

## Evaluación del incremento en la producción de enzimas queratinolíticas

Betina Galarza<sup>1,2</sup>, Ivana Cavello<sup>1,2</sup>, Laura Garro<sup>2</sup>, Cecilia Gortari<sup>1</sup>, Roque Hours<sup>1</sup>, Carlos Cantera<sup>2</sup>

1.- CINDEFI (UNLP; CCT-La Plata, CONICET), 50 y 115, (1900) La Plata, Argentina

2.- CITEC (INTI-Cueros; CICPBA), Camino Centenario e/505 y 508, (1897) Manuel B. Gonnert, Argentina

betinagal@hotmail.com; icavello@biotec.org.ar

### RESUMEN

El depilado convencional a base de sulfuro de sodio y cal da los valores máximos de polución en el área ribera, contribuyendo con un 50-60% a la contaminación total en términos de demanda bioquímica de oxígeno (DBO), demanda química de oxígeno (DQO), sólidos disueltos totales (SDT).

A partir de este estudio se puede concluir que el agregado de agentes reductores al medio de cultivo, en especial el tioglicolato de sodio, incrementa la producción de enzimas queratinolíticas. En el caso especial de *Trichophyton ajelloi* el tioglicolato de sodio fue utilizado no sólo como agente reductor sino como única fuente de carbono mientras que en el caso de la cisteína estaría incorporando además fuente de nitrógeno.

De esta manera, se puede afirmar el potencial uso de las queratinasas en las distintas etapas de la Tecnología del Cuero así como la posibilidad de agregar valor a los residuos sólidos, en este caso el residuo pelo, en procesos relacionados con la bioconversión en fertilizantes.

**Palabras clave:** Depilado, enzimas, tioglicolato, queratinas, reductores.

### Introducción

El área de ribera en Tecnología del Cuero tiene una notable influencia en las descargas totales tanto en el efluente líquido como en el gaseoso debido a que debe satisfacer descargas standards. El contenido de materia orgánica y la presencia de sólidos suspendidos en el efluente líquido dependen mayormente del proceso de depilado utilizado. El depilado convencional a base de sulfuro de sodio y cal rinde los valores máximos de polución en el área ribera, contribuyendo con un 50-60% a la contaminación total en términos de demanda bioquímica de oxígeno (DBO), demanda

química de oxígeno (DQO), sólidos disueltos totales (SDT) y generar además un efluente altamente alcalino de 100% de toxicidad.

El ácido sulfhídrico producido en el proceso de depilado es altamente tóxico aún en concentraciones tan bajas como 200 ppm. El uso extensivo de sulfuro no sólo produce consecuencias desfavorables para el medio ambiente sino que disminuye la eficacia de las plantas de tratamiento de efluentes. Las exigencias legales que deben cumplir las curtiembres en sus efluentes han aumentado y en algunos casos se han visto obligadas a cerrar sus puertas tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo como China (Wang R et al, 2009).

El proceso de depilado asistido con enzimas comparado con el método clásico a base de sulfuro de sodio trae aparejado una disminución en el contenido de sulfuro en el efluente del 50 % así como de los sólidos suspendidos en un 40%, reduciendo la emisión de olores y permitiendo por simple oxidación convertir el sulfuro en sulfato en concentraciones que cumplen con las especificaciones establecidas (Crispim et al, 2003).

Sin embargo a pesar de que el empleo de enzimas trae ventajas para el medio ambiente, su empleo está limitado debido a las dificultades que aparecen cuando se pretende utilizarlas sin sulfuro de sodio. Dichos inconvenientes se originan fundamentalmente en el mecanismo de proteólisis que no puede ser controlado totalmente debido a que perdura la acción enzimática sobre la estructura de la capa reticular, influyendo notablemente en las propiedades del cuero elaborado.

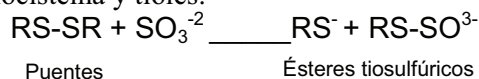
A pesar de estas dificultades se mantiene el interés en el desarrollo del depilado enzimático en el ámbito de actividades de investigación y desarrollo, con el fin de no confinar la utilización de preparados enzimáticos solamente a las etapas de remojo y purga (Cantera et al, 2000). En los últimos años, sus

aplicaciones se han extendido al desengrase y wet blue.

En relación a la especificidad de los preparados enzimáticos utilizados, las enzimas llamadas “queratinasas” actúan en el proceso de depilado o de la degradación de queratina (Riffel et al, 2003). Estas enzimas actúan como proteasas pero difieren de las proteasas no queratinolíticas en cuanto a su habilidad de degradar queratina insoluble (El Refai et al, 2005). Tienen una actividad proteolítica de amplia especificidad del tipo de las endopeptidasas.

Han sido purificadas y caracterizadas a partir de páncreas y diferentes microorganismos tales como ciertos géneros de hongos, actinomicetes y bacterias. En especial los hongos pertenecientes al género *Dermatophyton* (Kunert, 2000; Simpanya, 2000) y otros géneros pertenecientes al género de los fungi imperfecti (*Chrysosporium*, *Aspergillus*, *Alternaria*; *Trichuris*, *Curvularia*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geomyces*, *Gliomastix*, *Paecilomyces*, *Scopulariopsis*, *Penicillium* y *Doratomyces*) han sido reportados como buenos productores de enzimas queratinolíticas (Friedrich et al 1999).

Las queratinasas intervienen en el llamado proceso de “sulfitolisis” en el cual los puentes disulfuro intercadena de la cistina que estabilizan a la queratina se rompen, proveyendo el ión sulfito que a su vez puede reaccionar sobre el mismo tipo de enlace para generar ésteres tiosulfúricos como la S-sulfocisteína y tioles:



Puentes

Ésteres tiosulfúricos

disulfuro de la cistina

El sulfito reacciona selectivamente con los puentes S-S pero no reacciona con otros residuos de aminoácidos excepto el triptófano (Yu et al, 1981).

Como el medio de cultivo carece de ión sulfito, su síntesis debe tener lugar antes de que la sulfitolisis ocurra. Es poco conocido el mecanismo por el cual el sulfito se produce en los primeros estadios de la queratinolisis. La digestión proteolítica y la sulfitolisis son procesos simultáneos y complementarios utilizados por los microorganismos para transformar la queratina en material nutritivo (Galarza et al, 2004; Ruffin et al, 1976).

Yates reportó que la única actividad enzimática que puede estar relacionada con el proceso de depilación es la actividad proteolítica la cual involucra proteasas del tipo

de las endopeptidasas (Yates, 1968). En este sentido, este autor menciona a la caseína como el sustrato utilizado como marcador de actividad proteolítica, para predecir la capacidad de la enzima de ejercer un efecto depilatorio (Cantera et al, 2004).

Para los fines del presente trabajo, el sustrato caseína fue reemplazado por azocaseína, una aril amina diazotada que produce un derivado cromóforo.

### Objetivos

En el presente trabajo se determinaron el rendimiento enzimático y la concentración proteica del extracto crudo de cultivos en sustrato sólido y cultivo sumergido de *Trichophyton ajelloi* en presencia de agentes reductores.

### Materiales y métodos

#### Aislamiento de la cepa fúngica

La cepa seleccionada para este estudio, *Trichophyton ajelloi*, fue seleccionada de muestras de suelo del corral de Yak del zoológico de La Plata usando el método de “Vanbreuseghem’s hair technique” (Vanbreuseghem, 1952). Esta técnica consiste en incubar porciones de suelo no estéril en placas de Petri utilizando un sustrato queratínico estéril sobre el cual crecen aquellas cepas fúngicas que pueden degradarlo. El crecimiento micelial es observado luego de dos semanas de incubación en atmósfera húmeda. Luego del aislamiento, la cepa es cultivada y conservada en Agar Sabouraud con cloranfenicol y cicloheximida a 28°C para permitir el desarrollo de la especie fúngica medioambiental. Reportes indican que la cepa seleccionada no es patógena para el hombre o los animales.

### Condiciones del cultivo

#### Cultivo en sustrato sólido (CSS)

Los cultivos fueron desarrollados en placas de Petri conteniendo 3 g de “residuo pelo” obtenido a partir de un “proceso de depilado conservador del pelo” que fue previamente lavado, molido y autoclavado a 121°C por 15 minutos (Galarza et al, 2007).

#### Preparación del inóculo

El inóculo fue preparado como se describe a continuación: cultivos de 7 días en Agar Sabouraud de *Trichophyton ajelloi* en Erlenmeyers de 250 ml fueron resuspendidos mediante agitación magnética en 10 ml de

agua destilada estéril adicionada con Tween 80. Luego, se agregaron 90 ml de Medio Mineral Mínimo (MMM) compuesto de buffer  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,2, cloranfenicol 0,5 g/l y trazas de  $\text{Cl}_3\text{Fe}$ ,  $\text{Cl}_2\text{Zn}$  y  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ .

### Cultivos en sustrato sólido

Las placas de Petri preparadas como se describió fueron inoculadas con 10 ml de la suspensión de conidias (esporas fúngicas) cuyo recuento de viables fue en promedio de 105 ufc/ml. Para cada serie experimental (por duplicado) los siguientes agentes reductores fueron adicionados en concentraciones finales de 5 mM. 1) hidrocloreuro de L-cisteína monohidratado 2) tioglicolato de sodio 3) sulfito de sodio. En paralelo se realizó en las mismas condiciones experimentales, cultivos sin agente reductor para comparar el rendimiento.

La incubación se realizó a 28°C en estufa con atmósfera húmeda durante 28 días. Cada tres días, dos placas fueron retiradas del cultivo, y se extrajeron las enzimas adsorbidas al micelio mediante el agregado de 30 ml de  $\text{ClNa}$  0,5N, agitando durante 15 min. El “extracto crudo” obtenido fue filtrado en vacío a través de una membrana de celulosa de 0,45  $\mu\text{m}$  en baño de agua-hielo y guardado a -20°C hasta el posterior análisis de contenido proteico y actividad proteolítica.

### Cultivos líquidos sumergidos

Estos cultivos fueron desarrollados, por duplicado, en Erlenmeyers de 500 ml usando 200 ml de MMM con 1,0% (w/v) de “residuo pelo” tratado como se describió anteriormente. Los agentes reductores fueron adicionados en concentraciones de 5mM, autoclavados por 15 min a 121°C e inoculados con 10 ml de la

suspensión de esporas. Se incubó el sistema a 200 rpm durante 28 días. Cada dos días se extrajeron 5 ml del cultivo para su análisis. Las muestras fueron centrifugadas a 3000 g por 15min y los sobrenadantes fueron fraccionados y guardados a -20°C.

### Determinación del contenido proteico y de la actividad proteolítica

La concentración proteica fue determinada por el método de Bradford (Bradford, 1976).

La actividad enzimática fue determinada utilizando como sustrato sulfanilamida-azocaseína (Sigma Chem. Co. St Louis, MO). La mezcla de reacción conteniendo 100  $\mu\text{l}$  de extracto crudo y 250  $\mu\text{l}$  de solución 1% (w/v) de sustrato en buffer 0,1 M Tris-HCl pH 9 fue incubada por 30 min en agitación a 37°C. La reacción se detuvo por el agregado de 1 ml de ácido tricloroacético al 10% w/v (TCA) y centrifugada a 3000 g por 15 min. Luego a 1 ml de  $\text{OHNa}$  1 N se le adicionó 0,9 ml del sobrenadante, se agitó y la absorbancia fue medida a 440 nm. La reacción se realizó por triplicado. El blanco fue realizado en las mismas condiciones inactivando la enzima por calor a 100°C durante 5 min.

La unidad de actividad azocaseinolítica fue definida como la cantidad de enzima que en las condiciones de reacción causa un incremento de 0,1 Abs 440 por minuto.

### Resultados y discusión

Los siguientes gráficos representan: I y III: actividad azocaseinolítica en función de los días de cultivo en ambos medios (sólido y líquido sumergido) respectivamente; II y IV: la concentración proteica en función de los días de cultivo en ambos medios (sólido y líquido sumergido) respectivamente.

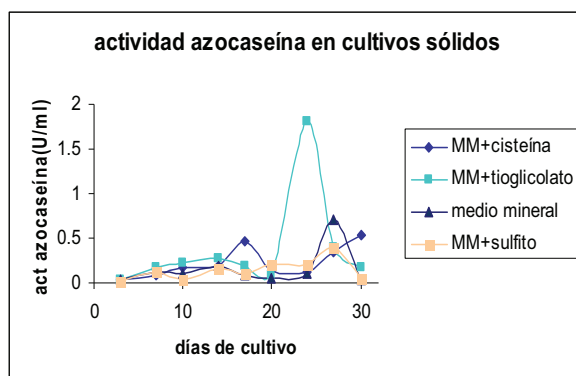


Gráfico I

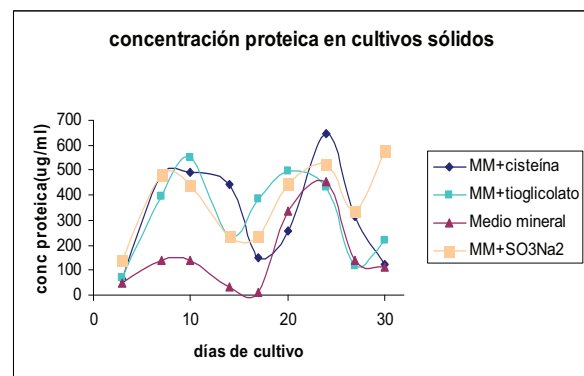


Gráfico II

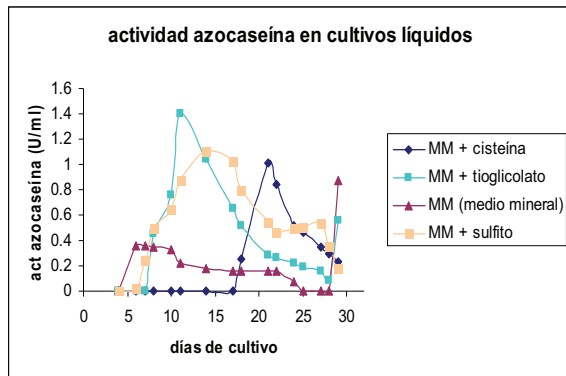


Gráfico III

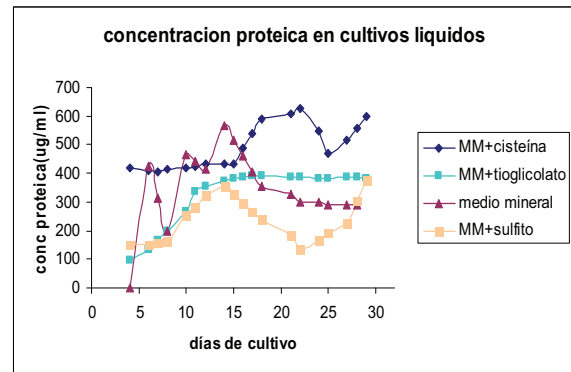


Gráfico IV

Se puede observar en los gráficos de concentración proteica vs días de cultivo, tanto en el cultivo en medio sólido como en el líquido que los valores mayores se obtienen con el agregado de cisteína. Para la actividad azocaseínica, el tioglicolato de sodio produce en medio líquido un máximo en el día 11. Este valor supera en 7 veces el valor producido en el mismo día por el medio mineral sin ningún aditivo. En el cultivo sólido el mayor valor de actividad se originó en el día

### Conclusiones

A partir de este estudio se puede concluir que el agregado de agentes reductores al medio de cultivo, en especial el tioglicolato de sodio, incrementa la producción de enzimas

queratinolíticas. Este hallazgo puede ser explicado en base al mecanismo del proceso de sulfitólisis.

En el caso especial de *Trichophyton ajelloi* el tioglicolato de sodio fue utilizado no sólo como agente reductor sino como fuente de

24 para el medio adicionado con tioglicolato de sodio. El aumento con respecto al medio mineral sólo es del mismo orden de magnitud que el observado en el medio líquido. Los valores máximos absolutos de actividad azocaseínica para el cultivo sólido fueron superiores a los encontrados para el cultivo líquido en todos los casos mientras que las máximas concentraciones proteicas fueron similares en ambos tipos de cultivo.

carbono y energía mientras que en el caso de la cisteína estaría incorporando además fuente de nitrógeno además de las suministradas por el residuo pelo.

De esta manera, se puede afirmar el potencial uso de las queratinasas en las distintas etapas de la Tecnología del Cuero como remojo, depilado y purga así como la posibilidad de agregar valor a los residuos sólidos, en este caso el residuo pelo, en procesos relacionados con la bioconversión en alimento balanceado y fertilizantes.

### Referencias bibliográficas

Bradford (1976) "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Analytical Biochemistry* 72 (248-254).

Cantera C, Garro ML, Goya L, Barbeito C, Galarza B (2004) "Hair saving unhairing process: part 6. Stratum corneum as a diffusion barrier: chemical-mechanical injury of epidermis". *Journal of the Society of Leather Technologists and chemists*, Vol 88 (121-131).

Cantera C (2000) "Hair saving unhairing process. Part 4. Remarks on the evolution of the investigations on enzyme unhairing". *Journal of the Society of Leather Technologists and chemists*, Vol.85 (125-132).

Crispim A, Mota M (2003) "Unhairing with enzymes". *Journal of the Society of Leather Technologists and chemists*, Vol 87 (198-202).

El Refai HA, AbdelNany MA, Gaballa A, El-Araby MH, Abdel Fattah AF (2005) "Improvement of the newly isolated *Bacillus pumilus* FH9 keratinolytic activity". *Process Biochemistry*, 40 (2325-2332).

Friedrich J, Gradisar H, Mandin D, Chaumont JP (1999) "Screening fungi for synthesis of keratinolytic enzymes". *Letters in Applied Microbiology* 28 (127-130).

Galarza BC, Goya L, Cantera C, Garro ML, Reinoso H, López L (2004) "Fungal biotransformation of bovine hair. Part 1: Isolation of fungus with keratinolytic activity". *Journal of the Society of Leather Technologists and chemists*, Vol 88 (93-98).

Galarza BC, Garro ML, Cavello I, Cazau MC, Hours R, Cantera CS (2007) "Fungal biotransformation of bovine hair: assessment of structural changes". *Journal of the Society of Leather Technologists and chemists*, Vol 91 (229-232).

Kunert, J (2000) "Physiology of keratinophilic fungi". Libro editado por la Revista Iberoamericana de Micología, Ed. RKS Kushwaha & Guarro J, Bilbao. ISBN 84-607-0711-3, cap 10 (77-85).

Riffel A, Ortolan S, Brandelli A (2003) "De-hairing activity of extracellular proteases produced by keratinolytic bacteria". *Journal Chemical Technology and Biotechnology*, 78 (855-859).

Ruffin P, Andrieu S, Biserte G (1976) "Sulphitolysis in keratinolysis. Biochemical proof". *Sabouradia*, 14 (181-184).

Simpanya M (2000) "Dermatophytes: Their taxonomy, ecology and pathogenicity". *Revista Iberoamericana de Micología*, (1-12)

Vanbreuseghem, R (1952) "Technique biologique pour l'isolement des dermatophytes du sol". *Annales Société Belgique Médecine Tropical* 32 (173-178).

Wang R, Min C, Haiming C, Li Z. (2009) "Enzyme unhairing-an eco friendly biotechnological process". *Journal of the Society of Leather Technologists and chemists*, Vol 93 (51-55).

Yates J (1968) "Studies in depilation. VI. Correlation of activity of depilatory enzyme systems with their activity against simple substrates". *Journal American Leather Chemist Association* .63 (474)

Yates J (1972) "Studies in depilation. Part X. The mechanism of the enzyme depilation process". *Journal of the Society of Leather Technologists and chemists*. 56 (158-175).

Yu M, Torchinsky S (1981) "Sulfur in Proteins". Pergamon Press Ltd, Headington Hill Hall, Oxford OX3 OBW, England, 1<sup>o</sup> ed.

### **Agradecimientos**

Este trabajo de investigación fue patrocinado por la Comisión de Investigación de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CICPBA), Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI) y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina



## REPELAN PSH-200 POLÍMERO HIDROFUGANTE

- ▲ Especialmente diseñado para cueros hidrofugados con altos requerimientos en el test Maeser.
- ▲ Se fija con curtientes minerales.
- ▲ Tinturas igualadas.
- ▲ Tacto agradable y excelente plenitud.



**CROMOGENIA-UNITS, S.A.**

Farell, 9 - 08014 Barcelona (Spain)  
Tel. (34) 93 432 94 00  
Fax (34) 93 422 60 14  
E-mail: cromogenia@cromogenia.com  
www.cromogenia.com

0218

