

PEPTIDASAS VEGETALES COMO ALTERNATIVA ECO-COMPATIBLE PARA LA TECNOLOGÍA DEL CUERO

M.E. Errasti, J.E. Martegani, G. Mazzilli, L.M.I. López
INTI Cuero
jemartegani@inti.gov.ar

Introducción

La industria curtidora es una de las más tradicionales de nuestro país, con un alto impacto en la generación de empleo y en la balanza comercial. Se revela como el primer eslabón en la generación de valor agregado al transformar un subproducto de la industria cárnica, la piel, en un producto que satisface diversas necesidades humanas, el cuero. Sin embargo, a través del complejo proceso tecnológico del curtido se generan una variedad de desechos. En este sentido resulta fundamental incorporar procesos y sistemas más eficientes para el tratamiento de los efluentes. El depilado enzimático mediante uso de proteasas constituye una alternativa biotecnológica eco-compatible ya que, además de eliminar el riesgo en la producción de SH₂, disminuye significativamente las DBO y DQO de los efluentes (Dettmer et al., 2012). Un beneficio adicional muy interesante es que las proteasas son biocatalizadores de naturaleza no tóxica y autodegradables.

Objetivo

A partir del látex de frutos de *Bromelia hieronymi* (Bh), *B. balanseae* (Bb) y *Pseudanana macrodotes* (Pm) se obtuvieron extractos con alta actividad proteolítica que fueron ampliamente caracterizados (Bruno et al., 2011; Pardo et al., 2000; López et al. 2001). El objetivo del presente trabajo fue evaluar la potencial aplicación de dichas preparaciones enzimáticas en la industria del cuero como agentes depilantes así como para el tratamiento de los residuos proteicos generados en dicha industria

Descripción

Obtención de extractos. Los frutos fueron triturados en un medio buffer adecuado, centrifugados y liofilizados. Las preparaciones crudas fueron sometidas a una purificación inicial por precipitación acetónica, acetónica/TCA.

La determinación de proteínas se realizó empleando el método de Bradford.

Actividades enzimáticas. Se usaron diferentes sustratos representativos de proteínas de la piel (Cantera et al., 2003): polvo azul de piel

(HPA), azul de queratina, elastina rojo congo y sustrato epidermis como representativos de colágeno, queratina, elastina y capa epidermis, respectivamente. La actividad proteolítica total fue evaluada usando caseína como sustrato (Torres et al., 2010). Las actividades fueron medidas a 25, 35 y 55 °C en buffer Tris-HCl 0,1 M y pH 8 conteniendo cisteína 20 mM. Las actividades enzimáticas determinadas frente a queratina fueron expresadas en unidades queratinolíticas (UKA), frente a colágeno como unidades colagenolíticas (UHPA), frente a elastina como unidades elastinolíticas (UE) y frente al sustrato epidermis como unidades epidermis (UEP). Los valores fueron comparados con el de una enzima depilante comercial (New 1875, Cergen).

Acción depilante: Muestras de piel vacuna (4 g) fueron incubadas con diferentes concentraciones de enzimas vegetales en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8 con cisteína 20 mM durante 24 h a 25 °C. El efecto depilante fue evaluado por un raspado superficial suave. Superficies y cortes transversales de las pieles tratadas fueron observadas mediante microscopía electrónica (SEM).

Resultados

Tabla 1: Actividad frente a caseína y concentración de proteínas

En la Tabla 1 se muestran los resultados de la actividad proteolítica sobre caseína (CU) y concentración de proteínas totales que presentan los extractos enzimáticos vegetales y la preparación enzimática comercial

Muestras	Actividad Proteolítica (CU/mg)	Proteínas (µgpro/mg)	Actividad específica (CU/gpro)
Bb	0,04 ± 0,01	3,38 ± 0,06	12
Bh	0,17 ± 0,02	22 ± 3	8
Pm	0,09 ± 0,02	15 ± 4	6
New1875	0,09 ± 0,01	6 ± 1	15

Las actividades enzimáticas determinadas frente a queratina, colágeno, elastina y sustrato epidermis, se muestran en la Tabla 2. Los resultados muestran que las enzimas vegetales son capaces de degradar queratina,

colágeno y el sustrato epidermis, en tanto que frente a elastina las actividades fueron muy bajas. Para igual actividad proteolítica Bb, Bh y Pm mostraron similar actividad colagenolítica y actividad sobre epidermis, ligeramente menores que las del producto enzimático comercial. Las actividades aumentaron notoriamente con la temperatura (hasta los 55°C).

Muestra	UKA/CU	UHPA/CU	UE/CU	UEP/CU
Bb	1 ± 0.3	1840 ± 93	1.1 ± 0.2	17 ± 5
Bh	7 ± 3	2052 ± 75	2.5 ± 0.3	22 ± 5
Pm	5 ± 1	2305 ± 255	0.46 ± 0.04	29 ± 3
New1875	5 ± 1	2468 ± 235	98.0 ± 2	45 ± 2

Tabla 2: Actividad frente a sustratos representativos de la piel animal

La actividad depilante de piel vacuna fue evaluada por microscopía electrónica (Figura 1). Se evidenció que los pelos y la capa epidermis resultaron totalmente eliminados de las pieles tratadas, mostrando características deseables para un agente depilante: poros limpios sin pelos residuales, superficie limpia e intacta y fibras de colágeno no dañadas.

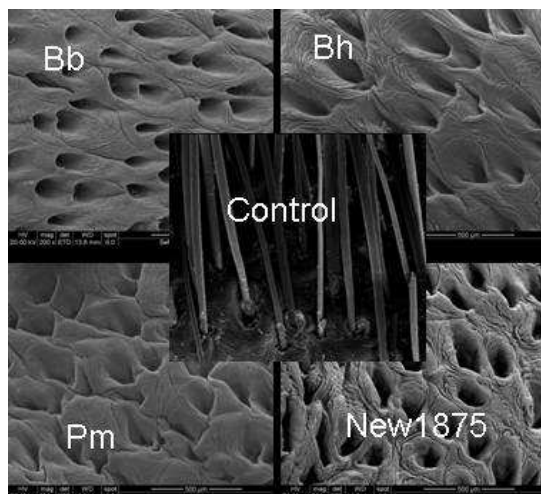


Figura 1: Actividad depilante, microscopía electrónica de barrido, vista superficial (200x).

Conclusiones

Extractos proteolíticos obtenidos a partir de frutos de especies de la familia Bromeliaceae: *Bromelia balansae* (Bb), *B. hieronymi* (Bh) y *Pseudananas macrodentes* (Pm) fueron caracterizados respecto a su actividad frente a sustratos representativo de la piel: Bb, Bh y Pm mostraron actividad frente a colágeno, keratina y epidermis. Estas características permiten

inferir que las fitopetidases estudiadas podrían ser utilizadas como biocatalizadores en el tratamiento de los residuos de la industria del cuero para degradar las proteínas presentes en los efluentes líquidos y sólidos que se generan. Además, los resultados obtenidos en los ensayos de depilado evidencian que Bb, Bh y Pm representan preparaciones enzimáticas de origen vegetal novedosas con potencialidades para ser utilizadas como agentes depilantes eco-compatibles y seguros en la industria del cuero

Bibliografía

- Bruno MA, Trejo SA, Avilés FX, Caffini NO and López LM (2011) "Cloning, Sequencing, and Identification Using Proteomic Tools of a Protease from *Bromelia hieronymi* Mez." *Appl Biochem Biotechnol*. 165:583-593.
- Cantera, C.S., Goya, L., Galarza, B., Garro M.L. and Lopez, L.M.I. (2003) Hair saving unhairing process. Part 5 Characterisation of enzymatic preparations applied in soaking and unhairing processes. *J. Soc. Leath. Tech. Chem.*, 87, 69-77.
- Dettmer, A., Cavalli, É., Ayub, M.A. and Gutterres, M. (2012) Optimization of the unhairing leather processing with enzymes and the evaluation of inter-fibrillary proteins removal: an environment-friendly alternative. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 35, 1317-1324.
- López, L.M.I., C. Sequeiros, S.A. Trejo, M.F. Pardo, N. O. Caffini and C.L. Natalucci (2001) "Comparison of Two Cysteine Endopeptidases from *Pseudananas macrodentes* (Morr.) Harms (Bromeliaceae)", *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 382: 875-878.
- Pardo, M.F., L.M.I. López, C.L. Natalucci, F. Canals, F.X. Avilés & N.O. Caffini (2000). "Purification of Balansain I, an Endopeptidase from Unripe Fruits of *Bromelia balansae* Mez (Bromeliaceae)". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 3795-800.
- Torres, M.J., Trejo, S.A., Martin, M.I., Natalucci, C.L., Avilés, F.X. and López L.M.I. (2010) "Purification and Characterization of a Cysteine Endopeptidase from *Vasconcellea quercifolia* A.St. Hil. Latex Displaying Higher Substrate Specificity". *J. Agric. Food. Chem.*, 58, 11027-11035.