

Agregado de valor a un residuo de la industria cárnica

Martínez, M.¹, Reñones, L.¹, Rodríguez, L.N.¹, Majul, L.², García Mansilla, M.²

¹ Laboratorio Fermoquímicos Naturales, Centro de Investigación y Desarrollo de la Industria Química, Instituto Nacional de Tecnología Industrial, Av. General Paz 5445, Buenos Aires, Argentina. ² Laboratorio de Micología Experimental – Instituto de Micología y Botánica, Universidad de Buenos Aires-CONICET, Av. Intendente Güiraldes s/n, Pabellón 2, Ciudad Universitaria, Buenos Aires, Argentina. marismar@inti.gob.ar

Introducción

Para la elaboración de embutidos, en la industria cárnica se utilizan tripas diferente tipo. Estas pueden ser de origen natural, artificial o sintético. Las tripas naturales se obtienen a partir del tubo digestivo de cerdos, bovinos, ovinos y equinos. Las artificiales son elaboradas a partir de fibras animales y constituidas por fibras de colágeno. Las sintéticas son elaboradas a partir de sustancias celulósicas o de polímeros de síntesis. Al ser más resistentes y económicas que las de colágeno, estas últimas se utilizan ampliamente en la elaboración de salchichas.

Están compuestas principalmente por celulosa regenerada y glicerina como plastificante. La tripa se utiliza para contener temporalmente los ingredientes del producto durante su procesamiento, por lo que, este material posee una alta resistencia, apta para las etapas de elaboración de dichos embutidos, pero esta resistencia dificulta su tratamiento.

Si bien en Argentina no hay estadísticas sobre la generación y uso de tripa celulósica, se estima que hay una producción anual de chacinados de 822.000 toneladas, de los cuales el 20% corresponde a salchichas tipo "Viena" [1]. En Estados Unidos, por ejemplo, a principios de siglo, la generación de tripa celulósica rondaba las 1.000 toneladas anuales [2].

En la actualidad, en nuestro país este desecho se descarta, lo que genera grandes cantidades de residuos que son incinerados, desperdiciando su posible reutilización y agregado valor.

Con el fin agregar de valor a este desecho denominado tripa agotada (TA), se plantearon dos abordajes independientes: por un lado, tratamientos químicos para la obtención de un producto de interés industrial como el acetato de celulosa y por otro, el empleo de la TA como sustrato de hongos que degradan celulosa de materiales lignocelulósicos, para la obtención de Enzimas Activas sobre Carbohidratos (CAZymes), de gran interés en diversos tipos de industrias.

Materiales y Métodos

Tratamiento Químico

Acondicionamiento de la muestra

Se partió de la tripa agotada (TA), tal cual se obtiene luego de su utilización en la industria cárnica (Figura 1).



Figura 1. Tripa agotada

Este residuo se acondicionó con el fin de eliminar restos provenientes de la preparación de los embutidos y se secó a temperatura ambiente (Figura 2).



Figura 2. Tripa agotada acondicionada (TAa), de aspecto similar a celofán

Molienda

Para obtener TAa en polvo (TAa/polvo) se probaron dos metodologías para salvar las dificultades de su molienda a temperatura ambiente debidas a las características plásticas del material. En primer término, se molió la TAa con nitrógeno líquido, en segundo término, se realizó una predigestión enzimática.

La muestra de TA (tal cual se obtiene luego de su utilización en la industria cárnica) se incubó con

un *blend* de lipasas, ajustando el pH entre 5-6 a 40°C por 2 horas. A continuación, se añadió una proteasa de origen bacteriano, *Alcalasa 2.0* comercial, y se dejó en baño termostático a 40°C durante 2 horas, regulando el pH entre 6-7. Luego se inactivó a 100°C durante 10 minutos. Finalmente se incubó a 40°C durante 5 horas con endocelulasas fúngicas de origen comercial, provenientes de *Penicillium peniculasum*, a pH 5. Se conservó entre 4-5°C por 10 días. Se filtró la TA. Se enjuagó con agua y detergente, y se secó a temperatura ambiente. Finalmente se molió con un molinillo a hélice FW-100.

Acetilación

Tanto a TAa como a TAa/polvo se les adicionó una mezcla de anhídrido acético/ácido fosfórico, y se calentó durante 4 horas a 70°C. Luego, se precipitó el producto en agua destilada, y se enjuagó hasta pH neutro. Por último, se secó en estufa de venteo a 105°C.

Análisis de la estructura química

Se realizó la determinación de la estructura química del producto mediante resonancia magnética nuclear de protón (RMN ¹H), con espectrómetro de RMN marca Bruker, modelo DPX400 equipado con una sonda QNP.

Obtención de CAZymes

Microorganismos

La cepa utilizada para los ensayos de degradación fue un aislamiento de *Peniophora laxitexta*. Los cultivos fueron mantenidos en medios de cultivo conteniendo extracto de malta 12,7% y glucosa 10%, a 4°C.

Prospección de actividades celulolíticas en medio agarizado

Se realizaron cultivos en placa de Petri con medio agarizado conteniendo como medio basal con micro y macronutrientes, y asparagina como fuente de nitrógeno. Alternativamente como fuente de carbono se utilizó carboximetilcelulosa (CMC) y un cuadrado de 5 x 5 cm de TA. Los medios de cultivo se inocularon en el centro de la caja con tacos de 6 mm de diámetro conteniendo micelio proveniente de colonias en fase de crecimiento exponencial. Para las determinaciones se extrajeron alícuotas del medio agarizado con sacabocados de 6 mm de diámetro, a los 5, 16 y 26 días de crecimiento. En los cultivos con única fuente de carbono CMC se determinó actividad celulolítica de forma cualitativa revelando halos de degradación del CMC por tinción diferencial con rojo congo [3].

Evaluación de actividades celulolítica en cultivos semisumergidos con tripa de celulosa

Se realizaron cultivos semisumergidos utilizando

como medio de cultivo líquido, medio basal suplementado con 2 fuentes de nitrógeno: peptona de carne o sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) y utilizando TAa como única fuente de carbono.

Condiciones de cultivo

Se utilizaron erlemeyers de 125 ml con 25ml de medio de cultivo, inoculados con tacos del borde de colonias crecidas en malta glucosada agarizada. Los cultivos se incubaron durante 21 días a 28°C en condiciones estáticas de crecimiento. Los sobrenadantes de cultivos fueron separados por filtración para posteriores análisis.

Determinaciones enzimáticas

La actividad β-glucosidasa se determinó usando como sustrato el reactivo p-nitrofenil-β-D-glucopiranosido (pNPG) [4]. La cantidad de p-nitrofenol liberada fue determinada espectrofotométricamente midiendo la absorbancia del producto de reacción a 430nm.

La actividad β-1,4-endocelulasa se determinó por medición de azúcares liberados por la degradación de CMC (carboximetilcelulosa). La actividad β-1,4-exocelulasa se determinó por medición de azúcares liberados por la degradación de celulosa cristalina. La liberación de azúcares fue cuantificada por medio de método de Somogyi (1952) [5] y Nelson (1944) [6].

Se definieron las unidades enzimáticas como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de p-nitrofenol (β-glucosidasa) o el equivalente a 1 μmol de glucosa (endo y exocelulasa) por minuto en las condiciones del ensayo.

En el caso de las determinaciones realizadas a partir de muestras provenientes de medios agarizados se reemplazó el volumen de sobrenadante por las muestras agarizadas y se expresó la actividad enzimática como U/g de medio agarizado.

Resultados y Discusión

Tratamiento químico

El análisis de RMN-¹H muestra la obtención de acetato de celulosa, presentado espectros para el acetato de ambas muestras, con el mismo registro de picos (Figura 3).

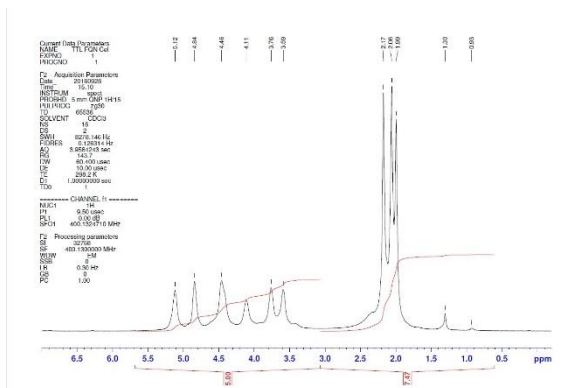


Figura 3. Espectro del acetato de celulosa obtenido por RMN-¹H

Los picos observados entre 3,6-5,1 ppm corresponden a los hidrógenos unidos a los carbonos de la glucosa, mientras que los observados alrededor de 2,0 ppm corresponden a los hidrógenos del acetilo. Comparando los moles de acetato por unidades de glucosa, se evidencia que el producto obtenido corresponde a una mezcla entre diacetato y triacetato de celulosa.

Se observó que el rendimiento obtenido para la muestra TAa/polvo fue mayor al 40%, mientras que para la muestra TA acondicionada, se logró un rendimiento menor al 10%.

Pretratamiento enzimático

Con el tratamiento con enzimas comerciales, se logró obtener un producto frágil, similar a un polvo blanco; que permitió una fácil molienda (Figura 4). Estos resultados permiten llegar a hidratos de carbono de menor tamaño, optimizando un futuro ataque químico y mejorando el rendimiento de las reacciones.



Figura 4. Tripa tratada enzimáticamente y molida

Obtención de CAZymes

Prospección de actividades celulolíticas en medio agarizado

Los cultivos realizados en medio agarizado tanto con TAa como CMC como única fuente de

carbono, mostraron la capacidad de la cepa de *Peniophora laxitexta* para crecer sobre materiales celulósicos. En la figura 5 podemos observar una colonia de *P. laxitexta* en medio agarizado con CMC como única fuente de carbono a los 5 días de crecimiento. Ésta fue revelada con el colorante rojo congo para evidenciar la degradación del CMC mediante tinción diferencial. Alrededor de la colonia se puede ver un halo de color anaranjado tenue que evidencia la presencia de actividad celulolítica, siendo un resultado cualitativo positivo en todos los cultivos.



Figura 5. Ensayo cualitativo para revelar actividad celulolítica mediante la técnica de tinción diferencial con rojo congo.

En la Figura 5 se pudo observar el halo de degradación de CMC (halos naranjas) y la toma de muestra de medio agarizado dentro de la colonia de *Peniophora laxitexta*.

La Figura 6 muestra la actividad endoglucanasa y exoglucanasa determinada a partir de las muestras de medio agarizado. Los cultivos realizados utilizando CMC como fuente de carbono muestran una mayor actividad exoglucanasa con respecto a la obtenida en los cultivos de tripa de celulosa. En los cultivos en tripa de celulosa se observa una mayor determinación de actividad endoglucanasa con respecto a las determinaciones en CMC.

Evaluación de actividades celulolítica en fermentaciones semisumergidas con tripa de celulosa

Los cultivos semisumergidos de *Peniophora laxitexta* en TA evidenciaron la colonización del sustrato (TA) por las hifas del microorganismo y su aumento de biomasa. La degradación de TA por *P. laxitexta* no fue total, quedando parcialmente degradada luego de la cosecha a los 21 días.

Los sobrenadantes de cultivo extraídos a los días 14 y 21 de crecimiento (cosecha) mostraron actividad Endocelulasa, Exocelulasa y β -glucosidasa como se muestra en la figura 7.

A)

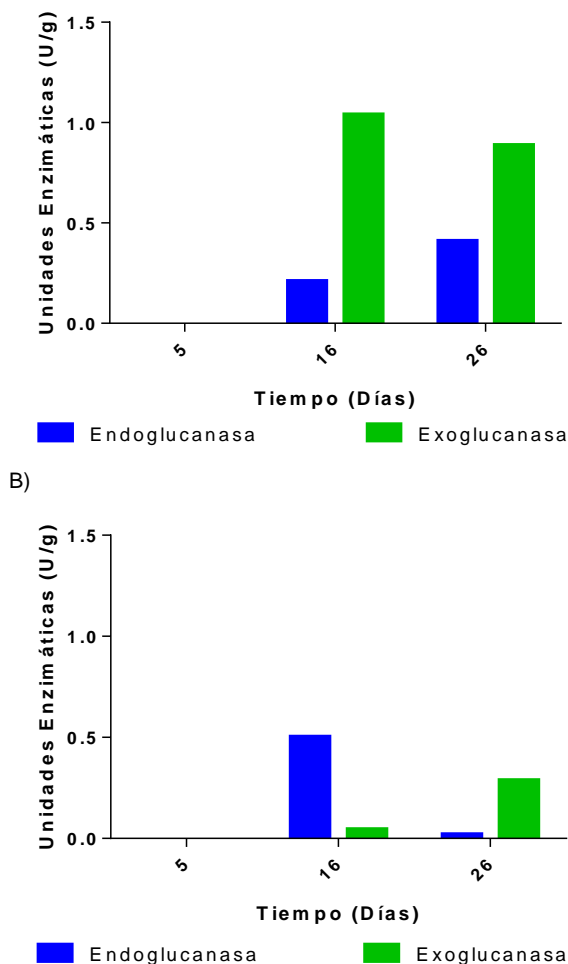


Figura 6. Actividad celulolítica determinada a partir de muestras de medio basal agarizado de *Peniophora laxitexta* utilizando como única fuente de carbono A) Carboximetilcelulosa B) Tripa de celulosa acondicionada.

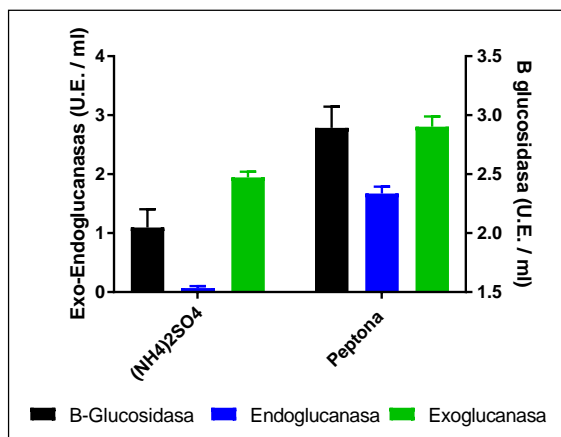


Figura 7. Actividad enzimática de los sobrenadantes de cultivo de *Peniophora laxitexta*

En los tratamientos de cultivo ensayados se puede observar una mayor actividad enzimática cuando se utiliza como fuente de nitrógeno peptona, siendo significativo el aumento de la actividad endoglucanasa y β -Glucosidasa. Esto puede ser debido a que los tratamientos con peptona mostraron un mayor crecimiento aparente sobre la tripa de celulosa y por lo tanto una mayor producción enzimática.

Conclusiones

Mediante el tratamiento químico se logró obtener, acetato de celulosa a partir de la TA, generando valor agregado a un residuo y obteniendo un producto de interés industrial.

Los mejores rendimientos se lograron utilizando la TA en polvo, debido a que la molienda en frío aumenta la superficie expuesta del residuo celulósico, favoreciendo el tratamiento de acetilación. El pretratamiento enzimático con celulasas comerciales favoreció la molienda mecánica a temperatura ambiente. No obstante, los altos costos de estas enzimas hacen limitada su aplicación a procesos con productos de alto valor agregado, siendo necesaria la utilización de alternativas más económicas.

Respecto al grado de acetilación se continuará con estudios de optimización, a fin de aumentar el rendimiento en este proceso.

La TA califica como un excelente desecho celulósico para ser utilizado como materia prima en procesos de fermentación. A pesar de la limitada bibliografía sobre procesos fermentativos de TA, se conoce que los porcentajes de bioconversión del residuo son considerablemente altos. Cepas de *Trichoderma reesei*, alcanzan valores de bioconversión a azúcares simples en fermentadores de 2L cercanos al 90% [7]. Esto es debido a que producen cocteles complejos que contienen Enzimas Activas sobre Carbohidratos (CAZymes), entre las que podemos encontrar actividades como actividades principales endoglucanasas (EC 3.2.1.4), exoglucanasa (EC 3.2.1.58) y β -glucosidasas (EC 3.2.1.21) [8].

La evaluación de actividades celulolíticas en medio agarizado mostró a *Peniophora laxitexta* como buen candidato para la obtención de cocteles con actividad celulolítica utilizando TA como única fuente de carbono.

Los cultivos semisumergidos de *P. laxitexta* permitieron obtener cocteles con actividad celulolítica, a partir de la tripa agotada. La mayor producción enzimática se logró al utilizar un

medio líquido basal suplementado con peptona de carne. Este proceso podría permitir la sustitución de las enzimas comerciales por las generadas a partir de la fermentación de hongos, generando una alternativa económica y probablemente rentable a escala industrial. Las alternativas estudiadas representan soluciones ambientalmente amigables al problema de disposición de residuos, con la obtención de productos de alto valor agregado.

Referencias

- [1] Costa, A., Brieva, S. (2014). *Visión prospectiva de la cadena de carne porcina al 2030*. Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, Buenos Aires.
- [2] Sanders, D. A., Belyea, R. L., Taylor, T. A. (2000). *Degradation of spent casings with commercial cellulases*. *Bioresource technology*. 71(2), 125-131.
- [3] Sazci, A., Erenler, K., Radford, A. (1986). *Detection of cellulolytic fungi by using Congo red as an indicator: a comparative study with the dinitrosalicylic acid reagent method*. *Journal of Applied Microbiology*, 61(6), 559-562.
- [4] Wood, T. M., Bhat, K. M. (1988). *Methods for measuring cellulase activities*. *Methods in Enzymology*, Volume 160, 87–112.
- [5] Somogyi MJ. (1952). *Notes on sugar determination*. *Journal of Biological Chemistry*. 195, 19-23.
- [6] Nelson NJ. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biochemistry*. 153, 375-380.
- [7] Cumba, H. J., Bellmer, D. (2005). *Production of value-added products from meat processing cellulosic waste*. In *2005 ASAE Annual Meeting* (p. 1). American Society of Agricultural and Biological Engineers.
- [8] Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., Henrissat, B. (2013). *The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013*. *Nucleic acids research*, 42(D1), D490-D495.