

## **Detección de cambios en los parámetros bioquímicos durante los procesos de ribera de la piel**

Y. K. Lin<sup>1</sup>, S. Y. Chang<sup>1</sup>, C. F. Huang<sup>2</sup>, C. J. Yu<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Science, Chinese Culture University, NO. 55, Hwa-Kang Road, Yang-Ming-Shan, Taipei, Taiwan 11114, Phone: +886-9-86718723, Fax: +886-2-28610943, e-mail: nitrite.tw@gmail.com

<sup>2</sup>Tehchang Leather Products Co., LTD., No.121, Minsheng Rd., Dayuan Township, Taoyuan County 337, Taiwan, Phone: +886- 3-3867649, Fax: +886-3-3865008, E-mail: george@cthw.com.tw

<sup>3</sup>Jollity Enterprise Co., LTD., No.54-13, Syucuogang, Dayuan Township, Taoyuan County 337, Taiwan; Phone: + 886-3-3860757, Fax: +886-3-3851549, E-mail: chengjen.yu@jollity-enterprise.com

### **Resumen**

La utilización de un proceso libre de cal para sustituir el calero convencional durante los procesos de ribera es una tendencia globalizada. No sólo se reduce el rendimiento de los lodos y cargas medioambientales, sino que también se reducen los costes. La liberación de los componentes interfibrilares facilita la apertura de las fibras del colágeno. Pero es conveniente mantener las fibras de colágeno en la piel. El objetivo del presente estudio se basa en un estudio bioquímico para controlar los cambios de valor de pH, grados Baumé, actividad de la proteasa, concentración de colágeno, proteína y concentración de glicosaminoglicanos durante los procesos de ribera para mejorar la calidad del cuero. En el tratamiento convencional del cuero, el valor de pH aumenta por la adición de cal. Debido a la adición de un 0,3% de enzima, la actividad de la proteasa aumenta con el paso del tiempo. Este fenómeno debe ser correlacionado con las enzimas endógenas de las pieles en bruto. La liberación de los componentes interfibrilares se relaciona con el valor de pH. La actividad de la proteasa del método libre de cal alcanzó  $169,4 \pm 1,8$  U y la cantidad liberada de colágeno alcanzó un máximo a los 350 minutos. En comparación con los métodos tradicionales, la relación entre la proteasa, los componentes interfibrilares y el colágeno del método libre de cal han demostrado una serie de coeficientes de correlación elevados (0.400 ~ 0.550). La utilización del método libre de cal puede reducir la contaminación ambiental y los costes. Sin embargo, la cantidad de colágeno liberado en el método libre de cal fue cuatro veces mayor respecto al método tradicional. Se propone resolver este dilema mediante un proceso de optimización.

### **Palabras clave :**

Procesado de la piel, Calero libre de cal, Colágeno, Glicosaminoglicano

### **1. Introducción**

El tratamiento del cuero implica una serie de operaciones unitarias que pueden clasificarse en tres grupos: (1) Operaciones de ribera, donde se limpian las pieles de vacuno u ovino, (2) curtición, que estabiliza permanentemente las pieles o la matriz de la piel, y (3) post-curtición y acabado, donde se proporciona a la piel un valor estético añadido [1]. La eliminación de los componentes interfibrilares como proteínas, proteoglicanos y glicosaminoglicanos durante los procesos de calero son el objetivo de los procesos de ribera convencionales [2]. Además, el calero puede inducir a un "efecto de apertura de fibras", donde se aflojan las fibras de colágeno, siendo más fácil para los agentes de curtido, colorantes, engrasantes y otras sustancias a difundirse dentro de la piel. El pelambre enzimático mediante enzimas proteolíticas combina pequeñas cantidades de sulfuro de sodio causando un aflojamiento del folículo piloso, siendo ésta la tendencia global. Sin embargo, la hidrólisis excesiva puede provocar la degradación de las fibras de colágeno y influir en la calidad del cuero. El objetivo del presente estudio pretende observar los cambios en los componentes interfibrilares del colágeno durante los procesos de ribera y proporcionar información para el desarrollo de técnicas limpias y procesos verdes.

### **2. Materiales y métodos**

#### **2.1. Toma de muestras**

En el presente estudio se utilizan dos pieles ovinas saladas húmedas como materia prima. La piel se corta en cuatro trozos adyacentes siguiendo el cuello y la zona de falda, una parte de la piel corresponde aproximadamente a 5 kg (Fig.1 y Fig.2). Los procesos llevados a cabo siguen un "proceso de ribera convencional" y un "proceso de ribera libre de

cal". Todos los reactivos utilizados son de grado comercial o analítico.

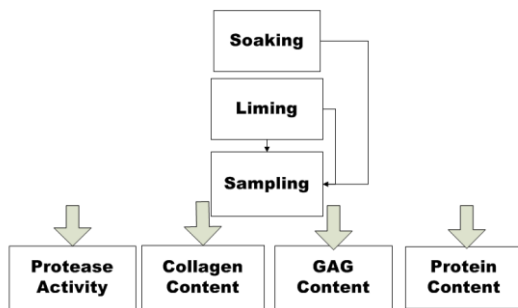


Fig. 1. Esquema del presente estudio.

## 2.2. Actividad de la Proteasa

La actividad proteolítica se determina según el método de Kembhavi, Kulkarni, and Pant [3] con algunas modificaciones.

Se utiliza como sustrato una solución al 0.6 % de caseinato de sodio en solución tampón de fosfato de sodio 0.1M (pH 8.0). Una unidad de actividad enzimática (U) se define arbitrariamente como la cantidad de enzima que se requiere para provocar un aumento de 0.001 en absorbancia a 280nm, bajo las condiciones de ensayo. La actividad enzimática se calcula de la siguiente forma:  $U/ml = (\Delta Abs_{280\text{ nm}} \times 10 \times \text{factor de dilución}) / 0.2$ . La actividad específica se expresa como unidades de actividad enzimática por mg de proteína.

## 2.3. Cuantificación del colágeno

La cuantificación del colágeno se lleva a cabo según un estudio previo [4]. La máxima cantidad de 4-hidroxiprolina liberada (4-Hyp) determina la presencia de colágeno en el baño.



Fig.2. Aspecto del bombo de planta experimental utilizado en el presente estudio

## 2.4. Cuantificación de glicosaminoglicano

La cantidad de ácido glucurónico presente en el baño se determina por la reacción de carbazol [5].

## 2.5. Cuantificación de la proteína

La proteína y la concentración de ácido urónico se determinan mediante el método de biuret [6] y utilizando sérum bovino de albúmina 0~10 mg/mL (BSA) en la calibración.

## 2.6 Análisis estadístico

Todo el protocolo se repite tres veces para cada baño. Todos los datos de este experimento se analizan por el programa GLM y comparando con el nuevo Test de Duncan de múltiples rangos contenido en el sistema Sigma Stat (versión 3.2), p-value < 0.05 se consideró como significativo. "compared with Duncan's new multiple ranges test contained in the Sigma Stat system (version 3.2), p-value < 0.05 was considered significant".

## 3. Resultados y discusión

Las operaciones de ribera utilizan principios complejos de bioquímica y química orgánica, siendo las áreas más complicadas para su comprensión en la manufactura de la piel [7]. Las operaciones de ribera tienen una gran importancia en ultimar la calidad de la piel. Sin embargo, no existe una técnica de seguimiento para determinar los cambios en los parámetros bioquímicos durante el proceso de las operaciones de ribera.

Se determinaron los cambios de pH, grados Baumé, actividad de la proteasa, concentración de proteína, contenido de colágeno y la concentración de glicosaminoglicanos de los baños finales interfibrillar, fibrillar and extra cellular matrix (ECM), respectively. The results shown the protein, collagen and glycosaminoglycan concentration in liquor were increased in liquor 4 and almost reach maximum in liquor. Previous result should be relate to the addition of lime between liquor 3 and liquor 4. Furthermore, the protein, collagen and glycosaminoglycan concentration in liquors were decreased in liquor 7 due to drain water between liquor 6 and liquor 7. Moreover the protein, collagen and glycosaminoglycan concentration peaked in liquor 9 means the overnight drum process would be enhanced the accumulation of protein, collagen and glycosaminoglycan.

tanto de las operaciones de ribera convencional como de las operaciones de ribera libre de cal, respectivamente.

El primer experimento se llevó a cabo siguiendo un proceso de ribera convencional (Tabla. 1) donde se utiliza la cal para eliminar el pelo y facilitar la "apertura de la fibra". Tanto el pH como los grados Baumé aumentaron considerablemente en el baño 4 debido a la adición de la cal (Tabla.3). La actividad de la proteasa llega a un índice importante durante el proceso de ribera. La proteasa detectada en el licor 1 indica que la piel todavía contenía pequeñas cantidades de proteasa endógena que puede afectar a la calidad del cuero. La actividad de la proteasa aumentó en el licor 2 debido a la adición de un 0,3% de una enzima exógena y su actividad quedó retenida durante el proceso de ribera convencional (Tabla. 3). La actividad de la proteasa alcanza un máximo en el licor 9, fenómeno que puede correlacionarse con el

procesado de la piel en bombo durante la noche entre el licor 8 y el licor 9. Las proteínas, el colágeno y los glicosaminoglicanos son indicadores de la matriz interfibrilar, fibrilar y de la matriz extra celular (ECM), respectivamente. Los resultados muestran que la concentración de proteínas, colágeno y glicosaminoglicanos en el licor 4 aumenta y casi alcanza su máxima intensidad en dicho licor. El resultado anterior debe relacionarse con la adición de cal entre licor 3 y el licor 4. Por otra parte, la concentración de proteína, colágeno y glicosaminoglicanos se redujo en el licor 7 debido al drenaje de agua entre el licor 7 y el licor 6. Por otra parte, la concentración de proteína, colágeno y glicosaminoglicanos alcanzó su punto máximo en el licor 9, hecho que indica que el procesado en bombo durante la noche puede favorecer la acumulación de proteína, colágeno y glicosaminoglicanos.

Tabla. 1 Cambios en los parámetros bioquímicos durante los procesos de ribera convencional

Proceso	%	Peso	Productos químicos	Tiempo	Consideraciones
Pre-remojo	300	15 kg	Agua		
	0.2	10g	Sodio carbonato		
	0.1	5g	STANDOX F330 (agente desengrasante)		
	0.1	5g	STARCIDE C (bactericida)	60	<b>Licor 1</b>
Escurrir baño					
Remojo principal	200	10 kg	Agua		
	0.3	15 g	INVIGAL SC (Proteasa)		
	0.1	5 g	STANDOX F255 (agente desengrasante)		
	0.1	5 g	STANDOX F330 (agente desengrasante)		
	1.0	50 g	Sodio carbonato	210	<b>Licor 2</b>
Escurrir baño					
Pelambre-Calero	100	5 kg	Agua		
	1	50 g	SIRO L330P (Agente de calero)	60	<b>Licor 3</b>
	+				
	1.2	60 g	Cal	60	<b>Licor 4</b>
	+				
	1.2	60g	Sodio sulfito		
	1.2	60g	Sodio hidrógenosulfuro	60	<b>Licor 5</b>
	+				
	1.0	50g	Cal		
	0.8	40g	Sodio sulfito	60	<b>Licor 6</b>
	+				
Licor	100	5kg	Agua	10	<b>60</b>
	0.5	25g	Cal	<b>Licor 7</b>	<b>Licor 8</b>
Rodar noche				5	<b>60</b> <b>Licor 9</b>

En el proceso convencional se utiliza una alta proporción de cal [1]. El logro más importante de los bioprocesos es reducir los residuos tóxicos y los sólidos totales. En el segundo experimento se utilizó una enzima para reemplazar la cal o el sulfuro. En el presente estudio se utilizó un 0,1% del producto INVIGAL SC y un 0,1% del producto NO.2 (proteasa alcalina bacteriana de alta especificidad comercial) en el licor 2 y el licor 5, respectivamente. Por otra parte, el carbonato

de sodio se utiliza para modular el pH y para mejorar la eliminación del pelo (Tabla. 2). El pH y los grados Baumé se incrementaron debido a la adición de productos químicos (Tabla. 4). La concentración de proteínas, colágeno y glicosaminoglicanos del licor aumentan significativamente en el licor 6. La cantidad liberada de proteínas y de colágeno alcanza un máximo en el licor 13 y una ligera disminución de entre el licor 15 y el licor 16.

Tabla. 2 Cambios en los parámetros bioquímicos durante el proceso de ribera convencional

Proceso	%	Peso	Productos químicos	Tiempo	Paro	Consideraciones
Pre-remojo	300	18kg	Agua			
	0.2	12g	Sodio carbonato			
	0.1	6g	STANDOX F330 (agente desengrasante)			
	0.1	6g	STARCIDE C (bactericida)	60	<b>Licor 1</b>	
Escurrir baño						
Remojo principal	200	12kg	Agua			
	0.3	18g	INVIGAL SC (Proteasa)			
	0.1	6g	STANDOX F255 (agente desengrasante)			
	0.1	6g	STANDOX F330 (agente desengrasante)			
	1.0	60g	Sodio carbonato	210	<b>Licor 2</b>	
Escurrir baño						
Pelambre-Calero	70	4.2kg	Agua			
	1	60g	SIRO L505 (Agente de calero)			
	0.3	18g	STANDOX F330 (agente desengrasante)	20 <b>Licor 3</b>	10	
	0.1	6g	SIRO NL		10	

	1.0	60g	Sodio hidróxido,	10	10	
				<b>Licor 4</b>		
	1.2	84g	Sodio sulfito	10	10	Repetir X3
				<b>Licor 6, 7, 8</b>		
	1	60g	Sodio hidróxido,	10	10	Repetir X2
				<b>Licor 9, 10</b>		
	1	60g	Sodio hidróxido,	10	10	X3
				<b>Licor 11, 12, 13</b>		
	1	60g	Sodio hidróxido,	10	50	
				<b>Licor 14</b>	<b>Licor 15</b>	
	80	4.8kg	Agua	5		
			O.N.	1	10	
					<b>Licor 16</b>	

En la comparación entre el proceso convencional y el proceso libre de cal, el efecto sinérgico entre el alto valor de pH y la proteasa exógena facilita la liberación de la inter-matriz fibrilar (proteínas y glicosaminoglicanos). Sin embargo, las cantidades liberadas de colágeno también aumentan simultáneamente y alcanzan un valor de cuatro veces superior respecto al proceso convencional. Estos resultados muestran que la enzima puede proporcionar una mejor eficiencia en el depilado y la apertura de las

fibras, pero puede inducir a la rotura de las fibras de colágeno de la dermis.

#### 4. Conclusiones

Los procesos asistidos por enzimas pueden reducir los residuos tóxicos y las cargas ambientales, pero la hidrólisis excesiva puede dañar las sustancias del cuero. Sin embargo, dicha desventaja podría controlarse a través de la optimización del proceso adecuado y regulando el uso de otros aditivos.

Tabla. 3 Cambios en los parámetros bioquímicos durante el proceso de ribera convencional

	pH	Be <sup>-</sup>	Actividad proteasa (U)	Concentración proteína (mg/mL)	Concentración 4-Hyp (µg/mL)	Contenido en Glicosaminoglicanos (µg/mL)
Licor 1	9.08±0.06	-	26.42±15.63	221.87±90.98	2.72±0.01	442.05±0.01
Licor 2	10.32±0.30	2.65±0.10	42.45±21.63	317.87±99.38	9.12±1.13	257.44±58.02
Licor 3	9.85±0.03	1.18±0.05	53.14±18.72	27.20±16.00	6.32±0.56	498.46±58.02
Licor 4	12.56±0.20	1.48±0.10	63.94±30.65	24.94±14.00	14.45±1.22	1226.67±43.51
Licor 5	12.60±0.03	2.53±0.17	69.06±37.88	707.20±159.79	28.59±0.46	1047.18±65.27
Licor 6	13.08±0.04	3.13±0.15	45.68±12.81	907.20±24.00	52.59±3.33	911.20±25.38
Licor 7	13.03±0.02	1.95±0.10	56.31±22.16	325.87±16.65	16.72±1.70	621.50±159.55
Licor 8	13.08±0.02	2.25±0.07	34.96±10.55	237.87±24.44	11.52±0.80	549.7±36.26
Licor 9	12.25±0.11	2.45±0.07	78.85±9.79	544.53±16.65	106.72±2.26	1001.03±65.27

- No se detecta

Tabla 4. Cambios en los parámetros bioquímicos durante el proceso de ribera libre de cal

	pH	Be <sup>-</sup>	Actividad proteasa (U)	Concentración de proteína (mg/mL)	Concentración 4-Hyp (µg/mL)	Contenido en Glicosaminoglicanos (µg/mL)
Licor 1	8.72	2.2	13.7±9.2	467.20±78.79	3.92±0.57	454.87±10.88

Licor 2	9.75	3.0	37.4±6.0	323.20±39.46	9.92±0.80	1236.92±14.50
Licor 3	9.54	1.6	47.5±4.5	101.87±39.46	5.52±0.57	475.38±10.88
Licor 4	12.02	2.2	34.0±27.5	165.87±12.22	9.92±0.80	436.92±94.28
Licor 5	11.49	1.8	169.4±1.8	195.20±21.17	38.32±1.70	826.67±108.79
Licor 6	12.31	3.8	163.8±2.5	1355.20±125.73	86.72±1.13	760.00±7.28
Licor 7	12.01	4.1	128.2±8.7	1336.53±96.77	123.92±1.70	1093.33±246.58
Licor 8	11.82	4.0	140.7±21.5	1989.87±281.29	184.32±4.52	1195.90±500.41
Licor 9	12.44	4.7	142.7±6.2	2235.20±531.44	337.92±1.13	888.21±36.26
Licor 10	12.29	4.9	132.0±17.0	1920.53±36.95	377.52±2.42	1339.49±43.51
Licor 11	12.62	4.7	145.0±6.0	2203.20±309.94	335.92±7.35	2136.92±511.29
Licor 12	12.53	5.0	132±17.0	2075.20±319.60	353.12±5.66	1870.26±141.42
Licor 13	12.45	5.0	124.0±11.6	2917.87±299.58	370.32±6.22	1903.59±420.64
Licor 14	12.73	5.0	123.0±7.6	2376.53±331.43	355.52±6.79	1072.82±29.01
Licor 15	12.73	4.9	93.3±15.9	2000.53±110.37	363.92±7.35	2131.79±54.39
Licor 16	12.66	3.2	64.5±7.2	1149.86±28.10	184.32±7.92	1260.00±576.56

## 5. Referencias

1. Thanikaivelan, P., J.R. Rao, B.U. Nair, and T. Ramasami (2004). Progress and recent trends in biotechnological methods for leather processing, *Trends Biotechnol.* **22**(4): p. 181-188.
2. Madhan, B., R. Raghava, and U.N. Balachandran (2010). Studies on the removal of inter-fibrillary materials part i: removal of protein, proteoglycan, glycosaminoglycans from conventional beamhouse process., *JALCA.* **105**: p. 145-149.
3. Merheb, C.W., H. Cabral, E. Gomes, and R. Da-Silva (2007). Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein, *Food Chemistry.* **104**(1): p. 127-131.
4. Lin, Y.K. and C.Y. Kuan (2010). Development of 4-Hydroxyproline Analysis Kit and Its Application in Collagen Quantification, *Food Chemistry.* **119**(3): p. 1271-1277.
5. Bitter, T. and H.M. Muir (1962). A modified uronic acid carbazole reaction, *Anal Biochem.* **4**: p. 330-334.
6. Itzhaki, R.F. and D.M. Gill (1964). A Micro-Biuret Method for Estimating Proteins, *Anal Biochem.* **9**: p. 401-410.
7. Thorstensen, T.C., *Practical leather technology.* 4 eds ed. 1993, Malabar, Florida: Krieger publishing company.

## 6. Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento al Sr. CJ Yu y el profesor Huang en la asistencia técnica y el apoyo financiero prestado por Jollity Enterprise Co., LTD y la Asociación Internacional de la Piel Taiwanés (TILA).