

Protocolo de análisis para el estudio de preparados enzimáticos con actividad proteolítica

Desprendimiento de actividades de I&D hacia servicios técnicos calificados

Cantera, C.⁽ⁱ⁾; Goya, L.⁽ⁱ⁾; Garro, M. L.⁽ⁱⁱ⁾; López, L. M.⁽ⁱⁱⁱ⁾

⁽ⁱ⁾ Centro de Investigación y Desarrollo del Cuero (CITEC)

⁽ⁱⁱ⁾ Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CICPBA)

⁽ⁱⁱⁱ⁾ Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales, Universidad Nacional de La Plata (LIPROVE)

INTRODUCCION

Para asistir el desarrollo del proyecto “Depilado conservador del pelo libre de sulfuros. Empleo de preparados enzimáticos como agentes depilantes”, cuyo objetivo rector es lograr una tecnología que permita conservar el pelo; producir cueros de la calidad requerida por los mercados; no utilizar sulfuro de sodio y reducir la carga orgánica del efluente líquido, el CITEC ha desarrollado un protocolo de análisis para la caracterización de las enzimas proteolíticas utilizadas en la industria del cuero.

El conocimiento de las propiedades de productos enzimáticos es relevante para mejorar la selección de los mismos, lograr un adecuado control en sus aplicaciones tecnológicas, así como para facilitar el diseño de un apropiado proceso de depilado de pieles.

La necesidad de conocer la acción que tienen las enzimas sobre diferentes proteínas de la piel animal condujo al empleo de sustratos cromogénicos específicos derivados de componentes proteicos de la misma, para generar de este modo información que pueda ser correlacionada con las condiciones reales de los procesos.

OBJETIVO

Desarrollar un protocolo analítico para caracterizar, comparar y seleccionar preparados enzimáticos con actividad preteolítica, que permita además correlacionar la información de laboratorio con el comportamiento de los mismos sobre la piel en las distintas etapas de su elaboración.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

Las técnicas utilizadas en el desarrollo del protocolo son las que se emplean habitualmente en la biología tradicional, las cuales se indican a continuación en la descripción del conjunto de procedimientos que conforman el protocolo:

- Determinación del contenido de proteínas totales
- Evaluación de la actividad proteolítica frente a los sustratos azul de polvo de piel, azocaseína, rojo de elastina, azul de queratina, azoalbúmina, tejido de epidermis y polvo de piel (evaluación de proteoglicanos)
- Variación de la actividad en función del pH para cada uno de los sustratos
- Perfil proteico. Electroforesis en SDS / gel de poliacrilamida (PAGE)
- Isoelectroenfoque (IEF) y zimograma (evaluación de la actividad proteolítica)
- Estudio de inhibición/activación de la actividad proteolítica utilizando componentes de las formulaciones de remojo y depilado.

Es de destacar la incorporación del denominado “sustrato epidermis”, el cual aporta el pelo, sus vainas y la epidermis; sustrato que permite lograr información sobre una etapa relevante de un depilado enzimático, ésta es: vulnerar la barrera que ofrece el tejido de epidermis. Asimismo, los estudios de la influencia de componentes utilizados en el remojo y depilado sobre la actividad proteolítica, empleando los ensayos del protocolo, aportan datos de interés sobre

los efectos de activación-inhibición de las enzimas.

Esta información puede emplearse tanto para incentivar la actividad proteolítica o bien evitar o minimizar el deterioro de la estructura colagénica durante el transcurso de un proceso.

RESULTADOS

Atendiendo al espacio disponible en el resumen del trabajo, sólo se exhibe la información obtenida frente a los diferentes sustratos proteicos con dos preparados enzimáticos comerciales: Pellvit (Together For Leather - TFL-), empleado en el proceso de remojo y Alcamax (Cergen s.a.)¹ utilizado en el proceso de depilado; y un extracto crudo de origen vegetal (no comercial) obtenido de frutos maduros de *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid, cuya actividad es debida a un conjunto de proteasas (extracto vegetal)², datos que se compilan en la tabla I.

CONSIDERACIONES FINALES

El protocolo desarrollado por el CITEC permite adquirir relevantes conocimientos sobre preparados enzimáticos para orientar la selección de los mismos atendiendo a objetivos específicos. Especialmente en el proceso de depilación brinda información analítica para correlacionar las actividades proteolíticas con la actividad depilatoria de las enzimas empleadas.

La potencialidad del conjunto de los procedimientos que conforman el protocolo motivó la incorporación del mismo a la oferta de servicios calificados del instituto.

Tabla I: Actividad proteolítica de los preparados enzimáticos frente a los diferentes sustratos

	Alcamax (Cergen s.a.) (sólido)	Pellvit (TFL) (sólido)	'Enzima vegetal' (líquido)
Proteínas totales mg/g (ml)	47,5	2,3	1
Rojo de elastina unidades U_E / g unidades U_E / mg	2.375 50	180 79	sin actividad en las condiciones del ensayo
Hide Power Azure unidades U_{HPA} / g unidades U_{HPA} / mg	1.700 36	92 40	8 8
Azocaseína unidades U_{Cas} / g Unidades U_{Cas} / mg	1.100 24	32 14	6 6
Albúmina bovina unidades U_{Alb} / g unidades U_{Alb} / mg	4.370 92	67 29	12 12
"epidermis" unidades U_{Epi} / g unidades U_{Epi} / mg	pH11,5 pH 12,5 570 520 12 11	pH 9 pH 11,5 12 13 5 6	pH8,4 pH 10,8 3 3 3 3
KA unidades U_{KA} / g unidades U_{KA} / mg	1.900 40	38 16	1 1
Polvo de piel unidades U_{GAGs} / g unidades U_{GAGs} / mg	520 11	7 3	1 1

1 U_E = 0,1 Abs₅₉₅ / h ; 1 U_{HPA} = 0,1 Abs₅₉₅ / min ;

1 U_{Cas} = 0,1 Abs₄₄₀ / min ; 1 U_{Alb} = 0,01 Abs₂₈₀ / min

1 U_{Epi} = 0,01 Abs₂₈₀ / min ; 1 U_{KA} = 0,1 Abs₅₉₅ / h ;

1 U_{GAGs} = 1 µg chondroitin sulfato/min.

Para mayor información contactarse con:

Carlos Cantera – ccitec@infovia.com.ar

¹ La elección de los productos comerciales no está vinculada a ninguna predilección por parte del instituto.

² La preparación del extracto crudo se realizó siguiendo el trabajo de Tesis "Aislamiento, purificación y caracterización de las proteasas presentes en el látex de frutos de *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid" de la Dra. Laura María Isabel López, en el Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (LIPROVE), Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de La Plata.

[Volver a página principal](#) ◀