



Utilización de plumas en la generación de nuevas cepas aisladas a partir de pieles bovinas en estado de putrefacción

Pauline DHORDAIN (1& 2); Anne-Laure LEPRETRE (1& 3); Pascal DHULSTER (2); Renato FROIDEVAUX(2)

(1): CTC Groupe - 69367 Lyon cedex 07 -France

(2): ProBioGEM - 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex- France

(3): Leather Consultant- Project Manager- 4 rue Hermann Frenkel- 69367 Lyon cedex 07- France email: allepretre@ctcgroupe.com

1. Introducción

El grupo CTC ha llevado a cabo un programa innovador para evaluar el interés de las tecnologías emergentes para el depilado de piel bovina. Mediante la asociación con un laboratorio especializado en biotecnología y en ingeniería enzimática y microbiana, en el presente estudio se describe la detección y el aislamiento de una nueva cepa, productora de proteasas que se utilizará para sustituir los productos químicos tradicionales.

Palabras clave: pelambre, actividad queratinolítica, proteasa.

2. Materiales y método

2.1. Placa tipo Luria Bertani:

Esta metodología se basa en el trabajo de G Bertani (1). El medio LB se compone de Triptona, 10 g/l; extracto de levadura, 5 g/L; NaCl, 10 g/l; pH 7,2. El agar añadido a la solución tiene una concentración de 17 g/l. El medio se esteriliza en autoclave durante 20 minutos a 121°C antes de llevar a cabo las pruebas.

2.2. Muestreo de las cepas:

Cuando el pelo empieza a caer de la piel, la parte superior de la piel se descarta. Se toma una muestra y se cultiva en la placa LB a 37°C durante 48 horas.

Las diferentes cepas obtenidas se transfieren en 5 ml de LB en forma líquida y se agitan durante 24 horas a 37°C a 160 rpm con el fin de maximizar su crecimiento.

2.3. Leche desnatada:

Este método es una adaptación de Ernst H. Reimerdes, Henning Klostermeyer (2). Cada

una de las cepas obtenidas anteriormente se recoge en matraces que contienen 1,5 g de agar y 50 ml de caldo nutriente, i se tratan en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Antes de utilizar el medio, se calienta leche desnatada a 50 °C. 50 ml de esta leche desnatada precalentada se mezclan con caldo nutriente en condiciones estériles. Se extiende sobre la placa una gota de medio de cultivo formando a central wale. Se detecta la actividad proteolítica cuando se forma un halo translúcido en la placa.

Las cepas que tienen una acción proteolítica se transfieren en 5 ml de LB líquido durante 24 horas y después se diluyen en una solución de glicerol y se congelan en criotubos a -20 °C.

2.4. Control de la actividad queratinolítica:

El medio de cultivo en base de plumas está basado en un estudio de Fakhfakh-Zouari, N., Haddar, A., Hmidet, N., Frikha, F., Nasri, M. (3)

- Se prepara un medio con plumas con 10 g/l de plumas, 0,1 g/l de MgSO₄, 0,5 g/l de NaCl, 0,7 g/l de KH₂PO₄ y 1.4 g/l de K₂HPO₄, completando la solución a 1 litro con agua. A continuación, la solución se trata en autoclave a 121°C durante 20 min, con el fin de conseguir condiciones estériles.

- 5 ml del medio de cultivo previo (que tiene acción proteolítica) se transfieren a un matraz de 500 ml, y se añaden también 100 ml de medio de cultivo de plumas.

- Después de una incubación de 24 horas a 30 °C y 160 rpm, se centrifuga el medio de cultivo durante 10 min. El sobrenadante obtenido se esteriliza posteriormente a través de un filtro de 0,2 micras.

2.5. Azul de Queratina:

A partir de un método desarrollado por Radhika Tatineni et al. (4), el sobrenadante se extrae de la solución anterior y se realiza el test con azul de queratina.

4 mg de sustrato azul de queratina se incuban durante 30 min a 55 °C con 500 µl de sobrenadante y 500 µl de tampón de Tris-HCl 50 mM a pH=7.

La mezcla se centrifuga a 10.000 g durante 5 minutos. Seguidamente se mide la absorbancia a 595 nm. Una unidad de actividad enzimática es definida por la variación de absorbancia de 0,01.

Actividad de pelambre:

El sobrenadante se coloca en un pedazo de piel para comprobar si existe actividad de pelambre.

2.6. Identificación de la cepa:

Secuenciación del RNA 16S:

La muestra de RNA amplificada a través de PCR se introduce en un secuenciador (análisis realizado por Eurofins MWGoperon). La secuencia obtenida se introduce posteriormente en una base de datos (por explosión en la base de datos NCBI).

2.7. Identificación de la proteasa:

Análisis por FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)

Se utilizó un soporte G4000 para la cromatografía de filtración en gel para identificar componentes que tienen grandes pesos moleculares, como las proteasas.

Se diluyó cada una de las proteínas, obteniéndose de cada una un “pico” recorriéndose los datos para su uso posterior.

Al ejecutar varias veces esta operación, es posible concentrar la proteína diluida con el fin de poner en marcha nuevos análisis.

El efluente concentrado que contiene la proteína se prueba sobre un trozo de piel.

Si la prueba funciona, se analiza posteriormente por cromatografía de intercambio iónico y por espectrometría de masas para obtener la información característica de la proteína.

3. Resultados y discusión

Muestreo de las cepas:

Después de 4 días de proceso de putrefacción de la piel, se obtuvo un sustrato en el que se observan bacterias (figura 1).

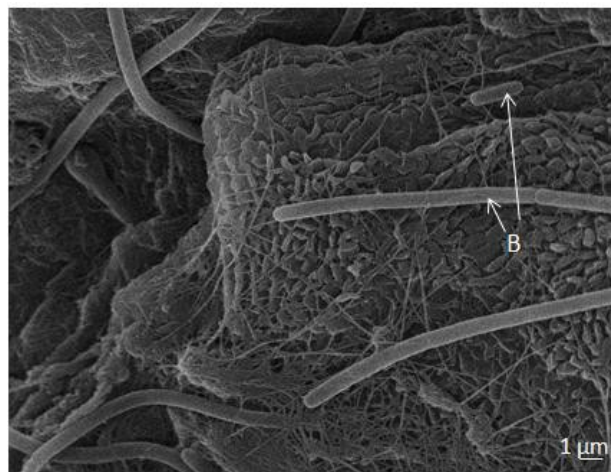


Figura 1: Imagen por microscopía Electrónica de Barrido de la superficie de la piel (SEM)/B: bacterias

3.2. Control de la actividad proteolítica:

Desde la placa LB de caldo, se obtuvieron 6 cepas.

Una vez seleccionadas a través de la leche desnatada, sólo una de las cepas presentó actividad proteolítica, hecho observado por la formación de un halo translúcido sobre la placa.

Figura 2: Placa de leche desnatada: S1(izquierda): Halo translúcido que muestra actividad proteolítica; S4(derecha): ensayo negativo

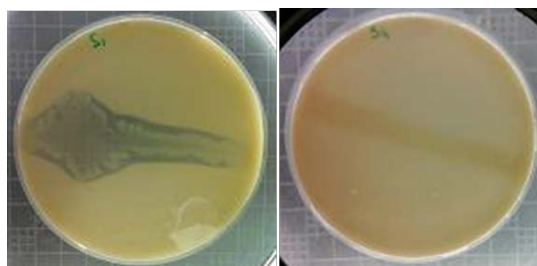


Figura 2: Placa de leche desnatada: S1(izquierda): Halo translúcido que muestra actividad proteolítica; S4(derecha): ensayo negativo

3.3 Control de la actividad queratinolítica:

Una vez seleccionada la cepa proteolítica, se comprueba si presenta actividad queratinolítica. El sobrenadante obtenido después del cultivo que contiene una mezcla de

plumas se centrifuga y se filtra en filtro de 0,2 micras. De esta forma se muestra la actividad a través de método de azul de queratina. En el análisis realizado, se mide una actividad enzimática de 8,4 U / ml (o 16,8 U / g de piel).

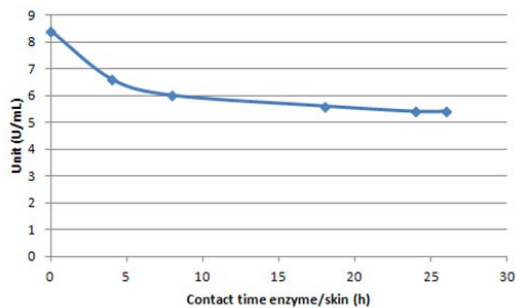


Figura 3: Efecto del tiempo en la actividad enzimática

Este sobrenadante también se probó en un trozo de piel en bruto, obteniéndose una actividad de pelambre sin abrasión del grano de la piel.

3.4. Prueba en la piel:

Cuatro horas después del contacto con la piel, hay un comienzo de dicha acción.

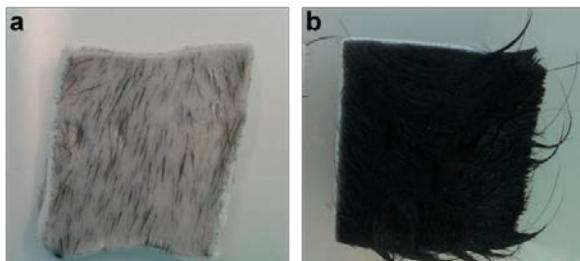


Figura 4: Prueba llevada a cabo con el sobrenadante (a). Prueba standard realizada con el medio de plumas b) Sin actividad enzimática.

3.5 Identificación de la cepa:

Después de comprobar que la secuencia obtenida mediante amplificación por PCR contiene RNA, (figura 5), se confirma que se trata de un RNA, ya que la banda tiene 1.500 pares de bases. A continuación, se secuencia el 16 s RNA y que lanza el análisis sobre la base de datos NCBI.

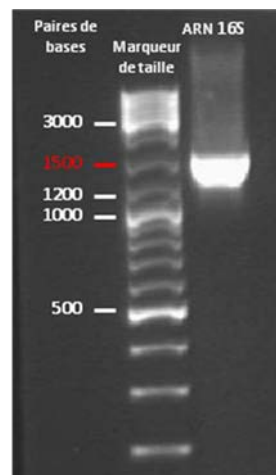


Figura 5: Gel de Agarose que muestra la migración de ARN 16 de la cepa analizada. Tamaño de la señal : « O'GeneRuler » de Fermentas.

ARN 16 S análisis capaz de detectar *Bacillus Cereus*.

3.6. Purificación de la cepa e identificación de la proteasa responsable de la actividad de pelambre:

El sobrenadante obtenido a partir del cultivo de plumas se analizó por FPLC. Se utiliza en primer lugar la Filtración en gel para fraccionar el sobrenadante. Se recuperan y se analizan cuatro fracciones.

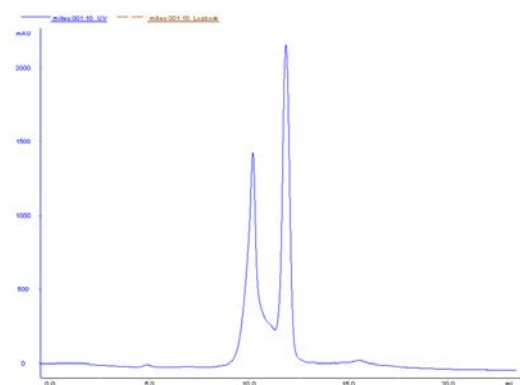


Figura 6: Cromatograma obtenido mediante un Sistema FPLC.

Las pruebas realizadas determinan que la muestra obtenida de los cuatro componentes no muestra actividad de pelambre. La hipótesis de los resultados obtenidos lleva a pensar que

puede ser causa de la baja concentración de la muestra o bien sea debido a un problema de soporte no adecuado para la separación de la mezcla de proteínas en un sistema FPLC.

Actualmente, el trabajo se ha centrado en otros métodos de ensayo como la electroforesis para analizar con mayor precisión la enzima pura responsable de esta actividad pelambre.

4. Conclusiones

Se obtienen microorganismos de pieles en bruto. Las muestras se siembran directamente en placas de agar Luria- Bertani para aislar las diferentes cepas.

Después del aislamiento, las placas que contienen leche desnatada y caldo nutriente se utilizan para la selección de microorganismos. A continuación, los microorganismos se cultivan en un medio que contiene plumas para promover la producción de enzimas queratinolíticas.

Una de las cepas muestra actividad proteolítica en placas de leche desnatada, la cual creció en medio de plumas. Después del cultivo, se ensaya el sobrenadante en un pequeño trozo de piel mostrando actividad de pelambre.

Hemos aislado una cepa de *Bacillus Cereus* de pieles en bruto que presenta una buena capacidad de pelambre en pieles de ternera. Actualmente, se está estudiando la purificación de la enzima.

Referencias

- (1) Studies of lysogenesis
The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. G. Bertina- Department of Bacteriology, University of Illinois, Urbana, Illinois. Received for publication May 14, 1951
- (2) Determination of proteolytic activities on casein substrates Original Research Article
Methods in Enzymology, Volume 45, 1976, Pages 26-28
Ernst H. Reimerdes, Henning Klostermeyer
- (3) Application of statistical experimental design for optimization of keratinases production by
Bacillus pumilus A1 grown on chicken feather and some biochemical properties Fakhfakh-Zouari, N., Haddar, A., Hmidet, N., Frikha, F., Nasri, M. (2010) *Process biochemistry*. 45, p617-626
- (4) Purification and characterization of an alkaline keratinase from *Streptomyces*, Radhika Tatineni et al. (2008) *sp. Bioresource technology*. 99, p1596-1602 ,