

Biotransformación fúngica del pelo vacuno II. Curva de crecimiento y producción de proteasas de un microorganismo capaz de biotransformar el "residuo pelo" generado en la curtiembre

Galarza, B.⁽¹⁾; Hours, R.⁽²⁾; Cantera, C.⁽³⁾; Goya, L.⁽⁴⁾; Mercerat, J.⁽⁴⁾

⁽¹⁾ Personal de Apoyo a la Investigación de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Pcia. de Bs. As.(CICPBA), Centro de Investigación y Desarrollo del Cuero (CITEC).

⁽²⁾ Miembro de la Carrera del Investigador Científico y Tecnológico de CONICET, Centro de investigación y Desarrollo de Fermentaciones Industriales (CINDEFI), Facultad de Ciencias Exactas (UNLP)

⁽³⁾ Coordinador de la Unidad "Tecnología de Producción" del CITEC, Miembro de la Carrera del Investigador Científico y Tecnológico de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Pcia. de Bs. As.(CICPBA) y de la Carrera del Tecnólogo del INTI : ccantera@inti.gov.ar

⁽⁴⁾ CITEC, Centro Tecnológico del Sistema Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI) y Comisión de Investigaciones Científicas de la Pcia. de Bs.As (CICPBA)

Introducción

En los modernos procesos de depilado conservador del pelo, en contraste con los convencionales, se reduce apreciablemente la carga orgánica en el efluente líquido de la ribera, pero se genera el "residuo pelo" parcialmente degradado, incorporando el inconveniente de su disposición final. Para una curtiembre que procesa diariamente 25 ton de pieles vacunas saladas, esto representa alrededor de 2,5 ton de pelo húmedo por día.

Una cepa de *Trichophyton ajelloi*, hongo geofílico aislado a partir del suelo del corral de bóvidos¹, ha demostrado tener la capacidad de generar un sistema enzimático capaz de degradar la queratina del "residuo pelo" por medio de proteasas específicas.

Esta propuesta de biodegradación tiene el atractivo del concepto de 'retroalimentación' ya que el pelo es el sustrato sólido sobre el que actúan los hongos dando lugar por un lado, a un residuo orgánico degradado y enriquecido en su contenido en aminoácidos, con potenciales usos en lombricultura y compostaje; por otro lado se genera un extracto proteico con amplia actividad proteolítica (queratinolítica entre otras) de posible aplicación en tecnología del cuero.

Objetivos específicos: a) caracterizar el crecimiento de este hongo mediante el cultivo en "residuo pelo" como sustrato sólido, previamente tratado y sin tratar, determinando la cinética de producción de proteasas y biomasa fúngica en función del tiempo de incubación; b) Evaluar el grado de deterioro del "residuo pelo" luego del cultivo mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), variación de la digestibilidad "in vitro" y

determinación de cistina en los extractos enzimáticos.

Metodología / Descripción Experimental

El aislamiento de la cepa, su conservación, la preparación del inóculo y condiciones para el cultivo sobre "residuo pelo" se describieron en la parte I del trabajo "Biotransformación fúngica del pelo vacuno"[1]. Se compararon dos tipos diferentes de "residuo pelo": uno sin tratar, y otro desengrasado en Soxhlet y tratado con SO_3Na_2 , 0,05M durante 5 hs (pretratado). Ambos tipos de residuo fueron secados a 40°C, triturados y esterilizados en cajas de Petri. Estas cajas conteniendo 3 gr de residuo fueron inoculadas con 10 ml de la suspensión de conidios fúngicos e incubadas durante 28 días en atmósfera húmeda. Comenzando por el día 0, se retiraron dos cajas por vez a intervalos de siete días para obtener 5 puntos de la curva de crecimiento. De cada caja, se tomaron 5 g húmedos y se extrajo el pool enzimático con una solución de CNa 0,5 N, el filtrado se alícuotó y se frizó para su posterior análisis. El remanente del cultivo se llevó a peso seco para la determinación de glucosamina como medida de la biomasa fúngica[2].

La concentración proteica se realizó por el método de Bradford [3]. Las medidas de actividad enzimática se realizaron sobre los sustratos: azocaseína, epidermis vacuna[4] y residuo pelo[5].

Para evaluar el grado de deterioro del pelo se utilizó un microscopio electrónico de transmisión marca Jeol (JEM 1200 EX II). Asimismo, se adaptó la técnica de digestibilidad in vitro con pepsina (microdeterminación). Los ensayos se realizaron sobre muestras de cultivo de 28 días .

También se determinó el contenido del aminoácido cistina en el ultrafiltrado del extracto crudo del cultivo

sobre el residuo pelo sin pretratamiento con el procedimiento de la Norma Española UNE 40-209-73 (IRANOR), Madrid, (1973).

Resultados

Se realizaron distintos gráficos con la variación en el contenido de biomasa y actividades enzimáticas en función del tiempo de cultivo para "residuo pelo" sin tratar y tratado (ver Fig.1 como ejemplo)

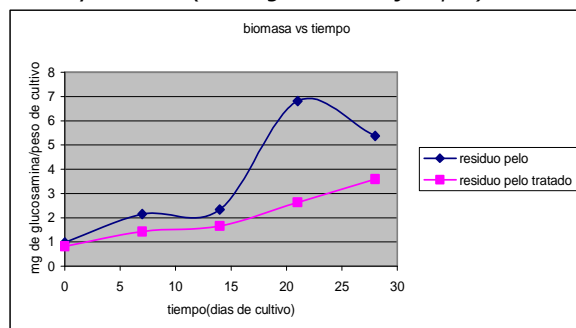


Figura 1

En la observación microscópica se detectaron elementos fúngicos entre la cutícula y la médula del pelo, donde se hallaron espacios sin queratina y sin gránulos de keratohialina[6]. La digestibilidad aumentó en el caso del pelo cultivado con el hongo hasta un 30% y la concentración de cistina en el ultrafiltrado del extracto crudo alcanzó el 0,2% (con respecto al peso seco de "residuo pelo" en el cultivo).

Conclusiones

La máxima concentración de proteasas, que se correlaciona con la mayor expresión de las distintas actividades enzimáticas evaluadas, ocurre luego de 14 días de incubación, tanto en el residuo pelo sin y con pretratamiento. El mayor aumento de biomasa en el cultivo sobre el "residuo pelo" no tratado con respecto al pretratado puede explicarse por la mayor disponibilidad del material lipídico como fuente de C y energía que se elimina en el pelo desengrasado.

Las condiciones operativas seleccionadas para el desarrollo experimental de esta segunda parte del estudio permitieron duplicar el rendimiento en la producción de enzimas con relación al procedimiento de incubación empleado en los estudios de la parte I.

La variación en el aumento de las actividades enzimáticas frente a los distintos sustratos, evidencian las distintas especificidades enzimáticas del extracto crudo que se expresan de acuerdo a la distinta disponibilidad de nutrientes.

Si bien el pelo mantiene su estructura de fibra, se pudo establecer que el "residuo pelo" sufre, por la acción fúngica, una degradación parcial. Aquí queda planteado el desafío de continuar con los estudios para extender el biodeterioro, ya sea por una acción fúngica más intensiva o mediante la posterior intervención de otros organismos. En esta primera

etapa de biotransformación, se dieron las condiciones para aumentar la biodisponibilidad del "residuo pelo" y al mismo tiempo enriquecer su potencial nutricional mediante el aporte proteico y vitamínico de la biomasa fúngica. Ambos factores posibilitarían su utilización como alimento de las lombrices californianas para generar lombricomposteo.

El aumento del rendimiento de proteasas en el extracto crudo es otro aspecto interesante del presente estudio, ya que tiene el atractivo de su potencial aplicación en tecnología del cuero, por este motivo la caracterización del extracto se está realizando sobre sustratos derivados de proteínas de la piel animal.

Referencias

- [1] Galarza, B.C., Goya, L.M., Cantera, C.S., Garro, M.L., Reinoso, E.H., López, L.M.I. "Biotransformación fúngica del pelo vacuno. I.- Aislamiento de hongos con actividad queratinolítica. Caracterización parcial de los extractos fúngicos crudos" Tecnología del Cuero, N° 47, 19-27, 2002.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4]. Buechler P. and Lollar "Some sulfur distribution studies on cattle hair and epidermis, R. J. Amer. Leather Chem. Ass.,44, 358-370, 1949.
- [5]- Yu, R.J., Harmon, S.R., Blank F. "Isolation and Purification of an extracellular keratinase of *Trichophyton mentagrophytes*". Journal of Bacteriology, 96, n°4, 1435-1436, 1968.
- [6]- Kanbe, T., Tanaka, K. "Ultrastructure of the invasion of human hair *in vitro* by the keratinophilic fungus *Microsporum gypseum*". Infection and Immunity, 38, n°2, 706-715, 1982.

Para mayor información contactarse con:
nombre del autor de contacto -ccantera@inti.gov.ar