

Transformando un residuo sólido en un sub-producto útil para el proceso de ribera

Galarza Betina¹, Garro María Laura¹, Gortari Cecilia², Bonfranceschi Alfonsina¹, Hours Roque², Cantera Carlos¹

1- Inti-Cueros (Citec-CICPBA), Camino Centenario e/505 y 508, Gonnet (1897), Argentina (54-0221-4840244)

2- CINDEFI (CONICET-UNLP), 50 y 115, La Plata (1900), Argentina (54-0221-4833794).
Bioquímica Betina Claudia Galarza: e-mail: betinagal@hotmail.com

Resumen

En un proceso de depilado conservador del pelo, se puede recuperar hasta el 10% en peso de la piel bovina salada como "residuo pelo". Una cepa del hongo *Trichophyton ajelloi* fue aislada a partir de muestras de suelo local usando la "Técnica del anzuelo de Vanbreuseghem". Esta cepa fue capaz de crecer en un medio mineral líquido adicionado con 10 g/l de glucosa y 5 mM de ácido tioglicólico, usando "residuo pelo" como única fuente de C y N. Luego de la optimización de diferentes variables de cultivo fue posible obtener un extracto crudo de máximo rendimiento en actividad proteolítica, especialmente queratinolítica y en la producción de iones amonio y sulfhidrilos. Cuando el extracto crudo fue aplicado en el proceso de ribera (etapas de remojo, depilado y purga) en condiciones óptimas de reacción junto con tensioactivos y biocida a escala laboratorio, se observaron cambios a nivel histológico y efecto depilante por medio de microscopía óptica.

Es posible sugerir que este extracto puede ser un sub-producto de utilidad en tecnología del cuero.

Keywords: hongo *Trichophyton*, piel bovina, residuo pelo.

1. Introducción

La industria del cuero produce residuos potencialmente peligrosos. La generación de estos residuos dependen, en la etapa ribera, del proceso de depilado utilizado, principalmente. Para disminuir la contaminación se han desarrollado diversos sistemas de depilado, entre ellos el enzimático. La sustitución del proceso convencional a base de sulfuro de sodio y cal por el depilado asistido con enzimas puede reducir la polución y el costo del tratamiento de los efluentes (Galarza et

al.2012; Crispim et al. 2003; Schraeder et al. 1996).

La actividad de la enzima debe estar dirigida hacia la epidermis, folículos pilosos y lámina basal. Esta proteólisis debe ser controlada para evitar daños sobre el colágeno, principal proteína relacionada con la calidad del cuero (Cantera 2001; Cantera et al. 2004; Garro et al. 2008). Las posibilidades de la utilización comercial de las enzimas en la industria del cuero posee un importante impacto económico y ambiental (Riffel et al. 2003).

Las queratinasas, enzimas capaces de actuar como agentes depilantes proteolíticos y de degradar la queratina, han sido purificadas, caracterizadas y aisladas a partir de páncreas y de diferentes microorganismos tales como hongos, actinomycetes y bacterias.

Dentro de los hongos, algunos pertenecientes al Fungi imperfecti y a géneros de Dermatofitos (Kunert 2000; Simpanya 2000) han sido reportados como productores de enzimas queratinolíticas (Friedrich et al 1999). Estas enzimas extracelulares son capaces de degradar diversas proteínas presentes en la piel vacuna: queratinas, albúminas, globulinas (Lollar 1956) y proteoglicanos (Cantera 2001). El proceso de degradación de la queratina en los Dermatofitos implica dos mecanismos complementarios: la sulfitolisis y la hidrólisis de los enlaces peptídicos intracatenarios. En el primer mecanismo, la ruptura de los puentes disulfuro de la queratina produce ión sulfito que a su vez vuelve a actuar sobre el mismo tipo de enlace para generar ésteres tiosulfúricos (S-sulfocisteína principalmente) y tioles (Ruffin et al. 1976). En el segundo mecanismo tendría lugar la proteólisis de la proteína.

Durante el proceso de depilado conservador del pelo, se puede recuperar hasta un 10% del peso de la piel bovina salada como "residuo pelo".

En el presente trabajo, este residuo fue utilizado como fuente de C y N para el crecimiento del hongo *Trichophyton ajelloi*. Esta cepa fue aislada en muestras de suelo local con la "Técnica del anzuelo de Vanbreuseghem" (Galarza et al. 2004). El pool enzimático obtenido fue aplicado en distintas etapas del proceso de ribera a escala laboratorio, principalmente como agente depilante. Los cambios a nivel histológico fueron analizados con microscopía óptica.

Materiales y Métodos

Condiciones del cultivo

El inóculo fue preparado a partir de un cultivo de *Trichophyton ajelloi* de 7 días en Agar Sabouraud en Erlenmeyers de 250 ml cuyas conidias (esporas fúngicas) fueron resuspendidas en agitación mediante el agregado de 10 ml de agua destilada adicionada con Tween 80. Los cultivos sumergidos se realizaron en Erlenmeyers de 500 ml usando 200 ml de medio mineral mínimo (MMM) (buffer NaH₂PO₄- K₂HPO₄ pH 7, cloranfenicol 0,5 g/l y cantidades trazas de Cl₃Fe, Cl₂Zn and Cl₂Ca) con 1% (p/v) de "residuo pelo" proveniente de un proceso de depilado conservador del pelo lavado, molido y autoclavado a 121°C, 15 min (Galarza et al. 2007). El MMM fue adicionado con ácido tioglicólico en una concentración final de 5mM y posteriormente inoculado con 10 ml de suspensión de conidias cuyo conteo de viables fue de 105 ufc/ml en promedio. El medio inoculado fue incubado en estufa a 28°C, 200 rpm durante 28 días. El extracto crudo (EC) fue separado por centrifugación a 5°C a 3000 g durante 15 min. El sobrenadante fue filtrado a través de filtro de nitrocelulosa de 0,45 µm en baño de hielo y guardado a -20°C hasta el posterior análisis de los parámetros en estudio.

Determinación de parámetros

Condiciones de ensayo

Se determinaron la actividad enzimática, la concentración proteica y el pH en el EC inicial y en los baños de proceso de cada etapa donde fue utilizado (actividad remanente). Se evaluaron previamente las condiciones óptimas de actividad del pool enzimático al aplicarlo junto al biocida, distintos tensioactivos y Ca⁺² (Matikevičienė et al. 2011). Para evaluar la estabilidad de la enzima a la incubación en

presencia de tensioactivos y biocida, se midió la actividad queratinolítica residual luego de la incubación durante 4 h 30 min a 37°C.

Se aplicó el EC a trozos de piel bovina en las siguientes etapas del área ribera: remojo, depilado, desescalado y purga.

Los controles se realizaron con trozos de piel sin ningún tratamiento, y otros sometidos al proceso convencional con sulfuro de sodio y cal.

Ensayos previos

La activación o inactivación que los distintos componentes adicionados a los procesos ejercen sobre las enzimas queratinolíticas fueron determinadas mediante las siguientes relaciones finales (Cantera et al. 2003):

- A. biocida/enzima (p/p) : 100/1
- B. Ca⁺²/enzima: 1 mg/ml EC
- C. biocida/enzima(p/p): 100/1; 1mg de Ca⁺²/ml EC

Condiciones iniciales del EC: 1,32 Uk/ml; 0,42 Uazo/ml, 0,136 mg/ml de prot.

Ca⁺² como Ca(OH)₂: 1 mg/ml en buffer Tris-HCl 0,1M pH 9.

Biocida: TCMTB 27%, 10% N,N-Dimetilamino (penetrante/emulsificante), 63% cresol (FUBA chem).

Determinación de la concentración proteica y actividades enzimáticas

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

Determinación de la actividad proteolítica y queratinolítica

La actividad azocaseinolítica fue determinada usando el sustrato azocaseína (sulphamide azocasein, Sigma Chem.Co., St. Louis, MO). La mezcla de reacción que contenía 100 µl de extracto crudo y 250 µl de 1% (w/v) del sustrato en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 9, se incubó a 37°C, 30 min y la reacción se detuvo por el agregado de 1 ml de TCA (ácido tricloroacético) 10% (p/v) y posterior centrifugación a 3000xg, 15 min. Luego a 0,9 ml del sobrenadante se le agregó 1 ml de OHNa, se agitó y se midió a 440 nm (por triplicado). Para el blanco se realizó el mismo procedimiento pero se inactivó la enzima por calentamiento a 100°C por 5 min (Liggieri et al. 2004).

La unidad de actividad enzimática (Uazoc) se definió como la cantidad de enzima que bajo las condiciones de reacción produce un incremento de 0,1 Abs 440 nm por minuto.

La actividad queratinolítica fue determinada usando “residuo pelo” como sustrato, previamente lavado con tensioactivos, secado a 45°C, molido, tamizado por tamiz de malla 850µm (USA Standard ASTM E 11-61) y autoclavado a 121°C por 15 min.

La mezcla de reacción que contenía 150 µl de EC y sustrato al 1%(p/v) en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 9 (Yamamura et al. 2002), se incubó a 37°C en agitación (100 rpm) por 1 h y luego se detuvo por la adición de 1 ml de TCA 10% (p/v) y posterior centrifugación a 5000xg, 15 min. El sobrenadante fue medido a 280 nm. Para el blanco de actividad enzimática, se inactivó el EC mediante el agregado de 1 ml de TCA 10% (p/v) al comienzo de la incubación.

La actividad keratinolítica (Uk) se definió como la cantidad de enzima que, bajo las condiciones de reacción causa un incremento de 0,01 Abs280 nm por min.

Procedimiento experimental utilizando la piel vacuna

Se utilizaron piezas de piel bovina en fresco de 3 cm x 2,7 cm y aproximadamente 3 g de peso. Se colocó cada trozo en sendos vasos de precipitado con 30 ml de medio líquido de acuerdo a los siguientes tratamientos:

I) Etapa de remojo:

Tratamiento 1 (T1): enzima (EC) (proveniente de un liofilizado disuelto en buffer Tris-HCl 0,1 M, pH9), isográs AN 0,1%: R1.

Tratamiento 2 (T2): sin enzima, en las mismas condiciones que en 1: R2.

Tratamiento 3 (T3): enzima (EC) (disuelta en las mismas condiciones), isográs AN 0,1%, biocida FUBAC al 0,2% de piel húmeda: R3.

Tratamiento 4 (T4): sin enzima, en las mismas condiciones que en 3: R4.

Tratamientos 5 y 6 (T5 y T6): sin enzima, buffer Tris-HCl 0,1 M pH 9, biocida FUBAC al 0,2% de piel húmeda: R5 y R6.

Duración y condiciones del remojo: agitación a 40 rpm en baño termostático a 37°C durante 4 h.

II) Etapa de depilado:

Se agregó tensioactivo Baymol al 0,5% final a los tratamientos: T1 (D1), T2 (D2), T3 (D3) y

T4 (D4). Previamente se había determinado que el agregado de este tensioactivo incrementaba la actividad azocaseinolítica en un 117% y la actividad queratinolítica en un 331%.

A los tratamientos 5(D5) y 6 (D6) (procedimiento convencional) se les agregó cal al 3% (p/p), sulfhidrato de sodio 1% (p/p) y 30 min más tarde sulfuro de sodio 2%(p/p). Los porcentajes se refirieron al % de peso de piel húmeda.

Duración y condiciones del depilado: agitación a 40 rpm en baño termostático a 37°C durante un intervalo de entre 24 h y 48 h.

III) Etapa de desencalado: sólo se realizó en los tratamientos 5 y 6. Para remover la cal residual de la piel, se disminuyó el pH para la subsecuente acción enzimática, reduciendo el hinchamiento de la piel. Se agregó sulfato de amonio al 2% (p/p) y metabisulfito de sodio al 1% (p/p). Los porcentajes

se refirieron al % de peso de piel húmeda.

Duración y condiciones del depilado: agitación a 40 rpm en baño termostático a 37°C durante un intervalo de entre 60-120 min. El control del pH se realizó en el baño de proceso con un pHmetro y en el interior de la piel con fenolftaleína.

IV) Etapa de purga: para remover los remanentes del proceso de depilado no deseados de la piel (epidermis, raíces de los pelos, glándulas, lípidos) se procedió a agregar el EC sólo en T5 (P5). En T6 (P6) el trozo de piel fue lavado e inmerso en Buffer Tris-HCl 0,1 M pH 9.

Duración y condiciones de la purga: agitación a 40 rpm en baño termostático a 37°C durante 40 min.

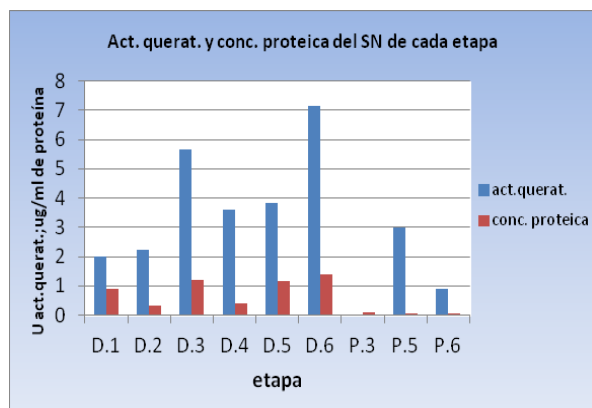
Técnicas histológicas

De cada etapa se cortaron trozos de piel que se fijaron en formol al 10%. Las muestras se deshidrataron en alcoholes 100, 96 y 70%, luego se aclararon en dos cambios de xilenos y se embebieron en parafina. Los bloques de parafina se cortaron en secciones de aproximadamente 6 µm de espesor y se montaron en portaobjetos limpios. A continuación se desparafinaron en xileno y se rehidrataron por pasajes en alcohol 100, 96, 70% y agua destilada. Luego se tiñeron con hematoxilina eosina (Prophet et al.1992) y se observaron en microscopio Olympus CHBS.

Resultados y discusión

En los ensayos previos de activación/inactivación se observó activación en A (30 veces) y en C (17 veces) luego de la incubación de la enzima con biocida y con biocida y Ca²⁺ (respectivamente) durante 4 h 30 min a 37°C en agitación (100 rpm).

Ensayos en los baños de proceso (actividad remanente)



D: proceso de depilado

P: proceso de purga

SN: sobrenadante

En D2 y D4 se observó cierta hidrólisis de material queratínico; por lo tanto a λ 280 nm, donde absorben aminoácidos y polipéptidos, la absorbancia se incrementó aunque la enzima no estuviera presente.

Cuando se llevó a cabo el depilado convencional (D5, D6), se produjo una máxima destrucción del pelo mientras que en P5 continuó la disolución de proteína proveniente de la dermis, epidermis y pelo por lo que los valores de absorbancia fueron altos. Dentro de los tratamientos donde se utilizó la enzima, solamente se extendió hasta el proceso de purga el del T3 (P3) ya que en los otros (T1, T2, T4) el depilado no fue evidente.

Observaciones microscópicas

Mediante las técnicas histológicas se observaron cambios a nivel de la dermis-epidermis y anexos, en la piel sometida a distintos tratamientos.

El control sin tratamiento mostró que la piel conservaba intacta la dermis y la estructura de la epidermis. Las fibras de colágeno presentaron una distribución normal y los estratos epidérmicos no presentaron cambios

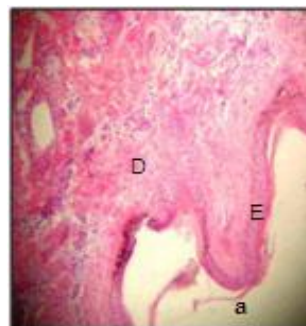
visibles con las tinciones empleadas. Las vainas del folículo piloso se observaron claramente (Figuras 1a-2a).

En las muestras después de 48 h de tratamiento con enzima, biocida y tensioactivo (T3, D3), se observaron cambios: las fibras de colágeno desorganizadas y los estratos de la epidermis no resultaron visibles (Figuras 1b-2b).

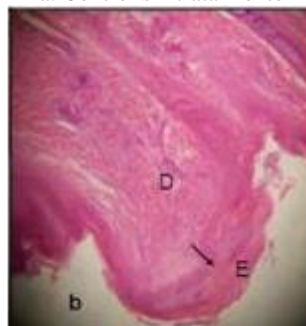
La combinación de tensioactivos con enzima después de 48h (T1, D1) produjo la pérdida de distribución típica del colágeno, pérdida de las vainas foliculares y separación dermis epidermis (Figura 3b).

Diversos tensioactivos son capaces de combinarse con proteínas fibrosas y globulares como es el caso del SDS (dodecilsulfato de sodio) que cuando se aplica en solución produce desorganización de la estructura del colágeno (Cantera et al. 2004). En las pieles tratadas 48h con tensioactivo (T2, D2) los haces de colágeno de la dermis superficial presentan una distribución extremadamente cerrada y compacta (Figura 3a) (Sivasubramanian et al. 2008).

Figura 1. Hematoxilina.



a. Control sin tratamiento



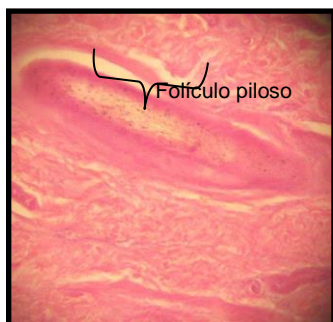
b. Encima-tensioactivo-biocida
48 h tratamiento (10 x)

(E: epidermis D: dermis)

Figura 2. Hematoxilina Eosina

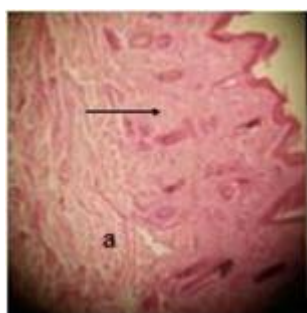


a: control sin tratamiento
(10 x)



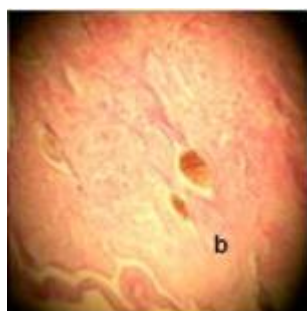
Enzima-tensioactivo-biocida
48 h tratamiento (10 x)

Figure 3. Hematoxylin Eosin



Tensioactivo
48 h tratamiento (4x)

b. Tensioactivo-Enzima
48 h tratamiento (10 x)



| Figura | Tratamiento | Microscopía óptica |
|--------|-------------------------------------|---|
| 1a | Control sin tratamiento | Colágeno con distribución característica. Estratos epidérmicos visibles. Vainas epiteliales del folículo sin cambios. |
| 1b | Enzima-biocida-tensioactivo (48 hs) | Fibras de colágeno desorganizado, estratos de epidermis sin morfología característica |
| 2a | Control sin tratamiento | Corte de folículo piloso con vainas epiteliales sin modificaciones. |
| 2b | Enzima-biocida-tensioactivo (48 hs) | Folículo piloso con vainas epiteliales sin morfología típica. |
| 3a | Tensioactivo (48 hs) | Haces de colágeno compactos |
| 3b | Enzima-tensioactivo (48 hs) | Vainas foliculares y colágeno desorganizados. Separación dermis epidermis |

Conclusiones

Los tratamientos donde se aplicaron las enzimas combinadas con tensioactivo y biocida, enzimas con tensioactivo, como así también con tensioactivo sólo, generaron alteraciones a nivel del colágeno, folículo y epidermis. Los cambios fueron más evidentes en los tratamientos en que se agregaron enzimas. El tiempo de contacto entre las

sustancias y la piel es un factor que podría influir sobre los cambios que se generaron y por lo tanto debe tenerse en cuenta para futuros experimentos.

Las condiciones óptimas y en que etapa del proceso utilizar el extracto enzimático fúngico deberán ser analizadas para poder aplicarlo como subproducto en la tecnología del cuero.

Agradecimientos

El presente trabajo fue financiado por la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CICPBA), el Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI) y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas (CONICET). Agradecemos especialmente al Departamento de Histología y Embriología, Instituto de Patología, Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata

Referencias

- Bradford M, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (248-254p).
- Cantera C, 2001. Hair-saving unhairing process Part 3. Cementing substances and the basement membrane. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 85 (93-98 p).
- Cantera C, 2001. 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*, 85 (125-132 p).
- Cantera C, Goya L, Galarza B, López LM, Garro ML, 2003. Characterization of enzymatic preparations applied in soaking and unhairing process, Part 5. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 87 (89-90 p).
- 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*, 88 (121-131p).
- Crispim A, Mota M, 2003. Unhairing with enzymes. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 87 (198-202 p).
- Friedrich J, Gradisar H, Mandin D, Chaumont JP, 1999. Screening fungi for synthesis of keratinolytic enzymes. *Letters in Applied Microbiology*, 28, (127-130 p).
- Galarza B, Goya L, Cantera C, Garro ML, Reinoso E, López LM, 2004. Fungal transformation of bovine hair. Part 1: Isolation of fungus with keratinolytic activity. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 88 (93-98 p).
- Galarza B, Garro M, Cavello I, Cazau M, Hours R, Cantera C, 2007. Fungal biotransformation of bovine hair: assessment of structural changes. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists* 91 (229-232p).
- Galarza B, Cavello I, Garro ML, Gortari M, 2012. Evaluation of increase at the production of keratinolytic enzymes. *Journal of Aqeic*, 63 (70-74p).
- Garro ML, Barbeito C, Mario R, Galarza B, Cantera C, 2008. Evaluación histológica del efecto de enzimas con actividad depilatoria sobre piel vacuna. Un estudio preliminar. *InVet Investigación Veterinaria*, 10, n°1 (103-110p).
- Kunert J, 2000. Physiology of keratinophilic fungi. Ed. *Revista Iberoamericana de Micología*, Ed. RKS Kushwaha & Guarro J, Bilbao. ISBN 84-607-0711-3, cap 10 (77-85 p).



TRUPOTAN BIO

TRUMPLER ESPAÑOLA, S.A.

C. Llobateras, 15. Centro Industrial Santiga. C.P. 06210 Barberà del Vallès (Barcelona-España) Tel: +34 937 479 355 / Fax: + 34 937 188 006 / www.trumpler.de / www.trumpler.es

Liggieri C, Arribère MC, Trejo S, Canals F, Avilés F, Priolo N, 2004. Purification and biochemical characterization of Asclepain c I from the latex of *Asclepias curassavica*. *The Protein Journal*, 23 (403-411p).

Lollar R,1956. The Chemistry and Technology of Leather, Ed O'Flaherty F, Roddy W y Lollar R, Cap I (303 p).

Matikevičienė V, Grigiškis S, Levišauskas D, Sirvydytė K, Dižavičienė O, Masiliūnienė D, Ančenko O, 2011. Optimization of keratinase production by actinomyces fradiae 119 and its application in degradation of keratin containing wastes. Environment, Technology, Resources. Proceedings of the 8th International Scientific and Practical Conference, Rēzeknes Augstskola, Rēzekne, RA Izdevniecība, vol. 1 (294-300 p).

Prophet E, Mills B, Arrington J, Sobin L, 1992. Laboratory Methods in Histotechnology. Armed Forces Institute of Pathology (AFIP), United States of America Washington DC, American Registry of Pathology.

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 p).

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

Schraeder C, Ervin R, and Eberspacher J, 1998. Economic analysis of the feasibility of using enzymes in the unhairing process, Journal of the American Leather Chemists Association, 93 (265-271).

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

Sivasubramanian S, Manohar M, 2008. Mechanism of enzymatic dehairing of skins using a bacterial alkaline protease. Chemosphere, 70 (1025-1034 p).

Yamamura S, Morita Y, Hasan Q, Yokoyama K, Tamiya E,2002. Keratin degradation: a cooperative action of two enzymes from Stenotrophomonas sp. Biochemical and Biophysical Research Communications, 294 (1138-1143 p).