datos fueron ajustados a un modelo modificado de Gompertz (Zwietering et al., 1990), el cual se expresa mediante la ecuación (4).

$$y(t) = A * \exp \left( -\exp \left( \frac{\mu_{m\acute{a}x} * e}{A} (\lambda - t) + 1 \right) \right) \quad (4)$$

Donde:

A= El valor máximo de crecimiento (asintótico)

$\mu_{m\acute{a}x}$ = La tasa máxima específica de crecimiento

$\lambda$  = el tiempo de adaptación o “fase lag”

El ajuste al modelo matemático se realizó con el software R ejecutado a través del entorno RStudio. Debido a la naturaleza no lineal del modelo modificado de Gompertz, el ajuste de los parámetros del modelo ( $A$ ,  $\mu_{m\acute{a}x}$  y  $\lambda$ ) fueron estimados mediante regresión no lineal utilizando el algoritmo de Levenberg-Marquardt (Quiñones-Muñoz et al., 2018).

Se establecieron valores iniciales para cada parámetro con base a los datos experimentales: el valor máximo observado para  $A$ , un valor aproximado de 0.1 para  $\mu_{m\acute{a}x}$ , y el promedio del tiempo registrado para  $\lambda$ . Estos valores iniciales fueron optimizados iterativamente por el algoritmo hasta minimizar el error cuadrático de predicción, permitiendo obtener estimaciones robustas y ajustadas para cada repetición y tratamiento.

### 3.2.5. Extracción de conidios

La cuantificación de los conidios se realizó por triplicado. Por lo que para la extracción de los conidios se añadieron 10 mL de solución salina estéril al 0.9 % de NaCl a cada caja Petri y se agitaron manualmente durante 5 minutos para facilitar la liberación de los conidios. Posteriormente, la suspensión con conidios fue recolectada y transferida a un tubo Falcon estéril de 15 mL.

El conteo de conidios se efectuó utilizando una cámara de Neubauer, la cual fue cargada con 150  $\mu$ L de la suspensión. Se observó en un microscopio óptico con un aumento de 40X, todos los conteos se realizaron por duplicado.

### 3.2.6. Evaluación de la actividad enzimática cualitativa

Se evaluó la actividad enzimática extracelular cualitativa de *T. harzianum* después de crecer en medios de cultivo adicionados con diferentes concentraciones y fuentes de peptona para determinar si existía algún efecto sobre las capacidades enzimáticas del hongo. Por lo que se realizaron ensayos en medios de cultivo sólidos específicos para determinar la actividad: amilolítica, celololítica, lipolítica (Dornelas et al., 2017), quitinolítica (Hernández-Melchor et al., 2023), proteolítica (Naik et al., 2008) y pectinolítica a pH 5 (Ordoñez-Valencia, 2014). Una vez preparados y estériles los medios de cultivo fueron inoculados en la parte central de la caja Petri con bocado de crecimiento activo del hongo y se incubaron a 28 °C de 3-4 días.

Para las actividades amilolítica, celololítica, quitinolítica y lipolítica, se estimó el diámetro del halo de hidrólisis, se trazaron cuatro líneas ortogonales sobre cada halo, el diámetro del halo se midió utilizando una regla y se calculó el promedio de las cuatro mediciones por caja Petri. Mientras que, en el caso de las pruebas proteolítica y pectinolítica se determinaron positivas o negativas con base en la formación de halos de hidrólisis o clarificación alrededor de las colonias.

### 3.2.7. Análisis estadístico

Se empleó un diseño experimental completamente al azar con un arreglo factorial 4×3, correspondiente a las cuatro fuentes de peptona (P, HK, HK+E y HK+P) y tres concentraciones (4, 6 y 8 g/L). Adicionalmente, se incluyó un tratamiento control con medio PDA sin peptona (control negativo). La unidad experimental estuvo constituida por placas de Petri inoculadas con *T. harzianum* y cada tratamiento fue evaluado con 4 repeticiones.

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) bifactorial para determinar el efecto de los factores tratamiento y concentración, así como su interacción. Cuando se detectaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), se aplicó la prueba de comparación de medias de Tukey (HSD). El análisis estadístico fue realizado utilizando el software RStudio (versión 4.4.2), empleando la paquetería *agricolae* para la prueba de Tukey y *ggplot2* para la visualización gráfica de los resultados.

### 3.3. Resultados y Discusión

#### 3.3.1. Crecimiento del hongo en hidrolizados de lana

El uso de hidrolizados de lana de oveja para el crecimiento de *T. harzianum*, mostró ser una fuente de C y N para el crecimiento del hongo, por lo que, al presentar una alta disponibilidad su uso en la formulación de medios de cultivo microbianos representa una estrategia accesible. Se observó una velocidad de crecimiento radial de 30.8 mm<sup>2</sup>/día para HK+E (Figura 11 A), el cual fue significativamente mejor en comparación con HK (19.4 mm<sup>2</sup>/día) y HK+P (18.5 mm<sup>2</sup>/día). El tratamiento M9 (control), el cual contenía un medio mínimo de sales minerales sin peptona, presentó la mayor velocidad de crecimiento (50.1 mm<sup>2</sup>/día) en comparación con el resto de los tratamientos.

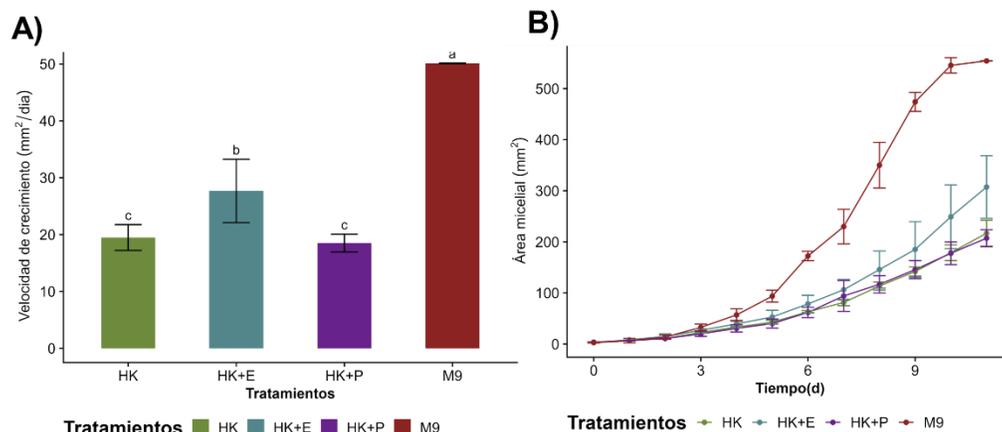


Figura 12 *T. harzianum* A) Velocidad promedio y B) Cinética de crecimiento micelial

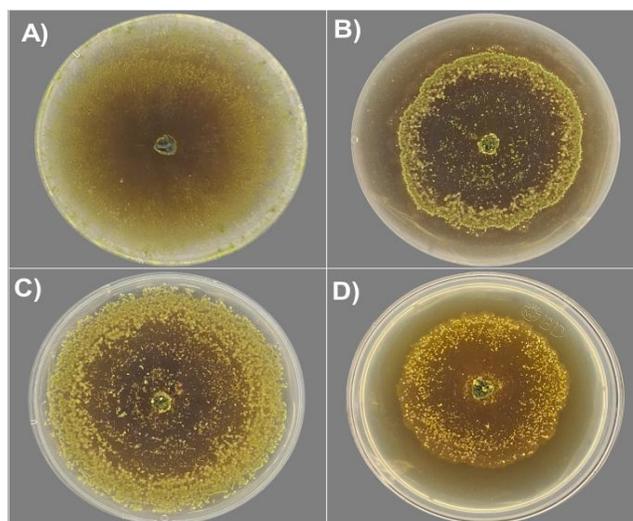


Figura 11 *T. harzianum* creciendo en A) M9, B) HK, C) HK+E, D) HK+P (16 d).

Aunque crecimiento micelial del hongo en M9 fue mayor al de los hidrolizados, se observó un crecimiento organizado y con coloraciones verdes intensas en los hidrolizados en comparación con el medio control (**Figura 12**). Esto se debe al contenido de C (45%) y N (12%), de los hidrolizados. Estudios similares reportan que el crecimiento micelial no está relacionado con la producción de conidios, sin embargo, las fuentes de C y N se encuentran relacionados en la producción de conidios de *T. harzianum* (Siordia-Grave et al., 2007). Por otra parte, Sun et al. (2021) sugieren que la producción de enzimas extracelulares en *Trichoderma reesei* responde a diversos estímulos ambientales, como las fuentes de origen de los sustratos que contienen N y C.

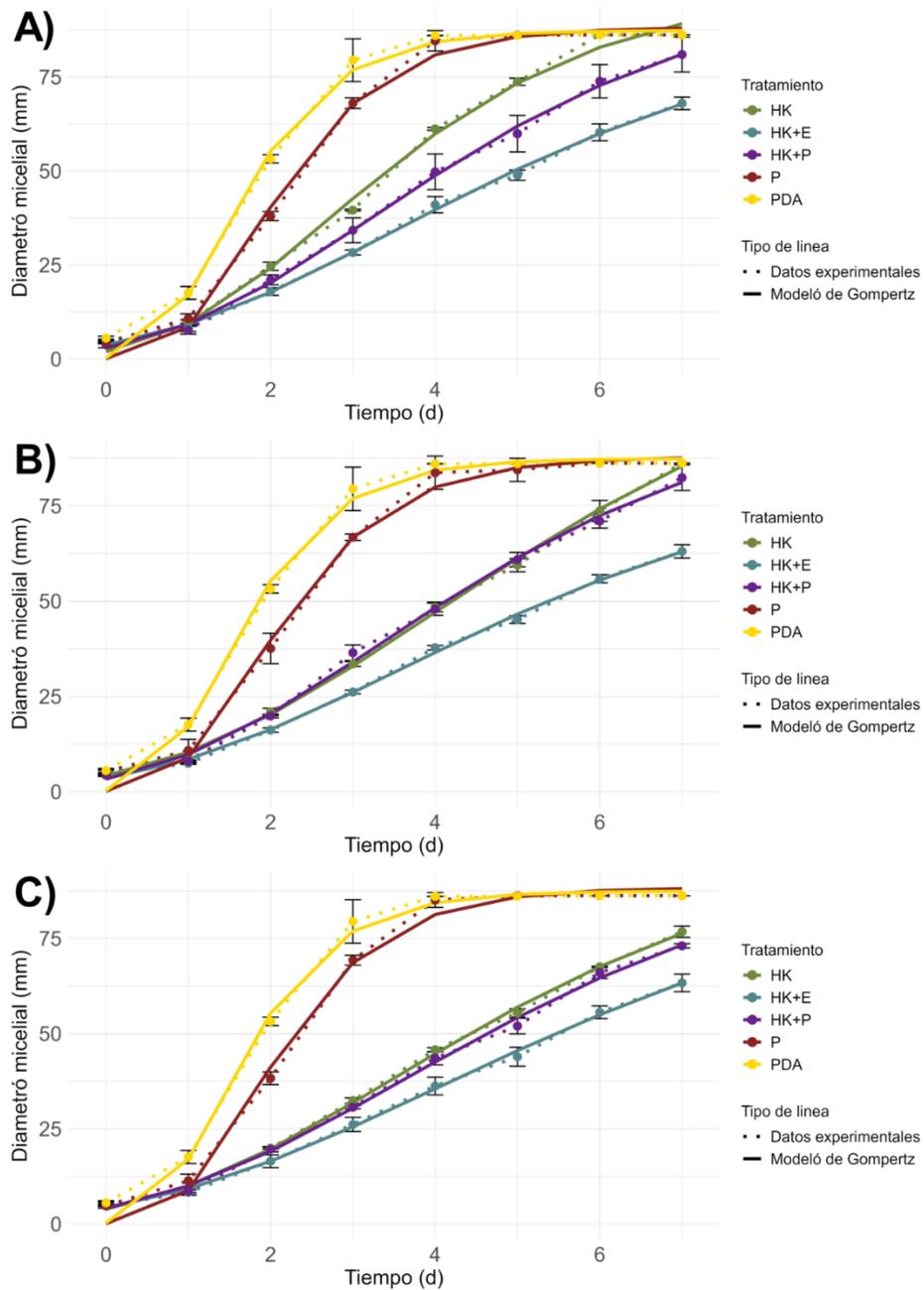
Por lo que, la generación de HPs a partir de este subproducto pecuario de alta disponibilidad propone una estrategia ecológica para su valorización como fuente de macronutrientes y micronutrientes para el cultivo de microorganismos de interés biotecnológico en la producción de biomasa para la obtención de enzimas extracelulares (Omeroglu et al. 2023).

### 3.3.2. Hidrolizados como peptona

Las cinéticas de crecimiento micelial de *T. harzianum* sobre diferentes fuentes de peptona se ajustaron adecuadamente ( $R^2 \geq 0.993$ ), al modelo de Gompertz modificado por Zwietering et al. (1990), los parámetros ajustados de este modelo permiten una descripción sobre el comportamiento de *Trichoderma* sp. al crecer en diferentes medios de cultivo (Quiñones-Muñoz et al., 2018). Los parámetros de las cinéticas de crecimiento micelial ajustados al modelo se observan en el **Apéndice C**.

Las fuentes de peptona, así como las diferentes concentraciones están altamente relacionadas con el desarrollo micelial del hongo. Se observó que los hidrolizados de lana presentaron crecimiento micelial más lento comparación con la peptona de caseína ( $\mu_{max} = 35.64$  mm/día) y el control negativo (PDA) en donde se observó la mejor tasa de crecimiento micelial ( $\mu_{max} = 41.00$  mm/día) (**Figura 13**). Mientras que, entre los hidrolizados de lana, el tratamiento con 4 g/L de HK, alcanzó una  $\mu_{max}$  de 18.74 mm/día, seguido los tratamientos HK y HK+P a concentraciones de 6 g/L con una  $\mu_{max}$  de 14.59 mm/día, lo que indica que las fuentes de N influyen en el desarrollo micelial de *T. harzianum*. Trabajos similares mostraron que el uso de hidrolizados de lana de oveja como fuente de peptona favorecen la producción de biomasa en *Aspergillus niger* a concentraciones de 5 g/L a 6 g/L (Taskin et al. 2016). Sin embargo, la tasa de crecimiento observada (**Figura 14**), en los hidrolizados de lana de oveja

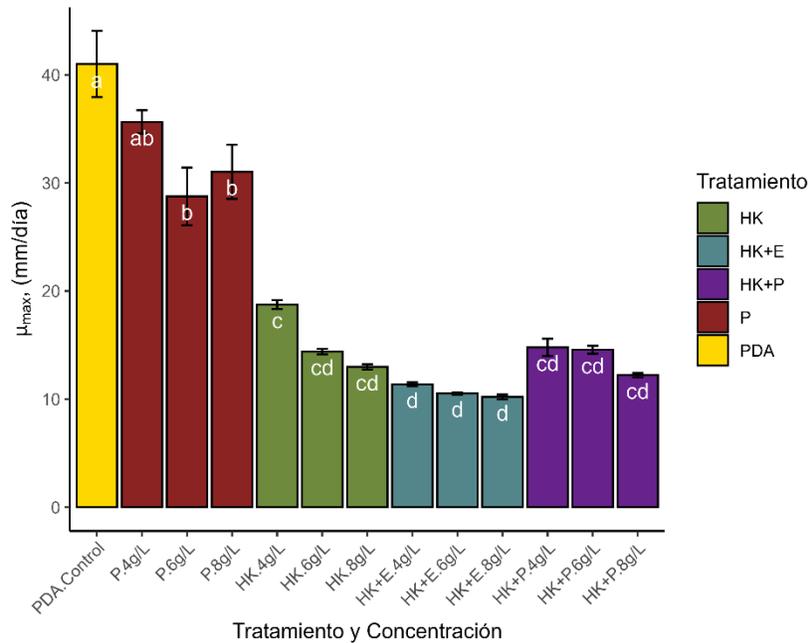
representa un crecimiento más lento, mientras que las tasas más altas se registraron en los medios con peptona comercial indicando un crecimiento más rápido.



**Figura 13** Cinéticas de crecimiento de *T. harzianum* ajustadas al modelo de Gompertz; **A)** comportamiento del desarrollo micelial a 4 g/L de peptona, **B)** 6 g/L y **C)** 8 g/L.

El tiempo de inflexión ( $\lambda$ ), que representa el punto en el que el crecimiento alcanza su máxima aceleración, también mostró diferencias. Los tratamientos con hidrolizados (HK,

HK+E, HK+P), presentaron menores valores de  $\lambda$  (desde 0.50 a 0.68), lo que sugiere un periodo de adaptación más largo, debido a la posible liberación de compuestos con actividad antimicrobiana como péptidos (Gaidau et al., 2021).

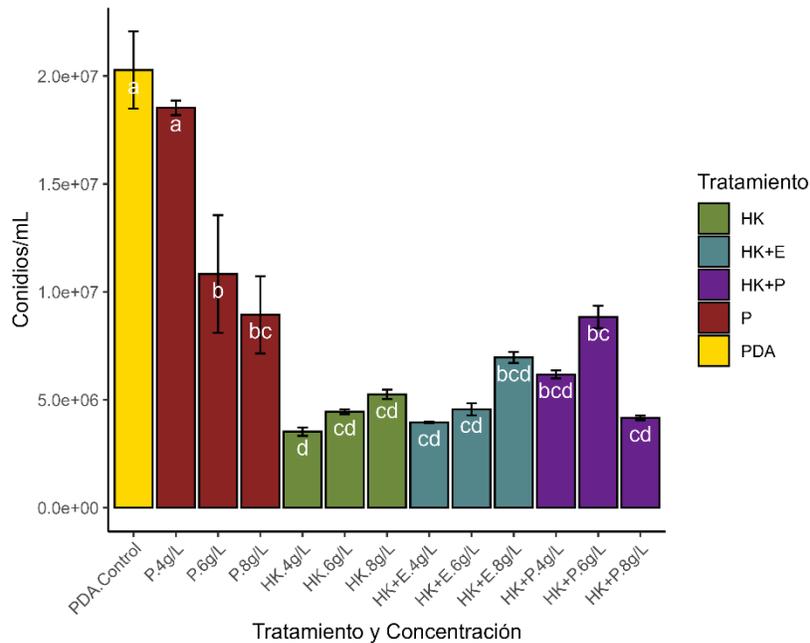


**Figura 14** Tasa de crecimiento estimada a partir del modelo de Gompertz de *T. harzianum* en diferentes fuentes y concentraciones de peptona. <sup>a, b, c</sup> diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre la interacción Tratamiento: Concentración.

### 3.3.3. Evaluación de la conidiación

Las condiciones de cultivo como las fuentes de nutrientes se encuentran altamente relacionados con la actividad biológica de la reproducción conidial de *Trichoderma* sp. (Caballeros-Chávez et al., 2025). Esto se relaciona con la bioactividad y la vida útil (capacidad de supervivencia) de los productos de control biológico basados en hongos (Amir et al., 2016). La producción de conidios de *T. harzianum* mostró una variación significativa en función de la fuente de peptona utilizada y su concentración (**Figura 15**). En el medio control (PDA sin peptona), presento una concentración de conidios de  $2.26 \times 10^7 \pm 4.99 \times 10^6$  conidios/mL. Al suplementar con 4 g/L de peptona comercial (P), la conidiación disminuyó ( $1.85 \times 10^7 \pm 6.76 \times 10^5$  conidios/mL), aunque sin diferencias significativas.

Entre los tratamientos con hidrolizados de lana, el mayor número de conidios se observó en el tratamiento HK+P a 6 g/L ( $8.84 \times 10^6 \pm 9.03 \times 10^5$  conidios/mL), similar a la peptona comercial a la más alta concentración ( $8.94 \times 10^6 \pm 3.10 \times 10^6$  conidios/mL). Mientras que, la mayor producción de HK y HK+E se observó en la concentración de 8 g/L (entre  $5.25 \times 10^6$  y  $6.96 \times 10^6$  conidios/mL).

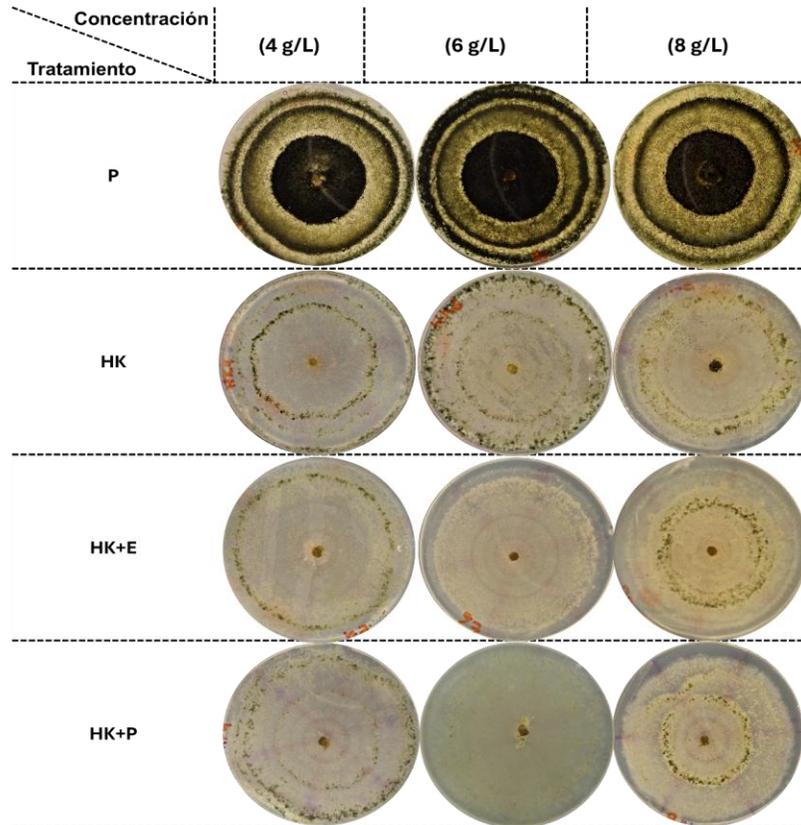


**Figura 15** Contenido de conidios de *T. harzianum* en diferentes fuentes y concentraciones de peptona. <sup>a, b, c</sup> diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre la interacción Tratamiento: Concentración.

En este trabajo se observó que, al aumentar la concentración de peptona, el crecimiento micelial presento una alta variabilidad incluso en el medio comercial (P) disminuyendo significativamente la producción de conidios (hasta una 48.7%), lo que coincide con lo reportado por Amir et al. (2016), en donde la relación C: N influye, en la morfología, la coloración (**Figura 16**), y la conidiación del hongo.

Esto se debe a que la fuente y concentración de N empleada en el cultivo de *Trichoderma* sp. dirige el metabolismo celular hacia la producción de biomasa influyendo en una reducción en la conidiación del hongo (Sanchez-Cuasapud et al., 2024). El contenido de aminoácidos como cisteína, serina, fenilalanina y arginina promueven el crecimiento, sin embargo, reducen la tasa de conidiación de *Trichoderma* (Jayaswal et al., 2003). Lo que

coincide con la tasa de crecimiento micelial (**Figura 14**), en donde a menor contenido de peptona se observó un mayor crecimiento micelial, sin embargo, la conidiación fue menor.



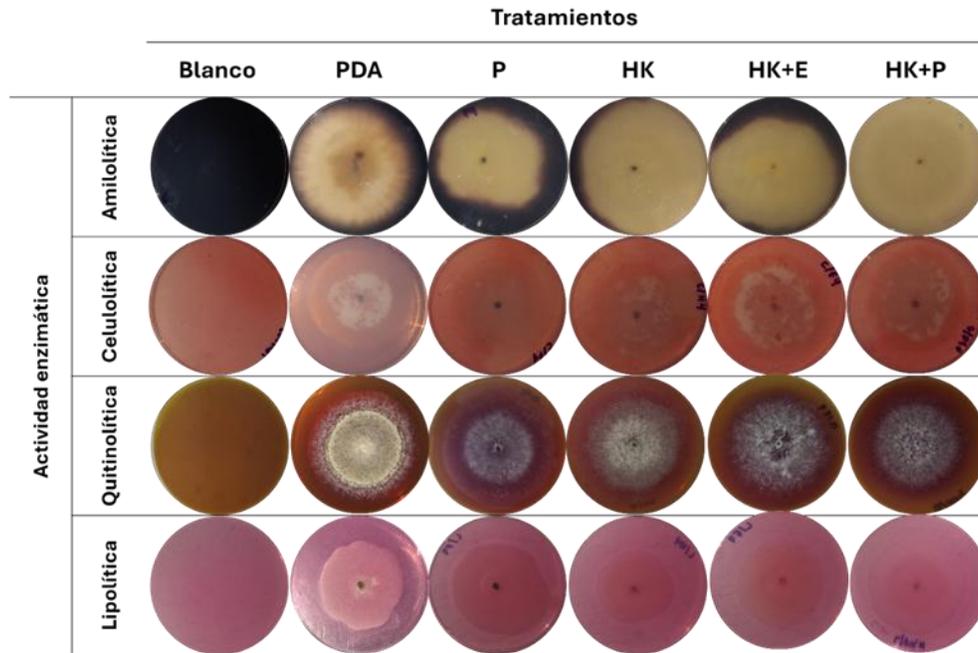
**Figura 16** *T. harzianum* cultivado en diferentes medios de cultivo (10 d).

### 3.3.4. Evaluación actividad enzimática cualitativa

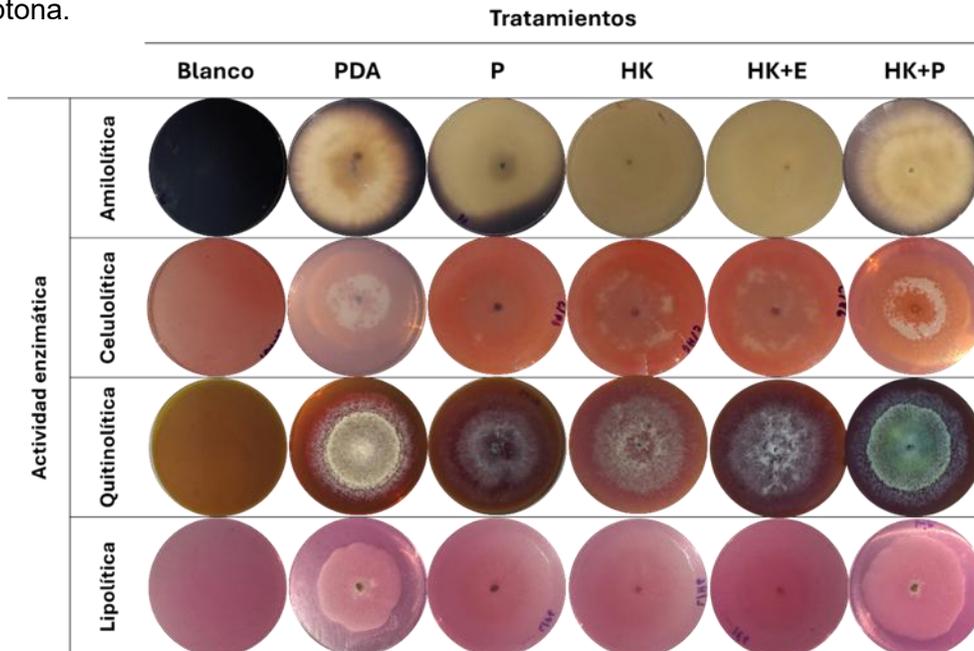
La actividad enzimática de *T. harzianum* fue positiva después de ser cultivado en diferentes fuentes de peptona, para el caso de la actividad enzimática amilolítica, celulolítica, quitinolítica y lipolítica se observó que tanto la concentración como la fuente influyen en el tamaño del halo de hidrólisis (**Figura 17, 18, 19**). Esto se debe a que las condiciones de cultivo de *Trichoderma* sp. influyen en el comportamiento del hongo, activando o reprimiendo rutas metabólicas involucradas en la síntesis de enzimas extracelulares (Shentu et al., 2014).

La capacidad del hongo para producir enzimas amilolíticas, celulolíticas, quitinolíticas, lipolíticas, pectinolíticas y proteolíticas presenta un alto interés, ya que algunas de ellas forman parte de los componentes involucrados en la colonización de raíces de las plantas mediante la degradación de compuestos polisacáridos exudados (Zhang et al., 2014), así como en su actividad micoparasitaria en degradación de la pared celular constituida por

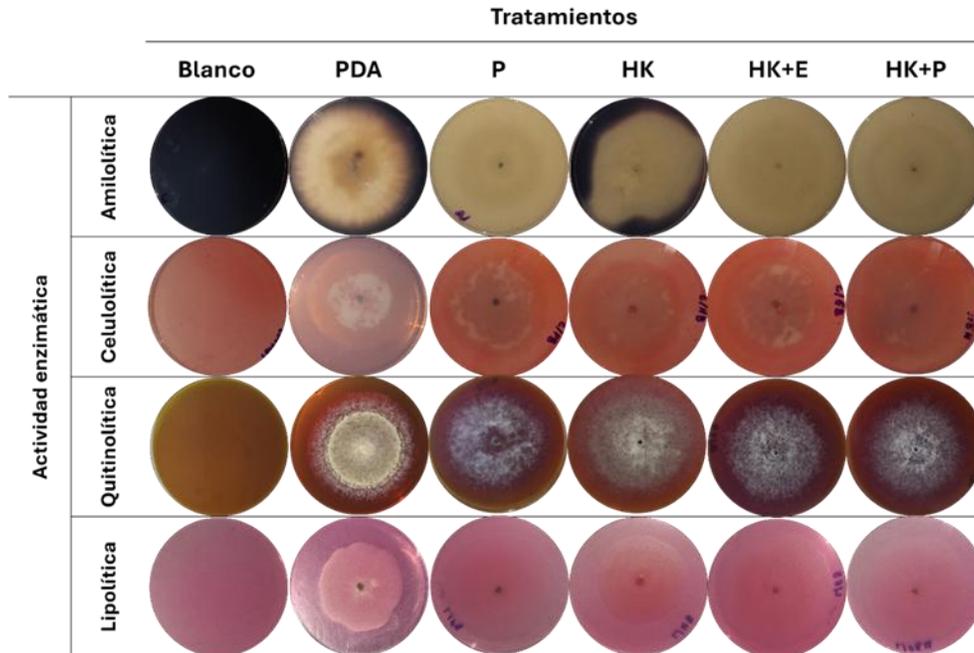
quitina y pectina de hongos fitopatógenos (Dutta et al., 2023). Por otra parte, la producción de enzimas lipasas y proteasas presentan potenciales aplicaciones como aditivos a los biopesticidas para aumentar su eficacia y reducir el tiempo de mortalidad (Mejía et al., 2024).



**Figura 17** Actividad enzimática cualitativa de *T. harzianum* después de ser cultivado a 4 g/L de peptona.

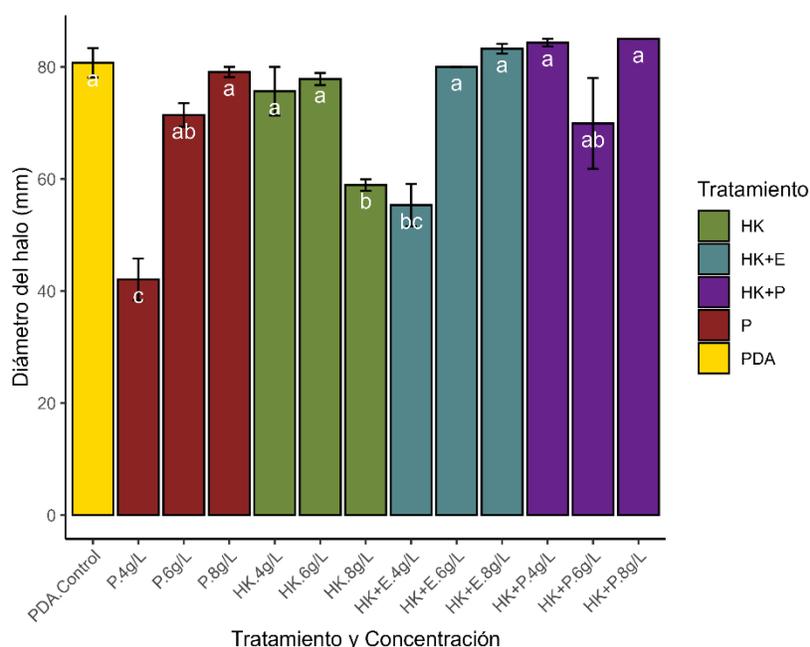


**Figura 18** Actividad enzimática cualitativa de *T. harzianum* después de ser cultivado a 6 g/L de peptona.



**Figura 19** Actividad enzimática cualitativa de *T. harzianum* después de ser cultivado a 8 g/L de peptona.

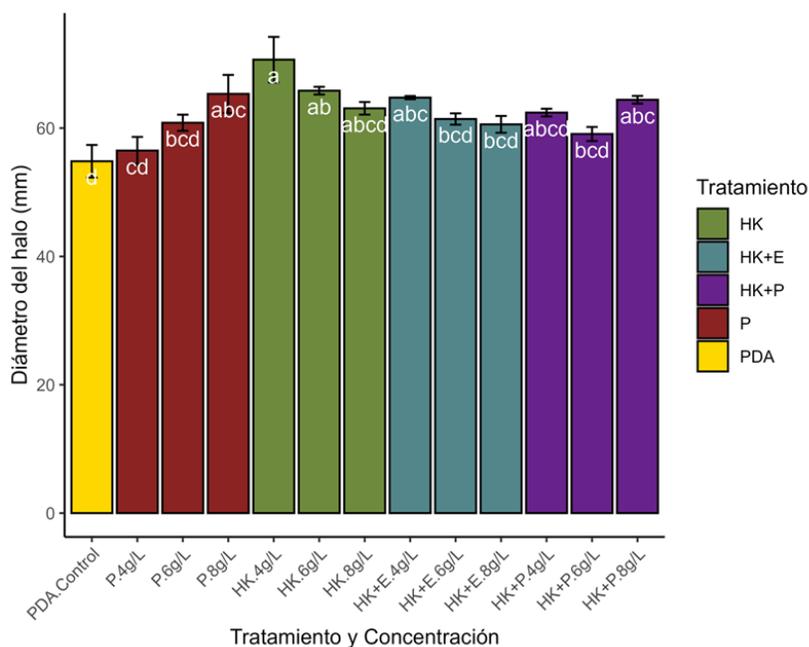
La capacidad amilolítica de *T. harzianum* cultivado en hidrolizados de lana de oveja como fuente de peptona a concentraciones de 4 g/L **Figura 20**, fue superior a la peptona de caseína ( $42.08 \pm 5.24$  mm) (control positivo), siendo el tratamiento HK+P el cual presentó el mayor halo de hidrólisis ( $84.33 \pm 0.94$  mm), incluso superior al control sin fuente de peptona (PDA:  $80.75 \pm 3.71$  mm), seguido por HK ( $75.66 \pm 6.12$  mm) y por HK+E ( $55.33 \pm 5.32$  mm). Posteriormente al aumentar la concentración a 6 g/L, se observó un incremento del halo, la peptona de caseína (P), de hasta el 70.5 % ( $71.75 \pm 3.12$  mm), aunque fue menor a lo obtenido por HK+E ( $80 \pm 0.20$  mm) el cual presentó un incremento del 44.94 %, y HK el incremento fue menor 2.87 % ( $77.83 \pm 1.53$  mm). Sin embargo, se observó para HK+P una disminución de 20.62 % ( $69.91 \pm 11.45$  mm), con respecto a la concentración anterior. Por otra parte, a la concentración de 8 g/L de fuente de peptona se observó una ligera disminución de la actividad enzimática amilolítica de *T. harzianum*. Un comportamiento similar al reportado por Omeroglu et al. (2023), en donde se observó que el uso de hidrolizados de lana aumenta la producción de enzimas amilasas, sin embargo, a concentraciones  $\geq 8$  g/L comienza a existir inhibición de su producción.



**Figura 20** Diámetro del halo de actividad amilolítica de *T. harzianum* a concentraciones de 4 g/L de fuente de peptona. <sup>a, b, c</sup> diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre la interacción tratamiento: concentración.

Los halos de hidrólisis de la actividad celulolítica (**Figura 21**), fueron favorecidos por el uso de los hidrolizados de lana, en comparación con PDA ( $54.83 \pm 4.44$  mm), siendo el tratamiento HK el cual presentó el mayor halo de actividad ( $70.67 \pm 6.17$  mm), los hidrolizados alcalino-enzimáticos presentaron valores similares ( $64.75 \pm 0.43$  mm para HK+E y  $62.42 \pm 0.82$  mm para HK+P), siendo superiores a la peptona de caseína ( $56.83 \pm 3.66$  mm). El aumento de la concentración de peptona a 6 g/L, presentó una disminución del tamaño del halo para los hidrolizados de lana, para HK una disminución del 6.84 % respecto al tamaño observado en la concentración de 4 g/L, mientras que para HK+E y HK+P ( $61.41 \pm 1.24$  mm y  $59.08 \pm 1.80$  mm), una disminución del 5 % respecto al tamaño de la concentración anterior. Por el contrario, tratamiento comercial de peptona presentó un incremento del 7.03 % ( $60.83 \pm 1.78$  mm), siendo similar a los hidrolizados HK+E y HK+P. A una concentración de 8 g/L, los halos obtenidos se mantuvieron relativamente constantes, aunque para HK+E se observó una disminución del 6.44 % ( $60.58 \pm 2.26$  mm), respecto al valor óptimo en la concentración de 6 g/L. Mientras que la fuente de peptona comercial obtuvo un mayor tamaño de halo del 13.95 % respecto a la concentración de 6 g/L, presentando un tamaño de halo igual al de HK+P. La síntesis de enzimas celulolíticas por hongos como *Aspergillus niger* pueden presentar preferencia por ciertas fuentes de N

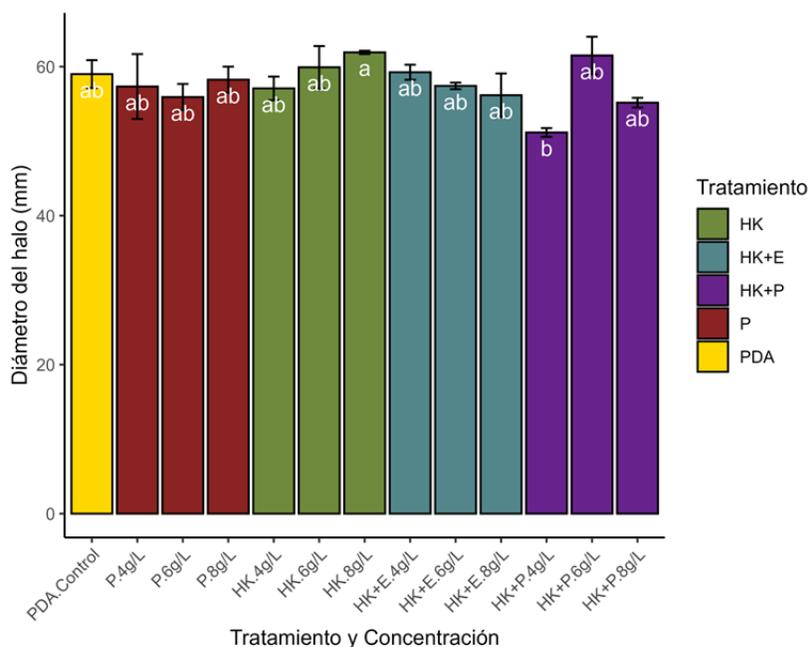
orgánico (Bharti et al., 2018). Se ha reportado en *Trichoderma reesei* que el uso de peptonas influye en la expresión de los genes *cbh1*, *cbh2*, *egl1* y *egl2* involucrados en la producción de celulasas, indicando que el hongo tiene preferencia hacia ciertas fuentes de N (Qian et al., 2019). Además, la fuente de C puede inducir ciertas respuestas metabólicas favoreciendo la síntesis de enzimas extracelulares (Jun et al., 2011). Por lo que, se sugiere que los hidrolizados al presentar un alto contenido de C orgánico (45%), favorecen la producción de estas enzimas.



**Figura 21** Diámetro del halo de actividad celulolítica de *T. harzianum* a concentraciones de 4 g/L de fuente de peptona. <sup>a, b, c</sup> diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre la interacción tratamiento: concentración.

Para el caso de la actividad quitinolítica (**Figura 22**) a la concentración de 4 g/L no se observó diferencia significativa entre los tratamientos PDA, P, HK y HK+E ( $59 \pm 2.65$  mm,  $57.33 \pm 6.15$  mm,  $57.08 \pm 2.23$  mm,  $59.25 \pm 1.42$  mm, respectivamente), sin embargo, HK+P fue el tratamiento con menor respuesta a esta concentración ( $51.16 \pm 0.82$  mm), siendo el tratamiento con el menor tamaño de halo observado en el experimento. Posteriormente, a la concentración de 6 g/L HK+P hubo un incremento del 20.21 %, respecto a la concentración anterior, a esta concentración no existió un efecto negativo sobre la actividad quitinolítica del hongo. A 8 g/L el tratamiento HK presentó el mayor tamaño del halo de actividad quitinolítica ( $61.91 \pm 0.22$  mm), siendo superior a las concentraciones anteriores

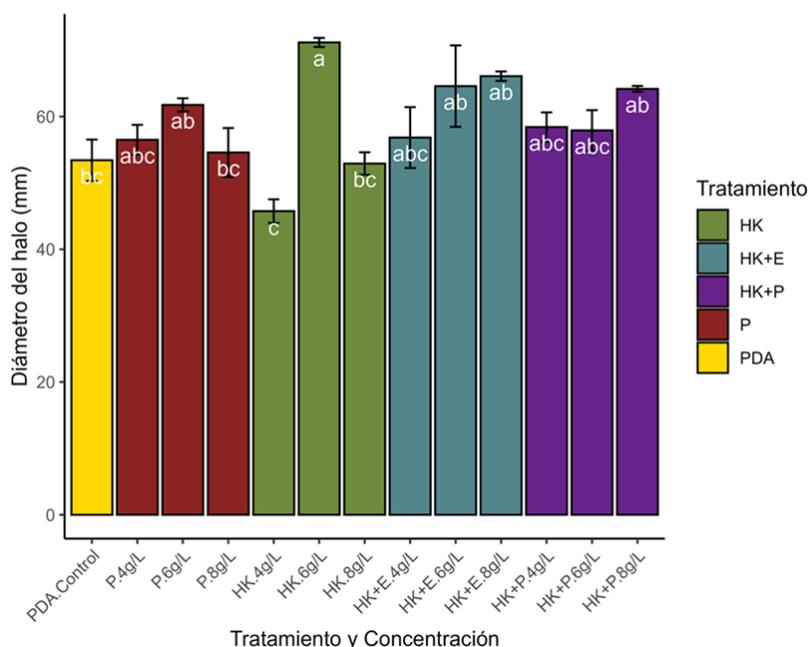
y a los tratamientos tanto comerciales como a los hidrolizados alcalino-enzimáticos. Existen reportes en donde la adición de fuentes de N orgánico como la tripeptona en comparación con el extracto de levadura y fuentes inorgánicas favorecen la producción de enzimas quitininolíticas en *T. harzianum* (Sandhya et al., 2004). El uso de hidrolizados de lana de oveja en la producción de *T. harzianum* preserva su capacidad de producir enzimas extracelulares involucradas en el mecanismo de actividad antagonica del hongo, por lo que, estudios posteriores deberían considerar la evaluación de la efectividad del hongo, después de ser estimulado con fuentes de N orgánico como las peptonas de lana de oveja.



**Figura 22** Diámetro del halo de actividad quitinolítica de *T. harzianum* a concentraciones de 4 g/L de fuente de peptona. <sup>a, b, c</sup> diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre la interacción tratamiento: concentración.

Por otra parte, la actividad enzimática lipolítica (**Figura 23**), a concentraciones de 4 g/L de peptona los tratamientos P, HK+E y HK+P mostraron un mayor tamaño de halo del 5.7 al 9.3 % en comparación con el control PDA ( $53.41 \pm 3.11$  mm), siendo el tratamiento HK el cual mostró el valor más bajo ( $45.75 \pm 2.50$  mm). La lipolítica fue favorecida a la concentración de 6 g/L, siendo HK la fuente de peptona que promovió el mayor halo de actividad ( $71.16 \pm 0.96$  mm), con un incremento del 55.54 % respecto a la concentración anterior de peptona (4 g/L), sin embargo, al aumentar la concentración a 8 g/L, la actividad lipolítica disminuyó para HK ( $52.41 \pm 1.00$  mm). Omeroglu et al. (2023), reportan que la concentración óptima de hidrolizados de lana para la producción de enzimas lipolíticas es

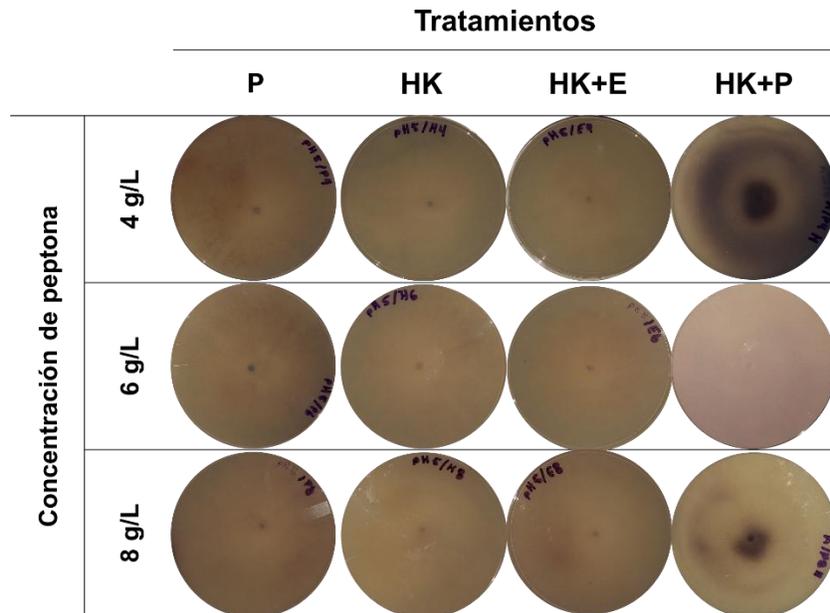
a 6 g/L, ya que a concentraciones más altas existe una disminución debido a una posible inhibición mediada por la fuente de N. Por lo que a concentraciones superiores (8 g/L), la actividad lipolítica disminuyó para P y HK+E ( $54.58 \pm 5.21$  mm y  $64.16 \pm 0.62$  mm), excepto para el tratamiento HK+P el cual reporto su valor óptimo ( $66.08 \pm 1.0$  mm).



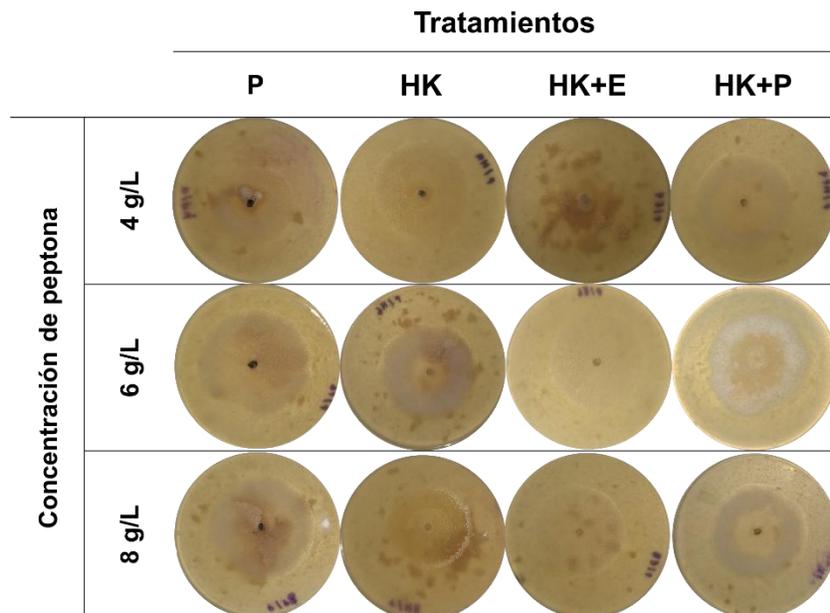
**Figura 23** Diámetro del halo de actividad lipolítica de *T. harzianum* a concentraciones de 4 g/L de fuente de peptona. <sup>a, b, c</sup> diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre la interacción tratamiento: concentración.

Para el caso de la actividad pectinolítica al día 4 de inoculación la mayoría de las cajas se cubrió de micelio, por lo que, la medición del diámetro del halo de actividad al revelar las con Lugol fue limitada considerándose positivas en todos los tratamientos (**Figura 24**). Mientras que para la actividad proteolítica (**Figura 25**), se realizó un ensayo por duplicado en donde se observó que la actividad fue menor en los tratamientos con peptona siendo el control negativo PDA el cual presentó un mayor halo de actividad ( $56.37 \pm 2.37$  mm). Esto se debe a que *Trichoderma* sp. presenta un mecanismo de represión del metabolismo del nitrógeno, en respuesta a las fuentes disponibles en su entorno la mediante la segregación de proteasas en presencia de fuentes de nitrógeno no preferidas como la leche desnatada (Qian et al., 2019). Los hidrolizados de lana de oveja no solo presentan un alto contenido de proteína sino también presentan aminoácidos libres. *Trichoderma* sp. puede utilizar aminoácidos como fuente de N tendiendo preferencias por el ácido glutámico, la asparagina, la leucina, el ácido aspártico, el ácido glutámico, alanina y prolina (Jayaswal et

al., 2003), los cuales se han reportado en los hidrolizados de lana de oveja (Gaidau et al., 2021), *Trichoderma* sp. genera la secreción de enzimas hidrolíticas para la liberación de C y N asimilable a partir de macromoléculas desempeñando un papel importante en la nutrición del hongo.



**Figura 25** Actividad pectinoítica de *T. harzianum* en diferentes fuentes de peptona y a diferentes concentraciones.



**Figura 24** Actividad proteolítica de *T.harzianum* en diferentes fuentes de peptona y a diferentes concentraciones.

### 3.4. Conclusiones

Los hidrolizados de lana de oveja presentan un alto potencial como fuente de peptona para el cultivo de microorganismos de interés agrícola como *T. harzianum*. A concentraciones de 4 g/L de hidrolizados mostraron el mejor desarrollo micelial y conidiación del hongo en comparación con la fuente de peptona comercial. Por otra parte, la evaluación de la actividad enzimática de *T. harzianum* después de crecer sobre los hidrolizados de lana de oveja presentaron una estimulación en la capacidad amilolítica, celulolítica y lipolítica a la concentración de 6 g/L. Los hidrolizados de lana de oveja, como fuente de C y N, representan una alternativa viable para la valorización de este residuo agropecuario. Por lo que, investigaciones futuras deberían centrarse en evaluar su capacidad para sustentar el crecimiento de diversos géneros de hongos y bacterias de interés agrícola, identificando aquellos capaces de aprovechar eficientemente estas fuentes de peptona.

## Capítulo IV: Evaluación de hidrolizados de lana como bioestimulante

### Resumen

Los sistemas de crianza de ganado ovino enfrentan dificultades en el suministro de insumos en cantidad y calidad para la alimentación animal. La producción de forraje verde hidropónico (FVH), representa una estrategia resiliente y accesible para la producción de forrajes con alto valor nutritivo. El aprovechamiento de residuos derivados de la crianza de ganado ovino como la lana de oveja para la obtención de hidrolizados de proteína (HP), representa una estrategia para su valorización en la bioestimulación de plantas. Se evaluó el uso de tres HP obtenidos a partir de procesos de hidrólisis alcalina (HK) y alcalino enzimática (HK+E y HK+P) de lana de oveja. Además, se determinó la concentración óptima en la producción de FVH de avena (*Avena sativa* L.), variedad Turquesa. En este trabajo se determinó uso de hidrolizados alcalino enzimáticos (HK+E y HK+P), a concentraciones de 3 g/L demostraron tener un efecto en la promoción del crecimiento hasta un 8.2-9.6 % del tallo, por lo que al promover el crecimiento vegetal de la planta se aumentó la producción de biomasa seca, así como mejorar el valor nutritivo del forraje al aumentar el contenido de proteína y cenizas totales. El uso de hidrolizados de lana de oveja en la bioestimulación de FVH de avena representa una estrategia compatible con los modelos de economía circular y desarrollo sustentable para la valorización de este residuo.

**Palabras clave:** Bioestimulación de plantas, hidrolizados de proteína, crecimiento vegetal, valor nutritivo y aminoácidos.

# Evaluation of wool hydrolysates as biostimulant.

## Abstract

Sheep farming systems face difficulties in the supply of inputs in quantity and quality for animal feed. The production of hydroponic green fodder (HGF) represents a resilient and accessible strategy to produce fodder with high nutritional value. The use of residues derived from sheep farming, such as sheep wool, to obtain protein hydrolysates (PH) represents a strategy for their valorization in plant biostimulation. The use of three PH obtained from alkaline (HK) and alkaline enzymatic (HK+E and HK+P) sheep wool hydrolysis processes was evaluated, and the optimum concentration in the production of HGF from oats (*Avena sativa* L.), Turquesa variety, was also determined. This study determined that the use of alkaline enzyme hydrolysates (HK+E and HK+P) at concentrations of 3 g/L had an effect on promoting stem growth of up to 8.2-9.6%, thereby promoting plant growth, increasing dry biomass production, and improving the nutritional value of the forage by increasing the protein and total ash content. The use of sheep wool hydrolysates in the biostimulation of oat FVH represents a strategy compatible with circular economy and sustainable development models for the valorization of this waste.

**Key words:** Plant biostimulation, protein hydrolysates, plant growth, nutritive value and amino acids.

## 4.1. Introducción

La producción de forrajes nutritivos y accesibles en la crianza sustentable de animales de granja es una problemática global (Tulu et al., 2023). El cambio climático actual, con fenómenos meteorológicos extremos y periodos de sequía largos, así como la alta competencia por el uso de tierras para la producción de alimentos para humanos, energía y otras actividades humanas, generan un gran desafío en la producción óptima de forraje (Chetroui et al., 2024; Pastorelli et al., 2024).

El cultivo de forrajes sin suelo, pero en un medio acuoso, se conoce como forraje verde hidropónico (FVH) y a diferencia del cultivo tradicional en suelo, presentan un ciclo de producción más corto (7-15 días), garantizando su disponibilidad durante todo el año, ya sea con dispositivos de bajo costo o de alta tecnología (Mahesh et al., 2024).

El forraje en forma de granos germinados puede cultivarse en un sistema ambientalmente controlado representando un insumo de alto valor nutrimental en la alimentación animal (Ahamed et al., 2023). La producción de FVH de avena (*Avena sativa* L.) representa una estrategia viable en la alimentación ovina para el remplazo de concentrados comerciales como suplemento, debido a su alto valor nutricional (Mekonnen et al., 2019).

La producción de FVH de avena con o sin solución nutritiva incrementa el contenido de materia seca, proteína, grasa y fibra, representando una práctica rentable para pequeños y medianos productores (Núñez Torres et al., 2023). Sin embargo, los sistemas hidropónicos requieren soluciones nutritivas que pueden exceder las demandas nutritivas de las plantas poniendo en riesgo la sostenibilidad de estos sistemas (Ciriello et al., 2022).

Una alternativa ecológica y compatible con las actividades de agricultura sustentable es la obtención de hidrolizados de proteína (HP) a partir de residuos agroalimentarios. Los HP benefician diferentes procesos fisiológicos en las plantas debido al alto contenido de moléculas bioactivas como péptidos, oligopéptidos y aminoácidos, demostrando tener efectos en la promoción del crecimiento y en la mejora de las características de calidad (Malécange et al., 2023). El objetivo de este capítulo fue evaluar el uso de hidrolizados de queratina de lana de oveja obtenidos a partir de diferentes procesos de hidrólisis; una fase alcalina (HK), y de dos fases alcalino-enzimática (HK+E y HK+P), así como la concentración óptima de aplicación foliar en la producción de FVH de avena.

## 4.2. Materiales y métodos

### 4.2.1. Ubicación y condiciones experimentales

Se estableció un sistema de producción de FVH de avena en condiciones de laboratorio, el experimento se desarrolló en las instalaciones del Instituto de Ciencias Agropecuarias, durante el experimento se midieron las variables de humedad relativa y temperatura. Se empleó una estructura con 4 niveles con capacidad para producción de 40 charolas de 28.5 cm de ancho por 55 cm de largo.

### 4.2.2. Material vegetal

El cultivo evaluado para la producción de forraje fue la avena (*Avena sativa*, L) variedad Turquesa, la cual fue adquirida a la empresa Grupo Vida®, la cual reporta en su etiquetado un 90% de índice de germinación y un 98% de pureza apta para su cultivo en valles altos de la zona centro de México.

### 4.2.3. Instalación del experimento

**Etapas pre-germinativa:** Se estableció una densidad de siembra de 3 kg/m<sup>2</sup> (Núñez Torres et al., 2023), la semilla fue enjuagada con abundante agua epura® con el objetivo de eliminar el polvo y otras impurezas, posteriormente se realizó una desinfección con hipoclorito de sodio al 6% disuelto en agua en una concentración 0.001 % de agua durante 2 h. Después de realizar la desinfección se aplicó un enjuague para eliminar el exceso de hipoclorito de sodio y se dejó en remojo por 24 h. Una vez terminado el tiempo de remojo se transfirió la semilla a recipientes con orificios para su ventilación durante 24 h en completa oscuridad.

**Etapas de germinación:** Para realizar la siembra en las charolas de manera homogénea se pesó la semilla húmeda y se dividió entre el total de charolas del experimento. Posteriormente, se trasladaron a una cámara de germinación cubierta con bolsas de hule oscuras hasta cumplir los 7 días. En esta etapa se estableció un periodo de riego de 2 veces al día con agua purificada de la marca e-pura® entre las 8 am y 6 pm.

**Etapas de producción:** Al día 8 de germinación se realizó el traslado de las charolas a la estructura experimental y se aplicó de manera foliar por única vez los tratamientos HK, HK+E y HK+P, los cuales se prepararon a las concentraciones 0.5 g/L, 1.5 g/L y 3 g/L diluidos con agua purificada, el control fue con agua purificada. Posteriormente, se mantuvieron los riegos con agua purificada hasta alcanzar los 15 días.

#### 4.2.4. Variables de estudio

Se realizó la cosecha de los FVH al cumplir los 15 días después de la siembra (dds), se pesó el material vegetal fresco, en una báscula granataria, posteriormente se midió aleatoriamente la longitud del tallo de 25 plantas por charola, el material se secó en una estufa con ventilación a 40 °C durante 7 días hasta peso constante para obtener el peso seco. Se realizó un análisis bromatológico de los tratamientos a la concentración de 3 g/L y el control (agua purificada), por lo que se preparó una muestra compuesta, la cual se empleó en los análisis químico-proximales para la determinación se realizó utilizando los métodos 925.10, 920.03, 920.39, 925.08 y 920.87 (AOAC, 2000), para porcentaje de humedad, contenido de cenizas, proteína total, fibra, lípidos y carbohidratos por diferencia (extracto libre de nitrógeno).

#### 4.2.5. Análisis estadístico

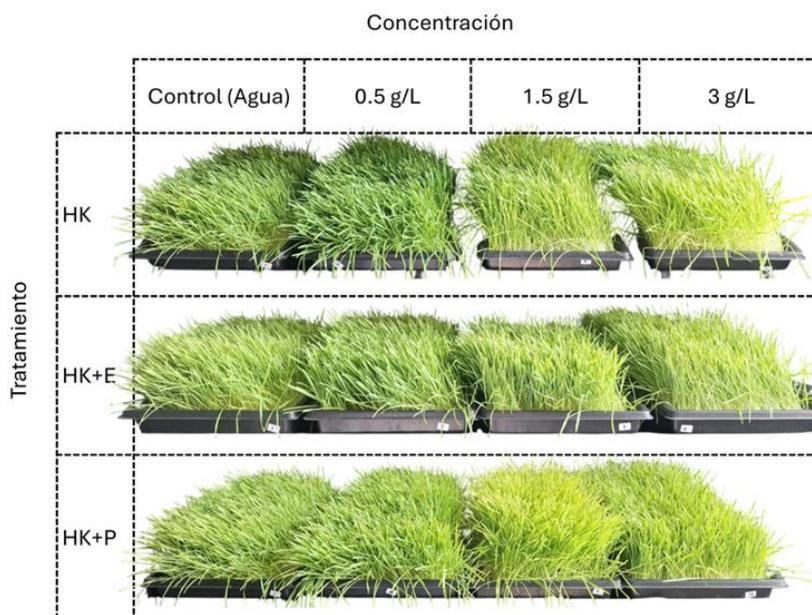
Se empleó un diseño experimental completamente al azar con un arreglo factorial 3×3, correspondiente a los hidrolizados de lana (HK, HK+E y HK+P) y tres concentraciones (0.5, 1.5 y 3 g/L). Adicionalmente, se incluyó un tratamiento control (agua purificada), sin hidrolizado. La unidad experimental estuvo constituida por charolas de germinación de 28.5 x 55.5 cm con una densidad de siembra de 3 kg/m<sup>2</sup>, con 3 repeticiones tratamiento.

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) bifactorial para determinar el efecto de los factores tratamiento y concentración, así como su interacción. Cuando se detectaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), se aplicó una prueba de comparación de medias de Tukey. El análisis estadístico fue realizado utilizando el software RStudio (versión 4.4.2), empleando la paquetería *agricolae* para la prueba de Tukey y *ggplot2* para la visualización gráfica de los resultados.

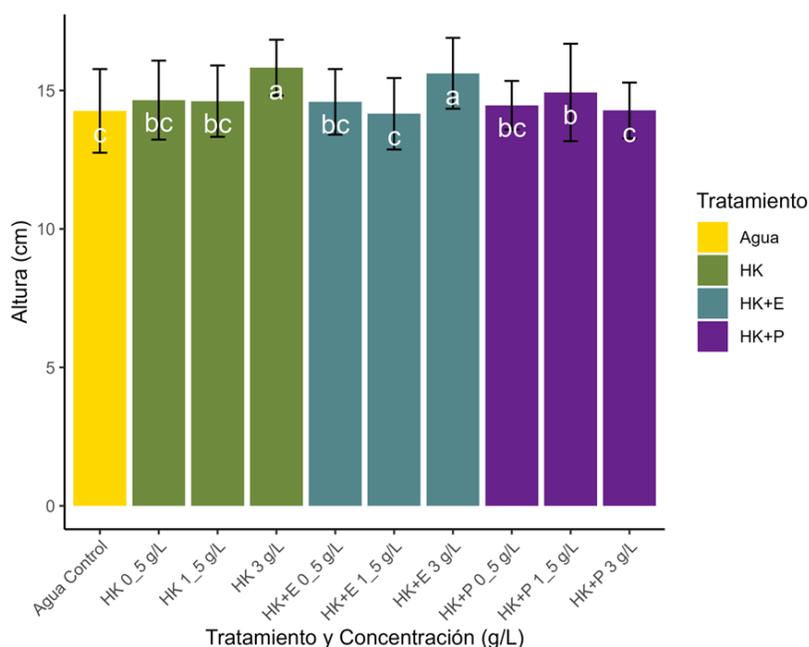
### 4.3. Resultados y Discusión

El uso de hidrolizados de lana de oveja demostró tener un alto potencial en la bioestimulación del crecimiento y mejoramiento de las características de calidad del cultivo de avena bajo un sistema de producción de forraje verde hidropónico (**Figura 26**). La

concentración, así como el tratamiento se relacionan con la promoción del crecimiento vegetal.



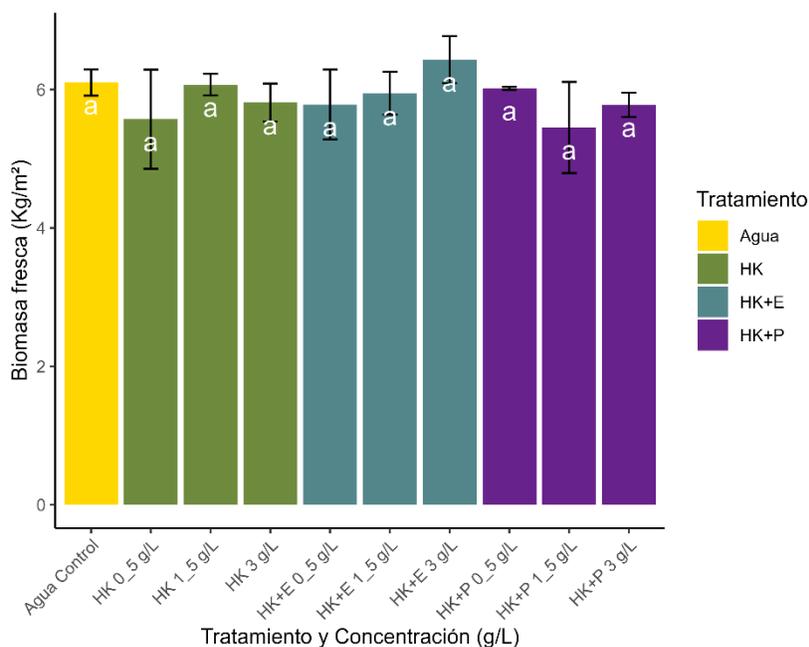
**Figura 27** Forraje verde hidropónico de avena a 15 d, tratados en la última etapa de germinación con hidrolizados de lana de oveja.



**Figura 26** Altura del tallo de los FVH de Avena a los 15 dds. <sup>a, b, c</sup> representan diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre la interacción tratamiento: concentración.

Al aplicar los hidrolizados de manera foliar a concentración de 0.5 g/L las plántulas presentaron longitud de tallo superior entre el 1.4 a 2.7 % con respecto al control ( $14.512 \pm$

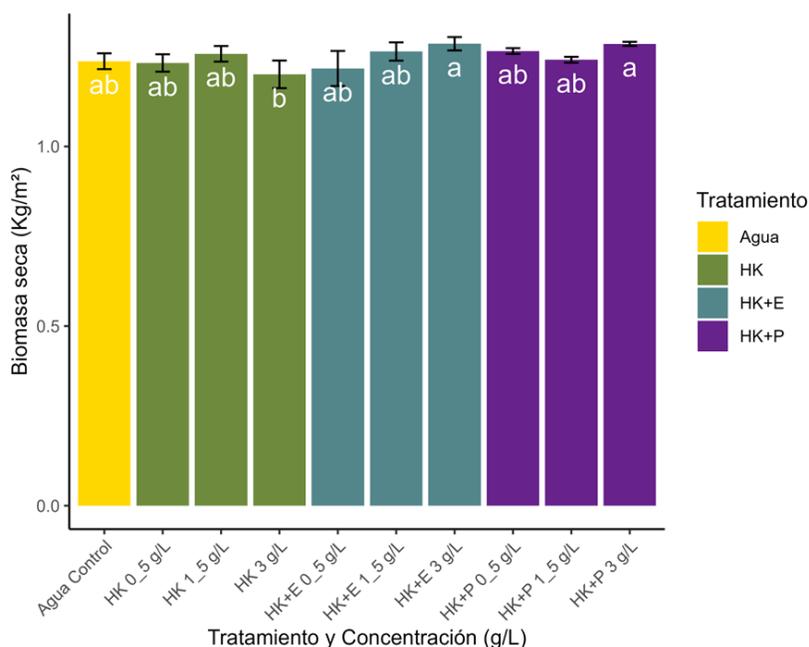
2.19 cm). **Figura 27**, al aumentar la concentración de hidrolizados de lana de oveja, los tallos de las plantas tratadas con HK+P presentaron un incremento del 4.6 %, mientras que en los demás tratamientos se observó una altura de tallo similar a la concentración anterior. La concentración más alta de 3 g/L favoreció la longitud de los tallos en los tratamientos HK y HK+E con incrementos del 9.5 al 11% respecto al control.



**Figura 28** Producción de biomasa fresca de los FVH de Avena a los 15 dds. <sup>a</sup> sin diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre la interacción tratamiento: concentración.

La producción de biomasa fresca de los FVH de avena (**Figura 24**), no presentó diferencias significativas entre los tratamientos manteniendo un promedio de producción de  $5.89 \pm 0.21$  Kg/m<sup>2</sup>, posteriormente al realizar la determinación de biomasa seca (**Figura 29**), el mayor contenido se observó en los tratamientos alcalino-enzimáticos HK+E y HK+P a concentraciones de 3 g/L del 4.06% respecto al control (1.23 kg/m<sup>2</sup>). Algunos HP de lana de oveja obtenidos a través de otros procesos térmicos, químicos, enzimáticos y así como la combinación de ellos reportan aumentos significativos en la longitud de los cultivos como el maíz y aumento en la producción de biomasa, esto principalmente se atribuye a la presencia de aminoácidos libres como prolina, ácido glutámico, glicina, alanina, leucina, valina, isoleucina y trionina (Nelly Noah Metomo, et al., 2024a; Gaidau et al., 2021, Zhang et al., 2018; Taskin et al., 2016), los cuales se parecen tener un efecto bioestimulante al favorecer los procesos fisiológicos en las plantas en la asimilación de nutrientes y al

promover el crecimiento vegetal, sin embargo, su efecto y mecanismo de acción específico aun no son comprendidos (Henderson et al., 2025).



**Figura 29** Producción de biomasa seca de los FVH de Avena a los 15 dds. <sup>a, b, c</sup> diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre la interacción tratamiento: concentración.

A pesar de no existir un entendimiento claro de la aplicación exógena de estos compuestos bioactivos, su uso en la agricultura se ha intensificado por su influencia en los procesos biológicos de señalización que regulan el crecimiento y desarrollo de las plantas (Gendaszewska et al., 2025). En el caso de la avena se ha reportado que el uso de aminoácidos como L-Triptofano, L-glicina y L-licina estimulan a la planta en la producción de auxinas, la síntesis de proteínas y potencian la división y elongación celular, lo que favorece la altura de la planta (Alshadiwi y Alrubiee, 2022).

Además, el uso de hidrolizados de lana de oveja en la bioestimulación del cultivo de avena en sistemas de producción de FVH, demostró tener un efecto positivo al mejorar las características de calidad de los forrajes (**Tabla 10**). Se observó que los hidrolizados alcalino-enzimáticos (HK+E y HK+P), mejoraron significativamente el contenido de proteína y las cenizas totales, lo que sugiere pueda contribuir en mejorar el aporte nutricional de los forrajes.

**Tabla 10** Análisis químico-proximal de los FVH de avena con una aplicación de 3 g/L de hidrolizados de lana.

Tratamiento	Cenizas	Proteína	Lípidos	Extracto libre de nitrógeno	Fibra
			%		
<b>Control</b>	4.4 ± 0.14 <sup>b</sup>	13.6 ± 0.18 <sup>d</sup>	0.423 ± 0.01 <sup>a</sup>	59.24 ± 0.41 <sup>a</sup>	12.37 ± 0.23 <sup>a</sup>
<b>HK</b>	4.5 ± 0.21 <sup>b</sup>	14.8 ± 0.20 <sup>c</sup>	0.399 ± 0.003 <sup>a</sup>	59.6 ± 0.50 <sup>a</sup>	11.3 ± 0.11 <sup>b</sup>
<b>HK+E</b>	5.09 ± 0.05 <sup>a</sup>	15.8 ± 0.18 <sup>b</sup>	0.410 ± 0.003 <sup>a</sup>	57.1 ± 0.15 <sup>b</sup>	11.3 ± 0.008 <sup>b</sup>
<b>HK+P</b>	4.36 ± 0.04 <sup>b</sup>	17.3 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.415 ± 0.002 <sup>a</sup>	56.6 ± 0.09 <sup>b</sup>	11.2 ± 0.04 <sup>b</sup>

\*a, b, c Representan las diferencias significativas entre los tratamientos

Los hidrolizados de lana de oveja tienen un alto contenido de grupos amino primario (-NH<sub>2</sub>), provenientes de péptidos, oligopéptidos y aminoácidos libres. En el capítulo III se observó que la hidrolisis alcalino-enzimática generaba perfiles proteolíticos en SDS-PAGE de bajo peso molecular entre 17 a 11 kDa. Estudios recientes sobre las hormonas peptídicas en plantas indican que estas biomoléculas juegan un papel importante en la señalización de vías metabólicas relacionadas con procesos fisiológicos en las plantas (Zhang et al., 2025). Por lo que, hidrolizados de lana de oveja obtenidos mediante un proceso de hidrólisis alcalino-enzimáticos (HK+E y HK+P), a la concentración de 3 g/L podrían tener un alto potencial para su uso como promotores del crecimiento vegetal, mejorando la calidad para su uso como forraje para la alimentación de ganado.

#### 4.4. Conclusiones

La valorización de lana de oveja para la obtención de HP representa una estrategia con enfoque a una bioeconomía de este residuo agrícola, además de presentar una alternativa para el desarrollo sostenible en la producción de forraje para la alimentación de ganado. Los hidrolizados del proceso de hidrolisis alcalino enzimático, presentan un alto contenido de moléculas bioactivas como péptidos, oligopéptidos y aminoácidos libres que desempeñan un papel importante en la fisiología al favorecer la promoción del crecimiento vegetal y aumentar el valor nutritivo de los FVH de avena. Por lo que su uso, en la producción de FVH de avena genera un mayor rendimiento de biomasa seca y aumenta el contenido de proteína y cenizas totales de los FVH. Aunque existe poca información sobre la aplicación de hormonas peptídicas exógenas a las plantas, su estudio representa un esclarecimiento del papel específico de los hidrolizados en la bioestimulación de las plantas.

Por lo que, estudios posteriores deberían de considerar la identificación de péptidos bioactivos, su caracterización y estudio de su efecto en la señalización vegetal.

## Conclusiones generales

- El establecimiento de un proceso de hidrólisis alcalino-enzimático presenta un alto potencial para la generación de bioinsumos agrícolas con valor agregado.
- La aplicación de un pretratamiento de la lana con tensioactivo biodegradable como el SDBS se favoreció la eliminación de impurezas y preparó la estructura de la lana para una posterior hidrólisis más efectiva.
- Los hidrolizados de proteína obtenidos presentan características moleculares favorables para su aplicación en biotecnología, especialmente en la bioestimulación de cultivos y como fuente de peptonas para microorganismos agrícolas debido a la liberación de compuestos a base de C, N y S (péptidos y aminoácidos).
- Los hidrolizados de lana de oveja presentan un alto potencial como fuente de peptona para el cultivo de *T. harzianum* a concentraciones de 4 g/L, manteniendo un crecimiento y conidiación adecuado. Además de promover una estimulación en la actividad enzimática amilolítica, celulolítica y lipolítica, sin afectar la capacidad pectinolítica y proteolítica del hongo.
- Los hidrolizados de proteína de lana de oveja presentan un alto contenido de moléculas bioactivas como péptidos, oligopéptidos y aminoácidos libres que desempeñan un papel importante en la fisiología de las plántulas de avena. Por lo que su uso, en la producción de FVH de avena promovió el crecimiento, generando un mayor rendimiento de materia seca y aumentando el valor nutricional de los FVH de avena.

## Literatura citada

Abdallah, A., Ugolini, F., Baronti, S., Maienza, A., Camilli, F., Bonora, L., Martelli, F., Primicerio, J., & Ungaro, F. (2019). The potential of recycling wool residues as an amendment for enhancing the physical and hydraulic properties of a sandy loam soil. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, 8(S1), 131–143. <https://doi.org/10.1007/s40093-019-0283-5>

Abdallah, A., Ugolini, F., Baronti, S., Maienza, A., Ungaro, F., & Camilli, F. (2019). Assessment of Two Sheep Wool Residues from Textile Industry as Organic Fertilizer in Sunflower and Maize Cultivation. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 19(4), 793–807. <https://doi.org/10.1007/s42729-019-00079-y>

Ahamed, M. S., Sultan, M., Shamsiri, R. R., Rahman, M. M., Aleem, M., & Balasundram, S. K. (2023). Present status and challenges of fodder production in controlled environments: A review. *Smart Agricultural Technology*, 3, 100080. <https://doi.org/10.1016/j.atech.2022.100080>

Ahmed, J., Lorch, J., Ong, L., & Wolfgram, J. (2018). How the global supply landscape for meat protein will evolve. *CHEMICALS & AGRICULTURE*. <https://www.mckinsey.com/>

Alshadiwi, S. M. A., & Alrubiee, S. H. A. (2022). EFFECT OF FOLIAR APPLIED AMINO ACIDS ON GROWTH CHARACTERISTICS OF OAT (AVENA SATIVA L.). *SABRAO Journal of Breeding and Genetics*, 54(5), 1183–1190. <https://doi.org/10.54910/sabrao2022.54.5.19>

AOAC. (2000). Vitamin and other nutrient. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists International. (17 ed). Gaithersburg, USA.

Avila, G. M. de A., Gabardo, G., Clock, D. C., & Lima Junior, O. S. de. (2021). Use of efficient microorganisms in agriculture. *Research, Society and Development*, 10(8), e40610817515. <https://doi.org/https://doi.org/10.33448/rsd-v10i8.17515>

Berechet, M. D., Simion, D., Stanca, M., Alexe, C. A., Chelaru, C., & Râpă, M. (2020). Keratin hydrolysates extracted from sheep wool with potential use as organic fertilizer. *Leather and Footwear Journal*, 20(3), 267–276. <https://doi.org/10.24264/lfj.20.3.5>

Bhari, R., Kaur, M., & Sarup Singh, R. (2021). Chicken Feather Waste Hydrolysate as a Superior Biofertilizer in Agroindustry. In *Current Microbiology* (Vol. 78, Issue 6, pp. 2212–2230). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02491-z>

Bhavsar, P. S. (2018). *Studies in Green Hydrolysis of Waste Wool* [Doctoral ]. Gheorghe Asaci Technical university of Iasi,Romania. Politecnico di Torino,Italy. Soochow University,Soochow,China.

Bhavsar, P., Zoccola, M., Patrucco, A., Montarsolo, A., Mossotti, R., Rovero, G., Giansetti, M., y Tonin, C. (2016). Superheated Water Hydrolysis of Waste Wool in a Semi-Industrial Reactor to Obtain Nitrogen Fertilizers. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 4(12), 6722–6731. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b01664>

Bradshaw, T., y Hagen, K. (2022). Wool Pellets Are a Viable Alternative to Commercial Fertilizer for Organic Vegetable Production. *Agronomy*, 12(5), 1210. <https://doi.org/10.3390/agronomy12051210>

Broda, J., Gawlowski, A., Rom, M., y Kobiela-Mendrek, K. (2023). Utilisation of waste wool from mountain sheep as fertiliser in winter wheat cultivation. *Journal of Natural Fibers*, 20(2). <https://doi.org/10.1080/15440478.2023.2200047>

Bullor, L., Braude, H., Monzón, J., Cotes Prado, A. M., Casavola, V., Carbajal Morón., N., y Risopoulos, J. (2023). *Bioinsumos: Oportunidades de inversión en América Latina*. FAO. <https://doi.org/10.4060/cc9060es>

Calin, M., Raut, I., Liliana, M., Capra, L., Gurban, A. M., Doni, M., & Jecu, L. (2019). Applications of fungal strains with keratin-degrading and plant growth promoting characteristics. *Agronomy*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/agronomy9090543>

Cardamone, J. M., Nuñez, A., Garcia, R. A., & Aldema-Ramos, M. (2009). Characterizing wool keratin. *Research Letters in Materials Science*, 2009. <https://doi.org/10.1155/2009/147175>

Chen, H., Gao, S., Li, Y., Xu, H. J., Li, W., Wang, J., & Zhang, Y. (2022). Valorization of Livestock Keratin Waste: Application in Agricultural Fields. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 19, Issue 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijerph19116681>

Chetroui, R., Rodino, S., Dragomir, V., Ilie, D. M., & Marin, A. (2024). Assessing Economic Viability of Resilient Sheep Foraging Alternatives in Lowland Regions of Romania. *Agriculture*, 14(9), 1656. <https://doi.org/10.3390/agriculture14091656>

- Ciriello, M., Formisano, L., El-Nakhel, C., Corrado, G., & Roupheal, Y. (2022). Biostimulatory Action of a Plant-Derived Protein Hydrolysate on Morphological Traits, Photosynthetic Parameters, and Mineral Composition of Two Basil Cultivars Grown Hydroponically under Variable Electrical Conductivity. *Horticulturae*, 8(5), 409. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8050409>
- Clerens, S., Cornellison, C. D., Deb-Choudhury, S., Thomas, A., Plowman, J. E., & Dyer, J. M. (2010). Developing the wool proteome. *Journal of Proteomics*, 73(9), 1722–1731. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.05.005>
- Constantin, M., Raut, I., Gurban, A. M., Doni, M., Radu, N., Alexandrescu, E., & Jecu, L. (2022). Exploring the Potential Applications of *Paecilomyces lilacinus* 112. *Applied Sciences (Switzerland)*, 12(15). <https://doi.org/10.3390/app12157572>
- Cristea, S., Niculescu, M.-D., Perisoara, A., Ivan, E., Stanca, M., Alexe, C.-A., Tihauan, B.-M., & Olariu, L. (2024). Germination Study of Some Protein-Based Gels Obtained from By-Products from the Leather Industry on Tomato and Pepper Seeds. *Gels*, 10(1), 75. <https://doi.org/10.3390/gels10010075>
- Dal Prà, A., Ugolini, F., Negri, M., Bortolu, S., Duce, P., Macci, C., Lombardo, A., Benedetti, M., Brajon, G., Guazzini, L., Casini, S., Spagnul, S., & Camilli, F. (2024). Wool Agro-Waste Biomass and Spruce Sawdust: Pellets as an Organic Soil Amendment. *Sustainability*, 16(6), 2228. <https://doi.org/10.3390/su16062228>
- Deb-Choudhury, S., Plowman, J. E., & Harland, D. P. (2016). *Isolation and Analysis of Keratins and Keratin-Associated Proteins from Hair and Wool* (pp. 279–301). <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2015.07.018>
- Diario Oficial de la Federación. (2002). *NORMA Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis.*
- Dornelas, J. C. M., Figueiredo, J. E. F., de Abreu, C. S., Lana, U. G. P., Oliveira, C. A., & Marriel, I. E. (2017). Research Article Characterization and phylogenetic affiliation of Actinobacteria from tropical soils with potential uses for agro-industrial processes. *Genetics and Molecular Research*, 16(3). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28873206/>
- FAO. (2023). *FAOSTAT Statistical Database: Crops and livestock products.* <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>

FAO. (2024). *Agricultural production statistics 2010–2023: Vol. No. 96* (FAOSTAT Analytical Briefs, Ed.). FAO. <https://openknowledge.fao.org/handle/20.500.14283/cd3755en>

FAO, FIDA, OMS, PMA, & UNICEF. (2024). *El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo 2024*. FAO; IFAD; WHO; WFP; UNICEF; <https://doi.org/10.4060/cd1254es>

Gaidau, C., Epure, D.-G., Enascuta, C. E., Carsote, C., Sendrea, C., Proietti, N., Chen, W., & Gu, H. (2019). Wool keratin total solubilisation for recovery and reintegration - An ecological approach. *Journal of Cleaner Production*, 236, 117586. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.07.061>

Gaidau, C., Stanca, M., Niculescu, M. D., Alexe, C. A., Becheritu, M., Horoias, R., Cioineag, C., Râpă, M., & Stanculescu, I. R. (2021). Wool keratin hydrolysates for bioactive additives preparation. *Materials*, 14(16). <https://doi.org/10.3390/ma14164696>

Garbowski, T., Bar-Michalczyk, D., Charazińska, S., Grabowska-Polanowska, B., Kowalczyk, A., & Lochyński, P. (2023). An overview of natural soil amendments in agriculture. *Soil and Tillage Research*, 225, 105462. <https://doi.org/10.1016/j.still.2022.105462>

Gendaszewska, D., Pipiak, P., Wieczorek, D., Miśkiewicz, K., Ławińska, K., & Popińska, W. (2025). Utilization of Protein Hydrolysates from Animal Waste for the Production of Biostimulants in Wheat Cultivation (*Triticum aestivum* L.). *Fibres & Textiles in Eastern Europe*, 33(1), 40–48. <https://doi.org/10.2478/ftce-2025-0004>

Georgieva, D. N., Stoeva, S., Voelter, W., Genov, N., & Betzel, C. (2001). Substrate Specificity of the Highly Alkalophilic Bacterial Proteinase Esperase: Relation to the X-Ray Structure. *Current Microbiology*, 42(5), 368–371. <https://doi.org/10.1007/s002840010231>

Giteru, S. G., Ramsey, D. H., Hou, Y., Cong, L., Mohan, A., & Bekhit, A. E. D. A. (2023). Wool keratin as a novel alternative protein: A comprehensive review of extraction, purification, nutrition, safety, and food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 22(1), 643–687. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13087>

Gong, H., Zhou, H., Forrest, R. H. J., Li, S., Wang, J., Dyer, J. M., Luo, Y., & Hickford, J. G. H. (2016). Wool keratin-associated protein genes in sheep—A review. In *Genes* (Vol. 7, Issue 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/genes7060024>

Górecki, R. S., & Górecki, M. T. (2010). Utilization of Waste Wool as Substrate Amendment in Pot Cultivation of Tomato, Sweet Pepper, and Eggplant. *Polish Journal of Environmental Studies*, 19, 1083–1087.

Hernández-Melchor, D. J., Ferrera-Cerrato, R., & Alarcón, A. (2019). Trichoderma: IMPORTANCIA AGRÍCOLA, BIOTECNOLÓGICA, Y SISTEMAS DE FERMENTACIÓN PARA PRODUCIR BIOMASA Y ENZIMAS DE INTERÉS INDUSTRIAL. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*, ahead, 0–0. <http://dx.doi.org/10.4067/S0719-38902019005000205>

Hernández-Melchor, D. J., Guerrero-Chávez, A. C., Ferrera-Rodríguez, M. R., Ferrera-Cerrato, R., Larsen, J., & Alarcón, A. (2023). Cellulase and chitinase activities and antagonism against *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense race 1 of six Trichoderma strains isolated from Mexican maize cropping. *Biotechnology Letters*, 45(3), 387–400. <https://doi.org/10.1007/s10529-022-03343-x>

Holkar, C. R., Jadhav, A. J., Bhavsar, P. S., Kannan, S., Pinjari, D. V., & Pandit, A. B. (2016). Acoustic Cavitation Assisted Alkaline Hydrolysis of Wool Based Keratins to Produce Organic Amendment Fertilizers. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 4(5), 2789–2796. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b00298>

Huéscar. (2024). *PANEL INTERNACIONAL OVINO DE CARNE*. [https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/comparativainternacional\\_ovinocarne\\_2024\\_tcm30-637149.pdf?utm\\_source=chatgpt.com](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/comparativainternacional_ovinocarne_2024_tcm30-637149.pdf?utm_source=chatgpt.com)

Huson, M. G. (2018). 3 - Properties of wool. In A. R. Bunsell (Ed.), *Handbook of Properties of Textile and Technical Fibres (Second Edition)* (Second Edition, pp. 59–103). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101272-7.00003-1>

Hustvedt, G., Meier, E., & Waliczek, T. (2016). The feasibility of large-scale composting of waste wool. In *Environmental Footprints and Eco-Design of Products and Processes* (pp. 95–107). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-0111-6\\_4](https://doi.org/10.1007/978-981-10-0111-6_4)

International Wool Textile Organisation (IWTO). (2024). A Statistical & Analytical Report from the IWTO. *Market Information*, 19, 1–8.

Islas-Martínez, D., Ávila-Vargas, Y. N., Rodríguez-Serrano, G. M., González-Olivares, L. G., Pérez-Flores, J. G., Contreras-López, E., Olloqui, E. J., & Pérez-Escalante, E. (2023). Multi-

Bioactive Potential of a Rye Protein Isolate Hydrolysate by Enzymatic Processes. *Foods* 2023, 38. <https://doi.org/10.3390/Foods2023-15037>

Jayaswal, R. K., Singh, R., & Lee, Y. S. (2003). Influence of Physiological and Environmental Factors on Growth and Sporulation of an Antagonistic Strain of *Trichoderma viride* RSR 7. *Mycobiology*, 31(1), 36. <https://doi.org/10.4489/MYCO.2003.31.1.036>

Jin, S., & Alberti, F. (2025). Advances in the discovery and study of *Trichoderma* natural products for biological control applications. *Natural Product Reports*. <https://doi.org/10.1039/D5NP00017C>

Jun, H., Kieselbach, T., & Jönsson, L. J. (2011). Enzyme production by filamentous fungi: analysis of the secretome of *Trichoderma reesei* grown on unconventional carbon source. *Microbial Cell Factories*, 10(1), 68. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-68>

Juwon, A. D., & Emmanuel, O. F. (2012). Experimental Investigations on the Effects of Carbon and Nitrogen Sources on Concomitant Amylase and Polygalacturonase Production by *Trichoderma viride* BITRS-1001 in Submerged Fermentation. *Biotechnology Research International*, 2012, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2012/904763>

Kamal, H., Le, C. F., Salter, A. M., & Ali, A. (2021). Extraction of protein from food waste: An overview of current status and opportunities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(3), 2455–2475. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12739>

Khushk, I. (2021). Environmental Friendly Production of Amylase from *Aspergillus niger* EFRL-FC-024 Using Corn Waste as Carbon Source. *Pakistan Journal of Analytical & Environmental Chemistry*, 22(1), 165–171. <https://doi.org/10.21743/pjaec/2021.06.17>

Korniłowicz-Kowalska, T., & Bohacz, J. (2011). Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects. *Waste Management*, 31(8), 1689–1701. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.03.024>

Koul, B., Yakoob, M., & Shah, M. P. (2022). Agricultural waste management strategies for environmental sustainability. *Environmental Research*, 206, 112285. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112285>

Kumar, S., Diksha, Sindhu, S. S., & Kumar, R. (2022). Biofertilizers: An ecofriendly technology for nutrient recycling and environmental sustainability. *Current Research in Microbial Sciences*, 3, 100094. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100094>

- Lazarus, B. S., Chadha, C., Velasco-Hogan, A., Barbosa, J. D. V, Jasiuk, I., & Meyers, M. A. (2021). Engineering with keratin: A functional material and a source of bioinspiration. *ISCIENCE*, 24, 102798. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102798>
- Lechuga Ardeo, S. (2022). *Compostaje con lana de oveja mallorquina; Soluciones agroecológicas contra el desperdicio de recursos*. Universidad de La Laguna.
- Lewis, D. M., & Rippon, J. A. (2013). *The coloration of wool and other keratin fibres*. Wiley.
- Li, H., Kim, M.-J., & Kim, S.-J. (2009). Cost-cutting of nitrogen source for economical production of cellulolytic enzymes by *Trichoderma inhamatum* KSJ1. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 26(4), 1070–1074. <https://doi.org/10.1007/s11814-009-0178-7>
- Mahesh, M. S., Chaudhary, S. K., Tewari, D., & Dutta, N. (2024). Hydroponic forage for ruminant feeding: A comprehensive review. *Animal Nutrition and Feed Technology*, 24(2), 441–459. <https://doi.org/10.5958/0974-181X.2024.00034.9>
- Malécange, M., Sergheraert, R., Teulat, B., Mounier, E., Lothier, J., & Sakr, S. (2023). Biostimulant Properties of Protein Hydrolysates: Recent Advances and Future Challenges. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 11). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms24119714>
- Mattiello, S., Guzzini, A., Del Giudice, A., Santulli, C., Antonini, M., Lupidi, G., & Gunnella, R. (2023). Physico-Chemical Characterization of Keratin from Wool and Chicken Feathers Extracted Using Refined Chemical Methods. *Polymers*, 15(1). <https://doi.org/10.3390/polym15010181>
- Mekonnen, E., Mekuriaw, Y., Tegegne, F., & Asmare, B. (2019). Evaluation of fodder biomass yield of hydroponically-grown barley and oats and the effects on intake, digestibility and weight gain of Washera sheep when fed as a supplement to a basal diet of natural pasture hay in Ethiopia. *Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales*, 7(5), 519–526. [https://doi.org/10.17138/tgft\(7\)519-526](https://doi.org/10.17138/tgft(7)519-526)
- Moktip, T., Salaipeth, L., Cope, A. E., Taherzadeh, M. J., Watanabe, T., & Phitsuwan, P. (2025). Current Understanding of Feather Keratin and Keratinase and Their Applications in Biotechnology. *Biochemistry Research International*, 2025(1). <https://doi.org/10.1155/bri/6619273>

- Naik, P. R., Raman, G., Narayanan, K. B., & Sakthivel, N. (2008). Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil. *BMC Microbiology*, *8*(1), 230. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-230>
- Nelly Noah Metomo, F. N., Fatima, T., Essamlali, Y., Amadine, O., & Zahouily, M. (2024). Optimization of keratin hydrolysis from sheep wool waste for enhanced crop performance: A sustainable approach in agriculture. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *60*, 103310. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2024.103310>
- Nelly Noah Metomo, F. N., Tayi, F., Younes, E., Amadine, O., & Zahouily, M. (2024). Production of sheep wool keratin hydrolysate and evaluation of its effectiveness in promoting maize cultivation. *Journal of Environmental Management*, *366*, 121648. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2024.121648>
- Núñez Torres, O. P., Guerrero López, J. R., Leiva-Mora, M., & Almeida Secaira, R. I. (2023). Producción de avena en corte e hidropónica sembrada a diferentes dosis y tiempo de cosecha. *Bionatura*, *8*(3), 1–7. <https://doi.org/10.21931/RB/2023.08.03.6>
- Official Journal of the European Union. (2019). *REGULATION (EU) 2019/1009 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL*.
- Omeroglu, M. A., Albayrak, S., Arslan, N. P., Ozkan, H., Adiguzel, A., & Taskin, M. (2023). Evaluation of wool protein hydrolysate as peptone for production of microbial enzymes. *3 Biotech*, *13*(1), 31. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03456-0>
- Ordoñez-Valencia, C. (2014). *INTERACCIÓN DE Trichoderma viride Y AGENTES QUÍMICOS ANTIFÚNGICOS EN EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE Sclerotinia sclerotiorum*. Colegio de Posgraduados.
- Palansooriya, K. N., Dissanayake, P. D., Igalavithana, A. D., Tang, R., Cai, Y., & Chang, S. X. (2023). Converting food waste into soil amendments for improving soil sustainability and crop productivity: A review. *Science of The Total Environment*, *881*, 163311. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163311>Obtenerderechosycontenido
- Palla, M., Turrini, A., Cristani, C., Bonora, L., Pellegrini, D., Primicerio, J., Grassi, A., Hilaj, F., Giovannetti, M., & Agnolucci, M. (2022). Impact of sheep wool residues as soil amendments on olive beneficial symbionts and bacterial diversity. *Bioresources and Bioprocessing*, *9*(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-022-00534-2>

- Parlato, M. C. M., Porto, S. M. C., & Valenti, F. (2022). Assessment of sheep wool waste as new resource for green building elements. *Building and Environment*, 225, 109596. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2022.109596>
- Pastorelli, G., Serra, V., Turin, L., & Attard, E. (2024). Hydroponic Fodders for Livestock Production – a Review. *Annals of Animal Science*, 24(3), 645–656. <https://doi.org/10.2478/aoas-2023-0075>
- Perța-Crișan, S., Ursachi, C. Ștefan, Gavrița, S., Oancea, F., & Munteanu, F. D. (2021). Closing the loop with keratin-rich fibrous materials. In *Polymers* (Vol. 13, Issue 11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/polym13111896>
- Petek, B., & Marinšek Logar, R. (2021). Management of waste sheep wool as valuable organic substrate in European Union countries. *Journal of Material Cycles and Waste Management*, 23(1), 44–54. <https://doi.org/10.1007/s10163-020-01121-3>
- Qian, Y., Sun, Y., Zhong, L., Sun, N., Sheng, Y., Qu, Y., & Zhong, Y. (2019). The GATA-Type Transcriptional Factor Are1 Modulates the Expression of Extracellular Proteases and Cellulases in *Trichoderma reesei*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(17), 4100. <https://doi.org/10.3390/ijms20174100>
- Quiñones-Muñoz, T. A., Hernández-Martínez R., & Lizardi-Jiménez M.A. (2018). *Aplicación del modelo matemático de Gompertz en cinéticas de crecimiento de cepas de Trichoderma sp.*
- Ranjit, E., Hamlet, S., George, R., Sharma, A., & Love, R. M. (2022). Biofunctional approaches of wool-based keratin for tissue engineering. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, 7(1), 100398. <https://doi.org/10.1016/j.jsamd.2021.10.001>
- Rippon, J. A. (2013). The Structure of Wool. In *The Coloration of Wool and other Keratin Fibres* (pp. 1–42). Wiley. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781118625118.ch1>
- SADER. (2017). *Obtenido de La ovinocultura, una actividad muy arropadora.* <https://www.gob.mx/agricultura/>
- Saeed, H., Ragaey, A., Samy, Z., Ashraf, V., ElMostafa, A., Ahmad, N., Bebawy, E., Sorour, N. E. M., El-Sayed, S. M., Bakry, A., Ebeed, N., Elhariry, H., El-Noby, T., & Abu-Hussien, S. H. (2025). Optimization and characterization studies of poultry waste valorization for

peptone production using a newly Egyptian *Bacillus subtilis* strain. *AMB Express*, 15(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s13568-024-01794-1>

Sánchez, Ó. J., Ospina, D. A., & Montoya, S. (2017). Compost supplementation with nutrients and microorganisms in composting process. *Waste Management*, 69, 136–153. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.08.012>

Sanchez-Cuasapud, D. del R., Botero-Botero, L. R., & Hincapié-Pérez, M. (2024). Inoculation and microelements: two important factors for enhanced conidiogenesis of *Trichoderma asperellum* in solid and liquid fermentation. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 77(1), 10601–10609. <https://doi.org/10.15446/rfnam.v77n1.108175>

Sandhya, C., Adapa, L. K., Nampoothiri, K. M., Binod, P., Szakacs, G., & Pandey, A. (2004). Extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in submerged fermentation. *Journal of Basic Microbiology*, 44(1), 49–58. <https://doi.org/10.1002/jobm.200310284>

Sani, M. N. H., & Yong, J. W. H. (2022). Harnessing Synergistic Biostimulatory Processes: A Plausible Approach for Enhanced Crop Growth and Resilience in Organic Farming. In *Biology* (Vol. 11, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biology11010041>

Schaafsma, G. (2009). Safety of protein hydrolysates, fractions thereof and bioactive peptides in human nutrition. In *European Journal of Clinical Nutrition* (Vol. 63, Issue 10, pp. 1161–1168). <https://doi.org/10.1038/ejcn.2009.56>

Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER). (2024). *Detrás de la Ovinocultura: Una Mirada a la Crianza de Ovejas en México*. <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/detras-de-la-ovincultura-una-mirada-a-la-crianza-de-ovejas-en-mexico>

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2023). *Anuario Estadístico de la Producción Ganadera*. [https://nube.siap.gob.mx/cierre\\_pecuario/](https://nube.siap.gob.mx/cierre_pecuario/)

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2024). *Panorama Agroalimentario-2024 Finish* (2024th ed.). <https://online.pubhtml5.com/rsarc/ywrn/>

Sharma, S. C., Sahoo, A., & Chand, R. (2019). Potential use of waste wool in agriculture: An overview. *Indian Journal of Small Ruminants (The)*, 25(1), 1. <https://doi.org/10.5958/0973-9718.2019.00019.9>

- Shavandi, A., Silva, T. H., Bekhit, A. A., & Bekhit, A. E. D. A. (2017). Keratin: Dissolution, extraction and biomedical application. In *Biomaterials Science* (Vol. 5, Issue 9, pp. 1699–1735). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/C7BM00411G>
- Shentu, X.-P., Liu, W.-P., Zhan, X.-H., Xu, Y.-P., Xu, J.-F., Yu, X.-P., & Zhang, C.-X. (2014). Transcriptome Sequencing and Gene Expression Analysis of *Trichoderma brevicompactum* under Different Culture Conditions. *PLoS ONE*, 9(4), e94203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094203>
- Siordia Grave, M. A., Figueroa Espinoza, A., & Cárdenas Cota, H. (2007). *EFFECTO DE LOS COMPONENTES DE SEIS MEDIOS DE CULTIVO SÓLIDO SOBRE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE Trichoderma harzianum Y SU PRODUCCIÓN*.
- Su, C., Gong, J. S., Ye, J. P., He, J. M., Li, R. Y., Jiang, M., Geng, Y., Zhang, Y., Chen, J. H., Xu, Z. H., & Shi, J. S. (2020). Enzymatic Extraction of Bioactive and Self-Assembling Wool Keratin for Biomedical Applications. *Macromolecular Bioscience*, 20(9). <https://doi.org/10.1002/mabi.202000073>
- Sun, Y., Qian, Y., Zhang, J., Wang, Y., Li, X., Zhang, W., Wang, L., Liu, H., & Zhong, Y. (2021). Extracellular protease production regulated by nitrogen and carbon sources in *Trichoderma reesei*. *Journal of Basic Microbiology*, 61(2), 122–132. <https://doi.org/10.1002/jobm.202000566>
- Tacias-Pascacio, V. G., Castañeda-Valbuena, D., Morellon-Sterling, R., Tavano, O., Berenguer-Murcia, Á., Vela-Gutiérrez, G., Rather, I. A., & Fernandez-Lafuente, R. (2021). Bioactive peptides from fisheries residues: A review of use of papain in proteolysis reactions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 184, 415–428. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.076>
- Taskin, M., Unver, Y., Firat, A., Ortucu, S., & Yildiz, M. (2016). Sheep wool protein hydrolysate: a new peptone source for microorganisms. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 91(6), 1675–1680. <https://doi.org/10.1002/jctb.4971>
- Tiwari, V. N., Pathak, A. N., & Lehri, L. K. (1989). Effect of cattle dung and rock phosphate on composting of wool waste. *Biological Wastes*, 27(3), 237–241. [https://doi.org/10.1016/0269-7483\(89\)90004-9](https://doi.org/10.1016/0269-7483(89)90004-9)
- Tulu, D., Gadissa, S., Hundessa, F., & Kebede, E. (2023). Contribution of Climate-Smart Forage and Fodder Production for Sustainable Livestock Production and Environment:

Lessons and Challenges from Ethiopia. *Advances in Agriculture*, 2023, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2023/8067776>

Vázquez, J. A., Durán, A. I., Menduñía, A., & Nogueira, M. (2020). Biotechnological Valorization of Food Marine Wastes: Microbial Productions on Peptones Obtained from Aquaculture By-Products. *Biomolecules*, 10(8), 1184. <https://doi.org/10.3390/biom10081184>

Verdnik, A., Čolnik, M., Knez, Ž., & Škerget, M. (2021). Isolation of Keratin from Waste Wool Using Hydrothermal Processes. *Acta Chimica Slovenica*, 68(2), 433–440. <https://doi.org/10.17344/acsi.2020.6538>

Vouvoudi, E. C., Dimaki, M. I., Ainali, N. M., Koronaiou, L.-A., Lambropoulou, D. A., Nikolaidis, N. F., & Bikiaris, D. N. (2024). Alkali hydrolysis of wool fibres using microwave irradiation as a recycling approach for handling wool-waste. *Polymer Degradation and Stability*, 223, 110744. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2024.110744>

Wang, B., Yang, W., McKittrick, J., & Meyers, M. A. (2016). Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. In *Progress in Materials Science* (Vol. 76, pp. 229–318). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2015.06.001>

Yoshimura, Y., & Ohe, T. (2012). Effect of Surfactant Pretreatment on Enzymatic Hydrolysis of Wool Fiber. *Sen'i Gakkaishi*, 68(5), 107–111. <https://doi.org/10.2115/fiber.68.107>

Zhang, Z., Han, H., Zhao, J., Liu, Z., Deng, L., Wu, L., Niu, J., Guo, Y., Wang, G., Gou, X., Li, C., Li, C., & Liu, C.-M. (2025). Peptide hormones in plants. *Molecular Horticulture*, 5(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s43897-024-00134-y>

Zheljazkov, V. D., Stratton, G. W., & Sturz, T. (2008). Uncomposted wool and hair-wastes as soil amendments for high-value crops. *Agronomy Journal*, 100(6), 1605–1614. <https://doi.org/10.2134/agronj2007.0214>

Zhu, S., Zhou, Q., Yi, J., Xu, Y., Fan, C., Lin, C., Wu, J., & Lin, Y. (2023). Using Wool Keratin as a Structural Biomaterial and Natural Mediator to Fabricate Biocompatible and Robust Bioelectronic Platforms. *Advanced Science*, 10(11). <https://doi.org/10.1002/advs.202207400>

Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., & van 't Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1875–1881. <https://doi.org/10.1128/aem.56.6.1875-1881.1990>

## Apéndices

### Apéndice A

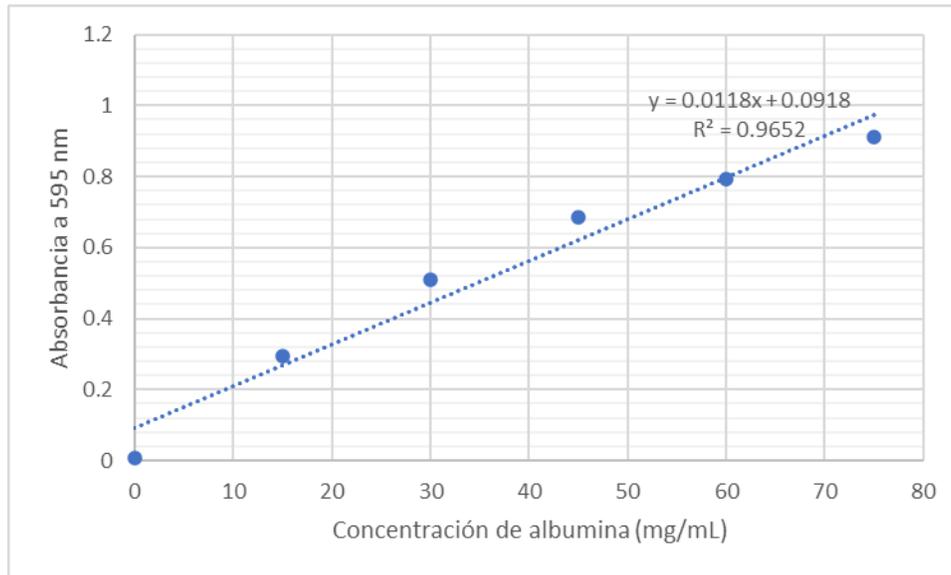


Figura A 1 Curva de calibración con albumina de huevo a 594 nm

### Apéndice B

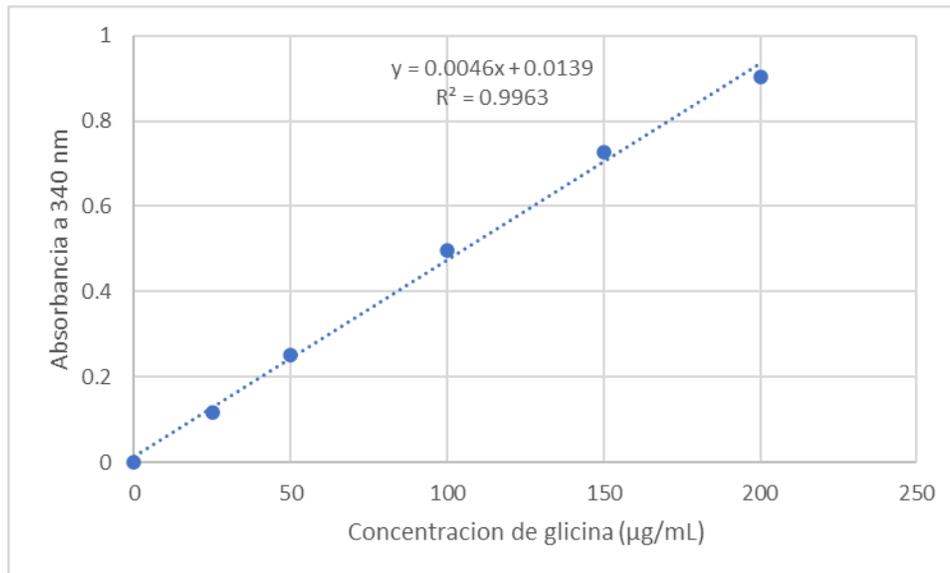


Figura A 2 Curva de calibración con glicina a 340 nm.

## Apéndice C

**Tabla 11** Parámetros estimados al modelo de Gompertz de las cinéticas de crecimiento micelial de *T. harzianum*.

Fuente de peptona	Nivel	$R^2$	Tamaño máximo ( $A$ )	Tasa de crecimiento ( $\mu_{max}$ )	Tiempo de inflexión ( $\lambda$ )
<b>PDA</b>	(0 g/L)	0.993 ± 0.001	87.54 ± 0.12	41.00 ± 5.29	0.59 ± 0.11
<b>P</b>	(4 g/L)	0.993 ± 0.004	88.29 ± 0.43	35.64 ± 1.88	0.86 ± 0.07
<b>HK</b>		0.994 ± 0.004	99.50 ± 1.36	18.74 ± 0.71	0.72 ± 0.09
<b>HK+E</b>		0.998 ± 0.001	92.61 ± 2.39	11.37 ± 0.32	0.50 ± 0.07
<b>HK+P</b>		0.998 ± 0.001	101.65 ± 2.39	14.78 ± 1.39	0.68 ± 0.13
<b>P</b>	(6 g/L)	0.933 ± 0.100	130.62 ± 72.92	29.54 ± 13.27	0.63 ± 0.57
<b>HK</b>		0.997 ± 0.001	126.18 ± 5.04	14.39 ± 0.44	0.72 ± 0.10
<b>HK+E</b>		0.998 ± 0.001	87.20 ± 4.24	10.52 ± 0.17	0.52 ± 0.01
<b>HK+P</b>		0.997 ± 0.001	107.48 ± 72.92	14.56 ± 0.63	0.67 ± 0.03
<b>P</b>	(8 g/L)	0.933 ± 0.100	88.32 ± 0.33	36.02 ± 1.02	0.85 ± 0.08
<b>HK</b>		0.997 ± 0.001	103.13 ± 5.78	12.98 ± 0.42	0.55 ± 0.06
<b>HK+E</b>		0.998 ± 0.001	99.06 ± 9.80	10.20 ± 0.39	0.52 ± 0.10
<b>HK+P</b>		0.997 ± 0.001	102.23 ± 3.85	12.21 ± 0.35	0.51 ± 0.03

± representa la desviación estándar

## Anexos

### Anexo 1: SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

**Gel de separación:** En un matraz kitazato de 25 mL, añadir 4 mL de acrilamida al 30% junto con 4 mL de buffer Tris-HCl 1.5 M, pH=8.8. Adicionar 80 µL de SDS al 10% disuelto en agua y desgasificar mediante agitación suave por 15 min. Posteriormente, agregar 40 µL de persulfato de amonio al 10% disuelto en buffer pH=8.8 y 4 µL de TEMED. Finalmente, agitar manualmente y traspasar el líquido a los cristales (0.75 mm), hasta la altura utilizada habitualmente y terminar de rellenar el cristal con agua desionizada. Dejar polimerizar entre 2 y 3 h.

\*Una vez polimerizado el gel retirar el agua desionizada.

**Gel de concentración:** Mezclar en un matraz kitazato de 25 mL, 1.1 mL de acrilamida al 30% junto con 6.9 mL de buffer Tris-HCl 0.5 M, pH=6.8. Adicionar 80 µL de SDS al 10% disuelto en agua y desgasificar mediante agitación suave y aplicación de vacío por 15 min. Posteriormente, agregar 40 µL de persulfato de amonio al 10% disuelto en buffer 6.8 y 6 µL de TEMED. Finalmente, agitar manualmente y trasladar el líquido hasta el ras de los cristales, evitando la formación de burbujas, colocar los peines y esperar 30 min para colocar Parafilm y guardar en el refrigerador.

**Buffer de corrida:** Pesar por separado 3 g de tris y 14.4 g de glicina, disolverlos en 800 mL de agua desionizada, ajustar el pH a 8.3 con HCl 6N y aforar con agua desionizada. Una vez aforado, adicionar 1 g de SDS, disolverlo totalmente y volver a revisar el pH, ajustándolo si fuera necesario.

\*Preparar un día antes y conservar en refrigeración.

\*Verificar el pH antes de usarse y ajustarlos con HCL a 6 N.

**Buffer colorante:** Pesar 0.25 g de glicerina dentro de un tubo para centrifuga delgado (capacidad de alrededor de 10 mL). Posteriormente, adicionar 950 µL de agua desionizada, 250 µL de buffer Tris-HCl 0.5 M pH=6.8 (mismo que fue utilizado para hacer los geles de concentración), 400 µL de SDS al 10% (preparado un minuto antes de su adicción, pesando

0.05 g de SDS en un microvial y añadiendo 500  $\mu\text{L}$  de agua desionizada) y 100  $\mu\text{L}$  de azul de bromofenol.

**Preparación de la muestra:** Las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min y a 4°C, posteriormente se tomaron 4  $\mu\text{L}$  de cada sobrenadante, mezclarlo con 40  $\mu\text{L}$  de agua, se añadieron 20  $\mu\text{L}$  de buffer colorante y se mezcló en el Vortex por 5 s, se agregaron 3  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol y calentaron a 95°C por 5 min en termoblock. Finalmente, cuando las muestras se enfriaron se cargaron en los carriles del gel de concentración.

**Condiciones de corrida y volúmenes de inyección.** A cada gel se le inyectarán 10  $\mu\text{L}$  de macador de peso molecular y 15  $\mu\text{L}$  de cada muestra en carriles separados. La corrida se realiza a 200 V por alrededor de 1-2 horas, manteniendo la cámara de electroforesis en un baño de hielo.

## Anexo 2: T-SDS-PAGE (Schagger y Jagow, 1987)

**Tabla 12** La composición de los geles de T-SDS-PAGE

	<b>Gel concentrador (4 % T)</b>	<b>Gel espacidor (10% T)</b>	<b>Gel Separador (15% T)</b>
<b>30% A : 0.8 B</b>	132 $\mu\text{L}$	0.664 $\mu\text{L}$	2000 $\mu\text{L}$
<b>Tris/HCL pH: 8.8</b>	120 $\mu\text{L}$	400 $\mu\text{L}$	800 $\mu\text{L}$
<b>SDS 20%</b>	5 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$
<b>Agua desionizada</b>	734.6 $\mu\text{L}$	903 $\mu\text{L}$	1.14 $\mu\text{L}$
<b>APS 20%</b>	8 $\mu\text{L}$	16 $\mu\text{L}$	32 $\mu\text{L}$
<b>TEMED</b>	1 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$

Una vez preparado el gel, se preparó el buffer de corrida el cual se preparó con 0.1 M de Tris ajustado a pH: 8.25, posteriormente se añadió SDS al 10% y la Tricina al 0.1 M.

La preparación de la muestra se realizó de la misma manera que en el apartado anterior y se cargó en los geles 15  $\mu\text{L}$  de cada muestra. Las condiciones de corrida fueron de 75 V por 3 h. Una vez terminada la electroforesis, se fijaron con una solución de ácido acético al 7.5% durante 1 h en agitación, posteriormente se tiñeron con azul de Coomasie al 0.025% por 2 h, y se destiñeron en agua desionizada por 1 noche.

### **Anexo 3: Pruebas de actividad enzimática cualitativa**

**Amilolítica:** Se usó agar nutritivo adicionado de 0.2% de almidón soluble, pH 6; se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 min y se distribuyeron 20 mL por cada caja de Petri. La actividad se reveló al día 3 mediante la adición de Lugol, la aparición de un halo alrededor de las colonias se consideró como prueba positiva.

**Celulolítica:** Se preparó un medio de cultivo utilizando una solución salina estándar de Winogradski (5 mL) **Tabla 4.1**,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (1.0 g), solución de micronutrientes (1 mL) **Tabla 4.2**, agua destilada (1 L) y carboximetilcelulosa (10 g). Primero se los componentes solubles del medio de cultivo se disolvieron en 500 mL de agua destilada y se ajustó el pH a 6.5, posteriormente y por separado, se preparó una suspensión con carboximetilcelulosa, con ayuda de una licuadora, ambas soluciones se mezclaron y se añadió agua hasta a completar 1 L y se esterilizó a 121 °C durante 15 min.

La evidencia de la actividad se realizó al 3 día por lo que se utilizó una solución con Rojo Congo (0.1%) durante 15 min, posteriormente se decantó el colorante y se inundaron con solución 1 M de NaCl durante 15 min.

**Quitinolítica:** Se preparó un medio basal (MB) el cual consistía en 0.3 g/L de  $\text{MgSO}_4$ , 3 g/L  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ , 2 g/L  $\text{KH}_4\text{PO}_4$  y 1 g/L de ácido cítrico y se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de Tween 20. Posteriormente en 500 mL de agua se disolvió con ayuda de una licuadora 4.5 g/L de quitina coloidal y se mezcló con el medio basal, se añadieron 0.5 g/L de púrpura de bromocresol y se ajustó el pH a 4.7 y se acomplete el volumen a 1 L para añadir 30 g/L de agar. Se esterilizó en autoclave a 121° C durante 15 min. La actividad se evaluó al 3 día de la inoculación el medio de cultivo cambió el color de amarillo brillante a violeta intenso.

**Lipolítica:** Se preparó un medio de cultivo con 5 g/L de peptona de caseína, 1 g/L de extracto de levadura, 3.75 g/L de NaCl, 0.075  $\text{CaCl}_2$ , 15 g/L de agar, y 7.5 mL de aceite de oliva y Tween 20 1:1, 0,01% p/v de rodamina B. La actividad se presentó el día 3 y se consideró positiva al presentar un área clarificada alrededor del micelio.

**Proteolítica:** Se utilizó un medio de cultivo con 7.5 g/L de digesto pancreático de caseína, 2.5 g/L de extracto de levadura, 1 g/L de glucosa, solución de leche desnatada al 7 % y 15 g de agar, se esterilizó a 121 ° C durante 15 min. La actividad se reveló al día 2 y se consideró positiva mediante la aparición de clara alrededor de las células.

**Pectinolítica:** El medio se preparó en dos partes, la parte 1) la cual consiste en 2 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de pectina de naranja, 10 g/L y 30 g/L de agar. La parte 2) la cual contiene 2 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 4 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 6 g/L de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.001 g/L de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.01 g/L  $\text{Cl}_2$ , 10  $\mu\text{g/L}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 70  $\mu\text{g/L}$   $\text{MnSO}_4$ , 50  $\mu\text{g/L}$   $\text{CuSO}_4$ , 10  $\mu\text{g/L}$   $\text{MoO}_3$  a pH 5.

Se mezclaron volúmenes iguales de ambas partes, y se esterilizó a 121 °C durante 18 min y distribuyéndose en cajas de Petri. La actividad pectinolítica se reveló usando una solución Lugol la reacción se consideró positiva por la presencia de un halo claro alrededor de la colonia.

**Tabla 13** Formulación de la solución Winogradski

Reactivo	g/L
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	5
$\text{MgSO}_4$	2.5
$\text{NaCl}$	2.5
$\text{Fe}(\text{SO}_4)_3$	0.5
<b>*Se disuelve en 1 L de agua destilada</b>	

**Tabla 14** Formulación de la solución de micronutrientes

Reactivo	g/L
$\text{KMoO}_4$	0.05
$\text{MnSO}_4$	0.05
$\text{Na}_3\text{BO}_3$	0.05
$\text{CoNO}_3$	0.05
$\text{CdSO}_4$	0.05
$\text{Cu}_2\text{SO}_4$	0.05
<b>*Se disuelve en 1 L de agua destilada</b>	