

## Biotransformación fúngica del pelo vacuno: correlación entre los cambios estructurales y la acción enzimática

Galarza, B.C. <sup>(1)</sup>; Garro, M.L.<sup>(1)</sup>; Cavello, I.<sup>(1)</sup>; Hours, R <sup>(2)</sup>; Cantera, C.S.<sup>(1)</sup>

<sup>819</sup> INTI-Cueros-CIC

<sup>(2)</sup>CINDEFI-CONICET

### Introducción

El depilado conservador del pelo, en sus diferentes modalidades, genera un nuevo desecho sólido en el sector de ribera: "el residuo pelo". El cambio en la tecnología de depilado trasladó el problema de la elevada carga orgánica y sólidos suspendidos del efluente líquido de la ribera a un problema de disposición del residuo pelo, claro está, "el problema se ha concentrado".

La generación diaria de una cantidad considerable del "residuo pelo" (del orden de 2,5 toneladas por cada 1000 pieles vacunas saladas procesadas) y la posibilidad de que este residuo, por sus propiedades físicas y químicas, pueda considerarse como una materia prima es que resulta atractivo desplegar esfuerzos de investigación y desarrollo para aportar alternativas tecnológicas que faciliten su valorización.

La composición del "residuo pelo", producido en un proceso de depilado conservador, puede encontrarse dentro de los siguientes rangos: sólidos totales: 25-30%, nitrógeno total: 11-15%, Ca<sup>++</sup> 2-3%, Na<sup>+</sup> 1-2%, S 3-5% (% referidos a muestra libre de humedad), sulfuros 80-100 mg H<sub>2</sub>S/kg de pelo húmedo, filtrado y escurrido, humedad del 75%)<sup>1</sup>.

El mayor componente orgánico presente en el pelo es la proteína fibrosa queratina de una gran resistencia a los distintos tipos de hidrólisis. La formación de puentes disulfuro entre residuos del aminoácido cisteína adyacentes de distintas cadenas proteicas son los responsables de su gran estabilidad química.

Entre las distintas alternativas de valorización del residuo pelo se encuentra su degradación biológica a través de una biotransformación fúngica. El residuo pelo es el sustrato sólido sobre el cual crecen los hongos lográndose una mayor biodisponibilidad para una posterior utilización, por ejemplo en tecnología agropecuaria. La biotransformación fúngica tiene

el atractivo del 'concepto de retroalimentación', ya que en el proceso de biodegradación se generan un conjunto de proteasas que dan lugar a un extracto enzimático con potenciales aplicaciones en tecnología del cuero. Los objetivos de este trabajo son: 1) evaluar, mediante microscopía electrónica de barrido, los cambios estructurales producidos por el cultivo del hongo *Trichophyton ajelloi* sobre el "residuo pelo" vacuno y correlacionarlos con la actividad proteolítica del extracto fúngico frente a sustratos de origen proteico queratínico y no queratínico, el contenido proteico y biomasa fúngica del cultivo sobre sustrato sólido; 2) comparar las actividades proteolíticas del extracto fúngico con aquellas correspondientes a preparados enzimáticos comerciales, habitualmente utilizados en tecnología del cuero.

### Descripción Experimental

#### 1.- Aislamiento de hongos con actividad queratinolítica

En el Reino Fungi existen numerosas especies reportadas como queratinofílicas o queratinolíticas, de acuerdo al grado de desorganización que producen en la estructura de la queratina. Dentro de estos últimos, encontramos a los géneros *Trichophyton*<sup>(2-7)</sup>, *Microsporium*<sup>8</sup> y *Epidermophyton*, comúnmente llamados "dermatofitos".

Entre los primeros podemos mencionar a especies medioambientales tales como *Chrisosporium sp*<sup>9,10</sup>, *Fusarium sp*, *Aspergillus sp*<sup>11</sup>, *Doratomyces sp*<sup>12</sup>, *Scopulariopsis sp*<sup>13</sup>, de las cuales se han podido purificar las enzimas responsables de la degradación de la queratina y cuyo hábitat principal es el suelo.

La técnica de aislamiento de las especies fúngicas queratinolíticas utilizada en el presente estudio fue el "método del anzuelo" o "hair baiting" descrita por Vanbreuseghem<sup>14</sup>

La cepa elegida para este estudio, *Trichophyton ajelloi*, fue aislada del suelo del corral de bóvidos del zoológico de la ciudad de la Plata y conservada en Agar Sabouraud adicionado con cloranfenicol para impedir el crecimiento bacteriano y cicloheximida para evitar el crecimiento de hongos medioambientales.

Esta especie no ha sido reportada como patógena para el ser humano o para los animales.

## 2.- Condiciones del cultivo

Se inocularon placas de Petri conteniendo 5 g de residuo pelo, autoclavado y molido con 10 ml de una suspensión de conidias del hongo, cuyo recuento promedio de viables en placa fue de  $10^4$  ufc/ml en un medio mineral mínimo con sales de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{Cl}_3\text{Fe}$ ,  $\text{Cl}_2\text{Zn}$  y  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  (estos tres últimos en cantidades traza), pH: 7,4. La incubación se realizó a 28°C en estufa con atmósfera húmeda durante 21 días.

## 3.- Preparación de la muestra para Microscopía Electrónica de Barrido

Luego del período de incubación del cultivo sobre residuo pelo desengrasado en Soxhlet con diclorometano durante 40 ciclos, se obtuvieron las muestras para su procesamiento en Microscopio Electrónico a partir de aquellas placas que mostraban un crecimiento fúngico macroscópico. Se procedió a la fijación de la muestra con formaldehído al 5%, previa hidratación y deshidratación con concentraciones crecientes de alcohol etílico. Luego se determinó el punto crítico de la muestra para poder ser observado con el Scanning Microscope (Jeol 6360 LV) perteneciente al Museo de Ciencias Naturales de La Plata. Este paso fue necesario debido a las distintas características químicas y físicas del micelio fúngico y del "residuo pelo" a analizar.

## 4.- Extracción enzimática

Se realizó la obtención del extracto crudo enzimático luego de los 21 días de cultivo, mediante el agregado de 30 ml de NaCl 0,5N a 5g del cultivo en placa mediante agitación suave durante 15 min. Los sólidos se separaron por filtración a través de membrana (tamaño de poro: 45  $\mu\text{m}$ ) y al líquido obtenido se le midió volumen y pH. Los extractos obtenidos a partir de las distintas placas se homogeneizaron, se fraccionaron y se congelaron a -20°C hasta su utilización.

## 5.- Determinación de la actividad proteolítica y contenido proteico de los extractos crudos

Las distintas relaciones enzima/sustrato y tiempo de incubación fueron fijadas a fin de obtener una relación lineal, donde la enzima mantiene sus condiciones de actividad máxima y la absorbancia no sobrepase el valor de 0,3<sup>15</sup>.

El sustrato de origen proteico no queratínico utilizado fue azocaseína (sulfanilamida-azocaseína) de Sigma Chem. Co. St. Louis, MO.

Se define la unidad de "actividad azocaseinolítica:  $U_{\text{azo}}$ " como la cantidad de enzima que en las condiciones del ensayo, produce un cambio de 0,1 unidad de Abs<sub>440</sub> por minuto y por mg de proteína.

Como sustratos de origen proteico queratínico se utilizaron "epidermis vacuna" y "residuo pelo". El primero de ellos fue obtenido siguiendo el procedimiento indicado por Buechler y Lollar<sup>16</sup>.

Se define la unidad de "actividad epidérmica:  $U_{\text{epi}}$ " como la cantidad de enzima que, en las condiciones del ensayo, produce un cambio de 0,01 unidad de Abs<sub>280</sub> por minuto y por mg de proteína.

Se define la unidad de "actividad queratinolítica:  $U_{\text{k}}$ " como la cantidad de enzima que, en las condiciones del ensayo, produce un cambio de 0,01 unidad de Abs<sub>280</sub> por minuto y por mg de proteína<sup>17</sup>.

La concentración proteica fue medida por el Método de Bradford<sup>18</sup>.

## 6.- Determinación de biomasa fúngica en el cultivo

Como la pared del hongo está compuesta principalmente por quitina, un polímero de la N-acetilglucosamina, la medida de crecimiento fúngico se puede estimar mediante hidrólisis con KOH concentrado y posterior reacción colorimétrica con el reactivo MBTH (cloruro de 3-metil-2-benzotiazolhidrazona) de la glucosamina liberada<sup>19</sup>. Se midió el contenido de glucosamina a partir del cultivo sobre "residuo pelo" después de 21 días de incubación a 28°C en estufa en atmósfera húmeda y fue expresado como " $\mu\text{g}$  de glucosamina por gramo de peso seco inicial de cultivo".

## Resultados y discusión

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos con respecto a actividad enzimática del extracto sobre diferentes sustratos, su

concentración proteica y la cantidad final de biomasa del cultivo.

Sustrato azocaseína ( $U_{azo}/mg$ proteína)	1,1
Sustrato epidermis ( $U_{epi}/mg$ proteína)	24,6
Sustrato residuo pelo ( $U_k/mg$ proteína)	20,0
Biomasa ( $\mu g$ glucosamina/g peso seco)	6,81
Concentración proteica (mg/ ml)	0,185

**Tabla 1:** Caracterización del cultivo de *T. ajelloi* sobre sustrato sólido.

Las enzimas proteolíticas manifiestan su actividad sobre varios sustratos proteicos queratínicos y no queratínicos, mostrando una especificidad de amplio rango.

### Observación de la muestra mediante Microscopía Electrónica de Barrido

En las siguientes cuatro fotografías se muestran las características del pelo nativo, luego de un proceso de depilado y al cabo del período de incubación con la especie fúngica.

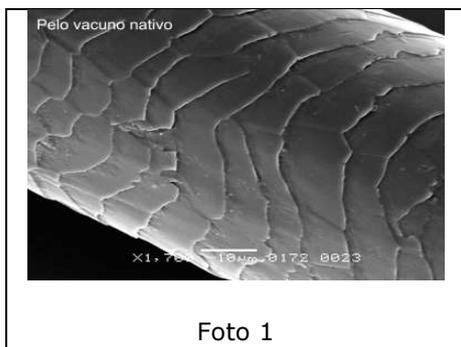


Foto 1

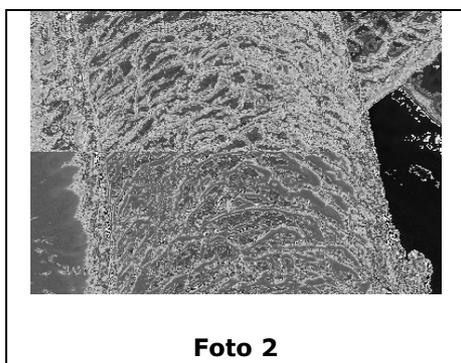


Foto 2

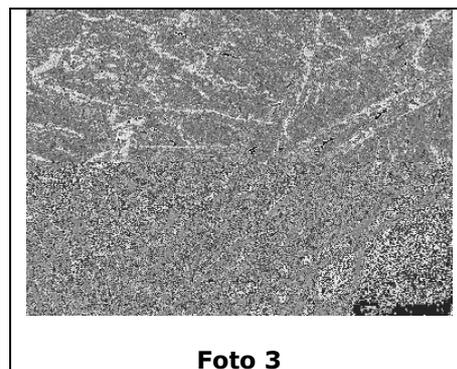


Foto 3

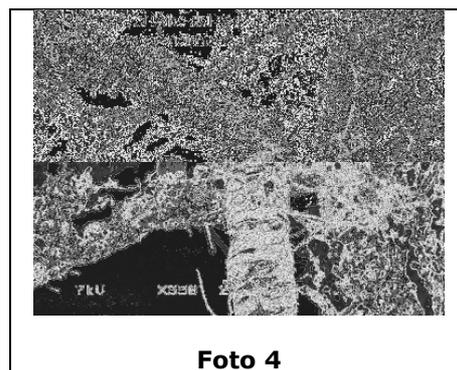


Foto 4

En un pelo vacuno nativo se puede observar la integridad de su cutícula dispuesta en tejas superpuestas (ver foto 1)

En el caso del "residuo pelo" luego de un depilado conservador conformado por un agente depilante orgánico, sulfuro de sodio y cal, se puede observar que la superficie se encuentra dañada, pero el pelo mantiene su integridad de fibra (ver foto 2)

En la Fotografía 3 la desorganización de la fibra se hace evidente debido al ataque fúngico producido durante el tiempo de cultivo con *Trichophyton ajelloi*, se puede apreciar la desorganización de la fibra donde los extremos hifales del micelio penetran entre las tejas cuticulares como "órganos perforadores", arrancándolas desde su nacimiento (ver foto 3). Cuando se observa con mayor perspectiva la acción del hongo sobre la fibra, el micelio la rodea, destruyendo sus capas más externas y desprendiendo las tejas de la cutícula desde su raíz.

Del análisis crítico de los resultados logrados se puede inferir que la liberación de las enzimas y su acción degradadora del pelo se produce en forma simultánea con la penetración mecánica del micelio. De esta manera, el hongo genera biomasa a expensas de los productos de degradación de la queratina que el micelio naciente va encontrando a su paso. Con relación a la actividad enzimática del extracto fúngico, cuando se comparan datos

promedios correspondientes a preparados enzimáticos comerciales frente a un sustrato 'proteico', normalmente utilizado para medir actividad proteolítica (caseína, en nuestro caso azocaseína) y uno conformado por la epidermis, pelo y sus vainas ("sustrato epidermis"<sup>17</sup>) se pone en evidencia que el extracto fúngico expresa una mayor actividad ante el sustrato de origen queratinico (ver Tabla 2). Estos datos preliminares, al igual que los encontrados en los estudios publicados en la parte I de la serie "Biotransformación fúngica del pelo vacuno. Aislamiento de hongos con actividad queratinolítica"<sup>20</sup>, con motivo del análisis de distintas relaciones de actividades con sustratos de origen colágeno, elastina y queratina, sugieren que las enzimas del extracto fúngico podrían ser utilizadas en el proceso de rendido, así como en el depilado.

	preparado comercial 1 (**)	preparado comercial 2 (***)	extracto fúngico
Sustrato azocaseína (U <sub>azo</sub> /mg proteína)	24,0	14,0	1,1
Sustrato epidermis (U <sub>epi</sub> /mg proteína)	11,5	5,0	24,6

**Tabla 2:** Comparación de la actividad proteolítica del extracto fúngico y de preparados comerciales

## Referencias

- 1.- A. Sofía, C. Cantera. Depilados conservadores del pelo ¿qué hacer con el pelo?". Tecnología del cuero, año 9, nº 35, 14-24, 1998.
- 2.- P. Ruffin, E. van Russel, J. Biguet, G. Biserte. Caractérisation partielle de deux aminopeptidases (arylamidases) extracellulaires du dermatophyte *Keratinomyces ajelloi*. Biochimie 61, 495-500, 1979.
- 3.- J. Blake, M. Dahl, M. Herron, R. Nelson. An immunoinhibitory cell wall glycoprotein (mannan) from *Trichophyton rubrum*. The Society for Investigative Dermatology 96, 5, 657-661, 1991.
- 4.- M. Asahi, R. Lindquist, K. Fukuyama, G. Apodaca, W. Epstein, J.H. Mc Kerrow. Purification and characterization of major extracellular proteinases from *Trichophyton*

*rubrum*. Biochemical Journal 232, 139-144, 1985.

5.- G. Apodaca, J.H. Mc Kerrow. Purification and characterization of a 27000 M<sub>r</sub> extracellular proteinase from *Trichophyton rubrum*. Infection and Immunity 57, 10, 3072-3080, 1989.

6.- G. Apodaca, J.H. Mc Kerrow. Regulation of *Trichophyton rubrum* proteolytic activity. Infection and Immunity 57, 10, 3081-3090, 1989.

7.- R.J. Yu, S.R. Harmon, F. Blank. Isolation and purification of an extracellular keratinase of *Trichophyton mentagrophytes*. Journal of Bacteriology 96, 4, 1435-1436, 1968.

8.- F.C. Viani, J.I. Dos Santos, C.R. Paula, C.E. Larsoni, W. Gambale. Production of extracellular enzymes by *Microsporum canis* and their role in its virulence. Medical Mycology 39, 463-468, 2001.

9.- I.N.S. Dozie, C.N. Okeke, N.C. Unaeze. A thermostable, alkaline-active, keratinolytic proteinase from *Chrysosporium keratinophilum*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 10, 564- 567, 1994.

10.- Chandra Jeet Singh, B. Geetha Singh. Characterization of extracellular proteolytic enzyme of *Chrysosporium tropicum* CF 34 and its role in keratin degradation. Indian Journal of Microbiology 35, 4, 311-315, 1995.

11.- R.M.D.B. Santos, A.A.P. Firmino, C.M. de Sá, C.R. Félix. Keratinolytic activity of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. Current Microbiology 33, 364-370, 1996.

12.- J. Friedrich, S. Kern. Hydrolysis of native proteins by keratinolytic protease of *Doratomyces microsporus*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 21, 35-37, 2003.

13.- Enzyme and Microbial Technology 36, 5-6, 639-647, 2005, "Purification of keratinase from poultry farm isolate-*Scopulariopsis brevicaulis* and statistical optimization of enzyme activity". Anbu P, Gopinath SCB, Hilda A, Priya TL, Annadurai G, Enzyme and Microbial Technology 32 (2005), 32, 812-819.

14.- R. Vanbreuseghem. Technique biologique pour l'isolement des dermatophytes du sol. Ann. Soc. Belg. Med. Trop, 32, 173-178, 1952.

15.- B. Galarza, R. Hours, C. Cantera, L. Goya, M.L. Garro, J. Mercerat, H. Reinoso.

Biotransformación fúngica del pelo vacuno. II.- Biomasa y proteasas producidas en función del tiempo de incubación. Evaluación del deterioro del residuo pelo. XVI Congreso FLAQTIC. Buenos Aires, 6 al 8 de octubre de 2004.

16.- Buechler P. and Lollar R. Evidence for the existence of a disulfide other than cystine in cattle epidermis. Journal American Leather Chem. Ass. 45, 503-512, 1950.

17.- C. Cantera, L. Goya, B. Galarza, M.L. Garro, L.M.I. López. Hair saving unhairing process. Part 5. Characterization of enzymatic preparations applied in soaking and unhairing processes.

---

Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists 87, 69-90, 2003.

18.- Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Ann. Biochem. 72, 248-254, 1976.

19.- Aidoo, K.E., Hendry, R and Wood, B.J.B. Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. Eur. Appl. Microbiol. Biotechnol.12, 6-9, 1981.

20.-B.Galarza, L. Goya, C. Cantera, M.L.Garro, H. Reinoso, L.M.I.López . "Biotransformación fúngica del pelo vacuno. Aislamiento de hongos con actividad queratinolítica" (2002) Tecnología del Cuero, **Año 10**, nº 47, 19-28.

### Referencias sobre los productos

\* tensioactivo aniónico: ISOGRAS AN

\*\* preparado comercial: Alcamax

\*\*\* preparado comercial: Pellvit