

Depilado enzimático de piel de ternera mediante proteasa y α -amilasa

Yunhang Zeng, Xuepin Liao, Jiahong Lu, Qiang He, Bi Shi*

National Engineering Laboratory for Clean Technology of Leather Manufacture, Sichuan University, Chengdu, P. R. China, Phone: 86-010-85400356, Fax: 86-010-85400356, e-mail: sibitannin@vip.163.com

Abstract

El depilado enzimático es una alternativa potencial al depilado convencional donde se utilizan la cal y el sulfuro sódico, pero el depilado de piel de ternera utilizando solamente una proteasa no puede eliminar el pelo de la piel completamente, en especial el pelo muy delgado. Con el objetivo de eliminar dicho efecto, se ha utilizado la mezcla de proteasa y α -amilasa para realizar un depilado de piel de ternera libre de cal y de sulfuros. Se determina el efecto del pH y de la temperatura en la actividad de la proteasa y de la α -amilasa, y se optimizan las condiciones de depilado analizando el grado de eliminación de pelo y la concentración de hidroxiprolina en el baño de pelambre. Los resultados experimentales indicaron que la adición de α -amilasa beneficia la eliminación del pelo durante el proceso de depilado enzimático. Las condiciones óptimas de depilado son 0.3% de proteasa, 0.1% de α -amilasa y 50% de agua a pH 7 y 25°C durante 2 h (los porcentajes se expresan sobre peso de piel en remojo), pudiendo conseguir como resultado una completa eliminación del pelo en bombo sin utilizar el caballete ni cuchillo de pelar.

Palabras clave: depilado, pelambre, proteasa, amilasa.

1. Introducción

La técnica de depilado convencional donde se utilizan el sulfuro sódico y la cal es un método efectivo y económico para la eliminación del pelo, debido al bajo coste de los reactivos utilizados y la gran calidad de la piel resultante. Así, el proceso convencional de depilado tiene como punto débil la presencia de sulfuros, la gran cantidad de residuo de cal y los productos de degradación del pelo que están presentes en los baños residuales¹. Por este motivo, se han desarrollado tecnologías medioambientalmente más aceptables, como el pelambre "Sirolime", el pelambre tipo "Blair", el pelambre enzimático, y el pelambre oxidativo, las cuales se han investigado con el

objetivo de reducir las cargas contaminantes de los baños. 2-7

El depilado enzimático utilizando proteasa o proteasa alcalina se ha estudiado de forma extensiva en las últimas décadas y se considera la tecnología de pelambre más acorde con el medio ambiente.^{4, 5, 8-10} Sin embargo, se observan algunas desventajas que restringen su aplicación práctica. Una de las desventajas es que en el depilado enzimático utilizando solamente la proteasa no se elimina el pelo por completo, especialmente el repelo, hecho que influye en una menor calidad de la piel.^{1,11}

La Alpha-amilasa, utilizada ampliamente en el sector alimentario, en detergentes, en el sector textil y en el del papel; tiene la capacidad de generar reacciones hidrolíticas sobre los carbohidratos que contienen proteoglicanos.^{12, 13} Se determina que la división de los proteoglicanos es beneficiosa para la acción de la proteasa sobre la piel.¹⁴ De este modo, es razonable hacer la hipótesis de que la introducción de la α -amilasa durante el pelambre enzimático permitirá aumentar el rendimiento de la eliminación del pelo.

En este estudio, se utiliza una mezcla de proteasa y α -amilasa para eliminar el pelo de la piel de ternera en bombo. Se determina el efecto del pH y de la temperatura sobre la actividad de la proteasa y de la α -amilasa, y se optimizan las condiciones de pelambre analizando el grado de eliminación del pelo y la concentración de hidroxiprolina (Hyp) en el baño de pelambre. Además, se compara la eficiencia del pelambre donde se utiliza la mezcla de la proteasa y la α -amilasa con un pelambre convencional de cal y sulfuro sódico.

2. Materiales y método

2.1 Materiales

Se utilizan pieles de ternera en remojo para las pruebas de depilado. Todos los reactivos utilizados para los procesos convencionales son de grado comercial. La proteasa utilizada en el pelambre es una endo-proteasa alcalina modificada genéticamente por una cepa de *Bacillus alcalophilus* de calidad comercial. La

α -amilasa usada en el depilado es de grado bioquímico. Los productos químicos utilizados para los análisis son también de grado analítico.

2.2 Ensayos de actividad enzimática

2.2.1 Efecto del pH y de la temperatura en la actividad de la proteasa

Se estudiaron los efectos del pH y de la temperatura sobre la actividad de la proteasa por incubación de 1 ml de 0,1 mg/ml de solución enzimática con 1 ml al 2% (p/v) de solución de caseína preparada en soluciones tampón de diferentes pH a diferentes temperaturas de incubación (25°C, 30°C, 35°C y 40°C) durante 10 min. A continuación, la incubación se detuvo mezclando la solución de enzima-caseína con 2ml de ácido tricloroacético 0,4 mol/L. La mezcla se mantuvo a 25°C durante 20 minutos y seguidamente se filtró. Se determinó la concentración de tirosina en el filtrado.¹⁵ Las soluciones tampón utilizadas fueron un tampón de fosfato (pH 7.2, pH 8.0) y un tampón de ácido bórico-solución salina (pH 9.0, pH 10.0, pH 11.0). Una unidad de actividad de proteasa se define como la cantidad de enzima que libera 1 μ g de tirosina por minuto.

2.2.2 Efecto del pH en la actividad de la α -amilasa

Se mezcla 1 ml de 1,0 mg/ml de solución de enzima con 1 ml de tampón británico-Robinson (pH 5.6, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0). La mezcla se calentó a 25 °C durante 15 min y después se incubó con 1% (p/v) de solución de almidón durante 5 min. a 25 °C. Se añadieron a la mezcla sucesivamente 4 mL de solución de NaOH 0,4 mol/L para detener la reacción. La mezcla se filtró y posteriormente se determinó la concentración de maltosa en el filtrado. Una unidad de actividad de α -amilasa se define como la cantidad de enzima que libera 1 g de maltosa por minuto a 25°C.¹⁶

2.3 Muestreo para las pruebas de depilado

La piel de ternera en remojo se sometió a un proceso de lavado y se dividió en 8 trozos numerados según se indica en la Figura 1 para los ensayos de pelambre. Cada grupo de muestras incluye cuatro piezas de piel en remojo tomadas del cuello, de la espalda, de la falda y de la culata, respectivamente.

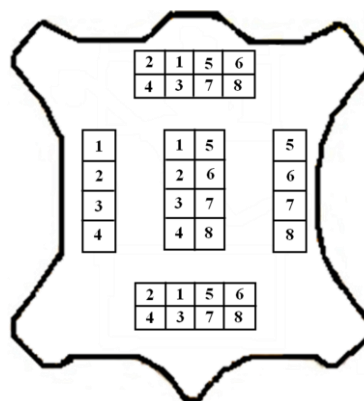


Figura 1 Muestreo realizado sobre las pieles de ternera en remojo para las pruebas de depilado

2.4 Optimización del depilado mediante el uso de proteasa

Se aplicó un diseño experimental ortogonal L16 (4⁵) (Tabla I) para optimizar las condiciones de depilado aplicando la proteasa. Se evalúa el efecto de la temperatura, el tiempo, el pH inicial del baño de pelambre, la cantidad de proteasa y la cantidad de agua analizando el grado de eliminación del pelo después del depilado.

Tabla I Diseño experimental ortogonal L₁₆ (4⁵)^a

Factor	Temperatura(°C)	Tiempo (min)	pH	Cantidad de proteasa (%)	Cantidad de agua (%)
Nivel 1	15	90	7.0	0.2	30
Nivel 2	20	120	8.0	0.3	50
Nivel 3	25	150	9.0	0.4	80
Nivel 4	30	180	10.0	0.5	100

a – Porcentaje expresado sobre peso de piel en remojo.

2.5 Optimización de la cantidad de α -amilasa

El pelambre se llevó a cabo en la solución de X% de α -amilasa (X representa la cantidad de α -amilasa, que corresponde a 0, 0.05, 0.10, 0.15, y 0.20); 0.3% de proteasa y 50% de agua a 25 °C y pH=7. Después del pelambre, se analizaron las concentraciones de Hyp en los efluentes de pelambre.

evolution **loves** creation

In 1912, we created the first synthetic tanning agent and have since evolved over the past 100 years. Basyntan® DLX-N & Basyntan® IS, our latest generation of Sulfone-based tanning agents not only improves fullness, softness and fastness, but also does not impart formaldehyde to leathers. Evolution that leads to the creation of possibilities? It's because at BASF, we create chemistry.

www.basf.com/leather



BASF
The Chemical Company

2.6 Comparación del depilado enzimático con un pelambre convencional

Una piel en remojo se dividió por el espinazo en dos hojas. Una hoja se sometió al proceso de pelambre o depilado utilizando la mezcla de proteasa y α -amilasa para el experimento, y la otra hoja se sometió a un proceso de pelambre convencional con sulfuro de sodio y cal para el control. Los procesos experimentales y de control del pelambre y calero se muestran en la Tabla II y en la Tabla III, respectivamente. Después del calero, las pieles son descalcadas, rendidas, piqueladas y curtidas al cromo según los procesos convencionales. Las pieles encaladas fueron liofilizadas y se observó la flor de la piel por microscopía electrónica de barrido (SEM, JSM-5900LV, JEOL LTD., Japón). Después de la curtición al cromo, se determinó la temperatura de contracción (T_s) de la piel wet-blue mediante el uso de un instrumento de registro de temperatura de contracción. A continuación, los trozos de cuero curtido al cromo se dejaron apilados durante 24 h y se analizó su contenido en cromo.

Tabla II Procesos experimentales de pelambre y calero

Proceso	Oferta de reactivo	Tiempo
Pelambre	50% agua, 0.3% proteasa, 0.1% α -amilasa	120 min
Lavado		20min
Calero	6% cal, 250% agua	30min
Rodar automático noche (5min/h), durante 10 horas. Siguiendo día rodar 30 min.		

Tabla III Procesos de control de pelambre y calero

Proceso	Oferta de reactivo	Tiempo
Pelambre y calero	100% agua, 1% NaHS	Run 20 min/ stop 40 min
	1% Na_2S	Run 20 min/ stop 40 min
	1% cal	Run 20 min/ stop 20 min
	0.5% Na_2S , 0.5% cal	Run 20 min/ stop 40 min
	0.5% Na_2S , 0.5% cal, 0.5% agente humectante	Run 20 min/ stop 40 min
	6% cal	10min
	300% agua	10min
Rodar automático noche (5min/h), durante 8 horas. Siguiendo día rodar 30 min.		

2.7 Métodos de estimación

2.7.1 Determinación de la concentración de Hyp

Los baños de pelambre se filtraron mediante el uso de tela de filtro de malla 100, y la

concentración en Hyp se determinó por el método descrito en la literatura.¹⁷

2.7.2 Determinación del grado de eliminación del pelo

El grado de eliminación del pelo se controló y se valoró en función de la zona sin pelo de la superficie total de las pieles en tripa.

2.7.3 Determinación del contenido en cromo

Se añadieron 2,0 g de piel curtida al cromo en 100 ml de solución de HCl de 2 mol/L, y se mantuvieron en agitación constante a 130 rpm durante 4 horas.¹⁸ A continuación, la mezcla se filtró y se determinó la concentración de cromo en el filtrado mediante el uso de un equipo de Espectroscopia de Emisión Atómica por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES, Optima 2100DV, Perkin Elmer, EE.UU.). La humedad del cuero curtido al cromo se analizó inicialmente y el contenido en cromo se calculó de la siguiente forma:

$$\text{Contenido en cromo} = \frac{\text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ peso en la piel al cromo}}{\text{Peso seco de piel al cromo}} \times 100\%$$

3. Resultados y discusión

3.1 Optimización del proceso de pelambre con el uso de proteasa

La actividad de la enzima tiene un efecto importante sobre la eficacia de pelambre enzimático. Por lo tanto, en este estudio se investiga por primera vez el efecto del pH y de la temperatura sobre la actividad de la proteasa. Tal y como se muestra en la Figura 2, la actividad de la proteasa fue relativamente inferior a pH neutro y se incrementó con el aumento de pH. Los daños en el colágeno de la piel aumentarían significativamente si la temperatura es superior a 40°C durante el proceso de depilado, por lo que el rango de temperatura empleada en este estudio es de 25°C a 40°C. Se determinó que el aumento de la temperatura tiene un efecto positivo sobre la actividad de la proteasa, hecho que puede atribuirse a que el aumento de la temperatura aumenta la velocidad de colisión entre la proteasa y el sustrato.¹⁹

El grado de eliminación del pelo de la piel es un parámetro clave para evaluar la eficacia de depilado, porque el pelo restante en la

superficie de las pieles tiene un efecto negativo sobre la calidad del cuero. Los efectos de las condiciones de pelambre, tales como la temperatura, el tiempo, el pH inicial del baño pelambre, la cantidad de proteasa y la cantidad de agua sobre el grado de eliminación del pelo se muestran en la Figura 3. De acuerdo con el experimento ortogonal, los efectos de las condiciones de pelambre se clasificaron de la siguiente forma: temperatura > tiempo > pH > cantidad de proteasa ≈ cantidad de agua. Las condiciones óptimas para el pelambre mediante el uso de la proteasa fueron de 0,3% de proteasa y 50% de agua a 25 °C y pH=10 durante 150 min. Sin embargo, se observó que el pelambre en bombo usando sólo la proteasa bajo las condiciones óptimas de trabajo no podía eliminar el pelo completamente, especialmente el repelo.

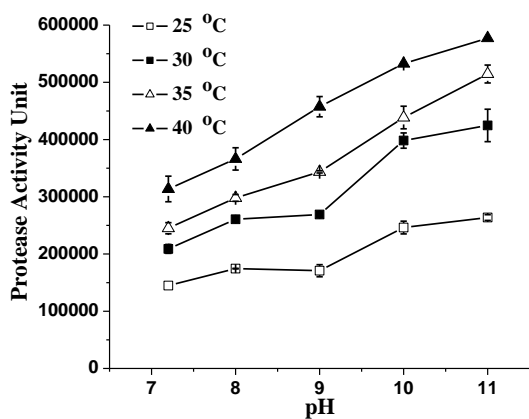


Figura 2 Efecto del pH y de la temperatura en la actividad de la proteasa

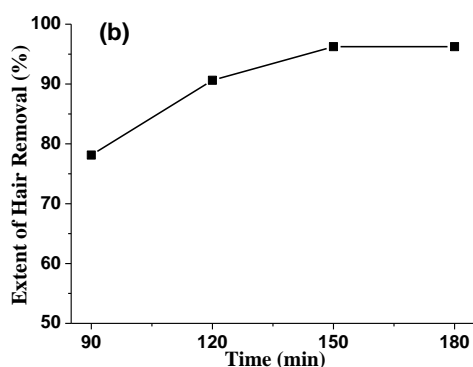
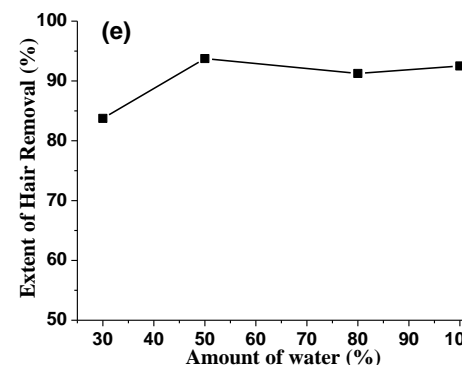
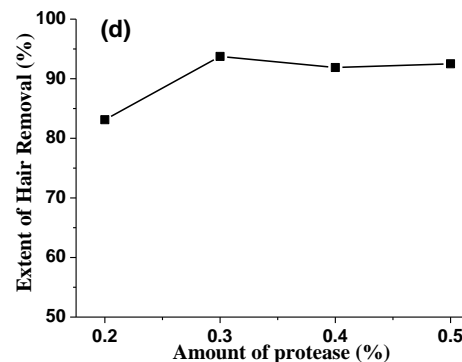
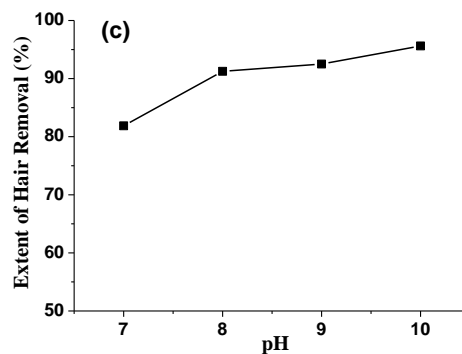


Figura 3 Efectos de (a) temperatura, (b) tiempo, (c) pH, (d) cantidad de proteasa y (e) cantidad de agua en el grado de eliminación del pelo



3.2 Optimización del pelambre utilizando la mezcla de proteasa y α -amilasa

El efecto del pH sobre la actividad de la α -amilasa se presenta en la Figura 4. La actividad se inhibe significativamente cuando el pH es superior a 8,0. Así, las pieles de ternera se depilaron con una solución al 0,3% de proteasa, una cierta dosis de α -amilasa y 50% de agua a pH=7 y 25 °C para lograr un mayor grado de eliminación del pelo. Se observó que el pelo se habían eliminado completamente en bombo en tan solo 2 h, cuando la dosis de α -amilasa fue del 0,1% o superior. Los resultados sugieren que la mezcla de proteasa y α -amilasa tiene una acción sinérgica, obviamente, para la eliminación del pelo, especialmente el repelo, y por lo tanto, podría superar con eficacia las deficiencias del pelambre sólo con proteasa. Este fenómeno se explica porque la α -amilasa puede beneficiar la división de los

proteoglicanos en la piel, lo cual es beneficioso para la acción de la proteasa sobre la piel.^{13, 14} Tal y como se muestra en la Figura 5, la concentración de Hyp en los baños de pelambre no presenta cambios con el aumento de la cantidad de α -amilasa. Por lo tanto, considerando el coste del reactivo, la dosis óptima de α -amilasa es de 0,1%. Otros experimentos indican que las condiciones óptimas de depilado se presentan mediante la mezcla de 0,3% de proteasa y 0,1% α -amilasa, 50% de agua y el pH 7 a 25°C durante 2 h. Estas condiciones de pelambre son aceptables, ya que el pH inicial del baño pelambre es neutro y respetuoso con el medio ambiente, y la temperatura es inferior a la de otros procesos de pelambre enzimático. Además, el depilado en bombo durante 2 h ahorra mucho tiempo y mano de obra en comparación con el depilado enzimático.^{10, 20}

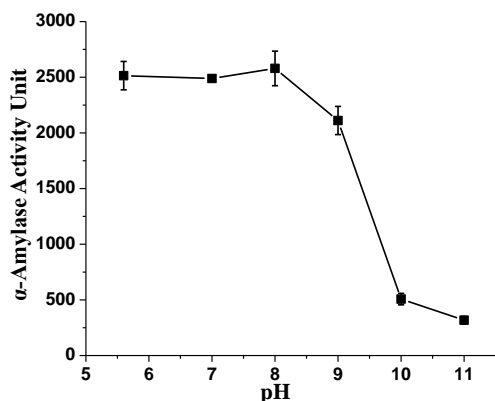


Figura 4 Efecto del pH en la actividad de la α -amilasa

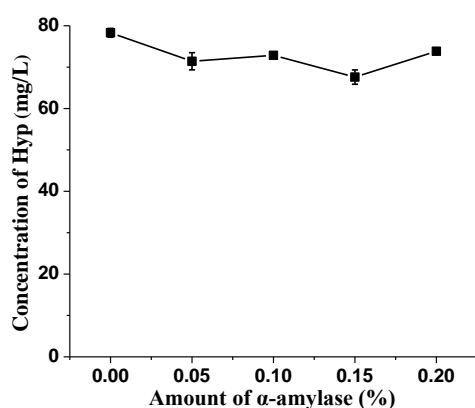
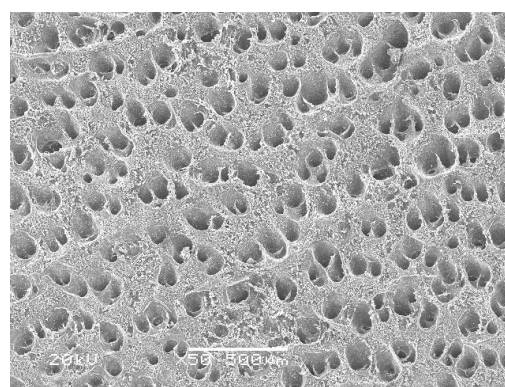


Figura 5 Concentración de Hyp en los baños de depilado

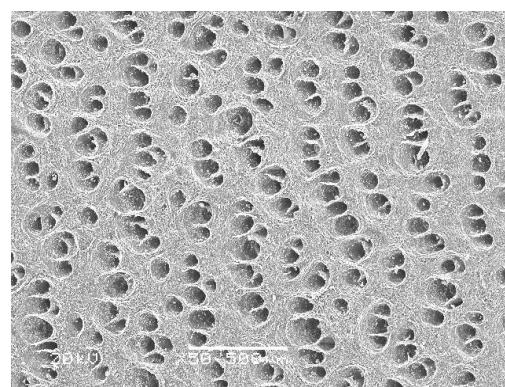
3.3 Comparación del control con el depilado experimental

Tal y como se muestra en las fotos SEM (Figuras 6a y 6b), los poros del pelo tanto del control como de las pieles en tripa eran

visibles y claros, hecho que indica que el pelambre con proteasa y α -amilasa no daña el grano de flor de la piel. El contenido en cromo y la Ts de los cueros curtidos al cromo utilizando los procesos experimentales de pelambre y de control se muestran en la Tabla IV. El contenido en cromo y la Ts del cuero curtido al cromo fueron superiores a los del control, lo que significa que el pelambre con proteasa y α -amilasa beneficia la absorción de cromo. Esto indica que el pelambre con la mezcla de proteasa y α -amilasa puede mejorar el grado de apertura de las fibras, mejorando la absorción del cromo.²¹



(a)



(b)

Figura 6 Observación de la cara flor de las pieles depiladas mediante SEM con un aumento de 50: (a) experimento y (b) control

4. Conclusiones

La Alfa-amilasa es eficaz ayudando a la proteasa en la eliminación total del pelop debido a su reacción hidrolítica sobre los proteoglicanos. La mezcla de proteasa y α -amilasa muestra una gran capacidad para el depilado en bombo de la piel de ternera. La combinación de proteasa y α -amilasa puede reemplazar el método convencional de cal y sulfuro de sodio en el proceso de depilado.

Tabla IV Contenido en cromo y Ts de la piel curtida al cromo del control y de los procesos experimentales de depilado

Muestras	Contenido en Cr ₂ O ₃ (%)	Ts (°C)
Experimentales	2.68	112
Control	2.35	105

5. Referencias

- Sivasubramanian S, Manohar B M, Rajaram A, et al. Ecofriendly lime and sulfide free enzymatic dehairing of skins and hides using a bacterial alkaline protease. *Chemosphere*, 2008, 70(5): 1015-1024.
- Cranston R W, Davis M H, and Scroggie J G. Development of the "Sirolime" unhairing process. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 1986, 81: 347-355.
- Blair T G. The Blair hair system. *Leather Manufacture*, 1986, 18(12): 104.
- Thangam E B, Nagarajan T, Rajkumar G S, et al. Application of alkaline protease isolated from *Alcaligenes faecalis* for enzymatic unhairing in tanneries. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 2001, 96(4): 127-132.
- Gehring A G, Dimaio G L, Marmer W N, et al. Unhairing with proteolytic enzymes derived from *Streptomyces griseus*. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 2002, 97(10): 406-411.
- Shi B, Lu X F, and Sun D H. Further investigations of oxidative unhairing using hydrogen peroxide. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 2003, 98: 185-192.
- Marmer W N, and Dudley R L. Oxidative dehairing by sodium percarbonate. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 2005, 100: 427-431.
- Paul R G, Mohamed I, Davighi D, et al. The use of neutral protease in enzymatic unhairing. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 2001, 96(5): 180-185.
- Raju A A, Chanorababu N K, Samivelu N, et al. Eco-friendly enzymatic dehairing using extracellular proteases from a *Bacillus* species isolate. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 1996, 91(5): 115-119.
- Dayanandan A, Kanagaraj J, Sounderraj L, et al. Application of an alkaline protease in leather processing: an ecofriendly approach. *Journal of Cleaner Production*, 2003, 11: 533-536.
- Christner J. Update on low sulfide systems. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 2000, 95(5): 163-169.
- Gupta R, Gigras P, Mohapatra H, et al. Microbial alpha-amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 2003, 38(11): 1599-1616.
- Thanikaivelan P, Rao J R, Nair B U, et al. Zero discharge tanning: A shift from chemical to biocatalytic leather processing. *Environmental Science & Technology*, 2002, 36(19): 4187-4195.
- Cantera C S, Garro M L, Goya L, et al. 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*, 2004, 88(3): 121-131.
- SB/T 10317-1999.
- Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 1959, 31: 426-428.
- Reddy G K, and Enwemeka C S. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. *Clinical Biochemistry*, 1996, 29(3): 225-229.
- Taylor M M, Diefendore E J, Phillips J G, et al. Wet process technology I. Determination of precision for various analytical procedures. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 1986, 81: 4-18.
- Zhou H X, and Chen Y. Chemically driven motility of brownian particles. *Physical Review Letters*, 1996, 77(1): 194-197.
- Nashy E H A, Ismail S A, Ahmady A M, et al. Enzymatic bacterial dehairing of bovine hide by a locally isolated strain of *Bacillus licheniformis*. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 2005, 89(6): 242-249.
- Saravanabhavan S, Thanikaivelan P, Rao J R, et al. Sodium metasilicate based fiber opening for greener leather processing. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(5): 1731-1739.

6. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Programa Nacional de alta Tecnología en R&D (National High Technologies R&D Program) (2011BAC06B11).

