



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral:

**Valorización de residuos sólidos de curtiembre:
biotransformación fúngica del pelo vacuno**

Tesista: Betina Galarza

Directora: Andrea Astoreca

Año: 2022

El presente trabajo de tesis, para optar al título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el Centro de Investigación y Tecnología del Cuero (CITEC) y en el Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata, con el financiamiento de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC)

Dedicatoria

A mis hijas Clarisa y Eleonora
A mi mamá

Agradecimientos

A la Dra Andrea Astoreca, al Ing. Carlos Cantera, al Dr Roque Hours, al Dr Reinoso quienes me guiaron en el presente trabajo y brindaron su confianza y estímulo.

A mis compañerxs del CITEC, especialmente a la Dra María Laura Garro, a Carlos Alberto Greco y Luis Goya, al Mgtr. Pablo Ungaro y al DI Mariano Aguyaro.

A mis compañerxs del CINDEFI, especialmente a la Bact. María Cecilia Gortari, el Dr Claudio Voget, a la Dra. Carolina Vita, la Dra. Teresita Castaneda, el Dr Leonel Ortega, la Lic. Aldana Brea, a la Técn. Caty.

C'est la curiosité; la seule espèce de curiosité, en tout cas, qui vaille la peine de être pratiquée avec un peu d'obstination: non pas celle qui cherche à s'assimiler ce qu'il convient de connaître, mais celle qui permet de se déprendre de soi-même.

Michel Foucault

Divulgación de los resultados de la Tesis Doctoral

Artículos publicados más relevantes

- Galarza, B., Goya, L., Cantera, C., Garro, .L., Reinoso, H. y López, L. (2004). Fungal biotransformation of bovine hair. Part 1: isolation of fungus with keratinolytic activity. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 88(3), 93-98.
- Galarza, B., Goya, L., Garro, L., Mercerat, J., Hours, R., Cantera, C. (2006). Fungal biotransformation of bovine hair. Part II: biomass and proteases produced as a function of incubation time. Assessment of hair waste digestion. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 90(4), 169-172.
- Galarza, B., Garro, L., Cavello, I., Cazau, M., Hours, R. y Cantera, C. (2007). Fungal biotransformation of bovine hair: assessment of structural changes. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 91 (6), 229-232.
- Galarza, B., Cavello, I., Greco, C., Hours, R., Schuldt, M. y Cantera, C. (2010). Alternative technologies for adding value to bovine hair waste. *Journal of the society of Leather Technologists and Chemists*, 94 (1), 26-32.
- Galarza, B., Cavello, I., Garro L., Gortari C., Hours, R., Cantera, C. (2012). Evaluation of increase at the production of keratinolytic enzymes. *Journal of AQEIC*, 63 (3), 70-73.
- Galarza, B., Garro, M., Gortari, C., Bonfranceschi, A., Hours, R., Cantera, C. (2014). From a problem of solid waste to an useful product in beamhouse process. *Journal of AQEIC*, 65 (2), 49-55.
- Galarza B., Garro L., Gortari C., Martegani J., Hours R. (2014). Tecnología limpia en la curtiembre; aplicación de enzimas fúngicas y su evaluación mediante Microscopio Electrónico de Barrido (MEB). En *Biotecnología Moderna Avances*. La Habana, Cuba: Elfos Scientae vol. 5, 2014.
- Galarza, B., Garro, M., Martegani, J. y Hours, R. (2016). Characterization and evaluation of fungal enzymatic pool with unhairing activity. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 100 (5), 257-262
- Galarza, B., Garro, M., Cortizo L., Greco C., Hours R. (2017). Enzymatic unhairing: Permeability assay of bovine skin epidermis with fungal enzyme extracts. En CSIR-CLRI (Ed), *Proceedings of the XXXIV IULTCS Congress* (pp 59). Chennai, India: Universal Publishing.

- Garro L., Galarza B., Greco C., Hours R, (2019). Unhairing of bovine skin with fungal enzymes, immersed and spread throughout epidermis. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 103(1), 28-34.
- Galarza B., Garro L., Ferreri N., Eliades L., Hours R. (2021). Optimizing fungal unhairing in bovine skin with *Fusarium oxysporum*. En G. Ghebremedhin. (Ed.), *Proceedings book of abstracts, XXXVI IULTCS Congress* (pp 69). Etiopía, Sudáfrica: África Leather and Leather Products Institute (ALLPI).
- Galarza B., Garro L., Gortari C. y Hours R. (2021). Production and application of compost with high nitrogen content coming from an organic keratin waste, *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, 4 (4), 4918-4924.

Índice de contenidos

CAPITULO 1

Introducción	1
1.1 Problemática ambiental de la industria curtidora	1
1.2 Generación del residuo pelo	4
1.3 Consideraciones sobre el residuo pelo	5
1.4 Fenómeno de inmunización	6
1.5 Comparación del efluente tipo entre el depilado tradicional o destructor del pelo y el depilado conservador del pelo	7
1.6 Distintos métodos para el depilado conservador del pelo	8
1.6.1 Método Sirolime	9
1.6.2 Método Blair Hair	9
1.6.3 Painting	9
1.7 Equipamiento para la separación del “residuo pelo”	9
1.7.1 Tamices de rejilla en cuña estáticos	10
1.7.2 Tamiz de fulon rotatorio	11
1.7.3 Prensa tipo tornillo con compactador	12
1.8 Alternativas tecnológicas para el residuo pelo	13
1.9 Objetivos, justificación y plan de tesis	14
1.10 Hipótesis	16
1.11 Referencias bibliográficas	16

CAPITULO 2

Aislamiento e identificación de cepas fúngicas queratinolíticas degradadoras del residuo pelo vacuno.	
Ensayos cuali y cuantitativos de actividad proteolítico-queratinolítica	19
2.1 Resumen	19
2.2 Introducción	19
2.2.1 Patogenicidad	20
2.2.1.1 Definición	20
2.2.1.2 Rol de las enzimas en la patogenicidad	20
2.2.1.3 Factores relacionados con el huésped	21
2.2.1.4 Evolución de los dermatofitos hacia la patogenicidad	21
2.2.1.5 Hongos queratinofílicos y queratinolíticos	22
2.2.1.6 Definición de dermatofitos	24
2.2.1.7 Clasificación taxonómica de los dermatofitos	24
2.2.1.8 Técnicas de aislamiento de hongos queratinofílicos y queratinolíticos a partir de muestras de suelo	27
2.3 Aislamiento de hongos queratinofílicos y queratinolíticos de suelo	28
2.3.1 Materiales y métodos	28
2.3.2 Resultados y discusión	30
2.4 Ensayos preliminares de actividad queratinolítica para la caracterización de los extractos crudos	32
2.4.1 Materiales y métodos: ensayo cualitativo de actividad queratinolítica	33
2.4.1.1 Selección de las cepas fúngicas	33
2.4.1.2 Preparación del inóculo fúngico	33
2.4.1.3 Ensayo cualitativo con sustrato azul de queratina	33
2.4.2 Resultados y discusión	34
2.4.3 Ensayos cuantitativos de actividad queratinolítica y colagenolítica	35
2.4.3.1 Materiales y métodos	35
2.4.4 Resultados y discusión	37
2.5 Producción de enzimas queratinolíticas de cepas seleccionadas de distinto origen; determinación de actividades proteolítico-queratinolítico-colagenolítico enzimáticas de sus extractos crudos	37
2.5.1 Criterios para la selección de las cepas fúngicas	37
2.5.1.2 Materiales y métodos	38
2.5.1.3 Resultados y discusión	39
2.5.2 Materiales y métodos: producción de extractos enzimáticos en medio líquido y sólido	41
2.5.2.1 Reactivos y soluciones; preparación del inóculo	41

Índice de contenidos

2.5.2.2 Cultivos líquidos agitados (batch)	41
2.5.2.3 Cultivos sólidos estáticos	41
2.5.2.4 Determinaciones analíticas en los extractos crudos	42
2.5.3 Resultados y discusión	42
2.6 Elección de la cepa para la caracterización de su extracto enzimático	45
2.7 Tipificación de <i>Trichophyton ajelloi</i>	45
2.8 Conclusiones generales	46
2.9 Referencias bibliográficas	46
CAPITULO 3	
Enzimas queratinolíticas, alternativas para su producción	58
3.1 Resumen	58
3.2 Introducción	58
3.2.1 Definición de enzimas queratinolíticas	58
3.2.2 Probables mecanismos en la degradación enzimática de la queratina	58
3.2.2.1 Mecanismo en el que intervienen diferentes enzimas con distinta especificidad	59
3.2.2.2 Mecanismo de sulfitólisis	59
3.2.2.3 Diversidad de enzimas proteolítico-queratinolíticas	61
3.2.3 Medios de cultivo, optimización para la expresión de las enzimas proteolítico-queratinolíticas	63
3.2.3.1 Composición	63
3.2.3.2 Consideraciones sobre sustratos queratínicos como inductores de la síntesis de enzimas queratinolíticas	64
3.2.4 Tipos de medios de cultivo	64
3.2.4.1 Fermentación en sustrato sólido	64
3.2.4.1.1 Definición de fermentación en sustrato sólido	65
3.2.4.1.2 Características de la FSS	65
3.2.4.1.3 Fenómenos físicos que ocurren en la fermentación en sustrato sólido	65
3.2.4.1.3.1 Efecto de tunelamiento	66
3.2.4.1.3.2 Transferencia de calor	66
3.2.4.1.4 Actividad acuosa	66
3.2.4.1.4.1 Efectos de la actividad acuosa en fermentación en estado sólido	66
3.2.4.1.5 Determinación de biomasa	67
3.2.4.1.5.1 Determinación de biomasa por la medida del contenido de glucosamina	68
3.2.4.2 Cultivos en medio líquido	68
3.3 Materiales y Métodos	69
3.3.1 Caracterización del residuo pelo en base a sus propiedades higroscópicas: determinación de la actividad acuosa	69
3.3.1.1 Reactivos y soluciones	69
3.3.1.2 Determinaciones analíticas: isothermas de adsorción de agua	69
3.3.2 Cultivo o fermentación en sustrato sólido (FSS)	70
3.3.2.1 Reactivos y soluciones	70
3.3.2.2 Microorganismo utilizado, preparación del inóculo	70
3.3.2.3 Cultivos sólidos con Residuo Pelo y Residuo Pelo Tratado	70
3.3.2.4 Extracción proteico-enzimática y determinación de biomasa	71
3.3.2.5 Determinaciones analíticas	71
3.3.2.5.1 Técnica de la Glucosamina para la determinación de biomasa	71
3.3.2.5.1.1 Extracción de glucosamina	71
3.3.2.5.1.2 Técnica colorimétrica	72
3.3.2.5.1.3 Curva de calibración	72
3.3.2.5.2 Determinación de la concentración proteica	72
3.3.2.5.3 Determinación de actividades enzimáticas	73
3.3.2.5.3.1 Determinación de actividad azocaseinolítica	73
3.3.2.5.3.2 Determinación de actividad queratinolítica frente a RP	73
3.3.2.5.3.3 Determinación de la actividad queratinolítica frente a epidermis bovina	74
3.3.3 Cultivos en medio líquido	75
3.3.3.1 Reactivos y soluciones	75
3.3.3.2 Microorganismo utilizado, preparación del inóculo, condiciones de los cultivos	75

Índice de contenidos

3.3.3.3 Determinaciones analíticas	75
3.3.3.3.1 Determinación de la concentración proteica	75
3.3.3.3.2 Determinaciones de actividad enzimática	75
3.3.3.3.3 Determinación de analitos remanentes y productos de reacción	75
3.3.3.3.3.1 Determinación del contenido de sulfhidrilos	76
3.3.3.3.3.2 Determinación de sulfatos	76
3.3.4. Comparación de la producción de enzimas y proteínas a partir del cultivo en dos medios líquidos distintos	76
3.3.4.1 Reactivos y soluciones	77
3.3.4.2 Microorganismo utilizado, condiciones de cultivo y procesamiento de las muestras	77
3.3.4.3 Determinaciones analíticas	77
3.3.5 Acción de agentes reductores en la producción de proteasas en cultivos en medio sólido y líquido	77
3.3.5.1 Reactivos y soluciones	77
3.3.5.2 Microorganismo utilizado, condiciones de cultivo y procesamiento de las muestras	77
3.3.5.3 Determinaciones analíticas	78
3.4 Resultados y discusión	78
3.4.1 Caracterización del residuo pelo en base a sus propiedades higroscópicas: determinación de la actividad acuosa	78
3.4.2 Cultivos en FSS: determinación de la variación de la biomasa, contenido proteico y producción enzimática	79
3.4.3 Cultivos en medio líquido: contenido proteico, actividades enzimáticas, analitos remanentes y productos de reacción	82
3.4.4 Comparación de la producción de enzimas y proteínas a partir del cultivo en dos medios líquidos distintos	88
3.4.5 Acción de agentes reductores en la producción de proteasas en cultivos en FSS y CML: proteínas y actividad azocaseinolítica	89
3.5 Conclusiones	92
3.6 Referencias bibliográficas	92
CAPITULO 4	
Caracterización e identificación del pool enzimático de <i>Trichophyton ajelloi</i>	102
4.1 Resumen	102
4.2 Introducción	102
4.2.1 Aplicaciones biotecnológicas de las queratinasas	102
4.2.2 Características de las queratinasas	103
4.3 Materiales y métodos I	106
4.3.1 Caracterización del pool enzimático en relación a distintos sustratos proteicos en distintas condiciones de reacción	106
4.3.1.1 Obtención del extracto crudo enzimático y reactivos	107
4.3.1.2 Determinaciones analíticas para la caracterización del EC	107
4.3.1.2.1 Determinación del pH óptimo frente a albúmina bovina, azocaseína, caseína, azul de polvo de piel, sustrato epidermis, sustrato residuo pelo	107
4.3.1.2.2 Estabilidad frente al pH	108
4.3.1.2.3 Estabilidad frente a la temperatura	109
4.3.1.2.4 Estabilidad frente a variaciones de la fuerza iónica	109
4.3.1.2.5 Efecto de la acción de diferentes sales metálicas y no metálicas	109
4.3.1.2.6 Efecto de la acción de agentes reductores	110
4.3.1.2.7 Efecto de la acción de diferentes tensioactivos aniónicos y no-iónicos	110
4.3.2 Resultados y discusión	111
4.3.2.1 pH óptimo	111
4.3.2.2 Estabilidad frente al pH	111
4.3.2.3 Estabilidad frente a la temperatura	112
4.3.2.4 Estabilidad frente a distinta fuerza iónica	113
4.3.2.5 Efecto de la acción de diferentes sales metálicas y no metálicas	113
4.3.2.6 Efecto de la acción de agentes reductores	116
4.3.2.7 Efecto de la acción de diferentes tensioactivos aniónicos y no-iónicos	117
4.4 Materiales y métodos II	118
4.4.1 Clasificación del tipo de proteasa en el pool enzimático	118
4.4.2 Resultados y discusión	119

Índice de contenidos

4.5 Materiales y métodos III	119
4.5.1 Actividad exopeptidásica/aminopeptídica del pool enzimático	119
4.5.2 Determinación de la actividad aminopeptídica	120
4.5.3 Determinación del pH óptimo	120
4.5.4 Determinación de constantes cinéticas Km y V máxima para el sustrato leu-p-nitroani	121
4.5.5 Resultados y discusión	121
4.6 Materiales y métodos IV	122
4.6.1 Actividad queratinolítica del pool enzimático usando “residuo pelo” como sustrato	122
4.6.2 Determinación de la linealidad en relación al tiempo de incubación	122
4.6.3 Determinación de la linealidad en relación a la concentración de enzima	123
4.6.4 Determinación del grado de saturación del sustrato RP	123
4.6.5 Estabilidad a la temperatura del EC frente a la actividad queratinolítica	124
4.6.6 Resultados y discusión	124
4.7 Materiales y métodos V	129
4.7.1 Identificación de las proteasas-queratinasas	129
4.7.1.1 Isoelectroenfoque acoplado a zimograma	130
4.7.1.2 Identificación de proteasas mediante electroforesis bidimensional y análisis por espectroscopía de masa	131
4.7.2 Resultados y discusión	132
4.8 Conclusiones	136
4.9 Referencias bibliográficas	137
CAPITULO 5	
Evidencias de la degradación fúngica del pelo	
5.1 Resumen	146
5.2 Introducción	146
5.2.1 Estructura de la queratina	146
5.2.2 Estructura del pelo y folículo piloso	162
5.2.3 Mecanismos de degradación de la queratina desde el punto de vista morfológico	167
5.3 Procedimiento para la observación en Microscopio Electrónico de Barrido del RP atacado por <i>Trichophyton ajelloi</i>	175
5.3.1 Materiales y métodos	175
5.3.2 Resultados y discusión	175
5.3.3 Conclusiones	179
5.4 Procedimiento para la observación en Microscopio Electrónico de Transmisión del RP atacado por <i>Trichophyton ajelloi</i>	179
5.4.1 Materiales y métodos	179
5.4.2 Resultados y discusión	180
5.4.3 Conclusiones	182
5.5 Determinación del grado de hidrólisis del “residuo pelo” sometido a distintos tratamientos mediante Espectroscopía Dieléctrica	182
5.5.1 Introducción	182
5.5.2 Objetivos	185
5.5.3 Materiales y métodos	185
5.5.4 Resultados y discusión	186
5.5.5 Conclusiones	190
5.6 Determinación del grado de hidrólisis del “residuo pelo” mediante su contenido de cisteína-cistina	190
5.6.1 Introducción	190
5.6.2 Objetivos	191
5.6.3 Materiales y métodos	191
5.6.4 Resultados y discusión	193
5.6.5 Conclusiones	193
5.6.6 Referencias bibliográficas	194
CAPITULO 6	
Aplicación de enzimas queratinolíticas a los procesos de ribera	
6.1 Resumen	199
6.2 Introducción	199
6.2.1 Definición de “cuero”	200

Índice de contenidos

6.2.2	Procesos que ocurren en el área ribera	200
6.2.3	Procesos que ocurren en el área de curtido	202
6.2.4	Mecanismos en la depilación	203
6.2.4.1	Desde el punto de vista de la curtiembre: mecanismo de desplazamiento nucleofílico	203
6.2.4.2	Desde el punto de vista de la queratinólisis: mecanismo de sulfitólisis	207
6.2.5	Composición y estructura de la piel	208
6.2.5.1	Capas de la piel	209
6.2.5.1.1	Epidermis	209
6.2.5.1.2	Dermis	211
6.2.5.1.3	Lamina basal	212
6.2.5.1.4	Colágeno	213
6.2.6	Procesos que ocurren en la piel durante el depilado	216
6.2.7	Distintos tipos de depilado	217
6.2.7.1	Depilado tradicional: problema del gas sulfhídrico	217
6.2.7.2	Depilado enzimático: argumentos rectores	219
6.3	Materiales y métodos	220
6.3.1	Aplicación de preparados enzimáticos fúngicos de <i>Trichophyton ajelloi</i> a la etapa ribera	220
6.3.1.1	Reactivos y soluciones	220
6.3.1.2	Microorganismo e inóculo	220
6.3.1.3	Condiciones del cultivo	221
6.3.1.4	Determinaciones analíticas	221
6.3.1.5	Determinaciones previas: caracterización y comportamiento del EC frente a los reactivos auxiliares de los procesos	221
6.3.1.6	Ensayo a escala laboratorio de la aplicación del extracto enzimático sobre piel vacuna en la etapa ribera	221
6.3.1.6.1	Ensayos en los baños de proceso	222
6.3.1.6.2	Observación en lupa	223
6.3.1.6.3	Técnicas histológicas para Microscopía Óptica	223
6.3.1.6.4	Metodología para la observación en Microscopio Electrónico de Barrido	223
6.4	Resultados y discusión	224
6.5	Conclusiones	233
6.5.1	Conclusiones referidas a las aplicaciones en tecnología del cuero	234
6.6	Conclusiones generales del presente trabajo de Tesis Doctoral	234
6.7	Referencias bibliográficas	235

Índice de Figuras

Capítulo 1	
Figura 1.1 Modelo de las 3 R	1
Figura 1.2. Etapas en el procesamiento de la piel hasta wet-blue	3
Figura 1.3. Lantionina	6
Figura 1.4. Lysinalanina	6
Figura 1.5. Elemento plástico perforado	10
Figura 1.6. Válvula manual para la recirculación del flote	10
Figura 1.7. Batería de fulones con canaletas colectoras semi-circulares	10
Figura 1.8. Tamiz de rejilla en cuña autolimpiante	11
Figura 1.9. Esquema de una sección transversal de un sistema de filtración y recirculación para el depilado conservador	12
Figura 1.10. Tamiz tipo tornillo con compactador y container	13
Capítulo 2	
Figura 2.1. Esquema de la Técnica del anzuelo	30
Figura 2.2 <i>Microsporium gypseum</i> , macromorfología de la colonia	32
Figura 2.3 <i>Fusarium chlamydosporum</i> , macromorfología de la colonia	32
Figura 2.4. Ensayo cualitativo con AQ	34
Figura 2.5. <i>Aspergillus versicolor</i>	40
Figura 2.6. <i>Cladosporium sphaerospermum</i>	40
Figura 2.7. <i>Fusarium oxysporum</i>	40
Figura 2.8. <i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	40
Figura 2.9. <i>Trichophyton ajelloi</i>	40
Figura 2.10. <i>Trichophyton mentagrophytes</i> : test de perforación del pelo <i>in vitro</i>	40
Figura 2.11. <i>Trichophyton mentagrophytes</i> : test de perforación del pelo <i>in vitro</i> positivo (MO 40x)	41
Capítulo 3	
Figura 3.1. Posibles mecanismos de ruptura de la queratina mediante la acción de diferentes enzimas	60
Figura 3.2. Representación hipotética de la acción de LPMOs (AA11)	60
Figura 3.3 Determinación de biomasa por la técnica de la glucosamina: extracción preliminar	72
Figura 3.4 Determinación de actividad queratinolítica frente a RP (Procedimiento II)	74
Figura 3.5 Isoterma de desorción de RP	78
Figura 3.6 Variación de la biomasa de los FSS en RP y RPT en función del tiempo de cultivo	79
Figura 3.7. Variación de la concentración de proteínas solubles de los FSS en RP y RPT en función del tiempo de cultivo	80
Figura 3.8. Variación de la actividad queratinolítica de los EC de los FSS en RP y RPT en función del tiempo de cultivo	81
Figura 3.9. Variación de la actividad azocaseinolítica de los EC de los FSS en RP y RPT en función del tiempo de cultivo	81
Figura 3.10. Variación de la actividad frente a sustrato epidermis de los EC de los FSS en RP y RPT en función del tiempo de cultivo	82
Figura 3.11.- Variación de la concentración de proteínas de los diferentes EC en función del tiempo de los cultivos líquidos	83
Figura 3.12.- Variación de la actividad azocaseinolítica en los diferentes EC en función del tiempo de los cultivos líquidos	84
Figura 3.13.- Variación de la actividad queratinolítica en los diferentes EC en función del tiempo de los cultivos líquidos	84
Figura 3.14.- Glucosa remanente en los diferentes EC en función del tiempo de los cultivos líquidos	85
Figura 3.15.- Variación de la producción de ión amonio en los diferentes EC en función del tiempo de los cultivos líquidos	86
Figura 3.16.- Variación de la concentración de iones sulfhidrilos en los sobrenadantes de los diferentes EC en función del tiempo de los cultivos líquidos	86
Figura 3.17.- Variación de la concentración de iones sulfhidrilos en los sobrenadantes de las mezclas de reacción de la determinación de actividad queratinolítica de los diferentes EC en función del tiempo de los cultivos líquidos	87

Índice de Figuras

Figura 3.18.- Variación de la concentración de iones sulfato en los sobrenadantes de los diferentes EC en función del tiempo de los cultivos líquidos	88
Figura 3.19.- Variación de la concentración proteica del EC de FSS en presencia de agentes reductores en función del tiempo de cultivo	89
Figura 3.20.- Variación de la actividad azocaseinolítica del EC de FSS en presencia de agentes reductores en función del tiempo de cultivo	90
Figura 3.21.- Variación de la concentración proteica del EC de CML en presencia de agentes reductores en función del tiempo de cultivo	90
Figura 3.22.- Variación de la actividad azocaseinolítica del EC de CML en presencia de agentes reductores en función del tiempo de cultivo	91
Capítulo 4	
Figura 4.1. Actividad azocaseinolítica remanente del EC sometido a diferentes pHs de preincubación	112
Figura 4.2. Actividad azocaseinolítica remanente del EC sometido a diferentes temperaturas de preincubación a distintos tiempos	112
Figura 4.3. Actividad azocaseinolíticas remanentes del EC sometido a la acción de diferentes concentraciones de NaCl	113
Figura 4.4. Actividades azocaseinolíticas remanentes del EC preincubando la azocaseína con distintas sales metálicas y no metálicas	114
Figura 4.5. Actividades azocaseinolíticas remanentes preincubando el EC en diferentes concentraciones de sales metálicas y no metálicas	115
Figura 4.6. Actividades azocaseinolíticas remanentes preincubando el EC en 100 mM, 10 mM y 1mM de HgCl ₂	115
Figura 4.7. Actividad azocaseinolíticas remanentes del EC sometido a la acción de agentes reductores durante 60 min	116
Figura 4.8. Actividad azocaseinolíticas remanentes del EC sometido a la acción de agentes reductores durante 30 min	117
Figura 4.9. Actividad azocaseinolíticas remanentes del EC sometido a la acción de tensioactivos	118
Figura 4.10. Actividades proteolíticas remanentes del EC sometido a la acción de inhibidores de proteasa	119
Figura 4.11. Representación de la inversa de las velocidades iniciales de la actividad aminopeptídica del EC en función de la inversa de la concentración de sustrato	122
Figura 4.12. Variación de la actividad queratinolítica en función del tiempo de incubación de la reacción enzimática	124
Figura 4.13. Variación de la actividad queratinolítica en función de la concentración de proteínas en µl de EC	125
Figura 4.14. Variación de la actividad queratinolítica del EC en función de la granulometría del sustrato	126
Figura 4.15. Variación de las absorbancias de los blancos de sustrato en función de su granulometría	126
Figura 4.16. Variación de la actividad queratinolítica del EC en función de la granulometría y de la concentración del sustrato RP	127
Figura 4.17. Variación de la absorbancia de los blancos de sustrato en función de la granulometría y de la concentración del sustrato RP	128
Figura 4.18. Actividad queratinolítica remanente del EC sometido a diferentes temperaturas de preincubación durante 60 min	129
Figura 4.19. Zimograma a partir del IEF de la muestra de EC y marcadores de pI	132
Figura 4.20. Electroforesis bidimensional	134
Figura 4.21. Espectro de los fragmentos peptídicos en función de la masa (m/z) del spot J9	135
Figura 4.22. Espectro de los fragmentos peptídicos en función de la masa (m/z) del spot J10	135
Figura 4.23. Espectro de los fragmentos peptídicos en función de la masa (m/z) del spot J11	136
Capítulo 5	
Figura 5.1. Esquema de la unión puente de H en una α hélice	152
Figura 5.2. Interacción del costado apolar de las dos cadenas en la conformación α-hélice como en la α-queratina y la tropomiosina	153
Figura 5.3. Hélices con la repetición del heptámero de residuos hidrofóbicos	153
Figura 5.4. Moléculas de α-keratina tipo I y tipo II	154
Figura 5.5. Representación esquemática de la estructura secundaria de la	155

Índice de Figuras

molécula de queratina	
Figura 5.6. Heterodímero formado por moléculas de queratina tipo I y II en alineamiento paralelo	158
Figura 5.7. Tetrámero de moléculas de queratina: diferente modos de alineación antiparalela (A) de los heterodímeros	159
Figura 5.8. Formación de un filamento de queratina a partir de la α -hélice	160
Figura 5.9. Estructura y ensamblado de la α -queratina	163
Figura 5.10. Representación esquemática de la fibra de la lana	163
Figura 5.11. Representación esquemática de la morfología de una sección longitudinal del complejo pilosebáceo	164
Figura 5.12. Representación esquemática del folículo piloso	165
Figura 5.13. Desarrollo de hifas perforadoras en el pelo humano	168
Figura 5.14. (A) Órgano perforador de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> ; (B) Hifa perforadora de <i>Chrysosporium</i> sp	168
Figura 5.15. Diferentes tipos de ataque al pelo humano	169
Figura 5.16. Sección transversal de una célula de la cutícula	170
Figura 5.17. Corte transversal con MET de la ultraestructura de las etapas iniciales de la formación del órgano perforador de <i>Microsporum gypseum</i>	173
Figura 5.18. Corte transversal con MET de la ultraestructura de un órgano perforador maduro de <i>Microsporum gypseum</i>	174
Figura 5.19. Pelo bovino nativo (MEB x 1700)	176
Figura 5.20. Pelo bovino (RP) (MEB x 1400)	176
Figura 5.21. Pelo bovino (RP) sin desengrasar (MEB x 1600)	177
Figura 5.22. Pelo bovino (RP) colonizado por <i>Trichophyton ajelloi</i> (MEB x 1800, 0006)	177
Figura 5.23. Pelo bovino (RP) colonizado por <i>Trichophyton ajelloi</i> (MEB x 1800)	177
Figura 5.24. Pelo bovino (RP) colonizado por <i>Trichophyton ajelloi</i> (MEB x 550)	178
Figura 5.25. Pelo bovino (RP) colonizado por <i>Trichophyton ajelloi</i> (MEB x 330)	178
Figura 5.26. Clusters de elementos fúngicos de <i>Trichophyton ajelloi</i> colonizando el RP (MEB x 900)	179
Figura 5.27. Pelo bovino (RP) sin desengrasar (MET x 5000)	180
Figura 5.28. Pelo bovino (RP) colonizado por <i>Trichophyton ajelloi</i> (MET x 8800)	181
Figura 5.29. Pelo bovino (RP) colonizado por <i>Trichophyton ajelloi</i> (MET x3300)	181
Figura 5.30. Pelo bovino (RP) colonizado por <i>Trichophyton ajelloi</i> (MET x 5000)	182
Figura 5.31. Espectro de relajación en dominio del tiempo ante un escalón de tensión (V/V ₀)	186
Figura 5.32. Magnitud del coeficiente de reflexión de las muestras en función de la frecuencia	187
Figura 5.33. Espectro dieléctrico de la parte real de la permitividad (ϵ') en función de la frecuencia para la muestra M ₀	188
Figura 5.34. Espectro dieléctrico de la parte imaginaria de la permitividad (ϵ'') en función de la frecuencia para la muestra M ₀	188
Figura 5.35. Espectro dieléctrico de la parte real de la permitividad (ϵ') en función de la frecuencia para la muestra M ₃	189
Figura 5.36. Espectro dieléctrico de la parte imaginaria de la permitividad (ϵ'') en función de la frecuencia para la muestra M ₃	189
Capítulo 6	
Figura 6.1 Etapas del proceso de curtido	199
Figura 6.2 Estructura química del biocida 2-tiocianometil-tio-benzotiazol	201
Figura 6.3 Estructura química del 2-n-Octyl-4-isotiazolin-3-ona	201
Figura 6.4 Representación típica de la estructura del integumento de la piel del mamífero	208
Figura 6.5 Esquema del proceso de queratinización	210
Figura 6.6 Sección transversal de un corte de piel vacuna curtida con curtientes vegetales	212
Figura 6.7 Poli (Gly-Pro-Pro), una triple hélice right-handed similar al colágeno compuesta de tres cadenas helicoidales left-handed	
Figura 6.8 Apariencia de las bandas de las fibrillas de colágeno	214
Figura 6.9 Concentración proteica y A _{280 nm} de los distintos baños de los procesos de depilado y purga a partir de los distintos tratamientos a los que fueron sometidos los trozos de piel	225
Figura 6.10 Corte de piel bovina en lupa 4x luego del tratamiento T4D	226
Figura 6.11 Corte de piel bovina en lupa 4x luego del tratamiento T3D	226
Figura 6.12 Corte de piel bovina sin tratamiento: control (C) (10 x HE)	227
Figura 6.13 Corte de piel bovina luego de T3D (EC-tensioactivos: Iso+Bay - B) (10 x HE)	227

Índice de Figuras

Figura 6.14 Corte de piel bovina luego de T4R (buffer-tensioactivo Iso - B) (10 x HE)	227
Figura 6.15 Corte de piel bovina luego de T3R (EC-tensioactivo Iso - B) (10x HE)	227
Figura 6.16 Corte de piel bovina luego del T4D (buffer-tensioactivos Iso+Bay - B) (10 x HE)	228
Figura 6.17 Corte de piel bovina luego del T3D (EC-tensioactivos Iso+Bay - B) (HE 10 x)	228
Figura 6.18 Corte de piel bovina sin tratamiento, control C (10 x HE)	228
Figura 6.19 Corte de piel bovina luego de T3P (EC-tensioactivos iso+bay-B, 48 h) (10 x HE)	228
Figura 6.20 Corte de piel bovina luego de T2D (buffer-tensioactivos iso+bay) (4x HE)	229
Figura 6.21 Corte de piel bovina luego de la acción de T1D (EC-tensioactivos iso+bay, 48 h) (10 x HE)	229
Figura 6.22 Corte de piel bovina luego de T5D (depilado tradicional) (10x HE)	229
Figura 6.23 Corte de piel bovina luego de T5D (depilado tradicional) (4x HE)	229
Figura 6.24 Corte de piel bovina luego de T5P (depilado tradicional + purga con EC) (10x HE)	230
Figura 6.25 Corte de piel bovina luego del T6P (depilado tradicional+purga con buffer) (10x HE)	230
Figura 6.26 Corte de piel bovina luego del T6P (depilado tradicional+purga con buffer) (4x HE)	230
Figura 6.27 Corte de piel bovina luego del T6P (depilado tradicional+purga con buffer) (10 x HE)	231
Figura 6.28 Corte de piel bovina sin tratamiento, Control (C) (MEB 100 x)	232
Figura 6.29 Corte de piel bovina sin tratamiento, Control (C) (MEB 500 x)	232
Figura 6.30 corte de piel bovina luego de T3D (EC-tensioactivos Iso+Bay – B) (MEB 37 x)	233
Figura 6.31 corte de piel bovina luego de T3D (EC-tensioactivos Iso+Bay – B) (MEB 250 x)	233

Índice de Tablas

Capítulo 1

Tabla 1.1. Parámetros contaminantes de un efluente líquido “tipo” (curtición al cromo) y valores límites permitidos para su emisión	4
Tabla 1.2. Porcentaje de pelo recuperado de acuerdo al origen de las pieles procesadas	5
Tabla 1.3. Límites aproximados de concentración de Na ₂ S utilizados en el depilado conservador del pelo a escala laboratorio	7
Tabla 1.4. Carga contaminante del efluente final (por t de piel salada) en un proceso de depilado destructor y de un depilado conservador	8
Tabla 1.5. Porcentaje de reducción de la carga contaminante del efluente final (por ton de piel cruda) en un proceso de depilado conservador comparado a un depilado destructor	8

Capítulo 2

Tabla 2.1 Subdivisiones de género de dermatofitos	25
Tabla 2.2 Especies de dermatofitos recientemente sinonimizadas	26
Tabla 2.3. pH y conductividad eléctrica de los suelos de los distintos hábitats de animales utilizados para la técnica del anzuelo	30
Tabla 2.4. Frecuencia relativa (FR%) de aparición de las especies fúngicas aisladas de suelo de distintos corrales por la técnica del anzuelo usando como sustratos PHE y RPE como anzuelo y la frecuencia total (FT%) de aparición de la especie fúngica	31
Tabla 2.5. pH de los medios de cultivo, actividades queratinolíticas específicas (U _{AQ} /mg de proteína) y actividades colagenolíticas específicas de los EC (U _{APP} /mg de proteínas)	37
Tabla 2.6. Concentración proteica y actividades enzimáticas específicas frente a sustratos AQ, APP, obtenidos a partir de cultivos en medio sólido y líquido	43

Capítulo 3

Tabla 3.1. Comparación de la concentración de proteínas y actividad azocaseinolítica en los EC de los medios MMM ₁ y MMM ₂ en función del tiempo de los cultivos	88
---	----

Capítulo 4

Tabla 4.1. Queratinasas purificadas y aisladas de origen bacteriano y fúngico por orden cronológico	104
Tabla 4.2. Variación de la actividad del EC frente a los distintos sustratos proteicos en función del pH	111
Tabla 4.3. Variación de la actividad aminopeptídica en función del pH	121

Capítulo 5

Tabla 5.1.1 Clasificación y localización de los distintos tipos de las queratinas básicas tipo II: queratinización blanda	148
Tabla 5.1.2 Clasificación y localización de las queratinas básicas: queratinización blanda y cornificada de la vaina interna de la raíz (IRS) de folículo piloso humano	148
Tabla 5.1.3 Clasificación y localización de las queratinas básicas como constituyentes menores	149
Tabla 5.1.4 Clasificación y localización de las queratinas básicas de la queratinización dura	149
Tabla 5.1.5 Clasificación y localización de las queratinas ácidas de queratinización blanda de células basales de la raíz interna del folículo piloso	149
Tabla 5.1.6 Clasificación y localización de las queratinas ácidas (tipo I) en la queratinización blanda específicas de la vaina interna de la raíz del folículo piloso y del pelo	150
Tabla 5.1.7 Clasificación y localización de las queratinas ácidas de queratinización dura	151
Tabla 5.2. Localización de queratina calcificada en tejidos de diversas especies	162
Tabla 5.3. Tipos de queratinas en los folículos pilosos	165
Tabla 5.4. Composición en aminoácidos de tres tipos de pelo	167
Tabla 5.5. Estructuras del pelo atacadas durante la invasión microbiana de acuerdo al orden cronológico	171
Tabla 5.6. Tiempos de relajación e incremento dieléctrico de las muestras de RP sometidas a los distintos tratamientos	190
Tabla 5.7. Contenido de cistina y cisteína en el RP control y en el RP inoculado proveniente de los cultivos con TA y FO sobre RP expresado en % de peso seco de RP ...	193
Tabla 5.8. Contenido de cistina y cisteína en los ultrafiltrados de los EC de los cultivos de TA y FO sobre RP expresado en % de peso seco de RP	193

Capítulo 6

Tabla 6.1. Valores permitidos de gas SH ₂ en efluentes y ambientes laborales	218
--	-----

Índice de Tablas

Tabla 6.2. Variación de la concentración de ácido sulfhídrico en la atmósfera en relación a la concentración de soluciones de sulfuro de sodio a distintos pH	219
Tabla 6.3. Protocolo de trabajo	222
Tabla 6.4. Actividad enzimática remanente del EC incubado con los auxiliares de ribera	224
Tabla 6.5 Resultados de las observaciones en microscopía óptica (HE)	231

Abreviaturas

18-MEA	ácido metil-eicosanoico
aa	aminoácido
AGS	agar glucosado de Sabouraud
APP	azul de polvo de piel
AQ	azul de queratina
B	biocida
Bay	tensioactivo Baymol
CE	conductividad eléctrica
CML	cultivos medio líquido
C	control
Cp	capa companion
D	depilado
DAPI	4,6 diamino-2-fenilindol
DBO ₅	demanda biológica de oxígeno
DC	depilado conservador
DQO	demanda química de oxígeno
DTNB	ácido 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoico
De	dermis
ϵ	permitividad dieléctrica
ϵ_0	permitividad dieléctrica del vacío
E	campo eléctrico
E	potencial de reducción
EC	extracto crudo
EECL	extracto enzimático de cultivos en medio líquido
EECS	extracto enzimático de cultivos en medios sólidos
Ep	epidermis
ES	erosión superficial
FO	<i>Fusarium oxysporum</i>
FP	fóliculo piloso
FSS	fermentación en sustrato sólido
He	capa de Henle
HE	Hematoxilina Eosina
him	hélix-initiating motif secuencia
Hx	capa de Huxley
IAA	iodoacetamida
IEF	isoelectroenfoque
IRS	vaina interna de la raíz (inner root sheath)
Iso	tensioactivo Isográs AN
KFAPs	proteínas asociadas a los filamentos de queratinas o keratin filament associated proteins
MBTH	cloruro de 3-metil-2-benzotiazolona hidrazona hidratado
MCC	Método de determinación colorimétrica del contenido de cistina+cisteína de los hidrolizados de lana
ME	micelio erosionante
ME _q	mezcla equimolar
MEB	Microscopio Electrónico de Barrido
MES	ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico
MET	Microscopio Electrónico de Transmisión
MFC	celda de combustible microbiano
MG	<i>Microsporium gypseum</i>
MMM	medio mineral mínimo
MMPT	medio mineral suplementado con peptona y tiamina
MO	microscopio óptico
OIT	2-n-Octyl-4-isotiazolin-3-ona
OP	órgano perforador
ORS	vaina externa de la raíz (outer root sheath)
P	polarización
P	purga
PBS	buffer fosfato salino (Na ₂ HPO ₄ - KH ₂ PO ₄)
PHE	pelo humano estéril
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo

Abreviaturas

PR	penetración radial
P	purga
R	remojo
RP	residuo pelo
RPE	residuo pelo estéril
RPT	residuo pelo pretratado
SDS	dodecilsulfato de sodio
Spp	<i>Scopulariopsis</i> spp
SSV	sólidos suspendidos volátiles
τ	tiempo de relajación
T	tratamiento
TA	<i>Trichophyton ajelloi</i>
TCA	ácido tricloroacético
TCMTB	2-tiocianometil-tio-benzotiazol
TDA	Técnica del Anzuelo
T	tratamiento
Tris	Buffer Tris-HCl
ULF	filamento de longitud unitaria
ω	frecuencia
χ_e	susceptibilidad dieléctrica

Capítulo 1

Introducción

1.1 Problemática ambiental de la industria curtidora

La industria curtidora es una de las más contaminantes en cuanto a la producción de residuos tanto orgánicos como inorgánicos. Poco a poco ha ido adaptando los procesos en pos del “desarrollo ambientalmente sustentable” mediante la implementación de tecnologías limpias.

La producción más limpia, según Kato, Ramírez, Valeriano Acevey, Aguilar Ruiz y Rivera Trasgallo (2006), es “la aplicación continua de una estrategia ambiental preventiva e integral a procesos, productos y servicios para incrementar la ecoeficiencia y reducir los riesgos para la salud humana y el ambiente”. Difiere del concepto “control de la polución” donde el control de la misma se efectúa en una etapa posterior al proceso que le dio origen. En la tecnología limpia se previene la polución y se reduce el consumo de los recursos mejorando el costo-efectivo sin depender de soluciones al final del proceso “end-pipe” que incrementan los costos económicos y ambientales (COWI, 1994).

De acuerdo al modelo de las 3 R, se trata de enviar a disposición final sólo lo que no hubiese sido posible reducir, reusar, reciclar o tratar (Figura 1.1). Al mismo tiempo las opciones de manejo para cada residuo deben ser en el orden en que lo muestra la pirámide invertida. En cuanto se toma conciencia de que los residuos tienen un valor económico, dejan de ser mal manejados (EPA, 2000).



Figura 1.1 Modelo de las 3 R (Kato *et al.*, 2006)

El presente trabajo de Tesis Doctoral tratará la revalorización de uno de los residuos sólidos generados en la industria del cuero local, el residuo pelo. La temática surgió como un pedido de la industria al grupo de investigación por la necesidad de solucionar la problemática ambiental que conlleva. En nuestro país, uno de los países con mayor producción del insumo cuero bovino, las curtiembres no sólo deben abastecer el mercado interno y proyectarse hacia el externo con un producto de calidad,

sino que deben adecuar su tecnología de proceso para cumplir con las normativas vigentes en relación a los residuos generados.

En general por cada 1000 kg de pieles saladas vacunas que entra al proceso de curtición se requieren en promedio 450 kg de diferentes tipos de insumos químicos. Como resultado se obtienen aproximadamente 200 kg de cuero acabado, 40 kg de solventes emitidos a la atmósfera, 640 kg de residuos sólidos y 183 kg de agua que pierde la piel. El volumen de agua que se consume en todo el proceso desde ribera a acabado y que por tanto se elimina en las descargas, oscila entre 15-40 m³ /t de piel fresca (Alzate Tejada y Tobón Mejía, 2004).

En el curtido, las primeras etapas del proceso involucradas en la etapa húmeda o “área de ribera o rivera” dejan su impronta en el producto final y al mismo tiempo generan la mayor contaminación en cuanto a su magnitud. En especial las etapas de depilado o pelambre y desencalado tienen una gran influencia en estos requerimientos concurrentes (Galarza *et al.*, 2010). En la Figura 1.2 se observan los distintos tipos de efluentes generados en el proceso de curtido desde la recepción de las pieles, pasando por el área de ribera hasta que la piel sufre un primer curtido (wet blue).

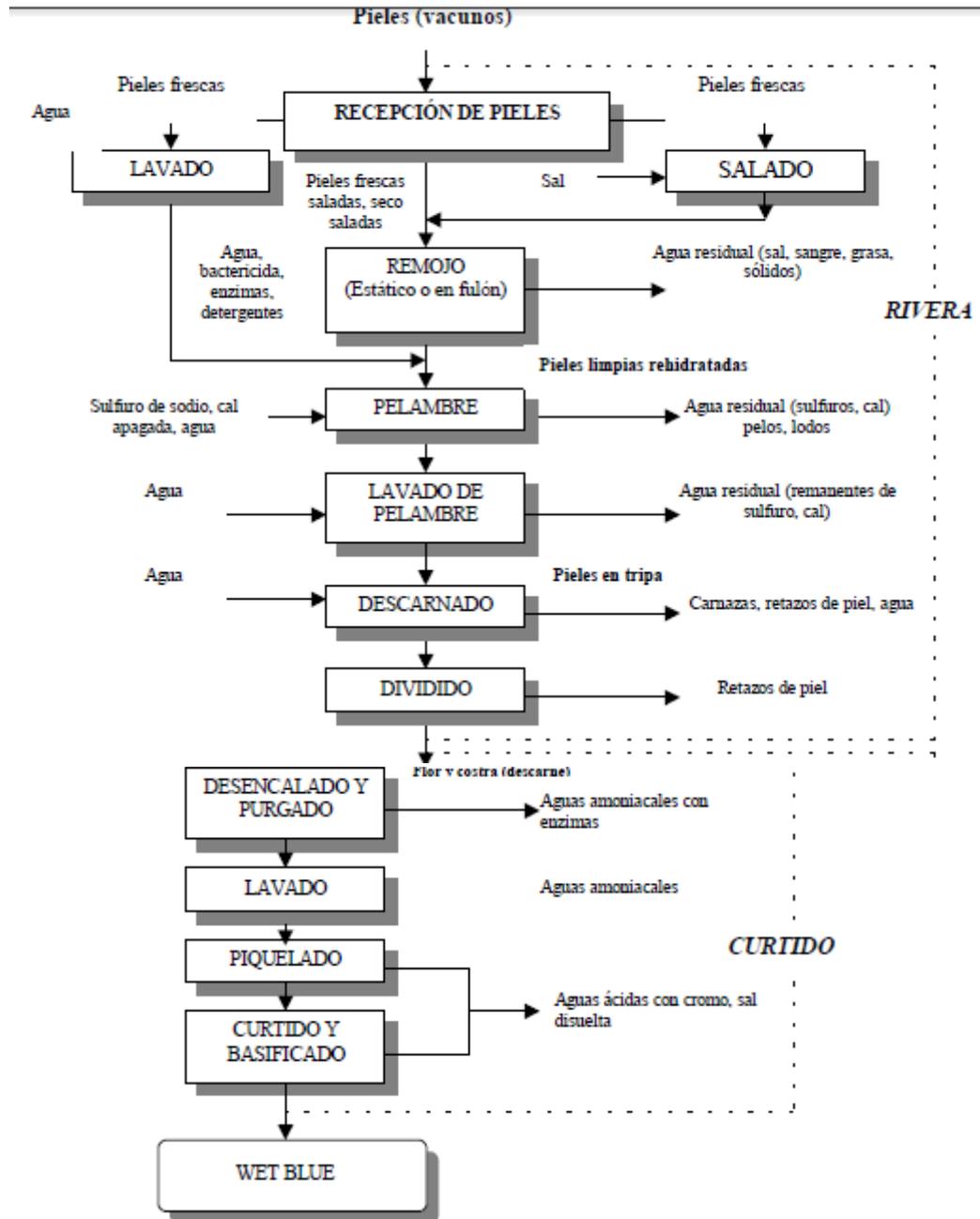


Figura 1.2. Etapas en el procesamiento de la piel hasta wet-blue (Alzate *et al.*, 2004)

Los parámetros de contaminación para un efluente líquido “tipo” que se producen en la “curtición al cromo” sobrepasan los valores límites permitidos para su emisión (Tabla 1.1). En dicho sentido es necesario no sólo el tratamiento de los desechos sino la implementación de tecnologías limpias para disminuir su generación.

Tabla 1.1. Parámetros contaminantes de un efluente líquido “tipo” (curtición al cromo) y valores límites permitidos para su emisión (Sofia *et al.*, 2012)

Parámetro	Curtiembre al cromo	Concentración máxima permisible mg/l (*)
DBO ₅ (mg O ₂ /l)	1500	50 - 200
DQO (mg O ₂ /l)	4000	200 - 500
sulfuros (mg/l)	150	0,5 - 1
Cr total (mg/l)	110	0,5 - 2
cromo hexavalente (mg/l)	0	0,1 - 0,5
cloruros (mg/l)	7500	1000 - 3000
sulfatos (mg/l)	1800	400 - 2000
NKT (mg N/l)	300	10 - 30
nitrógeno amoniacal (mg/l)	100	3 - 10
sólidos suspendidos (mg/l)	2600	50 - 700

DBO₅: Demanda Bioquímica de Oxígeno, expresa los mg de oxígeno necesarios para oxidar biológicamente, en condiciones normalizadas, la materia orgánica presente en el efluente, período de incubación 5 días. Evalúa la ‘carga orgánica’ del efluente susceptible de oxidarse biológicamente.

DQO: Demanda Química de Oxígeno, expresa los mg de oxígeno necesarios para oxidar la materia orgánica total con un oxidante químico fuerte (materia orgánica biodegradable y no biodegradable). Evalúa la ‘carga orgánica’ total del efluente y la presencia de reductores inorgánicos.

Sulfuro (S²⁻): evalúa el principal contaminante inorgánico del área de la ribera.

Cr total: sumatoria de cromo hexavalente y trivalente.

Sólidos suspendidos (SS): cantidad de material insoluble en el efluente que no sedimenta por acción de la gravedad.

NKT: nitrógeno Kjeldahl total, es la sumatoria del nitrógeno orgánico y el amoniacal.

Nitrógeno amoniacal: evalúa principalmente el aporte de sales amoniacales (desenlacado), excluyendo el nitrógeno proteico.

Cloruros y sulfatos: dan información sobre la salinidad del efluente

(*) Rango de variación del límite exigido por autoridades sanitarias de diferentes países, considerando la naturaleza del cuerpo receptor (agua superficial y sistema de cloacas).

1.2 Generación del “residuo pelo”

Dentro de las distintas variantes en el proceso de depilado, el “depilado convencional destructor del pelo”, a base de sulfuro de sodio y cal, genera los máximos valores en la contaminación de la ribera. En las últimas décadas se ha desarrollado un cambio de tecnología, el “depilado conservador del pelo” en base a una “inmunización” del mismo (sección 1.4) mediante la cual se preservan sus propiedades de fibra. Sus argumentos rectores, en relación al depilado tradicional o destructor, implican la reducción de la carga orgánica del efluente en un 40% a 60% en términos

de DQO, la disminución de la concentración de sulfuro en un 50% y de los sólidos suspendidos sedimentables en un 75% (sección 1.5). La disminución de estos parámetros forman parte de un cambio de paradigma que tiende a disminuir la huella ambiental en la cadena de valor de la industria del cuero (De Rosa-Giglio *et al.* 2018).

De entre todas las alternativas tecnológicas para el proceso de depilado, “el depilado conservador del pelo asistido por enzimas” constituye la modalidad más sustentable (capítulo 6, secciones 6.2.3 y 6.2.7.2).

El pelo, que antes formaba parte del efluente líquido, pasa ahora a formar parte de un nuevo residuo sólido, el “residuo pelo” cuya magnitud se encuentra entre un 10% a un 20% del peso (humedad 75%) de las pieles saladas procesadas, dependiendo de la especie de la cual proviene (Frendrup y Buljan, 2000) (Tabla 1.2). Si se considera que en la Argentina la totalidad de sus curtiembres llevaban procesadas 247.000 t de cueros durante el año 2018, según un informe de noviembre de 2018 (Diario Perfil, 2019), el “residuo pelo” generado llegaría casi a 100 t por día con lo que se aprecia la magnitud del problema. La mayor parte se dispone en rellenos sanitarios, con el correspondiente gasto económico de transporte y tasas ya que no es considerado como residuo peligroso según la legislación vigente (ley 24.051 de Residuos Peligrosos, 1993). Actualmente, en la provincia de Buenos Aires, debido al cierre del relleno sanitario de Villa Dominico y a las restricciones de vuelco en otros predios dependientes del CEAMSE (Coordinación Ecológica área Metropolitana Sociedad del Estado) como los ubicados en José León Suárez, González Catán y Ensenada se dificulta su disposición con lo que al costo económico se le suma el ambiental.

Por otro lado, este residuo es de naturaleza proteica, por lo que tiene potenciales aplicaciones en diversas industrias (sección 1.8).

Tabla 1.2. Porcentaje de pelo recuperado de acuerdo al origen de las pieles procesadas

Tipo de piel	Pelo escurrido/piel salada	Materia seca del pelo/piel salada
Piel bovina pesada	10-15 %	3-5 %
Piel bovina liviana	15-20 %	5-7%
Becerro	20-40 %	10-13 %
Oveja o piel de cabra	60-90% /p seco	20-30 %

1.3 Consideraciones sobre el “residuo pelo”

El pelo, por su composición química y estructura, es refractario a su degradación. Compuesto principalmente por α -queratina, es una macromolécula proteica “fibrosa” rica en cisteína. A través de este aminoácido se forman puentes disulfuro inter e intramoleculares por medio de la cistina. La elevada resistencia a la hidrólisis de su estructura tridimensional está estabilizada no sólo por uniones puente disulfuro, sino también por interacciones puente de hidrógeno, hidrofóbicas y electrostáticas. La α -hélice dextrógira se empaqueta sobre sí misma en un superenrollamiento levógiro, para constituir microfibrillas que a su vez se unen en forma

retorcida para dar macrofibrillas (Hill, Brantley y Van Dyke, 2010). La composición del pelo a nivel molecular se detallará en el capítulo 5.

La composición típica del “residuo pelo vacuno” en un depilado conservador a base de sulfuro de sodio, cal y agentes depilantes como mercaptanos y aminas se describe a continuación: sólidos totales 25-30% (bs: base seca), grasas 2-4% (bs), nitrógeno total 11-15% (bs), Ca 2-3% (bs), Na 1-2% (bs), S 3-5% (bs), sulfuros: 80-100 mg H₂S/kg de pelo húmedo recuperado, filtrado y escurrido, humedad 75% (Galarza *et al.*, 2010).

1.4 Fenómeno de inmunización

La “inmunización” es la resistencia a la degradación que ocurre cuando el pelo de la piel que va a ser transformada en cuero es sometido a bajas concentraciones de cal (1 a 2,5% en peso de las pieles procesadas, a tiempos entre 45-90 min por cada 100% del flote, pH 10-11). Este fenómeno se produce antes de su exposición al sulfuro de sodio cuando se aplica la tecnología de “depilado conservador del pelo”.

En la práctica debe ser agregado además un agente depilante (en base a mercaptanos y aminas) que debe ser adicionado junto o justo después del agregado de cal. En el depilado conservador usando mercaptanos en la “inmunización selectiva”, las dosis de sulfuro varían entre 2,5-5,0 kgS⁻²/t de piel salada procesada, mientras que si es asistido por enzimas la dosis varía entre 2,5-4,0 kgS⁻²/t (Cantera, 2001).

El cambio de agregar en primer término cal a baja concentración luego del remojo es lo que diferencia esta tecnología en relación al depilado destructor del pelo. Se producen una serie de reacciones químicas en la cistina de la queratina del tallo del pelo que dan como resultado la formación de lantionina y lisynalanina, compuestos más resistentes a la hidrólisis (Figuras 1.3 y 1.4). La lisylalanina se forma cuando en la inmunización se usa NaOH y Ca (OH)₂ lo cual resulta en enlaces intermoleculares; la formación de lantionina puede explicar sólo los enlaces intramoleculares. El posterior agregado de Na₂S y mercaptanos produce el desprendimiento del pelo desde la raíz, preservando el tallo del pelo del ataque químico.

Algunas teorías que explican este fenómeno asumen que las reacciones que ocurren en el pelo durante el depilado conservador se deben a un mecanismo de eliminación seguido por reacciones de adición. Algunas de estas reacciones llevan a un entrecruzamiento (cross-linking) que fortalecen el pelo, inmunizándolo y previniendo su disolución.

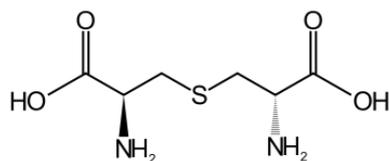


Figura 1.3. lantionina

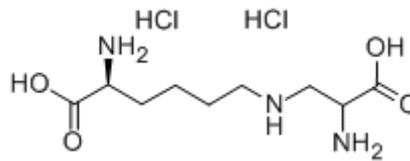


Figura 1.4. lisynalanina

Thakur y Balaram (2009) mediante estudios de espectrometría de masa iónica negativa en fase gaseosa, pudieron determinar el mecanismo de formación de lantionina, trisulfuro y tetrasulfuro a partir de péptidos con enlaces disulfuro acíclicos y cíclicos. La base de las transformaciones de las reacciones químicamente catalizadas de los disulfuros de los péptidos es mediada por la abstracción de protones de las posiciones de los C^α y C^β de los residuos de cistina. Las reacciones de las especies de tiol reactivas y residuos de dehidroalanina generadas por el clivaje de los puentes disulfuro resultan en la formación de lantionina, trisulfuro y tetrasulfuro (Thakury Balaram, 2009).

La llamada queratina blanda (donde dominan los residuos de cisteína por sobre los de cistina), presente en los estratos basal y espinoso de la epidermis, en las vainas epiteliales del folículo del pelo y en el bulbo del pelo, es más fácilmente atacada por los agentes depilantes que la queratina dura (donde predominan los residuos de cistina) de la vaina del pelo. Esto facilita el control sobre el proceso de inmunización, impidiendo la protección de los componentes del sistema de epidermis involucrados en la pérdida del pelo. Sin embargo, si no hay un buen control de este proceso puede llegar a producirse una “inmunización” de la epidermis, fenómeno observado histológicamente.

La concentración de sulfuro en el licor por debajo del cual el pelo permanece inalterado y por encima del cual es destruido depende del volumen del flote, dosis de cal, pH, temperatura, tiempo de proceso, intensidad de la acción mecánica y longitud del pelo (Tabla 1.3) (Frendrup, 2000).

Tabla 1.3. Límites aproximados de concentración de Na₂S utilizados

% flote	% Na ₂ S escamas (60% Na ₂ S)	Kg S ⁻² /t de piel salada
50-100	0,5	1,25
200	1	2,5
300	1,5	3,7

En la práctica, la dosis mínima en un depilado conservador a base de sulfuro de sodio y cal es de aproximadamente 0,25-0,5% Na₂S en escamas (60% Na₂S) o 0,6-1,2 kg S⁻²/t de piel salada (Frendrup, 2000).

1.5 Comparación del efluente tipo entre el “depilado tradicional o destructor del pelo” y el “depilado conservador del pelo”

A continuación, se comparan los valores de los parámetros de contaminación que se toman en cuenta en la curtiembre entre la tecnología tradicional (depilado destructor) y la tecnología limpia (depilado conservador) (Tabla 1.4), donde se aprecia las disminuciones de los sólidos totales, la BOD y DQO, el nitrógeno total y el sulfuro entre ambas.

Tabla 1.4. Carga contaminante del efluente final (por peso de piel salada) en un proceso de depilado destructor y de un depilado conservador (Frendrup, 1996)

Parámetro	Tecnología tradicional	Tecnología limpia ^(I)
Vol. del efluente (m ³ /t)	12	5
Sólidos totales (kg/t)	187	110 ^(II)
BOD ₅ (kg/t)	50	20 ^(III)
DQO (kg/t)	130	55
Nitrógeno total (kg/t)	5,8	2,7
Nitrógeno amoniacal(kg/t)	0,4	0,3
Sulfuro (kg/t)	8,5	1 ^(IV)
Cloruro	15	15 ^(V)

(I) Proveniente de un depilado conservador del pelo con filtración y reciclado del baño residual

(II) 90 kg/t de cuero fresco procesado

(III) 18 kg/t de cuero fresco procesado

(IV) valores mínimos 0,6-0,7 kg/t

(V) 2-4 kg/t de cuero fresco procesado

En la Tabla 1.5 se puede apreciar que el porcentaje de reducción de la carga contaminante de los distintos parámetros en la práctica industrial al aplicar la tecnología limpia de “depilado conservador” en relación al depilado tradicional es significativo, sobre todo en los sólidos suspendidos y el contenido de sulfuro, tanto en el licor del depilado como en el efluente líquido total (Frendrup, 2000).

Tabla 1.5. Porcentaje de reducción de la carga contaminante del efluente final (por ton de piel cruda) en un proceso de depilado conservador comparado a un depilado destructor.

Parámetro	Descarga a partir de un depilado conservador del pelo ^(I) (kg/t piel cruda)	% de reducción comparada con un depilado destructor del pelo	
		En el licor del depilado	En el efluente líquido total
Sólidos totales	60	30	8
Sólidos suspendidos	15	70	43
BOD ₅	20	50	28
COD	50	50	28
N Kjeldahl	2,5	55	22
N amoniacal	0,2	25	2
Sulfuro	0,6-1,2	50-60 (II)	50-60 (II)

(I) incluyendo el efluente líquido del lavado

(II) el % de reducción de la descarga es mayor que la reducción de la dosis correspondiente

1.6 Distintos métodos para el “depilado conservador del pelo”

El depilado conservador ha sido usado desde tiempos inmemoriales. Existen reportes que provienen del año 1880, donde se utilizó el depilado conservador a base de cal y sulfuro de sodio, en la forma de pieles encaladas en hoyos o en pieles sudadas. Los modernos métodos comerciales, sin embargo, fueron desarrollados en el período 1980-1990 junto con el advenimiento de nuevos equipos como mezcladores o tambores equipados para recircular el licor y separar el pelo depilado.

Existen métodos comerciales estandarizados como el “Sirolime” desarrollado por CSIRO en 1981 (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Leather Research Centre, Australia), el “Blair Hair” utilizado en curtiembres de EEUU, México y Corea, creado en 1985 por Rohm y Haas y la empresa Eagle Ottawa Leather Co y el sistema “painting” (Frendrup, 2000) que serán descritos a continuación.

1.6.1 Método Sirolime

La inmunización se logra con un agente reductor como NaHS al 1% en escamas (60% NaHS) y 1,5% de cal, ajustando el pH por encima de 9 para evitar la formación de H₂S. Posteriormente se agrega 0,5% de Na₂S en escamas (60% Na₂S), 0,75% de cal y parte del líquido se recircula. La ventaja es que se disminuye la utilización de Na₂S y de agua pero se eleva el costo por el uso de NaHS.

1.6.2 Método Blair Hair

Se utiliza cal al 2,5% en la inmunización, la remoción del pelo se logra con 1,5% de NaHS. El pelo depilado es lavado con agua que puede ser recirculada. El posterior reencalado se lleva a cabo con 2,5% de cal, 0,5% NaHS, una amina alifática auxiliar del depilado que incrementa el pH para impedir la formación de H₂S y 0,25% de un surfactante aniónico. La desventaja es que se usa un equivalente de Na₂S como NaHS de 10,9Kg S⁻²/ ton de piel cruda.

1.6.3 Painting

El painting es un método tradicional para becerros, ovejas o animales de pelo largo como la cabra. Se usa en casos donde el pelo o la lana son valiosos. El método consiste en pintar la piel (a mano o a máquina) por el lado carne con una pasta que consiste de Na₂S, cal, caolín o espesantes orgánicos de la piel y agua. Normalmente, la pasta contiene 5-15% de Na₂S y 40%-70% de agua, con una densidad de 15-40°Be. Después del painting, las pieles se estaquean en una pila, donde contactan pelo sobre pelo. Los químicos depilantes penetran la piel del lado de la carne y destruyen las raíces del pelo, logando un depilado donde la fibra capilar permanece intacta.

1.7 Equipamiento para la separación del “residuo pelo”

Los procesos modernos de depilado conservador del pelo requieren equipamiento para la recirculación del líquido del proceso (Buljan y Král, 2012). La separación del pelo se realiza inmediatamente después del depilado para evitar su degradación. Los fulones modernos están equipados para la recirculación y la regulación de la temperatura y pH. En los antiguos fulones se instalaban dentro placas de plástico perforadas para filtrar el pelo, válvulas manuales externas para la recirculación (Figura 1.5 y Figura 1.6) y canaletas semicirculares para coleccionar el flote en ambos lados del fulón (Figura 1.7).

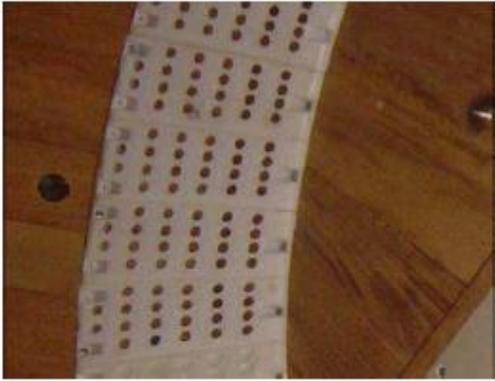


Figura 1.5. Elemento plástico perforado (Buljan *et al.*, 2012)

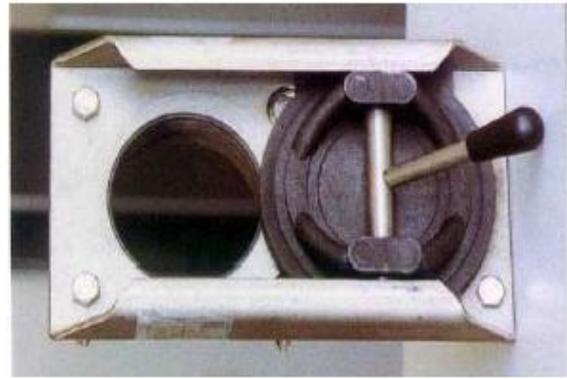


Figura 1.6. Válvula manual para la recirculación del flote (Buljan *et al.*, 2012)



Figura 1.7. Batería de fulones con canaletas colectoras semi-circulares (Buljan *et al.*, 2012)

Es importante que la capacidad filtrante sea suficiente para mantener la velocidad de recirculación apropiada y completar el proceso en el tiempo requerido. La capacidad de flujo típica de un sistema de filtrado comercial es de 600-1000 l/min.

Varios tipos de tamices pueden ser usados para separar el pelo, el flote puede ser bombeado hacia los recipientes mediante bombas.

1.7.1 Tamices de rejilla en cuña estáticos

El flote filtrado fluye a través de una placa de tamizaje de malla 0,5- 1,0 mm de acero inoxidable estática o vibratoria mientras que el pelo desliza y cae en un contenedor (Figura 1.8).



Figura 1.8. Tamiz de rejilla en cuña autolimpiante (Buljan *et al.*, 2012)

1.7.2 Tamiz de fulón rotatorio

La superficie de la rejilla en cuña cilíndrica sirve como filtro. El flote es llevado hacia afuera de la superficie cilíndrica del fulón y vuelve a éste filtrado mediante una bomba centrífuga. El pelo es enviado hacia afuera por medio de una cuchilla por gravedad (fulón inclinado) o con un montacarga desde donde es llevado a un contenedor en el final del fulón y sometido a un escurrimiento (Figura 1.9).

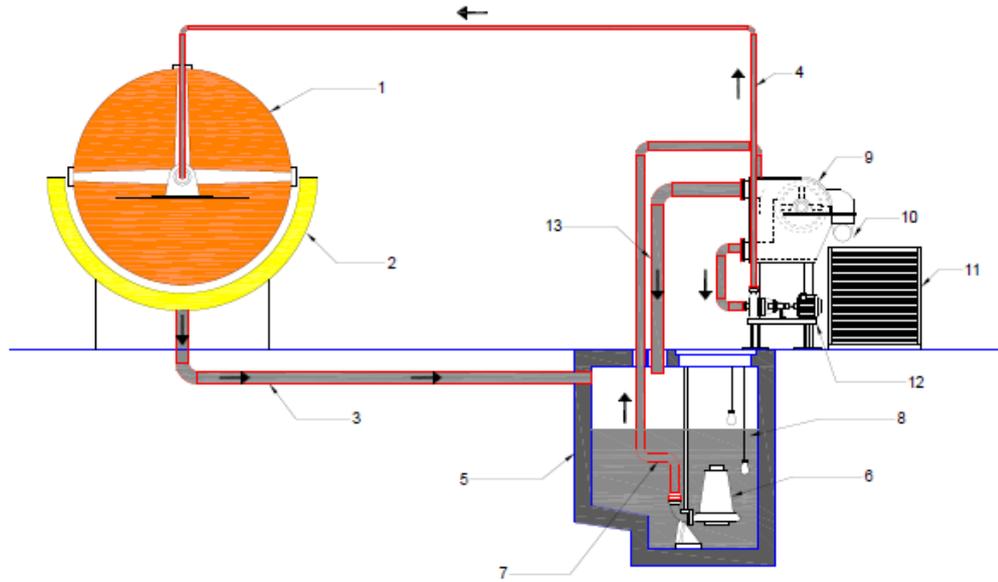


Figura 1.9. Esquema de una sección transversal de un sistema de filtración y recirculación para el depilado conservador. Referencias: 1.-Fulón de encalado; 2.-Canaleta colectora; 3.-Tubo colector; 4.-Tubo de elevación hacia el fulón; 6.-Bomba elevadora sumergible; 7.-Tubo de elevación hacia el tamiz rotatorio; 8.-Switch para el nivel de flote; 9.-Tamiz fino autolimpiante; 10.-Prensa para escurrir el pelo; 11.-Contenedor para el pelo escurrido; 12.-Bomba de reciclado centrífuga; 13.-Tubo para desbordes (Buljan *et al.*, 2012).

1.7.3 Prensa tipo tornillo con compactador

La separación del pelo toma lugar en la cañería de filtrado que consta de una sección semicircular perforada con un tornillo en la superficie interna. El pelo es escurrido en la sección cónica de goma (Figura 1.10).

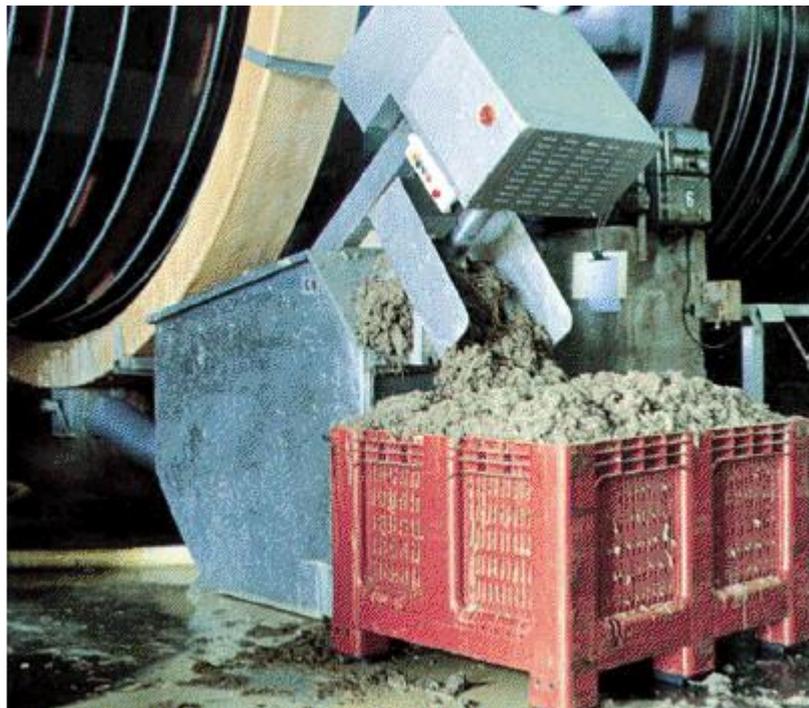


Figura 1.10. Tamiz tipo tornillo con compactador y container (Buljan *et al.*, 2012)

1.8 Alternativas tecnológicas para el “residuo pelo”

La morfología macroscópica de la fibra capilar y el folículo piloso se divide en tallo (región que emerge de la epidermis) y bulbo (región que permanece inserta en la epidermis-dermis) (Cap. 5, Fig. 5.12). Debido al efecto de inmunización-depilación del tratamiento alcalino moderado, el pelo depilado sufre una degradación parcial en el tallo pero mantiene algunas de sus propiedades de fibra. El depilado ocurre por la acción a nivel de la raíz del folículo piloso de los agentes químicos aunque en el caso del “depilado conservador del pelo” la cutícula pierde su resistencia, razón por la cual las posibles aplicaciones de este residuo dependerán del mayor o menor grado de hidrólisis.

Las diversas alternativas de la re-utilización están basadas en sus propiedades de fibra (I) o en sus propiedades luego de haber sido sometido a un proceso de hidrólisis (II) (Galarza *et al.*, 2010).

Según sus propiedades de fibra (I):

- Formación de fieltros
- Material filtrante
- Aislante térmico
- Recipientes para plantas
- Barreras oceánicas para derrames de petróleo

Luego de un proceso de hidrólisis (II):

- Fertilizante orgánico luego del tratamiento a 140°C, 3 atm y secado

- Pellet proteico para alimentación animal previamente tratado en un reactor industrial (ej. www.crestaraja.com.ar).
- Fuente de aminoácidos como cisteína, histidina, ácido aspártico, ácido glutámico, leucina e isoleucina para uso medicinal.
- Obtención de melanina
- Auxiliares en la industria del cuero: sustituto de la caseína en el acabado, agente de relleno o filler en el recurtido, agente de agotamiento del cromo en el curtido
- Generación de biogás (www.kuger.dk; www.bidagan.dk/uk/Fangel.htm).
- Bioinsumos aplicables a la agroecología (compost, vermicompost, bokashi) (Aguayo, Garro, Galarza, Hours, 2019; Galarza, Garro, Gortari, Hours, 2021; Kamini, Sujiritha, Shakila, Saravanan, 2021; www.esperanzanews.com.ar).
- En la industria cosmética, combinado con polímeros naturales como el quitosán, colágeno y fibroína de seda.
- En ingeniería de tejidos, para la formación de esqueletos 2D y 3D, regeneración de fibras, liberación controlada de drogas a partir de nanopartículas (Sharma y Kumar, 2019).
- Obtención de subproductos luego de la degradación biológica: producción de extractos enzimáticos fúngicos, aplicables a diversas industrias en especial la de la industria del cuero (capítulo 3).

1.9 Objetivos, justificación y plan de tesis

El objetivo general del presente plan de tesis doctoral plantea la posibilidad de utilizar el potencial de crecimiento de ciertos tipos de hongos queratinolíticos sobre el “residuo pelo” proveniente de un depilado conservador del pelo. De esta forma los hongos pueden biotransformar este residuo y al mismo tiempo producir un conjunto de enzimas con potenciales usos en diversas industrias como la del cuero, planteando la retroalimentación del proceso. La revalorización del “residuo pelo” daría lugar a una materia prima de origen proteico para dejar de ser considerado como tal y poder ser aplicado en biotecnología.

Objetivos específicos

1. Aislar, caracterizar e identificar hongos no patógenos con actividad queratinolítica sobre el “residuo pelo”.
2. Desarrollar cultivos con las especies fúngicas aisladas utilizando sustrato “residuo pelo” para la producción, caracterización, aislamiento e identificación de los extractos queratinolíticos obtenidos.
3. Alcanzar una desorganización avanzada de la estructura fibrosa del pelo mediante la hidrólisis o biotransformación fúngica.
4. Dar lugar a un residuo parcialmente degradado y a un extracto proteico con actividad queratinolítica (concepto de retroalimentación) mediante los puntos 2 y 3, siendo el pelo el sustrato sólido sobre el que actúan y crecen los hongos.
5. Estudiar las posibles aplicaciones del pool enzimático en tecnología del cuero

(proceso de remojo, depilado, purga).

Justificación

La idea del presente trabajo surge a partir de una demanda del sector curtidor local. La generación del “residuo pelo” constituye un problema, por su magnitud y costo de traslado. Por otro lado la posibilidad de producir, a partir de este residuo, un pool enzimático que se pueda aplicar al depilado de piel bovina constituiría una propuesta de generarlo a mayor escala y a nivel de industrias locales. La utilización de depilados enzimáticos en la primera etapa de fabricación del cuero, en especial en la etapa de depilado trae numerosas ventajas ambientales y de mejoramiento de la calidad laboral de los trabajadores de la curtiembre. La reducción del sulfuro de sodio en el efluente es del 50% y del 40% de los sólidos suspendidos en un depilado asistido con enzimas respecto al tradicional. En este último, se produce, bajo las condiciones de trabajo, la emisión de gas sulfhídrico que supera el umbral olfatorio con el correspondiente riesgo para la salud del operario (Crispim y Mota, 2003; Wise et al., 2019). Sustituir las importaciones de preparados enzimáticos y de la tecnología para su aplicación, como actualmente ocurre en las curtiembres locales, abarataría costos económicos y ecológicos.

El concepto de biotransformación utiliza la capacidad de los hongos queratinolíticos o queratinofílicos que en condiciones naturales producen la biodegradación de las queratinas, principal componente proteico del pelo. Esta acción es consecuencia de la actividad enzimática y mecánica de microorganismos queratinofílicos, tales como ciertos géneros de hongos, bacterias y actinomicetes que digieren estas proteínas para su metabolismo y crecimiento. Se han identificado numerosos eumycetes que producen queratinasas. Por ejemplo, se han aislado cepas fúngicas productoras de estas enzimas en dermatofitos zoofílicos (*Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton gallinae*, *Trichophyton simii*, *Microsporum canis*), geofílicos (*Microsporum gypseum*, *Microsporum cookei*, *Keratinomyces ajelloi*) y otros deuteromicetes.

Plan de Tesis

Relevamiento del estado actual en relación a la tecnología del cuero: empleo del método de depilado conservador (DC) del pelo; magnitud de la generación del “residuo pelo” (RP) y manejo del mismo. Comparación de las cargas contaminantes entre el depilado “destructor” y el DC del pelo. Métodos y equipamiento del DC. Alternativas tecnológicas de reutilización de RP.

Aislamiento, identificación y screening de cepas fúngicas productoras de enzimas queratinolíticas a partir de suelos en los que habitan bóvidos, de especímenes clínicos y ambientales.

Selección de cepas fúngicas con actividad proteolítica de amplio espectro (especialmente queratinolítica) en base a criterios de no patogenicidad para el hombre, animales, plantas o el ambiente.

Optimización de los cultivos de cepas fúngicas seleccionadas para la producción de enzimas queratinolíticas. Caracterización del residuo pelo. Fermentación en sustrato sólido y en medio líquido en distintas condiciones (en presencia de agentes reductores, glucosa,

Enzimas queratinolíticas. Mecanismos de acción. Caracterización del pool enzimático de la cepa fúngica seleccionada en función de la actividad proteolítico-queratinolítica: pH óptimo, temperatura, fuerza iónica, sales metálicas y no metálicas, agentes reductores, tensioactivos. Estandarización de la actividad queratinolítica utilizando residuo pelo como sustrato. Clasificación del tipo de enzimas proteolíticas, identificación de proteasas mediante la técnica de la huella peptídica.

Mecanismos de degradación fúngica y enzimática del pelo. Observación morfológica por medio de Microscopía Electrónica de Barrido y de Microscopía Electrónica de Transmisión. Determinación del grado de hidrólisis mediante Espectroscopía Dieléctrica, contenido de cistina- cisteína.

Aplicación del pool enzimático fúngico a la piel bovina durante la etapa de ribera en tecnología del cuero. Evaluación histológica de los cambios morfológicos de la piel bovina mediante Microscopio Óptico y Microscopio Electrónico de Barrido.

1.10 Hipótesis

Existirían cepas fúngicas geofílicas en ambientales locales que presentarían capacidad biodeteriorígena-biodegradadora sobre el “residuo pelo” vacuno. Estos hongos podrían ser aislados mediante métodos de screening específicos y tendrían capacidad de crecer sobre la queratina del pelo como única fuente de carbono, nitrógeno, azufre y energía con el sólo agregado de sales minerales.

Estas cepas fúngicas al crecer sobre el “residuo pelo” generarían un conjunto de enzimas con actividad proteolítico-queratinolítica (con actividad proteolítica de amplio rango). A su vez estas enzimas podrían ser utilizadas en tecnología del cuero en los procesos de remojo, depilado y rendido.

1.11 Referencias bibliográficas

Aguyaro M., Garro L., Galarza B., Hours, R. (2020). Bokashi de un residuo proteico industrial en dos sistemas: tradicional y cerrado con aireación. En M. Filippini, S. Greco (Ed.), *Primer Congreso Argentino de Agroecología* (pp. 148-152). Mendoza, Argentina: Universidad Nacional de Cuyo, Secretaría de Ciencia, Técnica y Posgrado.

Alzate Tejada A. y Tobón Mejía O. (2004). Manual ambiental sectorial, proyecto gestión ambiental en la industria de curtiembre en Colombia. *Centro Nacional de producción más limpia y tecnologías ambientales*. Recuperado de <http://www.ingenieroambiental.com/4014/sectorial.pdf>.

- Buljan, J. y Král I. (2012). Hair-save liming process, cleaner leather technologies suitable for tanneries in developing countries. *United Nations Industrial Development Organization (UNIDO)*. Recuperado de https://leatherpanel.org/sites/default/files/publications-attachments/hair_save_lpm2012.pdf.
- Cantera, C. S. (2001). Hair saving unhairing process. Part 2. Immunization phenomenon. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 85, 47-51.
- COWI (Consulting Engineer and Planners AS). (1994). Cleaner production assessment in meat processing, Chapter I. *EPA, United Nations Environment Programme Division of Technology, Industry and Economics, Danish Environmental Protection Agency, Danish Ministry of Environment and Energy, Denmark*. Recuperado de <http://www.unep.fr/shared/publications/pdf/2482-CPmeat.pdf>.
- Crispim, A., Mota, M. (2003). Unhairing with enzymes, *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 87, 198-202.
- De Rosa-Giglio, P., Fontanella, A., Gonzalez-Quijano, G., Ioannidis, I., Nucci, B. Brugnoli, F. (2018). Product environmental footprint category rules, *Leather. Leather Pilot Technical Secretariat*, Recuperado de https://ec.europa.eu/environment/eussd/smgp/pdf/PEFCR_leather.pdf.
- Diario Perfil digital. (2019). *Sigue creciendo la producción de cueros*. Recuperado de <https://fortuna.perfil.com/2018-11-12-201017-sigue-creciendo-la-produccion-de-cueros/>.
- EPA (Environmental Protection Agency). (2000). Principles of Pollution Prevention and Cleaner Production. An international training course. Participant's manual. *United States Environmental Protection Agency*.
- Frendrup W. (1996), UNEP Cleaner Production, Industrial Sector Guide Leather Industry. *Engineering Environmental Department of Danish Technological Institute*.
- Frendrup, W. y Buljan J. (2000), Hair-save unhairing methods in leather processing, *United Nations Industrial Development Organization (UNIDO)*, *US/RAS/92/120*.
- Galarza, B., Cavello, I., Greco, C., Hours, R., Schuldt, M. y Cantera, C. (2010). Alternative technologies for adding value to bovine hair waste. *Journal of the society of Leather Technologists and Chemists*, 94 (1), 26-32.
- Galarza B., Garro L., Gortari C. y Hours R. (2021). Production and application of compost with high nitrogen content coming from an organic keratin waste,

- Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, 4 (4), 4918-4924.
- Hill, P., Brantley H. y Van Dyke M. (2010). Some properties of keratin biomaterials: kerateines. *Biomaterials*, 31, 585-593.
- Kamini, N., Sujiritha, P., Shakila, T., Saravanan, P. (2021). Microbial degradation of animal hair and preparation of organic thereof. En L. Zugno, *Proceeding book of abstracts*, XXXVI Congress Greening the Leather Value Chain, (pp. 27), Etiopía, África. Recuperado de <https://iulacsAfrica2021.allpi.int>.
- Kato E., Ramírez P., Valeriano Acevey W., Aguilar Ruiz B. y Rivera Trasgallo A. (2006). Manual de buenas prácticas ambientales para la curtiembre en Centroamérica. *Agencia de Protección Ambiental de los EEUU (EPA), CIATEC A.C.* Recuperado de <https://ecologiafacil.files.wordpress.com/2012/05/curtido.pdf>.
- Ley Nacional Argentina n°24.051, decreto n°831/1993. (1993). *Ley de Residuos Peligrosos*, Ministerio de la Nación Argentina.
- Sharma, S. y Kumar, A. (Eds.) (2019). Keratin as a protein biopolymer: extraction from waste biomass and applications. Cham, Suiza: Springer (Series on polymer and composite materials).
- Sofía, A., Cantera, C., Greco, A., Martegani, J., Di Tullio, L., Gudewort, A., Fernández, J. (2012). Industria del Cuero (pieles vacunas). En Instituto Nacional de Tecnología Industrial (Ed.), *Cuadernillo Técnico producción más limpia* (pp 32-33), Migueletes, Argentina: Editorial INTI.
- Takur S. y Balaram P. (2009). Characterization of alkali induced formation of lanthionine, trisulfides and tetrasulfides from peptide disulfides using Negative Ion Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 20(5), 783-791.
- Wise, W., Ballantyne, A., Covington, A. (2019). Sulfide unhairing: rethinking the received wisdom. XXXV IULTCS Congress, Proceeding book of abstracts, 228, Dresden, Alemania, 2019.

Capítulo 2

Aislamiento e identificación de cepas fúngicas queratinolíticas degradadoras del residuo pelo vacuno

Ensayos de actividad proteolítico-queratinolítica

2.1 Resumen

En este capítulo, con el propósito de alcanzar la biodegradación del “residuo pelo” bovino, se llevó a cabo el aislamiento y screening de cepas productoras de enzimas proteolíticas, queratinolíticas y colagenolíticas a partir del hábitat de bóvidos según los objetivos específicos del plan de tesis (sección 1.9).

Se obtuvieron extractos crudos fúngicos de las cepas seleccionadas, se desarrollaron y diseñaron protocolos de ensayos cuali-cuantitativos de actividad enzimática para medir actividad proteolítica, queratinolítica y colagenolítica a partir de los extractos enzimáticos.

A partir del aislamiento de cepas fúngicas geofílicas mediante la “Técnica del Anzuelo”, se seleccionó a *Trichophyton ajelloi* como la cepa fúngica cuyo extracto enzimático se iría a caracterizar, aislar e identificar en base a criterios de patogenicidad y factibilidad de cultivo evaluando sus posibles aplicaciones en tecnología del cuero.

2.2 Introducción

Con el objetivo de biotransformar el “residuo pelo” bovino mediante hongos queratinofílicos- queratinolíticos se aislaron especies fúngicas no patógenas del suelo local mediante la “Técnica del Anzuelo” (sección 2.3.1).

Diversos microorganismos como bacterias de los géneros *Bacillus*, *Vibrio*, *Serratia*, actinomicetes, hongos dermatofitos y otros géneros de hongos tienen la capacidad de degradar la queratina nativa en la naturaleza. Entre ellos: *Chrysosporium*; algunos ascomycetes, zigomycetes; deuteromycetes como *Acremonium* spp., *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Curvularia* spp., *Penicillium* spp., *Trichurus spiralis*, *Myrothecium verrucaria*, *Geotrichum* spp., *Ulocladium botrytis*, *Stachybotrys atra* (Friedrich, Gradišar, Mandin, y Chaumont, 1999) así como también las larvas de las polillas de la lana (*Tineola bisselliella* o *Tineola pellionella* (Waterhouse, 1957). Algunas especies son parásitos de tejidos queratinizados animales y humanos, causantes de dermatomicosis. Éstos incluyen dermatofitos antropofílicos y zoofílicos tales como *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton verrucosum* y el complejo *Trichophyton mentagrophytes*, entre otros, que pueden contagiarse al humano. Otros hongos queratinofílicos son los dermatofitos geofílicos y los llamados chrysosporia

cuyo nombre deriva del género *Chrysosporium*, son saprótrofos que viven en los detritos animales ricos en queratina del suelo (Bohacz, 2017; Rivas y Mühlhauser, 2015; Vidal, Ulfing, Valmaseda y Guarro, 1999).

2.2.1 Patogenicidad

2.2.1.1 Definición

La patogenicidad se puede definir, desde el punto de vista del parásito, como la capacidad de usar el medio del huésped como medio de crecimiento y de vencer sus mecanismos defensivos (Simpanya, 2000).

2.2.1.2 Rol de las enzimas en la patogenicidad

Las enzimas sintetizadas permiten la supervivencia del hongo en los distintos ambientes degradando proteínas, entre otros sustratos, para su nutrición. Sin embargo, el potencial patogénico de un hongo depende del tipo de enzima secretada (Monod *et al.*, 2002). Existen cepas patógenas para el hombre y animales como los géneros *Microsporium* y *Trichophyton* capaces de solubilizar proteínas fibrosas de la piel, pelo, garras y pezuñas. El rol de las enzimas en la patogenicidad ha sido inferido por su hallazgo en los tejidos infectados mediante técnicas histológicas (Minocha, Pasricha, Mohapatra y Kandhari, 1972). Sin embargo, la identificación de los factores de virulencia en el laboratorio está supeditada a la reproducción de las condiciones ambientales del huésped. El desarrollo del sistema genético IVET (tecnología de expresión *in vivo*, “*in vivo* expression technology”) permite mediante ingeniería genética la inducción de los genes de virulencia en el sistema huésped-bacteria. Por otro lado, mediante el aislamiento de algunos saprótrofos queratinolíticos de la piel humana y del pelaje y plumas animales, no siempre es posible mostrar cuáles son los responsables de las lesiones. Algunos estudios demuestran que la queratolisis probablemente no juega un rol crítico una vez que el micelio está establecido en la epidermis (Simpanya, 2000). Se han realizado avances en la determinación de los genes involucrados en la virulencia de *Trichophyton rubrum* utilizando técnicas de secuenciamiento genético mediante bibliotecas de cDNA (Wang *et al.*, 2006).

Las queratinasas producidas por los hongos dermatofitos son las enzimas que juegan un rol fundamental en el establecimiento de la infección de la piel y en menor medida las elastasas y proteasas (Siesenop y Böhm, 1995). Inyectadas intradérmicamente en la piel de los animales producen una respuesta de hipersensibilidad retardada (Weitzman y Summerbell, 1995). En la colonización del pelo y la piel, la acción de las queratinasas fúngicas provocan la infección aguda causada por *Microsporium canis* en perros y gatos (Viani, Dos Santos, Paula, Larson y Gambale, 2001). En la determinación cuantitativa de la actividad queratinolítica los sustratos cromogénicos son de utilidad (Kunert y Kasafirek, 1988). En otros casos como en *Candida* spp., otras enzimas como las fosfolipasas y aspartyl-proteasas además de las proteasas, serían las responsables de la infección dermatológica (Subha y Gnamani, 2009).

En el estadio intermedio entre el saprofitismo y el parasitismo vinculado al geófilo *Microsporium gypseum* estarían involucradas otras enzimas como lipasas, α -glucosidasas, fosfatasa alcalina, N-acetyl- β -glucosaminidasa (Przystas, Ulfig, Miksh y Kunert, 2003).

Por otro lado, la secreción de los distintos tipos de proteasas fúngicas implicadas en el establecimiento de la infección o en la producción de las reacciones eritematosas de la piel dependen de las condiciones del cultivo *in vitro* como el tipo de sustrato, la temperatura de incubación y del estadio del crecimiento (Apodaca y Mc Kerrow, 1989a).

Dentro de otros de los factores involucrados en la infección por *Trichophyton rubrum*, se puede mencionar el hallazgo de la presencia de un manano que produce un efecto supresivo sobre la inmunidad mediada por células (Blake, Dahl, Herron y Nelson, 1991).

2.2.1.3 Factores relacionados con el huésped

Existen factores de defensa propios del huésped como la temperatura corporal, el pH, los ácidos grasos, los inhibidores de serin-proteasas entre otros (Simpanya, 2000).

2.2.1.4 Evolución de los dermatofitos hacia la patogenicidad

Se postula que la queratina podría llegar a ser el hilo conductor en el recorrido de las especies de dermatofitos como saprófitos del suelo a parásitos del hombre o animales. Esta hipótesis fue enunciada por Vanbreuseghem, a mediados del siglo XX cuando puso a punto la “Técnica del Anzuelo” (Vanbreuseghem, 1952), demostrando la existencia de una flora dermatofítica existente en el suelo por un lado y el origen saprófito de los dermatofitos por otro. Los hongos queratinofílicos, saprófitos del suelo se desarrollarían en un principio a través de los detritos de la queratina del suelo (fragmentos de pelos, piel, cuernos, pezuñas, caparazones de insectos); luego de este sustrato selectivo pasarían fácilmente a la queratina perteneciente a un ser vivo como los animales y de ahí al hombre o directamente a este último. Esta adaptación se debe a fenómenos extrínsecos como la sucesiva exposición a su huésped e intrínsecos como factores de reconocimiento y virulencia propios del hongo (Chabasse, 2008).

Si la habilidad de un hongo para demoler las α -queratinas *in vitro* es de real significancia para predecir su habilidad de infectar *in vivo*, entonces todos los hongos queratinofílicos del suelo son potenciales patógenos (Filipello-Marchisio, 2000a). En este sentido se acepta en general que la habilidad de descomponer la queratina de la epidermis y sus anexos y utilizarla como la principal fuente de nutrición es una precondition del parasitismo en los tejidos queratinizados del huésped. Sin embargo, hay algunos hongos que se consideran fuertemente queratinolíticos (incluyendo algunos miembros del género *Microsporium* y *Trichophyton*) que casi nunca fueron encontrados como parásitos. En las especies parásitas, la habilidad queratinolítica debe

estar por lo tanto acompañada por otras adaptaciones a las condiciones prevalentes en la epidermis (Kunert, 2000).

El pasaje del estado micelial saprofito al levaduriforme (parasítico) en los hongos dimórficos requiere la presencia de compuestos con radicales sulfhidrilo SH- (Simpanya, 2000). Kunert (1992) postuló que las enzimas proteolíticas son más activas en presencia de agentes reductores y de sulfito ya que la reducción de los puentes disulfuro aumenta en un 20% la hidrólisis de la lana sulfitada.

2.2.1.5 Hongos queratinofílicos y queratinolíticos

La distinción entre hongos queratinofílicos y queratinolíticos es borrosa ya que se basa solamente en la habilidad de una especie fúngica para crecer, utilizar o destruir los sustratos queratínicos (Safranek y Goos, 1982) aunque otros criterios se basen principalmente en el desarrollo de patogenicidad. Los hongos saprófitos pueden ser oportunistas en la patogenia de onicomicosis u otras dermatomicosis (Martínez-Herrera, Arroyo-Camarena, Tejada-García, Porras-López y Arenas, 2015).

Diferentes autores coinciden en el significado de ambos términos. La denominación “queratinolítico” debe ser reservada para los microorganismos colonizadores que son realmente capaces de atacar y degradar la queratina. Los queratinofílicos los acompañan utilizando sólo los componentes no queratínicos de los sustratos o los productos de su descomposición (Przystas, Ulfig y Miksh, 2007). Muchos hongos saprófitos geofílicos son resistentes al actidione (cicloheximida) y son potenciales patógenos de animales y seres humanos (Ulfig, 2003). Kunert (2000) definió a los hongos queratinofílicos como aquellos cuyo hábitat natural son los sustratos queratínicos y hongos queratinolíticos a aquellos en los que la degradación de la queratina dura ha sido experimentalmente probada. Los hongos fuertemente queratinolíticos, débilmente queratinolíticos y los que degradan compuestos proteicos de los sustratos queratínicos (no-queratinas), no representan grupos separados. Se han encontrado cepas queratinolíticas no sólo dentro del Orden de los Onygenales (al cual pertenecen los dermatofitos, sección 2.2.1.7) sino también dentro de otros grupos taxonómicos como los Mucorales. Al mismo tiempo, dentro de una misma especie existen cepas con distinta capacidad queratinolítica, como por ejemplo con *Scopulariopsis brevicaulis*, en la que se han aislado cepas productoras y otras que no lo son (Filipello Marchisio, Curetti, Cassinelli y Bordese, 1991).

En cultivos de hongos “ubicuos” creciendo en medio líquido con queratina de pluma nativa como única fuente de C, N, S y energía, una tasa de degradación por debajo de 20% da cuenta de que el hongo es débilmente queratinolítico, pudiendo digerir el 5 a 10% del sustrato queratínico correspondiente a las “no queratinas” (aminoácidos libres, urea, fenoles, proteínas solubles, lípidos, hidratos de carbono, para el caso del pelo). En el caso de los hongos típicamente queratinolíticos como los dermatofitos geofílicos y el género *Chrysosporium* se demostró que solubilizaron totalmente la queratina nativa de la pluma en las mismas condiciones. Kornilowicz-Kowalska y Bohacz (2011a) clasificaron a los microorganismos que degradan

queratina en dos tipos. Los queratinolíticos verdaderos que degradan la queratina dura y la solubilizan y por otro lado, aquellos potencialmente queratinolíticos que actúan en la conversión de proteínas no-queratínicas que se encuentran junto a las queratinas duras del pelo, plumas, uñas y queratinas blandas (callus).

Por otro lado, la habilidad queratinolítica fue determinada de acuerdo al grado de adaptación al parasitismo. Diversos autores hallaron que especies antropofílicas degradaron la queratina dura lentamente. Se aceptó el concepto de que la habilidad de descomponer queratina de la epidermis y sus anexos y utilizarla como la principal fuente de nutrición es una precondition del parasitismo en los tejidos queratinizados del huésped. El hongo encuentra en los tejidos temperaturas supra-óptimas, bajo potencial acuoso, condiciones micro-aeróbicas, producción de CO₂, componentes del sudor y del sebo y factores de inmunidad específica y no específica que abarcan aún las capas muertas de la superficie corporal. A pesar de esto hay algunos hongos fuertemente queratinolíticos (miembros del género *Microsporum* y *Trichophyton*) que casi nunca fueron encontradas como parásitos (Kunert, 2000; Kornilowsky-Kowalska, Kitowski e Iglík, 2011b).

La aparición de determinadas especies puede darse por competición entre especies y por las condiciones ambientales que preponderen como pH y T° del suelo que pueden lisar dermatofitos adaptados a la vida parasítica. Por ejemplo, los dermatofitos geófilos *Microsporum gypseum*, *Trichophyton ajelloi* y *Trichophyton terrestre* son resistentes a la lisis mientras que los antropo y zoofílicos son sensibles. Cuando hay material queratínico en el suelo, aparecen primero aquellos géneros de hongos de crecimiento más rápido y nutricionalmente menos estrictos como *Fusarium*, *Penicillium* y otros pertenecientes al orden Mucorales. Junto a éstos aparecen otros que no compiten con los saprófitos por el mismo sustrato ya que son capaces de utilizar partes más refractarias del sustrato, como por ejemplo los hongos queratinolíticos *Microsporum cookei*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton ajelloi* y *Trichophyton terrestre*, pertenecientes a los dermatofitos (Simpanya, 2000).

Sin embargo, la distribución de algunos hongos depende de la cantidad de material queratínico disponible debido a la presencia del hombre, animales domésticos, aquellos atraídos por éstos o la fauna salvaje. Estos factores ecológicos o medioambientales serían más importantes que el pH, T° o altitud ya que estos hongos demuestran una amplia tolerancia hacia estos factores (Filipello Marchisio, 1991).

La mayor actividad queratinolítica corresponde a los dermatofitos y sus géneros relacionados: *Microsporum*, *Trichophyton*, *Aphanoascus*, *Chrysosporium*, *Geomyces*, *Gymnoascus*, *Malbranchea* y *Myceliophthora*, al mismo tiempo *Alternaria*, *Beauveria*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Scopulariopsis* (Filipello Marchisio, 2000a). Dentro de los dermatofitos geofílicos se distinguen tres grupos de especies de acuerdo a su patogenicidad: saprótrofas, representadas primariamente por *Trichophyton terrestre* y *Trichophyton georgiae*; a menudo patógenas como *Microsporum gypseum* y *Microsporum fulvum*;

ocasionalmente patógenas como *Microsporium cookei* y *Trichophyton ajelloi*. El enriquecimiento del suelo en queratina es el factor preponderante en la aparición y desarrollo de estos microorganismos. Existen otros factores propios del suelo como el alto contenido de humus, un pH alcalino débil o neutro y riqueza en carbonato de calcio (CaCO₃) (Bohacz, 2017).

Se han aislado además otro tipo de géneros que actúan en la destrucción del material queratínico como *Cunninghamella*, *Diheterospora*, *Fusarium*, *Gliocladium* y *Paecilomyces* cuyos roles biológicos comunes son la descomposición del follaje y tallos de plantas. La adquisición de infecciones por parte de estos géneros de hongos puede ser considerada como oportunista, ya que estos hongos no necesitan colonizar al hombre o a los animales para poder sobrevivir. En especial los géneros *Fusarium*, *Paecilomyces* y la especie *Conidiobolus coronatus* (*Entomophthora coronatus*) han sido reportados como patógenos en pacientes inmunocomprometidos (Simpanya, 1994; Deepa, Aparna, Joy y Sarojini, 2016).

2.2.1.6 Definición de dermatofitos

Los hongos dermatofitos son considerados como queratinolítico/filicos y constituyen un grupo ecológico importante que forma parte del ciclo del material proteico más estable y abundante de la tierra como son las queratinas provenientes de piel, cuero, escamas, uñas y cuernos de animales muertos. A medida que este material (especialmente la fibra animal) se descompone, estos hongos toman un rol importante en el ecosistema del suelo por un lado, pero también tienen una significancia higiénico-epidemiológica ya que algunos de ellos son patógenos de animales de sangre caliente. Las especies de este grupo, han sido divididas en tres grupos de acuerdo a sus hábitats naturales: antropofilicos, cuando los humanos son los hospedadores naturales, zoofilicos, hospedados en una variedad de animales y geofilicos, cuyos reservorios están en el suelo (Kacinová, Tančinová y Labuda, 2013; Emmons, 1934).

2.2.1.7 Clasificación taxonómica de los dermatofitos

Si bien no se conoce la fase sexual, perfecta o teleomorfo de la mayoría de estos hongos, se ha demostrado que son ascomicetos por distintas técnicas. Taxonómicamente se engloban en la división Ascomycota y pertenecen a la clase Plectomycetes, orden Onygenales y familia Arthrodermataceae. Actualmente un único género denominado *Arthroderma* incluye todas las especies de teleomorfos (Sykes y Outerbridge, 2014).

La taxonomía de los dermatofitos y su identificación rutinaria en el laboratorio de micología clínica se basa fundamentalmente en criterios morfológicos, macro y microscópicos, relacionados con la fase de reproducción asexual (fase imperfecta, anamorfo, mitospórico) de estos hongos. En la actualidad, aproximadamente unas 40 especies se encuentran incluidas en estos géneros (Cabañes Saénz, 2001). El número de especies se reduce a unas 30 cuando se consideran únicamente a las productoras de dermatofitosis o dermatomicosis (verdaderos dermatofitos) (Cabañes Saénz, 2001).

Estas especies no se suelen aislar con la misma frecuencia en todos los laboratorios, ya que existe una clara variabilidad climática, geográfica, socioeconómica, etc., que origina cambios en los patrones de distribución de los agentes etiológicos de las dermatofitosis. En efecto, tan sólo 10 especies se aíslan con una frecuencia elevada en la mayoría de los laboratorios de micología clínica humana, representando el 99% de los cultivos positivos: *Epidermophyton floccosum*, *Microsporium canis*, *Microsporium gypseum*, *Microsporium audowini*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton violaceum*, *Trichophyton schoenleinii*. De éstas, únicamente seis especies: *E. floccosum*, *M. canis*, *M. gypseum*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* y *T. tonsurans*, pueden llegar a ser las responsables de más del 90% de los casos. Algunos de estos dermatofitos (ej. *T. mentagrophytes*, *M. gypseum*) son en realidad complejos de especies (“species complex”) que incluyen distintas variedades o incluso grupos de especies (Cabañes Saénz, 2001).

Existen especies que presentan una morfología y situación taxonómica común con los dermatofitos, pero sin embargo no se han descrito como agentes etiológicos de dermatofitosis. En este caso no son consideradas como verdaderos dermatofitos y se les reservan denominaciones como “tipo dermatofito”, (“dermatophyte-like fungi”), dermatofitoides o congéneres de los dermatofitos según distintos autores. Ejemplos de estas especies son: *Epidermophyton stockdaleae*, *Microsporium cookei* y *Trichophyton (Keratinomyces) ajelloi* (Cabañes Saenz, 2001).

La clasificación clásica divide a los dermatofitos en tres géneros: *Trichophyton*, *Microsporium*, *Epidermophyton* a los que pertenecen las distintas especies con ciertas variaciones según los distintos autores (Tabla 2.1).

Tabla 2.1 Subdivisiones de género de dermatofitos, comparando las clasificaciones de Sabouraud, Vanbreuseghem *et al.* y Emmons, Ajello *et al.* (- = excluyendo *A. gypseum*; + = incluyendo *A. gypseum*) (Modificada por Vanbreuseghem, De Vroey y Takashio, 1978; Simpanya, 2000)

Sabouraud	Vanbreuseghem <i>et al.</i>	Emmons, Ajello <i>et al.</i>
<i>Epidermophyton</i> Lang, 1879	<i>Epidermophyton</i>	<i>Epidermophyton</i>
<i>Microsporium</i> Gruby, 1843	<i>Microsporium</i> (+ <i>Achorion gypseum</i>)	<i>Microsporium</i> (+ <i>A. gypseum</i>)
<i>Achorion</i> Remak, 1845	<i>Trichophyton</i> (- <i>A. gypseum</i>)	<i>Trichophyton</i> (- <i>A. gypseum</i>)
<i>Trichophyton</i> Malmsten, 1845		
endothrix	<i>Trichophyton</i>	<i>Trichophyton</i>
ectothrix megaspore	<i>Trichophyton</i>	<i>Trichophyton</i>
ectothrix microides	<i>Microides</i>	<i>Trichophyton</i>
Unknown	<i>Keratinomyces</i>	<i>Trichophyton</i>

Los recientes estudios moleculares han producido una revisión en la clasificación taxonómica. Los cuatro géneros anamórficos tradicionales de la familia Arthrodermataceae (Onygenales): *Trichophyton*, *Microsporium*, *Epidermophyton* y *Chrysosporium*, no son todos ellos monofiléticos. Por ejemplo, en los árboles

filogenéticos de diferentes secuencias de ADN las especies de *Trichophyton* se acomodan dentro de los clados formados por especies de *Microsporium* y *Epidermophyton*. Además, algunas especies de *Chrysosporium* se agrupan con los *Trichophyton* geófilos, situados filogenéticamente distantes de *Chrysosporium merdarium*, la especie tipo de *Chrysosporium* (Guarro, 2012).

Importantes cambios taxonómicos también se han producido en el complejo *Arthroderma vanbreuseghemii*. En la actualidad, tres anamorfos de distribución mundial se asocian con este complejo: *Trichophyton tonsurans*, *T. equinum* y *T. interdigitale*. La primera especie es antropofílica, *T. equinum* es responsable de infecciones en equinos y *T. interdigitale* es la única especie de dermatofitos que presenta heterogeneidad desde un punto de vista ecológico ya que incluye tanto cepas antropofílicas como zoofílicas (Guarro, 2012; Sybren de Hoog *et al.*, 2017). Ejemplos de las diferentes especies de dermatofitos sinonimizadas se detallan en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2 Especies de dermatofitos recientemente sinonimizadas (Guarro, 2012)

Especie aceptada	Sinónimos
<i>Arthroderma fulva</i> / <i>Microsporium fulvum</i>	<i>Keratinomyces longifusus</i> , <i>M. boulardii</i> , <i>M. ripariae</i>
<i>Arthroderma grubyi</i> / <i>Microsporium gallinae</i>	<i>M. vanbreuseghemii</i>
<i>Arthroderma gypseum</i> / <i>Microsporium gypseum</i>	<i>M. appendiculatum</i>
<i>Arthroderma uncinata</i> / <i>Trichophyton ajelloi</i>	Todas las variedades de <i>T. ajelloi</i> , <i>Epidermophyton stockdaleae</i>
<i>Microsporium audouinii</i>	<i>M. langeronii</i> , <i>M. rivalieri</i>
<i>Microsporium canis</i>	<i>M. distortum</i> , <i>M. equinum</i>
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>quinckeanum</i> , <i>T. langeronii</i> , <i>T. sarkisovii</i>
<i>Trichophyton equinum</i>	Todas las variedades de <i>T. equinum</i>
<i>Trichophyton erinacei</i>	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>erinacei</i>
<i>Trichophyton interdigitale</i>	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>goetzii</i> , <i>interdigitale</i> , <i>mentagrophytes</i> , <i>nodulare</i> , <i>granulosum</i> , <i>T. kradjenii</i> , <i>T. verrucosum</i> var. <i>autotrophicum</i>
<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>T. fischeri</i> , <i>T. kanei</i> , <i>T. raubitschekii</i> , <i>T. soudanense</i> , <i>T. gourvilii</i> , <i>T. megninii</i>
<i>Trichophyton verrucosum</i>	Todas las variedades de <i>T. verrucosum</i>
<i>Trichophyton violaceum</i>	Todas las variedades de <i>T. violaceum</i> , <i>T. yaoundei</i>

Debido al pleomorfismo, la variabilidad cultural y la superposición de características morfológicas de los dermatofitos, el estudio fenotípico a veces no es suficiente para una correcta clasificación taxonómica. Por ello se recurre a técnicas moleculares como el análisis comparativo de ADN mediante PCR fingerprinting, determinación de antígenos serológicos, composición de ácidos grasos, isoelectroenfoco de proteínas enzimáticas. Además de los estudios macro y micromorfológicos se pueden utilizar técnicas bioquímicas y fisiológicas como: perforación del pelo *in vitro*, requerimientos nutricionales en medios selectivos, producción de ureasa para la diferenciación entre *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* (Simpanya, 2000; Tartabini, Bonino, Racca y Luque, 2013).

2.2.1.8. Técnicas de aislamiento de hongos queratinofílicos y queratinolíticos a partir de muestras de suelo

Técnica del Anzuelo:

El suelo, junto con los detritos de animales y plantas que se encuentran en él, es un reservorio continuo e inagotable de hongos queratinofílicos y en especial de dermatofitos debido a que constituye el hábitat de su vida saprofítica (Jatoth, Mangilal y Junapudi, 2016). Sabouraud ya en 1910 afirmaba que la falla en reconocer el tipo de hongos que se encuentran en el suelo era debido a las técnicas de aislamiento (Simpanya, 2000).

Los suelos urbanos son reservorios de hongos queratinolíticos y alergénicos en mayor medida que los rurales (Marfenina, 2004). A su vez, son indicadores de contaminación ambiental y de riesgo patogénico asociado (Ulfig, 2000). Sin embargo, se ha demostrado que hongos geofílicos queratinofílicos ejercen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de especies queratinolíticas patógenas (Ulfig, 1996).

La introducción del “Método del Anzuelo” por Vanbreuseghem, se convirtió en un método standard para el aislamiento de hongos de suelo tanto queratinofílicos como queratinolíticos (De Clerq y De Vroey, 1981; Deschmukh y Verekar, 2012). La técnica ha establecido la fuente de algunas infecciones como las producidas por dermatofitos tales como *Microsporum gypseum* y su teleomorfo fundamental cuando se reportó el descubrimiento del estado sexual *Nannizzia* (Aceituno, Fuguet y Yegres, 1988).

Existen variaciones al método de Vanbreuseghem como por ejemplo la introducción del método To-ka-va (Sharma, Chandra y Sharma, 2012).

Para poder aislar los distintos grupos de hongos se recurre a distintos tipos de muestreo y procesamiento del suelo. Simpanya (2000) menciona que la muestra se puede tomar removiendo la capa más superficial a 10 mm de superficie de las capas inferiores si se quieren aislar hongos queratinolíticos.

Existen variables en la cantidad de muestra de suelo a analizar, aunque en general no se especifica en la bibliografía. Por ejemplo, el tamaño de la placa de Petri utilizada condiciona el tamaño de la muestra. Algunos autores han usado sub-muestras únicas de 40-50 g por placa de Petri (Simpanya, 2000; Ulfig, 2003).

Una vez que las muestras fueron obtenidas existen variaciones en cuanto a las condiciones de mantenimiento hasta su procesamiento, que dependen del tipo de detrito y los distintos tipos de comunidades fúngicas a aislar. Pueden ser procesadas en el día o almacenadas a distintas temperaturas: en frío (0°C–4°C), a -20°C, a la misma temperatura de la recolección, aunque no se han hecho estudios de esta variable sobre la tasa de muerte de microorganismos.

Tanto el suelo estéril como el fértil constituyen un medio de cultivo apropiado que puede mantener la viabilidad fúngica. En el primero, los hongos han permanecido

viabiles por 1 a 4 años (Bakerspigel, 1953); en el segundo demostró ser tan satisfactorio como el agar Sabouraud para mantener algunos hongos tales como *Epidermophyton floccosum*.

En otros casos se han probado técnicas de enriquecimiento previo del suelo mediante el agregado de algún sustrato queratínico pero concluyen que puede aparejar una falsa impresión del balance de los hongos queratinolíticos inicialmente presentes en el suelo (Rebell y Taplin, 1978).

Se han utilizado diferentes materiales queratínicos como anzuelo: plumas de pollo, lana de oveja, pelo humano, pelo de caballo, púa de erizo, pelo de cobayo, mezcla de pelo humano, caballo, pluma de pollo, uñas de seres humanos (Simpanya y Baxter 1996; Simpanya, 2000; Ramadan e Ismael, 2011; Kumar, Mishra, Maurya y Sahu, 2013; Indira 1968; Khan y Bhaudaria, 2018; Singh, 1997) y plantas atacadas por fitopatógenos (Avanzato y Rothrock, 2010).

En relación a la temperatura y tiempo de incubación del ensayo propiamente dicho existen variaciones. En general las placas se incuban a temperatura ambiente, aunque el rango puede oscilar entre 23°C a 45°C y el tiempo, entre 15 días hasta 4 meses (Ulfig, 2003).

La relación entre cada tipo de sustrato queratínico de diferente composición y el requerimiento nutricional específico para cada género y especie fúngica *in vitro* no son bien conocidas (Simpanya, 2000).

Otras técnicas de aislamiento de hongos queratinofílicos como la “técnica del cepillado de pelo” o “Hair brush technique” usada para aislamiento de animales portadores de dermatofitos no fueron utilizadas en el presente trabajo de tesis ya que las especies fúngicas no debían presentar patogenicidad manifiesta en el ser humano o animales (Ali-Shtayed, 2013; Katoh, Sano y Kagawa, 1990).

2.3. Aislamiento de hongos queratinolíticos y queratinofílicos de suelo

2.3.1. Materiales y métodos

Se procedió a recolectar tierra del horizonte superficial (0-15 cm) de los siguientes corrales: caballos (I) y bovinos (II) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP y de bóvidos del Zoológico de la ciudad de La Plata: yak (III) (*Bos mutus* o *Bos grunniens*, bóvido de gran tamaño y pelaje lanoso proveniente del Asia Central y del Himalaya, emparentados con la vaca doméstica), cervicapra (IV) (*Antilope cervicapra*, mamífero artiodáctilo de la familia Bovidae que se encuentra en la India, Pakistán y Nepal) y eland (V) (*Taurotragus derbianus*, Gray 1847, bóvido de gran tamaño proveniente del Asia) (Galarza, Goya, Cantera, Garro, Reinoso y López, 2004). Se midieron el pH, con pH-metro digital (Mettler-Toledo GmbH, Switzerland) y la conductividad con un equipo portátil de medición multiparamétrico marca Hanna a partir de un extracto acuoso de tierra al 25% P/V en agua bidestilada de conductividad 0,1 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Garro, Galarza, Sarmiento, Greco y Hours, 2015). Las muestras se

procesaron en el día o en su defecto se guardaron refrigeradas a 4°C hasta no más de una semana.

La técnica utilizada para el aislamiento de hongos queratinofílicos y queratinolíticos a partir de muestras de suelo fue la “Técnica del Anzuelo” (TDA) (Vanbreuseghem, 1952; Vanbreuseghem, De Vroey y Takashio, 1978; Ulfig, 2003; Ulfig, Plaza, Markowska- Szczupak, Janda K. y Kirkowska, 2010).

El material queratínico usado como anzuelo fue “pelo humano” estéril (PHE) y “residuo pelo” estéril (RPE). Para el PHE se utilizó pelo de niño. El RPE fue obtenido a partir de un depilado conservador del pelo a base de sulfuro de sodio y cal (del área ribera en el proceso de curtido de piel bovina), lavado con agua y tensioactivo aniónico en una proporción pelo: tensioactivo 1:5 p/v a 45°C durante 30 min. Ambos materiales fueron esterilizados en autoclave a 120°C, 1 atm, 15 min.

Como se muestra en la Figura 2.1, se colocaron 50 g de las distintas clases de tierra (I a V) (por duplicado) sin esterilizar en placas de Petri. En sendas placas se agregó 200 mg de PHE (muestra control) y 200 mg de RPE (muestra problema) (Deshmukh *et al.*, 2012).

Se humedecieron las placas con 10 ml de agua destilada estéril y se incubó en estufa a 28°C en cámara húmeda por un tiempo que osciló entre 7 a 30 días durante el cual se analizó el crecimiento visible sobre el material queratínico (Vidyasagar, Hosmani y Shivkumar, 2005), realizándose los ensayos por triplicado.

A partir de las regiones de las placas donde hubo desarrollo visible sobre el sustrato queratínico se tomaron muestras con ansa de tres lugares distintos y se resuspendieron en 10 ml de agua destilada estéril (Ali-Shtayed y Jamous, 2000). Luego se tomaron 100 µl de esta suspensión y se sembraron en placas con Agar Glucosa Sabouraud (AGS) adicionado con cloranfenicol 0,5 g/l (para aislamiento de hongos en general) y en AGS adicionado con cloranfenicol 0,5 g/l y cicloheximida 0,5 g/l (para aislamiento de dermatofitos), esparciendo con espátula de Drigalsky. Las placas se incubaron por un período de entre 7 a 15 días a 28°C.

Se analizó el crecimiento de las distintas colonias de acuerdo a sus características macroscópicas (aspecto, tamaño, color, textura) y se las clasificó en: crecimiento bacteriano, crecimiento levaduriforme, crecimiento tipo mohofilamentoso. Se identificaron mediante claves taxonómicas por la técnica del microcultivo y su observación microscópica (Barnett y Hunter, 1998; Cabañes Sáenz, 2001; Carmichael, Bryce Kendrick, Connors, y Sigler, 1980; Guarro, 2012; Kurtzman y Fell, 1998; Nelson, Tousson y Marasas, 1983; Tartabini *et al.*, 2013; Weber y Pitt, 2000), se realizaron tinciones especiales, pruebas bioquímicas y test de perforación del pelo *in vitro* (Ajello y Georg, 1957).

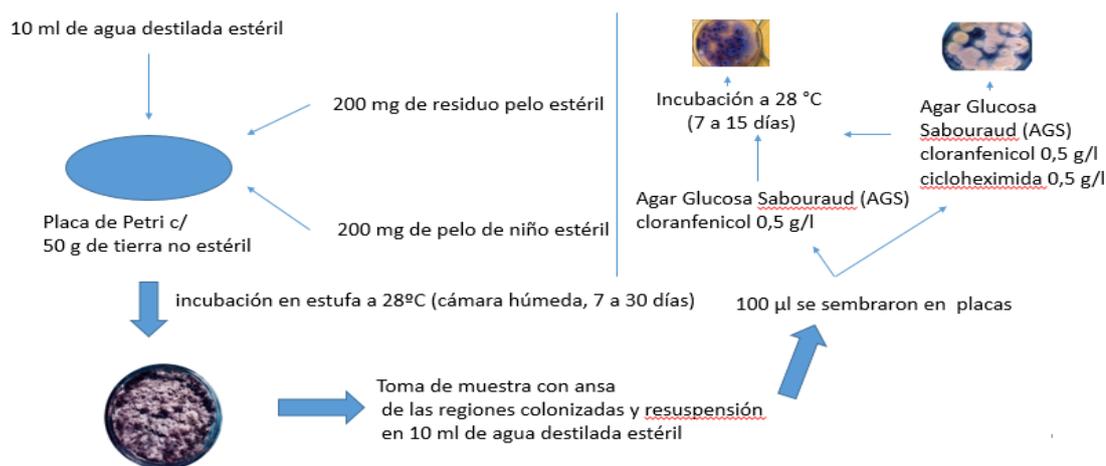


Figura 2.1. Esquema de la Técnica del Anzuelo

2.3.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización física de las muestras de suelo

En la Tabla 2.3 se aprecia el pH de los distintos suelos que se encuentran en valores cercanos a la neutralidad, oscilando en un rango de 7,38-6,73. La conductividad eléctrica (CE), salvo para el caso del hábitat de *eland*, resultó con valores inferiores en relación a los valores óptimos para su utilización como compost según la normativa del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (4 mS/cm) (Senasa, 2010) por lo que estas muestras de suelo pueden ser un sustrato apto para el desarrollo de microorganismos.

Tabla 2.3. pH y conductividad eléctrica de los suelos de los distintos hábitats de animales utilizados para la técnica del anzuelo

Hábitat	pH	cond. eléct.(µS/cm)
<i>caballo</i>	7,26	13
<i>bovino</i>	7,32	14
<i>yak</i>	6,85	32
<i>cervicapra</i>	6,73	36
<i>eland</i>	7,38	128

Aislamiento e identificación de especies fúngicas en las muestras de suelo

Las especies halladas a partir del aislamiento e identificación del crecimiento sobre el material queratínico mediante la “Técnica del anzuelo” fueron las que se muestran en la Tabla 2.4, expresadas como la frecuencia relativa. Se define la frecuencia relativa como el número de aislamientos de cada especie fúngica en relación al número de aislamientos totales en cada sustrato queratínico usado de anzuelo; la

frecuencia total como el número de aislamientos de cada especie fúngica en relación al número de aislamientos totales en ambos sustratos. El suelo donde se produjo el mayor número de aislamientos fue el hábitat de *yak*, mientras que la mayor diversidad de especies se encontró en el establo de *caballos* y en el de *yak*.

Tabla 2.4. Frecuencia relativa (FR%) de aparición de las especies fúngicas aisladas de suelo de distintos corrales por la técnica del anzuelo usando como sustratos PHE y RPE como anzuelo y la frecuencia total (FT%) de aparición de la especie fúngica en ambos sustratos.

Especie fúngica	Corral		Caballos		bovinos		Yak		Eland		Cervicapra		FT %
	PHE	RPE	FR%	FR%	FR%	FR%	FR%	FR%	FR%	FR%	FR%		
<i>Aspergillus spp.</i>	-	6,6	-		-	-	-	-	-	-	-	-	3
<i>Bothryotrichum Spp.</i>	-	6,6	-	6,6	-	-	-	-	-	-	-	-	6
<i>Vanrija humicola</i> (Dasz.) R.T.Moore (1980) ^I	5,5	-	-	-	-	-	-	-	5,5	-	-	-	6
<i>Cephalosporium spp.</i>	5,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
<i>Fusarium chlamydosporum</i> Wollenw.& Reinking (1925) ^{II}	-	-	-	-	11	13	11	-	-	-	-	-	18
<i>Fusarium oxysporum</i> Schltdl., Fl.berol (Berlin) (1824) ^{III}	-	6,6	-	20	22	-	-	13	-	-	-	-	30
<i>Metarhizium spp.</i>	-	-	-	-	-	20	-	-	-	-	-	-	9
<i>Nannizzia gypsea</i> (E.Bodin) Guiart & Grigoraki (1928) ^{IV}	5,5	-	11	-	-	-	11	-	-	-	-	-	15
<i>Trichophyton ajelloi</i> (Vanbreus) Ajello (1968) ^V	-	-	5,5	-	5,5	6,6	-	-	-	-	-	-	9

[I,II,III,IV,V] nomenclatura actualizada según <http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>

^IEquivalente a *Candida humicola*, según <http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp> (Moore, 1980)

Macromorfología de las colonias

A modo de ejemplo se muestra la macromorfología típica de las colonias de dos de las especies halladas, *Nannizzia gypsea* (en Agar Sabouraud) (Figura 2.1) y *Fusarium chlamydosporum* (en agar papa dextrosa) (Figura 2.2).

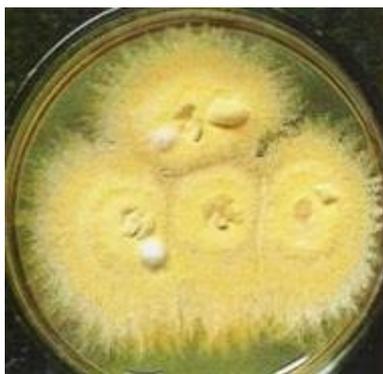


Figura 2.2 *Nannizzia gypsea* ,
macromorfología de la colonia
(Refai, El-Yazid y El-Hariri,
2013)



Figura 2.3 *Fusarium
chlamydosporum*,
macromorfología de la colonia
(Siddiquee, Yusuf, Zainudin,
2010)

Se hallaron especies reportadas como queratinolíticas tales como *Nannizzia gypsea* (anteriormente *Microsporium gypseum*) (Sharma, Sharma y Mohan Rao, 2011) y *Trichopyton ajelloi* (Ajello 1968; Kačínová, Tančínová y Medo, 2014), que pertenecen a los dermatofitos, de hábitat natural geofílico. El tipo de hábitat y el tipo de queratina que predomina en el mismo condicionan la frecuencia de hallazgo de estas especies (Kornilowicz- Kowalska *et al.*, 2011b; Przystas *et al.*, 2003). Las demás especies saprófitas halladas como *Fusarium oxysporum* (Kumar y Kushwaha, 2014), *Fusarium chlamydosporum* (Nosratabadi *et al.*, 2017), *Aspergillus* spp. (Sharma *et al.*, 2011), *Candida* spp. (Meyers y Ahearn, 1977; Duarte *et al.*, 2011; Vermelho *et al.*, 2009; Nogueira De Melo *et al.*, 2007), *Botryotrichum* spp. (Singh, 2014), *Cephalosporium* spp, (Oleniacz y Pisano, 1968; Tsuchiya, Arai, Seki y Kimura, 1987) y *Metarhizium* spp. (Gato-Cárdenas, Márquez-Gutiérrez, Baró-Robaina y Calle-Osorno, 2017) han sido reportadas como queratinofílicas o proteolíticas.

En relación a la frecuencia de aparición o aislamiento, las más altas fueron *Fusarium oxysporum* y *Fusarium chlamydosporum*, seguidas por *Nannizzia gypsea* . El género *Fusarium* suele ser el que se encuentra más comúnmente en suelos en cultivos activos o que han sido cosechados (Sánchez, 2015; Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de plagas, 2015). La especie *Microsporium gypseum* ha sido aislada frecuentemente en hábitats de aves (Kornilowicz-Kowalska *et al.*, 2011b).

2.4 Ensayos preliminares de actividad queratinolítica para la caracterización de los extractos crudos

En esta sección se presentaron como objetivos desarrollar y diseñar protocolos de determinación cuali y cuantitativa de actividad queratinolítica- colagenolítica en extractos crudos fúngicos.

2.4.1 Materiales y métodos: ensayo cualitativo de actividad queratinolítica

El medio sólido en placa de AGS adicionado con cicloheximida, cloranfenicol y caseína es de utilidad como screening de hongos productores de proteasas (Gortari, Galarza, Cazau, Hours, 2008). Sin embargo, en los casos en que los hongos en estudio no produzcan exoenzimas o sus enzimas no difundan en el agar, los resultados pueden conducir a conclusiones erróneas (Muhsin, Aubaid, y Al-Duboon, 1997). Por esta razón se utilizó el método del cultivo fúngico con un sustrato queratinolítico cromogénico en medio líquido.

2.4.1.1 Selección de las cepas fúngicas

Se utilizaron las siguientes cepas fúngicas aisladas con la técnica del anzuelo (2.4.1.2): *Trichophyton ajelloi* (TA) (aislada del corral de yak), *Fusarium oxysporum* (FO) (aislada del corral de yak), y *Nannizzia gypsea* (MG) (aislada del corral de bovinos). Además, se utilizó una cepa clínica de *Scopulariopsis* spp. (aislada en la Cátedra de Micología Médica e Industrial de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP a partir de un paciente con onicomicosis de miembro superior).

2.4.1.2 Preparación del inóculo fúngico

A partir de cultivos en AGS pico de flauta (tubos de 15 cm x 1,5 cm, capacidad 25 ml) de 7 días de incubación se prepararon suspensiones mediante el hisopado de la superficie y su posterior descarga en 10 ml de agua destilada estéril (Espinel-Ingroff 2001, Pfaller, Burmeister, Bartlett y Rinaldi, 1988). La densidad óptica de la suspensión fue comparable a la del tubo n°3 de Mac Farland (equivalente a 9×10^8 células bacterianas). Con 500 μ l de esta suspensión se inoculó un medio de Caldo Glucosa Sabouraud en un tubo de 25 ml con tapa a rosca y se incubó durante 1 mes a 28°C hasta la aparición de un colchón fúngico.

2.4.1.3 Ensayo cualitativo con sustrato azul de queratina

El azul de queratina (AQ) o keratin azure es un sustrato cromogénico queratínico comercial sólido (Sigma Chemical Co, St Louis MO, USA) en el cual la lana de oveja es impregnada con el colorante Azul Brillante de Remazol R. El sustrato es altamente resistente a la desnaturalización y degradación por las proteasas comunes, pero específicamente degradado por las queratinasas (Okoroma, 2012; Scott y Untereiner, 2004) que al ser clivado libera péptidos y aminoácidos coloreados.

I.- Medio mineral suplementado con peptona y tiamina

El colchón fúngico se lavó con agua destilada y luego se le agregó a cada tubo tapa a rosca, 5 ml de medio mínimo mineral cuya composición fue 10 g/l de peptona, 0,5 mg/l de $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,46 g/l de KH_2PO_4 , 1 g/l de K_2HPO_4 , 100 μ g/l de tiamina-HCl, pH 7,4 (MMPT) (Apodaca *et al.*, 1989) esterilizado en autoclave a 120°C durante 15 min y agregado posterior de 0,5 g de AQ estéril.

Se incubó a 28°C en oscuridad en forma estática durante 3 semanas (Meevootison y Niederpruem, 1979). Luego de este período se procedió a una lectura visual-macroscópica comparando con un blanco sin colchón fúngico.

II.- Agregado de medio mineral mínimo (MMM)

El mismo colchón fúngico utilizado con MMPT se procedió a lavarlo con agua destilada estéril y se agregaron 5 ml de un medio mineral mínimo (MMM) estéril cuya composición fue: 0,496 g/l de NaH₂PO₄, 2,486 g/l de K₂HPO₄, 0,02 g/l de MgCl₂.6H₂O, 0,016 g/l de FeCl₃, 0,013 g/l de ZnCl₂, 0,5 g/l de Cloranfenicol, pH 7,4 (Ruffin, van Brussel, Biguet y Biserte, 1979).

Según Ruffin, este medio desprovisto de hidratos de carbono tiene la capacidad de ser inductor de la queratinolisis o de la expresión de las queratinasas (Ragot, 1967a; Ragot 1967b; Ruffin *et al.*, 1979). Se incubó a 28°C durante 15 días sin agitación.

2.4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I. Observación cualitativa

En el caso de los tubos inoculados (secciones 2.4.1.3.I) no se produjo cambio apreciable de color en el medio líquido ni en el sustrato AQ para ninguno de los cultivos de las cinco cepas con respecto al blanco (Figura 2.3).

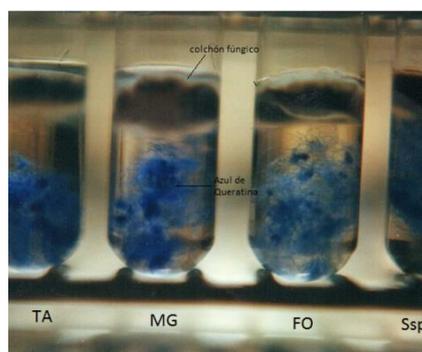


Figura 2.4. Ensayo cualitativo con AQ; colchón fúngico de las cepas (región superior) y sustrato AQ (región inferior): *Trichophyton ajelloi*, *Nannizzia gypsea*, *Fusarium oxysporum* y *Scopulariopsis* spp.

La falta de aparición del color azul en el medio líquido puede deberse a que no se expresaron las enzimas queratinolíticas o que a simple vista no puede apreciarse. Algunos autores sostienen que el agregado al medio mineral de compuestos proteicos o que aporten nitrógeno o carbono fácilmente metabolizables como son la peptona o la tiamina-HCl inhibe la expresión de queratinasas (Meevootison *et al.*, 1979; Ruffin *et al.*, 1979).

II. Observación cualitativa:

En relación a la sección 2.4.1.3.II, al igual que en el caso del punto I, no se

apreció cambio de color en el medio líquido ni en el sustrato azul de queratina en ninguno de los cultivos de las cinco cepas con respecto al blanco. Además de los motivos citados, el cultivo puede haber detenido su crecimiento y por ende la expresión de sus enzimas.

2.4.3 Ensayos cuantitativos de actividad queratinolítica y colagenolítica

2.4.3.1 Materiales y métodos

I. Reactivos y soluciones

Para el cultivo de las cepas se utilizó “residuo pelo” (RP), provisto por la curtiembre Gibaut SA (Buenos Aires, Argentina), obtenido a partir de un depilado conservador del pelo a base de sulfuro de sodio y cal durante el proceso de curtido de piel bovina. El RP fue lavado con agua y tensioactivo aniónico en una proporción pelo: tensioactivo 1:5 a 45°C durante 30 min y secado a 40°C durante 3 días consecutivos en estufa con circulación de aire y molido en procesadora Moulinex (La Moulinette D 56, Cormelles le Royal France). Posteriormente se lo tamizó en tamiz de 850 µm (mesh 20) (Núñez, 2008) y la fracción retenida se esterilizó en autoclave 20 min 121°C.

El medio mineral utilizado fue MMPT, descrito en la sección 2.4.1.3.I. Para las reacciones enzimáticas se utilizó buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8,5.

II. Elección de las cepas

Se utilizaron las mismas cepas que en el ensayo anterior (sección 2.4.1.1).

III. Preparación del inóculo

El procedimiento fue el mismo que el descrito en la sección 2.4.1.2.

IV. Cultivo en medio líquido sumergido (batch)

Los cultivos en medio líquido (CML) se realizaron en Erlenmeyers de 250 ml con 100 ml de MMPT (2.4.1.3) y 1% P/V de RP como sustrato inductor. El conjunto se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min (Galarza *et al.*, 2012). Posteriormente se inocularon con 500 µl de la suspensión de conidios del inóculo fúngico, se incubaron a 28°C en cuarto estufa y se agitaron en agitador orbital (Agitador de Kline, Vicking SA, Buenos Aires, Argentina) a 50 rpm durante 30 días (Apodaca *et al.*, 1989). Una vez finalizada la incubación, se midieron los pHs y se obtuvieron los extractos crudos (EC) mediante filtración en vacío con membrana de 0,22 µm en baño de hielo, se fraccionaron y se conservaron a -20°C.

V. Determinación de actividad queratinolítica frente a Azul de Queratina

La medida de actividad queratinolítica se llevó a cabo en tubos de ensayo con base plana y buzo magnético. En la mezcla de reacción se colocaron: - sustrato AQ al 0,25% (P/V); - 3,8 ml de buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8,5; - 200 µl de EC. Se incubó a 37°C durante 18 h en equipo de agitación magnética individual (Variomag

Electronicrührer, Alemania). La reacción se detuvo por filtración en filtro de papel Whatman grado 41. La absorbancia del filtrado se determinó a 595 nm. El blanco de reacción se realizó agregando el extracto crudo en baño de hielo a la mezcla y filtrando, sin incubación previa.

La unidad de actividad U_{AQ} se definió como aquella cantidad de enzima que en las condiciones del ensayo produjo un cambio de 0,001 unidades de absorbancia a 595 nm por hora y por cada ml de extracto (Cantera, Goya, Galarza, Garro y López, 2003). Los resultados se expresaron en unidades de actividad específica (U_{AQ}/mg) en relación a la concentración proteica en mg/ml.

VI. Determinación de actividad colagenolítica frente a Azul de Polvo de Piel

El azul de polvo de piel o hide powder azure (APP) es un sustrato cromogénico comercial sólido en base a polvo de piel bovina (colágeno dérmico) unido covalentemente al colorante azul brillante de Remazol R (Sigma Chemical-Co, St. Louis, MO USA). La razón para la utilización de este sustrato se basa en que la aplicación de enzimas a la tecnología del cuero, en especial en el depilado de las pieles, es indispensable que los extractos enzimáticos tengan una baja actividad frente a este sustrato. La acción de las enzimas puede deteriorar la calidad del colágeno de la dermis, especialmente la superficie de la capa flor. La erosión de esta capa produce su pérdida y la aparición de una “doble flor”, disminuyendo la calidad del cuero (sección 6.8.2).

Técnica enzimática

En la mezcla de reacción se colocaron: - sustrato APP al 0,25% (P/V); - 3,8 ml de buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8,5; - 200 μ l de EC. Se incubó a 37°C durante 3 h en baño termostático con agitación magnética individual (Stirring Drive Unit, H+P Labortechnik GMBH, Munich, West Germany). La reacción se detuvo por filtración en filtro de papel Whatman grado 41. La absorbancia del filtrado se determinó a 595 nm. El blanco de reacción se realizó agregando el extracto crudo en baño de hielo a la mezcla y filtrando, sin incubación previa.

La unidad de actividad APP (U_{APP}) se definió como la cantidad de enzima que bajo las condiciones de reacción produjo un incremento de 0,01 Abs_{595 nm} por hora y por ml en las condiciones del ensayo (Cantera *et al.*, 2003; Cantera, Goya, García y Sofia, 1999). Los resultados se expresaron en unidades de actividad específica (U_{APP}/mg) en relación a la concentración proteica en mg/ml.

VII. Determinación de concentración proteica

Fue determinada por el método de Lowry (Lowry, Rosebrough, Farr y Randall, 1951).

2.4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayos cuantitativos de actividad queratinolítica y colagenolítica

En la Tabla 2.5 se muestran el pH, las actividades queratinolíticas y colagenolíticas específicas de los EC de los cultivos en medio líquido de las distintas especies fúngicas testeadas.

Tabla 2.5. pH de los medios de cultivo, actividades queratinolíticas específicas (U_{AQ}/mg de proteína) y actividades colagenolíticas específicas de los EC (U_{APP}/mg de proteínas)

Cepa fúngica	pH	U_{AQ}/mg	U_{APP}/mg
<i>Fusarium oxysporum</i>	9,09	1,6	24
<i>Nannizzia gypsea</i>	9,13	1,57	4,21
<i>Scopulariopsis spp.</i>	8,96	2,5	72,5
<i>Trichophyton ajelloi</i>	9,11	0,47	3,81

En el análisis de los resultados se observó que todas las cepas alcalinizaron el medio y demostraron actividades dosables tanto queratinolíticas como colagenolíticas. *Scopulariopsis spp.* presentó los máximos valores para ambas actividades, lo que puede estar relacionada con su patogenicidad como agente causal de onicomycosis. *Fusarium oxysporum* presentó una alta actividad colagenolítica por lo que no sería aplicable a los procesos industriales donde se busca preservar el colágeno. *N. gypsea* y *T. ajelloi* presentaron los menores valores para ambas actividades. La posible aplicación tecnológica de *N. gypsea* se descarta ya que se trata de una especie patógena (Martínez, Ameen, Tejada y Arenas, 2014).

2.5 Producción de enzimas queratinolíticas de cepas seleccionadas de distinto origen; determinación de actividades proteolítico-queratinolítico-colagenolítico enzimáticas de sus extractos crudos

Los objetivos fueron obtener extractos enzimáticos queratinolíticos a partir del cultivo de las cepas en medio líquido (batch sumergido) y sólido cuyas actividades sean medibles frente a distintos sustratos de origen proteico-queratínico. Al mismo tiempo evaluar el comportamiento y la producción del pool enzimático de las distintas cepas, para poder elegir la cepa fúngica con la cual se iba a trabajar en la producción, caracterización y aislamiento de su extracto enzimático.

2.5.1 Criterios para la selección de las cepas fúngicas

Introducción

La elección de cepas de distinto origen para la obtención de enzimas

queratinolíticas tiene que ver con el concepto de patogenicidad. Especies fúngicas pertenecientes a los dermatofitos o a hongos saprófitos pueden ser patógenas o no, debido no sólo a la producción o liberación de enzimas queratinolíticas sino a otros factores debidos a la interacción parásito-huésped (secciones 2.2.1.2 y 2.2.1.3).

Se postula que son dos los mecanismos complementarios y simultáneos por los cuales tiene lugar la hidrólisis fúngica de la queratina. Por un lado, la penetración mecánica del micelio en el sustrato queratina y por otro, la degradación enzimática de la queratina por medio de las queratinasas secretadas en los tips o extremos hifales (sección 3.2.4.1; Gow y Gadd, 1994). Teniendo en cuenta estos probables mecanismos, las distintas cepas de hongos filamentosos que se estudiaron fueron inoculadas en ambos medios. El crecimiento del micelio filamentosos en medio sólido podría estar aprovechando la capacidad de adhesión al sustrato.

Se estudiaron cepas de distinto origen: clínico, ambiental y geofílicas y se incluyó una cepa de referencia de reconocida acción como agente causal de dermatomicosis.

2.5.1.2 Materiales y métodos

Cepas utilizadas y descripción

Se utilizaron 6 cepas: *Scopulariopsis brevicaulis*, *Aspergillus versicolor*, *Fusarium oxysporum*, *Trichophyton ajelloi*, *Cladosporium sphaerospermum* y *Trichophyton mentagrophytes*.

Las especies fúngicas fueron identificadas taxonómicamente mediante macro y micromorfología (sección 2.3.1) por su crecimiento en Agar Sabouraud adicionado con cloranfenicol 500 mg/l y Agar Sabouraud adicionado con cicloheximida 500 mg/l.

Para identificar *Trichophyton rubrum* de *T. mentagrophytes* se utilizó el “Test de perforación del pelo *in vitro*” siguiendo el procedimiento descrito por Ajello *et al.* (1957) con algunas modificaciones. En placas de Petri ($\varnothing = 100$ mm, h = 20 mm), se colocaron 30 g de tierra fértil no estéril del horizonte superficial del Campus de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP con una siembra puntual de 0,5 g de pelo de niño esterilizado en autoclave a 121°C durante 15 min, se humedeció con 5 ml de agua destilada estéril. El conjunto se incubó en forma estática durante 15 días en atmósfera húmeda a 28°C en cuarto estufa.

A continuación se describe el origen y características de las distintas cepas utilizadas para los ensayos cualitativos de actividad enzimática.

Scopulariopsis brevicaulis (*Microascus brevicaulis* S.P. Abbot), *Aspergillus versicolor* (Vuill.) Tirab. 1908 y *Trichophyton mentagrophytes* se aislaron a partir de muestras clínicas como causantes de onicomycosis de miembro superior en la Cátedra de Micología Médica e Industrial de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

Las cepas de *Fusarium oxysporum* Schltdl., Fl. berol. (Berlin) (1824) y *Trichophyton ajelloi* (Vanbreus.) Ajello (1968) utilizadas fueron las aisladas e identificadas en la sección (2.3.1.1.2).

Aspergillus es un género del cual se han aislado y purificado sus queratinasas (Farag y Hassan, 2004). En particular, *Aspergillus versicolor* es un patógeno oportunista causante de onicomiosis (Ramírez Hobak, Gómez-Sáenz, Vega Sánchez, y Arenas, 2017), aspergillosis (Charles, Joseph, Easow y Ravishankar, 2011), productor de aflatoxinas (Engelhart, Loock, Skutlarek, Sagunski, Lommel, Färber, y Exner, 2002) y xilanasas (Carmona, Pizzirani-Kleiner, Monteiro y Joao, 1997).

Cladosporium sphaerospermum (Penz. 1882) fue aislado a partir del medio ambiente por exposición de placas a la intemperie con Agar Sabouraud y cloranfenicol 500 mg/l durante 30 min. Es un hongo dematiáceo presente con frecuencia en suelo y aire así como en hábitats humanos como viviendas, baños, etc. No ha sido reportado como causante de tiñas aunque debido a su propagación aérea tiene capacidad alergógena a nivel de sistema respiratorio. Esta cepa fue utilizada como control negativo por no presentar actividad queratinolítica reportada al momento del ensayo y no haber sido aislado por el método del anzuelo.

Fusarium oxysporum es un deuteromycete que ataca especies vegetales, produce micotoxinas y causa micosis invasiva en inmunocomprometidos como patógeno emergente (Al-Maqtoufi y Thornton, 2016; Nucci y Anaissie, 2007; Roncero *et al.*, 2000).

Scopulariopsis brevicaulis (*Microascus brevicaulis* S.P. Abbot) es un hongo ascomycota saprófito de suelo, cosmopolita, agente de biodeterioro que puede ser patógeno de plantas, puede causar eventualmente onicomiosis (Vásquez Díaz, Galíndez, Carballo y Dionisio de Calier, 2011) y presentarse como multirresistente a antifúngicos (Cuenca-Estrella *et al.*, 2003).

Trichophyton ajelloi es un dematofito geófilo, no patógeno para hombres o animales aunque se han reportado casos esporádicos (Presburg y Young, 1978; Lakshmipathy y Kannabiran, 2010).

Trichophyton mentagrophytes fue utilizado como cepa de referencia como control positivo por su capacidad de atacar el pelo humano *in vitro* y como agente causal de dermatomicosis.

2.5.1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las Figuras 2.5 a 2.9 se observan macroscópicamente las colonias de las especies fúngicas creciendo en Agar Sabouraud, cuyas características corresponden a su clasificación taxonómica. En la Figura 2.10 se muestra el test de perforación del pelo de *T. mentagrophytes* donde la cepa tiene crecimiento macro y microscópico típico. A nivel microscópico, el hongo genera cuñas que penetran en el tallo del pelo (Figura 2.11).



Figura 2.5. *Aspergillus versicolor* macromorfología de la colonia

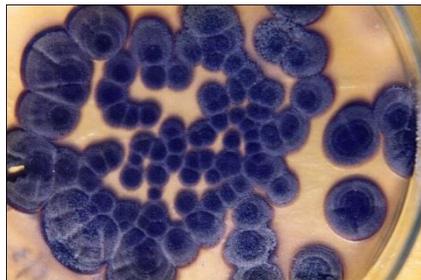


Figura 2.6. *Cladosporium sphaerospermum* macromorfología de la colonia



Figura 2.7. *Fusarium oxysporum* macromorfología de la colonia



Figura 2.8. *Scopulariopsis brevicaulis* macromorfología de la colonia



Figura 2.9. *Trichophyton ajelloi* macromorfología de la colonia



Figura 2.10. *Trichophyton mentagrophytes*: test de perforación del pelo *in vitro*

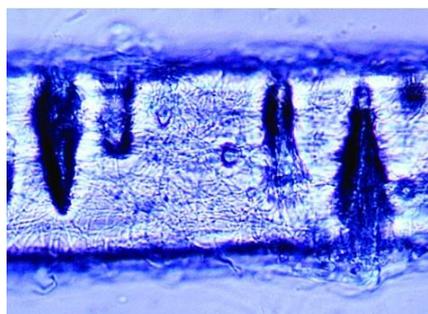


Figura 2.11. *Trichophyton mentagrophytes*: test de perforación del pelo *in vitro* positivo (MO 40x) (Ellis, 2009)

2.5.2 Materiales y métodos: producción de extractos enzimáticos en medio líquido y sólido

2.5.2.1 Reactivos y soluciones; preparación del inóculo

Para los cultivos se utilizó el “residuo pelo” (RP) (sección 2.4.3.1.I) y medio mineral mínimo (MMM) (sección 2.4.1.3.II).

Para el inóculo se siguió el procedimiento fue el mismo que se describió en la sección 2.4.1.2, con un recuento de viables en placa del orden de 10^6 ufc/ml.

2.5.2.2. Cultivos líquidos agitados (batch)

Los cultivos se realizaron como se describió (sección 2.4.2.1.IV) utilizando una concentración de sustrato de 0,7% P/V de RP en 100 ml de MMM. Una vez finalizada la incubación, se obtuvieron los EC (extractos enzimáticos de cultivos en medio líquido, EECL) mediante filtración en vacío con membrana de $0,22 \mu\text{m}$ en baño de hielo, se fraccionaron y se conservaron a -20°C .

2.5.2.3 Cultivos sólidos estáticos

Los cultivos en sustrato sólido se llevaron a cabo en placas de Petri de vidrio ($\text{Ø} = 100 \text{ mm}$, $h = 20 \text{ mm}$) con 0,5 g de RP (preparado según la sección 2.4.2.1.I). El conjunto se esterilizó en autoclave a 121°C , 20 min y posteriormente se agregaron 5 ml de MMM con 200 μl de la suspensión de conidios del inóculo fúngico. Las placas se incubaron en forma estática durante 15 días en atmósfera húmeda a 28°C en cuarto estufa (Galarza *et al.*, 2004).

Transcurrido el tiempo de incubación de cada cultivo, se realizó la extracción del EC por agregado de 5 ml de MMM a cada placa, separando el líquido sobrenadante por filtración a través de membrana de $0,22 \mu\text{m}$ y prefiltro de fibra de vidrio. Los EC (EECS) obtenidos fueron fraccionados y guardados a -20°C hasta su posterior análisis.

2.5.2.4 Determinaciones analíticas en los extractos crudos

I. Determinación de la concentración proteica

Fue determinada por el método de Bradford (1976).

II. Caracterización de los extractos crudos

La caracterización de los extractos crudos fúngicos se determinó en función de su concentración proteica y se determinaron sus actividades enzimáticas frente a los sustratos caseína, azul de polvo de piel (APP) y azul de queratina (AQ).

II.1. Determinación de la actividad caseinolítica

La actividad caseinolítica fue determinada usando el sustrato caseína tipo Hammarsten (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) al 1% en buffer Tris-HCl 0,1 M, pH 9. El sustrato se disolvió en el buffer por calentamiento en baño maría a ebullición durante 20 min, se filtró mediante papel de filtro Whatman grado 41 y se utilizó en el día de la preparación.

La mezcla de reacción que contenía 1,1 ml de la solución del sustrato y 100 μ l de EC, se incubó a 37°C durante 30 min, se detuvo por el agregado de 900 μ l de TCA 5% y se centrifugó a 3000 g durante 20 min. En el sobrenadante se midió la absorbancia a 280 nm (Liggieri, 2005; Karpagam, Viswanatham, Prabhu, Sulochana y Sivanandham, 2013; López *et al.*, 2017).

La unidad caseinolítica se definió como la cantidad de enzima que bajo las condiciones de reacción produjo un incremento de una unidad de Abs_{280 nm} por minuto.

La actividad caseinolítica específica se expresó como U_{act cas}/mg de proteína soluble.

II.2. Determinación de la actividad con Azul de Queratina

Se determinó según la sección 2.4.3.1.V.

II.3. Determinación de la actividad con Azul de Polvo de Piel

Se determinó según la sección 2.4.3.1.VI.

2.5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Caracterización de los extractos crudos

Los resultados obtenidos de la sección 2.5.2 se expresan a continuación en la Tabla 2.6 donde se observan las concentraciones proteicas y las actividades enzimáticas específicas de los diferentes EC obtenidos mediante el cultivo en medio líquido (EECL) y sólido (EECS) testeados frente a los sustratos AQ, caseína y APP. Se analizará el comportamiento de cada cepa por separado relacionándolo con su rol como patógeno en la naturaleza.

Tabla 2.6. Concentración proteica y actividades enzimáticas específicas frente a sustratos AQ (azul de queratina) expresada en U_{aq} , APP (azul de polvo de piel) expresada en U_{HPA} y caseína expresada como U_{cas} de los EC obtenidos a partir de cultivos en medio sólido (EECS) y líquido (EECL)

	Concentración de proteínas (mg/ml)		U_{aq} específica.		U_{cas} específica		U_{app} específica	
	EECL	EECS	EECL	EECS	EECL	EECS	EECL	EECS
<i>Aspergillus versicolor</i> (AV)	0,3±0,01	0,27±0,04	1,33±0,04	1,49±0,05	7,6±0,8	8,5±0,9	253±12	283,3±0,9
<i>Cladosporium sphaerospermum</i> (CS)	0,674±0,05	0,43±0,07	0,44±0,06	2,55±0,06	8,45±0,3	5,4±0,8	25±2	48±8
<i>Fusarium oxysporum</i> (FO)	1,00±0,3	0,77±0,06	0,7±0,08	0,78±0,03	12,6±0,9	18,9±2	277±15	520±15
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (SB)	0,74±0,09	0,47±0,08	0,94±0,02	1,48±0,03	11,21±2	17,6±3	277±18	436±20
<i>Trichophyton ajelloi</i> (TA)	0,25±0,05	0,26±0,02	1,2±0,06	2±0,4	26,92±7	28±5	202±8	1269±150
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> (TM)	0,486±0,02	0,17±0,01	1,02±0,07	7,6±0,7	5,3±1	21,6±6	131±12	617±19

Las actividades enzimáticas específicas variaron de acuerdo a los distintos sustratos, cepas fúngicas y sistemas de cultivo.

Comportamiento del EC de *Aspergillus versicolor*: presentó la mayor actividad queratinolítica en el EECL, mientras que el EECS se ubicó en cuarto lugar. En cuanto a la actividad colagenolítica, el EECL se ubicó en segundo lugar y el EECS en el quinto. Estos resultados tienen correlación directa con su rol patogénico (sección 2.5.2.1). La actividad caseinolítica y concentración proteica de ambos EC fueron bajas.

Comportamiento del EC de *Cladosporium sphaerospermum*: frente a AQ el EECS demostró una alta actividad, lo que resulta llamativo, ubicándose en segundo lugar mientras que el EECL se ubicó en último lugar. Frente a los demás sustratos tanto EECL como EECS tuvieron las actividades más bajas. Se ha reportado actividad queratinolítica en esta especie (Gordonova y Nikitina, 2015).

Comportamiento del EC de *Fusarium oxysporum*: frente a AQ tanto EECL como EECS demostraron baja actividad. El EECL demostró la mayor actividad frente a APP y junto con EECS las mayores concentraciones proteicas (Sharma *et al.*, 2011). *Fusarium* spp. causa numerosas enfermedades en pacientes inmunocompetentes e inmunodeprimidos (Nucci y Annase, 2007). En estos últimos produce endoftalmítis, sinusitis, neumonía, que comprometen piel superficial y profunda, funguemia y fusariosis. Frente a caseína, la actividad de EECL se ubicó en el segundo lugar, mientras que EECS en el tercero.

Comportamiento del EC de *Scopulariopsis brevicaulis*: el comportamiento del EECL de *Scopulariopsis brevicaulis* demostró la mayor actividad colagenolítica junto con *Fusarium oxysporum* frente a APP. *Scopulariopsis brevicaulis* está reportado como productor de queratinasas (Anbu, Gopinath, Hilda, Lakshmi Priya y Annadurai,

2005; Anbu, Gopinath, Hilda, Mathivanan y Annadurai, 2006; Sharaf y Khalil, 2011), pero no de colagenasas. Cuando esta cepa se aisló de suelo, se utilizó para volatilizar arsénico, metilar antimonio, biodegradar plumas o producir metioninasa con potenciales aplicaciones en medicina (Tamminen, Kramer, Labes, y Wiebe, 2014). Cultivos de su teleomorfo, aislado del lecho marino, fueron aprovechados para la producción de metabolitos secundarios “Scopularide” A y B como medicamento oncológico (Kramer *et al.*, 2015).

Comportamiento del EC de *Trichophyton ajelloi*: tanto el EECL como el EECS demostraron las mayores actividades específicas frente a caseína. Frente a APP, el EECS presentó el mayor valor, mientras que en el EECL se determinaron valores intermedios de actividad. En cuanto a la actividad frente a AQ, en el EECS fue intermedia y en el EECL ocupó el segundo lugar. La concentración proteica en ambos extractos fue baja.

Comportamiento del EC de *Trichophyton mentagrophytes*: demostró la mayor actividad queratinolítica frente a AQ en el EECS, sin embargo, en el EECL ocupó el tercer lugar. En relación a los distintos sustratos (caseína y APP), el EECS se encontró en segundo lugar para caseína y APP; el EECL se ubicó en el último lugar para caseína y anteúltimo para APP. La concentración proteica del EECS y del EECL se ubicó en 6° y 4° lugar. Debido a la patogenicidad de este microorganismo como agente de tiñas inferimos que debe poseer otros mecanismos vinculados a la relación huésped – parásito en el establecimiento de enfermedad ya que no demostró las máximas actividades como era lo esperado (ver capítulo 5). En relación a los otros sustratos y medios presentó valores medios. Las concentraciones proteicas de EECL y EECS ocuparon el segundo lugar.

La comparación general de las cepas utilizadas del rendimiento enzimático entre el medio de cultivo líquido y el sólido se observó que el segundo produjo EC con valores de actividades mayores para todas las cepas. Una razón para este comportamiento podría basarse en la naturaleza miceliar o filamentosa de las cepas fúngicas testeadas.

El cultivo en sustrato sólido de cepas fúngicas es frecuentemente utilizado para la obtención de enzimas proteolíticas. Cebada, arroz, maíz, soja, residuos de la industria alimenticia como pulpa de fruta de baya, salvado, remolacha y pulpa de patata mezclados con las sales minerales y aditivos sirven como sustratos apropiados (Mikhailova, 2011).

El micelio filamentoso tiene una mayor adherencia al sustrato sólido, que implica un mayor aprovechamiento del mismo y por ende una mayor producción enzimática (Gow *et al.*, 1994). Inversamente, el valor de la concentración proteica en el EECL fue mayor al del EECS, que puede deberse a una mayor variedad de péptidos enteros o fragmentados producidos ya sea por el hongo en sí mismo o por hidrólisis de la queratina del RP. Por otro lado, en el análisis comparativo de las actividades enzimáticas, el hecho de que se hayan tomado los valores de actividad enzimática específica relativiza el resultado. Valores altos de actividad en una concentración proteica baja o viceversa magnifican los resultados.

2.6 Elección de la cepa para la caracterización de su extracto enzimático

Los criterios aplicados se basaron en la falta de patogenicidad de la cepa, su capacidad de producción de un extracto enzimático con actividad queratinolítica en la degradación del residuo pelo y en la potencial aplicación a la industria del cuero. La cepa de elección fue *Trichophyton ajelloi*, dermatofito geófilo no patógeno (sección 2.5.2.1) aislado a partir del corral de yak. Si bien esta cepa no presentó las máximas actividades enzimáticas tanto en el medio sólido como en el líquido, en el criterio de su elección se tuvo en cuenta que no manifiesta patogenicidad hacia animales inmunocompetentes o plantas (Ragot 1966a; Ragot 1966b). El aumento en la producción de las enzimas queratinolíticas se planteó como objetivo del capítulo 3. Algunos autores consideran a esta cepa relacionada con hábitats acidofílicos, por cuanto determinaron que la actividad de la fosfatasa ácida fue mayor que la de la fosfatasa alcalina (Przystas *et al.*, 2003) o alcalinofílico (Simpanya, 2000), dependiendo su hallazgo de la época del año, la temperatura y humedad, pero en general se ha aislado en un amplio rango de pHs.

Esta especie fúngica, junto con *Microsporium gypseum*, presenta en sus extractos un pool enzimático con actividad fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, esterasa, lipasa, leucin-arylamidasa, naftol AS-BI- fosfohidrolasa, β -glucosidasa, N-acetyl- β -glucosaminidasa, α -manosidasa (determinadas mediante un kit comercial en medio sólido, API ZYM system) (Przystas *et al.*, 2007; Janda-Ulfig, Ulfig y Plaza, 2007).

En la posible aplicación de esta cepa a la tecnología del cuero debe tenerse en cuenta el objetivo de cada etapa del proceso de curtido, donde la actividad enzimática debe ser proteolítica (proceso de purga) y/o queratinolítica y aminopeptidásica (proceso de pelambre o depilado) sin atacar el colágeno de la dermis, mecanismos donde cobra importancia el balance entre todas estas actividades (sección 6.3.5 y 6.8.2, respectivamente) (Galarza *et al.*, 2004).

2.7 Tipificación de *Trichophyton ajelloi*

Características macro y micromorfológicas de *Trichophyton ajelloi*

Las colonias presentaron en Agar Sabouraud (AS) un color beige a naranja, con un pigmento en el reverso negro a rojizo difusible (Figura 2.9). En su micromorfología con azul de Gueguen se observó al microscopio óptico (40X) micelio hialino, macroconidias con paredes de ancho medio, largas, cilíndricas, fusiformes, elongadas, con 8 a 12 células, el test de perforación del pelo *in vitro* fue positivo.

Esta especie de dermatofito fue nombrado como *Keratinomyces ajelloi* (*Keratinomyces ajelloi* Vanbreus.1952), luego se lo clasificó como perteneciente al género *Trichophyton* (Ajello, 1968). Es el anamorfo de la especie *Arthroderma uncinatum* (Dawson y Gentles 1962). Entre las razones del cambio taxonómico del género *Keratinomyces* a *Trichophyton* se encuentran la producción de microconidias y cleistotecios del género *Arthroderma*, estado sexual o teleomorfo del género

Trichophyton. Sin embargo, estudios antigénicos demostraron que *T. ajelloi* tiene poca similitud con otras especies de *Trichophyton*; además morfológicamente las macroconidias de *K. ajelloi* tienen paredes gruesas y lisas mientras que las de las especies de *Trichophyton* son finas (Simpanya 2000).

Entre algunas de las aplicaciones de esta cepa, puede citarse la acción de sus metabolitos contra las larvas de mosquitos de *Aedes aegypti* (Mohanty y Prakash, 2004; Singh y Prakash, 2012).

2.8 Conclusiones generales

En cuanto a la patogenicidad y la actividad queratinolítica *in vitro* se encontró correlación en los extractos de *Scopulariopsis* sp., cepa que se aisló a partir de una onicomiosis. Sin embargo, en otros casos (*Trichophyton mentagrophytes*), otros factores estarían en juego en el desarrollo de la patogenicidad.

La actividad colagenolítica *in vitro* tuvo relación directa con el desarrollo de enfermedades fúngicas como en el caso de *Fusarium oysporum*.

En relación al comportamiento de los extractos enzimáticos de *Trichophyton ajelloi*, demostraron alta actividad caseinolítica y colagenolítica e intermedia queratinolítica. Sin embargo, esta especie fúngica no manifiesta patogenicidad para el ser humano o animales inmunocompetentes. Esta situación apoyaría la hipótesis de que la actividad proteolítico-queratinolítica de amplio espectro no sería el único mecanismo para el establecimiento de la infección fúngica, lo que se va a desarrollar con mayor detalle en el capítulo 5.

2.9 Referencias bibliográficas

- Aceituno, H., Fuguet, I., Yegres, F. (1988). *Microsporum gypseum*. Dermatófito geofílico de importancia clínica. Revisión. *Investigación Clínica*, 29(4), 219-237.
- Ajello, L. (1968). A taxonomic review of the dermatophytes and related species. *Sabouraudia*, 6, 147-149.
- Ajello L. y Georg L. (1957). In vitro hair cultures for differentiating between atypical isolates of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. *Mycopathologia et mycologia applicata*, 8(1), 3-17.
- Ali-Shtayed, M. y Jamous, R. (2000). Keratinophilic fungi and related dermatophytes in polluted soil and water habitats. *Revista Iberoamericana de Micología*, 51-59.
- Ali-Shtayed, M. (2013). *Laboratory Diagnosis of Mycoses*. Til, Nablus, Palestina: Biodiversity and environmental Research Center (BERC).

- Al-Maqtoofi, M. y Thornton, C. (2016). Detection of human pathogenic *Fusarium* species in hospital and communal sink biofilms by using a highly specific monoclonal antibody” *Environmental Microbiology*, 18 (11), 3620-3634.
- Anbu, P., Gopinath, S., Hilda, A., Lakshmi Priya, T. y Annadurai, G. (2005). Purification of keratinase from poultry farm isolate-*Scopulariopsis brevicaulis* and statistical optimization of enzyme activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 639-647.
- Anbu, P., Gopinath, S., Hilda, A., Mathivanan N. y Annadurai, G. (2006). Secretion of keratinolytic enzymes and keratinolysis by *Scopulariopsis brevicaulis* and *Trichophyton mentagrophytes*: regression analysis. *Canadian Journal of Microbiology*, 52, 1060-1069.
- Apodaca, G. y McKerrow, J. (1989a). Regulation of *Trichophyton rubrum* proteolytic activity. *Infection and Immunity*, 57, 3081-3090.
- Avanzato, M. y Rothrock, C. (2010). Use of selective media and baiting to detect and quantify the soilborne plant pathogen *Thielaviopsis basicola* on Pansy. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2010-0610-01.
- Bakerspigel A. (1953). Soil as a storage medium for fungi. *Mycologia*, 45(4), 596-604. DOI 10.180/00275514.1953.12024301.
- Barnett H.L. y Hunter B. (1998). *Illustrated genera of Imperfect Fungi*. St. Paul Minnesota, USA: American Phytopathological Society Press.
- Blake, J., Dahl, M., Herron, M. y Nelson, R. (1991). An immunoinhibitory cell wall glycoprotein (mannan) from *Trichophyton rubrum*. *Journal of Investigative Dermatology*, 96 (5), 657-661.
- Bohacz, J. (2017). Biodegradation of feather waste keratin by a keratinolytic soil fungus of the genus *Chrysosporium* and statistical optimization of feather mass loss. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 33(13), 1-16, DOI 10.100/s11274-016-2177-2.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Cabañes Sáenz, J. (2001). Identificación de hongos dermatofitos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 12, 1-12.
- Cantera, C. S., Goya, L., Galarza, B., Garro, M. L. y López, L. M. I. (2003). Hair saving unhairing process. Part 5. Characterisation of enzymatic preparations applied in soaking and unhairing processes. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 87, 69-77.

- Cantera, C. S., Goya, L., Garcia, R. y Sofia, A. (1999). Proteolytic activity assessment: use of the chromogenic substrate hide powder azure. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 83, 101-106.
- Carmona, E., Pizzirani-Kleiner, A., Monteiro, R. y Jorge, Joao, J. (1997). Xylanase production by *Aspergillus versicolor*. *Journal of Basic Microbiology*, 37, 387-393.
- Carmichael, J., Bryce Kendrick, W., Connors, I. y Sigler, L. (1980). *Genera of Hyphomycetes*. Edmonton, Alberta, Canadá: The University of Alberta Press.
- Chabasse, D. (2008). Les dermatophytes: d'où viennent-ils? Comment sont-ils devenus des parasites?. *Journal de Mycologie Médicale*, 18, 27-35.
- Charles M, Joseph N, Easow J, Ravishankar M. (2011). Invasive pulmonary aspergillosis caused by *Aspergillus versicolor* in a patient on mechanical ventilation. *Australasian Medical Journal*, 4 (11), 632-634.
- Cuenca-Estrella, M., Gomez-Lopez, A., Mellado, E., Buitrago, M., Monzón, A. y Rodríguez-Tudela, J. (2003). *Scopulariopsis brevicaulis*, a fungal pathogen resistant to broad-spectrum antifungal agents. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 47(7), 2339-2341.
- Dawson, C., y Gentles, J. (1962). The perfect states of *Keratinomyces ajelloi* Vanbreuseghem, *Trichophyton terrestre* Durie & Frey and *Microsporum nanum* Fuentes. *Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 1(1), 49-57.
- De Clercq, D. y De Vroey, C. (1981). Procédé favorisant l'isolement de champignons kératinophiles par la technique de Vanbreuseghem. *Bulletin de la Société Française de Mycologie Médicale*, 10, (29-31).
- Deepa, J., Aparna, I. y Joy Sarojini, M. (2016). Concurrent infection of *Conidiobolus coronatus* with disseminated tuberculosis presenting as bilateral orbital cellulitis. *Journal Clinical & Diagnostic Research*, 10(4), 1-2. DOI: 10.7860/JCDR/2016/16790.7535.
- Deshmukh, S.K. y Verekar, S.A. (2012). Prevalence of keratinophilic fungi in public park soils of Mumbai, India. *Microbiology Research*, 3(1), 24-27.
- Duarte, T., Oliveira, A., Macrae, S., Cedrola, A., Mazotto, A., Souza, E., Vermelho, A. (2011). Increased expression of keratinase and other peptidases by *Candida parapsilosis* mutants. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 44, 212-216.
- Ellis, D. (2009). Mycology Online. Hair perforation test for dermatophytes. Recuperado de <https://mycology.adelaide.edu.au/laboratory/hair>.

- Emmons, C. (1934). Dermatophytes: natural grouping based on form of the spores and accessory organs. *Archives of Dermatology*, 30, 337-362.
- Engelhart, S., Looock, A., Skutlarek, D., Sagunski, H., Lommel, A., Färber, H. y Exner, M. (2002). Occurrence of toxigenic *Aspergillus versicolor* isolates and sterigmatocystin in carpet dust from damp indoor environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 3886-3890.
- Espinel- Ingroff A. (2001). Comparison of the test with the NCCLS M 38-P method for antifungal susceptibility testing for common and emerging pathogenic filamentous fungi. *Journal Clinical Microbiology*, 39, 1360-1367.
- Farag A. y Hassan M. (2004). Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 34, 85-93.
- Filipello Marchisio, V. (2000a). Keratinophilic fungi: their role in nature and degradation of keratinic substrates. En R.K.S. Kushwaha, J. Guarro. (Ed.), *Revista Iberoamericana de Micología* (pp. 86-92). Bilbao, España: Elsevier.
- Filipello Marchisio, V., Fusconi, A. y Querio, F. (2000b). *Scopulariopsis brevicaulis*: a keratinophilic or a keratinolytic fungus. *Mycoses*, 43(7-8), 281-292.
- Friedrich, J., Gradišar, H., Mandin, D. y Chaumont, J. (1999). Screening fungi for synthesis of keratinolytic enzymes. *Letters of Applied Microbiology*, 28, 127-130.
- Filipello Marchisio, V., Curetti, V., Cassinelli, C., Bordese, C., (1991). Keratinolytic and keratinophilic fungi in the soil of Papua New Guinea. *Mycopathologia*, 115(2), 113-119.
- Galarza, B., Cavello, I., Garro M., Gortari C., Hours, R. y Cantera, C. (2012). Evaluation of increase at the production of keratinolytics enzymes. *Journal of AQEIC*, 63(3), 70-73.
- Galarza, B., Goya, L., Cantera, C., Garro, .L., Reinoso, H. y López, L. (2004). Fungal biotransformation of bovine hair. Part 1: isolation of fungus with keratinolytic activity. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 88(3), 93-98.
- Garro, ML., Galarza, B., Sarmiento, P., Greco, A. y Hours R. (2015). Compostaje de un residuo sólido de curtiembre; The tannery solid waste as compost. En M. Afonso, R. Torres Sánchez (Ed.), *Enfoques interdisciplinarios para la sustentabilidad del ambiente* (pp. 267- 272), Buenos Aires. Argentina: Sociedad Argentina de Ciencia y Tecnología Ambiental.
- Gato-Cárdenas, Y., Márquez-Gutiérrez, M., Baró-Robaina, Y. y Calle-Osorno, J. (2017). Detección de enzimas extracelulares en cepas cubanas del complejo

- Methariziumanisopliae* con acción entomopatogénica contra *Cylas formicarius* Fabricius (Coleoptera: Brentidae). *Actualidades Biológicas*, 39 (106), 71-78.
- Gordonova, I., Nikitina, Z. (2015). *Cladosporium sphaerospermum* keratinase byosynthesis regulation. *Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry*, 8, 14-18.
- Gortari, M., Galarza, B., Cazau, M. y Hours, R. (2008). Comparison of the biological properties of two strains of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson associated to their antagonistic effect onto *Toxocara canis* eggs. *Malaysian Journal of Microbiology*, 4(2), 35- 41.
- Gow N. y Gadd G., (Ed.). (1994). *The Growing Fungus*. London, UK: Chapman & Hall.
- Guarro, J. (2012). Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 30 (1), 33-39.
- Guiart, J. y Gregorakis, L. (1928). Classification botaniques des teignes. *Lyon Médical*, 141, 369-378.
- Index Fungorum, Recuperado de <http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp> (Royal Botanic Gardens, Kew; Landcare Research; Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences.
- Indira P. (1968). Human pathogenic fungi from soil. *Proceedings of the Indian Academy Sciences section B*, 67, 68-77.
- Janda-Ulfig, K., Ulfig, K. y Plaza, G. (2007). A study of the growth and enzymatic activity of *Microsprum gypseum* and *Trichophyton ajelloi* isolates from sewage sludge. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny (ROCZN. PZH)*, 58(2), 481-488.
- Jatoth, K., Mangilal, T. y Junapudi, S. (2016). Prevalence of dermatophytes and other keratinophilic fungi from soil of playgrounds and public parks of Hyderabad, India. *International Journal of Current Biotechnology*, 4(6), 1-5.
- Kačínová J., Tančínová D, Labuda R. (2013). Keratinophilic fungi in soils stressed by occurrence of animals. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science*, 2 (special issue 1), 1436-1446.
- Kačínová, J., Tančínová, D., Medo, J. (2014). Production of extracellular keratinase by *Chrysosporium tropicum* and *Trichophyton ajelloi*. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 3 (special issue 1), 103-106.
- Karpagam, N., Viswanatham, S., Prabhu, S., Sulochana S. y Sivanandham M. (2013). Biochemical and *in silico* clotting activity of latex from *Asclepias curassavica* L. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 4(4), 542-552.

- Katoh, T., Sano, T. y Kagawa, S. (1990). Isolation of dermatophyte from clinically normal scalps in *Microsporum canis* infections using the hairbrush method. *Mycopathologia*, 112 (1), 23-25.
- Khan, A. y Bhadauria, S., (2018). Molecular characterization of keratin degrading fungi isolated from semi-arid soil by PCR using ITS4 and ITS5 primers, *Journal of King Saud University-Science*, <http://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.04.014>.
- Kornilowicz-Kowalska, T. y Bohacz, J. (2011a). Biodegradation of keratin waste: theory and practical aspects, *Waste Management*, 31, 1689-1701.
- Kornilowicz-Kowalska T., Kitowski I. y Iglík H. (2011b). Geophilic dermatophytes and other keratinophilic fungi in the nests of wetland birds. *Acta Mycologica*, 46 (1), 83-107.
- Kramer, A., Beck, H., Kumar, A., Kristensen, L., Imhoff, J., Labes, A. (2015). Proteomic analysis of anti-cancerous scopularide production by a marine *Microascus brevicaulis* strain and its UV mutant. *PLoS ONE*, 10(10). Recuperado de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140047>.
- Kumar, J. y Kushwaha R. (2014). Screening of fungi efficient in feather degradation and keratinase production. *Archives of Applied Science Research*, 6(1), 73-78.
- Kumar, R., Mishra, R., Maurya, S. y Sahu, H. (2013). Isolation and identification of keratinophilic fungi from garbage waste soils of Jharkand region of India. *European Journal of Experimental Biology*, 3(3), 600-604.
- Kunert, J. (2000). Physiology of keratinophilic fungi. En R.K.S. Kushwaha, J. Guarro. (Ed.), *Revista Iberoamericana de Micología* (pp. 77-85). Bilbao, España: Elsevier.
- Kunert, J. (1992). Effect of reducing agents on proteolytic and keratinolytic activity of enzymes of *Microsporum gypseum*. *Mycoses*, 35, 343-348.
- Kunert, J. y Kasafirek, E. (1988). Preliminary characterization of extracellular proteolytic enzymes of dermatophytes by chromogenic substrates. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 26, 187-194.
- Kurtzman, C. y Fell, J. (Ed.). (1998). *The yeast, a taxonomic study*. Amsterdam, Países Bajos: Elsevier Science Publisher.
- Lakshmiopathy, D. y Kannabiran, K. (2010). Review on dermatomycosis: pathogenesis and treatment. *Natural Science*, 2 (7), 726-731.
- Liggieri, C. (2005). *Proteasas del látex de Asclepias curassavica L. Caracterización y potencial aplicación en la síntesis de péptidos* (Tesis doctoral). Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata.

- López, L., Viana, C., Errasti, M., Garro, M., Martegani, J., Mazzilli, G., Freitas, C., Araújo, I., Da Silva, R.O, Ramos, M. (2017). Latex peptidases of *Calotropis procera* for dehairing of leather as an alternative to environmentally toxic sodium sulfide treatment. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40(9):1391–1398. <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1796-9>.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. y Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193 (1), 265-275.
- Marfenina, O. E., (4-12 de septiembre de 2004). Health Problems microfungi in urban soil. En Eurosoil, Symposium, Freiburg, Alemania.
- Martínez-Herrera, E., Arroyo-Camarena, S., Tejada-García, D., Porras-López, C. y Arenas, R. (2015). Onychomycosis due to opportunistic molds, *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 90(3), 334-337.
- Martínez, E., Ameen, M., Tejada, D. y Arenas, R. (2014). *Microsporum* spp. onychomycosis: disease presentation, risk factors and treatment responses in an urban population. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 18(2), 181-186.
- Meevootison V. y Niederpruem J. (1979). Control of exocellular proteases in dermatophytes and especially *Trichophyton rubrum*. *Sabouradia*, 17, 91-106.
- Meyers, S. P. y Ahearn, D. G. (1977). Extracellular proteolysis by *Candida lipolytica*. *Mycologia*, 69, 646-651.
- Mikhailova, R. (2011). Proteolytic enzymes of mycelial fungi. *Microbiology & Biotechnology*, 3, 47-62. DOI: 10.18524/2307-4663.2011.3(15).92910.
- Minocha, Y., Pasricha, J., Mohapatra, L. y Kandhari, K. (1972). Proteolytic activity dermatophytes and its role in the pathogenesis of skin lesions. *Sabouraudia*, 10(1), 79-85.
- Mohanty, S. y Prakash, S. (2004). Extracellular metabolites of *Trichophyton ajelloi* against *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus* larvae. *Current Science*, 86(2), 323-325.
- Monod, M., Capoccia, S., Léchenne, B., Zaugg, C., Holdom, M. y Jousson, O. (2002). Secreted proteases from pathogenic fungi. *International Journal of Medical Microbiology*, 292(5-6), 405-419.
- Muhsin, T., Aubaid, A. y Al-Duboon, H. (1997). Extracellular enzyme activities of dermatophytes and yeast isolates on solid media. *Mycoses*, 40, 465-469.
- Moore, R. (1980). Taxonomic proposals for the classification of marine yeasts and other yeast-like fungi including the smuts. *Botanica Marina*, 23(6), 361-373.
- Nelson, P., Tousson, T.A., Marasas, W.F.O. (1983). *Fusarium Species*. Pennsylvania, USA: The Pennsylvania State University Press.

- Nogueira De Melo, A., Dornelas-Ribeiro, M., De Souza, E., Macrae, A., Longo Fracalanza, S., y Vermelho, A. (2007). Peptidase profiles from non-albicans *Candida* spp. isolated from the blood of a patient with chronic myeloid leukemia and another with sickle cell disease. *FEMS Yeast Research*, 7, 1004-1012.
- Nosratabadi, M., Kordbacheh, P., Kachuei, R., Safara, M., Rezaie, S. y Afshari, M. (2017). Isolation of keratinophilic fungi from the soil of Greater Tunb, Abu-Musa and Sirri islands in the Persian Gulf, Iran. *Current Medical Mycology*, 3(2), 13-19.
- Núñez C. (2008). *En relación a los tamices normalizados, Tablas de Tamices Estandares ASTM (American Society Of Testing Methodos)*. Misiones, Argentina: Facultad de Ciencias Exactas. Recuperado de www.cenunez.com.ar.
- Nucci, M. y Anaissie, E. (2007). *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(4), 695-704. doi: 10.1128/CMR.00014-07.
- Okoroma, E. (2012). *Enzymatic degradation of prion protein by keratinase producing proteolytic microorganisms*, (Tesis doctoral). Middlesex University's Research, London, UK.
- Oleniacz W. y Pisano M. (1968). Proteinase production by a Species of *Cephalosporium*. *Applied Microbiology*, 16(1), 90-96.
- Pfaller, M. A., Burmeister, L., Bartlett, M. S. y Rinaldi, M. G. (1988). Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparation. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(8), 1437-1441.
- Presburg, D. y Young, C. (1978). *Trichophyton ajelloi* isolated from a child. *Sabouraudia*, 16(3), 233-235.
- Przystas, W., Ulfig, K., Miksh, K. y Kunert, J. (2003). Extracellular enzyme profiles of geophilic dermatophytes and related fungi from waste and waste-contaminated habitats. *Mikologia Lekarska*, 10(1), 9-14.
- Przystas, W., Ulfig, K. y Myksch, K. (2007). The potential of keratinolytic and keratinophilic fungi for degradation of petroleum hydrocarbons in soil. En H. Heipieper (Ed.), *Bioremediation of soils contaminated with aromatic compounds*, (pp. 75-92). Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- Ragot, J. (1966a). Activité kératinolytique du *Keratinomyces ajelloi* Vanbreusghem sur la laine non dénaturée. *Comptes Rendus de la Academie de Sciences de Paris, Série D*, 262, 412-415.

- Ragot, J. (1966b). Activité protéolytique du *Keratinomyces ajelloi* Vanbreuseghem. *Comptes Rendus de la Academie de Sciences de Paris, Série D*, 263, 1895-1898.
- Ragot, J. (1967 a). Activité proteolytique du *Keratinomyces ajelloi* Vanbreuseghem cultivé en présence de kératine. *Comptes rendus de la Academie de Sciences de Paris, Serie D*, 265, 493-496.
- Ragot, J. (1967 b). Influence de la composition du milieu de culture sur la synthèse des enzymes protéolytiques par *Keratinomyces ajelloi* Vanbreuseghem. *Comptes rendus de la Academie de Sciences de Paris, Serie D*, 265, 965-968.
- Ramadan, N. e Ismael, H. (18-20 de octubre de 2011). Isolation of fungi seasonally from soil, air and water in villages in “binary safeen. 4th International Scientific Conference of Salahaddin University. Conferencia llevada a cabo en Erbil, Irak (vol. 666-612).
- Ramírez Hobak, L., Gómez-Sáenz, A., Vega Sánchez, D. y Arenas, R. (2017). Onicomycosis por mohos no dermatofitos. Una revisión. *Dermatología CMQ*, 15(3), 184-194.
- Rebell, G. y Taplin, D. (1978). *Dermatophytes: their recognition and identification*. Coral Glabes, Florida, USA: University of Miami Press.
- Rivas, L. y Mühlhauser, M. (2015). Complejo *Trichophyton mentagrophytes*. *Revista chilena de infectología*, 32(3), 319-320.
- Refai, M., El-Yazid H., El-Hariri, M. (2013). A guide for isolation and identification of dermatophytes, diseases and treatment, Monograph on Dermatophytes. Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Cairo University. Recuperado de https://scholar.cu.edu.eg/sites/default/files/hanem/files/monograph_on_dermatophytes.
- Roncero, M., Di Pietro, A., Ruiz-Roldán, M., Huertas-González, M., García Maceira, F., Méglecz, E., Jiménez, A., Caracuel, Z., Sancho-Zapatero, R., Hera, C., Gómez- Gómez, E., Ruiz-Rubio, M., González Verdejo, C. y Páez, M. (2000). Papel de enzimas líticas de la pared celular en la patogenicidad de *Fusarium oxysporum*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17, S47- S48.
- Ruffin, P., van Brussel, E., Biguet, J. y Biserte, G. (1979). Caractérisation partielle de deux aminopeptidases (arylamidases) extracellulaires du dermatophyte *Keratinomyces ajelloi*. *Biochimie*, 61, 495-500.
- Safranek, W. y Goos, R. (1982). Degradation of wool by saprotrophic fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, 28(1), 137-140.

- Sánchez, A. (2015). Biocontrol de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*, patógeno de suelo en cebolla con aislamientos nativos de Trichoderma de la región Patagonia Norte (Tesis de maestría). Universidad del Comahue, Río Negro, Argentina.
- Scott, J. y Untereiner, W. (2004). Determination of keratin degradation by fungi using keratin azure. *Medical Micology*, 42, 239-246.
- Senasa, Anexo I, (2009). Manual para el registro de fertilizantes, enmiendas, sustratos, acondicionadores, protectores y materias primas en la República Argentina. Recuperado de http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL_SENASA/INFORMACION, Enmiendas orgánicas, 1-49.
- Sharaf, E. y Khalil, N. (2011). Keratinolytic activity of purified keratinase production by *Scopulariopsis brevicaulis* (Sacc.) and its aminoacid profile. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18(2), 117-121.
- Sharma, M., Sharma, M. y Mohan Rao, V. (2011). In vitro biodegradation of keratin by dermatophytes and some soil keratinophiles. *African Journal of Biochemistry Research*, 5(1), 1-6.
- Sharma, A., Chandra, S., Sharma, M. (2012). Difference in keratinase activity of dermatophytes at different environmental conditions is an attribute of adaptation to parasitism. *Mycoses*, 55(5), 410-415.
- Siddiquee, S., Yusuf, U., Zainudin, N. (2010). Morphological and molecular detection of *Fusarium chlamydosporum* from root endophytes of *Dendrobium crumenatum*. *African Journal of Biotechnology*, 9(26), 4081-4090.
- Siesenop, U. y Böhm, K. (1995). Comparative studies on keratinase production of Trichophyton mentagrophytes strains of animal origin. *Mycoses*, 38, 205-209.
- Simpanya, M. (2000). Dermatophytes: Their taxonomy, ecology and pathogenicity. En R.K.S. Kushwaha, J. Guarro. (Ed.), *Revista Iberoamericana de Micología* (pp. 1-12). Bilbao, España: Elsevier.
- Simpanya, M. y Baxter, M. (1996). Isolation of fungi from soil using the keratinolytic baiting technique. *Mycopathologia*, 136(2), 85-89.
- Simpanya, M. (1994). Comparative enzyme studies of *Microsporum canis* and *Microsporum cookie* in relation to their pathogenicity and diversity (Tesis doctoral). Massey University, Auckland, Nueva Zelandia.
- Singh, C. (1997). Characterization of an extracelular keratinase of *Trichophyton simii* and its role in keratin degradation. *Mycopathologia*, 137, 13-16.
- Singh, I. (2014). Extracellular keratinase of some dermatophytes, their teleomorphs and related keratinolytic fungi. *European Journal of Experimental Biology*,

4(4), 57-60.

- Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de plagas, Senasa (2015). *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepa*. Recuperado de <https://www.sinavimo.gov.ar/plaga/fusarium-oxysporum-f-sp-cepa>.
- Snyder, W. y Hansen, H. (1940). The species concept in *Fusarium*. *American Journal of Botany*, 27, 64-67.
- Subha, T. y Gnamani, A. (2009). *In vitro* assessment of anti-dermatophytic effect of active fraction of methanolic extracts of *Acorus calamus*. *Journal of Annual & Plant Sciences*, 5(1), 450-455.
- Sybren de Hoog, G., Dukik, K., Monod, M., Packeu, A., Stubbe, D., Hendrickx, M., Kupsch, C., Stielow, J., Freeke, J., Göker, M., Rezaei-Matehkolaei, A., Mirhendi, H. y Gräser, Y. (2017). Toward a novel multilocus phylogenetic taxonomy for the dermatophytes. *Mycopathologia*, 182, 5-31. DOI: 10.1007/s11046-016-0073-9.
- Sykes, J., Outerbridge, C. (2014). Dermatophytosis. En J. Sykes. (Ed.), *Canine and feline Infections* (pp. 558-569). St. Louis, USA: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0795-3.00058-2>
- Tamminen, A., Kramer, A., Labes, A. y Wiebe, M. (2014). Production of scopularide A in submerged culture with *Scopulariopsis brevicaulis*, *Microbial Cell Factories*, 13(89), 1-7. Recuperado de <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-89>.
- Tartabini, M., Bonino, G., Racca, L. y Luque, A. (2013). Estudio taxonómico de aislamientos clínicos de *Trichophyton*. *Revista Argentina de Microbiología*, 45(4), 248-253.
- Tsuchiya, K., Arai, T., Seki, K. y Kimura, T. (1987). Purification and some properties of alkaline proteinase from *Cephalosporium* sp. KM 388. *Agricultural and Biological Chemistry*, 51(11), 2959-2965.
- Ulfig, K., Plaza G., Markowska- Szczupak A., Janda K. y Kirkowska S. (2010). Keratinolytic and Non-keratinolytic fungi sewage sludge. *Polish Journal of Environmental Studies*, 19(3), 635-642.
- Ulfig, K. (2003). Studies of keratinolytic and keratinophilic fungi in sewage sludge by means of a multi-temperature hair baiting method. *Polish Journal of Environmental Studies*, 12(4), 461-466.
- Ulfig K. (2000). The occurrence of keratinolytic fungi in waste and waste-contaminated habitats. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17, 44- 50.
- Ulfig K. (1996). Interaction between selected geophilic fungi and pathogenic

- dermatophytes. *ROCZN, PZH*, 47(2), 137-149.
- Vanbreuseghem, R. (1952). Technique biologique pour l'isolement des dermatophytes du sol. *Annales de la Societé Belge de Medecine Tropicale*, 32, 173-177.
- Vanbreuseghem, R., De Vroey, C. y Takashio, M. (1978). *A practical guide to medical and veterinary mycology*. Paris, Francia: Masson.
- Vásquez Díaz, P., Galíndez, V., Carballo, G. y Dionisio de Calier, M. (2011). Onicomycosis por *Scopulariopsis brevicaulis*: un hallazgo excepcional de tratamiento complejo. *Dermatología Argentina*, 17(5), 370-374.
- Vermelho, A., Mazotto, A., Nogueira de Melo, A., Cardoso Vieira, F., Rodrigues Duarte, T., Macare, Pinto da Silva Bon, E. (2009). Identification of *Candida parapsilopsis* strain producing extracelular serine peptidase with keratinolytic activity. *Mycopathologia*, 169(1), 57-65.
- Viani, F., Dos Santos, J., Paula, C., Larson, C., y Gambale, W. (2001). Production of extracellular enzymes by *Microsporum canis* and their role in its virulence. *Medical Mycology*, 39, 463-468.
- Vidal, P., Ulfing, K., Valmaseda, M. y Guarro, J. (1999). Studies on keratinophilic fungi. XI. *Chrysosporium undulatum* sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek*, 75(3), 171-182.
- Vidyasagar, G., Hosmani, N. y Shivkumar D. (2005). Keratinophilic fungi isolated from hospital dust and soils of public places at Gulbarga, India. *Mycopathologia*, 159, 13-21.
- Wang, L., Ma, L., Leng, W., Liu, T., Yang, J., Yang, L., Zhang, W., Zhang, Q., Dong, J., Xue, Y., Zhu, Y., Xu, X., Wan, Z., Ding, G., Yu, F., Tu, K., Li, Y., Li, R., Shen, Y., y Jin, Q. (2006). Analysis of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* expressed sequence tags. *BMC Genomics*, 7(255), 1-18, DOI: 10.1186/1471-2164-7-255.
- Waterhouse D. (1957). Digestion in insects. *Annual Review of Entomology*, 2, 1-18.
- Weber, R., Pitt, D. (2000). Teaching techniques for micology. *Mycologist*, 14(3), 118-120.
- Weitzman, I. y Summerbell, R. (1995). The dermatophytes. *Clinical Microbiology Reviews*, 8(2), 240-254.

Capítulo 3

Enzimas queratinolíticas, alternativas para su producción

3.1 Resumen

En el presente capítulo se caracterizó el sustrato residuo pelo desde el punto de vista higroscópico para poder usarlo como medio de cultivo en fermentación en sustrato sólido (FSS). En cultivos de *Trichophyton ajelloi* en FSS se probó utilizar el RP con un pretratamiento de desengrasado y sulfitado para ver el efecto que se observaba en los parámetros de biomasa, concentración proteica y actividades azocaseinolítica y queratinolítica en función del tiempo.

En medio de cultivo líquido se estudió el efecto de la adición de glucosa, de ácido tioglicólico y un medio mineral con fuente de N sobre la concentración proteica, actividad azocaseinolítica, queratinolítica, glucosa remanente, producción de amonio, sulfhidrilos en el EC y en el sobrenadante de la actividad queratinolítica y de sulfatos en los sobrenadantes de los cultivos en función del tiempo.

En ambos medio de cultivo sólido y líquido se determinó la acción de diferentes agentes reductores en la concentración proteica y azocaseinolítica a lo largo del tiempo del cultivo.

3.2 Introducción

3.2.1 Definición de enzimas queratinolíticas

El término “queratinasa” es utilizado para designar al sub-conjunto de proteasas que tienen actividad queratinolítica.

Sin embargo, la distinción entre las verdaderas queratinasas y otras proteasas que también actuarían degradando alguna forma de queratina no está del todo dilucidada. Lange, Huang y Busk (2016) indican que algunas proteasas pueden tener actividad queratinolítica pero sólo pueden llegar a una degradación completa si otras enzimas específicas actuaran en forma sinérgica.

3.2.2. Probables mecanismos en la degradación enzimática de la queratina

La degradación eficiente de queratina requiere de una combinación de diferentes queratinasas y posiblemente de otras enzimas que atacan modificaciones post-traduccionales de la queratina tales como puentes disulfuro y glicosilación.

Se han estudiado queratinasas purificadas y/o expresadas en *Escherichia coli* o en *Pichia pastoris* con el concepto de que una sola enzima podría descomponer la queratina (Gunkel y Gassen, 1989; Hu *et al.*, 2013). La idea de “un gen, una proteína, un producto” en la biotecnología industrial tradicional se ha modificado. Algunos

autores han reportado que la actividad queratinolítica desaparece cuando la enzima es aislada y purificada del caldo de cultivo entero, es decir que una sola enzima por sí sola no es capaz de descomponer totalmente la estructura recalcitrante de la queratina (Inada y Watanabe, 2013; Ramnani y Gupta, 2007).

En la búsqueda de cuáles enzimas o cofactores son necesarios para la degradación de la queratina se ha puesto especial énfasis en la acción del sulfito.

3.2.2.1. Mecanismo en el que intervienen diferentes enzimas con distinta especificidad

Se ha reportado últimamente que una mezcla combinada de una endoproteasa, una exoproteasa y una oligopeptidasa (pertenecientes a las familias S8, M28 y M3, respectivamente) actuaban en la degradación de la queratina. En el caso de las bacterias se propuso que la M28 podía ser sustituida por una exoproteasa de igual función (Figura 3.1).

A través del análisis PPR (*Peptide Pattern Recognition*) del amplio espectro de 79 genomas fúngicos pertenecientes a distintos *phylum* se reveló la existencia de un nuevo grupo de proteínas auxiliares, las LPMOs AA11 (AA9, AA10, AA11) que se encontrarían en el genoma de los hongos dermatofitos, y algunos hongos queratinolíticos como *Onygena corvina* y en el de bacterias que rompen quitina, celulosa y hemicelulosa (Busk y Lange, 2015; Wang, Hsu, Liang, Yeny Wang, 2008).

Se ha postulado que la acción de LPMOs AA11 sería la de romper las uniones glucosídicas entre la N-acetilglucosamina y los aminoácidos serina y treonina del extremo cabeza no enrollado de los filamentos de queratina. Esta hidrólisis llevaría a un cambio en la conformación estérica o de carga en los extremos cabeza y cola de los filamentos de queratina causando su desensamblaje (Figura 3.2). Tales cambios llevan a una pérdida de la estructura forma parte de los dímeros y tetrámeros (Lange *et al.*, 2016).

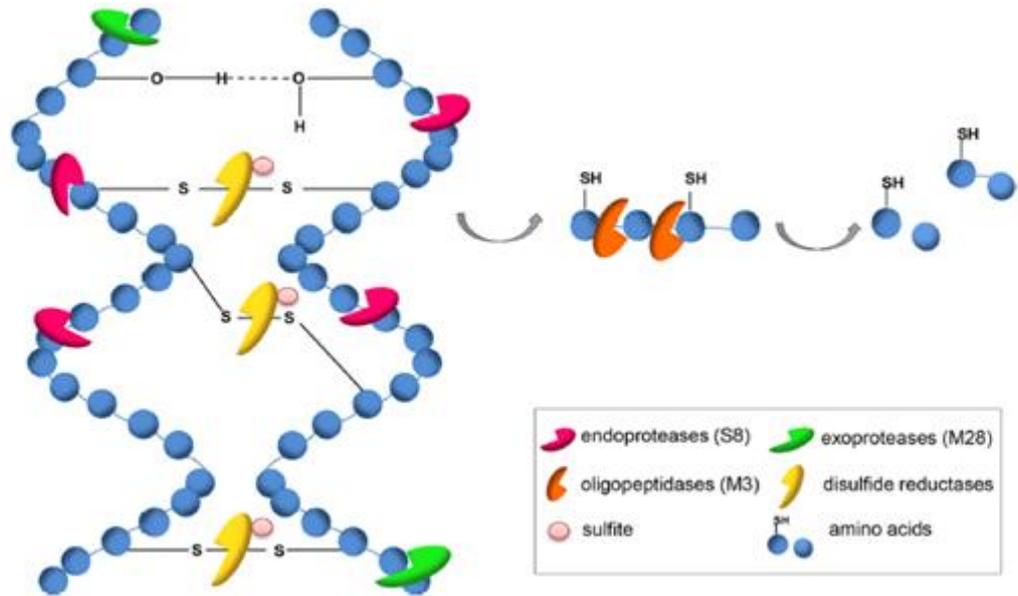


Figura 3.1. Posibles mecanismos de ruptura de la queratina mediante la acción de diferentes enzimas: endoproteasas extracelulares (S8), exoproteasas (M28), oligopeptidasas/metaloproteasas (M3) y sulfito/disulfuro-reductasas (Lange *et al.* 2016).

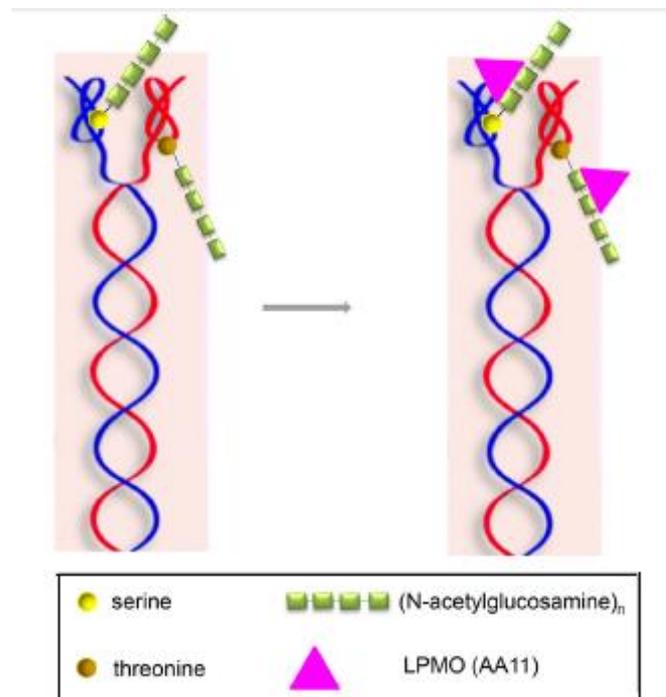


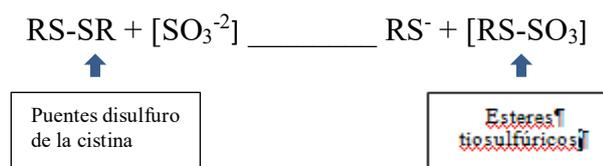
Figura 3.2. Representación hipotética de la acción de LPMOs (AA11): ruptura de la unión $\beta - 1,4$ de la N-acetilglucosamina en la glicosilación de la serina y la treonina de la cabeza no enrollada del filamento de queratina (Sprecher *et al.*, 2001)

Se postulan diversos mecanismos de ruptura de los puentes disulfuro de la cistina inter e intracadena en el comienzo de la degradación de la queratina. Uno de

ellos es la acción de la enzima disulfuro-reductasa (Yamamura, Morita, Hasan, Yokohama y Tamiya, 2002a; Böckle y Müller, 1997).

3.2.2.2 Mecanismo de sulfitólisis

Otro mecanismo de ruptura de los puentes disulfuro es el llamado proceso de “sulfitólisis” (Kunert, 1989; Kunert, 1995; Kunert, 2000) que iniciaría el proceso de queratinolisis. Se propone que el ión sulfito reacciona sobre el enlace disulfuro para generar ésteres tiosulfúricos como la S-sulfocisteína y tioles:



El sulfito reacciona selectivamente con los puentes S-S pero no reacciona con otros residuos de aminoácidos excepto el triptófano (Torchinsky, 1981; Cecil y Loening, 1960).

Como el medio de cultivo carece de ión sulfito, su síntesis debe tener lugar antes de que la sulfitólisis ocurra. Es poco conocido el mecanismo por el cual el sulfito se produce en los primeros estadios de la queratinolisis. Se ha postulado que la cisteína puede ser metabolizada a SO_3^{-2} mediante la enzima cisteín-dioxigenasa (CDO1) (Steindorff, Persinoti, Neves Monteiro y Nascimento Silva, 2015). En las queratinas duras habría suficiente cisteína libre como para iniciar la secreción de SO_3^{-2} según la hipótesis planteada por Grumbt *et al* (2013). En ciertos hongos como los dermatofitos existe un gen único (*ssui*) que codifica para la bomba impulsora de SO_3^{-2} , que además de secretarlo, participaría en su detoxificación y en la sulfitólisis. Esta hipótesis se pudo corroborar en cepas mutantes para CDO1 y *ssui* que eran incapaces de crecer sobre pelo y uña de humano.

La sulfitólisis ha sido corroborada en estudios donde la presencia de agentes reductores, que actúan rompiendo los puentes disulfuro de la cistina inter e intramoleculares, potencian la acción de las enzimas proteolítico-queratinolíticas sobre el sustrato queratínico (Kunert, 1992).

Una vez producida la sulfitólisis, actuarían enzimas proteolíticas en la degradación de la fibra proteica. Ambas acciones enzimáticas serían procesos simultáneos y complementarios utilizados por los microorganismos para transformar la queratina en material nutritivo (Galarza *et al*, 2004; Ruffin, van Brussel, Biguet y Biserte, 1979).

3.2.2.3. Diversidad de enzimas proteolítico-queratinolíticas

Numerosas enzimas proteolítico-queratinolíticas han sido caracterizadas y purificadas relacionadas con la degradación de la queratina pertenecientes a especies

fúngicas causantes de micosis superficiales así como de hongos no patógenos, actinomicetes (Esawy, 2007; Böckle, Galunsky, Müller, 1995; Bressollier, Letourneau, Urdaci, y Verneuil, 1999) y bacterias (Brandelli y Riffel, 2005; Ionata *et al.*, 2008; Kumar Ganesh, Swarnalatha, Gayathri, Nagesh y Sekaran, 2007; Kumar, Kazi y Soomro, 2012; Yamamura *et al.*, 2002b). Las proteasas de hongos patógenos pertenecen a la clase de proteasas: aspárticas (de la familia de la tripsina) producidas por *Candida tropicalis*, serinproteasas (de la familia de las subtilisinas), metaloproteasas, aminopeptidasas, proteasas cisteínicas, carboxipeptidasas, dipeptidilpeptidasas, proteasas no clasificadas (Lin, Tang, Koelsch, Monod y Foling, 1993; Monod *et al.*, 2002; Apodaca y McKerrow, 1989a; Apodaca y McKerrow, 1989b; Yu, Harmon y Blank, 1968; Asahi *et al.*, 1985; Ruffin *et al.*, 1979; Simpanya y Baxter, 1996; Thys, Lucas, Riffel, Heeb y Brandelli, 2004; Day, Toncic, Stratman, Leeman y Harmon, 1968).

Se ha encontrado que la especificidad de sustrato de queratinasas de dermatofitos que degradan preferentemente tetrapéptidos con residuos de aminoácidos hidrofóbicos en la posición P1 sigue el siguiente orden: Phe>Leu > Met = Ala > Val (en el caso de *Trichophyton ajelloi*, *Microsporum gypseum*, *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton schoenleini*, *Arthroderma glorieae*, *Ctenomyces serratus*, *Keratinomyces terreum*) (Kunert y Kasafirek, 1988).

Entre las que pertenecen a hongos no patógenos se encuentran las queratinasas con preferencia en la hidrólisis de aminoácidos aromáticos y no polares en la posición P1 de oligopéptidos sintéticos tales como N-succinil-Ala-Ala-Ala-pNA y N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, por ejemplo, pertenecientes al grupo S8 de serin proteasas (Merops; Rawlings *et al.*, 2018). Entre las clasificadas en su mayoría como serin proteasas fueron reportadas las producidas por *Doratomyces microsporus* y *Paecilomyces marquandii* (Gradisar, Friedrich, Križaj y Jerala, 2005; Friedrich y Kern 2003), *Tritirachium album* (proteínasa K) (Ebeling *et al.*, 1974; Gunkel *et al.*, 1989), *Onygena corvina* (Huang, Busk y Lange, 2015), *Aspergillus parasiticus* (Anitha y Palanivelu, 2013), *Aspergillus oryzae* (Farag y Hassan, 2004), *Scopulariopsis brevicaulis* (Anbu, Gopinath, Hilda, Lakshmi Priya y Annadurai, 2005), *Kocurea rosea* (Bernal, Cairó y Coello, 2006), *Trichoderma atroviride* (Cao, Tan, Liu, Xue y Zhou, 2008). En menor proporción se han caracterizado aquellas pertenecientes a las metaloproteasas producidas, por ejemplo, por *Chrysosporium keratinophilum* (Dozie, Okeke y Unaeze, 1995). Algunas proteasas con especificidad sobre la queratina no han sido clasificadas dentro de ninguna familia como las producidas por *Myrothecium verrucaria* (Moreira-Gasparin *et al.*, 2009) y *Aspergillus oryzae* (Ali, Ali y Mohamed, 2011).

El perfil de los productos liberados en el curso de la degradación de la queratina nativa por hongos y algunos actinomicetes tales como *Streptomyces fradiae* es similar. Los dermatofitos geofílicos y el género *Chrysosporium* convierten el 75% de N de la pluma durante cultivos de 21 días en amonio, del cual el 60% se libera como amoníaco. No más del 20% del nitrógeno queratínico se libera en forma de péptidos de 10 kDa, oligopéptidos de 1-2 kDa y aminoácidos donde prevalecen la serina (10%-20%),

cisteína-cistina (20%-30%). Además, se producen compuestos con S como sulfatos (en alto porcentaje), sulfitos, hiposulfitos, a partir de pluma de pollo; compuestos con grupos sulfhidrilos, en el caso de actinomicetes; aminoácidos azufrados en el caso de las bacterias; cisteína y péptidos conteniendo sulfocisteína en el caso de hongos queratinolíticos como *Microsporium gypseum*, a partir de lana de oveja (Kornilowicz-Kowalska *et al.*, 2011).

3.2.3. Medios de cultivo, optimización para la expresión de las enzimas proteolítico-queratinolíticas

3.2.3.1. Composición

Los distintos componentes de los medios de cultivo influyen en la expresión de las enzimas proteolítico-queratinolíticas.

En algunos casos como en *Tritirachium album* Limber, la producción de la proteínasa K aumentó con el agregado de proteínas naturales solubles como peptona al 1,5%, leche en polvo, harina de soja, hidrolizado de maíz o albúmina. Sin embargo, con el agregado de sales conteniendo N (nitratos, sales de amonio o aminoácidos como glutamato, alanina) se produjo una mínima actividad proteolítica. En otros casos se incorporaron sales de NH_4Cl 0,5 g/l además de pelo bovino como fuente de N al medio de cultivo de elección (Kumar *et al.*, 2007).

La adición de 1% de glucosa al caldo conteniendo 1% de peptona aumentó el crecimiento de células y la secreción de proteasa (Ebeling *et al.*, 1974). La adición de glucosa (10 g/l) a un caldo con sales y gelatina al 1% produjo el máximo rendimiento enzimático y de biomasa entre otros hidratos de carbono como fructosa, manosa, maltosa y arabinosa (Singh y Singh, 1995).

Por otro lado, se ha reportado que la adición de 0,5% a 1% glucosa exógena al medio líquido con sales de queratina suprimió la producción de elastasa en el caso de dermatofitos como *Microsporium gypseum*, *M. canis*, *M. cookei*, *Trichophyton mentagrophytes*, *T. terrestre*, *T. rubrum*, de la queratinasa en el caso de *Microsporium gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* y *T. rubrum*, en cambio, la adición de fosfato de amonio no actuó en la represión enzimática. En *Trichophyton rubrum* las proteínas exógenas que sirven como inductores de la proteasa incluyeron la queratina nativa, la elastina y la seralbúmina bovina mientras que la pérdida del rendimiento de la enzima ocurrió con la caseína, la casitona o el colágeno (Meevootison y Niederpruem, 1979). Kunert (2000) sostiene que los dermatofitos consumen preferiblemente proteínas, péptidos o aminoácidos como fuentes de C y que cuando éstos son consumidos, utilizan glucosa junto con iones amonio, al final de la fase de crecimiento exponencial. Además, postula que la suplementación con glucosa siempre acelera el crecimiento.

Para el caso de *Actinomyces fradiae* creciendo en un caldo con harina de plumas de pollo la producción enzimática se incrementó con el agregado de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fuente de N adicional, pero disminuyó con otras sales de N como NH_4Cl (Matikevičienė *et al.*, 2011).

En cultivos bacterianos de *Bacillus cereus* MCM B-326, el agregado de 2% de

almidón aumentó 4 veces la síntesis de proteasas. El agregado de 1% de harina de soja como fuente de N tuvo efecto positivo como inductor al igual que el CaCO₃ en su aporte de ión Ca⁺² (Nilegaonkar, Zambare, Kanekar, Dhakephalkar y Sarnaik, 2007).

La optimización en la producción de queratinasas fue exitosa cuando se aplicaron modelos multiparamétricos estadísticos para el diseño del cultivo (Menakshi, Kumar y Yadav, 2022). Asimismo, se han utilizado técnicas de mutagénesis química para aumentar la capacidad de producción de queratinasas por medio de *Bacillus subtilis* (Cai, Lou y Zheng, 2008).

3.2.3.2. Consideraciones sobre sustratos queratínicos como inductores de la síntesis de enzimas queratinolíticas

En los medios de cultivo se utilizan distintos tipos de queratina como inductores de expresión de enzimas queratinolíticas. Por ejemplo: pelo humano desengrasado (Ruffin *et al.*, 1979; Takiuchi, Higuchi, Sei y Koga, 1982; Yamamura *et al.*, 2002a), de cobayo (Yu, Harmon y Blank, 1969), de caballo (Yu *et al.*, 1968), harina de plumas de pollo o plumas enteras (Sangali y Brandelli, 2000) y queratina de plumas solubilizada en dimetil-sulfóxido a 100°C (Wawrzekiewicz, Wolski y Lobarzewski, 1991).

Los primeros autores que obtienen queratinasas mencionan que el cultivo en un medio mineral cuya única fuente de C y N sea la queratina (lana nativa, etc) induce la síntesis de estas enzimas (Ragot, 1966; Ruffin *et al.*, 1979;).

El modo en que se suministra el material queratínico tiene que ver también con la facilidad de acceso al sustrato por parte de las enzimas para producir la queratinolisis. Cualquier acción física sobre el sustrato genera el interrogante de si las enzimas que se van a expresar sean las que atacan la queratina nativa y no simples proteasas. El autoclavado, la molienda en molino “ball-milling”, en el caso de la lana, pueden disminuir el contenido de cistina por ruptura de los puentes disulfuro. En ciertos casos la lana se esterilizó mediante óxido de etileno durante 48 hs (Weary, Canby y Cawley, 1965; Weary y Canby, 1967).

3.2.4. Tipos de medios de cultivo

Con el objetivo de obtener el máximo rendimiento en la producción de enzimas queratinolíticas realizamos cultivos en distintas condiciones de medios sólidos (FSS) y líquidos (CML), con diferentes medios minerales y aditivos, evaluando diversos parámetros en función del tiempo de cultivo, entre ellos las distintas actividades enzimáticas, productos y compuestos remanentes del metabolismo.

3.2.4.1 Fermentación en sustrato sólido

En primera instancia se eligió la fermentación en medio sólido donde se utilizó como sustrato el RP. Este sustrato se usó como única fuente de C, N y energía y al mismo tiempo fue biotransformado durante el cultivo fúngico. El estado sólido del sustrato es un medio propicio para el desarrollo del tipo de crecimiento del hongo

elegido. El mecanismo de colonización de los sustratos sólidos de los hongos filamentosos se produce a partir del extremo de su micelio. La hifa tiene el poder de penetrar dentro del sustrato sólido por la extensión lineal de su extremo apical y de sus ramificaciones. Las enzimas hidrolíticas son excretadas en el tip hifal y no se diluyen en el medio como en el caso del medio líquido, lo que hace que su acción sea eficiente. La penetración incrementa la disponibilidad del sustrato con lo que el contacto catalítico promueve la biosíntesis y la actividad metabólica fúngica (Gow *et al.*, 1995).

3.2.4.1.1 Definición de fermentación en sustrato sólido

La fermentación en sustrato sólido (FSS) es un tipo de cultivo que ocurre en un medio con partículas, generalmente poroso, en ausencia de agua libre, a diferencia de los medios líquidos donde el agua constituye más del 95% del medio. En la FSS el agua libre o potencial de agua del sustrato es un parámetro crítico del cultivo.

3.2.4.1.2 Características de la FSS

Las características de los materiales sólidos durante la fermentación en este tipo de medio tienen las siguientes propiedades (Galarza *et al.*, 2004, Galarza *et al.*, 2006, Raimbault, 1998):

- ✓ La matriz porosa, sea biodegradable o no, tiene un área de superficie por unidad de volumen de 10^3 a 10^6 m²/cm³ para el caso de un verdadero crecimiento de la interfase sólido/gas.
- ✓ La matriz puede absorber líquido una o más veces su peso seco con una relativamente alta actividad acuosa en la interfase sólido-gaseosa para permitir los procesos bioquímicos.
- ✓ Una mezcla de aire con oxígeno y otros gases y aerosoles pueden fluir bajo condiciones tales como una baja presión de vapor y mezclar la masa fermentante.
- ✓ La interfase sólido/gaseosa puede ser un buen hábitat para el rápido crecimiento de cultivos específicos de mohos, levaduras y bacterias ya sea en cultivos mixtos o puros.
- ✓ Las propiedades mecánicas de la matriz sólida pueden ser compresión estática o suave agitación como en el medio líquido. Esto requiere pequeñas partículas fibrosas o granulares las cuales no tienden a cortarse o a chocarse entre sí.
- ✓ La matriz sólida no puede contaminarse con inhibidores de actividad de índole microbiano y deben ser capaces de absorber nutrientes microbianos como carbohidratos, fuentes de nitrógeno y sales minerales.

3.2.4.1.3 Fenómenos físicos que ocurren en la fermentación en sustrato sólido

3.2.4.1.3.1 Efecto de tunelamiento

Este efecto ocurre en sustratos no inertes debido al consumo del sustrato sólido

y del agua por el enfriamiento evaporativo. Hay achicamiento del lecho (en promedio un 30%) que puede dar origen a tunelamientos que provoquen un déficit en la remoción del calor metabólico impidiendo el crecimiento fúngico y la evaporación. Esta situación se da fundamentalmente en casos donde se utiliza un hongo micelial que se propaga mediante una red hifal (Zweistra-Hoogschagen, 2007).

3.2.4.1.3.2 Transferencia de calor

La remoción del calor en FSS aireado toma lugar mediante dos mecanismos: la conducción, donde los materiales estacionarios transfieren calor como resultado de los gradientes de temperatura y la convección, donde uno de los materiales involucrados en esta transferencia, fluye.

En sistemas enfriados por conducción no mezclados, el transporte radial de agua puede limitar el crecimiento fúngico por lo que la altura del lecho no debe sobrepasar los 16 cm (Zweistra-Hoogschagen, 2007).

3.2.4.1.4 Actividad acuosa

La actividad acuosa a_w a una temperatura dada es la relación entre la presión de vapor parcial del agua de una sustancia y la presión de vapor parcial del agua en estado puro. Es decir que la a_w de un sólido es la humedad relativa con la cual está en equilibrio en el sistema que interviene en reacciones de cualquier tipo.

El líquido ligado a las partículas sólidas debe estar en una cantidad que asegure la actividad del agua adecuada para el crecimiento y el metabolismo de los microorganismos, pero sin exceder el máximo poder de retención de este líquido en la matriz sólida. El potencial del agua o la actividad del agua (a_{H_2O} o a_w) es el parámetro que se ha utilizado para caracterizar cuantitativamente el estado del agua en el sistema.

Un a_w por debajo del valor óptimo puede afectar la velocidad de crecimiento y la producción de biomasa. Este valor depende del microorganismo utilizado, en los hongos es de alrededor de 0,98 (Gervais y Molin, 2003). Por otro lado, la adición de solutos al medio disminuye en forma artificial la actividad acuosa (por ej NaCl).

Para caracterizar el sustrato “residuo pelo” utilizado en la FSS en relación a sus propiedades higroscópicas determinamos las isotermas de desorción del agua (Elíades, 2008).

3.2.4.1.4.1 Efectos de la actividad acuosa en fermentación en estado sólido

Desde un punto de vista físico el calor metabólico que se desprende y la evaporación, que contribuye al enfriamiento, disminuyen la actividad acuosa en FSS y puede llevar a la limitación del crecimiento fúngico.

Durante el cultivo, puede disminuir la tasa de reproducción del hongo en los primeros estadios del proceso, aún cuando la actividad acuosa es óptima. Este efecto puede ser atribuido al gradiente de actividad acuosa intrapartícula, en el caso en que el sustrato sea por ejemplo un sustrato no inerte con cierto volumen como el grano de trigo, o al enfriamiento evaporativo resultante del uso de aire seco. Sin embargo,

Zweistra-Hoogschagen (2007) determinó que el gradiente intrapartícula es despreciable y que la tasa de enfriamiento evaporativo puede ser la causa de la disminución del crecimiento en el comienzo del secado en la fermentación.

En fermentaciones a gran escala, una aireación forzada puede disminuir la actividad acuosa por disminución del nivel de saturación por evaporación, la formación de un gradiente de temperatura y una presión de vapor que varía axialmente.

Cuando la a_w es baja, por debajo del umbral específico del hongo, el crecimiento disminuye, se lentifica hasta detenerse, afectando la tasa de producción de las enzimas y otros productos metabólicos.

3.2.4.1.5 Determinación de biomasa

Las medidas de biomasa se basan en medidas técnicas indirectas de parámetros físicos (densidad óptica, turbidez, capacitancia) o metabólicos (respirométricos como captación de oxígeno o liberación de CO_2) relacionados al peso seco. El método tradicional de medida del peso seco, que puede resultar tedioso, se ha mejorado con la utilización de técnicas acopladas. Por ejemplo, mediante un analizador de humedad modular que consiste de un sistema de calentamiento infrarrojo con flujo de aire controlado, acoplado a una balanza de precisión electrónica con aislamiento térmico (Li y Mira de Orduña, 2010).

La viscosidad del caldo de cultivo no es una medida muy precisa ya que está influenciada por otros factores como la temperatura. Otros métodos de cuantificación como la coloración con diacetato de fluoresceína, medidas de la longitud de las hifas y su ramificación, medida del ergosterol o de la concentración de la quitina tienen una limitada aplicabilidad en la práctica.

La determinación de los sólidos miceliarios en medio líquido luego de la fragmentación del micelio por homogeneización ha sido reportada para hongos filamentosos tales como *Rhizopus oryzae*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Penicillium chrysogenum* y *Neurospora sitophila* mediante la medida de la absorbancia a 450 nm (Banerjee, Chisti y Moo-Yung, 1993).

En el caso de la determinación de biomasa de los microorganismos de efluentes líquidos, los parámetros de contaminación como la cuantificación de los sólidos suspendidos volátiles (SSV) es un método tradicional para medir la biomasa de los microorganismos. La determinación de la demanda química de oxígeno (DQO) se ha utilizado como una alternativa a esta técnica aplicada a la bacteria filamentosa *Sphaerotilus natans*. La biomasa se calculó como la diferencia entre la DQO total y la DQO soluble de la muestra (Contreras, Bertola, Gianuzzi y Zaritzky, 2002). Es aplicable para los casos en que el procedimiento de filtración en la determinación de SSV se dificulta por obstrucción, en el caso de hongos filamentosos o cuando los microorganismos tienen un diámetro muy pequeño ($<1 \mu\text{m}$).

En el caso de otros microorganismos como el plancton en muestras líquidas (ríos, cuerpos de agua) el método más común es la tinción del DNA con DAPI (4,6 diamino-2-fenilindol) y observación en microscopio de epifluorescencia (Romani, Artigas, Camacho, Graça y Pascoal, 2009).

La determinación de biomasa mediante la cuantificación de ergosterol se basa en que este lípido forma parte de la membrana celular de los hongos cuya función es impermeabilizarla. El método consiste en la extracción de los lípidos en fase sólida o mediante la separación con ciclohexano y la posterior separación del ergosterol por cromatografía líquida (Gessner y Schmitt, 1996).

En el caso de FSS, el hecho de que el micelio penetre en el sustrato y de que sea muy difícil su separación requiere de un método donde se pueda hidrolizar el sustrato y que el mismo no interfiera en la determinación de la biomasa.

Chester & Mathison (1963) fueron capaces de centrifugar diferencialmente la lana insolubilizada de la asociada con el micelio de *Streptomyces* spp. en sus cultivos haciendo posible una estimación de la lana digerida. Para el caso de *Keratinomyces ajelloi* aplicaron la solubilidad diferencial del micelio y de la lana en solución de soda cáustica para el cálculo del peso seco de la queratina consumida.

3.2.4.1.5.1. Determinación de biomasa por la medida del contenido de glucosamina

Fue determinada mediante el método de Ride y Drysdale modificado (Hours, Katsuragi y Sakai, 1994). Esta técnica se basa en que la degradación del micelio fúngico con álcali concentrado a alta temperatura produce la depolimerización parcial y desacetilación extensiva liberando un conjunto de productos insolubles (quitosán) que permanecen así al remover el álcali con diluciones sucesivas de etanol. El problema es que el quitosán posee grupos acetilos residuales que ofrecen porciones de la molécula resistentes a la desaminación y sólo algunos residuos glucosamina de la quitina se convierten en aldehído para poder medirse su concentración. Sin embargo, este número de aldehídos es constante (Ride y Drysdale, 1972; Aidoo, Hendry, Wood, 1981; Nandi, 1978).

La desaminación de la glucosamina se produce con ácido nitroso y sulfato ácido de potasio. El exceso de ácido nitroso se elimina con sulfamato de amonio. Por posterior agregado de MBTH 0,5% (cloruro de 3-metil-2 benzotiazolona hidrazona hidratado) y tricloruro férrico hexahidratado se produce una reacción de color medible a 650 nm.

3.2.4.2 Cultivos en medio líquido

Los cultivos líquidos se realizaron en batch agitado utilizando RP como inductor de síntesis enzimática en un medio mineral mínimo (Ruffin *et al.*, 1979). Se probaron distintas variables como la introducción de una fuente de hidrato de carbono (glucosa) en distintas concentraciones y el agregado de un agente reductor como el ácido tioglicólico que podría intervenir en el mecanismo de sulfitólisis del RP (Kunert, 1992) y aumentar la producción de enzimas queratinolíticas (Galarza *et al.*, 2012).

3.3 Materiales y Métodos

3.3.1 Caracterización del residuo pelo en base a sus propiedades higroscópicas: determinación de la actividad acuosa

Se caracterizó el “residuo pelo” (RP) en relación a sus propiedades de hidratación (relación entre el contenido de agua y la actividad acuosa a_w) mediante la determinación de las isotermas de desorción de agua en el rango de a_w de 1 a 0,9 (Rojas, 2004). En la práctica el medio sólido se preparó con una humedad inicial equivalente a una actividad acuosa de 1 y se asumió que en el transcurso del cultivo la humedad disminuye a un nivel crítico para el crecimiento microbiano.

3.3.1.1 Reactivos y soluciones

El RP, provisto por la curtiembre Gibaut SA (Buenos Aires, Argentina), obtenido a partir de un depilado conservador del pelo a base de sulfuro de sodio y cal, fue lavado con agua y tensioactivo aniónico en una proporción pelo: tensioactivo de 1:5 a 45°C durante 30 min, secado a 40°C durante 3 días consecutivos en estufa con circulación de aire y molido en procesadora Moulinex, La Moulinette D 56, Cormelles le Royal France (sección 2.4.3.1.I).

Posteriormente la materia grasa fue extraída con Soxhlet con diclorometano durante 40 ciclos donde, por diferencia de peso, se determinó la reducción de 10,2% (base seca) antes del lavado, a 5,6% (base seca) al final del procedimiento. El RP, el agua desionizada y el glicerol fueron esterilizados en autoclave, 20 min a 121°C.

3.3.1.2 Determinaciones analíticas: isotermas de adsorción de agua

Se pesaron 0,5 g de RP en placas de Petri pequeñas ($\varnothing = 50$ mm, $h = 10$ mm) y se esterilizaron durante 15 min a 120°C. Previamente se determinó el volumen de saturación del sustrato ($a_w=1$) equivalente a 1,1 ml de agua. Se agregó a cada placa dicho volumen de agua desionizada estéril. Se preincubaron las placas durante 24 h en estufa a 25°C en recipientes herméticos para que el RP se embebiera de agua a saturación. Luego se colocaron las placas (por triplicado) en sendos recipientes herméticos donde a través de distintas mezclas glicerol-agua (estériles) se lograron las distintas humedades relativas o a_w deseadas, calculadas mediante la ley de Raoult:

$$a_w = \frac{n_1}{n_1 + n_2}$$

donde: n_1 : moles de H₂O o humedad relativa; n_2 : moles glicerol

Se incubaron los recipientes con las placas 15 días a 25°C en estufa para establecer el equilibrio. Luego se determinó por gravimetría a 80°C el contenido de agua remanente del sustrato (3 medidas consecutivas) y se expresó como g de agua retenida/g de RP seco o g H₂O/ g de material seco (Rojas, 2004).

3.3.2 Cultivo o fermentación en sustrato sólido (FSS)

3.3.2.1 Reactivos y soluciones

La azocaseína y MBTH 0,5% p/v (cloruro de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona hidratado) utilizados fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Co (St. Louis, MO, USA).

El medio mineral mínimo (MMM) tuvo la siguiente composición: 496 mg/l de NaH_2PO_4 , 2486 mg/l de K_2HPO_4 , 16 mg/l de FeCl_3 , 13 mg/l de ZnCl_2 , 110 mg/l de CaCl_2 (sección 2.4.1.3 II; Ruffin *et al.*, 1979).

El RP y RPT (residuo pelo pretratado) fueron preparados como se describió en la sección 2.4.3.1.I. Para los cultivos con RPT, la materia grasa fue extraída con Soxhlet (sección 3.3.1.1). Posteriormente fue sometido a un tratamiento de sulfitado con solución de Na_2SO_3 0,05 M durante 5 h con agitación en agitador orbital Kline (Vicking SA, CABA, Argentina) a 100 rpm, a temperatura ambiente. Finalmente, el material así obtenido se enjuagó y se secó en estufa a 40°C y se molió.

El sustrato epidermis se obtuvo por el procedimiento indicado por Buechler y Lollar (1949; 1950) (Cantera, Goya, Galarza, Garro y López, 2003). Las piezas de piel bovina fresca fueron conservadas a 5°C, lavadas y tratadas con una solución de NaCl 5%, en una relación sal/piel: 3:1.

Una vez que la epidermis se aflojó, el pelo fue cortado a una altura de 2 a 3mm. Mediante este procedimiento la epidermis pudo ser desprendida con una espátula de la dermis junto al pelo y los folículos pilosos. Luego que el material recogido fuera lavado entre 3 a 4 veces con agua destilada hasta reacción negativa de cloruros, se filtró con papel Whatman n° 41 y se secó a 30°C. El sólido obtenido fue desengrasado con dicloroetileno en Soxhlet, molido, tamizado y recogida la fracción menor a 300 μm .

3.3.2.2 Microorganismo utilizado, preparación del inóculo

A partir de la cepa *Trichophyton ajelloi* (sección 2.6), conservada en AGS adicionado con cloranfenicol 0,5 g/l, se realizaron repiques en Erlenmeyer de 125 ml en el mismo medio de cultivo. Al cabo de 7 días de incubación en estufa a 28°C, se agregaron 10 ml de MMM y se agitó con un buzo en agitador magnético para desprender los conidios fúngicos y micelio aéreo. La suspensión obtenida tuvo una concentración de 10^4 ufc/ml mediante recuento en placa de AGS al cabo de 48 h de incubación en estufa a 28°C.

3.3.2.3 Cultivos sólidos con Residuo Pelo y Residuo Pelo Tratado

Los cultivos se llevaron a cabo en placas de Petri de vidrio ($\text{Ø} = 100$ mm, h = 20 mm) con 5 g de RP y RPT. El conjunto se esterilizó en autoclave a 121°C, 20 min y posteriormente se agregaron 10 ml de MMM (sección 2.4.1.3 II) con 1 ml de inóculo. Las placas se incubaron durante 28 días en atmósfera húmeda en estufa de cultivo a 28°C.

3.3.2.4 Extracción proteico-enzimática y determinación de la biomasa

A partir de los cultivos en FSS se obtuvieron los extractos enzimáticos. Comenzando por el día 0, se retiraron tres cajas por vez, a intervalos de siete días de manera de tener cinco puntos de la curva de crecimiento (0, 7, 14, 21 y 28 días) para cada sustrato.

Se procesaron las placas tomando 5 g de sustrato inoculado homogeneizado y se agregaron 30 ml de NaCl 0,5 N, se agitó a 100 rpm durante 15 min. La extracción a esta concentración fue determinada previamente como la que produjo un mayor rendimiento enzimático.

El RP fue separado del EC por filtración a través de membrana de 0,45 μm y prefiltro de fibra de vidrio, determinando el volumen y el pH. Los extractos obtenidos fueron fraccionados y guardados a -20°C hasta su posterior análisis.

Por otro lado, parte del cultivo con RP se secó a peso constante para la determinación de la biomasa.

3.3.2.5 Determinaciones analíticas

En los EC obtenidos a lo largo del cultivo se determinaron la concentración proteica y las actividades enzimáticas frente a los siguientes sustratos: azocaseína (proteolítica), epidermis bovina y residuo pelo bovino (queratinolíticas). La biomasa se determinó por la técnica de la glucosamina que se describe a continuación.

3.3.2.5.1 Técnica de la Glucosamina para la determinación de biomasa

En experiencias previas se adaptó la técnica de la sección 3.2.4.1.5.1 utilizando RP inoculado y sin inocular y se determinó que el RP no interfería en la determinación del contenido de glucosamina de la biomasa fúngica.

3.3.2.5.1.1 Extracción de glucosamina

El RP con crecimiento fúngico visible (3.3.2.4) fue secado a peso constante (115 mg – 45 mg) y colocado dentro de tubos Corex de 30 ml. Se lavó con acetona, se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min a 2°C . Se eliminó el sobrenadante por succión con trampa de vacío. El residuo sólido se lavó con 5 ml de H_2O , se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min a 2°C y se eliminó el sobrenadante por succión con trampa de vacío. Al residuo sólido se le agregaron 3 ml de KOH concentrado (120 g KOH en 100 ml de H_2O) y se mantuvo a 130°C en un digestor durante 1 h con agitación frecuente y rotando los tubos cada 10 min. Se enfrió en baño de H_2O -hielo, se agregaron 5 ml de etanol 75% v/v frío, se agitó en vórtex hasta lograr una fina emulsión y se dejó 15 min en baño de H_2O -hielo. Se agregó 1ml de suspensión de Celite (descargando suavemente por la pared del tubo), se centrifugó a 6000 rpm, 10 min a 2°C y se eliminó el sobrenadante por succión con trampa de vacío. Se lavó el residuo sólido con etanol

40% v/v, se centrifugó a 6000 rpm 10 min, a 2°C eliminando el sobrenadante. Este lavado se repitió dos veces más con H₂O helada. El residuo se resuspendió en 1,5 ml de H₂O.

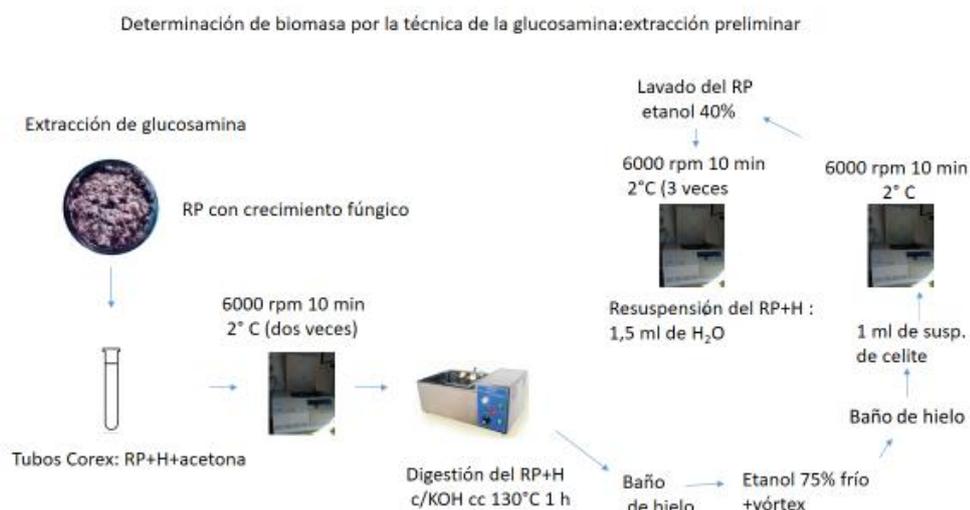


Figura 3.3 Determinación de biomasa por la técnica de la glucosamina: extracción preliminar

3.3.2.5.1.2 Técnica colorimétrica

A 1,5 ml del pellet lavado se le agregaron 1,5 ml de NaNO₂ 5% p/v y 1,5 ml de KHSO₄ 5% p/v. Se agitó durante 15 min y se centrifugó a 6000 rpm 10 min a 2°C. A 1,5 ml del sobrenadante (diluir si es necesario) se le agregó 0,5 ml de sulfamato de amonio 12,5% p/v. Se agitó 5 min con vórtex y se agregaron 0,5 ml de MBTH 0,5%. Se hirvió la mezcla 5 min, se enfrió en H₂O-hielo y se agregó FeCl₃.6H₂O 0,83% p/v. Las muestras de reacción se dejaron 30 min a temperatura ambiente y se determinó su absorbancia a 650 nm.

3.3.2.5.1.3 Curva de calibración

La curva de calibración se realizó a partir de una solución patrón de glucosamina de 200 mg/l en el rango de concentración de 0, 10, 20, 30, 40 mg/l.

El contenido de biomasa se expresó en mg de glucosamina por gramo de peso seco del cultivo.

3.3.2.5.2 Determinación de la concentración proteica

Fue determinada por el método de Bradford (1976).

3.3.2.5.3 Determinación de actividades enzimáticas

3.3.2.5.3.1 Determinación de actividad azocaseinolítica

La actividad azocaseinolítica fue determinada usando el sustrato azocaseína (sulphamide azocasein, Sigma Chem. Co., St. Louis, MO). La mezcla de reacción que contenía 250 µl de 1% (w/v) del sustrato en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 9 y 100 µl de EC, se incubó a 37°C durante 30 min. La reacción se detuvo por el agregado de 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10% (p/v) y posterior centrifugación a 3000xg durante 15 min. Luego a 0,9 ml del sobrenadante se le agregó 1 ml de NaOH, se agitó y se midió a 440 nm (por triplicado). Para el blanco se realizó el mismo procedimiento inactivando el EC por calentamiento a 100°C por 5 min (Liggieri, 2005).

La unidad de actividad azocaseinolítica ($U_{act\ azoc}$) se definió como la cantidad de enzima que bajo las condiciones de reacción produjo un incremento de 0,1 Abs_{440nm} por minuto. La actividad azocaseinolítica específica se expresó como $U_{act\ azoc}/mg$ de proteína soluble.

3.3.2.5.3.2 Determinación de actividad queratinolítica frente a RP

Esta determinación fue puesta a punto como una adaptación de las técnicas descritas por Yamamura *et al.* (2002a) y Yu *et al.* (1968).

El procedimiento se llevó a cabo de dos maneras distintas debido a que se tomaron en cuenta ventajas operativas en la reducción de la cantidad de sustrato y volumen de la mezcla de reacción.

Procedimiento I

La mezcla de reacción donde se colocaron 40 mg de RP (0,5% P/V) (2.4.3.1.I) tamizado por tamiz de 850 µm (USA Standard ASTM E 11-61) y esterilizado en autoclave a 121°C por 15 min, se incubó con 8 ml de buffer bórax 0,025 M, pH 9 y 500 µl de EC a 37°C en baño termostático durante 30 min en agitación horizontal a 100 rpm. La reacción se detuvo por filtración y la absorbancia del filtrado fue determinada a 280 nm. El blanco de reacción se realizó en forma instantánea en baño de hielo y mediante filtración del tubo de reacción, sin incubación previa.

Procedimiento II

La mezcla de reacción donde se colocaron 20 mg de RP (1% P/V), se incubó con 2 ml de buffer Tris-HCl 0,1 M pH 9 y 150 µl de EC a 37°C en baño termostático durante 60 min en agitación orbital a 100 rpm. La reacción se detuvo por la adición de 1 ml de TCA 10% (p/v) y posterior centrifugación a 5000 rpm durante 15 min. La absorbancia del sobrenadante fue determinada a 280 nm. El blanco de reacción se realizó agregando 1 ml de TCA 10% (p/v) al comienzo de la incubación. La inactivación por calor del EC no demostró diferencias significativas en la absorbancia

entre el blanco y la muestra de reacción.

La unidad de actividad queratinolítica ($U_{act\ quer}$) se definió como la cantidad de enzima que, bajo las condiciones de reacción, causa un incremento de 0,01 Abs_{280 nm} por min (Galarza, Goya, Garro, Mercerat, Hours, Cantera, 2006; Galarza *et al.*, 2014). La actividad queratinolítica específica se expresó como $U_{act\ quer}$ /mg de proteína soluble.



Figura 3.4. Determinación de actividad queratinolítica frente a RP (Procedimiento II) (representación esquemática)

3.3.2.5.3.3 Determinación de la actividad queratinolítica frente a epidermis bovina

La mezcla de reacción donde se colocaron 40 mg de “sustrato epidermis” obtenido como se describió en la sección 3.3.2.1, se incubó con 3,8 ml de Tris-HCl 0,1 M pH 9, 200 µl de extracto enzimático y 10 µl de tensioactivo no-iónico 10% (P/V) para favorecer la humectación del sustrato, a 37°C durante 60 min en equipo de agitación magnética individual (Variomag Electronicrührer, Alemania, sección 2.3.2.2.V). La reacción se detuvo por la adición de 1 ml de TCA 10% (p/v) y posterior centrifugación a 5000 rpm 15 min. La absorbancia del sobrenadante fue determinada a 280 nm. El blanco de reacción se realizó agregando 1 ml de TCA 10% (p/v) al comienzo de la incubación.

La unidad de actividad epidermis ($U_{act\ epi}$) se definió como la cantidad de enzima que bajo las condiciones de reacción produjo un incremento de 0,01 Abs_{280 nm} por minuto (Cantera *et al.*, 2003). La actividad epidermolítica específica se expresó como $U_{act\ epi}$ /mg de proteína soluble.

3.3.3 Cultivos en medio líquido

3.3.3.1 Reactivos y soluciones

El medio mineral mínimo (MMM) se describió en sección 2.4.1.3.II. La glucosa y el ácido tioglicólico fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Co (St. Louis, MO, USA). DTNB (ácido 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoico) de Fluka Biochemika para Sigma-Aldrich Co (Buchs, Alemania). Para la determinación de amonio se preparó una solución de nitroprusiato de sodio 0,016% en fenol al 1% (reactivo 1) y de hipoclorito de sodio 0,055% en medio alcalino (NaOH 2%) con buffer NaH_2PO_4 3,47% (reactivo 2). Se realizó una curva de calibración con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ en un rango de concentración 2 a 200 ppm.

3.3.3.2 Microorganismo utilizado, preparación del inóculo, condiciones de los cultivos

La cepa utilizada fue *Trichophyton ajelloi* (sección 2.3.2) y la preparación del inóculo fue la misma que en la sección 3.3.2.2.

Los cultivos se realizaron en Erlenmeyers de 500 ml con 200 ml de MMM y 1% P/V de RP. El conjunto se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min (Galarza *et al.*, 2012). Posteriormente se inocularon con 1 ml de la suspensión de conidios del inóculo fúngico.

Para probar el efecto de distintas concentraciones de glucosa en la producción enzimática se agregaron distintos volúmenes de una solución stock de glucosa de 10 g/l estéril, de manera de tener soluciones resultantes de 2,5 g/l (2); 5 g/l (3); 10 g/l (4). Asimismo, se realizaron cultivos con MMM sin ningún aditivo (1) y con ácido tioglicólico 5 mM (5).

Los cultivos se incubaron a 28°C en cuarto estufa y se agitaron en agitador orbital a 100 rpm (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) durante 28 días en total. A diferentes tiempos de cultivo, se tomaron 2 ml de cada serie y se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se filtró (EC) a través de filtro de nitrocelulosa de 0,45 μm en baño de hielo y se conservó a -20°C hasta la determinación de los diferentes parámetros a evaluar.

3.3.3.3 Determinaciones analíticas

3.3.3.3.1 Determinación de la concentración proteica

Según la sección 3.3.2.5.2.

3.3.3.3.2 Determinaciones de actividad enzimática

Se determinaron la actividad azocaseinolítica y queratinolítica según las secciones 3.3.2.5.3.1 y 3.3.2.5.3.2.II, respectivamente.

3.3.3.3.3 Determinación de analitos remanentes y productos de reacción

Se determinaron las concentraciones de: glucosa remanente, mediante un kit comercial de glucemia enzimática (Wiener), ión amonio colorimétrico (reacción de

Berthelot) (Rojas, Cavalitto, Mignone y Hours, 2008), sulfhidrilos en los sobrenadantes del EC y de la determinación de actividad queratinolítica y sulfatos.

3.3.3.3.1 Determinación del contenido de sulfhidrilos

La concentración de sulfhidrilos se determinó como una medida de la actividad de ruptura de puentes disulfuro, postulada como un primer paso en la degradación de la queratina. Se utilizó el método de Ellman (1959), modificado según el catálogo Uptima (Almoazen, Battacharjee, Samsa y Pate, 2010), basado en la reacción con el reactivo DTNB (ácido 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoico) 2 mM disuelto con AcNa 50 mM en buffer Tris-HCl 1 M pH 8.

En la mezcla de reacción se agregaron 50 µl de solución-mezcla de DTNB 2 mM- 50 mM NaAc, 100 µl de Tris-HCl 1 M pH 8 y 840 µl de H₂O. Luego de mezclar se pasó a la cubeta del espectrofotómetro, se agregaron 10 µl de muestra, se incubó 5 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 412 nm.

La concentración de SH⁻ se expresó en µmoles/l calculada a partir de la ley de Lambert-Beer.

3.3.3.3.2 Determinación de sulfatos

La concentración de sulfatos en el sobrenadante del EC se determinó por la técnica turbidimétrica (Greenberg, Clesceri y Eaton, 1992) con algunas modificaciones. El método se basa en la precipitación cuantitativa de sulfato en presencia de BaCl₂, la turbidez resultante se mide a 450 nm. Se preparó una solución buffer conteniendo: 7,5 ml de glicerina, 4,5 ml de HCl, 45 ml de H₂O destilada, 15 ml de etanol 96°, 11,25 g de NaCl para estabilizar la solución y minimizar interferencias. A la muestra (previamente centrifugada a 5000 rpm, 20 min) y el patrón, diluidos en la solución buffer y H₂O, se les agregó una pizca de BaCl₂, se agitó en vórtex durante 1 min y se midió la turbidez en espectrofotómetro a 450 nm a intervalos de 30 s durante 4 min. La lectura mayor es la que se tomó como válida. La curva de calibración se preparó a partir de una solución patrón 1000 ppm de Na₂SO₄ y se realizaron dos curvas de calibración, para concentraciones menores y mayores de Na₂SO₄ (0-40 ppm y 20-80 ppm) respectivamente.

3.3.4. Comparación de la producción de enzimas y proteínas a partir del cultivo en dos medios líquidos distintos

Con el objetivo de lograr una mayor producción de enzimas proteolítico-queratinolíticas se ensayaron cultivos en dos medios líquidos minerales con distinta composición. Se comparó la producción enzimática entre el MMM utilizado previamente y el descrito por Vázquez, Aguilera, Prado-Barragán y Aguilar (2008).

3.3.4.1 Reactivos y soluciones

Se utilizó medio mineral mínimo MMM (descrito en sección 3.2.2.1) que se nombró como MMM₁ y otro medio mineral mínimo cuya composición fue: NaNO₃ (0,25%), KH₂PO₄ (0,1%), MgSO₄·7 H₂O (0,05 %), KCl (0,05%) (MMM₂). El segundo medio tenía aporte de N a diferencia del MMM. La proporción de RP fue de 1% P/V para los dos medios.

3.3.4.2 Microorganismo utilizado, condiciones de cultivo y procesamiento de las muestras

La cepa utilizada, las condiciones de cultivo y procesamiento de las muestras para su análisis fueron la de la sección 3.3.3, salvo que la incubación duró 30 días en agitación orbital (120 rpm) a 28°C. Se extrajeron muestras cada 3 días, que fueron centrifugadas, separado el sobrenadante y conservado a -20°C para su posterior análisis.

3.3.4.3 Determinaciones analíticas

En la determinación de concentración proteica y de actividad azocaseinolítica se siguieron los protocolos descritos en 3.3.2.5.2 y 3.3.2.5.3.1 respectivamente.

3.3.5 Acción de agentes reductores en la producción de proteasas en cultivos en medio sólido y líquido

3.3.5.1 Reactivos y soluciones

Los agentes reductores utilizados fueron los siguientes: clorhidrato monohidrato de L-cisteína (Biopack, Buenos Aires, Argentina); tioglicolato de sodio (Sigma-Aldrich Co (St. Louis, MO) y sulfito de sodio (Anal. Quim, Especialidades Químicas, Buenos Aires, Argentina). El MMM utilizado se describió en 3.3.2.1. El RP se preparó según 3.3.1.1.

3.3.5.2 Microorganismo utilizado, condiciones de cultivo y procesamiento de las muestras

La cepa fúngica y la preparación del inóculo se describieron en 3.3.2.2. Los cultivos se desarrollaron en medio sólido (FSS) (3.3.2.3) y en medio líquido (CML) (3.3.3.2) (Galarza *et al.*, 2012).

Para cada tipo de cultivo (por duplicado) se adicionaron los agentes reductores cuyas concentraciones finales en el medio mineral fueron de 5 mM de (1) hidrocloreto de L-cisteína monohidratado; (2) tioglicolato de sodio; (3) sulfito de sodio. En paralelo se realizaron en las mismas condiciones experimentales, cultivos en medio mineral mínimo sin agente reductor como control para comparar el rendimiento. La incubación se realizó a 28°C en estufa con atmósfera húmeda durante 28 días. Para el FSS fueron retiradas dos placas de cultivo cada tres días, y se procedió a la extracción enzimática

sección (3.3.2.4). En ambos casos el EC obtenido fue filtrado en vacío a través de una membrana de celulosa de 0,45 μm en baño de agua-hielo y conservado a -20°C hasta su posterior análisis.

3.3.5.3 Determinaciones analíticas

En la determinación de concentración proteica y de actividad azocaseinolítica se siguieron los protocolos descritos en 3.3.2.5.2 y 3.3.2.5.3.1 respectivamente.

3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1 Caracterización del residuo pelo en base a sus propiedades higroscópicas: determinación de la actividad acuosa

En el ensayo en que se determinó la curva de desorción de agua para el RP se obtuvieron los siguientes resultados (Figura 3.5).

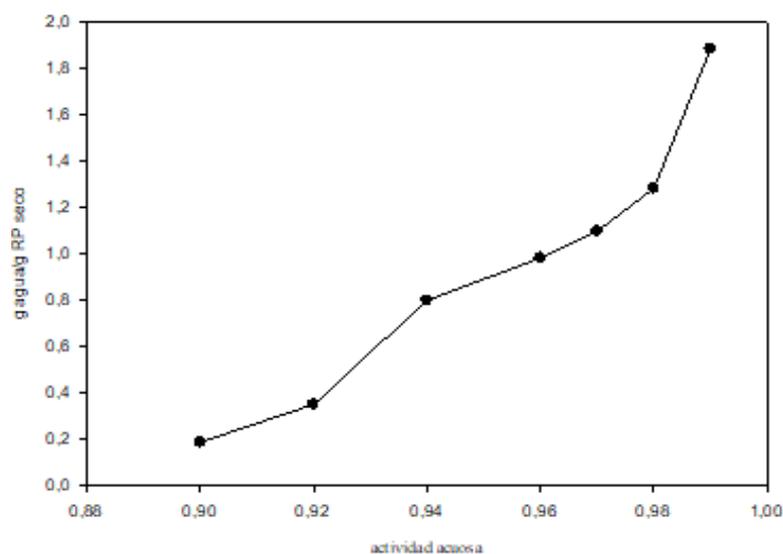


Figura 3.5 Isoterma de desorción de RP

Se determinó que para lograr un valor de a_w de 0,98 como mínimo aceptable para los cultivos fúngicos, la humedad del medio debe ser mayor o igual a 1,2828 g de agua/g de RP seco. Este valor de a_w fue utilizado en los cultivos en FSS (ver sección 3.3.2) para asegurar el desarrollo fúngico.

3.4.2. Cultivos en FSS: determinación de la variación de la biomasa

La variación del contenido de biomasa de glucosamina de los cultivos FSS sobre RP y RPT en función del tiempo se observa en la Figura 3.6.

El hongo mostró poco desarrollo en el RP pretratado, comparado con el no tratado; esta diferencia se hace más notoria a partir del día 14 de cultivo.

El desarrollo de la biomasa en el pelo sin tratar (RP) mostró un crecimiento en dos fases, similar a un fenómeno de diauxia. El hongo creció lentamente hasta el día 14, utilizando probablemente pequeñas cantidades de sustrato (queratina blanda) liberada en el autoclavado. A partir del día 14 al 21 se observó una tasa de crecimiento mayor. Luego de este período disminuyó su crecimiento hasta el día 28, hecho que podría deberse a un proceso de autólisis típico del final del cultivo.

La diferencia del desarrollo de la biomasa en ambos cultivos puede deberse a que en RPT el pretratamiento del pelo elimina el material lipídico que podría ser una fuente de C y energía para el hongo, material más fácilmente asimilable que la queratina.

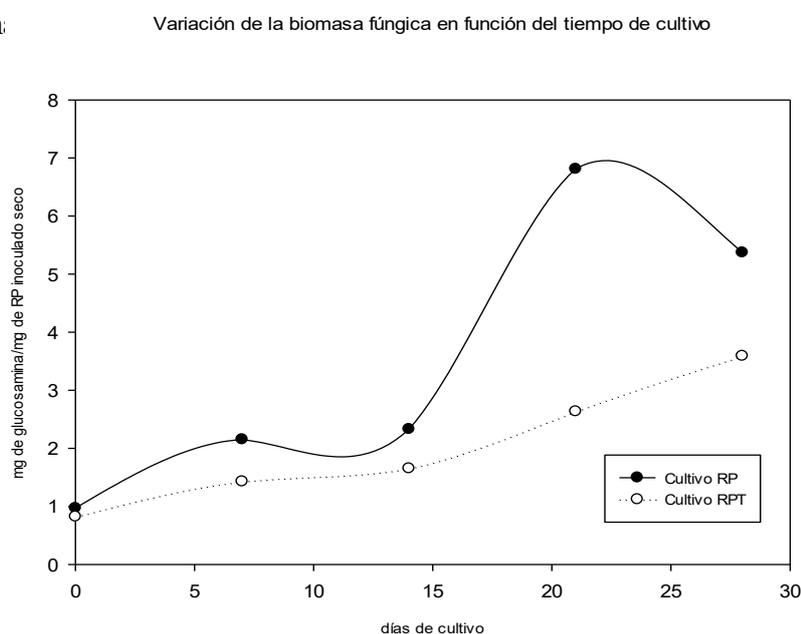


Figura 3.6. Variación de la biomasa de los FSS en RP y RPT en función del tiempo de cultivo (expresada como mg de glucosamina / g de neso seco del cultivo)

Determinación de la variación en el contenido de proteínas del EC

Las proteínas solubles del extracto tienen dos orígenes, por un lado, las proteínas del metabolismo fúngico liberadas (principalmente exoenzimas) y por otro, fracciones proteicas derivadas de la queratina del pelo, liberadas por acción de las queratinasas del hongo. Como el método utilizado fue el de Bradford que mide proteína nativa, puede inferirse que el componente debido a las fracciones proteicas solubilizadas es mínimo.

En la Figura 3.7 se observa la variación de la concentración de proteínas solubles de los cultivos sobre RP y RPT en función del tiempo.

Hasta el día 14, en ambos medios (RPT y RP) se incrementó la concentración proteica de manera similar. En el RPT, el aumento de biomasa a partir de ese día estaría

dado a expensas de las proteínas queratínicas más fácilmente accesibles del RP, hecho que explicaría la disminución de la concentración proteica.

El comportamiento del cultivo en el RP mostró que a partir del día 14, la concentración proteica del medio aumentó en la misma forma que el aumento de la biomasa con el consiguiente aumento del metabolismo fúngico y degradación enzimática de la queratina.

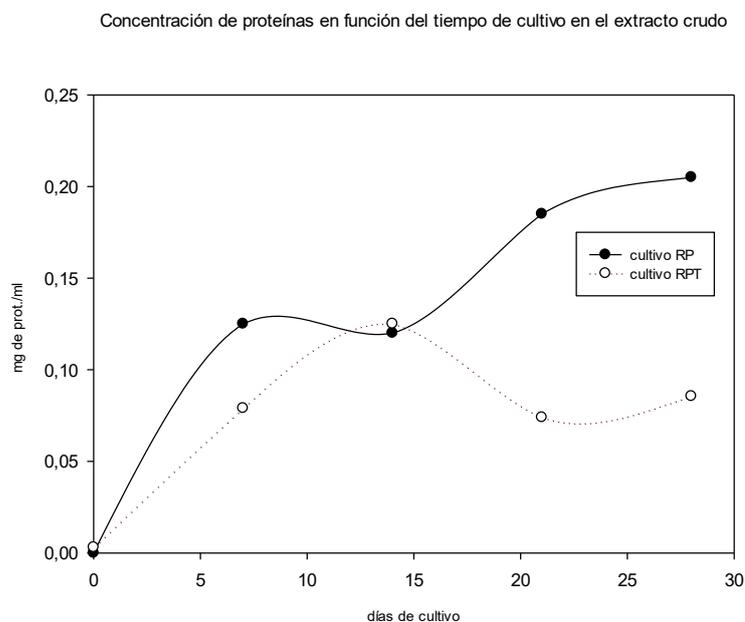


Figura 3.7. Variación de la concentración de proteínas solubles de los FSS en RP y RPT en función del tiempo de cultivo

Determinación de la variación en la producción enzimática del EC

En las Figuras 3.8 a 3.10 se observan las variaciones de las actividades enzimáticas sobre los tres diferentes sustratos proteicos: residuo pelo, azocaseína y sustrato epidermis en función del tiempo de cultivo sobre RP y RPT.

En los EC de los cultivos en RPT las actividades frente a residuo pelo, epidermis y azocaseína aumentaron hasta el día 21 y luego disminuyeron hasta el día 28 (Figuras 3.8 y 3.10 respectivamente). Es decir que la producción de las queratinas estaría asociada al crecimiento del hongo. La actividad azocaseinolítica tuvo un pico en el día 14 y luego disminuyó hasta el final del cultivo. La síntesis de las enzimas proteolíticas podría estar inducida por la disminución de las fracciones proteicas que fueron solubilizadas durante el autoclavado (Figura 3.9).

En los EC de los cultivos en RP se observó que las actividades frente a RP y a sustrato epidermis aumentaron hasta el día 14, luego disminuyeron hasta el día 28 para el primer sustrato y permanecieron constantes para el segundo (Figuras 3.8 y 3.10 respectivamente). Esta situación demuestra las diferentes especificidades enzimáticas expresadas de acuerdo a la distinta composición de las queratinas del pelo y de la epidermis, las distintas disponibilidades de nutrientes y/o inductores. La actividad

frente a azocaseína aumentó hasta el día 7, disminuyó luego hasta el día 14 y continuó aumentando hasta el final del cultivo. A partir del día 14 decreció la síntesis de queratinasas y aumentó la de las proteasas. En esta situación disminuye la solubilización de péptidos a partir de la médula y del córtex del pelo. La acción de enzimas que actúan contra la epidermis y el pelo sería requerida para proveer los sustratos solubles de las enzimas proteolíticas.

Actividad queratinolítica específica en función del tiempo de cultivo

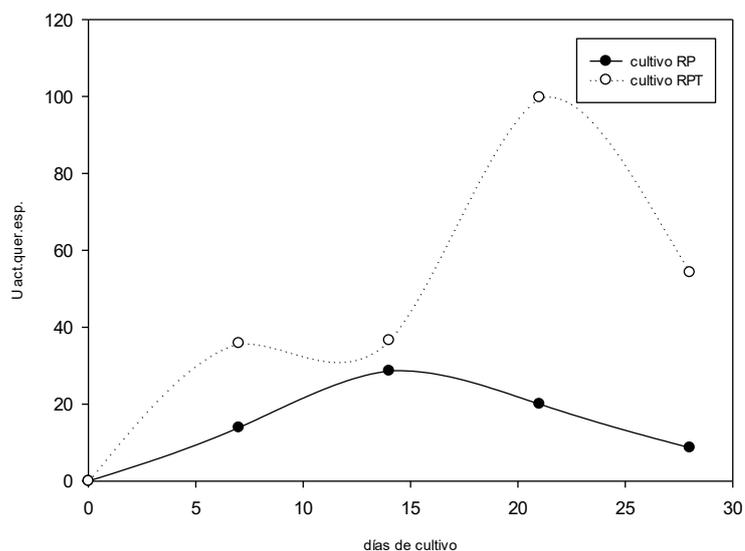


Figura 3.8. Variación de la actividad queratinolítica de los EC de los FSS en RP y RPT en función del tiempo de cultivo expresada como $U_{act\ quer}/mg$ de proteínas de EC

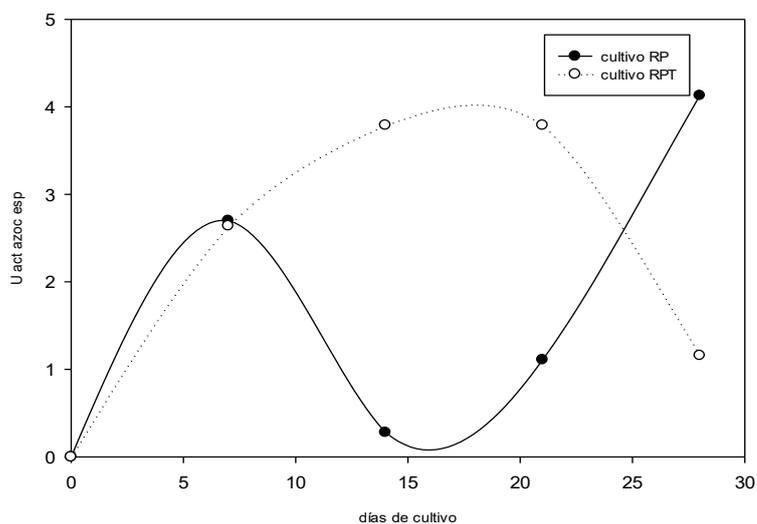


Figura 3.9. Variación de la actividad azocaseinolítica de los EC de los FSS en RP y RPT en función del tiempo de cultivo expresada como $U_{act\ azoc}/mg$ de proteínas

Actividad epidermolítica específica en función de tiempo

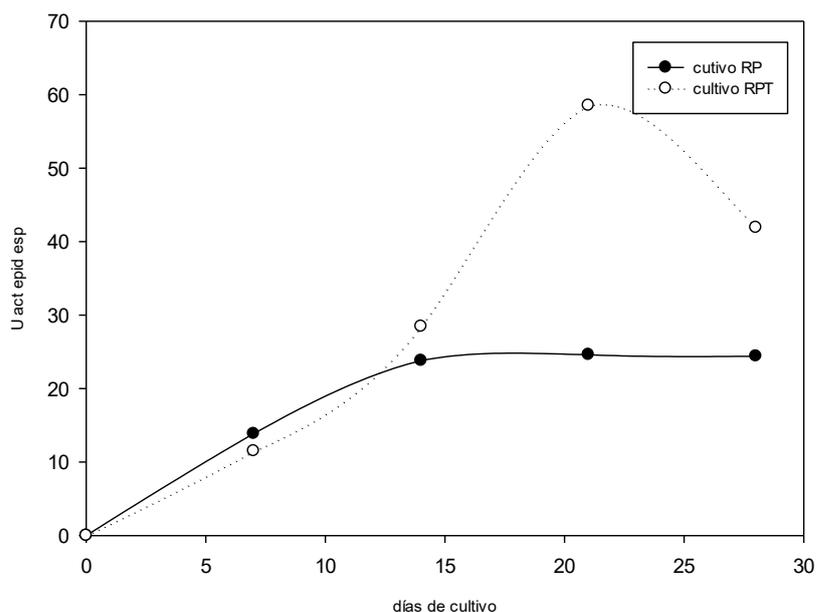


Figura 3.10. Variación de la actividad frente a sustrato epidermis de los EC de los FSS en RP y RPT en función del tiempo de cultivo expresada como $U_{act\ epi}/mg$ de proteínas

Las actividades enzimáticas detectadas en el EC del cultivo sobre RP y RPT fueron similares hasta el día 14 salvo para la actividad azocaseinolítica.

A partir de este día la biomasa, el contenido proteico y la actividad azocaseinolítica del EC proveniente del RP aumentaron y fueron mayores que las del EC de RPT.

En cambio, en ese mismo período (día 14 al 28), el EC del RPT demostró mayor actividad frente a sustrato epidermis y a “residuo pelo” que el EC del RP, llegando al pico máximo a los 21 días y disminuyendo su actividad hasta el día 28.

3.4.3 Cultivos en medio líquido

Determinación de la variación en la concentración proteica

La variación de la concentración proteica del EC a lo largo del tiempo según las distintas condiciones de cultivo se observa en la Figura 3.11.

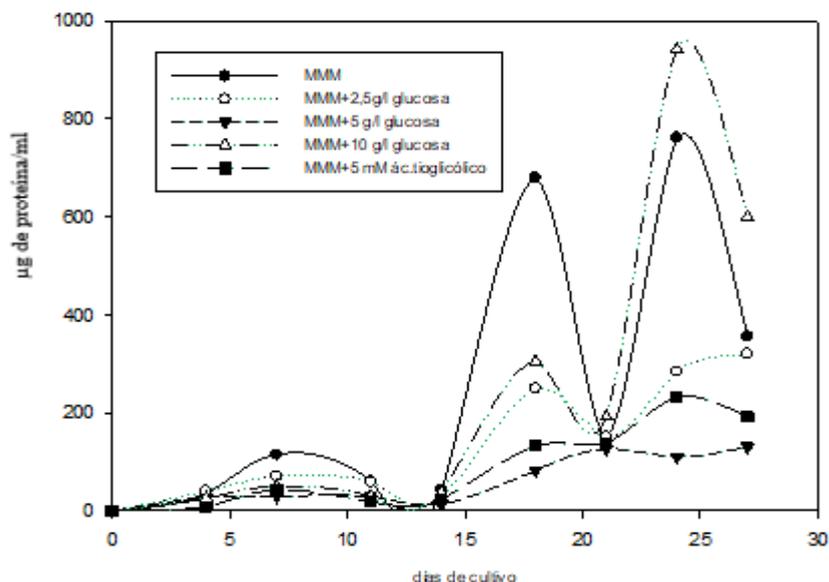


Figura 3.11.- Variación de la concentración de proteínas de los diferentes EC en función del tiempo de los cultivos líquidos

La mayor concentración proteica (proveniente tanto de la producción enzimática como de fragmentos de queratina hidrolizados) se encontró en el día 24 de cultivo (941 µg/ml) en el medio con 10 g/l glucosa.

Determinación de la variación de la actividad enzimática

La mayor producción de enzimas proteolíticas en el EC de las distintas condiciones de cultivo se observó el día 25 en el medio mineral adicionado con 10g/l de glucosa (medio 4) donde la actividad azocaseinolítica superó en 24,4 $U_{act.azoc.}$ el valor en los demás medios para el mismo día (Figura 3.12).

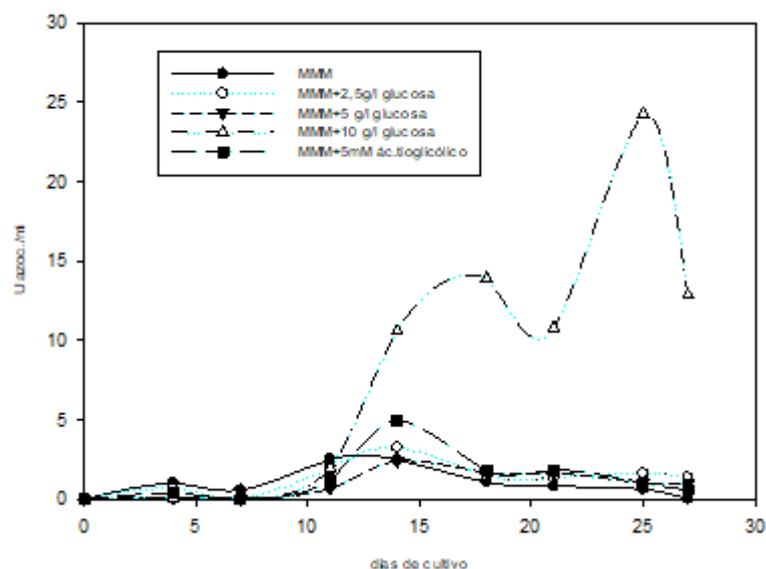


Figura 3.12.- Variación de la actividad azocaseinolítica en los diferentes EC en función del tiempo de los cultivos líquidos

La mayor actividad queratinolítica de los sobrenadantes se produjo en los días 14 y 28 de cultivo en el medio mineral adicionado con 5 mM de ácido tioglicólico (Figura 3.13). el efecto de este agente reductor se desarrolla en 3.4.5.

La adición de glucosa actuó como inductor positivo en la síntesis de enzimas queratinolíticas, posiblemente al aumentar la generación de biomasa, constituyendo una alternativa eficiente para la producción enzimática. Matikevičienė *et al.* (2011) reportó que la producción de queratinasas en un medio adicionado con glucosa no se ve reprimido sino débilmente disminuido. Por el contrario, Meevootison *et al.* (1979), demostraron que los hidratos de carbono reprimen su síntesis.

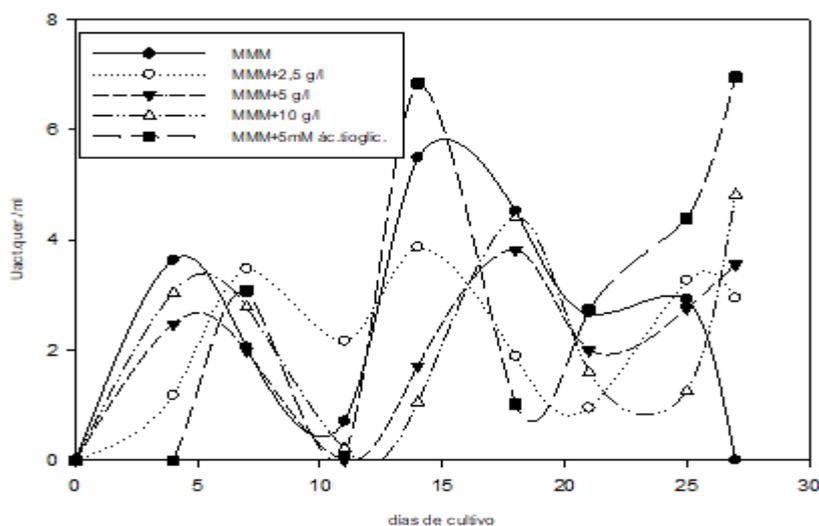


Figura 3.13.- Variación de la actividad queratinolítica en los diferentes EC en función del tiempo de los cultivos líquidos

Determinación de la variación de analitos remanentes y productos de reacción

Glucosa remanente

En cuanto a la glucosa remanente en el EC, se observa en la Figura 3.14 que en el día 4 de cultivo la concentración de glucosa cayó abruptamente en los medios con 2,5 g/l y 5 g/l de glucosa mientras que el mínimo valor se alcanzó el día 11 para el medio con 10 g/l.

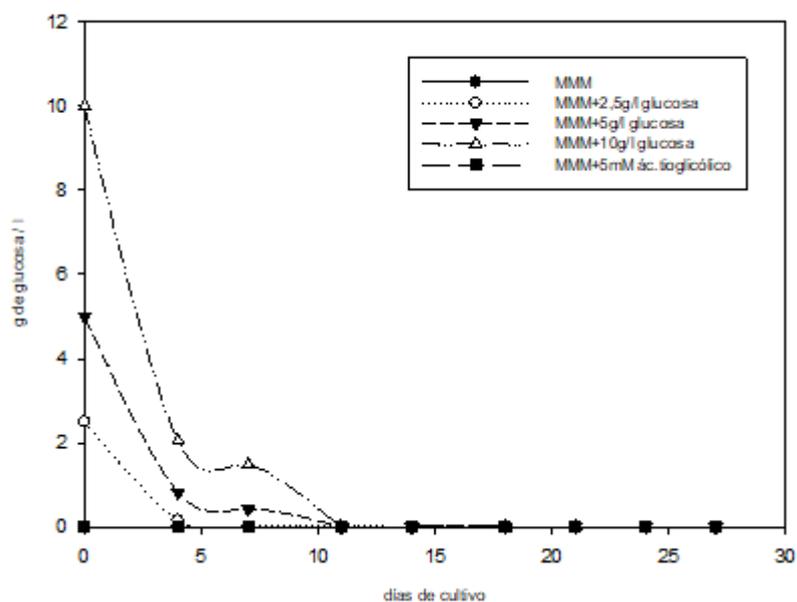


Figura 3.14.- Glucosa remanente en los diferentes EC en función del tiempo de los cultivos líquidos

Producción de amonio

El ión amonio de los sobrenadantes de los cultivos, llegó a su concentración máxima en el día 28 de cultivo en el medio mineral adicionado con ácido tioglicólico 5mM (Figura 3.15). Esto se pudo deber al efecto reductor de puentes disulfuro del ácido tioglicólico facilitando la proteólisis y amonólisis (Burack y Knight, 1958). La alta concentración de amonio (actividad exopeptidasa) liberado en la degradación de la queratina no interfirió en la síntesis enzimática.

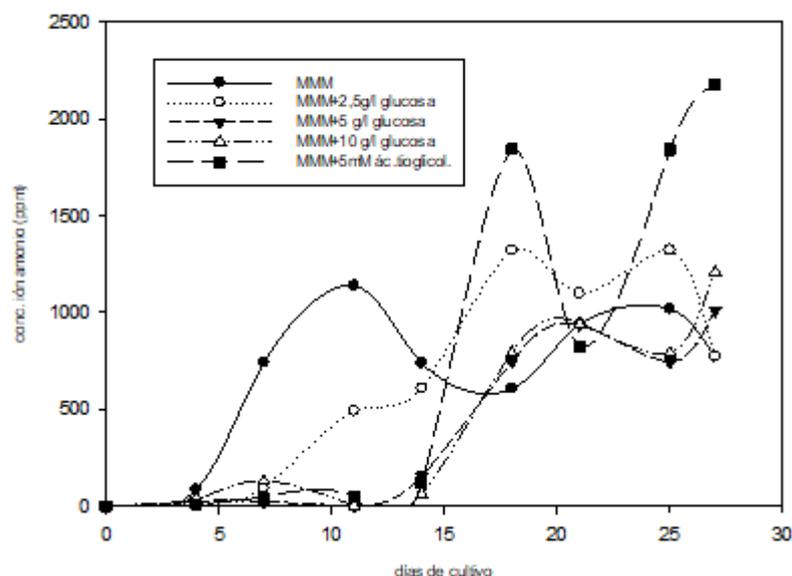


Figura 3.15.- Variación de la producción de ión amonio en los diferentes EC en función del tiempo de los cultivos líquidos

Producción de sulfhidrilos libres

La concentración de sulfhidrilos libres en el sobrenadante del cultivo y en el de la actividad queratinolítica se pudo medir en todas las muestras y evidenció una hidrólisis del aminoácido cistina presente en las uniones transversales intra e intercadena de la molécula de queratina. La mayor concentración de sulfhidrilos en el sobrenadante del extracto crudo se produjo en los días 7 y 21 de cultivo en el medio mineral sólo y en el adicionado con 10 g/l glucosa, respectivamente (Figura 3.16).

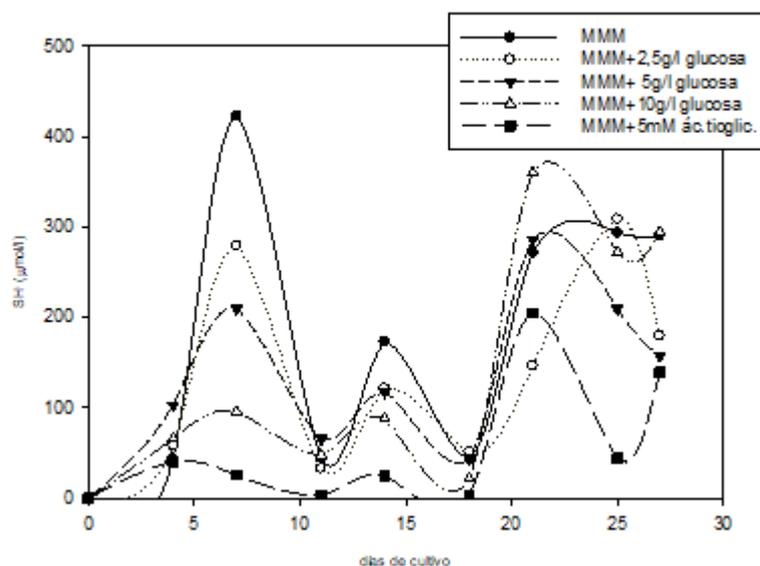


Figura 3.16.- Variación de la concentración de iones sulfhidrilos en los sobrenadantes de los diferentes EC en función del tiempo de los cultivos líquidos

Las máximas concentraciones de iones sulfhidrilos de los sobrenadantes de las mezclas de reacción de la determinación de la actividad queratinolítica se dosaron en el día 11 del medio mineral sólo y en el día 18 del mismo medio y de los adicionados con glucosa 2,5 g/l y 5 g/l (Figura 3.17).

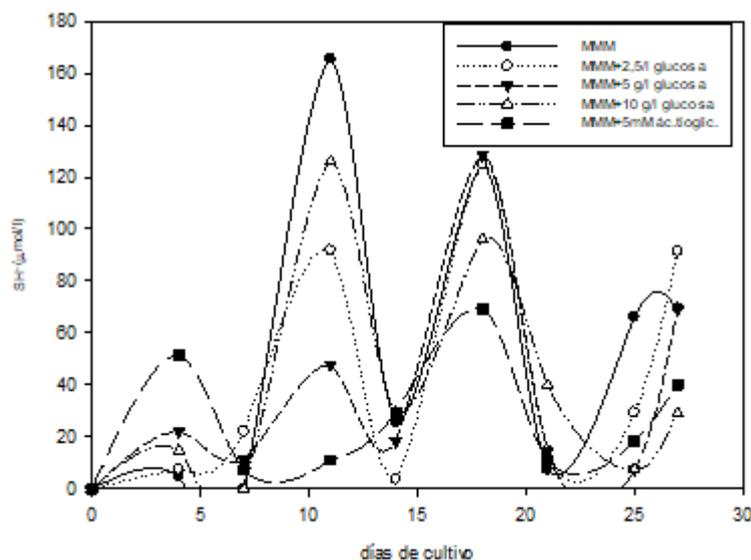


Figura 3.17.- Variación de la concentración de iones sulfhidrilos en los sobrenadantes de las mezclas de reacción de la determinación de actividad queratinolítica de los diferentes EC en función del tiempo de los cultivos líquidos

En valores absolutos, la máxima concentración de sulfhidrilos libres en el sobrenadante ($422,7 \mu\text{M}$ en MMM) superó casi tres veces su concentración al del máximo valor del sobrenadante de la actividad queratinolítica ($165,43 \mu\text{M}$ en MMM). La adición de ácido tioglicólico 5 mM al medio de cultivo no resultó en un aumento significativo.

Producción de sulfatos

Otro mecanismo de degradación de la queratina (Kunert, 2000) sugiere la liberación de sulfatos como metabolito final.

La presencia de ión sulfato solo se pudo cuantificar en el medio (1) a partir del día 18 y en (4) a partir del día 14. La técnica fue engorrosa por cuanto la medida turbidimétrica no tuvo mucha sensibilidad debido a que dosa niveles de sulfato mayores a 18 ppm (Figura 3.18).

Se observó que a partir del día 18 para el medio con 10 g/l de glucosa y a partir del día 21 para el MMM sólo se obtienen valores dosables lo que estaría demostrando que uno de los productos últimos de la sulfitólisis sería el ión sulfato.

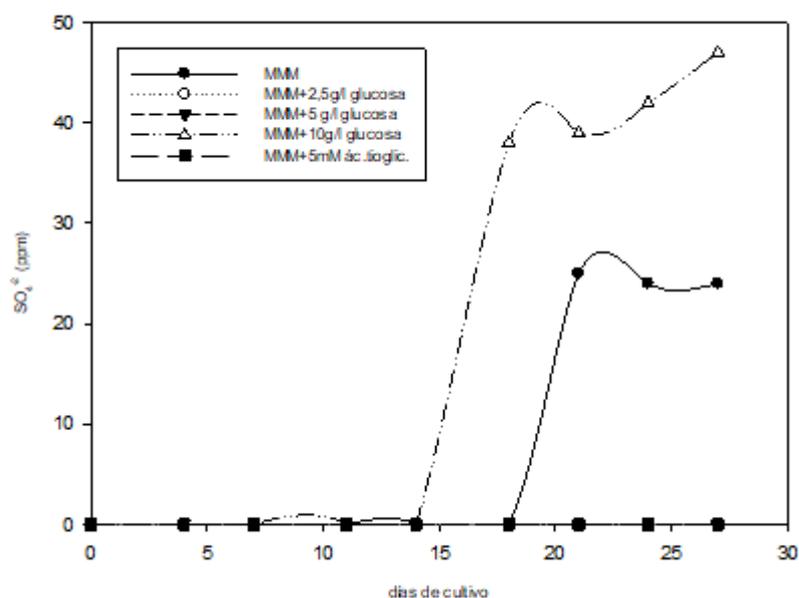


Figura 3.18.- Variación de la concentración de iones sulfato en los sobrenadantes de los diferentes EC en función del tiempo de los cultivos líquidos

3.4.4 Comparación de la producción de enzimas y proteínas a partir del cultivo en dos medios líquidos distintos

En la tabla 3.I se comparan las variaciones entre la concentración proteica y la actividad azocaseinolítica entre ambos medios en función del tiempo de cultivo.

Tabla 3.I.- Comparación de la concentración de proteínas y actividad azocaseinolítica en los EC de los medios MMM₁ y MMM₂ en función del tiempo de los cultivos

día de incubación	MMM ₁ µg prot./ml.	MMM ₂ µg prot./ml.	MMM ₁ Uact.azoc.	MMM ₂ Uact.azoc.
0	243±0,5	96±0,8	0	0
2	393±0,1	87±0,9	0,15±0,02	0,05±0,01
4	425±0,9	57±0,8	0,21±0,01	0,10±0,06
6	393±1,0	133±1,2	0,36±0,03	0,20±0,09
8	200±1,5	75±0,9	0,35±0,09	0,17±0,03
10	467±3,0	139±2,5	0,32±0,10	0,16±0,10
12	416±2,8	230±1,9	0,22±0,08	0,10±0,06
14	568±5,0	202±3,5	0,18±0,07	0,12±0,08
16	293±2,0	193±1,2	0,15±0,07	0,08±0,01
22	300±2,5	120±1,3	0,15±0,08	0,08±0,02

Se observa que, tanto en la concentración de proteínas como en la producción de enzimas proteolíticas, el medio mineral 1 (MMM₁) tuvo un mayor rendimiento que el medio mineral 2 (MMM₂). La fuente de N provista por el NaNO₃ en el MMM₂ estaría reprimiendo la producción de enzimas proteolíticas. En el trabajo original (Vázquez *et al.*, 2008) usaron pelo de cerdo en vez del vacuno como activador en la producción de proteasas.

3.4.5 Acción de agentes reductores en la producción de proteasas en cultivos en FSS y CML

Variación en la concentración proteica y de la actividad azocaseinolítica en FSS

La variación de la concentración proteica y de la actividad azocaseinolítica de los EC provenientes del cultivo en FSS en presencia de agentes reductores en función del tiempo de cultivo se observa en las Figuras 3.19 y 3.20.

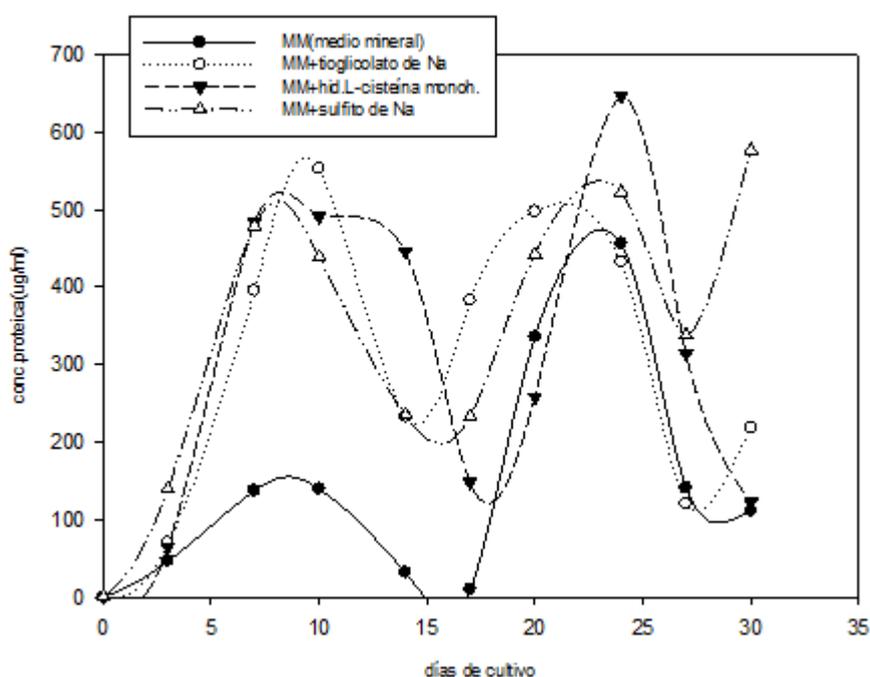


Figura 3.19.- Variación de la concentración proteica del EC de FSS en presencia de agentes reductores en función del tiempo de cultivo

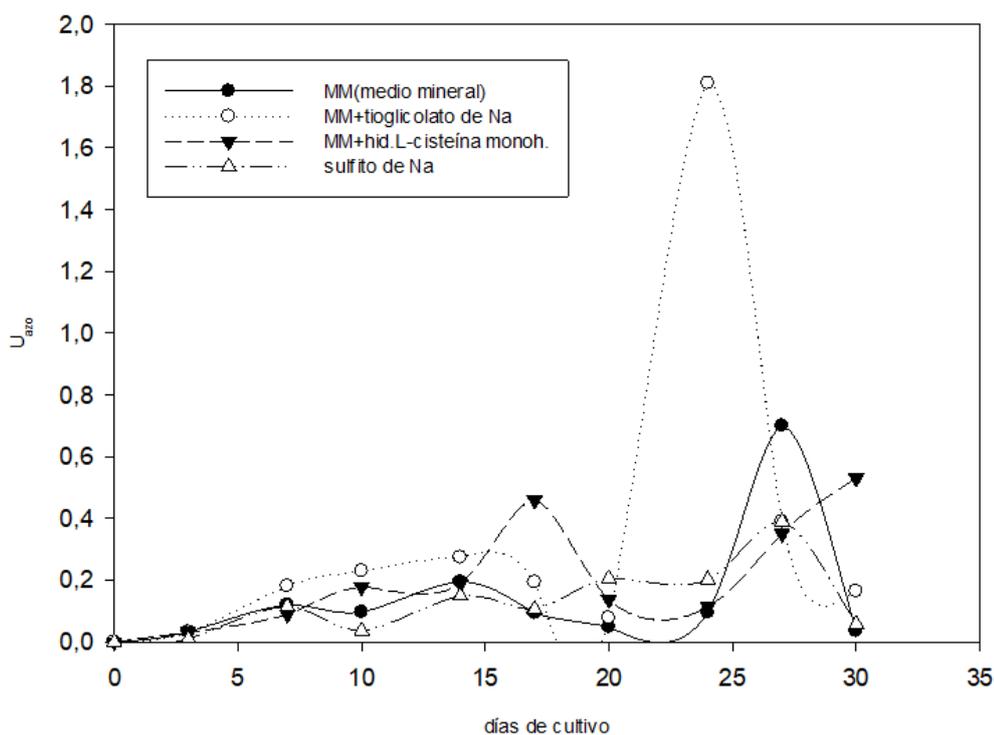


Figura 3.20: Variación de la actividad azocaseinolítica del EC de FSS en presencia de agentes reductores en función del tiempo de cultivo

Variación en la concentración proteica y de la actividad azocaseinolítica en CML

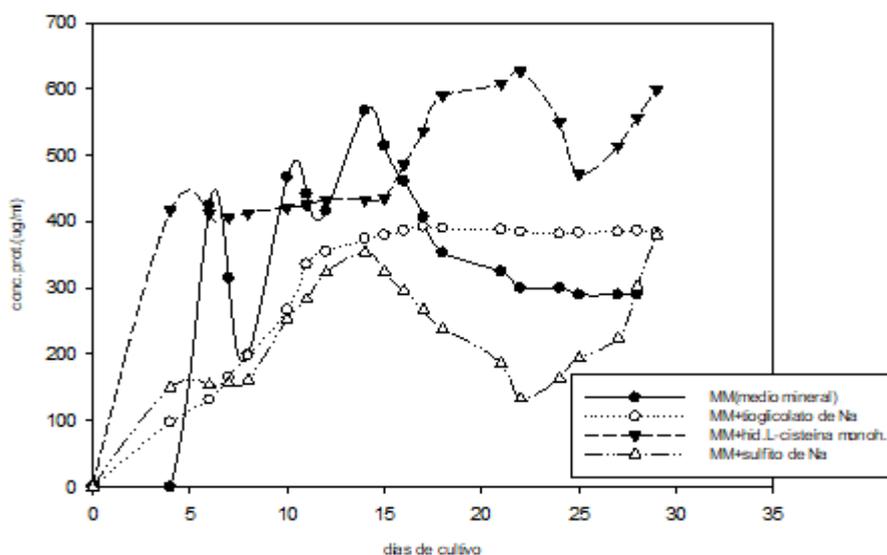


Figura 3.21.- Variación de la concentración proteica del EC de CML en presencia de agentes reductores en función del tiempo de cultivo

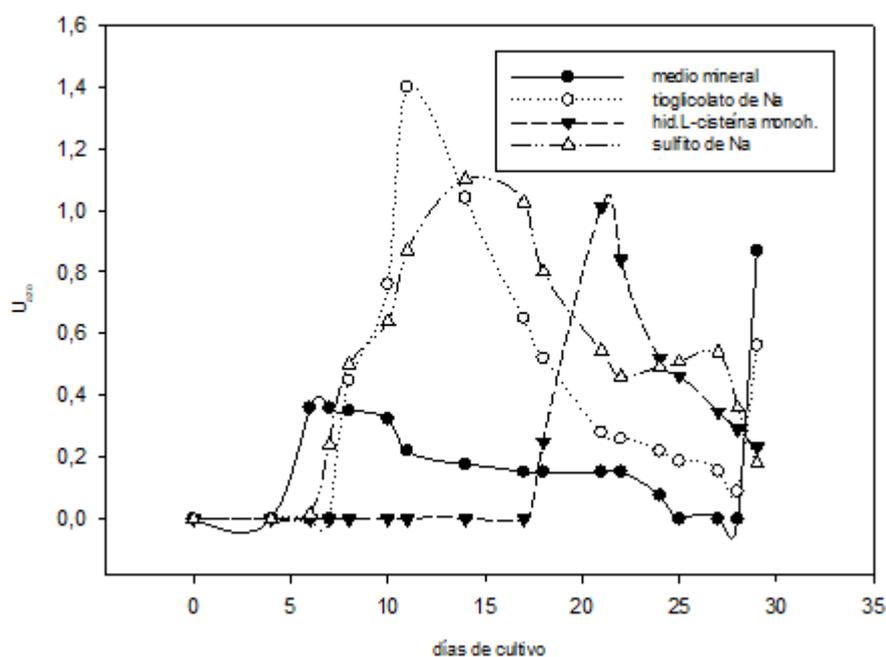


Figura 3.22.- Variación de la actividad azocaseinolítica del EC de CML en presencia de agentes reductores en función del tiempo de cultivo

3.4.5.3 Discusión

En los resultados obtenidos en la sección 3.4.5 se puede observar en las Figuras 3.19 y 3.21 que los mayores valores de concentración proteica para ambos tipos de medio de cultivo se obtuvieron con el agregado de cisteína, donde la máxima concentración proteica para FSS se encontró a los 24 días (646,87 $\mu\text{g/ml}$) y para CML a los 22 días (626,9 $\mu\text{g/ml}$).

En FSS los picos de concentración proteica coinciden con los menores valores de actividad azocaseinolítica, lo que sugiere el efecto inhibitor de la síntesis de proteasas por parte de las proteínas biodisponibles.

Para la actividad azocaseinolítica, la adición de tioglicolato de sodio al medio produjo en CML un máximo en el día 11 (1,4 Uazo) que supera en 7 veces el valor producido (0,22 Uazo) en el mismo día por el medio mineral sin ningún aditivo. En el cultivo sólido el mayor valor de actividad se determinó en el día 24 (1,81 Uazo/ml) para el medio adicionado con tioglicolato de sodio. El aumento con respecto al medio mineral sin aditivos (MMM) es del mismo orden de magnitud que el observado en el medio líquido. Los valores máximos absolutos de actividad azocaseinolítica para el cultivo sólido fueron superiores a los encontrados para el cultivo líquido en el caso del medio (2) mientras que para los medios (1) y (3) fue al revés (Figuras 3.20 y 3.22).

En CML, el pico de máxima actividad azocaseinolítica para el caso del medio (2) antecedió en el tiempo al de concentración proteica, permaneciendo este último parámetro constante a partir del día 14 hasta el fin del cultivo en un valor promedio de $384,598 \pm 10,728 \mu\text{g/ml}$ (Figuras 3.21 y 3.22)

A partir de este estudio se puede concluir que el agregado de agentes reductores al medio de cultivo, en especial el tioglicolato de sodio, incrementó la producción de enzimas queratinolíticas. Este hallazgo puede ser explicado en base al mecanismo del proceso de sulfitólisis mencionado en la sección 3.2.2.2. En el caso especial de *Trichophyton ajelloi* el tioglicolato de sodio fue utilizado no sólo como agente reductor sino como fuente de carbono y energía mientras que en el caso de la cisteína estaría incorporando además una fuente de nitrógeno adicional a la que aporta el residuo pelo.

Kunert (1992) demostró que la presencia de estos agentes reductores podían aumentar la acción de estas enzimas sobre el sustrato mientras que Moreira-Gasparin *et al.*, (2009) postularon que actúan sobre el sustrato y no sobre las queratinasas. Se hablaría entonces de un mecanismo de activación en la producción de las enzimas relacionado probablemente con una mayor accesibilidad al sustrato queratínico relacionado al proceso de sulfitólisis y/o de sustitución nucleofílica.

3.5 Conclusiones

- En general se observaron valores dosables con las técnicas utilizadas para medir la actividad enzimática de los EC frente a distintos sustratos proteicos queratínicos y no queratínicos.
- Cuando se utilizó el FSS para el cultivo se observó que la falta de fuentes de N y C fácilmente metabolizables al utilizar como sustrato RP indujeron la síntesis de enzimas queratinolíticas que utilizan los sustratos epidermis y “residuo pelo”.
- En cuanto a la producción de proteasas y queratinasas en el medio mineral mínimo líquido, la adición de glucosa actuó como inductor positivo en la síntesis de enzimas queratinolíticas, posiblemente al aumentar la generación de biomasa. Cuando se comparó esta producción con un medio líquido de diferente composición que contenía una fuente de N mineral, la síntesis enzimática disminuyó. Esto puede ser debido a que la expresión de enzimas proteolíticas se desreprime en un medio que carece de C, N o S.
- Se comprobó la liberación de sulfhidrilos, sulfato y amonio como productos de degradación biológica del pelo.
- La adición de agentes reductores a los cultivos generó una mayor producción de enzimas proteolítico-queratinolíticas.

3.6 Referencias bibliográficas

- Aidoo, K., Hendry, R., Wood, B. (1981). Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 12, 6-9.
- Ali, T. H., Ali, N. H. y Mohamed, L. A. (2011). Production, purification and some properties of extracellular keratinase from feathers-degradation by *Aspergillus*

- oryzae* nrrl-447. *Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation*, 6 (2), 123-136.
- Almoazen, H., Battacharjee, H., Samsa, A., Pate, S. (2010). Stability of mesna in ReadyMed Infusion Devices. *Annals of Pharmacotherapy*, 44, 224-225.
- Anbu, P., Gopinath, S. C. B., Hilda, A., Lakshmi Priya, T. y Annadurai, G. (2005). Purification of keratinase from poultry farm isolate-*Scopulariopsis brevicaulis* and statistical optimization of enzyme activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 639-647.
- Anitha, T., Palanivelu, P. (2013). Purification and characterization of an extracellular keratinolytic protease from a new isolate of *Aspergillus parasiticus*. *Protein Expression and Purification*, 88, 214-220.
- Apodaca G. and McKerrow J. (1989a). Purification and characterization of a 27000-Mr extracellular proteinase from *Trichophyton rubrum*. *Infection and Immunity*, 57, 3072-3080.
- Apodaca, G. and McKerrow, J. (1989b). Regulation of *Trichophyton rubrum* proteolytic activity. *Infection and Immunity*, 57, 3081-3090.
- Asahi, M., Lindquist, R., Fukuyama, K., Apodaca, G., Epstein, W. y McKerrow J. (1985). Purification and characterization of major extracellular proteinases from *Trichophyton rubrum*. *Biochemical Journal*, 232, 139-144.
- Banerjee, U., Chisti, Y., Moo-Yung, M. (1993). Spectrophotometric determination of mycelial biomass. *Biotechnology Techniques*, 7 (4), 313-316.
- Bernal, C., Cairó, J. y Coello, N. (2006). Purification and characterization of a novel exocellular keratinase from *Kocuria rosea*. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 49-54.
- Böckle, B., Galunsky, B., Müller, R. (1995). Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (10), 3705-3710.
- Böckle, B., Müller, R. (1997). Reduction of disulfide bonds by *Streptomyces pactum* during growth on chicken feathers. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (2), 790-792.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Brandelli, A. y Riffel, A. (2005). Production of an extracellular keratinase from *Chryseobacterium* sp. growing on raw feathers. *Electronic Journal of Biotechnology*, 8 (1), 35-42.

- Bressollier, P., Letourneau, F., Urdaci, M. y Verneuil, B. (1999). Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (6), 2570-2576.
- Buechler, P. y Lollar, R. (1949). Some sulfur distribution studies on cattle hair and epidermis. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 44, 358-370.
- Buechler, P. y Lollar, R. (1950). Evidence for existence of a disulphide other than cystine in cattle epidermis. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 45, 503-512.
- Burack, A. y Knight, G. (1958). Observations on submerged growth and deamination of amino acids by dermatophytes. *The Journal of Investigative Dermatology*, 30 (4), 197-199.
- Busk, P. y Lange, L. (2015). Classification of fungal and bacterial lytic polysaccharide monoxygenases. *BioMed Central Genomics*, 16 (1), 368. DOI: 10.1186/s12864-015-1601-6.
- Cai, C., Lou B. y Zheng X. (2008). Keratinase production and keratin degradation by a mutant strain of *Bacillus subtilis*. *Journal of Zhejiang University Science B*, 9 (1), 60-67.
- Cantera, C. S., Goya, L., Galarza, B., Garro, M. L. y López, L. M. I. (2003). Hair saving unhairing process. Part 5. Characterisation of enzymatic preparations applied in soaking and unhairing processes. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 2 (87), 69-77.
- Cao, L., Tan H., Liu, Y., Xuem X., Zhoum S. (2008). Characterization of a new keratinolytic *Trichoderma atroviride* strain F6 that completely degrades native chicken feather. *Letters in Applied Microbiology*, 46, 389-394.
- Cecil, R. y Loening, U. (1960). The reaction of inter and intra-chain disulphide bonds in proteins with sulphite. *Biochemical Journal*, 76, 146.
- Contreras, E., Bertola, N., Giannuzzi, L., Zaritzky, N. (2002). A modified method to determine biomass concentration as COD in pure cultures and in activated sludge systems. *Water SA*, 28 (4), 463-467.
- Chester, C., Mathison, G. (1963). The decomposition of wool keratin by *Keratinomyces ajelloi*. *Sabouraudia*, 2 (4), 225-237.
- Day, A., Tonic, P., Stratman, S., Leeman, U. y Harmon, S. (1968). Isolation and properties of an extracellular protease of *Trichophyton granosolum*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 167, 597-606.

- Dozie, I., Okeke, C., Unaeze, C. (1994). A termoestable, alkaline –active, keratinolytic proteinase from *Chrysosporium keratinophylum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10, 563-567.
- Ebeling, W, Hennrich, N., Klockow, M., Metz, H., Orth, H.y Lang, H. (1974). Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. *Europeann Journal of Biochemistry*, 47 (1), 91-97.
- Elíades, L. (2008). Estudio de la microbiota alcalofílica y alcalino-tolerante del suelo de los bosques de *Celis tala Gill* (ex Planch) y *Scutia buxifolia* Reiss en el Partido de Magdalena, Provincia de Buenos Aires (tesis doctoral). Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.
- Ellman, G. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82, 70-79.
- Esawy, M. (2007). Isolation and partial characterization of extracellular keratinase from a novel mesophilic *Streptomyces albus* AZA. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 3 (6), 808-817.
- Farag, A. y Hassan, M. (2004). Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 34, 85-93.
- Friedrich, J. y Kern, S. (2003). Hydrolysis of native proteins by keratinolytic protease of *Doratomyces microspores*. *Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic*, 21, 35-37.
- Galarza, B., Goya, L., Cantera, C., Garro, L., Reinoso, H., López, M. (2004). Fungal biotransformation of bovine hair. Part 1: isolation of fungus with keratinolytic activity. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 88 (3), 93-98.
- Galarza, B., Goya, L., Garro, L., Mercerat, J., Hours, R., Cantera, C. (2006). Fungal biotransformation of bovine hair. Part II: biomass and proteases produced as a function of incubation time. Assessment of hair waste digestion. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 90 (4), 169-172.
- Galarza, B., Cavello, I., Garro L., Gortari C., Hours, R., Cantera, C. (2012). Evaluation of increase at the production of keratinolytic enzymes. *Journal of AQEIC*, 63 (3), 70-73.
- Galarza, B., Garro. M., Gortari, C., Bonfranceschi, A., Hours, R., Cantera, C. (2014). From a problem of solid waste to an useful product in beamhouse process. *Journal of AQEIC*, 65 (2), 49-55.

- Gervais, P., Molin, P. (2003). The role of water in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13, 85-101.
- Gessner, M., Schmitt, A. (1996). Use of solid-phase extraction to determine ergosterol concentration in plant tissue colonized by fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 415-419.
- Gow, N. y Gadd, G. (Ed.). (1995). *The Growing Fungus*, London, UK: Editorial Chapman & Hall.
- Gradisar, H., Friedrich, J., Križaj, I. y Jerala R. (2005). Similarities and specificities of fungal keratinolytic proteases: comparison of keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microsporus* to some known proteases. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (7), 3420–3426.
- Greenberg, A., Clesceri, L. y Eaton, A. (1992). *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. Washington DC, USA: American Public Health Association.
- Grumbt, M., Monod, M., Yamada, T., Hertweck, C., Kunert, J. y Staib, P. (2013). Keratin degradation by dermatophytes relies on cysteine dioxygenase and a sulfite efflux pump. *Journal of Investigative Dermatology*, 133, 1550-1555. DOI:10.1038/jid.2013.41.
- Gunkel, F. y Gassen, H., (1989). Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. Characterization of the chromosomal gene and expression of the cDNA in *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, 179, 185-194.
- Hours, R. A., Katsuragi, T. y Sakai, T., (1994). Growth and protopectinase production of *Aspergillus awamori* in solid-state culture at different acidities. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 78 (6), 426-430.
- Hu, H., Gao, J., He, J., Yu, B., Zheng, P., Huang, Z., Mao, X., Yu, J., Han G. y Chen D. (2013). Codon optimization significantly improves the expression level of a keratinase gene in *Pichia pastoris*. *Public Library of Science One*, 8 (3), e58393. DOI: 10.1371/journal.pone.0058393.
- Huang, Y., Busk, P. y Lange, L. (2015). Production and characterization of keratinolytic proteases produced by *Onygena corvina*. *Fungal Genomics and Biology*, 5,119. DOI: 10.4172/2165-8056.1000119.
- Inada, S. y Watanabe, K. (2013). Draft genome sequence of *Meiothermus ruber* H328, which degrades chicken feathers and identification of proteases responsible for degradation. *Genome Announcements*, 1 (3), e00176-13. DOI: 10.1128/genomeA.00176-13.
- Ionata, E., Caganella, F., Bianconi, G., Benno, Y., Sakamoto, M., Capasso, A., Rossi, M. y La Cara F. (2008). A novel keratinase from *Clostridium sporogenes* bv.

- nov. a thermotolerant organism isolated from solfataric muds. *Microbiological Research*, 163, 105-112.
- Kornilowicz-Kowalska, T., Bohacz, J. (2011). Biodegradation of keratin waste: theory and practical aspects”, *Waste management*, 31, 1689-1701.
- Kumar Ganesh, A., Swarnalatha, S., Gayathri, S., Nagesh, N. y Sekaran, G. (2007). Characterization of an alkaline active-thiol forming extracellular serine keratinase by the newly isolated *Bacillus pumilis*. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 411-419.
- Kumar, P., Kazi, Y. y Soomro, I. (2012). A comparative characterization of indigenous keratinase enzyme from district Khairpur, Sindh, Pakistan. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 25 (1), 73-79.
- Kunert, J. (1989). Biochemical mechanism of keratin degradation by the actinomycete *Streptomyces fradiae* and the fungus *Microsporum gypseum*: a comparison. *Journal of Basic Microbiology*, 29 (9), 597-604.
- Kunert J. (1995). Biochemical mechanism of keratin degradation by keratinolytic fungi. *Journal of the Indian Botanical Society*, 74, 89-98.
- Kunert, J. (1992). Effect of reducing agents on proteolytic and keratinolytic activity of enzymes of *Microsporum gypseum*. *Mycoses*, 35, 343-348.
- Kunert, J. (2000). Physiology of keratinophilic fungi. En Kushwaha R. y Guarro J. (Ed.), *Revista Iberoamericana de Micología* (pp 77- 85). Bilbao, España: Asociación Española de Micología.
- Kunert J. y Kasafirek E. (1988). Preliminary characterization of extracellular proteolytic enzymes of dermatophytes by chromogenic substrates. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 26, 187-194.
- Lange, L., Huang, Y. y Busk, P. (2016). Microbial decomposition of keratin in nature, a new hypothesis of industrial relevance. *Applied Microbiology Biotechnology*, 100, 2083-2096.
- Li, E. y Mira de Orduña, R. (2010). A rapid method for the determination of microbial biomass by dry weight using a moisture analyser with an infrared heating source and an analytical balance. *Letters in Applied Microbiology*, 50, 283-288.
- Liggieri, C. (2005). Proteasas del látex de *Asclepias curassavica* L. Caracterización y potencial aplicación en la síntesis de péptidos (Tesis doctoral). Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.
- Lin, X., Tang, J., Koelsch, G., Monod, M. y Founling S. (1993). Recombinant candidropsin, an extracellular aspartic protease from yeast *Candida tropicalis*,

- Escherichia coli expression, purification, zymogen activation and enzymes properties. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 20143-20147.
- Matikevičienė, V., Grigiškis, S., Levišauskas, D., Sirvydytė, K., Dižavičienė, O., Masiliūnienė, D. y Ančenko O. (2011). Optimization of keratinase production by *Actinomyces fradiae* 119 and its application in degradation of keratin wastes. En *Environment Technology Resources, Proceedings of the 8th International Scientific and Practical Conference*, Lituania, 1, 294-300.
- Meevootison, V. y Niederpruem, J. (1979). Control of exocellular proteases in dermatophytes and especially *Trichophyton rubrum*. *Sabouradia*, 17, 91-106.
- Meenakshi, J., Kumar, J. y Yadav, R. (2022). Optimization of cultural conditions for keratinase production by *Curvularia lunata* (JK17) using response surface methodology. *Journal of Scientific Research*, 14 (1), 363-374.
- Merops system uniprot, <https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/pepsum?mid=%s>.
- Monod, M., Capoccia, S., Léchenne, B., Zaugg, C., Holdom, M. y Jousson, O. (2002). Secreted proteases from pathogenic fungi. *International Journal of Medical Microbiology*, 292 (5-6), 405-419.
- Moreira-Gasparin, F., de Souza, C., Costa, A., Alexandrino, A., Bracht, C., Boer, C. y Peralta, R. (2009). Purification and characterization of an efficient poultry feather degrading-protease from *Myrothecium verrucaria*. *Biodegradation*, 20, 727-736.
- Nandi, B. (1978). Glucosamine analysis of fungus-infected wheat as a method to determine the effect of antifungal compounds in grain preservation. *Cereal Chemistry*, 55 (2), 121-126.
- Nilegaonkar, S., Zambare, V., Kanekar, P., Dhakephalkar, P. y Sarnaik, S. (2007). Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus*. *Bioresource Technology*, 98 (6), 1238-1245.
- Ragot, J. (1966). Activité kératinolytique du *Keratinomyces ajelloi* Vanbreuseghem sur la laine non dénaturée. *Comptes Rendus de la Academie de Sciences de Paris, Série D*, 262, 412-415.
- Raimbault, M. (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1 (3), 174-188.
- Ramnani, P. y Gupta, R. (2007). Keratinases vis-à-vis conventional proteases and feather degradation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 1357-1540.
- Rawlings, N., Barrett, A., Thomas, P., Huang, X., Bateman, A. y Finn, R. (2018). The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in

- 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Research*, 46, D624-D632.
- Ride, J. y Drysdale R. (1972). A rapid method for the chemical estimation of filamentous fungi in plant tissue. *Physiological Plant Pathology*, 2, 7-15.
- Rojas, N. (2004). Hongos alcalofílicos como potencial fuente de enzimas de interés biotecnológico. (Tesis de grado). Universidad Nacional de Quilmes, Quilmes, Buenos Aires.
- Rojas, N., Cavalitto, S., Mignone, C. y Hours R. (2008). Role of PPase-SE in *Geotrichum klebahnii*, a yeast-like fungus able to solubilize pectin. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11,1-8.
- Romani, A., Artigas, J., Camacho, A., Graça, M. y Pascoal, C. (2009). La biota de los ríos: los microorganismos heterotróficos. En Elosegui A. y Sabater S. (Ed.), *Conceptos y técnicas en ecología fluvial* (pp. 176-181). Bilbao, España: Fundación BBVA.
- Ruffin, P., van Brussel, E., Biguet, J. y Biserte G. (1979). Caractérisation partielle de deux aminopeptidases (arylamidases) extracellulaires du dermatophyte *Keratinomyces ajelloi*. *Biochimie*, 61, 495-500.
- Sangali, S. y Brandelli, A. (2000). Isolation and characterization of a novel feather-degrading bacterial strain. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 87, 17-24.
- Simpanya, M. y Baxter, M. (1996). Partial characterization of proteolytic enzymes of *Microsporum canis* and *Microsporum cookei*. *Mycoses*, 39, 279-282.
- Singh, C. y Singh, G. (1995). Characterization of extracellular proteolytic enzyme of *Chrysosporium tropicum* CF 34 and its role in keratin degradation. *Indian Journal of Microbiology*, 35 (4), 311-315.
- Sprecher, E., Ishida-Yamamoto, A., Becker, O., Marekov, L., Miller C., Steinert P., Neldner K., Richard G. (2001). Evidence for novel functions of the keratin tail emerging from a mutation causing ichthyosis hystrix. *Journal of Investigative Dermatology*, 116, 511–519. DOI:10.1046/j.1523-1747.2001.01292.x.
- Steindorff, A., Persinoti, G., Neves Monteiro, V. y Nascimento Silva, R. (2015). Fungal metabolic diversity. En V. Gupta, R. Mach R. y S. Sreenivasaprasad. (Ed). *Fungal Biomolecules: sources, applications and recent developments* (pp 255-256). Chichester, UK: Wiley Blackwell.
- Takiuchi, I., Higuchi, D., Sei, Y., Koga, M. (1982). Isolation of an extracellular proteinase (keratinase) from *Microsporum canis*. *Sabouraudia*, 20, 281-288.

- Thys, R., Lucas, F., Riffel, A., Heeb P. y Brandelli, A. (2004). Characterization of a protease of a feather-degrading *Microbacterium* species. *Letters in Applied Microbiology*, 39, 181-186.
- Torchinsky Y. M. (1981). Sulfur in proteins. Oxford, UK: Pergammon Press Ltd.
- Uptima, Quantitation of sulfhydryls DTNB, Ellman's reagent. Interchim, Montluçon, France. Recuperado de <http://www.interchim.fr/ft/0/01566H.pdf>
- Vázquez, I., Aguilera, A., Prado-Barragán, L. y Aguilar C. (2008). Producción fúngica de proteasas inducidas con pelo de cerdo. *Información Tecnológica*, 19 (2), 34-40.
- Wang, S., Hsu, W., Liang, T., Yen, Y. y Wang, C. (2008). Purification and characterization of three novel keratinolytic metalloproteases produced by *Chryseobacterium indologenes* TKU014 in a shrimp shell powder medium. *Bioresource Technology*, 99, 5679-5686.
- Wawrzekiewicz, K., Wolski, T. y Lobarzewski, J. (1991). Screening the keratinolytic activity of dermatophytes *in vitro*. *Mycopathologia*, 114, 1-8.
- Weary, P., Canby, C. y Cawley, E. (1965). Keratinolytic activity of *Microsporum canis* and *Microsporum gypseum*. *The Journal of Investigative Dermatology*, 44 (5), 300-310.
- Weary, P. y Canby, M. (1967). Keratinolytic activity in *Trichophyton schoenleini*, *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. *Journal of Investigative Dermatology*, 48 (3), 240-248.
- Wiener Argentina, Glicemia enzimática, kit comercial, (cód. 1400101), Rosario, Argentina.
- Yamamura, S., Morita, Y., Hasan, Q., Yokohama, K. y Tamiya, E. (2002a). Keratin degradation: a cooperative action of two enzymes from *Stenotrophomonas* sp. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294, 1138-1143.
- Yamamura, S., Morita, Y., Hasan, Q., Ramachandra Rao, S., Murakami, Y., Yokoyama, K. y Tamiya, E. (2002b). Characterization of a new keratin-degrading bacterium isolated from deer fur. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93 (6), 595-600.
- Yu, R., Harmon, S. y Blank, F. (1968). Isolation and purification of an extracellular keratinase of *Trichophyton mentagrophytes*. *Journal of Bacteriology*, 96 (4), 1435-1436.
- Yu, R., Harmon, S. y Blank F. (1969). Hair digestion by a keratinase of *Trichophyton mentagrophytes*. *The Journal of Investigative Dermatology*, 53, 166-171.

Zweistra-Hoogschagen, M. (2007). *Macroscopic Modelling of Solid State Fermentation* (Tesis doctoral). Universidad de Wageningen, Wageningen, Holanda.

Capítulo 4

Caracterización e identificación del pool enzimático de *Trichophyton ajelloi*

4.1. Resumen

Con el propósito de obtener aplicaciones biotecnológicas del pool enzimático de *Trichophyton ajelloi* en este capítulo se caracterizó el extracto crudo en función de su actividad queratinolítica, proteolítica y aminopeptídica frente a distintos sustratos en distintas condiciones físicas y químicas. Se clasificaron e identificaron los distintos tipos de proteasas que componen el pool enzimático.

4.2. Introducción

4.2.1. Aplicaciones biotecnológicas de las queratinasas

La caracterización del pool enzimático, el aislamiento y la purificación de las enzimas que lo componen constituyen herramientas de utilidad para sus posibles aplicaciones biotecnológicas.

Las queratinasas por su amplio espectro de acción tienen numerosas aplicaciones en diversas industrias: biomedicina, bioenergía, textil, medicina, cosmética, cuero, bioconversión de residuos queratínicos (Kornilowicz-Kowalska *et al.*, 2011; Singh, 2002).

En la industria alimenticia y veterinaria, la queratinasa PWD1 (Versazyme) demostró su capacidad de degradar completamente los priones de la encefalopatía espongiforme bovina en tejido cerebral y en heridas de animales infectados, en presencia de detergentes y tratamiento térmico. Al mismo tiempo puede actuar en la descontaminación de: harinas animales usadas para alimento balanceado, instrumentos médicos, etc. y en la obtención de aminoácidos como serina, cisteína y prolina (Gupta y Ramani, 2006; Okoroma, 2012; Liang, Han, Zhan, Du, Liang, Li, 2011; Sharma y Gupta, 2010).

En la industria del cuero como asistentes en el depilado enzimático y limpieza de las pieles en reemplazo de tecnologías contaminantes y en el manejo del residuo pelo generado (Pillai y Archana, 2008; secciones 6.2.7.2 y 6.3).

En medicina, se las ha utilizado en la regulación de la presión arterial. A partir del hidrolizado de músculo de sardina mediante una proteasa alcalina de *Bacillus licheniformis* se produjo un hidrolizado proteico con actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina I. Así como en la producción de hidrolizados proteicos para alimentación hipoalergénica infantil, en dietas terapéuticas ricas en proteínas, en la tenderización de carnes (Kumar y Takagi, 1999).

En el tratamiento de residuos agroindustriales de queratina, como la harina de pluma, deficientes en metionina, lisina, triptófano e histidina estas enzimas aportan dichos aminoácidos esenciales cuando se las utiliza en alimento balanceado (Nam *et al.*, 2002; Harvey, 1992; Onifade, Al-Sanc, Al-Musallam y Al-Zarban, 1998). Incluso la suplementación de la dieta con queratinasas en cerdos mejora la respuesta inmune, la ganancia de peso, la digestibilidad de los nutrientes (Sharma y Kumar, 2019). En el caso de la queratinasa proveniente de *Kocuria rosea* el pigmento rosado del extracto enzimático se aplica en acuicultura de salmónidos (Coello *et al.*, 2003).

En el manejo de residuos de lana y plumas las queratinasas se han aplicado en combinación con agentes reductores o con otras enzimas como disulfuro-reductasas (Fang, Zhang, Liu, Du y Chen, 2013; Qiu, Wilkens, Barrett y Meyer, 2020).

Como agroinsumo se aplicaron para promover el crecimiento de plantas y como metabolito antimicrobiano de amplio espectro en los cultivos (Sharma *et al.*, 2019). Se ha utilizado una queratinasa purificada de *Bacillus* sp- 50-3 como control biológico en la destrucción de larvas juveniles de nematodos agalladores de raíces tal como *Meloidogyne incognita* (Yue, Zhang, Jiang, Liu y Niu, 2011).

Como detergente, en la remoción de suciedad en prendas como cuellos de camisa por su capacidad de actuar sobre residuos sólidos; en la remoción de cañerías tapadas con restos queratínicos como bañeras, toilettes. En la producción de films biodegradables para agricultura y alimentos, revestimientos y gomas obtenidos a partir de residuos queratínicos, para packagings compostables (Gupta *et al.*, 2006).

Se han utilizado en la generación de electricidad mediante el empleo de una celda de combustible microbiano (MFC) a partir del metabolismo de *Pseudomonas aeruginosa* creciendo en un medio con pluma de pollo (Chaturvedi y Verma, 2014) así como en la producción de biogás para combustible mediante la digestión anaeróbica de residuos queratínicos (Gupta *et al.*, 2006).

La valorización de residuos de plumas mediante la biodegradación queratinolítica se ha aplicado para el desarrollo de fibras proteicas, esqueletos 2 D y 3 D en ingeniería de tejidos, films de queratina para la liberación de drogas, regeneración de fibras, formación de micro y nanopartículas, óxidos de grafeno y sus derivados en biomateriales. Para la producción de materiales microporosos en electrodos y como material ignífugo, en matafuegos (Sharma *et al.*, 2019).

4.2.2. Características de las queratinasas

Las queratinasas reportadas que han sido purificadas, provenientes tanto de bacterias como de hongos presentan un amplio espectro de pesos moleculares (Tabla 4.1). El rango varía entre 27 kDa (Apodaca y McKerrow, 1989) y 200 kDa (Nam *et al.*, 2002), donde preponderan aquellas de PM entre 30-50 kDa (Brouta *et al.*, 2001; Sanyal *et al.*, 1985; Syed *et al.*, 2009; Takiuchi, Higuchi, Sei, y Koga, 1983; Takiuchi, Sei, Takagi y Negi, 1984; Wawrzkievicz, Lobarzewski y Wolski, 1987; Yu, Harmon y Blank, 1968; Yu, Harmon y Blank, 1969a; Yu, Harmon, Wachter y Blank, 1969b) (Tabla 4.1).

La mayoría de las queratinasas son del tipo serinproteasa (sección 3.2.2.3). Los sustratos sobre los que actúan son diversos: sustratos proteicos no queratínicos naturales como seralbúmina bovina, caseína, hemoglobina o semisintéticos como azocaseína, azul de polvo de piel, azocoll (colágeno tipo I), seralbúmina bovina (BSA) fracción V, rojo de elastina (Kunert y Kasafirek, 1988); queratínicos naturales como residuo pelo bovino, pelo humano, epidermis bovina, callus, uñas, pluma de pollo, cuernos, pezuñas; semisintéticos como azul de queratina; péptidos sintéticos como α -N-benzoyl-L-arginina etil-éster, etc. En general, el pH óptimo se encuentra entre 7 y 10 aunque se han aislado algunas queratinasas que actúan a pH ácido. La temperatura de actividad máxima oscila entre 30°C a 60°C (Ionata *et al.*, 2008).

La distinta capacidad en la biodegradación de los distintos tipos de queratina (agrupadas genéricamente como α y β queratinas) da cuenta de sus posibles aplicaciones. Por ejemplo, una queratinasa aislada de *Doratomyces microsporus* degrada la epidermis y el pelo humano pero no actúa sobre la dermis y la plumas de pollo (Friedrich y Kern, 2003). La mayoría son exoenzimas aunque en algunos casos son intracelulares (Wawrzkievicz *et al.*, 1987; Yu, Harmon, Grappel y Blanck, 1971).

Tabla 4.1. Queratinasas purificadas y aisladas de origen bacteriano y fúngico por orden cronológico

Autor principal	PM	Tipo	Microorganismo productor	Sustratos sobre los que actúan
Day <i>et al.</i> (1968)	34,3 kDa	-	<i>Trichophyton granulosum</i>	Caseína, pelo de cobayo, insulina, hemoglobina
Yu <i>et al.</i> (1968)	48 kDa	-	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Pelo humano, caseína, colágeno, elastina, fibrina, fibrinógeno, hemoglobina, insulina, ovoalbúmina, amidas, gelatina
Yu <i>et al.</i> (1971)	440 kDa 20,3 kDa	-	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Pelo de cobayo, caseína, colágeno, elastina, fibrina, fibrinógeno, hemoglobina, insulina, ovoalbúmina, gelatina
Ebeling <i>et al.</i> (1974)	18,5 kDa	serinproteasa	<i>Tritirachium album</i> Limber	Ribonucleasa bovina, hemoglobina, caseína, lactato-deshidrogenasa, malato-deshidrogenasa, creatin-quinasa
Takiuchi <i>et al.</i> (1983)	45 kDa	serinproteasa	<i>Microsporum canis</i>	Pelo humano y stratum corneum
Asahi <i>et al.</i> (1985)	44 kDa 36 kDa	serinproteasas	<i>Trichophyton rubrum</i>	Colágeno tipo I (azocoll), elastina, keratina de epidermis de rata
Wawrzkievicz <i>et al.</i> (1987)	-	proteasa intracelular	-	Pluma de pollo
Apodaca <i>et al.</i> (1989)	27 kDa	serinproteasa dep. de Ca ⁺	<i>Trichophyton rubrum</i>	Azocoll, elastina, keratin azure, laminina, fibronectina, colágeno tipo III, procolágeno tipo IV, succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA

Autor principal	PM	Tipo	Microorganismo productor	Sustratos sobre los que actúan
Lin <i>et al.</i> (1992)	33 kDa	-	<i>Bacillus licheniformis</i>	Pluma de pollo
Dozie <i>et al.</i> (1994)	69 kDa	proteasa alcalina termoestable	<i>Chrysosporium keratinophilum</i>	Pelo de cobayo, de vaca, humano, pluma de pollo
Böckle <i>et al.</i> (1995)	30 kDa	serinproteasa	<i>Streptomyces pactum</i> DSM 40530	Azul de queratina, pluma y harina de pollo, lana de oveja, azocoll, queratina bovina
Friedrich <i>et al.</i> (1996)	130 kDa	serinproteasa	<i>Fervidobacterium pennavorans</i>	Harina de pluma desnaturalizada
Bressollier <i>et al.</i> (1999)	18 kDa	serinproteasa	<i>Streptomyces albidoflavus</i>	Queratina, elastina, colágeno tipo I
Gradisar <i>et al.</i> (2000)	33 kDa	serinproteasa	<i>Doratomyces microsporus</i>	Epidermis, uña, pelo, caseína, BSA, elastina porcina
Mushin <i>et al.</i> (2001)	38 kDa	serinproteasa	<i>Trichophyton mentagrophytes var. erinacei</i>	Pelo de cobayo, proteína fibrosa, pelo humano, caseína
Brouta <i>et al.</i> (2001)	43,5kDa	metaloproteasa	<i>Microsporum canis</i>	Azul de queratina, rojo de elastina, azocoll
Nam <i>et al.</i> (2002)	>200kDa	serinproteasa	<i>Fervidobacterium islandicum</i> AW-1	Pluma de pollo
Longshaw <i>et al.</i> (2002)	30 kDa-50 kDa	serinproteasas	<i>Kytococcus sedentarius</i>	Callus humanos, caseína, azocaseína
Farag <i>et al.</i> (2004)	60 kDa	probable metaloproteasa	<i>Aspergillus oryzae</i>	BSA, caseína, pluma de pollo, colágeno, pluma de pato, lana de oveja, queratina no especificada
Anbu <i>et al.</i> (2005)	39 kDa-36 kDa	serinproteasa	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	
Gradisar <i>et al.</i> (2005)	33kDa	probable serinproteasa	<i>Paecilomyces marquandii</i>	<i>Stratum corneum</i> , caseína, AAPF:succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA
Bernal <i>et al.</i> (2006)	240 kDa	serinproteasa	<i>Kocuria rosea</i>	Plumas solubilizadas, epidermis, colágeno tipo I soluble, caseína, gelatina
Hossain <i>et al.</i> (2007)	-	serinproteasa	<i>Bacillus licheniformis</i> MZK-3	Pluma de pollo
Riffel <i>et al.</i> (2007)	64 kDa	Zn-metaloproteasa	<i>Chryseobacterium</i> sp. kr6	Caseína, stratum corneum, hemoglobina, BSA, pelo humano y bovino, lana, piel porcina, pluma de pollo
Nilegaonkar <i>et al.</i> (2007)	45 kDa-36 kD	serinproteasa	<i>Bacillus cereus</i> MCM B-326	Caseína, BSA, hemoglobina

Autor principal	PM	Tipo	Microorganismo productor	Sustratos sobre los que actúan
Ionata <i>et al.</i> (2008)	28,7 kDa	-	<i>Clostridium sporogenes</i> bv. Pennavorans bv. nov.	Caseína, BSA, azul de queratina, HPA, azocoll, rojo de elastina, pluma de pollo
Wang <i>et al.</i> (2008)	56 kDa 40 kDa	Zn-metaloproteasa	<i>Chryseobacterium indologenes</i> TKU014	Caseína, azul de queratina
Moreira-Gasparin <i>et al.</i> (2009)	22±1,5kDa	serinproteasa	<i>Myrothecium verrucaria</i>	Pluma de pollo
Syed <i>et al.</i> (2009)	46 kDa	proteasa inhibida por Ca ⁺²	<i>Streptomyces gulbargensis</i>	Gelatina, caseína, BSA, queratina solubilizada, elastina, pelo, uña, pluma de pollo
Prakash <i>et al.</i> (2010)	30 kDa 60 kDa	serinproteasa	<i>Bacillus halodurans</i> PPKS-2	Glutación, caseína, queratina, rojo de elastina, azocaseína, azocoll
Xie <i>et al.</i> (2010)	25,50,34, 19 kDa	serinproteasa	<i>Streptomyces</i> sp. Strain 16	Epidermis humana, azul de queratina, colágeno, caseína
Ali <i>et al.</i> (2011)	-	-	<i>Aspergillus oryzae</i> nrr1-447	Queratina solubilizada
Duarte <i>et al.</i> (2011)	100 kDa	serinproteasa	<i>Candida parapsilosis</i>	Pluma de pollo en DMSO
Yue <i>et al.</i> (2011)	27,423kDa	-	<i>Bacillus</i> sp 50-3	Azoqueratina, pluma de pollo, nematodos (<i>Meloidogyne incognita</i>)

Park *et al.* (2015) secuenciaron la queratinasa de *Chryseobacterium gallinarum* DSM 27622^T e identificaron 25 genes involucrados en la actividad proteolítica. Kim, Kluskens, de Vos, Huber y van de Oost (2004) aislaron la primera estructura cristalina de una queratinasa de *Fervidobacterium pennivorans* que correspondió a una fervidolisina en su forma inmadura, compuesta por cuatro dominios: uno catalítico, dos en sándwich y uno correspondiente a un propéptido relacionado a la subtilisina E.

Shih (2005) fue uno de los primeros en patentar la producción de estas enzimas a mayor escala utilizando la tecnología de DNA recombinante a partir de una queratinasa aislada de la cepa *Bacillus licheniformis* T1.

Wang, Swaisgood y Shih (2003) lograron la inmovilización de una queratinasa unida a estreptoavidina de *Bacillus subtilis* en una matriz sólida biotinilada que había sido previamente clonada con pérdida de su capacidad catalítica.

4.3 Materiales y métodos I

4.3.1 Caracterización del pool enzimático en relación a distintos sustratos proteicos en distintas condiciones de reacción

Los objetivos de esta sección fueron:

- Caracterizar el pool en función de su actividad a distintos pHs y sustratos de naturaleza proteica como queratina, colágeno, albúmina y caseína.

- Determinar la estabilidad de la actividad azocaseinolítica frente a distintos parámetros físico-químicos: pH, temperatura, fuerza iónica, sales metálicas y no metálicas, agentes reductores y tensioactivos.
- Caracterizar la actividad aminopeptídica y sus parámetros cinéticos.
- Estandarizar la actividad queratinolítica utilizando como sustrato a RP frente a distintas variables: linealidad de la reacción en función del tiempo de incubación y de la concentración de enzima; saturación del sustrato en función de su granulometría y concentración; estabilidad del EC a la temperatura.
- Clasificar e identificar los distintos tipos de proteasa que componen el pool enzimático.

4.3.1.1 Obtención del extracto crudo enzimático y reactivos

El EC para la caracterización fue obtenido a partir de un cultivo de *Trichophyton ajelloi* en sustrato sólido RP (sección 3.3.2.3). El sustrato RP fue preparado según la sección 3.3.1.1. MES (ácido 2-etanosulfónico) (Sigma Chemical Co, St Louis MO, USA).

4.3.1.2 Determinaciones analíticas para la caracterización del EC

4.3.1.2.1. Determinación del pH óptimo frente a distintos sustratos

Se determinó la actividad enzimática del EC frente a los siguientes sustratos: albúmina bovina, azocaseína, caseína, azul de polvo de piel, epidermis y residuo pelo en un rango de pH 7 a 12, usando como buffer de la reacción una mezcla equimolar (ME_q) 20 mM de cada buffers (MES, Tris, Gly).

Actividad frente a albúmina bovina

La mezcla de reacción conteniendo una solución al 1% de albúmina bovina Fracción V (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO) en 3,8 ml de ME_q y 200 µl de extracto enzimático se incubó a 37°C durante 30 min en equipo de agitación orbital. La reacción se detuvo por la adición de 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v) y posterior centrifugación a 5000xg 15 min. La absorbancia del sobrenadante fue determinada a 280 nm. El blanco de reacción se realizó agregando 1 ml de TCA 10% (p/v) a la mezcla de reacción al comienzo de la incubación.

La unidad de actividad albuminolítica (U_{alb.}) se definió como la cantidad de enzima que bajo las condiciones de reacción produjo un incremento de 0,01 Abs_{280 nm} por minuto en las condiciones del ensayo (Cantera *et al.*, 2003).

Actividad azocaseinolítica

La descripción en la determinación de esta actividad y la definición de la unidad de actividad fueron desarrolladas en 3.3.2.5.3.1, salvo que el buffer de incubación fue ME_q.

Actividad caseinolítica

Se preparó una solución de caseína (tipo Hammarsten, Research Organics, Cleveland, OH, USA) al 1% (P/V) en buffers ME_q, se calentó a baño maría a 80°C hasta disolución completa y se filtró por membrana de 0,45 µm. La mezcla de reacción conteniendo 1,1 ml de la solución de sustrato y 150 µl de extracto enzimático, se incubó a 37°C durante 30 min. La reacción se detuvo con 1 ml de TCA 10%, se centrifugó a 5000 rpm durante 20 min y la absorbancia del sobrenadante se determinó a 280 nm. Para el blanco de reacción se agregó 1 ml de TCA 10% a la mezcla de reacción al comienzo de la incubación (López *et al.*, 2017).

La unidad de actividad caseinolítica (U_{cas}) se definió como la cantidad de enzima que bajo las condiciones de reacción produjo un incremento de 1 Abs_{280 nm} por minuto en las condiciones del ensayo.

Actividad frente a Azul de Polvo de Piel

La descripción en la determinación de la actividad frente a APP y la definición de la unidad de actividad fueron desarrolladas en 2.4.3.1.VI, salvo que el buffer de incubación fue ME_q (Cantera, Goya, García y Sofía, 1999).

Actividad queratinolítica frente a sustrato epidermis

La descripción en la determinación de esta actividad y la definición de la unidad de actividad fueron desarrolladas en 3.3.2.5.3.3, salvo que el buffer de incubación fue ME_q.

Actividad queratinolítica frente a sustrato “residuo pelo”

La descripción en la determinación de esta actividad y la definición de la unidad de actividad fueron desarrolladas en sección 3.3.2.5.3.2.II, salvo que el buffer de incubación fue ME_q.

4.3.1.2.2. Estabilidad frente al pH

El EC utilizado se obtuvo a partir de un liofilizado resuspendido (en un volumen menor para concentrarlo) en 1,5 ml de Buffer Tris-HCl 0,1 M, pH 9. Luego se incubaron 100 µl de esta solución con 1,9 ml de la mezcla de buffers ME (rango de pH 7 a 12) durante 2 h a 20°C. Posteriormente se midieron la actividad remanente azocaseinolítica (sección 3.3.2.5.3.1) y se la refirió a la actividad azocaseinolítica a pH 9 en las mismas condiciones pero sin preincubación en ME_q.

4.3.1.2.3. Estabilidad frente a la temperatura

Para establecer la estabilidad a la temperatura del EC se preincubó a distintas temperaturas (50°C, 60°C, 70°C y 100°C) durante 30, 60, 90 y 120 min en baño termostático, luego se llevó a 0°C mediante baño de hielo y se procedió a determinar la actividad azocaseinolítica remanente (sección 3.3.2.5.3.1).

Para establecer la estabilidad del EC a condiciones ambientales se mantuvo la muestra durante 1 h, 6 h, y 24 h incubando en baño termostático a 25°C y se midió la actividad azocaseinolítica remanente como se mencionó previamente.

Los resultados se expresaron como porcentaje de actividad azocaseinolítica en relación a la misma muestra sin preincubar.

4.3.1.2.4. Estabilidad frente a variaciones de la fuerza iónica

Para determinar la estabilidad del EC a soluciones de distinta fuerza iónica se preincubaron 0,9 ml de EC con 0,1 ml de NaCl de concentración: 0,1 M, 0,2 M, 0,4 M, 0,6 M, 0,8 M, 1,0 M durante 1 h en baño termostático a 37°C y se procedió a determinar la actividad azocaseinolítica remanente (sección 3.3.2.5.3.1).

El resultado se expresó como porcentaje de actividad azocaseinolítica en relación a la misma muestra sin preincubar.

4.3.1.2.5. Efecto de la acción de diferentes sales metálicas y no metálicas

Se evaluaron dos diferentes mecanismos de acción, en cuanto a su influencia sobre el sustrato azocaseína por un lado (I) y por otro, sobre el EC (II).

I. Efecto de la preincubación con el sustrato azocaseína

Para determinar el efecto de las sales metálicas sobre la azocaseína se preincubaron 200 µl de azocaseína al 1% en buffer Tris-HCl (0,1 M) pH 9 con 200 µl de una solución 0,1 M de las siguientes sales: MnSO₄, CaCl₂, Na₂SO₃, BaCl₂, EDTA, KCl, MgSO₄, ZnSO₄, CuSO₄ durante 1 h a 37 °C y se procedió a determinar la actividad azocaseinolítica remanente (sección 3.3.2.5.3.1). Se ensayó un blanco de reacción para cada sal metálica, donde la enzima fue reemplazada por buffer y un blanco de enzima donde fue inactivada agregando en primer término 1 ml de TCA al 10%.

El resultado se expresó como porcentaje de actividad azocaseinolítica en relación a la misma muestra sin preincubar.

Las sales de CaCl₂ se disolvieron previamente en etanol por su insolubilidad en las condiciones de la reacción.

II. Efecto de la preincubación con el EC

El efecto de la preincubación con las sales de MnSO₄, CaCl₂, Na₂SO₃, BaCl₂,

EDTA, KCl, MgSO₄, ZnSO₄, CuSO₄ sobre el EC se determinó incubando 150 µl de EC con 200 µl de las distintas sales en tres concentraciones diferentes: 0,1 M, 0,01 M y 0,001 M, a 37°C durante 1 h. Luego se procedió a determinar la actividad azocaseinolítica remanente (sección 3.3.2.5.3.1). Para los blancos se procedió según 4.3.2.5.I.

El resultado se expresó como porcentaje de actividad azocaseinolítica en relación a la misma muestra sin preincubar.

III. Efecto de la acción de las sales de HgCl₂

El efecto de la preincubación se determinó incubando 150 µl de EC con 200 µl de la sal de HgCl₂ en tres concentraciones diferentes: 100 mM, 10 mM y 1mM, a 37°C durante 1 h. Las soluciones de HgCl₂ se prepararon a partir de un stock y se diluyeron con el buffer equimolar Tris: MES: Gly 20 mM, pH 9.

Luego se procedió a determinar la actividad azocaseinolítica remanente (sección 3.3.2.5.3.1). Para los blancos se procedió según 4.3.2.5.I.

El resultado se expresó como porcentaje de actividad azocaseinolítica en relación a la misma muestra sin preincubar.

4.3.1.2.6. Efecto de la acción de agentes reductores

El efecto de la preincubación de los siguientes agentes reductores: hidrocloreto de L-cisteína monohidratado, Na₂S, ácido tioglicólico se determinó incubando 100 µl de EC con 100 µl de la solución de los agentes reductores en concentraciones de 10 mM a 40 mM durante 30 min y 60 min a 20°C. Luego se procedió a determinar la actividad azocaseinolítica remanente (sección 3.3.2.5.3.1). Para los blancos se procedió según 4.3.2.5.I.

El resultado se expresó como porcentaje de actividad azocaseinolítica en relación a la misma muestra sin preincubar.

4.3.1.2.7. Efecto de la acción de diferentes tensioactivos aniónicos y no-iónicos

Se determinó el efecto sobre el EC de tensioactivos de diferente naturaleza química, algunos utilizados en tecnología del cuero: SDS (aniónico), Isográs AN (nombre comercial, alcohol etoxilado, aniónico, usado en la etapa de remojo), Azymol (nombre comercial, alcohol etoxilado, aniónico, usado en los procesos húmedos del proceso de curtido), Tritón X-100 (no-iónico), Baymol (nombre comercial, no-iónico, usado en la etapa de depilado).

Se preincubaron 250 µl de soluciones de tensioactivos (0,5%, 0,3% y 0,1 %) con 150 µl de EC durante 60 min a 20°C. Luego se procedió a determinar la actividad azocaseinolítica remanente (sección 3.3.2.5.3.1). Para los blancos se procedió según 4.3.2.5.I.

El resultado se expresó como porcentaje de actividad azocaseinolítica en

relación a la misma muestra sin preincubar.

4.3.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.2.1 pH óptimo

En la siguiente Tabla 4.2 se observa la variación de la actividad del EC frente a los distintos sustratos proteicos en función del pH. La máxima actividad para todos los casos se registró a pH 9 (pH óptimo). En general las queratinasas demuestran pH óptimos alcalinos salvo algunas excepciones cuyas actividades son mayores a pH ácido (Tsuboi, Ko, Matsuda, y Ogawa, 1987).

Tabla 4.2. Variación de la actividad del EC frente a los distintos sustratos proteicos en función del pH. Los resultados representan la media \pm de la desviación std de tres medidas independientes

pH	U _{alb}	U _{azo}	U _{cas}	U _{APP}	U _{epi}	U _{quer}
7	0,70 \pm 0,08	0,20 \pm 0,09	0,90 \pm 0,08	1,00 \pm 0,15	0,70 \pm 0,05	0,72 \pm 0,08
8	0,86 \pm 0,10	0,43 \pm 0,06	1,25 \pm 0,60	1,98 \pm 0,13	0,88 \pm 0,02	1,50 \pm 0,85
9	0,99\pm0,07	0,50\pm0,08	1,33\pm0,40	2,54\pm0,30	0,91\pm0,07	2,89\pm0,90
10	0,88 \pm 0,02	0,42 \pm 0,05	1,20 \pm 0,15	2,17 \pm 0,90	0,82 \pm 0,06	1,50 \pm 0,75
11	0,85 \pm 0,06	0,16 \pm 0,08	1,00 \pm 0,30	1,20 \pm 0,66	0,82 \pm 0,09	1,41 \pm 0,24
12	0,82 \pm 0,09	0,06 \pm 0,01	0,90 \pm 0,09	0,06 \pm 0,02	0,87 \pm 0,04	1,20 \pm 0,08

4.3.2.2. Estabilidad frente al pH

El EC conservó su actividad (90,7% \pm 8,35%) en un rango de pH de 8 a 10 (Figura 4.1).

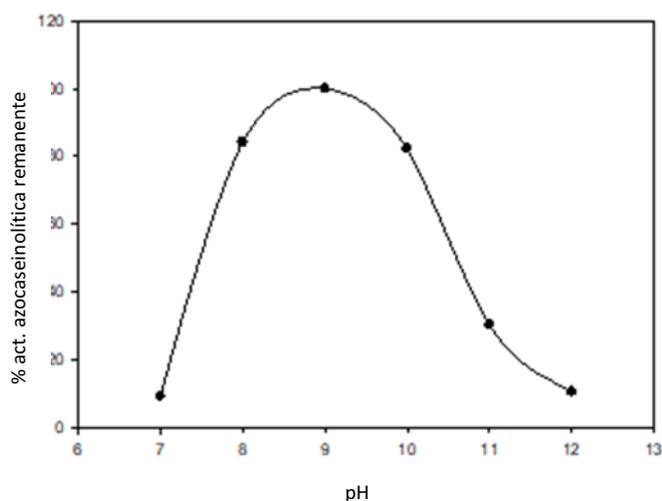


Figura 4.1. Actividad azocaseinolítica remanente del EC sometido a diferentes pHs de preincubación

4.3.2.3. Estabilidad frente a la temperatura

En la Figura 4.2 se observa la actividad azocaseinolítica remanente del EC luego de ser preincubado a distintas temperaturas durante distintos tiempos.

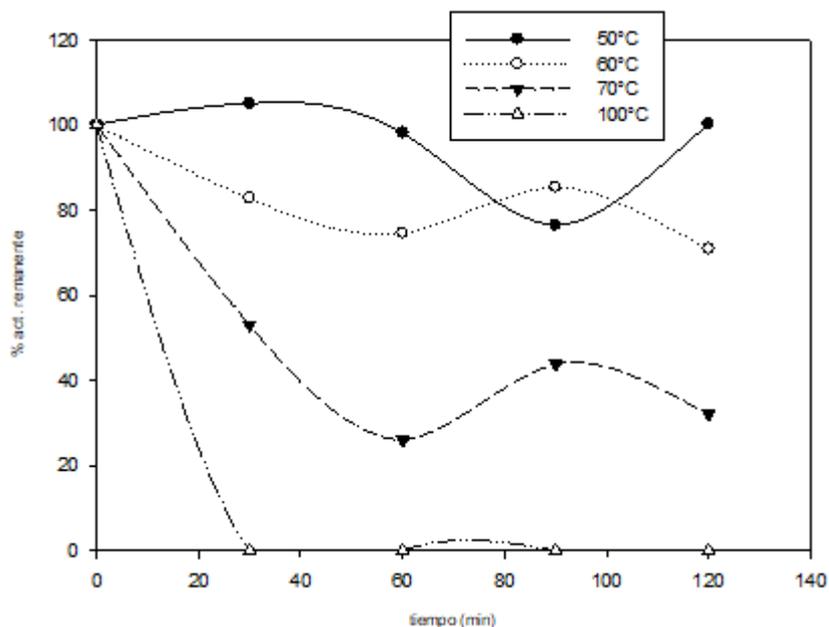


Figura 4.2. Actividad azocaseinolítica remanente del EC sometido a diferentes temperaturas de preincubación a distintos tiempos

El pool enzimático demostró una amplia tolerancia al aumento de temperatura. Se observó una pérdida de actividad leve a los 60 min inferior al 25% para la preincubación a 60°C y del 2% para la de 50°C. Mientras que la disminución fue del

15% y 22% a los 90 min a los a 60°C y a los 50°C, respectivamente (Tapia y Garcia Simões, 2008). La incubación a 100°C resultó en una total inactivación durante los primeros 30 min. Sin embargo se detectó una activación de la actividad enzimática a los 30 min de preincubación a 50°C.

Con respecto a la incubación a 25°C, la actividad azocaseinolítica remanente del EC después de 1 h, 6 h y 24 h fue de 100%, 99,4% y 99,4% respectivamente, demostrando gran estabilidad proteolítica en las condiciones ambientales.

4.3.2.4. Estabilidad frente a distinta fuerza iónica

En la Figura 4.3 se observa el comportamiento del EC frente a las distintas soluciones de NaCl. La actividad azocaseinolítica del EC demostró un incremento en todo el rango de concentraciones de NaCl, con un máximo a la concentración de 0,6M. La modulación de la actividad enzimática por la fuerza iónica es debida a dos efectos, el efecto de neutralización de las sales en las interacciones electrostáticas requeridas para la unión al sustrato y la influencia sobre los pKa de los residuos ionizables de la enzima y el sustrato (Hyone-Myong, 1996). El comportamiento del EC postula alguno de los dos mecanismos expuestos como posible explicación.

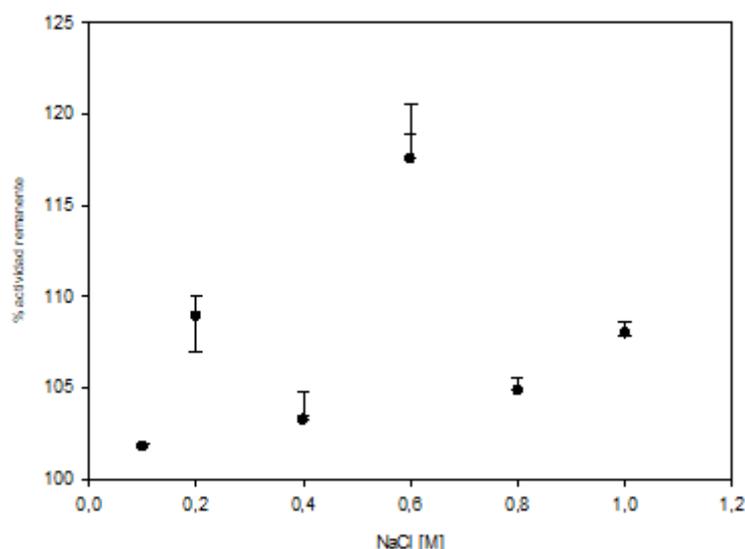


Figura 4.3. Actividad azocaseinolíticas remanentes del EC sometido a la acción de diferentes concentraciones de NaCl

4.3.2.5. Efecto de la acción de diferentes sales metálicas y no metálicas

I. Efecto de la preincubación con el sustrato azocaseína

El efecto de la preincubación del sustrato con las sales se observa en la Figura 4.4 según 4.3.1.2.5.I. Algunas sales como el Na₂SO₃ y el BaCl₂ ejercieron un efecto activador de la actividad azocaseinolítica del EC (20% y 10 % de aumento, respectivamente). Las demás sales provocaron un efecto inhibitorio parcial. Entre ellas,

la que causó una mayor disminución fue el ZnSO_4 (50%). El MnSO_4 0,1 M es bastante insoluble en las condiciones de reacción y fue dificultoso llevar a cabo la reacción enzimática. El EDTA ejerció inhibición parcial (20%) en esta concentración. Su efecto inhibitorio será analizado en la sección 4.4.2.

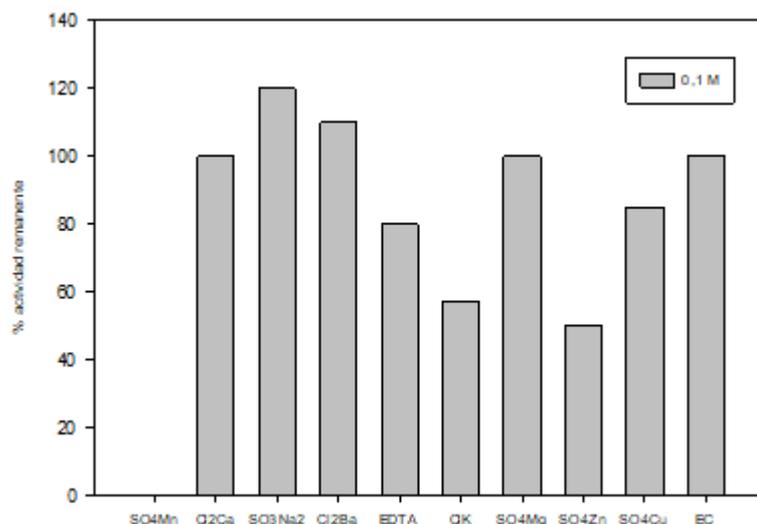


Figura 4.4. Actividades azocaseinolíticas remanentes del EC preincubando la azocaseína con distintas sales metálicas y no metálicas

II. Efecto de la preincubación con el EC

El efecto de la preincubación del EC con las sales se observa en la Figura 4.5. Las soluciones de MnSO_4 0,001M, de Na_2SO_3 0,01 M y 0,001 M y de MgSO_4 0,001 M ejercieron un efecto activador sobre el EC.

El EDTA y las soluciones de CaCl_2 , BaCl_2 , KCl , ZnSO_4 , CuSO_4 en sus distintas soluciones provocaron distintos grados de inhibición en forma inversamente proporcional a su concentración. El CuSO_4 0,1 M y el MnSO_4 0,01 M inhibieron en un 100% la actividad enzimática del EC.

En general el efecto inhibitorio o activador tiene relación con la concentración de cada sal. El Na_2SO_3 0,1 M y el SO_4Mg 0,1 M y 0,01 M producen cierta inhibición mientras que a 0,01 M y 0,001M para el primero y 0,001 M para el segundo, provocaron activación del EC. En el caso del MnSO_4 su comportamiento está condicionado por su solubilidad. El caso del Na_2SO_3 a bajas concentraciones tiene relación con su intervención en la sulfitólisis (sección 3.2.2.2).

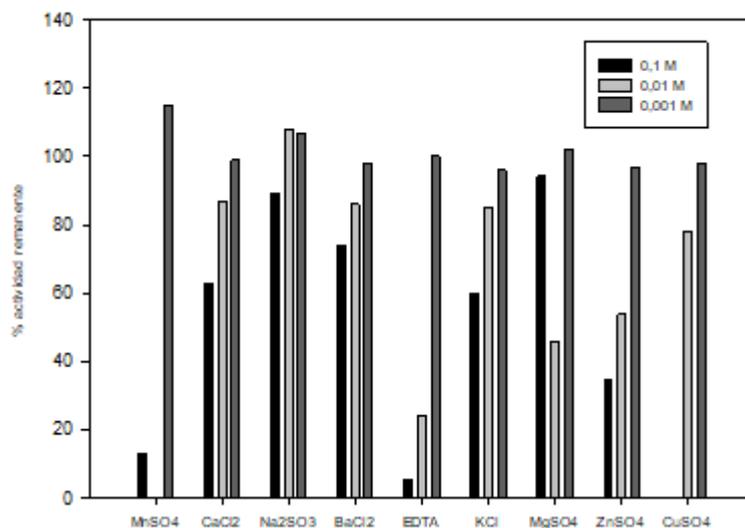


Figura 4.5. Actividades azocaseinolíticas remanentes preincubando el EC en diferentes concentraciones de sales metálicas y no metálicas

III. Efecto de la acción de las sales de $HgCl_2$

El efecto de la preincubación del EC con las sales se observa en la Figura 4.6. La acción del $HgCl_2$ 1mM provocó un aumento de la actividad azocaseinolítica remanente. Las serinproteasas presentan inhibición en concentraciones de 1 mM de Hg_2Cl (Mitra y Chakrabarty, 2005). En concentración 10 mM, 100 mM provocó una disminución del 18% y 28% respectivamente. En ninguna de las concentraciones tuvo una inhibición alta (Meevootison *et al.*, 1979).

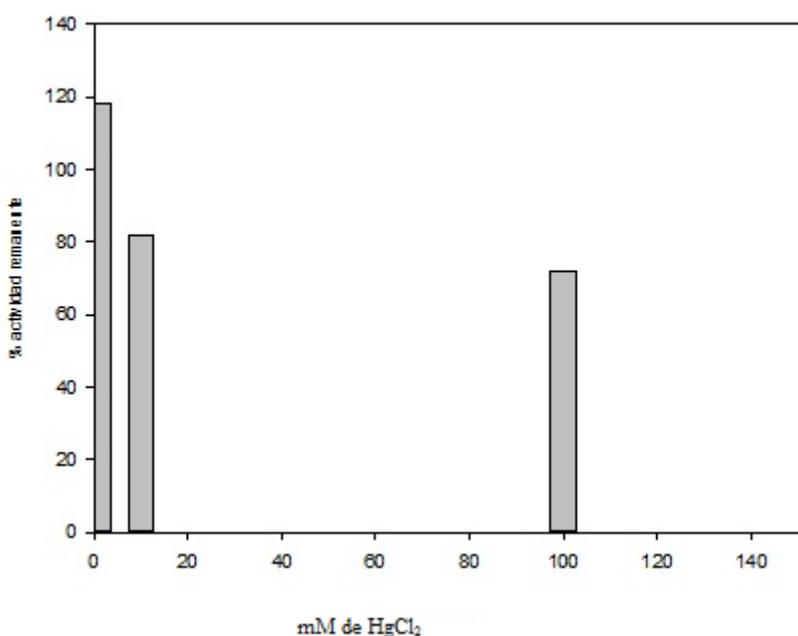


Figura 4.6. Actividades azocaseinolíticas remanentes preincubando el EC en 100 mM, 10 mM y 1mM de $HgCl_2$

4.3.2.6. Efecto de la acción de agentes reductores

El efecto de la preincubación del EC con las sales se observa en las Figuras 4.7 y 4.8. En la preincubación de 60 min, el ácido tioglicólico demostró ser un potente activador, sobre todo a concentración 10 mM mientras que el Na₂S y la L-cisteína demostraron ejercer el efecto contrario o ninguno.

En la preincubación de 30 min, los valores mayores de actividad enzimática se obtuvieron para el SNa₂, seguido por el ácido tioglicólico. El hidrocloreto de L-cisteína monohidratado disminuyó la actividad remanente en forma proporcional a su concentración en las dos condiciones de incubación (Galarza *et al.*, 2012). Kunert (1992) estudió el efecto del sulfito de sodio, cisteína, glutatión y mercaptoetanol. Determinó que el mayor incremento de actividad queratinolítica correspondió al primer compuesto, comprobando su hipótesis sobre el mecanismo de degradación de la queratina. El rol de los agentes reductores en la actividad proteolítico-queratinolítica está relacionada con el proceso de sulfitólisis.

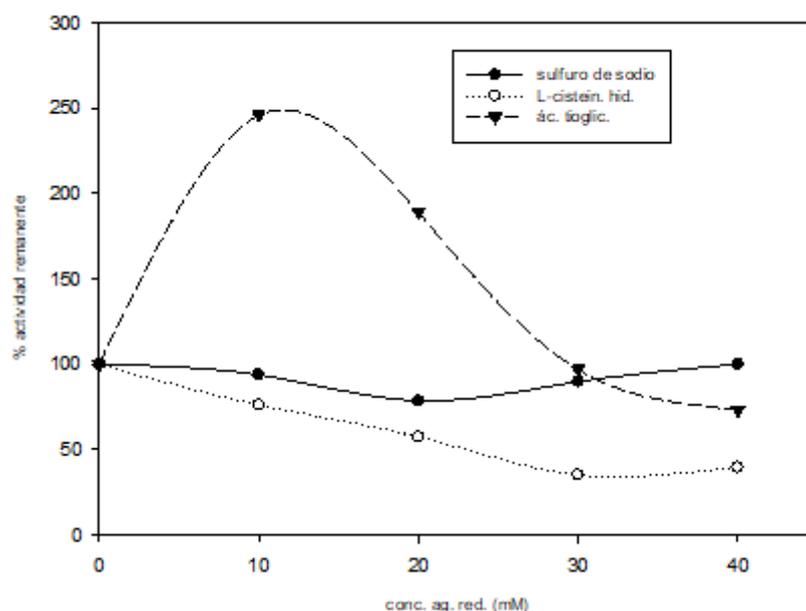


Figura 4.7. Actividad azocaseinolíticas remanentes del EC sometido a la acción de agentes reductores durante 60 min

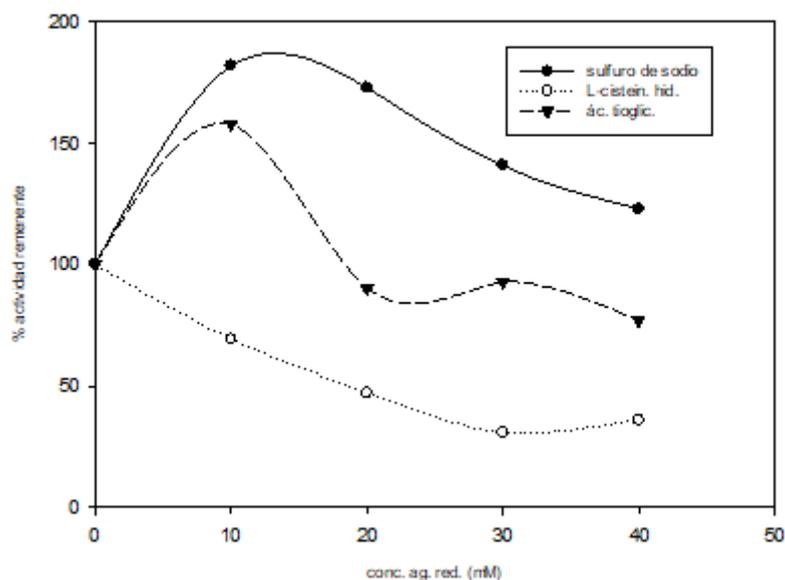


Figura 4.8. Actividad azocaseinolítica remanente del EC sometido a la acción de agentes reductores durante 30 min

4.3.2.7. Efecto de la acción de diferentes tensioactivos aniónicos y no iónicos

El efecto de la preincubación del EC con los tensioactivos se observa en la Figura 4.9. Los tensioactivos testeados incrementaron la actividad azocaseinolítica a concentraciones bajas de 0,1% a excepción del SDS. Los tensioactivos aniónicos produjeron activación (Azymol 0,1% y 0,3%, Isográs 0,1%) e inhibición (SDS causó una disminución total al 0,5% y parcial al 0,1% y 0,3%).

Posiblemente el desenrollamiento y/o las cargas negativas del tensioactivo a bajas concentraciones rodeando al sitio activo aumentaron la capacidad hidrolítica de las enzimas del EC.

El Tritón X-100, el Baymol (no iónicos) ejercieron el mayor efecto activador en todas las concentraciones testeadas (Tapia *et al.*, 2008). Este aumento podría deberse a la interacción entre el core hidrofóbico del sitio activo de la enzima y el tensioactivo (Nishiya, Yamashita, Murooka, Fujii e Hirayama, 1998).

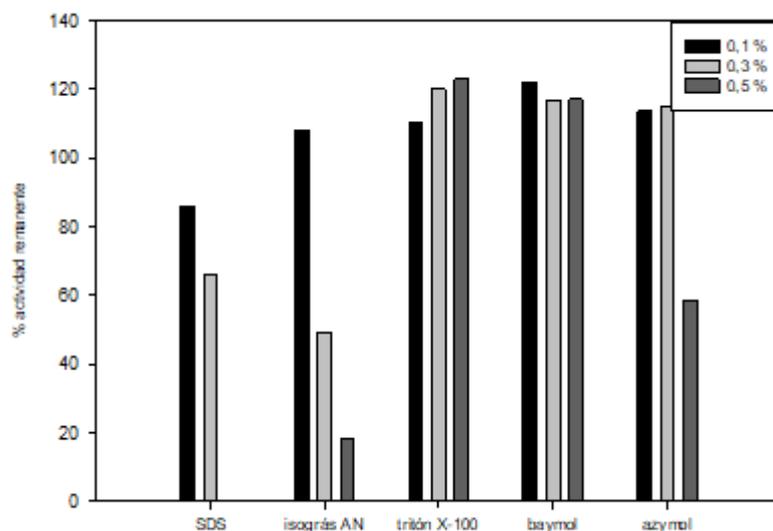


Figura 4.9. Actividad azocaseinolíticas remanentes del EC sometido a la acción de tensioactivos

4.4. Materiales y métodos II

4.4.1. Clasificación del tipo de proteasas en el pool enzimático

Dentro del estudio de las proteasas, el tipo o mecanismo del sitio catalítico es usualmente revelado por los efectos de los inhibidores de clase, clasificándolas según el sistema Merops (Merops database; Rawlings, Waller, Barrett y Bateman, 2014) en serin-proteasas, cistein-proteasas, metaloproteasas y proteasas. El comportamiento del EC en presencia de inhibidores de proteasa fue evaluado mediante la determinación de la actividad proteolítica remanente de acuerdo al protocolo de Dunn (2000).

Se testearon los siguientes inhibidores a las siguientes concentraciones: PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 100 mM en isopropanol (inhibidor de serin-proteasas); iodoacetato 100 μ M (inhibidor de cistein-proteasas); EDTA 5mM y fenantrolina 10 mM en CH₃OH (inhibidores de metaloproteasas). Se preincubaron 10 μ l de cada inhibidor en 0,98 ml de buffer con 10 μ l de EC durante 30 min a 30°C, luego se procedió a determinar la actividad caseinolítica remanente (sección 4.3.1.2.1). Para los blancos se procedió según 4.3.1.2.5.I.

El resultado se expresó como porcentaje de actividad caseinolítica en relación a la misma muestra sin preincubar.

Se hicieron controles de la inhibición que pudieran ejercer los distintos solventes reemplazando el agregado de inhibidor por el solvente.

En el caso de la fenantrolina se disolvió en CH₃OH y se determinó la actividad azocaseinolítica remanente (3.3.2.5.3.1) ya que este inhibidor absorbe a 280 nm.

4.4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El efecto de la preincubación del EC con los inhibidores de proteasas se observa en la Figura 4.10 en la que se observan las actividades proteolíticas remanentes. El PMSF fue el que ejerció un mayor efecto inhibitorio (51,74%), por lo que existiría en el pool enzimático enzimas pertenecientes a la familia de las serin-proteasas. Los blancos de los solventes (CH₃OH o DMSO) ejercieron el mismo efecto inhibitorio (50,8%) que la solución con fenantrolina (50,3% y 51% respectivamente). Por otro lado, el EDTA no sólo no ejerció efecto inhibitorio sino que provocó activación (105%) por lo que se deduce que la fenantrolina no ejerció efecto inhibitorio es decir que en el EC no existen metaloproteasas. Sin embargo el EDTA (sección 4.3.2.5) en concentraciones mayores de 0,1 M y 0,01 M, inhibió en un 93 % y 75 % respectivamente mientras que a 0,001 M no la produjo. El iodoacetato no ejerció efecto inhibitorio (95,7%).

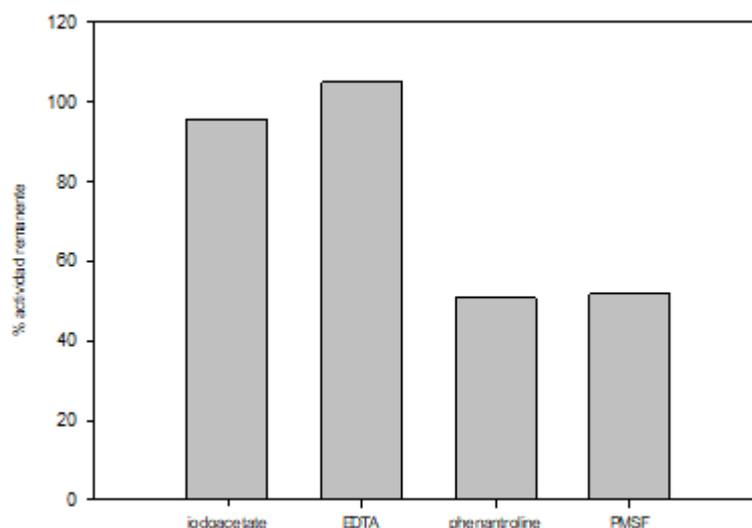


Figura 4.10. Actividades proteolíticas remanentes del EC sometido a la acción de inhibidores de proteasa

Los resultados consignados en las secciones 4.3 a 4.4 fueron publicados (Galarza, Garro, Martegani y Hours, 2016).

4.5. Materiales y métodos III

4.5.1. Actividad exopeptidásica/aminopeptídica del pool enzimático

Introducción

Este sustrato del tipo arylamida, leu-p-nitroanilida, fue utilizado para evaluar la actividad enzimática del tipo exopeptidásica sobre los extremos amino-terminales de la queratina del RP. La reacción se produce por la liberación de p-nitroanilina a partir de la hidrólisis de la Leu-p-nitroanilida (Leu-p-NA) (Galarza *et al.*, 2004; Ragot,

1966). Este tipo de actividad formaría parte del mecanismo propuesto para la degradación de la queratina (3.2.2.1). En la posibilidad de aplicar el EC a la tecnología del cuero daría idea de su eficiencia en las etapas de purga y depilado actuando en forma sinérgica con las queratinasas (capítulo 6).

La actividad aminopeptídica puede ser descrita por medio de parámetros cinéticos determinados en las condiciones iniciales de la reacción. En este caso se calcularon el K_m (constante de Michaelis-Menten) que cuantifica la concentración de sustrato a la cual la velocidad es la mitad de la velocidad máxima (es inversamente proporcional a la afinidad de la enzima por el sustrato) y la V máxima o velocidad donde la concentración del sustrato es tan elevada que toda la enzima está saturada con el sustrato y se encuentra en forma de complejo enzima-sustrato (Lehninger, 1981).

4.5.2. Determinación de la actividad aminopeptídica

Para la determinación de la actividad aminopeptídica se calculó previamente el coeficiente de extinción molar debido a que el producto liberado en la reacción enzimática está referido a la concentración expresada en molaridad (Ruffin *et al.*, 1979).

Se determinó la absorbancia a 410 nm de una solución con igual composición a la de la mezcla de reacción de la actividad enzimática reemplazando el EC por Buffer Tris-HCl-Gly 100 mM pH 9 y el sustrato, por una solución de p-NA 0,04 mM. Luego utilizando la ecuación de Lambert-Beer (1) se calculó el valor del coeficiente de extinción molar de $\epsilon_{410\text{ nm}} = 13.600\text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ donde c es la concentración (M) y l el camino óptico en cm.

$$A = \epsilon \times c \times l \quad (1)$$

La actividad aminopeptídica fue determinada usando el sustrato Leu-p-nitroanilida (Leu-pNA) (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO). La mezcla de reacción que contenía 200 μl de una solución 0,4% del sustrato en dimetilformamida: agua (1,5:2) (0,0159 M) y 3ml de Buffer Tris-HCl-Gly 100mM, pH 9 se preincubó a 37°C durante 10 min. Luego se agregaron 250 μl de EC (0,1 mg de proteína/ml) y se incubó 15 min a 37°C. La reacción se detuvo por el agregado de 0,5 ml de TCA 10%, se centrifugó a 3000 rpm 15 min y el sobrenadante se midió a 410 nm.

Para el blanco se realizó el mismo procedimiento inactivando el EC por calentamiento a 100°C por 5 min.

La unidad de actividad aminopeptídica (U_{ami}) se definió como la cantidad de enzima que bajo las condiciones de reacción libera 1 μmol de p-nitroanilina por minuto a 410 nm (Galarza *et al.*, 2004).

4.5.3. Determinación del pH óptimo

Se determinó la actividad aminopeptídica remanente según la sección 4.5.2 en

un rango de 8 a 10, usando el buffer Tris-HCl-Gly 0,1 M para establecer el pH de actividad máxima.

4.5.4. Determinación de constantes cinéticas Km y V máxima para el sustrato leu-p-nitroanilida

Para la determinación de estos parámetros cinéticos, se obtuvieron las velocidades iniciales de la reacción enzimática en condiciones de concentración de sustrato no saturante (100 µg a 700 µg) por triplicado. La reacción enzimática se llevó a cabo en Espectrofotómetro (modelo 2021, Cecil Instruments, Cambridge, UK) con cubeta termostatazada a 37°C mediante un baño termostático con bomba peristáltica para recirculación (Colora, Germany). Para la medida de la absorbancia en función del tiempo se utilizó el programa de cinética enzimática del mencionado espectrofotómetro. Se obtuvieron, para cada concentración de sustrato y para una misma concentración proteica de EC (50 ug) (por triplicado), las distintas velocidades iniciales obtenidas de las pendientes de las rectas de absorbancia vs tiempo durante los primeros 10 min de reacción (Ruffin *et al.*, 1979).

Para el cálculo de Km y Vmáx se utilizó la ecuación de Lineweaver-Burk (2) y se representó la inversa de la velocidad inicial (mmoles de producto/min) en función de la inversa de la concentración de sustrato (mmoles). La pendiente de esta recta representó Km/Vmáx y la intersección con el eje de las ordenadas, 1/Vmáx.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (2) \text{ Ecuación de Lineweaver-Burk}$$

4.5.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación del pH óptimo

El pH óptimo de actividad aminopeptídica se encuentra entre los valores 8,5 y 9 (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Variación de la actividad aminopeptídica del EC en función del pH

pH	% act. remanente
8	79±5
8,5	91±6
9	100±4
9,5	56±3
10	64±2

Determinación de constantes cinéticas K_m y V máxima para el sustrato leu-p-nitroanilida

Los parámetros cinéticos obtenidos en la región lineal de la reacción enzimática que corresponden a las velocidades iniciales, en función de las distintas concentraciones de sustrato se presentan en la Figura 4.11. Se excluyeron los datos de baja concentración de sustrato: 100 μg y 200 μg .

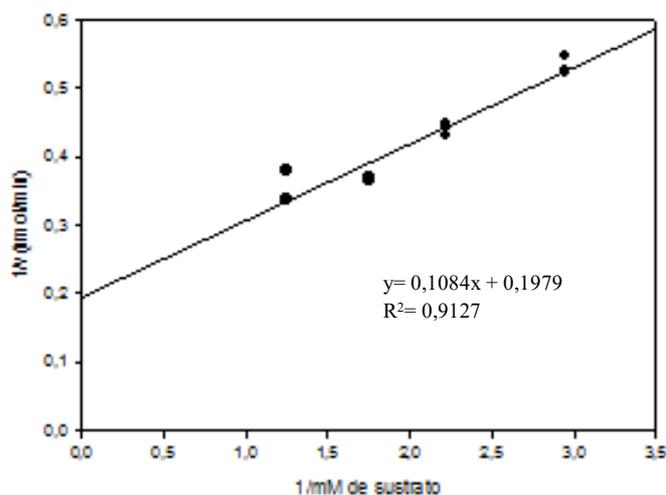


Figura 4.11. Representación de la inversa de las velocidades iniciales (min/nmol) de la actividad aminopeptídica del EC en función de la inversa de la concentración de sustrato (mM)

Según la ecuación que surge del gráfico y aplicando la ecuación de Lineweaver-Burk los valores obtenidos fueron K_m 0,55 mM y V máx 5 nmol/min, del mismo orden de los obtenidos en bibliografía (Ruffin *et al.*, 1979).

4.6. Materiales y Métodos

4.6.1 Actividad queratinolítica del pool enzimático usando “residuo pelo” como sustrato

Para poder caracterizar y estandarizar la actividad queratinolítica utilizando el “residuo pelo” como sustrato, se determinaron diversos parámetros como:

- intervalo de linealidad de la reacción en función del tiempo de incubación y de la concentración de enzima
- saturación del sustrato en función de su granulometría y concentración
- estabilidad del EC a la temperatura

4.6.2. Determinación de la linealidad en relación al tiempo de incubación

Se determinó la actividad queratinolítica (sección 3.3.2.5.3.2.II) variando el

tiempo de incubación de la mezcla de reacción (1h, 2h, 4h, 6h, 18h y 24h) y manteniendo constante el volumen de EC.

4.6.3. Determinación de la linealidad en relación a la concentración de enzima

Se determinó la actividad queratinolítica (sección 3.3.2.5.5.2.II) variando la concentración proteica del EC en la mezcla de reacción cuya concentración inicial fue de 33,54 µg de proteínas/ml.

4.6.4. Determinación del grado de saturación del sustrato RP

La acción de las queratinasas requiere de un sustrato sólido sobre queratina nativa por lo cual el fenómeno de adsorción sobre el sustrato insoluble adquiere relevancia. En este sistema del tipo heterogéneo el área de sustrato expuesto a la acción enzimática tiene importancia. A igual cantidad de sustrato, la superficie de contacto sólido-solución aumenta cuanto más pequeñas sean las partículas del mismo. La tasa de hidrólisis es proporcional al área de la superficie del sustrato y a la cantidad de enzima adsorbida por unidad de área. Debido a que el sustrato no tiene una superficie lisa, la velocidad inicial es directamente proporcional al área, pero sólo a una fracción de la concentración de enzima. Al mismo tiempo las tasas de reacción son altamente sensibles a la fuerza iónica ya que además de actuar sobre la enzima, en general influye en la unión de la enzima al sustrato insoluble (Mc Laren y Packer, 1970).

La optimización de la actividad queratinolítica usando el sustrato RP presenta numerosas ventajas. El elevado costo del sustrato comercial azul de queratina (sección 2.4.1.3) y la gran dispersión en la absorbancia que libera la reacción enzimática no justifican su utilización (Okoroma, 2012; Scott *et al.*, 2004). En cambio, el RP puede obtenerse como residuo de la industria curtidora y es el sustrato sobre el cual crecen los hongos que producen las queratinasas. Sin embargo, al ser un sustrato insoluble constituye un medio heterogéneo por lo que es necesario establecer cómo afecta en la mezcla de reacción la diferente granulometría, la saturación y la dispersión de datos asociada.

1. En función del distinto tamaño o granulometría del sustrato

El RP utilizado (sección 3.3.1.1) fue sometido a un proceso de tamizado por distintos tamices cuyas mallas fueron: mesh 16 (1,19 mm), mesh 18 (1,00 mm), mesh 20 (aprox 0,850 mm), mesh 35 (0,5 mm), mesh 50 (0,297 mm), mesh 60 (0,250 mm), mesh 70 (0,210 mm) (USA Standard ASTM E 11-61) (Núñez, 2008).

La actividad queratinolítica se determinó como en la sección 3.3.2.5.5.2.II, manteniendo constante la cantidad de RP (20 mg) pero variando su granulometría. En el caso de la malla 75, se usó el sustrato que atravesaba la malla 70. Se determinaron blancos de sustrato en las mismas condiciones, pero sin EC. Los resultados se expresaron en unidades de absorbancia.

2. En función de la granulometría y de la concentración del sustrato

La actividad queratinolítica se determinó como en la sección 3.3.2.5.3.2.II, variando la granulometría y la cantidad o concentración de RP (10 mg a 60 mg). El resultado se expresó en unidades de absorbancia.

4.6.5. Estabilidad a la temperatura del EC frente a la actividad queratinolítica

Para establecer la estabilidad a la temperatura, se preincubó el EC a distintas temperaturas (20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 100°C) durante 60 min en baño termostático, luego se llevó a 0°C mediante baño de hielo y se procedió a determinar la actividad queratinolítica remanente (sección 3.3.2.5.3.2.II).

4.6.6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de la linealidad en relación al tiempo de incubación

La variación de la actividad, expresada en absorbancia, en función al tiempo de duración de la reacción se observa en la Figura 4.12. Dicha reacción aumentó linealmente en el rango comprendido entre 1 h a 6 h y luego se mantiene constante (en promedio) hasta las 24 h. Este comportamiento puede deberse a que el RP es un sustrato polimérico complejo (Whitaker, 1993).

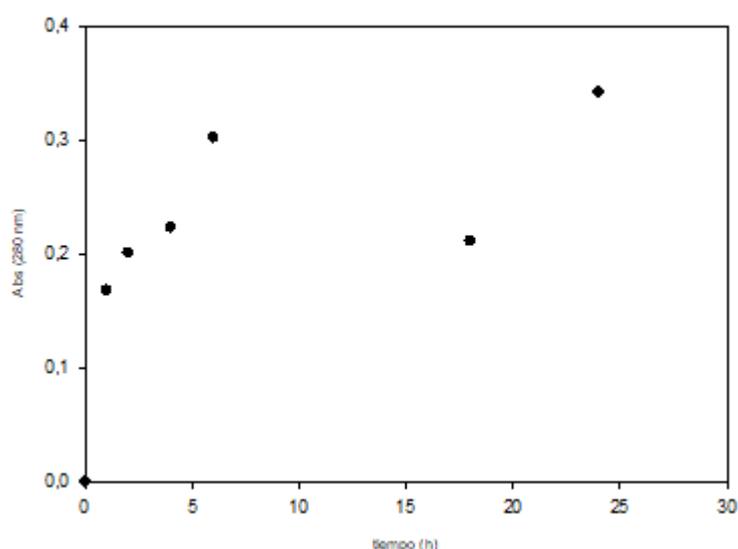


Figura 4.12. Variación de la actividad queratinolítica (en absorbancia) en función del tiempo de incubación de la reacción enzimática

Determinación de la linealidad en relación a la concentración de enzima

La variación de la actividad (U_{quer}) en función de la concentración proteica del EC se observa en la Figura 4.13. El rango de linealidad de la reacción se mantuvo entre 100 μl de EC (3,35 μg de proteínas) y 200 μl de EC (6,70 μg de proteínas). Luego comenzó a disminuir hasta 500 μl (16,77 μg de proteínas).

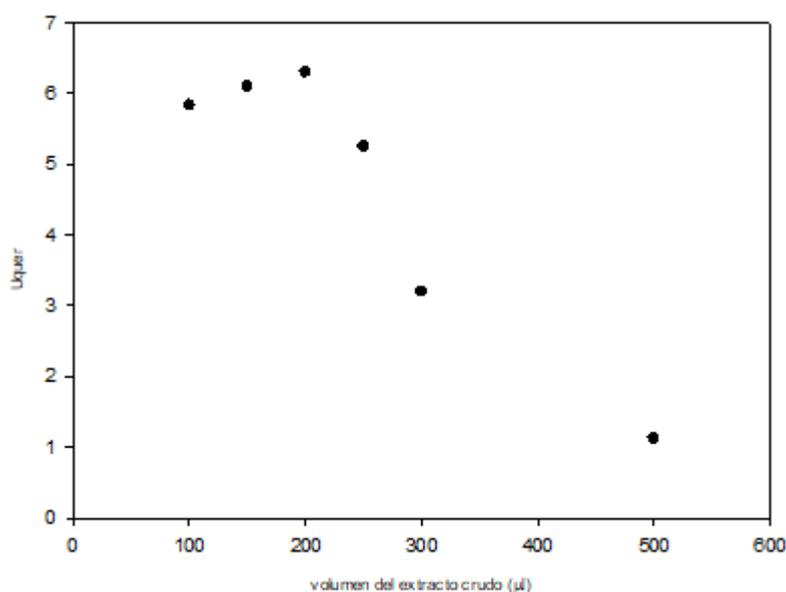


Figura 4.13 Variación de la actividad queratinolítica en función de la concentración de proteínas en μl de EC

Grado de saturación del sustrato

1. En función del distinto tamaño o granulometría del sustrato

La variación de la actividad (expresada en absorbancia) del EC en función de la granulometría del sustrato expresada como el número de malla que retiene el sustrato se observa en las Figuras 4.14 y 4.15. El aumento de la absorbancia de la actividad queratinolítica del EC en las partículas que atraviesan el mesh 70 se debe a dos factores. Por un lado, la mayor accesibilidad de la enzima al sustrato al aumentar el área de contacto y por otro el aumento de la disolución del sustrato en sí mismo (Fig. 4.15). La dispersión en la medida de absorbancia para el EC y los blancos de sustrato es menor en los tamaños intermedios de sustrato (malla 18 a 50).

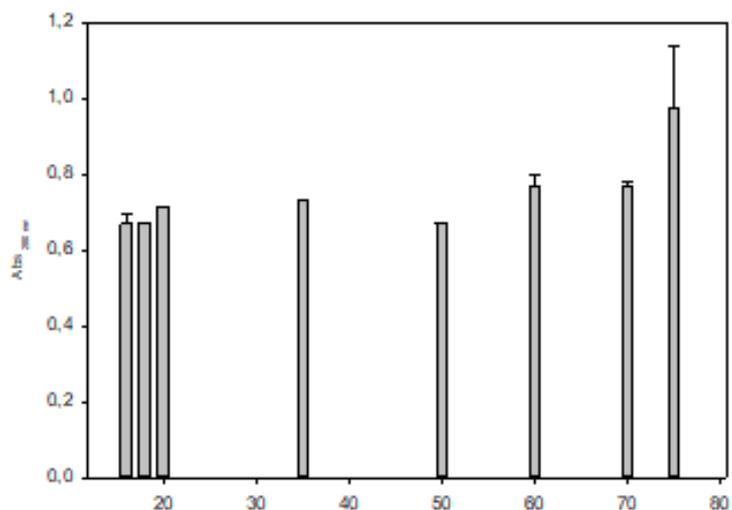
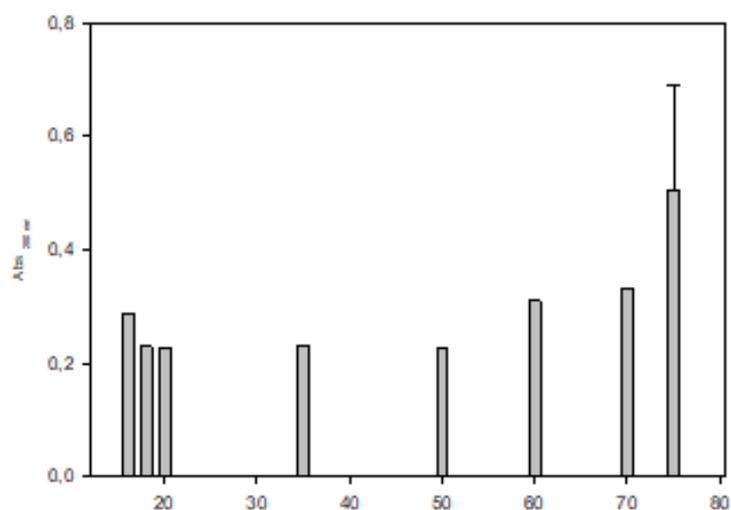


Figura 4.14. Variación de la actividad queratinolítica (absorbancia) del EC en función de la granulometría del sustrato



4.15. Variación de las absorbancias de los blancos de sustrato en función de su granulometría

2. En función de la granulometría y de la concentración del sustrato

La actividad es lineal para el RP retenido por tamiz 18, 35 y 50 en el rango entre 10 mg y 40 mg (Figura 4.16). A partir de los 40 mg continúa lineal para el retenido por tamiz 18. Para el sustrato retenido por los tamices 20 y 50 cambia a una mayor pendiente y luego disminuye. En el retenido por tamiz 35 se mantiene constante en promedio.

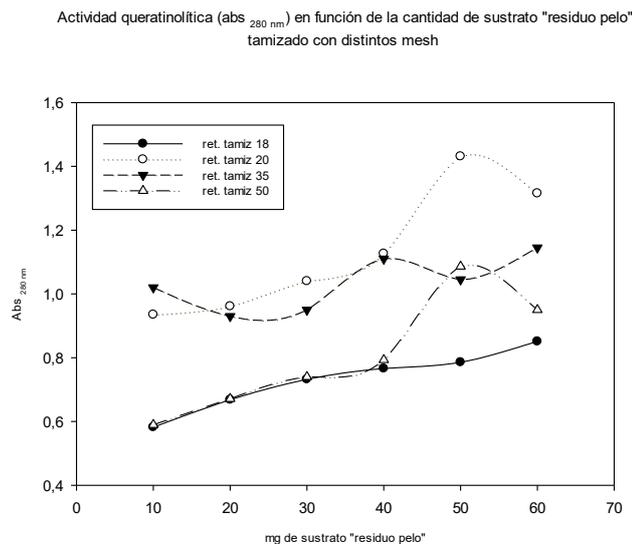


Figura 4.16. Variación de la actividad queratinolítica del EC en función de la granulometría y de la concentración del sustrato RP

En todo el rango el EC no se encuentra saturado por el sustrato, situación que puede quedar enmascarada porque el sustrato mantiene una disolución proporcional a su peso o concentración en la mezcla de reacción. Teniendo en cuenta estas observaciones y las ventajas operativas se eligió la relación 1% P/V (sustrato/buffer) en la estandarización de medida de actividad.

La absorbancia de los blancos aumentó en forma proporcional al aumento de peso de sustrato en todo el rango y para todos los tamaños de partícula. Las partículas que muestran mayor dispersión son las retenidas por tamiz 18 y 35. Las retenidas por tamiz 20 y 50 presentaron dos pendientes distintas: una pendiente menor entre 10 mg - 30 mg de RP y una mayor entre 30 mg- 60 mg de RP (Figura 4.17).

Se debió tener en cuenta que a altas relaciones peso/volumen fue difíciloso recuperar el volumen para realizar la medida de absorbancia debido en parte a la hidratación del RP (sección 3.3.1).

Variación de blancos de sustrato en función de la cantidad de sustrato "residuo pelo" tamizados con distintos mesh

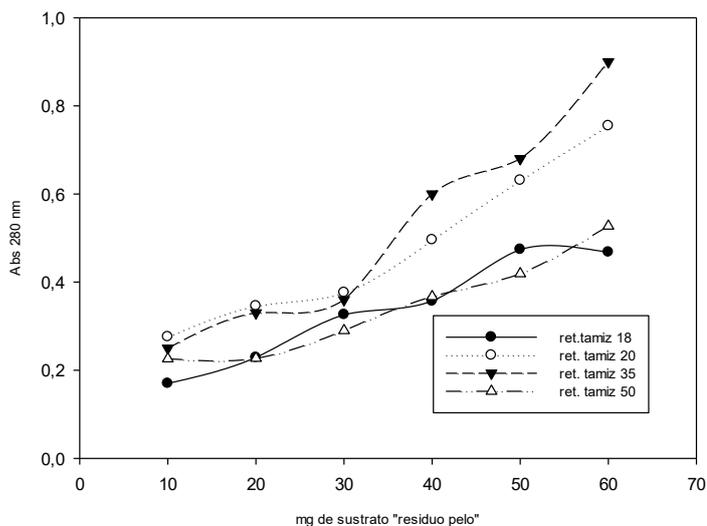


Figura 4.17. Variación de la absorbancia de los blancos de sustrato en función de la granulometría y de la concentración del sustrato RP

Estabilidad a la temperatura del EC frente a la actividad queratinolítica

En la Figura 4.18 se observa la actividad queratinolítica remanente del EC luego de ser preincubado a distintas temperaturas durante 60 min. El aumento de actividad queratinolítica con el aumento de la temperatura durante la incubación puede deberse a una hidrólisis del sustrato RP más que a un mayor aumento de la actividad enzimática.

La estabilidad a la temperatura es mayor para el caso del sustrato azocaseína sección 4.3.2.3. La actividad azocaseinolítica remanente después de 60 min de preincubación a 50°C es del 98% mientras que la actividad queratinolítica residual en las mismas condiciones es de un 30%.

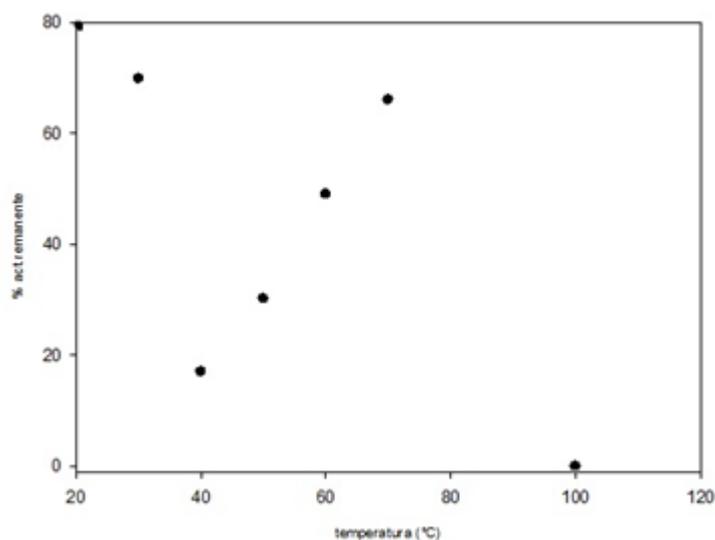


Fig 4.18. Actividad queratinolítica remanente del EC sometido a diferentes temperaturas de preincubación durante 60 min

4.7. Materiales y métodos V

4.7.1. Identificación de las proteasas-queratinasas

Se ensayaron diversas condiciones de purificación del EC. En los pasos previos, se procedió al desalado y eliminación del pigmento del EC mediante precipitación acetónica, etanólica, exclusión molecular en columna Sephadex G25 (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO), precipitación con sulfato de amonio al 85%, posterior diálisis, concentración en evaporador rotatorio (Figmay S.R.L., Córdoba). Posteriormente se procedió a la purificación en cromatógrafo FPLC AKTA P 920 en columnas de exclusión molecular: Sephacryl 200. Las fracciones de mayor absorbancia a 280 nm o de mayor actividad azocaseinolítica y/o queratinolítica se combinaron para volver a inyectar. En esta segunda separación en corridas separadas se usaron columnas de intercambio aniónico: DEAE- celulosa en buffer Tris-HCl 20 mM pH 8 en un gradiente de NaCl a 100%; Q sepharosa; intercambio catiónico: Sepharosa catiónica en buffer Ac- Acetato 20 mM pH 5. Posteriormente, las fracciones eluidas que demostraron mayor actividad azocaseinolítica y/o queratinolítica fueron desaladas y liofilizadas. Posteriormente fueron sometidas a electroforesis SDS-PAGE. El problema que se encontró en las diversas condiciones fue que no se obtuvieron rendimientos significativos, ni tampoco bandas proteicas apreciables en el gel. El zimograma posterior tampoco mostró bandas nítidas.

4.7.1.1. Isoelectroenfoque acoplado a zimograma

Se cambió la estrategia de trabajo comenzando por el isoelectroenfoque y posterior zimograma para poder determinar la banda proteica que poseía actividad enzimática con el objetivo de hacer su identificación mediante los datos m/z de los fragmentos trípticos sometidos a Maldi-ToF.

Técnica de isoelectroenfoque

La muestra de EC obtenida según 3.3.2.3 de concentración proteica 49 µg/ml fue desalada mediante columna de exclusión molecular PD 10 (Sephadex G25, Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) liofilizada, resuspendida en agua destilada apirógena (20 µl) y posteriormente centrifugada a 16000 g durante 15 min. El precipitado se redisolvió en agua destilada apirógena. Se sembraron 3 µl de muestra.

En el desarrollo del IEF se utilizó un equipo Mini IEF Cell (Modelo 111, Bio Rad). Para la preparación de los geles de poli(acrilamida) se utilizó la bandeja provista por dicho equipo. El gel de poli(acrilamida) se preparó con 2 ml de acrilamida-bis(acrilamida) (25% T, 3 % C), 2 ml de glicerol (25% p/v), 0,5 ml de anfolitos (BioLyte 3-10, Bio-Rad, Hércules, CA) y 5,5 ml de agua desionizada. Luego de desgasificar al vacío, se agregaron los siguientes reactivos polimerizantes: 3 µl de TEMED y 60 µl de persulfato de amonio 10%. Para cada placa se usó una película plástica (Gel Bond support film, Bio-Rad) cuyo lado hidrofóbico se colocó sobre el vidrio de iguales dimensiones y ambos se invirtieron sobre la bandeja con el lado hidrofílico hacia abajo. La polimerización de los geles se produjo entre el lado hidrofílico y la bandeja formadora de geles durante 2 h a la luz y finalmente se removieron de la bandeja con espátula.

Las muestras (3 µl) y los marcadores de pI (Amersham GE Healthcare 3-10), se sembraron y se dejaron difundir en el gel durante 5 min. Una vez que los electrodos de la celda de IEF fueron humedecidos con agua desionizada, se apoyaron los geles y se cerró herméticamente.

El desarrollo del IEF se llevó a cabo a tres voltajes, respectivamente: 15 min a 100 v, 30 min a 200 v y 60 min a 450 v. Luego uno de los geles fue fijado con una solución fijadora (ácido sulfosalicílico 4 g, metanol 30 ml, TCA 12,5 g, agua c.s.p.) durante 30 min, luego se coloreó con solución colorante (ácido acético glacial 10 ml, etanol 27 ml, Coomassie Brilliant Blue R 250 40 mg, agua c.s.p. 100 ml). Finalmente fue decolorado con solución decolorante I (ácido acético glacial 7 ml, etanol 12 ml, CuSO₄ 500 mg y agua c.s.p. 100 ml) y solución decolorante II (ácido acético glacial 7 ml, etanol 12 ml y agua c.s.p. 100 ml) hasta obtención de fondo claro (Errasti, 2013).

La estimación de los puntos isoeléctricos (pI) se llevó a cabo mediante una curva de calibración con los pI de las proteínas del patrón en función de la distancia recorrida por las mismas, a partir de la posición del cátodo.

Zimograma

Para poder detectar la posición de la banda proteica con actividad proteolítica, el gel que no había sido fijado fue colocado inmediatamente sobre un gel de agarosa de la misma medida embebido en una solución de caseína al 1% en buffer Tris-HCl. Para ello, se preparó una placa de agarosa al 1% polimerizada sobre una película plástica de Gel Bond, embebida en una solución de caseína al 1%. El gel del IEF se puso en contacto con el gel de agarosa en estufa a 37°C durante 1 h en cámara húmeda. Luego la placa de agarosa se fijó, se secó y se coloreó con una solución de Coomassie Brilliant Blue R-250, se decoloró y se secó al aire (Errasti, 2013).

4.7.1.2. Identificación de proteasas mediante electroforesis bidimensional y análisis por espectroscopía de masa

En la identificación de proteínas se utilizó la técnica del mapeo peptídico o de la huella peptídica. Se basa en que una proteína aislada es convertida en péptidos de tamaño medio mediante la acción de enzimas específicas, en general tripsina, que son características de cada proteína particular. La determinación de la masa de los péptidos permite hacer comparaciones con las masas teóricas del conjunto de péptidos esperados para las secuencias almacenadas en una base de datos y sugerir las que se ajustan mejor a los hallazgos experimentales en función del número de señales de masa identificadas y de la diferencia entre los datos teóricos y experimentales utilizando diferentes algoritmos matemáticos. Independientemente del algoritmo usado, la exactitud en la medida de masa es un factor determinante en la identificación (Henzel, Watanabe y Stults, 2003; Pappin, Hojrup y Bleasby, 1993).

Electroforesis bidimensional

El EC de concentración proteica 300 µg/ml fue desalado en columna de exclusión molecular PD 10 (Sephadex G25, Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden), liofilizado y redissuelto en solución 1 mM de PMSF en isopropanol para evitar la autoproteólisis.

La muestra, analizada en la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas del Instituto Pasteur de Montevideo, fue sometida en primera instancia a un gel bidimensional.

Para el gel bidimensional, se procedió a una purificación parcial con el kit comercial 2-D Clean-Up kit (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) del EC (30 µl de la muestra equivalente a 50 µg de proteínas) para precipitar proteínas y separarlas de contaminantes como detergentes, sales, lípidos, fenoles y ácidos nucleicos. El pellet obtenido fue resuspendido en una solución de urea 7 M, CHAPS {3-[(3-Cholamidopropyl) dimetilamonio]-1-propansulfonato hidrato} 2%, IPG Buffer 6-11 (mezcla comercial de urea, detergente zwitterión, anfolitos, y ditiotreitól) (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), 0,5% azul de bromofenol 0,002% y ditiotreitól 17 mM.

Para el isoelectroenfoque (primera dimensión) se cargaron 50 µg de la muestra a tiras IPG Strips 3-10, de 7 cm por rehidratación pasiva toda la noche a temperatura ambiente. El isoelectroenfoque se llevó a cabo en equipo Ettan IPGphor (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) y se aplicaron voltajes escalonados: 1-300 v, constante, durante 60 min; 2-1000 v, en gradiente, durante 30 min; 5000 v, en gradiente, durante 80 min; 5000 v, constante, hasta 1,5 kVh. Los parámetros alcanzados fueron: 3695 V; 48 uA y el proceso duró 3 h 54 min en total.

Se equilibró con el buffer de equilibración I (urea 6 M, Tris 75 mM pH 8,8, glicerol 29,3%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,002%, DTT 10 mg/ml) durante 15 min a temperatura ambiente en agitación. Luego con el buffer de equilibración II (urea 6 M, Tris 75 mM pH 8,8, glicerol 29,3%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,002%, iodoacetamida (IAA) 25 mg/ml) durante 15 min a temperatura ambiente en agitación.

Para la segunda dimensión, se realizó una electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 12,5% en equipo ETTAN Dalt Six (Amersham Bioscience, UK). La corrida se llevó a cabo con corriente de 10 mA durante 15 min y luego de 20 mA hasta el borde del gel (Obal *et al.* 2012). El marcador de peso molecular fue Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). La tinción se realizó con la técnica del Coomassie Blue Coloidal (Neuhoff, Arold, Taube y Ehrhardt, 1988).

Identificación por mapeo peptídico

Se tomaron para identificar los spots más representativos cuyas masas moleculares y puntos isoeléctricos fueron: 37 kDa, pI 4,7 (J9); 19 kDa, pI 5,7 (J10); 33 kDa, pI 8,8 (J11), este último era coincidente con la banda que expresaba actividad en el zimograma (sección 4.7.2).

Los spots proteicos en el gel fueron sometidos a digestión trípica (sequencing-grade, Promega) a 37°C toda la noche. Luego los péptidos fueron extraídos del gel usando acetonitrilo 60% en 0,1% TFA, liofilizados y desalados en microcolumna de fase reversa C 18 (Omix Pipette tips, Varian) (Folle *et al.*, 2017). La elución de las muestras se realizó directamente a la cubeta de muestras del espectrómetro de masa. Los espectros de masa MS y MS/MS de las muestras digeridas fueron obtenidos mediante espectrómetro de masa Maldi ToF (4800 analyzer, Ab-Sciex, Darmstadt, Alemania) en modo reflector positivo. Para la calibración externa se usó una mezcla de péptidos standards (Mix 1, AB-Sciex). Los valores de m/z medidos en los modos de adquisición MS y MS/MS fueron contrastados en sistemas de búsqueda proteómica.

4.7.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Isoelectroenfoque acoplado a zimograma

En la Figura 4.19 se observa el perfil de pI del EC de *Trichophyton ajelloi*, donde se encuentra una banda cercana a pI 6,25 mientras que en el zimograma la banda activa se localizó en las cercanías del pI 9.

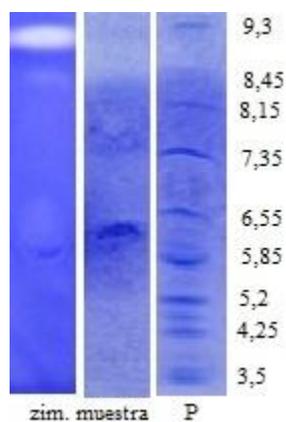


Fig 4.19. Zimograma (carril 1) a partir del IEF de la muestra de EC (carril 2); P: marcadores de pI (carril 3)

Identificación de proteasas mediante electroforesis bidimensional

En la Figura 4.20 en el gel bidimensional, las distintas bandas proteicas se encuentran separadas de acuerdo a su pH y pI. Se han señalado los spots de los que luego fueron obtenidos sus espectros de masa MS y MS/MS: 37 kDa, pI 4,7 (J9); 19 kDa, pI 5,7 (J10); 33 kDa, pI 8,8 (J11). Se encontró una banda proteica a 27,5 kDa, pI 7,1, que puede coincidir por la reportada como aminopeptidasa AP₁ por Ruffin (1979).

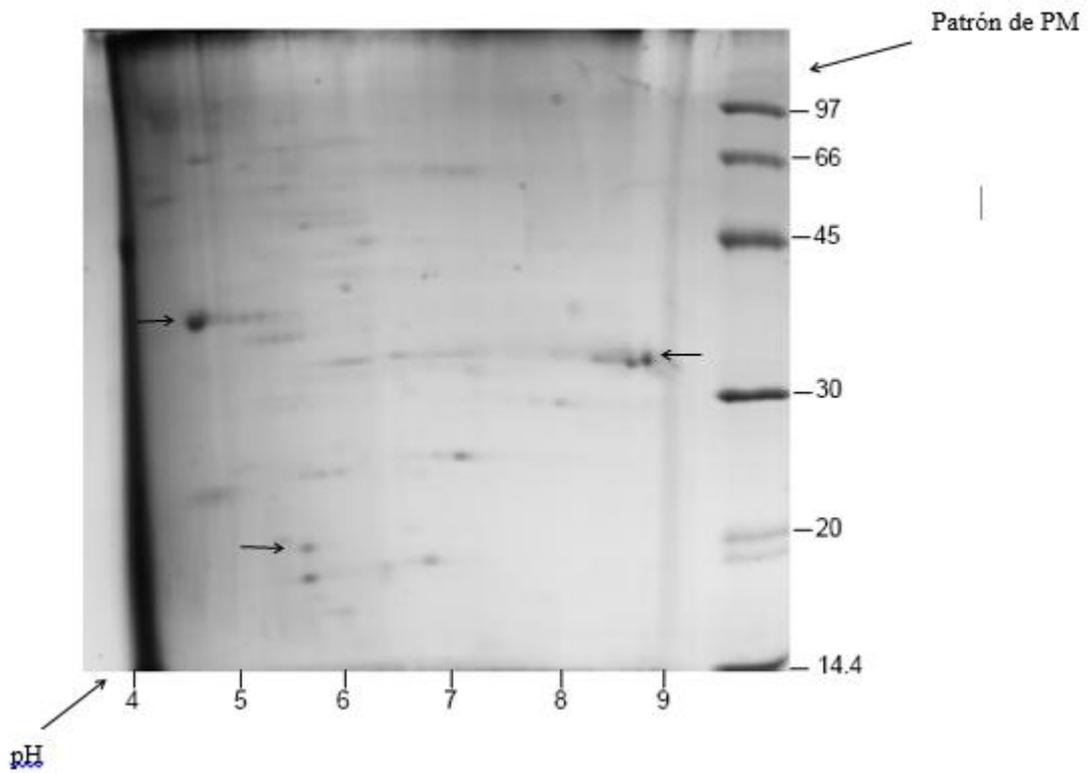


Fig. 4.20 Electroforesis bidimensional: las flechas indican los spots representativos: 37 kDa, pI 4,7 (J9); 19 kDa, pI 5,7 (J10); 33 kDa, pI 8,8 (J11) analizados posteriormente para su identificación por medio de los espectros de masa MS y MS/MS

Identificación por mapeo peptídico

En las siguientes figuras se muestran los espectros de masa m/z de los fragmentos peptídicos de acuerdo al porcentaje de intensidad de la señal (% intensidad vs masa m/z).

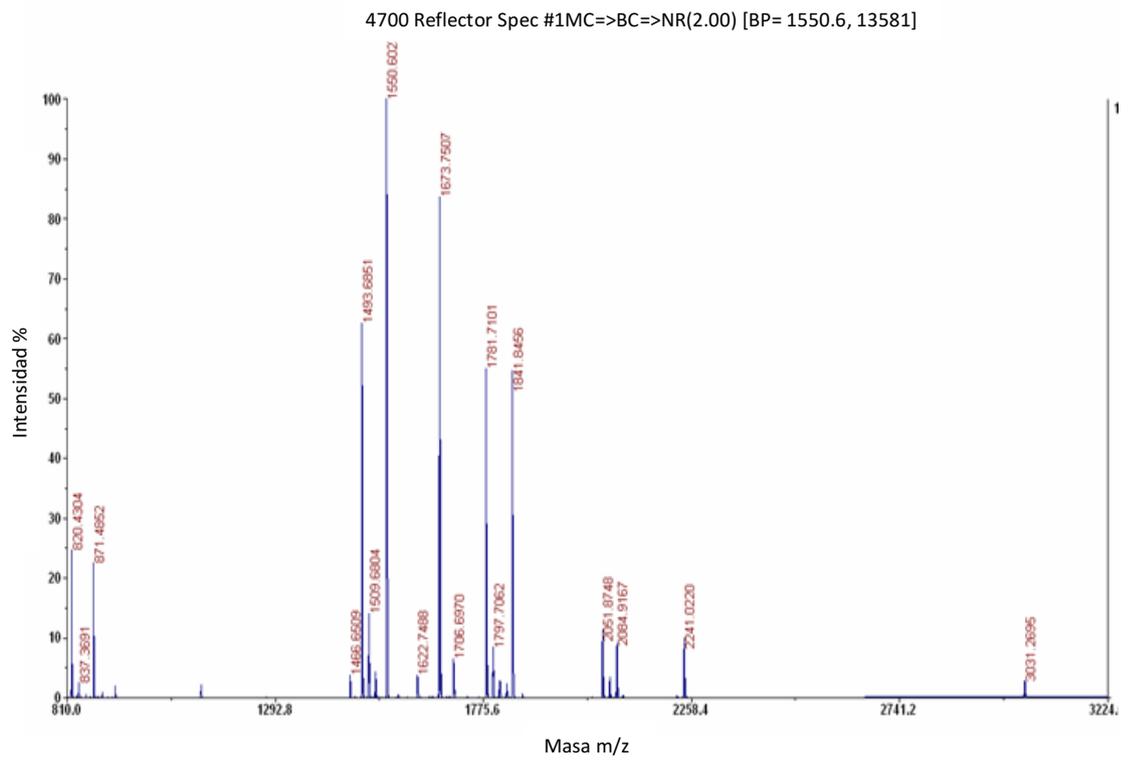


Figura 4.21. Espectro de los fragmentos peptídicos en función de la masa (m/z) del spot J9 (37 kDa, pI 4,7)

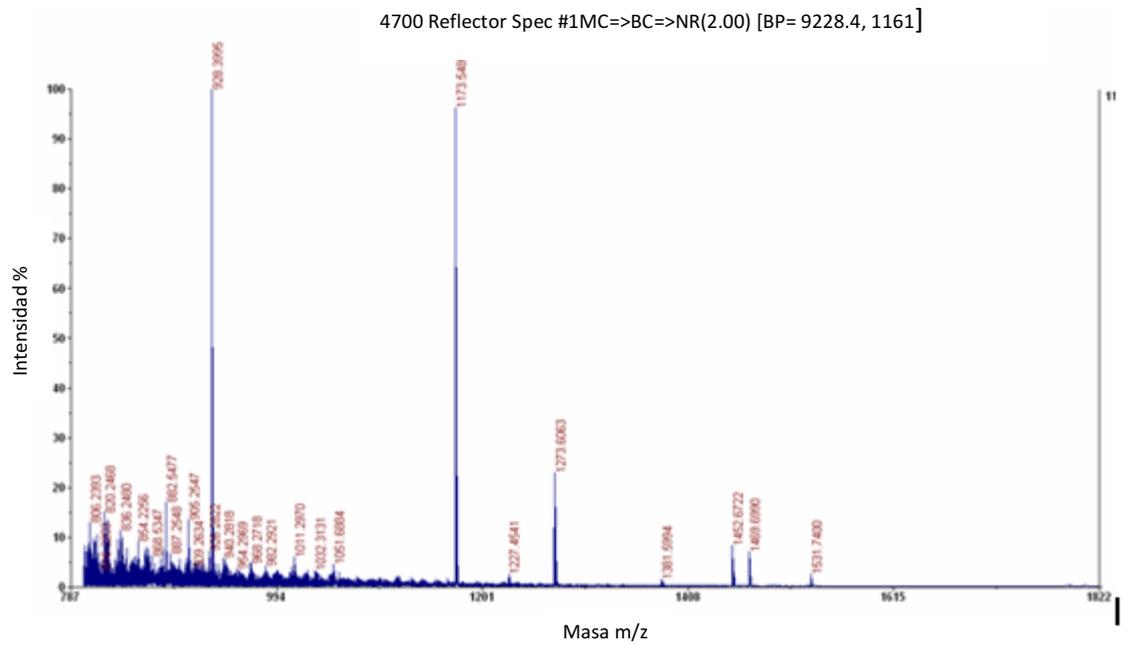


Figura 4.22. Espectro de los fragmentos peptídicos en función de la masa (m/z) del spot J10 (19 kDa, pI 5,7)

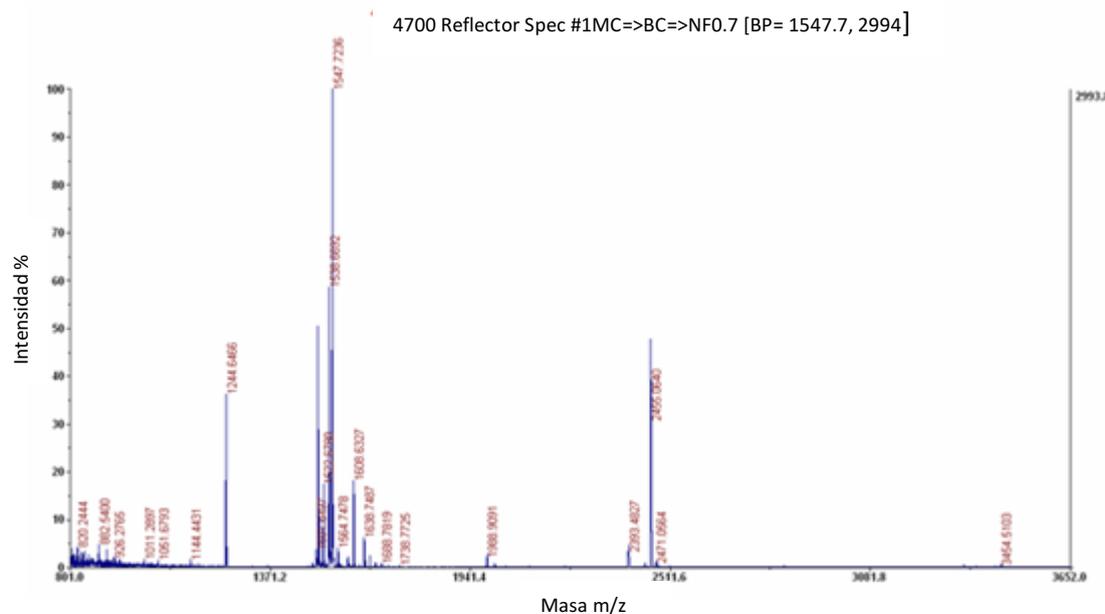


Figura 4.23. Espectro de los fragmentos peptídicos en función de la masa (m/z) del spot J11 (33 kDa, pI 8,8)

Los datos MS (m/z) de las Figuras 4.21, 4.22 y 4.23 y los de MS/MS (m/z) de los picos del espectro (no consignados) fueron contrastados contra distintas bases de datos: Mascot (Matrix Science, <http://www.matrixscience.com>), NCBI, EST de hongos, UNIPROT. A pesar de que los espectros fueron de muy buena calidad, no se pudo identificar ninguna proteína coincidente con las reportadas. Esta situación puede deberse a que el proteoma del hongo *Trichophyton ajelloi* no está secuenciado en su totalidad. Debido a esta situación es necesaria la secuenciación de *novo* a partir de las intensidades de los distintos espectros MS/MS para poder reconstruir el proteoma especialmente de la banda proteica J 11 que coincide con la banda de actividad del zimograma. La secuenciación de *novo* se basa en que al conocer la diferencia de masa entre los picos de fragmentación y las masas de los aminoácidos se puede obtener la secuencia del péptido fragmentado.

4.8. CONCLUSIONES

En general, muchos de los resultados experimentales concuerdan con la literatura referida a las enzimas queratinolíticas, que se caracterizan por su robustez y amplio espectro de acción frente a numerosos sustratos proteicos.

El pool enzimático de *Trichophyton ajelloi* demostró tener actividad frente a proteínas solubles (caseína, azocaseína, seralbúmina bovina, leu-p-nitroanilida) e insolubles (colágeno, azul de queratina, queratina proveniente de epidermis bovina y de pelo bovino).

Se determinó la estabilidad a la temperatura del EC durante 90 min en un rango de 20°C a 60°C con pérdida inferior al 25% de su actividad azocaseinolítica y estabilidad al pH en un rango de pH 8 a 10. En cambio la actividad queratinolítica frente a la temperatura se vio influenciada por el aumento en la solubilización del

sustrato. Para esta actividad fueron determinadas sus condiciones óptimas, introduciendo un nuevo sustrato queratínico, el “residuo pelo”, económicamente más accesible.

La actividad azocaseinolítica fue estimulada en condiciones de fuerza iónica 0,1 M-1 M de NaCl. Frente a sales metálicas como CaCl₂, BaCl₂, KCl, ZnSO₄, CuSO₄ y Hg₂Cl sufrió distinto grado de inhibición en forma inversamente proporcional a las concentraciones de las sales, mientras que las concentraciones bajas de MnSO₄, Na₂SO₃, MgSO₄ y Hg₂Cl ejercieron un efecto activador.

La acción de agentes reductores como el sulfuro de sodio y el ácido tioglicólico provocaron un efecto positivo al igual que los tensioactivos aniónicos y no iónicos utilizados en tecnología del cuero.

Entre las distintas clases de proteasas que componen el pool la inhibición parcial debida al PMSF indicó que en su composición existiría una serinproteasa. Sin embargo, el hecho de que existan otras exoenzimas como las aminopeptidasas, de las cuales se determinaron los parámetros cinéticos de la reacción, no redujo la actividad en su totalidad. La presencia de estas últimas tomaría parte en el mecanismo de la queratinolisis o sulfitolisis.

En cuanto a la identificación de las proteínas que componen el extracto crudo, los espectros de masa obtenidos a partir de los spots extraídos del gel bidimensional (37 kDa de pI 4,7, 19 kDa de pI 5,7, 33 kDa, pI 8,8) no mostraron coincidencia con otras proteínas de las distintas de bases de datos, debido a no estar secuenciado el genoma de *Trichophyton ajelloi*. Es de interés la banda de 33 kDa que coincidió con la banda de actividad caseinolítica del zimograma para realizar la secuenciación de *novo* a partir de las intensidades de los distintos espectros MS/MS para poder reconstruir su proteoma.

4.9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali, T., Ali, N. y Mohamed, L. (2011). Production, purification and some properties of extracellular keratinase from feathers-degradation by *Aspergillus oryzae* nr1-447. *Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation*, 6 (2), 123-136.
- Anbu, P., Gopinath, S., Hilda, A., Lakshmi Priya, T. y Annadurai, G. (2005). Purification of keratinase from poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis* and statistical optimization of enzyme activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 639-647.
- Apodaca, G. y McKerrow, J. (1989). Purification and characterization of a 27000-Mr extracelular proteinase from *Trichophyton rubrum*. *Infection and Immunity*, 57, 3072-3080.
- Asahi, M., Lindquist, R., Fukuyama, K., Apodaca, G., Epstein, W. y McKerrow, J. (1985). Purification and characterization of major extracellular proteinases from *Trichophyton rubrum*. *Biochemical Journal*, 232, 139-144.

- Bernal, C., Cairó, J. y Coello, N. (2006). Purification and characterization of a novel exocellular keratinase from *Kocuria rosea*. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 49-54.
- Böckle, B., Galunsky, B. y Müller, R. (1995). Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3705-3710.
- Bressollier, P., Letourneau, F., Urdaci, M. y Verneuil, B. (1999). Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 2570-2576.
- Brouta, F., Descamps, F., Fett, T., Losson, B., Gerday, C. y Mignon, B. (2001). Purification and characterization of a 43,5 kDa keratinolytic metalloprotease from *Microsporium canis*. *Medical Mycology*, 39(3), 269-275.
- Cantera, C., Goya, L., Garcia, R. y Sofia, A. (1999). Proteolytic activity assessment: use of the chromogenic substrate hide powder azure. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 83, 101-106.
- Cantera, C. S., Goya, L., Galarza, B., Garro, M. L. y López, L. M. I. (2003). Hair saving unhairing process. Part 5. Characterisation of enzymatic preparations applied in soaking and unhairing processes. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 2 (87), 69-77.
- Chaturvedi, V. y Verma, P. (2014). Metabolism of chicken feathers and concomitant electricity generation by *Pseudomonas aeruginosa* by employing microbial fuel cell (MFC). *Journal of Waste Management*, 2014, 1-9. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1155/2014/928618>.
- Coello N., Bernal C., Bertsch A., Estrada O., Mocco Y. y Hasegawa M. (2003). Las plumas como residuo agroindustrial: su utilización biotecnológica para producir insumos de interés industrial. *Revista de la Facultad de Ingeniería de la U.C.V.*, 18(3), 119-126.
- Day, W., Tonic, P., Stratman, S., Leeman, U. y Harmon, S. (1968). Isolation and properties of an extracellular protease of *Trichophyton granulosum*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 167, 597-606.
- Dozie, I., Okeke, C. y Unaeza, C. (1994). A termoestable, alkaline -active, keratinolytic proteinase from *Chrysosporium keratinophilum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10, 563-567.
- Duarte, T., Oliveira, S., Macrae, A., Cedrola, S., Mazotto, A., Souza, E., Melo, A. y Vermelho, A. (2011). Increased expression of keratinase and other peptidases by *Candida parapsilosis* mutants. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 44(3), 212-216.

- Dunn, B. (2000). Determination of protease mechanism. En R. Beynon y J. Bond (Ed.), *Proteolytic enzymes, the Practical Approach Series* (pp. 78-86). Oxford, UK: University Press.
- Ebeling, W, Hennrich, N., Klockow, M., Metz, H., Orth, H. y Lang H. (1974). Proteinase K from *Triticirachium album* Limber. *European Journal Biochemistry*, 47, 91-97.
- Errasti, M. (2013). *Estudio de posibles aplicaciones farmacológicas de extractos de especies de bromeliáceas y su comparación con bromelina* (Tesis doctoral). Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.
- Farag, A. y Hassan, M. (2004). Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 34, 85-93.
- Fang, Z., Zhang, J., Liu, B., Du, G. y Chen, J. (2013). Biodegradation of wool waste and keratinase production in scale-up fermenter with different strategies of *Stenotrophomonas maltophilia* BBE 11.1. *Bioresource Technology*, 140, 286-291.
- Folle, A., Kitano, E., Lima, A., Gil, M., Cucher, M., Mourglia-Ettlin, G., Iwai, L., Rosenzvit, M., Batthyány, C. y Ferreira, A. (2017). Characterization of antigen B protein species present in the hydatid cyst fluid of *Echinococcus Canadensis* G7 Genotype. *PLOS, Neglected Tropical Diseases*, 1(1). doi: org/10.1371/journal.pntd.0005250.
- Friedrich, A. y Antranikian G. (1996). Keratin degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order Thermotogales. *Applied of Environmental Microbiology*, 62, 2875-2882.
- Friedrich, J. y Kern, S. (2003). Hydrolysis of native proteins by keratinolytic protease of *Doratomyces microsporus*. *Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic*, 21, 35-37.
- Galarza, B., Goya, L., Cantera, C., Garro, L., Reinoso, H. y López, M. (2004). Fungal biotransformation of bovine hair. Part 1: isolation of fungus with keratinolytic activity. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 88(3), 93-98.
- Galarza, B., Cavello, I., Garro, L., Gortari C., Hours, R. y Cantera, C. (2012). Evaluation of increase at the production of keratinolytic enzymes. *Journal of AQEIC*, 63 (3), 70-73.
- Galarza, B., Garro, M., Martegani, J. y Hours, R. (2016). Characterization and evaluation of fungal enzymatic pool with unhairing activity. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 100 (5), 257-262.

- Gradisar, H., Kern, S. y Friedrich, J. (2000). Keratinase of *Doratomyces microsporus*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 53, 196-200.
- Gradisar, H., Friedrich, J., Križaj, I. y Jerala R. (2005). Similarities and specificities of fungal keratinolytic proteases: comparison of keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microsporus* to some known proteases. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 3420-3426.
- Gupta, R. y Rammani, P. (2006). Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70, 21-33.
- Harvey, J. (1992). Cambiando un problema de eliminación de proteínas de desperdicio a una fuente proteica de alimentación valiosa: un rol para las enzimas al procesar vísceras, plumas y aves muertas. *Ronda Latinoamericana*, 23-34.
- Henzel, W., Watanabe C. y Stults J. (2003). Protein identification: the origins of peptide mass fingerprinting. *Journal American Society Mass Spectrometry*, 14(9), 931-42.
- Hossain, M., Azad, A., Sayem, A., Mostafa, G. y Hoq M. (2007). Production and partial characterization of feather-degrading keratinolytic serine protease from *Bacillus licheniformis* MZK-3. *Journal of Biological Sciences*, 7(4), 599-606.
- Hyone-Myong, E. (1996). *Enzymology primer for recombinant DNA technology*. Recuperado de [https:// doi.org/10.1016/B978-012243740-3/50004-1](https://doi.org/10.1016/B978-012243740-3/50004-1).
- Ionata, E., Caganella, F., Bianconi, G., Benno, Y., Sakamoto, M., Capasso, A., Rossi, M. y La Cara, F. (2008). A novel keratinase from *Clostridium sporogenes* bv. Pennavorans bv. nov. A thermotolerant organism isolated from solfataric muds. *Microbiological Research*, 163, 105-112.
- Kim, J., Kluskens, L., de Vos, W., Huber, R. y Van der Oost, J. (2004). Crystal structure of fervidolysin from *Fervidobacterium pennivorans*, a keratinolytic enzyme related to subtilisin. *Journal of Molecular Biology*, 335(3), 787-797.
- Kornilowicz-Kowalska, T. y Bohacz, J. (2011). Biodegradation of keratin waste: theory and practical aspects. *Waste Management*, 31, 1689-1701.
- Kumar A. G. y Takagi H. (1999). Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*, 17, 561-594.
- Kunert, J. y Kasafirek, E. (1988). Preliminary characterization of extracelular proteolytic enzymes of dermatophytes by chromogenic substrates. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 26, 187-194.
- Kunert, J. (1992). Effect of reducing agents on proteolytic and keratinolytic activity of enzymes of *Microsporum gypseum*. *Mycoses*, 35, 343-348.

- Lehninger A. (1981). *Bioquímica*. Barcelona, España: Omega.
- Liang, J., Han, Y., Zhang, J., Du, W., Liang, Z. y Li, Z., (2011). Optimal culture conditions for keratinase production by a novel thermophilic *Myceliophthora thermophila* strain GZUIFR-H49-1. *Journal of Applied Microbiology*, 110(4), 871-880.
- Lin, X, Lee, C, Casale, E y Shih, J. (1992). Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading *Bacillus licheniformis* strain. *Applied of Environmental Microbiology*, 58, 3271-3275.
- Longshaw, C., Wright, J., Farrell, A. y Holland, K. (2002). *Kytococcus sedentarius*, the organism associated with pitted keratolysis, produces two keratin-degrading enzymes. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 810-816.
- López, L., Viana, C., Errasti, M., Garro, M., Martegani, J., Mazzilli, G., Freitas, C., Araújo, I., Da Silva, R.O, Ramos, M. (2017). Latex peptidases of *Calotropis procera* for dehairing of leather as an alternative to environmentally toxic sodium sulfide treatment. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40(9):1391–1398. <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1796-9>.
- Mc Laren A. y Packer L. (1970). Some aspects of enzyme reactions in heterogenous system. En F. Nord (Ed.), *Advances in enzymology & related areas of Molecular Biology* (33, pp. 245-308). New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Meevootison, V. y Niederpruem, J. (1979). Control of exocellular proteases in dermatophytes and especially *Trichophyton rubrum*. *Sabouradia*, 17, 91-106.
- Merops, database (2017). Recuperado de <http://merops.sanger.ac.uk>
- Mitra P. y Chakrabartty P. (2005). An extracellular protease with depilation activity from *Streptomyces nogalator*. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 64, 978-983.
- Moreira-Gasparin, F., Marques de Souza, C., Costa, A., Alexandrino, A., Bracht, C., Boer, C. y Peralta, R. (2009). Purification and characterization of an efficient poultry feather degrading-protease from *Myrothecium verrucaria*. *Biodegradation*, 20, 727-736.
- Muhsin, T. y Aubaid, A. (2001). Partial purification and some biochemical characteristics of exocellular keratinase from *Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacei*. *Mycopathologia*, 150(3), 121-125.

- Nam, G., Lee, D., Lee, H., Lee, N., Kim, B., Choe, E., Hwang, J., Suhartono, M. y Pyun, Y. (2002). Native-feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase-producing thermophilic anaerobe. *Archives of Microbiology*, 178, 538-547.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. y Ehrhardt, W. (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, 9, 255-262.
- Nilegaonkar, S., Zambare, V., Kanekar, P., Dhakephalkar, P. y Sarnaik, S. (2007). Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus* MCM B-326. *Bioresource Technology*, 98, 1238-1245.
- Nishiya, Y., Yamashita, M., Murooka, Y., Fujii, I. y Hirayama, N. (1998). Effect of non-ionic detergents on apparent enzyme mechanism: V121A mutant of *Streptomyces* cholesterol oxidase endowed with enhanced sensitivity towards detergents. *Protein Engineering*, 11(8), 609-611.
- Núñez, C. (2008). *En relación a los tamices normalizados, Tablas de Tamices Estándares ASTM (American Society Of Testing Methodos)*. Misiones, Argentina: Facultad de Ciencias Exactas. Recuperado de www.cenunez.com.ar.
- Obal, G., Ramos, A., Silva, V., Lima, A., Batthyany, C., Bessio, M., Ferreira, F., Salinas, G. y Ferreira, A. (2012). Characterisation of the native lipid moiety of *Echinococcus granulosus* antigen B. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 6(5), e 1642. doi: 10.1371/journal.pntd.0001642
- Okoroma, E. (2012). *Enzymatic degradation of prion protein by keratinase producing proteolytic microorganisms* (Tesis doctoral). Middlesex University's Research, London, UK.
- Onifade, A., Al-Sanc, N., Al-Musallam, A. y Al-Zarban, S. (1998). A review: potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. *Bioresource Technology*, 66, 1-11.
- Pappin, D., Hojrup, P., Bleasby, A. (1993). Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Current Biology*, 3(6): 327-332.
- Park, G-S., Hong, S-J., Jung, B., Khan, A., Park, Y-J., Park, C. y Shin, J. (2015). Complete genome sequence of a keratin-degrading bacterium *Chryseobacterium gallinarum* strain DSM 27622^T isolated from chicken. *Journal of Biotechnology*, 211, 66-67.

- Pillai, P. y Archana, G. (2008). Hide depilation and feather disintegration studies with keratinolytic serine protease from a novel *Bacillus subtilis* isolate. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 78, 643-650.
- Prakash, P., Jayalakshmi, S. y Sreeramulu, K. (2010). Purification and characterization of extreme alkaline, thermostable keratinase and keratin disulfide reductase produced by *Bacillus halodurans* PPKS-2. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 87, 625-633.
- Qiu, J., Wilkens, C., Barrett, K. y Meyer, A. (2020). Microbial enzymes catalysing keratin degradation: classification, structure, function. *Biotechnology Advances*, 44, 107607. doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107607.
- Ragot, J. (1966). Activité protéolytique du *Keratinomyces ajelloi* Vanbreuseghem. *Comptes Rendus de la Academie de Sciences de Paris, Série D*, 263, 1895-1898.
- Rawlings, N., Waller, M., Barrett, A. y Bateman, A. (2014). MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research*, 42, D 503-509.
- Riffel, A., Brandelli, A., Bellato M., Souza, G., Eberlin, M. y Tavares, F. (2007). Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. kr6. *Journal of Biotechnology*, 128(3), 693-703.
- Ruffin P., van Brussel E., Biguet J. y Biserte G. (1979). Caractérisation partielle de deux aminopeptidases (arylamidases) extracellulaires du dermatophyte *Keratinomyces ajelloi*. *Biochimie*, 61, 495-500.
- Sanyal, A., Das, S y Banerjee, A. (1985). Purification and partial characterization of an exocellular proteinase from *Trichophyton rubrum*. *Sabouraudia*, 23, 165-178.
- Scott J., Untereiner W. (2004). Determination of keratin degradation by fungi using keratin azure. *Medical Micology*, 42, 239-246.
- Sharma, R y Gupta, R. (2010). Thermostable, thiol activated keratinase from *Pseudomonas aeruginosa* KS-1 for prospective applications in prion decontamination. *Research Journal of Microbiology*, 5(10), 954-965.
- Sharma, S. y Kumar, A. (Eds.) (2019). *Keratin as a protein biopolymer: extraction from waste biomass and applications, Series on polymer and composite materials*. Cham, Suiza: Springer.
- Shih, J. (2005). Construction of *Bacillus licheniformis* T1 strain and fermentation production of crude enzyme extract therefrom. Recuperado de <http://www.wikipatents.com/ca/2498200.html>.

- Singh C. (2002). Optimization of an extracellular protease of *Chrysosporium keratinophilum* and its potential in bioremediation of keratinic wastes. *Mycopathologia*, 156, 151-156.
- Syed, D., Lee, J.C., Li, W-J., Kim, C-J. y Agasar, D. (2009). Production, characterization and application of keratinase from *Streptomyces gulbargensis*. *Bioresource Technology*, 100, 1868-1871.
- Takiuchi, I., Higuchi, D., Sei, Y. y Koga, M. (1983). Immunological studies of an extracellular keratinase. *Journal of Dermatology*, 10(4), 327-330.
- Takiuchi, I., Sei, Y., Takagi, H. y Negi, M. (1984). Partial characterization of the extracellular keratinase from *Microsporum canis*. *Sabouraudia*, 22(3), 219-224.
- Tapia, D. y Garcia Simões, M. (2008). Production and partial characterization of keratinase produced by a microorganism isolated from poultry processing plant wastewater. *African Journal of Biotechnology*, 7(3), 296-300.
- Tsuboi, R., Ko, I., Matsuda, K. y Ogawa, H. (1987). A new keratinolytic proteinase from clinical isolates of *Trichophyton mentagrophytes*. *Journal of Dermatology*, 14, 506-508.
- Wang, J-J., Swaisgood, H. y Shih, J. (2003). Production and characterization of bio-immobilized keratinase in proteolysis and keratinolysis. *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 812-819.
- Wawrzkiwicz, K., Lobarzewski, J. y Wolski, T. (1987). Intracellular keratinase of *Trichophyton gallinae*. *Journal of Medical and Veterinary Micrology*, 25(4), 261-268.
- Whitaker, J. (1993). *Principles of Enzymology for the Food Sciences*. New York, USA: CRC Press.
- Xie, F., Chao, Y., Yang, X., Yang, J., Xue, Z., Luo, Y. y Qjan, S. (2010). Purification and characterization of four keratinases produced by *Streptomyces* sp. strain 16 in native human foot skin medium. *Bioresource Technology*, 101, 344-350.
- Yu, R., Harmon, S. y Blank, F. (1968). Isolation and purification of an extracellular keratinase of *Trichophyton mentagrophytes*. *Journal of Bacteriology*, 96(4), 1435-1436.
- Yu, R., Harmon, S. and Blank, F. (1969a). Hair digestion by a keratinase of *Trichophyton mentagrophytes*. *The Journal of Investigative Dermatology*, 53, 166-171.
- Yu, R., Harmon, S., Wachter, P. y Blank, F. (1969b). Amino acid composition and specificity of a keratinase of *Trichophyton mentagrophytes*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 135, 363-370.

- Yu, R., Harmon, S., Grappel, S. y Blanck, F. (1971). Two cell-bound keratinases of *Trichophyton mentagrophytes*. *Journal of Investigative Dermatology*, 56(1), 27-32.
- Yue, X., Zhang, B., Jiang, D., Liu, Y. y Niu T. (2011). Separation and purification of a keratinase as pesticide against root-knot nematodes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 2147-2153.

Capítulo 5

Evidencias de la degradación fúngica del pelo

5.1. Resumen

En el trabajo reportado en este capítulo se utilizaron diversos métodos de estudio para evidenciar la degradación fúngica de la fibra del pelo y la hidrólisis de la queratina. Se puso a punto la preparación de la muestra de residuo pelo colonizado con *Trichophyton ajelloi* para su posterior observación mediante Microscopio Electrónico de Barrido y Microscopio Electrónico de Transmisión. Se evaluó mediante Espectroscopía Dieléctrica el cambio en la frecuencia de relajación del RP sometido a la acción del extracto crudo fúngico, entre otros tratamientos. Se determinó el grado de hidrólisis del RP inoculado, con *Trichophyton ajelloi* y con *Fusarium oxysporum*, respectivamente, mediante la determinación del contenido de cisteína-cistina en los ultrafiltrados de los cultivos y en el RP propiamente dicho.

5.2. Introducción

5.2.1. Estructura de la queratina

Definición, características, ubicación

La queratina es una proteína fibrosa que se encuentra en los animales vertebrados y se caracteriza por su dureza mecánica y su escasa reactividad química. Los mamíferos poseen alrededor de 50 genes que codifican para proteínas involucradas en la síntesis de queratina, los cuales están expresados de una manera tejido-específica y cuyos productos son clasificados como pertenecientes a familias de polipéptidos de acidez relativa (tipo I) y de basicidad relativa (tipo II). Los filamentos de queratina que forman parte de los filamentos intermediarios en las células de la piel y anexos, contienen al menos un miembro de cada tipo (Voet y Voet, 2011).

Las queratinas son los principales constituyentes de tejidos biológicos del ectodermo y anexos como pelo, escamas, cuernos, pezuñas, lana, picos, uñas, plumas y garras. La forma prevalente de la queratina en los mamíferos es la α -hélice aunque existen formas alternativas en las plumas de las aves y en reptiles donde aparecen formadas como estructura en hoja β plegadas y apiladas (Zubay, Parson y Vance, 1995).

Las α -queratinas además son miembros de un gran grupo de proteínas filamentosas intermedias que desempeñan funciones estructurales en los núcleos, citoplasmas y superficies de muchas células con estructura de hélice α mayoritariamente (Mathews, Van Holde y Ahern, 2002).

Históricamente, los atributos mecánicos de un órgano en relación al contenido de esta proteína fueron interpretados como una simple combinación de queratinización blanda y cornificación dura, sin embargo esta simplificación está cuestionada. En la

actualidad se sostiene que las queratinas no son características de un mismo tejido sino que dependen de las propiedades funcionales de cada célula y región del mismo. Se encontró por ejemplo que ciertas queratinas que son expresadas en la raíz del pelo también se encuentran en la lengua de rata (Bragulla y Homberger, 2009).

Dentro de las queratinas que se clasifican en básicas y ácidas existen distintos tipos en base a la composición de aminoácidos de su estructura primaria.

En la Tabla 5.1 (Bragulla y Homberger, 2009) se observan los distintos tipos de queratinas clasificadas en base a su tipo, composición, pI, PM y localización. Las pertenecientes al tipo II o básicas, que intervienen en tejidos de queratinización blanda forman parte de las células suprabasales de distintos epitelios como: estratos de epidermis, vaina interna de la raíz del pelo, mucosa bucal, lengua, paladar pelvis renal, córnea, uréter, vejiga, genitales masculinos, lecho ungueal, ectodermo y peridermo de feto humano. A su vez este tipo de queratina humana puede dar reacción cruzada con *Xenopus laevis* (rana) y *Carassius auratus*.

Las queratinas básicas blandas y cornificadas de la vaina interna de la raíz del folículo piloso son compartidas por otras especies y no se restringen en su ubicación solamente al folículo. Se ubican además en epitelios de planta y palma de pie, cutícula, capa de Henle y Huxley, etc.

El mismo grupo de queratinas básicas forma parte de la queratinización dura, de la médula, matriz, córtex y cutícula del pelo y de las papilas linguales.

Las queratinas ácidas ubicadas en tejidos de queratinización blanda se encuentran en la vaina interna de la raíz del pelo, hocico y talón de bovinos, epidermis, mucosa de pelvis renal, células suprabasales de la córnea humana, epitelio transicional de la mucosa, pelvis renal, uréter, vejiga, mucosa oral, esófago, queratinoblastos, epitelio estratificado de la epidermis fetal y uña de humanos, las que actúan en procesos de cicatrización, capas epiteliales de la cutícula, capas de Henle y capas de Huxley, etc.

Las queratinas ácidas de queratinización dura se encuentran en la epidermis folicular y tienen un gran número de residuos de prolina y cisteína en sus dominios cabeza y cola. Son diez queratinas específicas de pelo (K31-40) sintetizadas en células queratinizantes de varios compartimentos del folículo piloso.

Tabla 5.1.1 Clasificación y localización de las queratinas básicas o tipo II: queratinización blanda

Nombre	PM (kDa)	pI	gen-cromosoma	Localización y/o expresión
K1	65 66		H:12	Células suprabasales de la epidermis (red de filamentos); componente regular del citoesqueleto asociada a filamentos de K1-K14; precede a la expresión de K10
K2	61 65,5		H:12	Secuencia similar a K1 y K5 epidérmica y corneal; en células basales del estrato espinoso; aumentada en epitelios estresados (oído, almohadilla del pie, cola de ratón); en pelo humano junto a la KFAP trichohialina de las células epidérmicas y de queratinización blanda de la IRS
K3	63	7,5	KRT ₃ H:12	Células epiteliales del epitelio estratificado de la córnea humana
K4	59	7,3	H:12	Células suprabasales del epitelio oral y transicional de la pelvis renal, uréter y vejiga
K5	56	7,4	H:12	Queratina primaria de las células basales mitóticamente activas de epitelio estratificado; en pequeñas cantidades en pelvis renal, uréter y vejiga
K6	56	7,8	H:12	Epitelios estratificados internos de la lengua, paladar y genitales masculinos; células suprabasales de la epidermis palmar y plantar, uñas, y de IRS de folículo piloso; células hiperproliferativas epiteliales cancerígenas y en las heridas
Isoforma K6hf K75			Subfamilia de genes de K6; H:12	Células de la capa companion de la IRS del folículo piloso
K7	54	6	H:12	Comparte secuencia de aa del dominio varilla entre humano, ratón y marsupial; reacción cruzada de anticuerpos entre epitopes de distintas especies; queratinas secundaria del epitelio simple, lecho ungueal y aparato urinario
K8	52,2	6,1	H:12	Ectodermo y peridermo de feto humano; reacción cruzada con <i>xenopus laevis</i> (rana) y <i>carassius auratus</i>

Tabla 5.1.2 Clasificación y localización de las queratinas básicas: queratinización blanda y cornificada de la vaina interna de la raíz (IRS) de folículo piloso humano

Nombre	PM	pI	Gen-cromosoma	Localización y/o expresión
K71 (K6_{irs1})	57,3	6,5	K25 K27	IRS de humanos: cutícula, capa de Henle y Huxley, en planta y palma de pie
Ortóloga mK6_{irs1}				IRS del folículo piloso anágeno murino; déficit causa alopecia
K72 K6_{irs2}	55,8	6,9		Etapas final de células queratinizantes de la cutícula de la IRS de ratón
K73 K6_{irs3} ortóloga	58,9	7,3		Células suprabasales de la cutícula de IRS IRS murino
K74 K6_{irs}	57,8	7,8		Células epiteliales queratinizantes de la capa de Huxley del IRS del folículo piloso
K75 K6hf	59,5	7,9		Capa companion del IRS del folículo piloso perpendiculares al eje longitudinal tipo “hoops of a barrel”; secuencia similar en un 80% a K5

Tabla 5.1.3 Clasificación y localización de las queratinas básicas como constituyentes menores

Nombre	PM	pI	Gen-cromosoma	Localización y/o expresión
K71 (K6_{irs1})	57,3	6,5	K25 K27	IRS de humanos: cutícula, capa de Henle y Huxley; en planta y palma de pie
Ortóloga mK6_{irs1}				IRS del folículo piloso anágeno murino; déficit causa alopecia
K72 K6_{irs2}	55,8	6,9		Etapa final de células queratinizantes de la cutícula de la IRS de ratón
K73 K6_{irs3} ortóloga	58,9	7,3		Células suprabasales de la cutícula de IRS IRS murino
K74 K6_{irs}	57,8	7,8		Células epiteliales queratinizantes de la capa de Huxley del IRS del folículo piloso
K75 K6_{hf}	59,5	7,9		Capa companion del IRS del folículo piloso perpendiculares al eje longitudinal tipo "hoops of a barrel"; secuencia similar en un 80% a K5

Tabla 5.1.4 Clasificación y localización de las queratinas básicas de la queratinización dura

Nombre	PM	pI	Gen/par	Localización y/o expresión
(Kb20) K81 hHb1	54,8	5,2		Células corticales de diferenciación avanzada de pelo humano y células queratinizantes de la médula del pelo
K82 hHb2	56,6	6,7		Coexpresada con K32 ácida del pelo; en células suprabasales de la matriz del pelo que forman la cutícula
K83 hHb3-I hHb3-II	54,1	5,1		Expresada junto a K81 y K86 en procesos avanzados de queratinización en células suprabasales que forman el córtex de los pelo humanos
K84 hHb4	65	7,6		Epitelio dorsal de lengua humana producida por el epitelio aboral de las papilas filiformes de la lengua
K85 hHb5	55,7	6,5	K35	Células queratinizantes cuticulares de la matriz del pelo humano
K86	53,5	5,3		Células suprabasales del córtex del pelo humano

Tabla 5.1.5 Clasificación y localización de las queratinas ácidas de queratinización blanda de células basales de la raíz interna del folículo piloso

Nombre	PM	pI	Localización
K25 (K25_{irs1})	49,3	4,7	Células epiteliales de IRS cutícula, capas de Henle y de Huxley
K26	51,8	4,6	Cutícula de IRS
K27	49,8	4,8	Células epiteliales de IRS, cutícula, capas de Henle y de Huxley
K28 (K25_{irs4})	50,5	5,1	Células epiteliales de IRS cutícula, capas de Henle y de Huxley

Tabla 5.1.6 Clasificación y localización de las queratinas ácidas (tipo I) en la queratinización blanda específicas de la vaina interna de la raíz del folículo piloso y del pelo

Nombre	PM	pI	Gen/cromosoma/par	Localización y/o expresión
hHb6-K9 ort K9	64(H) 60-64 (B)	5	KRT9/ H: 17/ K1/ K2	Hocico y talón de bovinos; aparece a las 15 semanas de gestación, en células suprabasales de la epidermis plantar y palmar (stress mecánico); en células suprabasales de porción intraepidérmica de ductos de glándulas sudoríparas; reacción cruzada de antiK9 humano con bovino y equino
K10	56,5	5,3	H: 17/K1, K2	Principal tipo de queratinas expresada en células queratinizantes post-mitóticas de las capas suprabasales de la epidermis y de otros epitelios estratificados cornificados; su expresión previene futuras divisiones celulares
K11			H: 17	Es una variante polimórfica de K10 debido a cambios en su dominio cola
K12	55	4,9	H: 17, K3, K4	En células suprabasales queratinizantes del epitelio estratificado externo de la córnea humana
K13	54	5,1	H: 17, K4	Epitelio transicional de la mucosa de la pelvis renal, uréter, vejiga, mucosa oral, esófago; típica de células suprabasales de epitelio estratificado no-cornificado
K14 (H)	50	5,3	H: 17, K5	Fundamental en queratinocitos del epitelio estratificado; producido en células basales de la epidermis interfolicular y parte superior de la IRS del folículo; su síntesis se correlaciona con la actividad mitótica y el grado de pluripotencialidad de las células basales del epitelio estratificado y se incrementa en las heridas
K15(H)	50	4,9	H: 17, K5	En queratinoblastos del epitelio estratificado de la epidermis fetal y uña en humanos, en el subconjunto de queratinoblastos de la ORS del folículo piloso humano; en células más maduras y con menor división celular como planta de pie, stemcells de la epidermis, stemcells límbicas de la córnea humana, stemcells de la médula del pelo, glándulas sebáceas y epidermis interfolicular;
K16	46	5,1	H: 17/ K5,K6, K6b,K8	Subconjunto de células epiteliales durante la morfogénesis de la piel y de la capa "companion" de la ORS. Células en un estadio intermedio entre células basales y suprabasales. Marcador del estado activado de queratinocitos. Células epidérmicas suprabasales del pliegue ungueal proximal del lecho de la uña en humanos. Fases catágena y telógena del ciclo del pelo.
K17	48	5,1	H: 17/ K6, K5, K8	Procesos de cicatrización y de desarrollo en la formación de placodes ectodérmicos del pelo, glándulas, timus, dientes, palma y planta del pie. Epitelio simple de la glándula vesicular seminal y epidídimo, células basales del epitelio transicional y pseudoestratificado. Células mioepiteliales de unidades secretoras de glándulas serosas exócrinas; epidermis interfolicular humana, cuerpos papilares dérmicos. Promueve el crecimiento del folículo piloso.
K18	44,45(H), 4.9(R)	5,5; 5,7(H) 5,3(R)	Excepción 12, cerca del gen de K8	Células epiteliales del ectodermo y peridermo, epitelio de la piel humana fetal, epitelio simple del tracto urogenital masculino humano, citoesqueleto de células del epitelio simple (hepatocitos), túbulos celulares de ductos biliares y renales; epitelio intestinal, alveolar y bronquial.
K19	40	5,2	KRh9/ H: 17/K8, K5, K7	Aumenta con la concentración de ácido retinoico. Queratina más pequeña por crecer del dominio cola, fácilmente inducible. Epitelio estratificado, stemcells epidérmicas, células de Merkel, epitelio pseudoestratificado de la vejiga urinaria bovina, capa basal de peridermo de la piel en feto; disminuye su expresión con la edad.
K20	48,5		H: 17	Células epiteliales del pulmón murino, placenta de rata, mucosa gástrica, intestinal, útero, vejiga, células de Merkel, mucosa oral.
K21	48		H: 17	Mucosa oral del epitelio simple y células diferenciadas del intestino
K22			H: 17	No está asignado a ninguna queratina
K23	48,1		H: 17	Citoesqueleto de células pancreáticas; es inducida por butirato de sodio y bloqueada por actinomicina D (tratamiento de cáncer pancreático)
K24	55,1		KRT24/ H: 17	Epitelio simple glandular humano no cornificado estratificado, lengua, placenta, ojo y en menor proporción en timo, pulmón, intestino delgado, queratinocitos, colon, bazo

Tabla 5.1.7 Clasificación y localización de las queratinas ácidas de queratinización dura

Nombre	PM	PI	Gen/ Cromosoma/ par	Localización y/o expresión
K31	47,2	4,5	KRT31 K85	Córtex del pelo del folículo piloso humano, células epiteliales de la matriz de la uña; factor de unión linfoide (LEF) de unión de sitios en la región promotora del gen
K32-(hHa2)	50,3	4,5	K82 K85	Cutícula del pelo: porción media y final
K33a (hHa3-I)	45,9	4,8		Córtex y vaina de la raíz externa del folículo (ORS) de pelo de ratón, matriz ungueal del murino
K33b (hHa3- II) K34 8hHa4 ort.K34 (mHa4)	46,2 49,4	4,5 4,7	K86	Córtex superficial del pelo de ratón, células suprabasales del córtex y ORS del pelo
K35 (hHa5)	50,3	4,5	K85	Extremo terminal de la cutícula humana
K36 (hHa6)	52,2	4,6		Células corticales del pelo en diferenciación avanzada
K37 (hHa7)	49,7	4,6	K81 K85 K86	Médula del pelo
K38 (hHa7)	50,5	4,5		Córtex del pelo
K39 (Ka35)	55,6	4,99	K82	Porción superior de cutícula, córtex, médula de pelos terminales humanos
K40 (Ka36)	48,2	4,17	K82	Porción superior de la cutícula del pelo humano

Modelo y estructura en α -hélice

La estructura secundaria proteica en α -hélice se distribuye entre 60 miembros de familias en los humanos, incluyendo los filamentos intermediarios, proteínas que contribuyen al citoesqueleto de las células (andamiaje interno de las células), colágeno, queratina y los músculos como la miosina y la tropomiosina.

En la evaluación de posibles estructuras para las proteínas fibrosas, Pauling y Corey (1951) predijeron cuáles conformaciones de péptidos estaban estéricamente permitidas y cuáles aprovechaban mejor la capacidad del puente de H entre el esqueleto de los grupos NH y CO. Una de las primeras estructuras propuestas fue una estructura en varilla, la α -hélice, postulando lo que seis años después se confirmara mediante difracción de rayos X, constituyendo un hito en la bioquímica.

La estructura en α -hélice adquiere una forma enrollada firmemente en la región interna de la varilla y los laterales apuntan hacia el exterior en un arreglo helicoidal (Garret y Grishem, 2010), estabilizada por puentes de H intracadena (Figura 5.1) entre los grupos CO de cada aminoácido y el grupo NH del aminoácido que se ubica a cuatro residuos enfrente en la secuencia de su estructura secundaria. Cada residuo está relacionado con el siguiente por una elevación llamada “traslado” de 1,5 Å a lo largo del eje de la hélice y una rotación de 100°, lo cual da 3,6 residuos de aa por vuelta de hélice. Los enlaces que estabilizan la estructura son del tipo puente de hidrógeno, fuerzas de van

der Waals, interacciones iónicas y puentes disulfuro entre cisteínas vecinas intra e intercadena.

Los diagramas de Ramachandran revelan que estas hélices pueden tener sentido de rotación hacia la derecha o hacia la izquierda y ambos son posibles. Sin embargo las hélices dextrógiras son energéticamente más favorables ya que hay menor repulsión estérica entre las cadenas laterales y el esqueleto. Esencialmente, todas las hélices encontradas en las proteínas son dextrógiras (Berg, Tymocsko y Stryer, 2006).

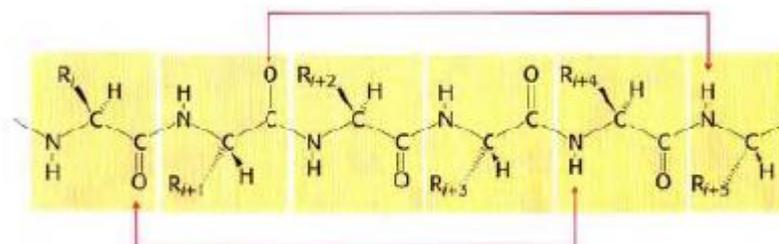


Figura 5.1. Esquema de la unión puente de H en una α hélice (Berg *et al.*, 2006).

Todos los puentes de H apuntan en una misma dirección debido a las polaridades de los grupos amino y carbonilo. La alineación de estos grupos a lo largo de la hélice generan una fuerza resultante con un sustancial momento dipolar cargado parcialmente en forma positiva en el N terminal y una carga parcialmente negativa en el C-terminal (Garret *et al.*, 2010).

Región central de repetición de heptámeros

Una de las características más importantes en la conformación de la estructura de la α -hélice es la región central de 300 aa- 310 aa (Berg *et al.*, 2006; Voet *et al.*, 2011) constituida por secuencias repetidas imperfectas de siete aminoácidos llamadas “repetición de heptámeros” (heptad-repeat) para el caso del dímero, donde el aminoácido ubicado en la séptima posición es una leucina. A partir de esta secuencia repetida es que se constituye la totalidad de la estructura super enrollada en forma de varilla y por lo tanto sus propiedades físicas y químicas. Por ejemplo, la posibilidad de que se unan 2 hélices de α -queratinas se debe a que cada 4 aa aproximadamente hay uno con cadena lateral hidrofóbica no polar (Voett *et al.*, 2011).

Si se nombran a los siete residuos de aminoácidos como a,b,c,d,e,f,g, los denominados a y d tendrán cadenas laterales hidrofóbicas mientras que los e y g poseerán cadenas laterales polares. El anillo se forma debido a que como cada séptimo residuo representa dos vueltas de la α -hélice, los residuos a y d quedan enfrentados formando un borde apolar. Este borde apolar en las α -queratinas, por ejemplo, interactúa con los lados apolares peptídicos de otras cadenas para formar una estructura superhelicoidal conteniendo 2 o 3 cadenas polipeptídicas. Además el lado polar correspondiente a los residuos e y g interactúa con el solvente agua en el lado externo de la superhélice, estabilizando la estructura superhelicoidal o superenrollada “coil-coiled” de la región central o varilla (Figura 5.2). Estas interacciones ocurren en el colágeno, la α -queratina y

la tropomiosina (Devlin, 1997) y son consecuencia de su estructura primaria.

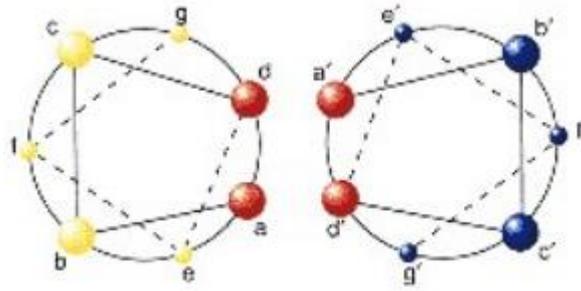


Fig. 5.2. Interacción del costado apolar de las dos cadenas en la conformación α -hélice como en la α -queratina y la tropomiosina (Devlin, 1997)

En las α -hélices con 3,6 residuos por vuelta, estos residuos no polares están dispuestos en una línea inclinada de 18° (Zubay *et al.*, 1995) que gira alrededor del eje de la hélice donde cada aminoácido está elevado 0,15 nm uno con respecto a otro estabilizados por puentes de H intracatenarios (Fig 5.3). Estos residuos no polares podrían hacer que la hélice sea muy inestable si fueran expuestos a solventes, sin embargo la asociación de las franjas hidrofóbicas en las dos α -hélices para formar las dos hebras coiled-coil esconden eficientemente estos residuos hidrofóbicos y forman una estructura muy estable. Las hélices sacrifican alguna estabilidad al adoptar esta conformación retorcida o girada, pero ganan energía de estabilización por el empaquetamiento de los residuos laterales dentro de las hélices (Garrett *et al.*, 2010). La inclinación resultante forma una “rugosidad o cresta de montaña” formada por las cadenas laterales de una hélice para caber dentro de las muescas de las rugosidades de la otra hélice, incrementando ampliamente las interacciones (Voett *et al.*, 2011).

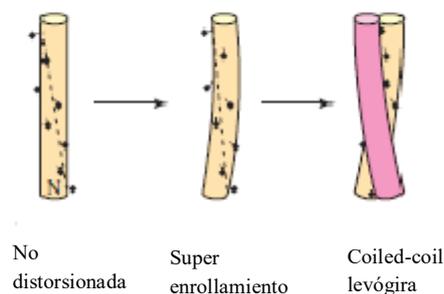


Fig.5.3. Hélices con la repetición del heptámero de residuos hidrofóbicos (Garret *et al.*, 2011).

El haz de α -hélices super-enrollado se puede encontrar en dos, tres o más segmentos helicoidales dispuestos en forma paralela o antiparalela unos con otros. Los

coil-coiled se caracterizan por un empaquetamiento regular y distintivo en su centro donde las cadenas laterales deben tener un tamaño determinado para ocupar posiciones equivalentes vuelta a vuelta. Sin embargo en el caso de las α -hélices no distorsionadas que tienen 3,6 residuos por vuelta esto no es posible. La posición de las cadenas laterales en la superficie se desplaza continuamente a lo largo de la superficie de la hélice (Fig. 5.3). El cambio de la conformación dextrógira a levógira reduce el número de residuos por vuelta a 3,5 por lo que como $3,5 \times 2$ hebras = 7, las posiciones a los costados de las cadenas se repiten luego de dos vueltas (7 residuos). El patrón “heptad-repeat” en la secuencia del péptido es un diagnóstico de la estructura coil-coiled (Garret *et al.*, 2011).

Estructura secundaria de la α -queratina, caracterización de la estructura coiled-coil

En la α -queratina las dos α -hélices dextrógiras entrelazadas forman un tipo de super hélice levógira coiled-coil que puede tener un largo de 1000 Å.

La estructura secundaria de la α -queratina consta de un dominio central en varilla, flanqueado por dominios en casquete: un dominio cabeza en el extremo N-terminal y un dominio cola C-terminal, constituyendo los dos tipos de queratina I (ácida) y II (básica) (Fig. 5.4).

La secuencia de aminoácidos de la hélice central rica en dominios en varilla consta de 311 a 314 aminoácidos.

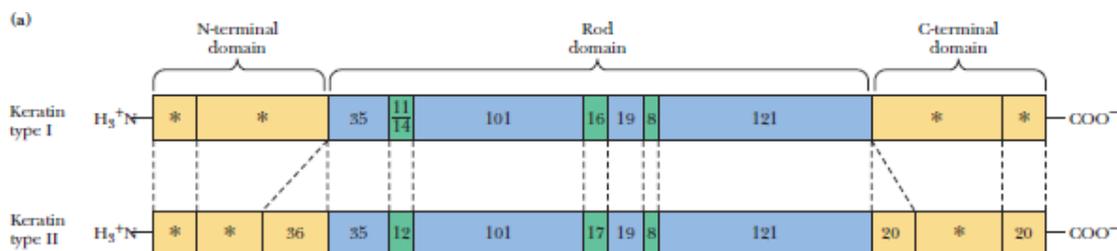


Figura 5.4. Moléculas de α -keratina tipo I y tipo II. Los asteriscos denotan dominios de largo variable (Garrett *et al.*, 2010)

Otra representación de la estructura secundaria de la molécula de queratina se muestra en la Figura 5.5 donde están representados los dominios y subdominios de cada región. Se aprecia que el dominio de la cabeza está constituido por tres subdominios E1, V1 y H1. En la región del dominio en varilla existen 4 subdominios: 1A (compuesto por el “motivo iniciador de la hélice” o “him”), 1B, 2A, 2B (compuesto por el “motivo de terminación de la hélice” o “htm” y por un stutter o secuencia de interrupción). A su vez cada subdominio está unido por linkers: L1, L12 y L2. El dominio cola se compone de los subdominios H2, V2 y E2 (Bragulla *et al.*, 2009).

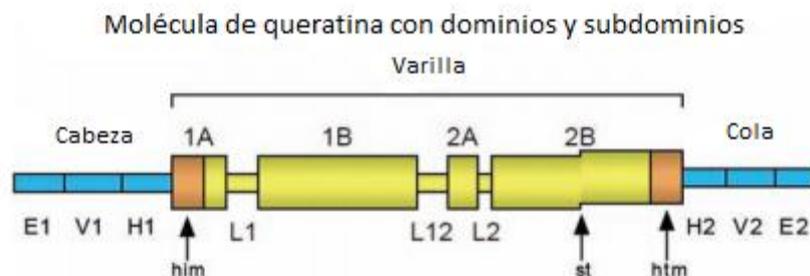


Figura 5.5. Representación esquemática de la estructura secundaria de la molécula de queratina (Bragulla *et al.*, 2009)

Descripción de los distintos dominios de la molécula de α -queratina

Dominio del extremo N-terminal (cabeza)

Está formado por un alto y variable número de aa (ej. 50-100) con una carga positiva que interactúa con otras moléculas tales como las que están unidas a la membrana de los desmosomas. Esta interacción molecular depende de las propiedades químicas de los aminoácidos constituyentes. Por ejemplo, los residuos de arginina cargados positivamente en la cabeza del dominio interactúan con residuos ácidos del dominio de varilla para formar heterodímeros superenrollados. El residuo de lisina altamente conservado en el dominio cabeza de las queratinas básicas K1, K2, K5, K6 se unen a las proteínas del envoltorio cornificado, tales como loricrina, involucrina y envoplaquina. El residuo serina del dominio cabeza puede devenir negativamente cargado en la fosforilación, resultando en el desensamblaje de los filamentos de queratina, por lo que este residuo es fundamental en el desensamblaje y reensamblaje de los filamentos de queratina. El dominio cabeza de las células epiteliales cornificadas duras incluyendo las del córtex del pelo es rico en cisteína, la cual forma puentes disulfuro con otras queratinas o con KFAPs (keratin filament associated proteins o proteínas asociadas a los filamentos de queratinas). El dominio de la cabeza tiene una estructura no-helicoidal globular. En la queratina tipo II, está subdividido en subdominios E1 (final), V1 (variable) y H1 (secuencia de homología) (Fig. 5.5). En la queratina tipo I, el dominio de la cabeza contiene sólo el subdominio V1 y E1 lo cual explica que el PM de las queratinas tipo I sea 6-9 kDa menor al de las correspondientes tipo II. La secuencia de aminoácidos en el subdominio H1 es relativamente constante en la queratina tipo II básica pero es variable en las queratinas tipo I ácidas. Por ejemplo el subdominio H1 de la queratina K1 (básica tipo II), contiene muchas treoninas y prolina, pudiendo jugar un rol importante en el correcto alineamiento de las cadenas polipeptídicas y estabilizar los tetrámeros por unión al subdominio 2A – L2 de la queratina durante la formación del heterodímero superenrollado y en el autoensamblado de los filamentos de queratina.

El subdominio V1 del dominio cabeza es más variable que el del dominio H1 y contiene muchos residuos de glicina. En las células basales del epitelio estratificado el subdominio V1 está conectado vía un residuo lisina a las proteínas de los desmosomas

mientras que en las células suprabasales está unido a las proteínas de la envoltura cornificada de los queratinocitos y corneocitos. El cross-linking del subdominio V1 del residuo lisina a un residuo glutamina de la envoltura cornificada, tal como la involucrina es promovida por la enzima transglutaminasa epidérmica. El subdominio V1 es también esencial para la elongación de los filamentos de queratina.

La función principal del dominio cabeza es la de establecer la correcta orientación en forma paralela y escalonada de los dominios en varilla en los heterodímeros y quizás también en los tetrámeros. Además el dominio cabeza del tipo II está covalentemente unido a las proteínas del envoltorio cornificado de las células epiteliales (Bragulla *et al.*, 2009).

Dominio en varilla

El dominio en varilla de las α -queratinas comprende aproximadamente 310 aa, ~ 45 nm y consiste de 4 subdominios α -helicoidales dextrógiros 1A, 1B, 2A y 2B los cuales están separados de otros por giros β no helicoidales llamadas regiones conectoras (L1, L12 y L2) (Fig 5.5).

Alrededor del 38-45% de la estructura de la molécula de queratina es del tipo de conformación α -helicoidal. La clasificación en tipo I y tipo II depende de la carga de ciertos subdominios del dominio en varilla. En el tipo I (ácido) todos los subdominios están negativamente cargados. En el tipo II (básico) los únicos subdominios ácidos son los 1B y 2A mientras que el subdominio 2B es neutro y el subdominio 1A está positivamente cargado.

Los subdominios α -helicoidales 1A, 1B, 2A y 2B del dominio en varilla están compuestos de una secuencia repetitiva de 7 aminoácidos en las posiciones de unión a-g, como se mencionó anteriormente, que intervienen en la formación de la α -hélice y del heterodímero superenrollado.

Los primeros trece residuos de aa en el N-terminal del dominio en varilla forman un sitio llamado “trigger”, gatillo o desencadenante, el cual inicia la formación de la α -hélice del dominio en varilla (secuencia him: hélix-initiating motif) dándole estabilidad. Permite la formación superenrollada del heterodímero a través de un apareamiento o emparejamiento de iones intercadena.

En los subdominios 1B y 2B la secuencia de aminoácidos especial favorece y estabiliza la formación de la α -hélice como estructura. En el C-terminal existe una región htm (motivo de terminación de la hélice, hélix terminating motif) que conecta con el dominio cola no helicoidal. Generalmente este dominio en varilla está negativamente cargado. En las queratinas básicas tanto duras como blandas existe una secuencia de aa conservada en el subdominio 2B cercana al C terminal que interviene en el empaquetamiento lateral de los heterodímeros para la formación de los tetrámeros.

Las regiones linker formadas por giros β -no helicoidales difieren en su secuencia de aa y longitud. Por ejemplo la longitud del linker L1 en el dominio en varilla de las queratinas varía de 8 a 16 y este linker forma una bisagra flexible.

El linker L12 es usualmente la región no-helicoidal mayor del dominio en varilla, mientras que el linker L2 contiene sólo 7 residuos en las queratinas humanas.

Los heterodímeros se forman principalmente gracias a los dominios en varilla pero también son requeridas las regiones no helicoidales de la cabeza y la cola. Los heterodímeros se forman por un par de queratinas que se orientan paralelas de tal manera que la cabeza de una limita con la cabeza de otra (Fig.5.6). La secuencia de aa en el dominio en varilla es ampliamente homóloga, es decir que casi no varían ya que su estructura es determinante de su función en la formación de la queratina.

Dependiendo de la secuencia de aa, la estructura secundaria del dominio central en varilla tiene una o dos formas básicas, la α -hélice o β -hoja plegada (β -sheet), base de su clasificación. Las β queratinas forman los tejidos duros cornificados de los saurópsidos (garras y escamas de reptiles y picos, garras y plumas de aves) mientras que todos los vertebrados producen α -queratinas. Mutaciones de los genes (KRT) alteran la secuencia de aa de la estructura secundaria del dominio en varilla, causan disrupción del superenrollamiento, heterodímeros y tetrámeros y alteran las propiedades mecánicas de la fibra (Bragulla *et al.*, 2009).

Dominio C-terminal (cola)

Este dominio globular se subdivide en tres subdominios H2, V2 y E2 en las de tipo II y en dos subdominios en las de tipo I, V2 y E2. El subdominio V2 contiene loops repetitivos con numerosas Gly que son requeridos para el rol tejido-específico de los filamentos de queratina en el proceso de cornificación. La interacción entre el dominio de la cola de una queratina y el dominio en varilla de la queratina compañera determina el diámetro del filamento. En la K14, el dominio cola promueve el empaquetamiento de los filamentos por interacción con los dominios en varilla de las queratinas vecinas, aumentando las propiedades mecánicas de los filamentos de queratina al menos *in vitro*. El dominio cola de la K5 y la K14 es requerido para la estabilización de los filamentos de queratina *in vitro*, mientras que el subdominio V2 de la K1 facilita el alineamiento paralelo de los filamentos en manojos de filamentos así como la translocación de la loricrina a la membrana celular. En las queratinas específicas de pelo, el dominio cola es más variable que los de la cabeza y de la varilla. El dominio cola de las queratinas en las células cornificantes- queratinizantes duras es rico en cisteína el cual forma puentes disulfuro con otras queratinas o con KFAPs. En el tipo I de α -queratinas duras la cadena de aa de la cola forma una hélice levógira, triplemente plegada, mientras que en el tipo II de α -queratinas duras forma una β -hoja plegada antiparalela de cuatro hebras con una superficie apolar.

Tanto el dominio cola como el dominio cabeza ayudan al ensamblaje en el sentido correcto en forma paralela y escalonada del dominio en varilla para la formación del heterodímero y tetrámero. La cola también interactúa con las KFAPs tales como filagrina o trichialina formando un complejo matriz-filamento que es similar al hormigón reforzado para impartir estabilidad al citoesqueleto (Bragulla *et al.*, 2009).

Formación de la estructura terciaria: heterodímero

La estructura terciaria de las queratinas está formada por un heterodímero

compuesto de dominios en varilla de una queratina básica y una ácida orientados en forma paralela (Fig.5.6). En el caso de los heterodímeros de las células cornificadas-queratinizadas blandas, los dominios en varilla se alinean ligeramente desfasados (7-8 aminoácidos), estabilizados por interacciones hidrofóbicas de ciertos residuos de aa, lo que permite el solapamiento de la cabeza y la cola. El heterodímero es el primer block del filamento de queratina que junto con los tetrámeros constituyen los blocks más estables de los filamentos de queratina. La naturaleza heteropolimérica de las queratinas está establecida en el nivel de la doble hebra superenrollada. La síntesis de la queratina está controlada de manera de poder obtener la estequiometría de los pares de queratina ácida y básica y de producir filamentos de queratina específicos de los estadios particulares de la diferenciación de las células epiteliales.

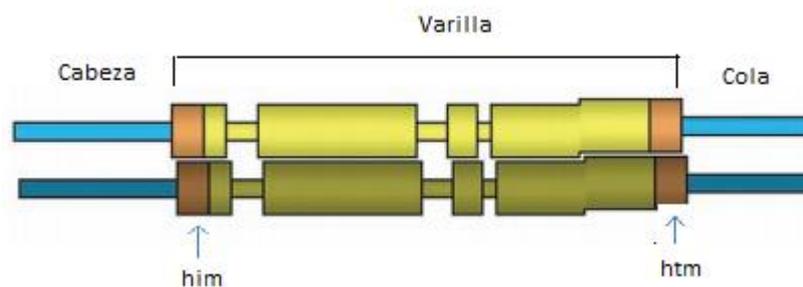


Figura 5.6: Heterodímero formado por moléculas de queratina tipo I y II en alineamiento paralelo (Bragulla *et al.*, 2009)

En el caso de las queratinas cornificadas-queratinizadas duras están alineadas en escalón pero no se superponen los dominios de la cabeza y la cola.

Los heterodímeros de las queratinas son solubles en el citoplasma según su tipo y pH intracelular.

Formación de la estructura cuaternaria

La formación de un filamento intermediario de queratina de ancho 10 nm comienza con la formación de un tetrámero de 60 nm de longitud mediante el alineamiento anti- paralelo escalonado de dos heterodímeros. Existen cuatro diferentes modos de alineamiento (Figura 5.7).

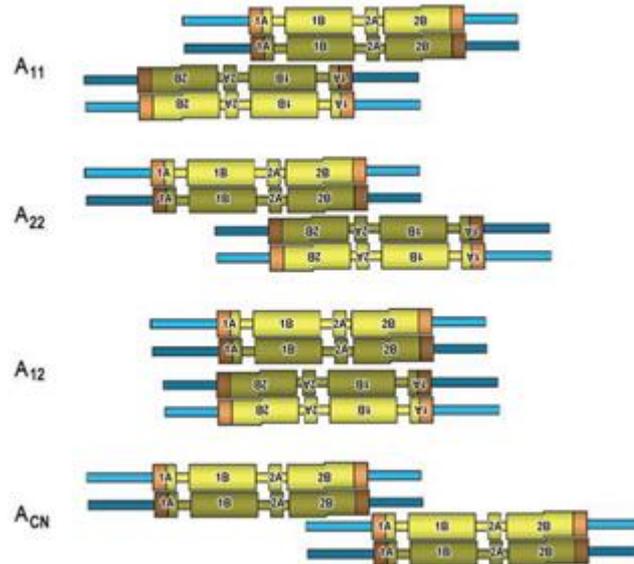


Fig. 5.7. Tetrámero de moléculas de queratina: diferente modos de alineación antiparalela (A) de los heterodímeros (Bragulla *et al.*, 2009)

El modo A₁₁, donde se alinean los dominios 1 en varilla α-helicoidales adyacentes; en el A₂₂ los dominios 2 en varilla α-helicoidales adyacentes; en el A₁₂ los dominios 1 y 2 se disponen en varilla α-helicoidales adyacentes; en el A_{CN}, el extremo C-terminal de un dominio en varilla se yuxtapone con el extremo N-terminal de otro.

El ensamblado de filamentos y tetrámeros depende del pH, fosforilación, osmolaridad, salinidad y se produce en la periferia de la célula.

Mediante difracción de rayos X se determinó que la unión de 8 tetrámeros ensamblados uno al lado de otro, cola con cola, produce una estructura tipo tubo llamada “filamento de longitud unitaria” (ULF) o “partícula tipo filamento intermedio” que contiene cantidades equimolares de queratina tipo I y II en las células no cornificadas. En la Figura 5.8 se muestra la formación del filamento de queratina a partir de la α-hélice. Cada ULF tiene 70 nm de longitud con un diámetro de alrededor de 20 nm que puede disminuir en los filamentos de queratina (Garret *et al.*, 2010).

En las células cornificadas del pelo y la lana en la forma oxidada de los filamentos de queratina los tetrámeros se alinean para formar un anillo de 7 protofilamentos.

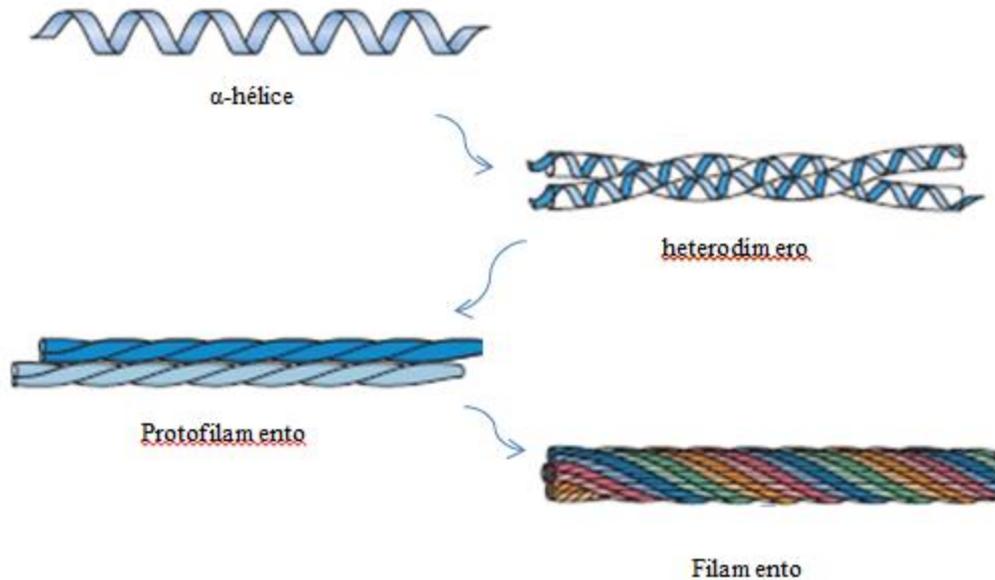


Fig. 5.8. Formación de un filamento de queratina a partir de la α -hélice: dos heterodímeros de α -hélices dextrógiras se unen en forma levógira para formar el protofilamento, cuatro de éstos se alinean y giran en forma dextrógira para formar un filamento (Garret *et al.*, 2010).

Formación de los filamentos de queratina

Las queratinas en los mamíferos se forman por agregados laterales y longitudinales de subunidades de protofilamentos de $\sim 30 \text{ \AA}$ (tetrámeros) y protofibrillas de $\sim 50 \text{ \AA}$ (octámeros). En una sección transversal, los filamentos de queratina constan de 32 moléculas de queratinas, 16 heterodímeros que forman 8 tetrámeros.

A pesar de que la estructura primaria de la queratina tienen un gran momento dipolar, el filamento pierde la polaridad debido a su estructura y ensamblajes particulares, influenciando en sus propiedades mecánicas y la interacción con otras moléculas del citoplasma.

A su vez, los filamentos se empaquetan en forma densa en manojos de variado diámetro, llamados tonofilamentos, constituyendo el citoesqueleto de las células epiteliales, rodeados de polirribosomas y de complejos de membrana multivesiculares que forman una red tubular ramificada.

En las células cornificadas de la piel (*stratum corneum*) existe un empaquetamiento de los filamentos en forma de varilla con un patrón cúbico, que consta de membranas lipídicas como armazón y proteínas asociadas que completan todo el espacio (Garret *et al.*, 2010).

Características funcionales de las queratinas

Presentan numerosas funciones mecánicas. Como andamio celular, soportan el

stress mecánico, otorgan integridad estructural, aseguran la resiliencia mecánica, protegen contra las variaciones de la presión hidrostática, establecen la polaridad celular, actúan en la mitosis de las células epiteliales, forman complejos de adhesión celular como desmosomas, hemidesmosomas, proteínas del shock térmico.

Entre las funciones de índole no mecánica intervienen en la diferenciación celular, en las señales pro-apoptóticas, en la proliferación celular en heridas epiteliales, en la transducción en células sensoriales (células de Merkel, células del pelo) hacia las neuronas, en las células desarrolladoras del gusto, en el transporte de membranas de unión a vesículas del citoplasma de las células epiteliales (Espinosa de los Monteros y Zayas, 2004).

Proceso de cornificación

El proceso de cornificación en la piel de los mamíferos se caracteriza por una concentración de sulfuros a través de la cisteína y metionina en la zona queratogena (sección 6.2.5.1).

La α -queratina de la queratina dura en mamíferos contiene alto contenido de cisteína en los dominios cabeza, cola y varilla, aunque los residuos de cisteína de la cola son específicos de este tipo de queratina.

En el pelo humano, bovino, ratón, lana de oveja se producen cuatro α -queratinas duras en heterodímeros: ácidas y básicas.

Las queratinas murinas pelo-específicas mHa1, mHa3 y mHa4 las cuales son ortólogas de las queratinas duras específicas humanas K31 (hHa1), K33 (hHa3) y K34 (hHa4) son producidas en las células suprabasales que forman el córtex del pelo y mHa2 o K32 (hHa2) es expresada en las células de la cutícula del pelo del ratón o del humano respectivamente. Estas queratinas duras son muy similares en su secuencia de aminoácidos entre distintas especies manifestando reactividad cruzada de anticuerpos entre distintas especies de mamíferos. La expresión de las queratinas específicas de pelo cesa en el final del ciclo del pelo del catágeno al telógeno (Morioka, 2010).

Unión mediante puentes disulfuros

Los puentes disulfuro covalentes formados entre residuos de cisteína adyacentes de moléculas vecinas intracadena hacen la estructura más rígida, inextensible e insoluble como es el caso de las garras, uñas, pelo y cuerno (Buechler y Lollar, 1950). Determinan el rizamiento del pelo y la lana. En la “permanente” de la peluquería, los disulfuros del pelo son primero reducidos y clivados luego son reoxidados y reorganizados para cambiar el grado de rizado u onda. En cambio un “set” que es creado humedeciendo el pelo, enrulando el pelo y luego secando representa un mero arreglo de puentes de H entre las hélices y fibras (Garret *et al.*, 2010).

A nivel de las protofibrillas y microfibrillas las uniones puentes disulfuro que entre ellas se establecen, definen sus propiedades de fibra, rigidez y resistencia a la degradación microbiana. El pelo y lana que tienen menos cross-links, son flexibles. Cuernos, uñas o garras y uñas que tienen más cross-links son mucho más resistentes o duras (Filipello-

Marchisio, 2000).

Calcificación de las queratinas

Se ha observado la calcificación de las queratinas de células cornificadas y queratinizadas epidérmicas.

Ha sido descrita en procesos patológicos como el cáncer de piel o en injurias de piel. Su disminución ha sido mencionada como patológica en el caso de los cuernos y pezuñas cornificados de terneros lactantes.

Tabla 5.2. Localización de queratina calcificada en tejidos de diversas especies (Bragulla *et al.*, 2009)

Especie	localización	Tipo de calcificación
Serow japonés(<i>capricornus crispis</i>)	Cuerno cornificado duro	Fosfato octacálcico; hidroxapatita
Antílope Saiga	Stratum corneum	Fosfato octacálcico
Rinoceronte blanco	Cuerno frontal y nasal	Fosfato octacálcico
Ballenas barbudas	Barba	Fosfato octacálcico
Felinos	Vaina cornificada de las garras	Fosfato octacálcico

5.2.2. Estructura del pelo y folículo piloso

Como se mencionó en la sección 5.2.1, la formación del pelo y folículo piloso siguen las mismas etapas. Macroscópicamente, un pelo típico tiene aproximadamente 20 μ de diámetro y está formado a partir de células muertas cada una de las cuales tiene macrofibrillas empaquetadas (\sim 200nm) que están orientadas en forma paralela a la fibra del pelo. Las macrofibrillas están constituidas a su vez por microfibrillas (\sim 7-8 nm de ancho) que están pegadas entre sí por una matriz proteica amorfa de alto contenido de sulfuro. Los dímeros coil-coiled o heterodímeros (Fig. 5.9.a) se ensamblan de manera antiparalela y escalonada cabeza con cola para formar el protofilamento (Fig. 5.9.b). A su vez éstos se dimerizan para formar una profibrilla y la unión de cuatro de éstas forma una microfibrilla (c) (Voett *et al.*, 2011).

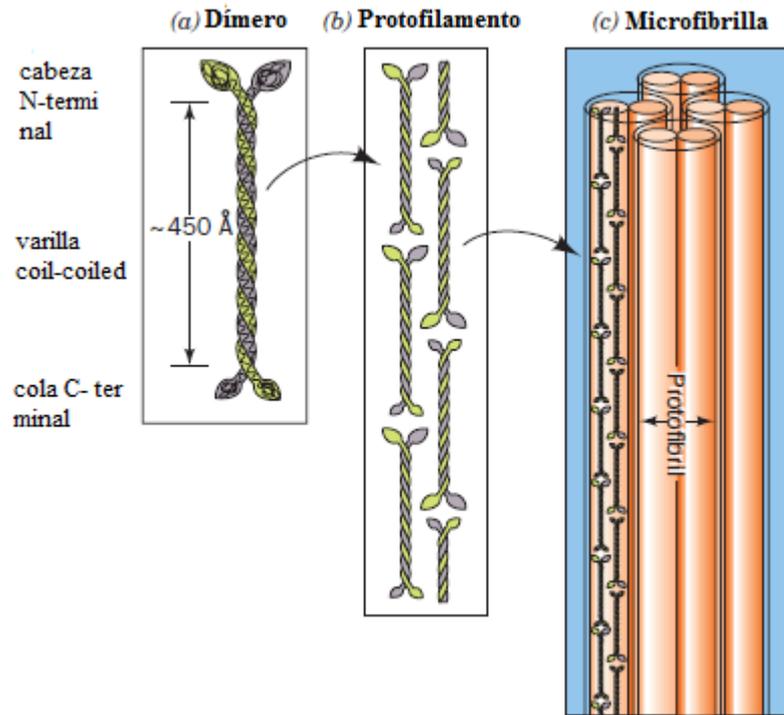


Figura 5.9. Estructura y ensamblado de la α -queratina (Voett *et al.*, 2011)

En la Figura 5.10 se representa la secuencia en la formación de la fibra de la lana cuya estructura es similar a la del pelo (Hill, Brantley y Van Dyke, 2010).

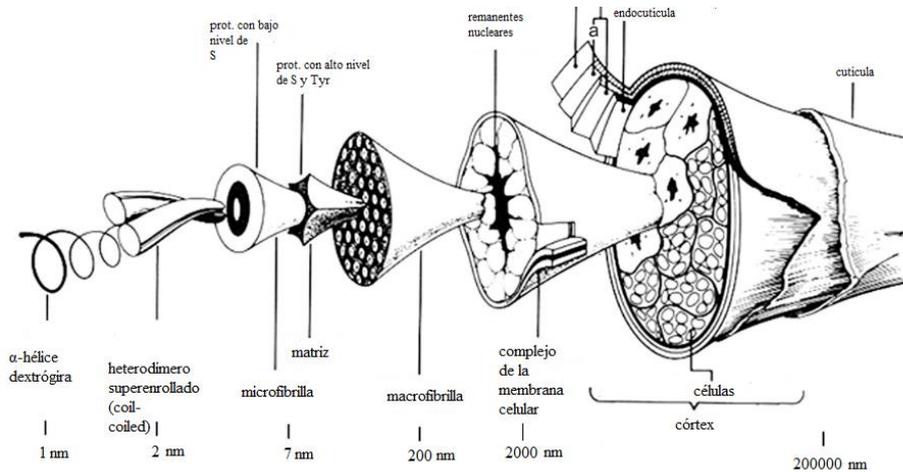


Fig. 5.10. Representación esquemática de la fibra de la lana (Hill, Brantley y Van Dyke, 2010)

Macroscópicamente, la estructura del pelo es básicamente la misma para todos los mamíferos incluyendo pelo fetal “lanugos” y pelos sensores. El folículo piloso consiste de nueve capas epidérmicas diferentes (Morioka, 2010): matriz del pelo, tallo del pelo (médula, córtex o corteza, cutícula del pelo), cutícula de la vaina interna de la raíz (IRS), capa de Huxley (Hx), capa de Henle (He), capa companion (Cp) y capa de la vaina externa

de la raíz (ORS), dispuestas de manera concéntrica desde el centro a la periferia. En la base del folículo aparece la papila dérmica formada por la invaginación del folículo del tejido conectivo (Figuras 5.11 y 5.12).

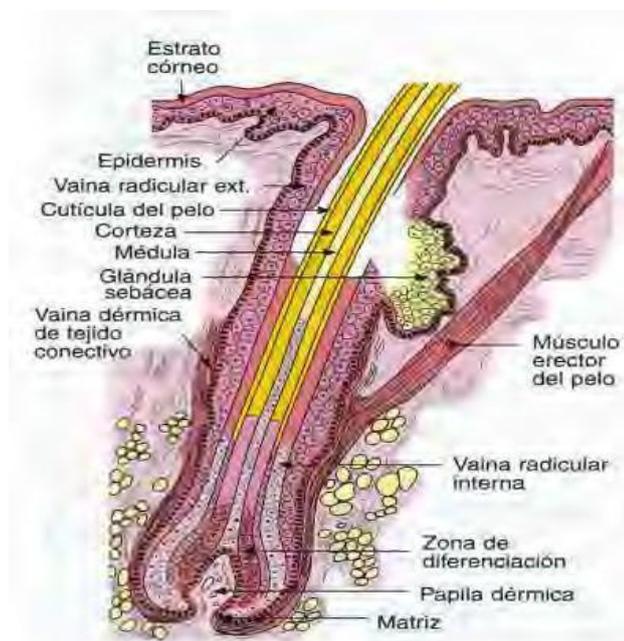


Fig. 5.11. Representación esquemática de la morfología de una sección longitudinal del complejo pilosebáceo (Peckham, 2003)

El córtex y la cutícula constituyen las capas mayoritarias de la vaina del pelo que penetran en la piel, están altamente queratinizadas aunque la composición de queratinas que los componen es diferente (Tabla 5.3). Las tres capas concéntricas localizadas en forma inmediatamente distal a la vaina: la cutícula de la IRS, la Hx y la He constituyen la IRS que permite su crecimiento y diferenciación. La capa más interna es la cutícula de la vaina que consiste de escamas superpuestas al igual que la cutícula del pelo. La Hx es el último de los tejidos queratinizados de la IRS y del tallo del pelo que toman parte del proceso de queratinización (sección 6.2.5.1). Sus células metabólicamente activas sobreviven hasta el final del proceso y pueden jugar un rol fundamental en el cuidado de otras células queratinizadas en términos nutricionales y de soporte de información. Ayudan en el mantenimiento de la plasticidad para disipar la distorsión que produce el desbalance de la queratinización del tallo, como por ejemplo en el enrulado. Junto con la cutícula de la IRS mantiene la suavidad de la estructura del folículo. Cuando la IRS está ausente, la cutícula del pelo puede quedar enganchada en la dermis o la epidermis debido a su superficie rugosa (Morioka, 2010).

Tabla 5.3. Tipos de queratinas en los folículos pilosos (Morioka, 2010)

	Tipo I	Tipo II
médula	K 17, K 19	K 5, K 6hf y/o K6
córtex	Ha 1, Ha 3, Ha 4, Ha 5, Ha 6, Ha 8	Hb 1, Hb 3, Hb 6
cutícula	K 10, K 11, Ha 2, Ha 5	K 1, K 7, Hb 2, Hb 5
vaina de la raíz interna (IRS)	K 10, K13, K 18, IRSa	K 1, K 4, K 6irs
capa companion	K 14, K 16, K 17, K 18	K 6, K 8, K 6hf
vaina de la raíz externa (ORS)	K 14, K 15, K 17, K 19	K 5, K 6
matriz del pelo	K 14, K 15, K 17, Ha 5	Hb 5, K 6hf

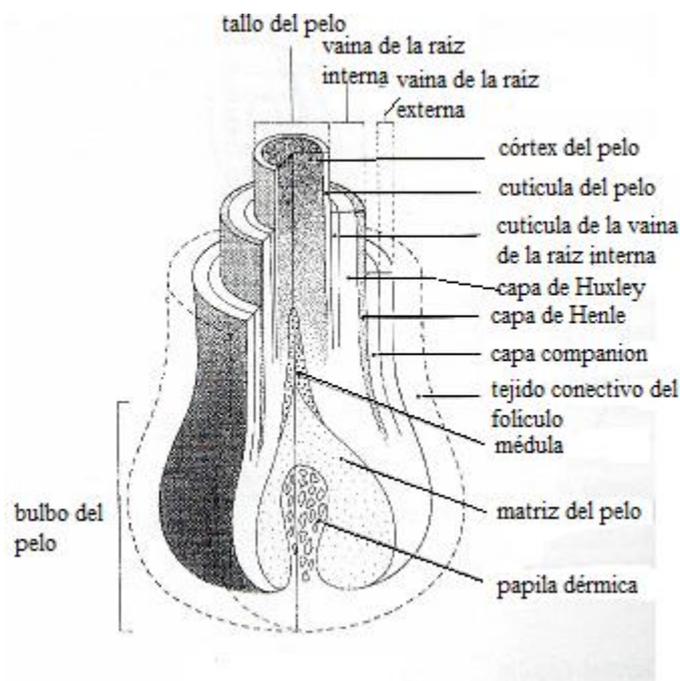


Figura 5.12. Representación esquemática del folículo piloso (Morioka, 2010)

La capa de Henle se queratiniza en etapas tempranas del desarrollo folicular. Las células del IRS y las del tallo del pelo crecen y se diferencian bajo la protección de crecimiento de la He, que les brinda fuerza mecánica y sustancias nutricionales en los frágiles primeros estadios de su desarrollo.

Esencialmente no existe angiogénesis en la papila dérmica del folículo temprano.

Todas las capas de la IRS forman gránulos de trichohialina y luego se queratiniza pero no forman una estructura dura y compacta como la del tallo. Las capas cornificadas

de la IRS finalmente se descaman junto con las células de la superficie de la piel. La ORS y la Cp, situada entre la IRS y la ORS son las capas más externas del folículo. La ORS se continúa con la capa basal del epitelio epidérmico pero es incapaz de producir los estratos espinoso y granular o células cornificadas característicos de la epidermis (Morioka, 2010).

En relación al tallo del pelo propiamente dicho, la cutícula forma una muy eficiente defensa contra la injuria del ambiente. Sus células contienen mucha cantidad de queratina amorfa con alto contenido de cistina especialmente en la capa externa más densa (capa A) y en la interna. Dentro de las regiones de la cutícula (sección 5.2.3), la exocutícula es rica en cistina y la endocutícula posee muy poca queratina, con prevalencia de residuos citoplasmáticos como mitocondrias, núcleo y retículo endoplásmico (Filipello Marchisio, 2000). Jones y Rivett (1997) descubrieron la presencia de ácidos grasos como el esteárico, palmítico y el 18-MEA adheridos a la superficie cuticular, unidos a la queratina mediante uniones tioéster y cuya función es la de estabilizar la superficie hidrofóbica y/o la fricción del pelo (Rogers, 2019). El patrón morfológico de la médula y las escamas cuticulares es característico de cada especie (Baca Ibarra, Sánchez-Cordero y Stoner, 2010).

En el córtex no existe una estructura en capas. Sus microfibrillas se combinan en haces de macrofibrillas, están rodeadas de queratina amorfa y a su vez tienen distinta composición. Las microfibrillas están compuestas de queratina de alto peso molecular y poca cistina, mientras que su matriz contiene queratina de bajo peso molecular y es rica en cistina. La matriz macrofibrilar contiene poca queratina y su composición química es similar a la de la endocutícula.

Las células de la médula, dependiendo de la especie, no están siempre presentes en la porción interna del tallo del pelo. Están desprovistas de cistina y contienen alto porcentaje de ácido glutámico (Filipello Marchisio, 2000).

Composición de aminoácidos del pelo

La composición del pelo bovino y de la oveja es similar, como lo demostraron los mapas peptídicos luego de la digestión trípica y quimotríptica, con un mismo heptapéptido acetilado en la secuencia N-terminal, aunque en el pelo bovino puede haber un residuo extra en la misma secuencia (Gillespie, Haylett y Lindley, 1968). En la tabla 5.4 se compara la composición de aminoácidos del pelo humano, de oveja y bovino (g/100 g de proteína seca) (Cantera, 2001).

Tabla 5.4. Composición en aminoácidos de tres tipos de pelo;
 (1) (Fearheller, Taylor, Windus, Filachione y Naghski, 1972);
 (a) Aminoácidos esenciales

Componente	Pelo humano(%)	Lana de oveja(%)	Pelo bovino (%) (1)
N-total	15,5-16,9	16,2-16,9	16,3
S-total	5,0-5,2	3,0-4,0	3,7
Glicina	4,1-4,2	5,2-6,5	4,3
Alanina	2,8	3,4-4,4	3,6
Valina ^a	5,5-5,9	5,0-5,9	5,2
Leucina ^a	6,5-8,3	7,6-8,1	7,1
Isoleucina ^a	4,7-4,8	3,1-4,5	3,4
Fenilalanina ^a	2,4-3,6	3,4-4,0	2,6
Tirosina	2,2-3,0	4,0-6,4	3,7
Triptofano ^a	0,4-1,3	1,8-2,1	0,5
Serina	7,4-10,6	7,2-9,5	8,2
Treonina ^a	7,0-8,5	6,6-6,7	6,1
Cistina	16,6-18,0	11,0-13,7	12,4(cys)
Metionina ^a	0,7-1,0	0,5-0,7	0,4
Prolina	4,3-9,6	5,3-8,1	7,1
Arginina	8,9-10,8	9,2-10,6	9,7
Histidina	0,6-1,2	0,7-1,1	1,0
Lisina ^a	1,9-3,1	2,8-3,3	3,4
Acido aspártico	3,9-7,7	6,4-7,3	6,6
Acido glutámico	13,6-14,2	13,1-16,0	15,1

5.2.3. Mecanismos de degradación de la queratina desde el punto de vista morfológico

Se postulan dos tipos de ataque al pelo por medio de los hongos filamentosos o miceliales, la erosión superficial y la penetración radial (Filipello-Marchisio, 2000) que dependen del grado de queratinización y el contenido de cistina (Fig. 5.13).

En la erosión superficial (ES) producida en general por los hongos no dermatofitos la destrucción radial del pelo ocurre de afuera hacia adentro; las hifas actúan por debajo de las escamas cuticulares, se dispersan a través de la cutícula del pelo, la levantan y disuelven. Estas hifas perforadoras mantienen su forma inicial o se ramifican, se hinchan y desvían, formando estructuras como helechos que English (1968) denomina “micelio erosionante” (ME) en forma de palma en el córtex del pelo. Las hifas transformadas forman una estructura tipo cubierta que rodea al pelo haciendo que la superficie de erosión sea uniforme. Ambos tipo de estructura forman hoyos de erosión (por medio de células anchas) o un pseudoparénquima que forma cavidades en el córtex. Desarrollan una menor actividad queratinolítica, penetrando en menor grado en el sustrato con pérdida de masa.

Para el caso de *Chrysosporium tropicum* y *Scopulariopsis brevicaulis*, las hifas perforadoras surgen de estructuras similares a apresorios cuya actividad enzimática prevalece por sobre la ruptura física. La actividad secretoria se concentra en el tipo hifal

durante la perforación y luego se dispersan lateralmente (Figura 5.13) (Kunert y Krajči, 1981; Filipello-Marchisio, 2000).

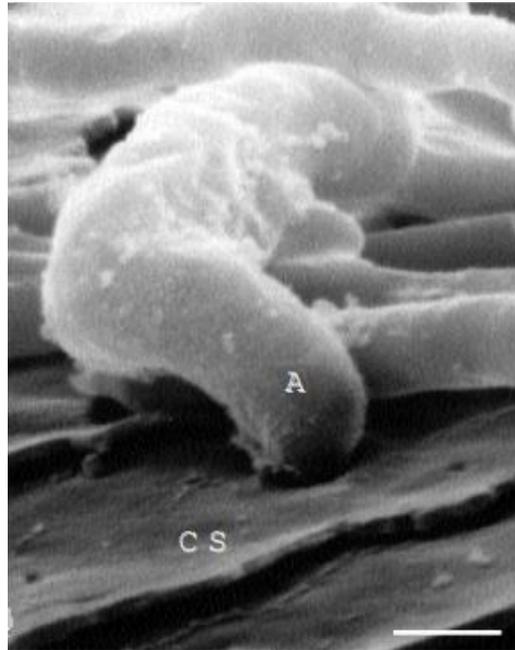


Figura 5.13. Desarrollo de hifas perforadoras en el pelo humano. SEM de la formación de una hifa “tipo apresorio” (A), que es el punto inicial de una hifa perforadora en la superficie de una escama cuticular (CS). Bar= 2 μm (Filipello-Marchisio, 2000).

En la penetración radial (PR) perpendicular al eje del pelo, se forman áreas de lisis alrededor de las hifas perforadoras y de los órganos perforadores que cubren un área de superficie mayor que el de las primeras (Fig. 5.14) (Kornillowszky-Kowalska y Bohacz, 2011). Los órganos perforadores, propios de los dermatofitos, adquieren forma de cuña.

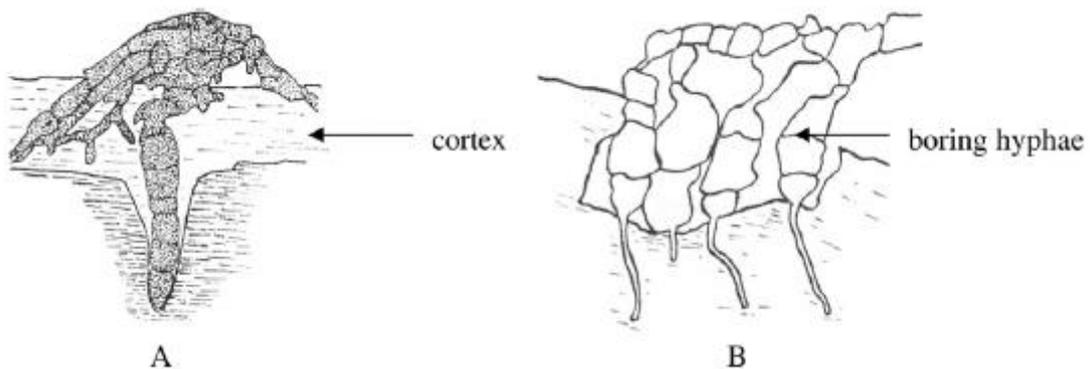


Figura 5.14. (A) Órgano perforador de *Trichophyton mentagrophytes*, infección del pelo *in vitro*, de acuerdo a English (1963) $\times 650$; (B) Hifa perforadora de *Chrysosporium* sp., infección *in vitro*, de acuerdo a English (1976) $\times 1320$ (Kornillowicz *et al.*, 2011).

Ali-Shtayeh y Jamous (2000) estudiaron con microscopio óptico (MO) el ataque al pelo por medio de distintos hongos no dermatofitos y dermatofitos, observando diferencias en el tipo de erosión y el tipo de hifa perforadora (Figura 5.15).

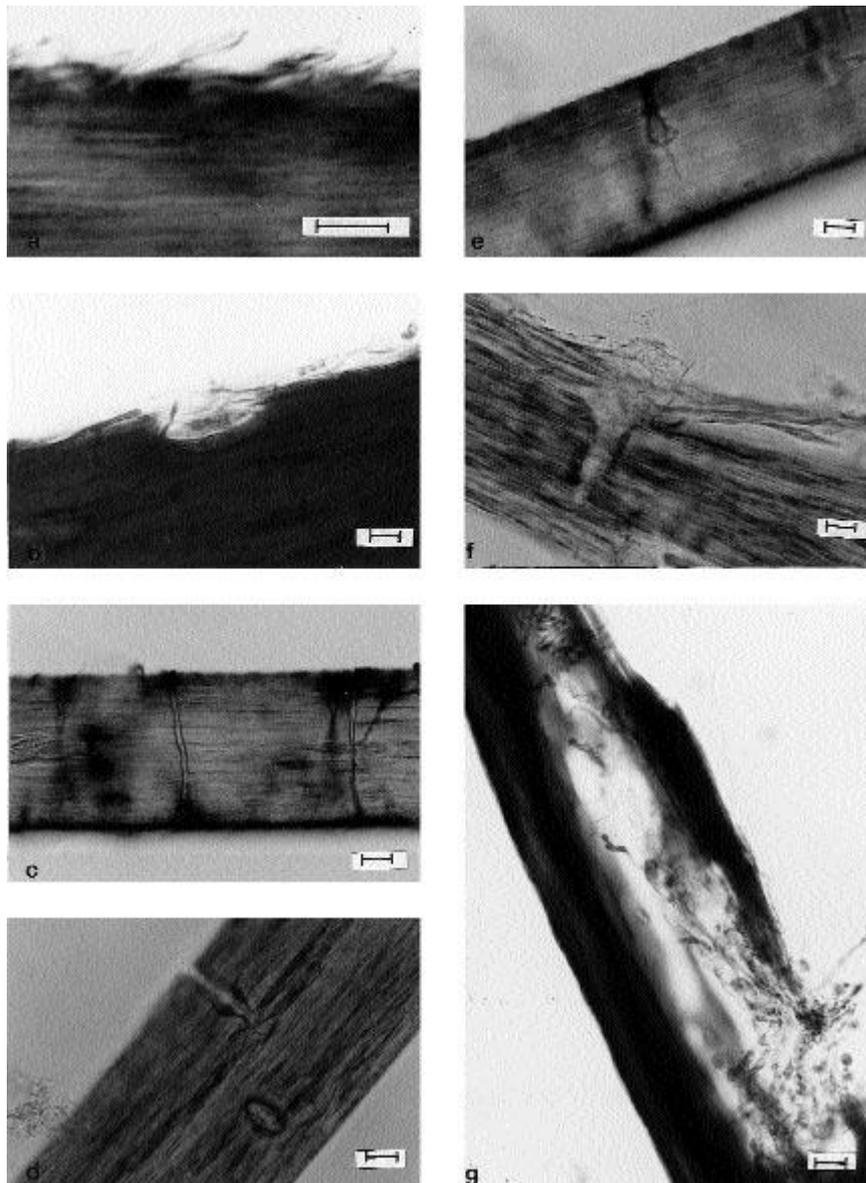


Figura 5.15. Diferentes tipos de ataque al pelo humano (MO, coloración: azul de lactofenol): (a) *Paecilomyces lilacinus*, erosión de superficie uniforme; (b) *Chrysosporium keratinophilum*, erosión de superficie, tipo hoyo; (c) *Penicillium chrysogenum*, hifas perforadoras; (d) *Microsporum gypseum*, hifas perforadoras anchas; (e) *Chrysosporium keratinophilum*, hifas perforadoras hinchadas; (f) *Trichophyton ajelloi*, órgano perforador; (g) *Chrysosporium keratinophilum*, digestión avanzada de la vaina del pelo. Bar: 10 μ m (Ali-Shtayeh *et al.*, 2000).

Otros autores, describen el desfibrilamiento de los extremos de la fibra capilar como una de las etapas en el caso de *Chrysosporium* sp, como se aprecia en la Figura 5.15 (g). Describen una secuencia que comienza por la erosión superficial (en hoyos o uniforme), penetración radial (a través de hifas perforadoras u órganos perforadores), desfibrilamiento (sobre todo en los extremos de la fibra) y fisura del eje del pelo en la invasión profunda. Se demostró mediante microscopía óptica dos tipos de erosión uniforme en áreas localizadas: hifas perforantes hinchadas (I) e hifas perforantes anchas con subsecuente penetración radial, similares a órganos perforadores (II) (Mittola, Escalona, Salas, García y Ledesma, 2002).

Secuencia cronológica de ataque microbiano-fúngico al pelo

Los aspectos morfológicos de la degradación microbiológica de la fibra del tallo del pelo son objeto de estudio en prácticas experimentales, forenses y arqueológicas.

En la Figura 5.16 se representa un esquema del corte transversal de una célula cuticular madura del pelo.

Cada célula está separada y rodeada por una capa fuertemente adhesiva conocida como célula de la membrana de la matriz, constituida por una capa δ de polisacáridos rodeada por dos capas β ricas en lípidos, uno de los cuales es el 18-MEA, unido en forma covalente a sus componentes proteicos (sección 5.2.2) (Jones *et al.*, 1997).

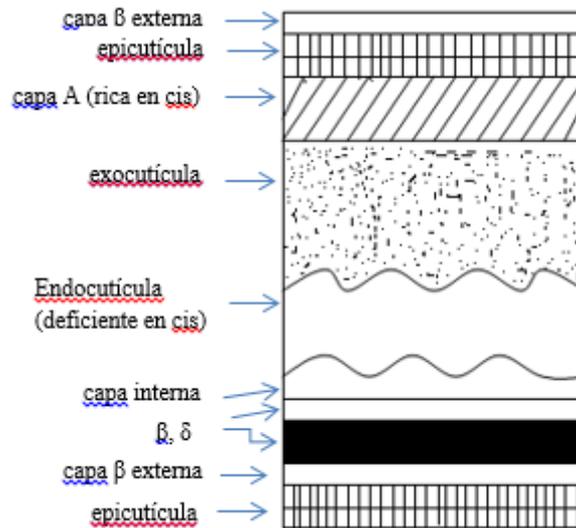


Figura 5.16. Sección transversal de una célula de la cutícula (Barton, 2011).

Wilson, Dodson, Janaway, Pollardà y Tobin (2007) estudiaron el ataque selectivo al pelo y determinaron que la degradación comienza por las estructuras pobres en cistina tanto en la cutícula como en el córtex del pelo. Establecen un orden cronológico en el proceso que se detalla en la Tabla 5.5. Observaron que los gránulos de pigmentos como los de melanina fueron los menos vulnerables a la degradación.

Tabla 5.5. Estructuras del pelo atacadas durante la invasión microbiana de acuerdo al orden cronológico

Cutícula	Córtex	Resistencia
I. Complejo de membrana celular: capa intercelular δ, μ	I. Complejo de membrana celular: capa intercelular δ, μ	Menor
II. Endocutícula	II. Membrana celular: capa β, μ	Menor a +
III. Capa β de la membrana celular	III. Matriz intermacrofibrilar-remanentes nucleares	Menor a ++
IV. Exocutícula	IV. Microfibrillas	Menor a +++
V. Epicutícula	V. Matriz intermicrofibrilar	Mayor a -
VI. Capa A	VI. Gránulos de pigmentos	Mayor

Rashid, Hodgins y Richardson (1996) inocularon arthroconidias de *Trichophyton mentagrophytes* en el tallo de pelo. El crecimiento se extendió hacia el bulbo donde la vaina interna de la raíz fue un excelente sustrato para el hongo. Si bien la cutícula actúa inicialmente como barrera, al 4° día de incubación las hifas del hongo penetraron por debajo y por dentro de las células cuticulares para invadir el córtex. No se hallaron arthroconidias ni órganos perforadores característicos de la invasión *in vitro*. El proceso de invasión combinaría fuerzas mecánicas y químicas que actúan en forma sinérgica.

En el caso del *Chrysosporium* otros autores observaron que la secuencia en la demolición del pelo estudiada por Microscopio Electrónico de Barrido y Microscopio Electrónico de Transmisión, era la siguiente: en la cutícula: material intercelular, membrana citoplasmática, endocutícula, exocutícula, capa A, capa fina subyacente a la membrana citoplasmática interna de las células de la cutícula; en el córtex: material cementante, plasmalema, material intermacrofibrilar, microfibrillas y matriz de las microfibrillas (Fusconi y Filipello-Marchisio, 1991).

Colonizadores de los residuos queratínicos en la naturaleza

En la degradación de detritos queratínicos del suelo intervienen numerosas especies de acuerdo al sustrato y al tiempo de descomposición. Griffin y De Vries (Filipello Marchisio, 2000) observaron que los primeros colonizadores son los quitridios (hongos primitivos), seguidos por los géneros *Fusarium*, *Penicillium* y *Mucor* que utilizan sustancias más fácilmente digeribles. La secuencia continuó con los géneros

Chaetomium, *Gliocladium* y *Humicola*, capaces de degradar sustancias más resistentes y por último especies de *Trichophyton* y *Microsporum*. En la naturaleza esta secuencia de hongos descomponedores suele superponerse.

Degradación del pelo mediante hongos dermatofitos

Los dermatofitos como *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton violaceum* crecen colonizando el pelo *in vivo* en forma de micelio filamentosos al igual que *in vitro*. Mediante Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) se observó el desarrollo del micelio altamente polarizado en sus tips hifales donde aparecen vesículas con síntesis de enzimas líticas y de la pared celular.

Sin embargo demuestran al mismo tiempo una morfología peculiar en su crecimiento saprofito sobre tejidos queratinizados *in vitro*. Producen un micelio erosionante o un micelio en fronda que luego deriva en un órgano perforador que penetra en el tejido (Baxter y Mann, 1969). Kanbe y Tanaka (1982) estudiaron los detalles ultraestructurales de la formación del órgano perforador en *Microsporum gypseum*, que produce un test de perforación del pelo *in vitro* positivo. Durante los primeros días del cultivo sobre pelo infantil estéril, las hifas germinadas penetran por debajo de las tejuelas cuticulares. El micelio en fronda aparece por debajo de las cutículas que fueron despegadas. Mediante cortes transversales con Microscopio Electrónico de Transmisión (MET) observan que el ME consiste de una variedad de células de distinta forma cuyo contenido citoplasmático se incrementa en la cercanía de la superficie del pelo. A partir de estas células comienza a formarse el órgano perforador (OP) que penetra perpendicularmente en el córtex y lo erosiona. En la Figura 5.17 A, el micelio aplanado con sus hifas en fronda levanta las escamas cuticulares, la porción central del futuro OP se hincha y empuja hacia adentro del córtex cuyas células contienen núcleo, mitocondria, retículo endoplásmico con ribosomas durante las primeras etapas de su formación. Las vesículas citoplasmáticas se forman a partir del plasmalema o membrana plasmática y la célula esférica central se embebe en el córtex. En la Figura 5.17 B el OP adquiere una forma esférica donde sus ramificaciones laterales avanzan en paralelo al eje longitudinal del córtex del pelo constituyendo una única célula cuando se reconstruyen los sucesivos cortes transversales en 3D. Esta célula contiene todos los orgánulos citoplasmáticos que poseía al comienzo de la transformación y la gran actividad biosintética está demostrada por la gran cantidad de vesículas y organelas que van degradando la queratina dura que la rodea. Los lomasomas se aprecian como estructuras membranares dispuestas entre el espacio de los perfiles irregulares del plasmalema y las fibrillas de queratina del córtex degradado donde aparentemente tienen una función relacionada con la síntesis de queratinasas.

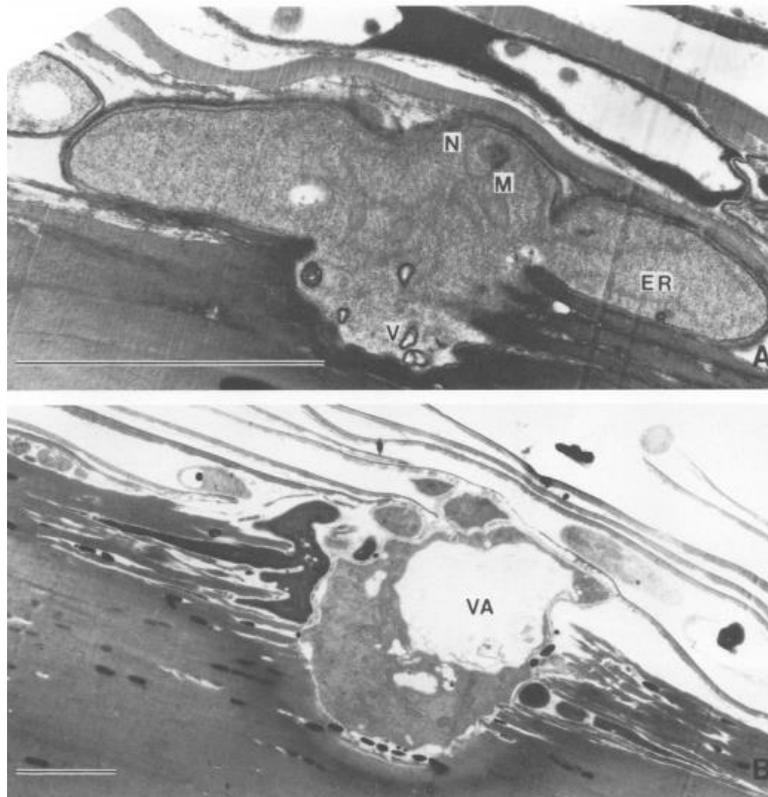


Figura 5.17 Corte transversal con MET de la ultraestructura de las etapas iniciales de la formación del órgano perforador de *Microsporum gypseum* (Bar, 5µm). N: núcleo; M: mitocondria; ER retículo endoplásmico; VA: vesícula (Kanbe *et al.*, 1982).

En la Figura 5.18 se observa el órgano perforador maduro después de 7 días de crecimiento en el pelo formado por un apilamiento de células cortas y anchas dispuestas en forma perpendicular a la médula. Las vacuolas están dispuestas hacia la periferia. La médula del pelo adyacente está digerida debido al ataque de las queratinasas liberadas por las vacuolas mientras que los gránulos de melanina permanecen intactos.



Fig.5.18 Corte transversal con MET de la ultraestructura de un órgano perforador maduro de *Microsporum gypseum* (Bar 10 μ m) (Kanbe *et al.*, 1982).

Baxter *et al.* (1969), demostraron con MET que todos los dermatofitos u hongos queratinofílicos pueden invadir el pelo *in vitro* pero sólo algunas especies donde se encuentran entre otras, *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton ajelloi*, pueden desarrollar un ME en forma de OP.

Ambas especies fúngicas presentaron similitudes en el modo de invasión al pelo pero *Trichophyton ajelloi* presentó una menor o nula digestión del córtex, el órgano perforador con muchas más células de distintos tamaños y menor cantidad de mitocondrias. A las dos semanas la apariencia fue la de una masa de remanentes fúngicos interconectados como resultado de una compleja ramificación del OP para formar una masa de células hinchadas. Estos autores concluyen que en la acción de esta especie predomina la acción mecánica más que la enzimática.

Trichophyton mentagrophytes, en los primeros estadios, provocó la erosión de las áreas intracelulares. En estadios más avanzados, las regiones altamente queratinizadas del córtex alrededor del OP y de las hifas fueron totalmente digeridas. El patrón de ruptura estructural fue común a la actividad subcuticular del ME, de las áreas alrededor del OP y de las hifas que crecen longitudinalmente a través del córtex.

En cambio *Trichophyton rubrum* fue menos queratinolítico que *Trichophyton ajelloi* y *Trichophyton mentagrophytes*. Desarrolló un ME que penetró entre las capas de las células cuticulares levantándolas para extenderse entre éstas y el córtex. Luego de una semana demostró digestión de las regiones de queratina menos resistentes. Las hifas del ME presentaron una pared celular gruesa y un plasmalema con un retículo endoplásmico granular con ocasionales mitocondrias. A las dos semanas las células del micelio y su contenido fueron reducidos a membranas residuales. Dentro del OP se encontraron gránulos de glucógeno y una cantidad de mitocondrias asociadas a la menor o mayor síntesis enzimática.

5.3. Procedimiento para la observación en Microscopio Electrónico de Barrido del RP atacado por *Trichophyton ajelloi*

5.3.1. Materiales y métodos

Se procesaron muestras de: pelo bovino nativo lavado; “residuo pelo” (RP) (sección 3.3.1.1) sin inocular: “residuo pelo” (RP) desengrasado con tensioactivos y/o diclorometano y posteriormente inoculado y cultivado en fermentación en sustrato sólido durante 15 días con *Trichophyton ajelloi*.

Las distintas muestras fueron lavadas en 1% de buffer PBS, pH 7.4, prefijadas y fijadas en formol al 5% y al 6% (marca Dowill 40%, proanálisis). A esta concentración de formol se llegó luego de probar al 10% y determinar que colapsaban las estructuras fúngicas en la observación con MEB. Posteriormente se deshidrataron en una batería de alcoholes del más diluído al más concentrado (30%, 50%, 70% y 100%) (Sarmiento, Garro, Galarza, y Hours, 2017; Galarza, Garro, Gortari, Martegani, Hours. 2014). Luego las muestras se deshidrataron a sequedad 100% absoluta mediante el secado por punto crítico con un equipo Bal-TecCP 030 (Balzers) a 31°C y 73 atm. Este paso fue necesario debido a que los componentes de la muestra eran diferentes y podían colapsar durante la observación (Hutton, Kerbs y Yee, 1978). Luego se metalizaron con baño de oro en el equipo Jeol Fine Coat Ion Sputter JFC 1100 (Japón). La observación se llevó a cabo en el Microscopio Electrónico de Barrido Jeol JSM 6360 LV (Japón) del Museo de Ciencias Naturales de La Plata.

5.3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 5.19 se observa el pelo bovino nativo sin ningún tratamiento con las escamas cuticulares características de la especie (Baca Ibarra *et al.*, 2010).

La Figura 5.20 muestra el pelo vacuno después de un depilado conservador del pelo a base de cal y sulfuro de sodio donde el RP obtenido fue desengrasado posteriormente con diclorometano. La superficie cuticular está más opaca y sus escamas presentan bordes irregulares.

En la Figura 5.21 se presenta el RP en las mismas condiciones anteriores sin tratamiento de desengrasado posterior. Se aprecia que el pelo ha sufrido deterioro como parte del proceso de depilado, las escamas o tejuelas cuticulares han perdido definición y

en algunos lugares el córtex queda al descubierto.

En la Figura 5.22 el RP desengrasado con diclorometano colonizado con *Trichophyton ajelloi* luego de 15 días de incubación se muestran las cutículas rodeadas de micelio penetrando por debajo de las mismas. Se observa un engrosamiento de algunos extremos y porciones medias de las hifas para formar los “órganos perforadores” que se introducen por debajo de las tejuelas cuticulares (Baxter *et al.*, 1969; Kanbe *et al.*, 1982).

En la Figura 5.23 el RP con el mismo tratamiento que en la Fig. 5.22, se observa el micelio fúngico que se va transformando en micelio erosionante y órganos perforadores para penetrar en los espacios entre las escamas cuticulares. Estas hifas perforadoras engrosadas cumplen el rol de los “apresorios” (Filipello- Marchisio, 2000).

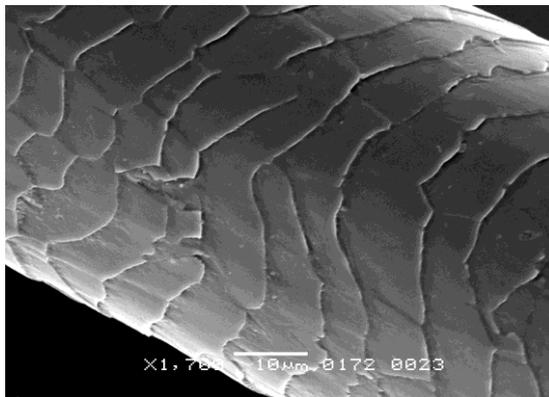


Figura 5.19. Pelo bovino nativo (MEB x 1700)
(Bar 10 µm)

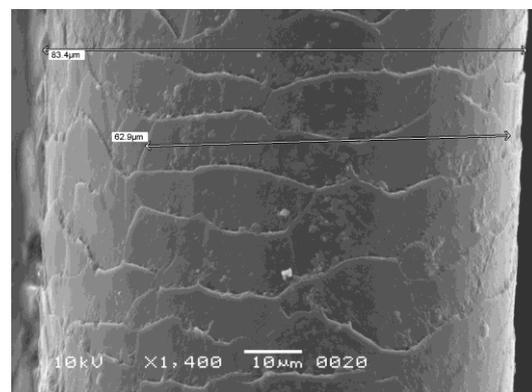


Figura 5.20. Pelo bovino (RP) (MEB x 1400)
(Bar 10 µm)

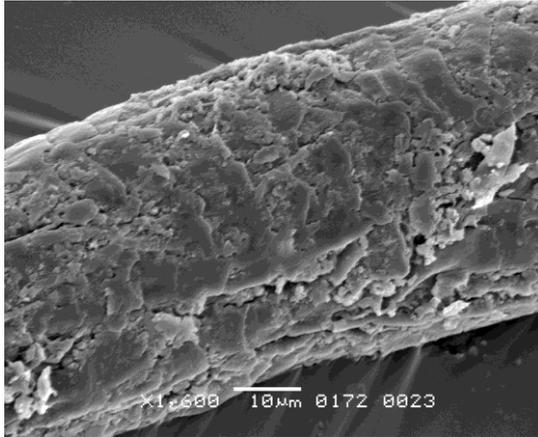


Figura 5.21. Pelo bovino (RP) sin desengrasar (MEB x 1600) (Bar 10 µm)

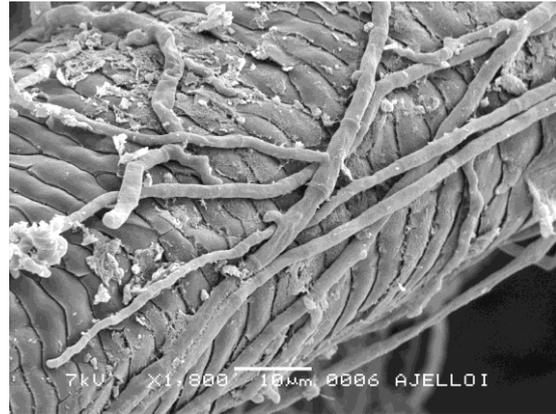


Figura 5.22. Pelo bovino (RP) colonizado por *Trichophyton ajelloi* (15 días de cultivo) (MEB x 1800) (Bar 10 µm)



Figura 5.23. Pelo bovino (RP) colonizado por *Trichophyton ajelloi* (15 días de cultivo) (MEB x 1800) (Bar 10 µm)



Figura 5.24. Pelo bovino (RP) colonizado por *Trichophyton ajelloi* (15 días de cultivo) (MEB x 550) (Bar 20 µm)

En la Figura 5.24 el RP desengrasado con tensioactivos se encuentra rodeado de micelio fúngico. La degradación fúngica produce el desprendimiento de las escamas por acción de la erosión de las hifas del hongo que penetran por debajo de la cutícula.

En la Figura 5.25 con RP sin desengrasar, las fibras del pelo aparecen con las escamas cuticulares totalmente desprendidas, arrancadas desde su base dejando al descubierto el córtex (marcado con la flecha). En la Figura 5.26 el hongo creciendo sobre el RP en iguales condiciones que las de la Fig. 5.25 forma acúmulos o clusters de macroconidias características rodeadas de micelio, lo que demuestra que *in vitro* el microorganismo produce reproducción asexual.

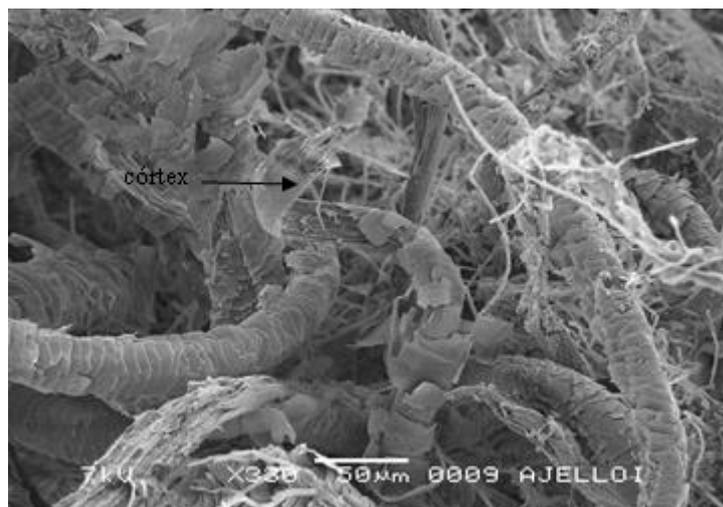


Figura 5.25 Pelo bovino (RP) colonizado por *Trichophyton ajelloi* (15 días de cultivo) (MEB x 330) (Bar 50 µm)



Figura 5.26. Clusters de elementos fúngicos de *Trichophyton ajelloi* colonizando el RP (15 días de cultivo) (MEB x 900) (Bar 20 μ m)

5.3.3. CONCLUSIONES

En coincidencia con lo reportado en las referencias bibliográficas el hongo demostró una acción degradadora. Se produce en forma simultánea la liberación de enzimas y la penetración mecánica del micelio erosionante y los órganos perforadores. De esta manera el hongo genera biomasa a expensas de los productos de degradación de la queratina (sección 3.4.2) (Galarza, Garro, Cavello, Cazau, Hours y Cantera, 2007).

5.4. Procedimiento para la observación en Microscopio Electrónico de Transmisión del RP atacado por *Trichophyton ajelloi*

5.4.1. Materiales y métodos

Se utilizaron muestras de RP colonizadas por el hongo a partir de cultivos de 28 días (sección 3.3.2.3). Como control negativo se utilizó RP sin inocular en las mismas condiciones que el usado para el cultivo (sección 3.3.1.1).

A una porción de 0,5 g de RP colonizado se le realizó una fijación primaria en 2% de glutaraldehído, 2% PBS pH 7,4 durante 2 h a 4°C con tres cambios de 30 min. En la fijación secundaria, se utilizó una solución 1% de tetróxido de osmio. Posteriormente las muestras se deshidrataron en una batería de alcoholes del más diluído al más concentrado (50%, 70%, 80%, 90% y 100%) y acetona a temperatura ambiente. Luego las muestras se incluyeron en resina epoxi poly-bed 812 dentro de moldes de silicona, se secaron en estufa a 35°C, 45°C y 60°C durante 12 h respectivamente. Los cortes ultrafinos de las muestras (90 nm) se colorearon con acetato de uranilo y citrato de plomo.

La observación fue realizada mediante el Microscopio Electrónico de Transmisión JEOL, Modelo JEM 1200 EX II del Servicio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP.

5.4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 5.27, en el corte transversal ultrafino del RP sin inocular se aprecia el borde superior que corresponde a las escamas cuticulares. Los corpúsculos en negro podrían corresponder a corpúsculos de melanina o gránulos de trichohialina (gránulos de queratohialina), aunque estos últimos sólo están presentes en la médula e IRS del folículo piloso (sección 5.2.2).

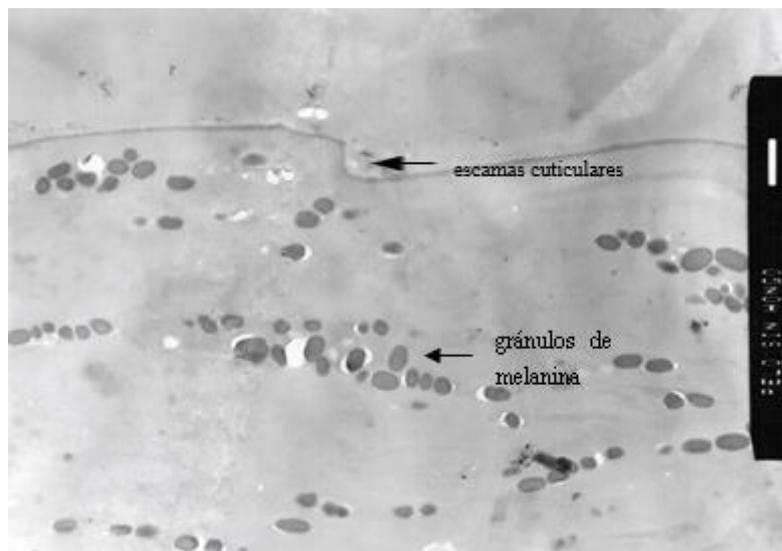


Figura 5.27 Pelo bovino (RP) sin desengrasar (MET x 5000) (Bar 1 μ m)

En la Figura 5.28, en el RP colonizado por el hongo se aprecian en el córtex del pelo espacios vacíos donde la queratina está ausente y gránulos de melanina. Por comparación con las observaciones de Kanbe *et al.* (1982) y Baxter *et al.* (1969) se puede inferir que el OP se encuentra bordeando a la capa cuticular.

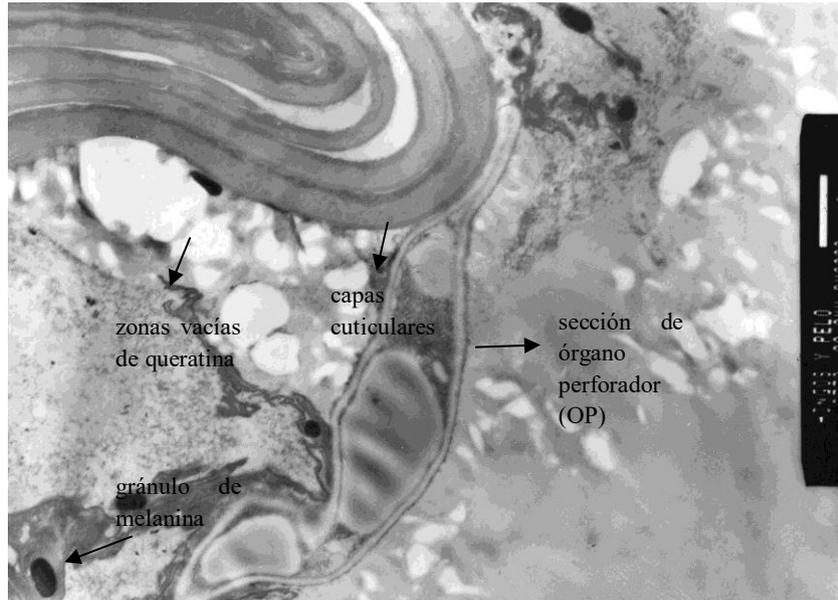


Figura 5.28 Pelo bovino (RP) colonizado por *Trichophyton ajelloi* (28 días de cultivo) (MET x 8800) (Bar 1µm)

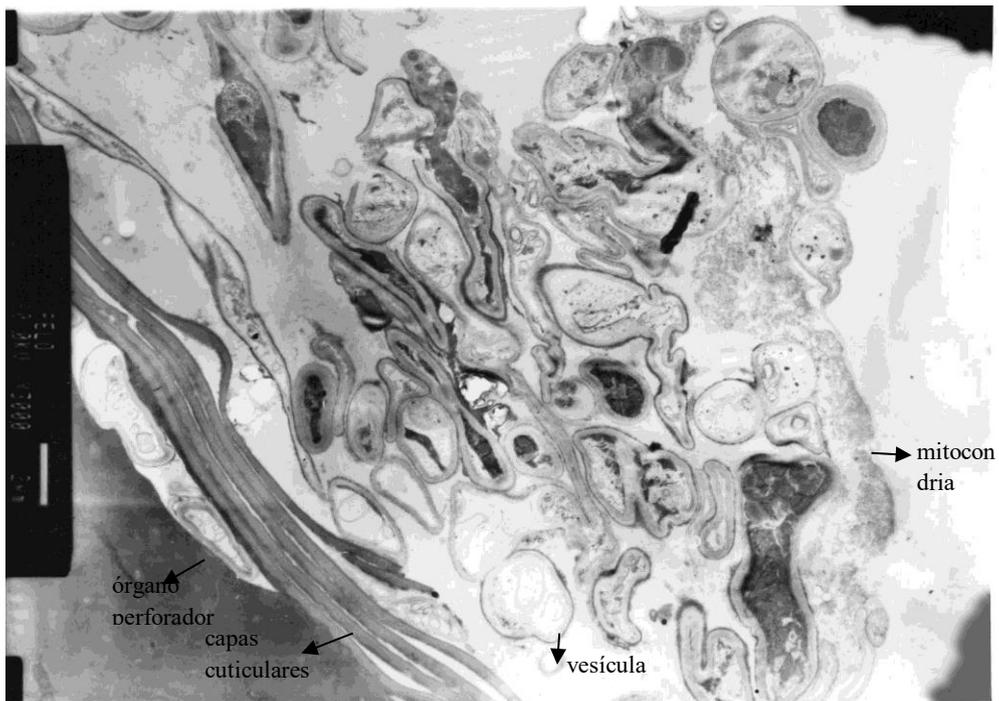


Figura 5.29 Pelo bovino (RP) colonizado por *Trichophyton ajelloi* (28 días de cultivo) (MET x3300) (Bar 1µm)

En las Figuras 5.29 y 5.30 se observan las ramificaciones del OP en forma de células hinchadas interconectadas (lomasoma), vesículas (originadas a partir de la invaginación del plasmalema) donde algunas poseen paredes rotas y otras, material electrodenso.



Figura 5.30 Pelo bovino (RP) colonizado por *Trichophyton ajelloi* (28 días de cultivo) (MET x5000) (Bar 1µm).

En la Figura 5.30 se aprecia en la parte superior central una de las capas cuticulares rota, aunque en general no presentan erosión. El córtex, por el contrario presenta sectores donde hay ausencia de material queratínico.

5.4.3. CONCLUSIONES

Las observaciones en MET complementaron las de MEB. Como lo enunciaron Baxter *et al.* (1969), el OP de *Trichophyton ajelloi* es voluminoso y por esta razón el mecanismo que predomina en la degradación es de naturaleza mecánica más que enzimática. El OP contiene numerosos gránulos ubicados sobre todo en la periferia característicos de los dermatofitos que pueden ser de glicógeno y se ubica en todos los casos estrechamente unido a la capa cuticular. La presencia de mitocondrias sugiere la síntesis enzimática (Galarza, Goya, Garro, Mercerat, Hours y Cantera, 2006).

5.5. Determinación del grado de hidrólisis del “residuo pelo” sometido a distintos tratamientos mediante Espectroscopía Dieléctrica

La propuesta y aplicación de esta metodología fue llevada a cabo en colaboración con el Dr. Andrés Salvay [Universidad de Quilmes; Instituto de Física de Líquidos y Sistemas Biológicos (IFLYSIB) CCT-CONICET La Plata].

5.5.1. Introducción

En la espectroscopía dieléctrica el medio reacciona al campo eléctrico aplicado mediante diversos mecanismos con una frecuencia característica que es inversamente

proporcional al tiempo característico del proceso. Estos mecanismos dieléctricos se pueden dividir en procesos de relajación y de resonancia.

El efecto que genera la aplicación de un campo eléctrico externo \mathbf{E} , sobre un dieléctrico es el de formar dipolos en su interior. La polarización que se produce, si suponemos un comportamiento lineal, está dada por:

$$\mathbf{P} = \chi_e \mathbf{E} \quad (1)$$

$$\text{Donde } \chi_e = \varepsilon - \varepsilon_0 \quad (2)$$

(χ_e = susceptibilidad dieléctrica; ε = permitividad dieléctrica; ε_0 = permitividad dieléctrica del vacío; la permitividad dieléctrica también es llamada constante dieléctrica pero depende del campo aplicado)

La susceptibilidad dieléctrica depende de la temperatura, la presión y la composición del dieléctrico y es independiente del tiempo. La permitividad dieléctrica del vacío comúnmente es llamada constante dieléctrica; por depender de la frecuencia del campo aplicado se evita utilizar este nombre.

Despejando (1) y reemplazando de (2):

$$\varepsilon = \varepsilon_0 + \frac{\mathbf{P}}{\mathbf{E}}$$

En el equilibrio, cuando la polarización se equilibra con el campo, las cantidades son estáticas:

$$\varepsilon_e = \varepsilon_0 + \frac{\mathbf{P}_e}{\mathbf{E}} \quad \text{A}$$

La polarización en un instante t será:

$$\mathbf{P}(t) = \mathbf{P}_\infty + \mathbf{P}_d(t) \quad (5)$$

Donde \mathbf{P}_∞ corresponde a los mecanismos instantáneos y $\mathbf{P}_d(t)$ a la orientación de los dipolos.

En el instante inicial en el que aplicamos el campo la permitividad va a estar dada por:

$$\varepsilon_\infty = \varepsilon_0 + \frac{\mathbf{P}_\infty}{\mathbf{E}}$$

Si suponemos una velocidad de polarización proporcional a su apartamiento del valor de equilibrio tendremos la siguiente ecuación diferencial que describe este comportamiento:

$$\frac{d\mathbf{P}(t)}{dt} = \frac{1}{\tau} [\mathbf{P}_e - \mathbf{P}(t)]$$

donde τ es el tiempo de relajación (tiempo en que tardan los dipolos en alinearse con el campo). En este caso se considera un único proceso de polarización.

Si ahora consideramos que el campo eléctrico aplicado tiene la forma: $E(t) = E_0 \cdot e^{i\omega t}$ podremos resolver fácilmente la ecuación anterior, proponemos que $P_d(t) = C \cdot e^{i\omega t}$

Reemplazando en (6) obtenemos la solución para la permitividad dieléctrica $\varepsilon(\omega)$:

$$\varepsilon = \varepsilon_\infty + \frac{(\varepsilon_e - \varepsilon_\infty)}{1 + i\omega\tau}$$

Con esto, podemos ver que la permitividad es una magnitud compleja. Veamos cuánto valen su parte real e imaginaria:

$$\varepsilon = \varepsilon'(\omega) - i\varepsilon''(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{(1 - i\omega\tau)(\varepsilon_e - \varepsilon_\infty)}{1 + \omega^2\tau^2} = \left(\varepsilon_\infty + \frac{(\varepsilon_e - \varepsilon_\infty)}{1 + \omega^2\tau^2} \right) - i \frac{(\varepsilon_e - \varepsilon_\infty)\omega\tau}{1 + \omega^2\tau^2}$$

De esta manera, tenemos:

$\varepsilon'(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{(\varepsilon_e - \varepsilon_\infty)}{1 + \omega^2\tau^2}$	Componente Dispersiva (real)	}	Ecuaciones de Debye (8)
$\varepsilon''(\omega) = \frac{(\varepsilon_e - \varepsilon_\infty)\omega\tau}{1 + \omega^2\tau^2}$	Componente Disipativa (imaginaria)		

Las relaciones anteriores fueron deducidas por Debye en base a consideraciones moleculares (mecánica estadística) (Salvay, Santos y Howard, 2007).

Dependiendo del rango de frecuencias en que se quiera obtener el espectro dieléctrico $\varepsilon(\omega)$ se utilizan distintos métodos para medir la permitividad dieléctrica. En el rango de bajas frecuencias (50 Hz – 13 MHz) se utiliza el puente de impedancias. Para incorporar al espectro frecuencias más altas se utiliza la espectroscopia en dominio del tiempo. El trabajar en altas frecuencias posibilita una mayor sensibilidad en la información sobre la movilidad molecular del sistema en estudio (Irastorza, 2010).

Para obtener los espectros de permitividad eléctrica en altas frecuencias se utilizó la espectroscopía en dominio del tiempo, la cual determina el espectro dieléctrico como respuesta del sistema ante un pulso eléctrico [escalón de tensión $V(t)$] que se aplica en forma de señales transitorias.

Permitividad Eléctrica

A partir de las curvas de respuesta en tiempo, mediante algoritmos, se pueden obtener las curvas de la permitividad real y compleja en función de la frecuencia : $\varepsilon'(\omega)$ y $\varepsilon''(\omega)$.

Los datos experimentales de la parte real e imaginaria de la permitividad son ajustados con las ecuaciones de Debye (8) lo que permite obtener valores de los parámetros τ (tiempo de relajación dieléctrica del sistema) y $\Delta\varepsilon = \varepsilon_0 - \varepsilon_\infty$ (incremento dieléctrico).

Cuanto mayor es la movilidad molecular es menor el tiempo de relajación porque el sistema responde mejor a la perturbación eléctrica, tiene más libertad de movimiento. Es decir, tiempos de relajación mayores indican menor movilidad del sistema o restricciones móviles.

5.5.2. Objetivos

Evaluar el cambio en la frecuencia de relajación en el espectro dieléctrico del residuo pelo sometido a distintos tratamientos: etanol, extracto crudo de un cultivo de *Trichophyton ajelloi* sobre RP, NaOH. La hipótesis es la posibilidad de observar, empleando frecuencias altas, un aumento de la frecuencia en la que se produce la relajación debido a la ruptura de enlaces químicos (peptídicos, disulfuro) producidos por la hidrólisis. Este aumento se deberá a la mayor movilidad entre las cadenas con lo que la frecuencia de relajación aumentará. Los aportes más relevantes de la aplicación de la espectroscopía dieléctrica en material biológico como pelo han empleado mediciones a baja frecuencia. Al mismo tiempo el estudio de los enlaces químicos del pelo se facilita por poseer un momento dipolar resultante nulo (sección 5.2.1) (Marzec y Kubisz, 1997; Marzec, 1998; Schwan, Schwarz, Maczuk y Pauly, 1962).

5.5.3. Materiales y métodos

Se utilizaron muestras de RP (sección 3.3.1.1) en distintas condiciones. Se hicieron cuatro series de tratamientos:

- RP sin tratamiento (M_0)
- RP lavado con etanol 96° (M_1)
- RP incubado con EC (concentración proteica 45 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) durante 5 h a 25°C y secado posterior (M_2)
- RP incubado con NaOH 1 N durante 2 h (M_3)

Posteriormente las muestras fueron expuestas a una humedad ambiente relativa de 98% durante 48 h para mejorar la señal. Las medidas del espectro $\varepsilon(\omega)$ fueron realizadas a 18°C (temperatura ambiente de laboratorio).

Para las mediciones dieléctricas se utilizó un osciloscopio Hewlett-Packard 1801 A junto con partes adicionales: Hewlett-Packard Time Domain Reflectometry (TDR) /Sampler 1815B plug in, una cabeza de muestreo HP 1106 A y un diodo túnel HP 1106 que conforman el conjunto generador de señal rápida y el adquisidor. Este equipamiento permitió obtener las señales del proceso de identificación. Se generó un escalón de tensión de 200 mV de 35 pseg de tiempo para que la señal de entrada al sistema tenga un amplio

espectro. Posteriormente la señal fue aplicada a la celda (Irastorza, 2010). El rango de frecuencia en que se realizó la medición estuvo comprendida entre 13 MHz – 5000MHz.

Como se mencionó, al utilizar “espectroscopia en dominio del tiempo”, se aplicó un pulso eléctrico al sistema y la respuesta al mismo en el tiempo determinó el espectro $\varepsilon(\omega)$. Luego, a partir de estos datos, se obtuvieron las curvas de la permitividad real y compleja en función de la frecuencia.

Por otro lado se realizó la medida de la magnitud del coeficiente de reflexión de las muestras para complementar la medida anterior, usando el Analizador de Redes Escalar (Scalar Network Analyzer, SNA) HP8711 A que mide el módulo del coeficiente de reflexión de la línea con la muestra.

5.5.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 5.31 se observa la respuesta de las muestras ante la aplicación de un pulso eléctrico en función del tiempo que da idea del grado de movilidad de sus enlaces químicos. Las muestras M_1 y M_2 no presentan diferencias respecto de M_0 . En cambio la M_3 presenta un comportamiento diferente con respecto a M_0 .

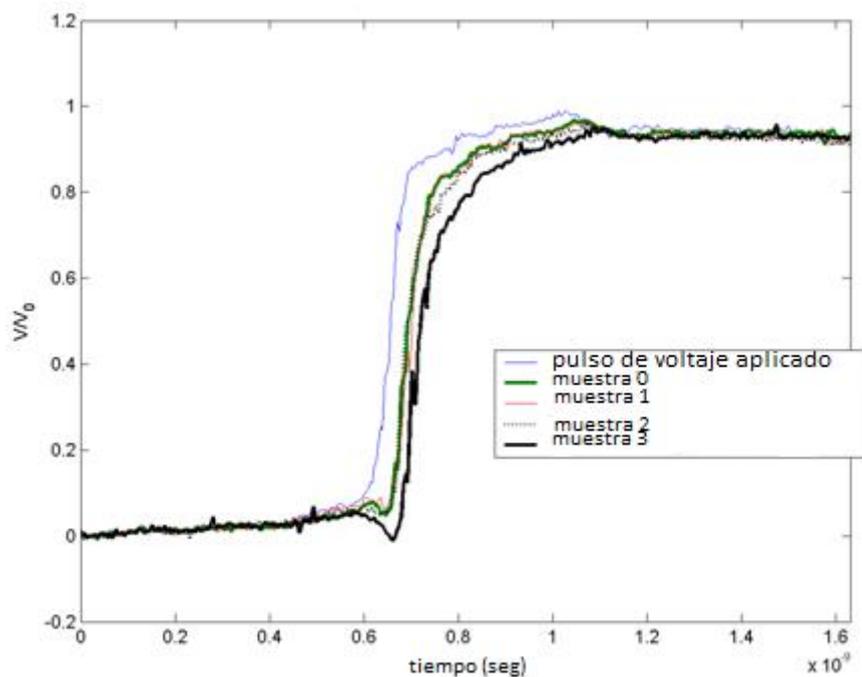


Figura 5.31 Espectro de relajación en dominio del tiempo ante un escalón de tensión (V/V_0)

La Figura 5.32 muestra la medición de la magnitud del coeficiente de reflexión en forma complementaria a la anterior. La medida en frecuencia del espectro es una validación de los datos obtenidos en tiempo. La M_3 comienza la absorción a frecuencias menores que las demás muestras, corroborando que existe una disminución de la frecuencia de relajación o un aumento en el tiempo de relajación. M_1 y M_2 se comportan del mismo modo que M_0 .

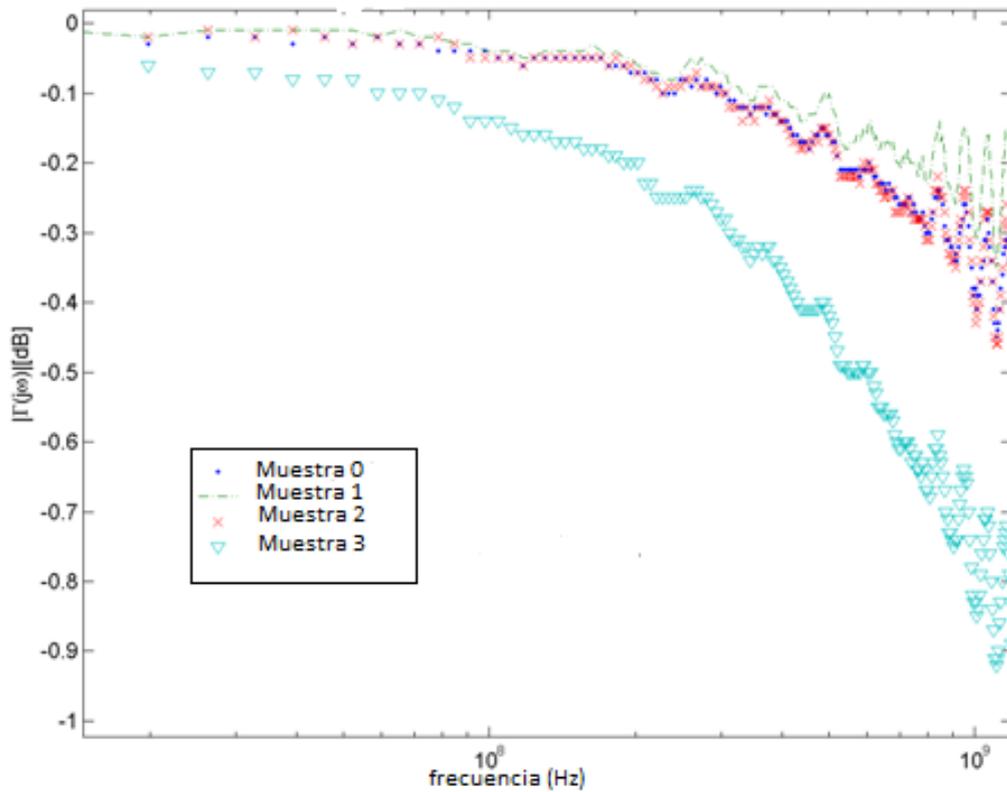


Figura 5.32. Magnitud del coeficiente de reflexión de las muestras en función de la frecuencia

En las Figuras 5.33 a 5.36 se observan la parte real e imaginaria de la permitividad $\epsilon'(\omega)$ y $\epsilon''(\omega)$ y en la Tabla 5.6 los valores de los parámetros τ (tiempo de relajación dieléctrica del sistema) y $\Delta\epsilon = \epsilon_0 - \epsilon_\infty$ (incremento dieléctrico) ajustados y calculados según las ecuaciones de Debye [ec. (8)] de las muestras M_0 y M_3 .

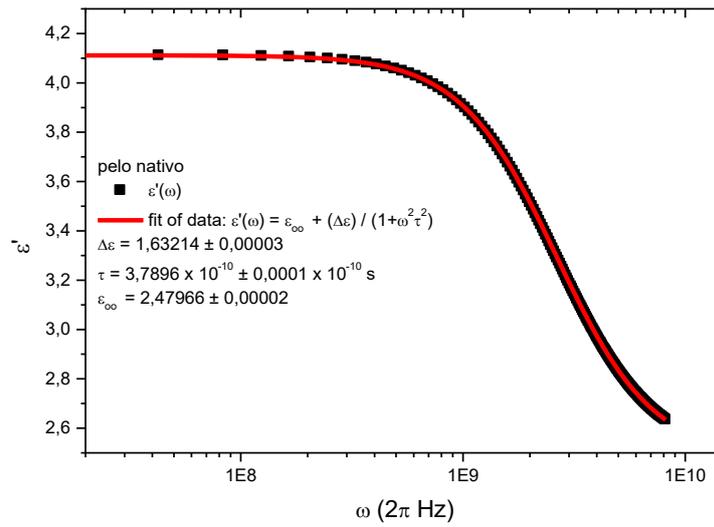


Figura 5.33 Espectro dieléctrico de la parte real de la permitividad (ϵ') en función de la frecuencia para la muestra M_0

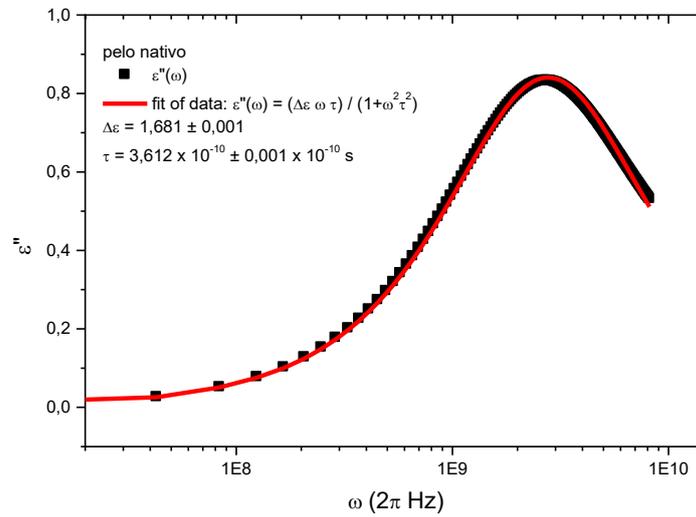


Figura 5.34 Espectro dieléctrico de la parte imaginaria de la permitividad (ϵ'') en función de la frecuencia para la muestra M_0

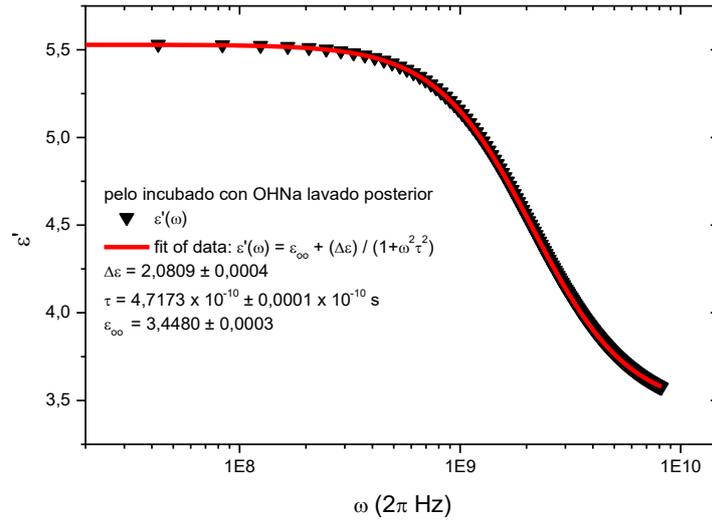


Figura 5.35 Espectro dieléctrico de la parte real de la permitividad (ϵ') en función de la frecuencia para la muestra M_3

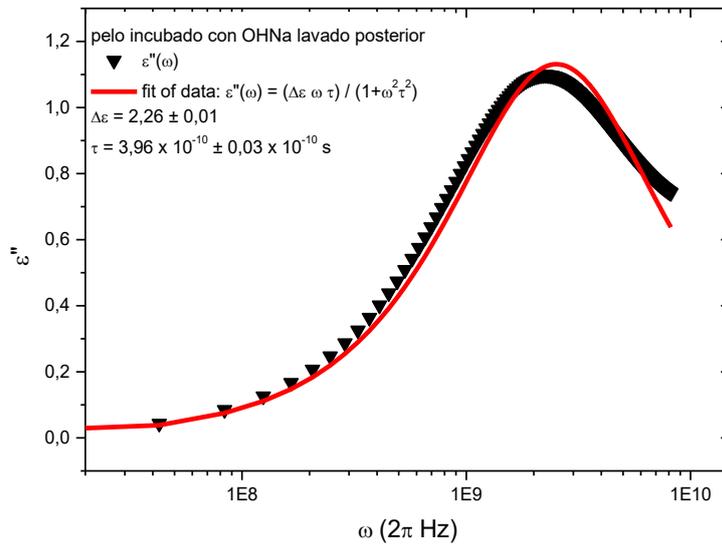


Figura 5.36 Espectro dieléctrico de la parte imaginaria de la permitividad (ϵ'') en función de la frecuencia para la muestra M_3

Tabla 5.6 Tiempos de relajación (1) y (2) (seg) e incremento dieléctrico ($\Delta\epsilon$) de las muestras de RP sometidas a los distintos tratamientos

	(1)	(2)	($\Delta\epsilon$)
RP (M_0)	3,7896 10^{-10} seg	3,612 10^{-10} seg	1,63
RP tratado con etanol (M_1)	Similar a M_0	Similar a M_0	Similar a M_0
RP tratado con EC (M_2)	Similar a M_0	Similar a M_0	Similar a M_0
RP tratado con NaOH (M_3)	4,7173 10^{-10} seg	3,96 10^{-10} seg	2,08

(1) obtenido del ajuste de datos de la permitividad real

(2) obtenido del ajuste de datos de la permitividad imaginaria

Los espectros dieléctricos de M_1 y M_2 no se muestran ya que no existió diferencia en relación a M_0 . Del análisis comparativo de las Figuras 5.33 y 5.34 con respecto las Figuras 5.35 y 5.36 se observa que la hidrólisis alcalina altera la movilidad de las uniones químicas en la queratina del RP. En la Tabla 5.6 se aprecia un aumento del tiempo de relajación y del incremento dieléctrico de M_3 en comparación con M_0 a pesar de que existe hidrólisis, contrariamente a lo que se espera: a mayor hidrólisis, mayor ruptura de enlaces químicos, menor tiempo de relajación y de incremento dieléctrico. Sin embargo este comportamiento se puede atribuir a la formación de nuevos enlaces intermoleculares que disminuyen la movilidad (sección 1.4). Cuando la piel es sometida a concentraciones bajas de álcalis previamente al depilado se produce el fenómeno de inmunización del pelo, donde la cistina de la queratina del tallo del pelo da como resultado la formación de lantionina y lisynalanina, compuestos más resistentes a la hidrólisis. Esta última se forma cuando en la inmunización se usa NaOH y $\text{Ca}(\text{OH})_2$ lo cual resulta en enlaces intermoleculares; la formación de lantionina puede explicar sólo los enlaces intramoleculares.

5.5.5. Conclusiones

Las muestras manifestaron una buena señal y resultaron ser apropiadas para las medidas en la forma en que fueron preparadas. Los resultados mostraron diferencias entre la muestra sometida a la hidrólisis alcalina del RP con respecto a la muestra sin tratamiento que pueden ser atribuidos, como se mencionó, al fenómeno de inmunización.

Con respecto a la acción enzimática y del etanol sobre el RP, no se detectaron diferencias en los espectros con respecto al RP sin tratamiento. Sería necesario aumentar el tiempo de exposición de la enzima con el RP y utilizar un EC con mayor actividad específica.

5.6. Determinación del grado de hidrólisis del “residuo pelo” mediante su contenido de cisteína-cistina

5.6.1. Introducción

La degradación de la queratina a través de la biotransformación fúngica del pelo se puede abordar mediante la determinación de cistina que constituye, a través de sus enlaces disulfuro, uno de los factores de su alta estabilidad (sección 5.2.1). Durante el proceso de sulfitolisis se postula que la cistina se convierte en cisteína por ruptura de sus puentes disulfuros (sección 3.2.2.2) (Kunert, 2000).

Entre los numerosos métodos para medir estos aminoácidos libres se pueden mencionar los espectrofotométricos de Boyer (1954) (Weary, Canby y Cawley, 1965); Smith (1977) y Brand (1930) para la detección de cistina en orina en el diagnóstico de cistinuria, que utiliza el complejo de cisteína con cianuro de sodio y nitroprusiato de sodio; Ellman (1959) y el amperométrico de Kolthoff y Stricks (1950).

5.6.2. Objetivos

Determinar el contenido de cisteína-cistina en el ultrafiltrado del EC de un cultivo de *Trichophyton ajelloi* (TA) y *Fusarium oxysporum* (FO) en sustrato sólido RP y en el propio RP colonizado e hidrolizado químicamente (sección 3.3.2.3).

5.6.3. Materiales y métodos

Determinación de cistina-cisteína

En la determinación del contenido de cisteína-cistina se usó la Norma Española (Norma Española, UNE 40-209-73, 1973) “Método de determinación colorimétrica del contenido de “cistina+cisteína” de los hidrolizados de lana” (MCC) (Galarza, Goya, Cantera, Garro, Reinoso y López, 2004). Se basa en la reducción de la unión disulfuro de la cistina mediante metabisulfito de sodio. La cisteína resultante reacciona con el ácido fosfowolfrámico y el complejo azul formado es medido a 720 nm. En ensayos anteriores se había utilizado el método de Smith sin resultados satisfactorios debido a que su intervalo de sensibilidad mide concentraciones de cistina mayores (35-60 μ moles de cistina/mol de creatinina).

El ácido fosfotúngstico ($W_{12}O_{40}H_3P$) se preparó disolviendo 200 g de tungstato de sodio ($WO_4Na_2 \cdot 2H_2O$, exento de Mo, Merck 1.06673.02509) secado en estufa a 105°C, 17 hs, en 400 ml de agua destilada. Se añadieron 100 ml de ácido fosfórico (H_3PO_4) 85% p/v y se hirvió moderadamente bajo refrigerante a reflujo durante 1 h. Se sacó el refrigerante, se añadió bromo (Br: 30202, Riedel de Hæn) gota a gota hasta obtener una coloración amarilla-oscura. Se eliminó el exceso de bromo por ebullición durante 15 min. Se enfrió, se filtró y se llevó a 1 l en matraz aforado, conservando el filtrado amarillo oscuro en un matraz coloreado.

Se preparó una solución 0,56 M de metabisulfito de sodio (disulfito) disolviendo 10,78 g de metabisulfito de sodio (Merck, Darmstadt) en agua destilada completando a 100 ml. Se conservó en oscuridad y por un período no mayor a 20 días.

Para la curva patrón de cistina se disolvieron 100 mg de cistina en 20 ml de solución concentrada de H₂SO₄ 6N y se completó el volumen con agua destilada. Se procedió de la misma manera, reduciendo con metabisulfito de sodio. El intervalo de concentraciones varió de 0,125 mg/ml a 0,5 mg/ml.

Previamente la cistina se secó en un desecador de cloruro de calcio conservándose en oscuridad.

Para aplicar la técnica colorimétrica se hizo una adaptación debido a que la sensibilidad del método es baja.

Se probaron distintas condiciones de hidrólisis del RP a fin de utilizar la más eficiente para aplicar MCC:

-Hidrólisis en medio alcalino: I. KOH 60%, a 105°C 24 h, 4% p/v (RP/KOH)

-Hidrólisis en medio ácido: I. HCl 6 M, a 110°C, 24 h, 2% p/v (RP/HCl)

(Buechler y Lollar, 1950)

II. H₂SO₄ 6 N a 105°C, 8 h p/v, 5,6% p/v (RP/
H₂SO₄) (Norma española, 1973).

Las hidrólisis se realizaron en estufa, en tubos con tapa esmerilada y rotación periódica. La hidrólisis I fue la que mayor eficiencia produjo al determinar su contenido de cistina-cisteína mediante MCC.

Para que la medida de la cistina pudiera entrar dentro del rango de la curva de calibración y poder determinar el grado de hidrólisis para los distintos tratamientos, se adicionó cistina, en experimentos por separado y se la recuperó cuantitativamente en el medio de reacción.

Determinación colorimétrica de cisteína y reductores extraños

Para esta determinación se realizó previamente la hidrólisis ácida (I) del RP inoculado proveniente de los cultivos y del RP control.

Se transfirieron 5 ml del hidrolizado en un matraz de 25 ml. Se añadieron 15 ml de solución tampón (buffer AcH-Ac⁻ pH 5,6), después 2 ml de ácido fosfotúngstico. Se agitó y se dejó reposar durante 20 o 30 min. Se completó el volumen al del matraz con agua destilada, se agitó y se midió la absorbancia a 720 nm.

Determinación colorimétrica de cistina, cisteína y reductores extraños

Para la determinación colorimétrica de cistina, cisteína y reductores extraños se transfirieron 1 ml del hidrolizado en un matraz de 25 ml. Se añadieron 5 ml de solución tampón, 1 ml de disolución de metabisulfito de sodio y 2 ml de reactivo ácido fosfotúngstico. Se agitó y se dejó reposar durante 20-30 min. Se completó el volumen al del matraz, se agitó y se midió la absorbancia a 720 nm. Se efectuaron tres determinaciones y se designó el valor medio correspondiente al valor promedio de cistina+cisteína.

Determinación de cistina-cisteína en el EC

Se procedió a la ultrafiltración del EC con membrana Amicon 8050 bajo presión de N₂ (cut-off 10 KDa, Merck, Darmstadt). Posteriormente se procedió como en la sección “determinación colorimétrica de cistina, cisteína y reductores extraños”.

5.6.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las siguientes Tablas 5.7 y 5.8 se expresan el contenido de cistina+cisteína del RP control y del inoculado con TA y FO luego de ser sometidos a hidrólisis ácida I y de los ultrafiltrados de EC de los cultivos sobre el RP con los mismo hongos, respectivamente.

Tabla 5.7 Contenido de cistina y cisteína en el RP control y en el RP inoculado proveniente de los cultivos con TA y FO sobre RP expresado en % de peso seco de RP

residuo pelo	cistina+cisteína (%)
control	0,33
inoculado, cultivado con <i>TA</i>	0,46
inoculado, cultivado con <i>FO</i>	0,49

Tabla 5.8 Contenido de cistina y cisteína en los ultrafiltrados de los EC de los cultivos de TA y FO sobre RP expresado en % de peso seco de RP

extracto crudo	cistina+cisteína (%)	cisteína (%)
<i>Trichophyton ajelloi</i>	0,19	0,01
<i>Fusarium oxysporum</i>	0,20	0,08

5.6.5. Conclusiones

Los porcentajes detectados por este método son muy bajos en relación al porcentaje del contenido de cistina-cisteína reportado en pelo bovino (sección 5.2). Al comparar las Tablas 5.7 y 5.8, en la primera se observa que los porcentajes de cisteína son mayores que los expresados en la Tabla 5.8 debido a que se suma el aporte del RP hidrolizado y de las enzimas fúngicas adsorbidas al sustrato sólido. Existen diversas razones para explicar los bajos resultados. Desde el punto de vista metodológico, la técnica no tiene mucha sensibilidad y la hidrólisis del RP no es completa como para que puedan solubilizarse todos los aminoácidos. Al mismo tiempo puede haber una pérdida de cisteína y cistina durante la hidrólisis con HCl (Inglis y Liu, 1970). Desde el punto de vista del cultivo, tanto la cisteína como la cistina pueden haber sido convertidas en

compuestos tioésteres (mecanismo de sulfitólisis, sección 3.2.2.2) o pueden haber sido consumidos por los hongos como fuente de C, N y energía para generar biomasa.

5.6.6. Referencias bibliográficas

- Ali-Shtayeh, M. y Jamous, R. (2000). Keratinophilic fungi and related dermatophytes in polluted soil and water habitats. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17, 51-59.
- Baca Ibarra, I., Sánchez-Cordero, V. y Stoner, K. (2010). Morfología del pelo en mamíferos terrestres. En V. Sánchez-Cordero (Ed.), *60 años de la Colección Nacional de Mamíferos del Instituto de Biología, UNAM, Aportaciones al conocimiento y conservación de los mamíferos mejicanos* (pp. 89-102). Ciudad de México, México: UNAM.
- Barton, P. (2011). *A Forensic Investigation of Single Human Hair Fibres using FTIR-ATR Spectroscopy and Chemometrics* (Tesis doctoral). Queensland University of Technology, Brisbane, Australia.
- Baxter, M. y Mann, P. (1969). Electron microscopic studies of the invasión of human hair *in vitro* by three keratinophilic fungi. *Sabouraudia*, 7, 33-37.
- Berg, J., Tymoczko, J. y Stryer, L. (2006). *Biochemistry*. New York, USA: W. H. Freeman and Company.
- Boyer, P. (1954). Spectrophotometric study of the reaction of protein sulfhydryl groups with organic mercurials. *Journal of the American Chemical Society*, 76 (17), 4331-4337.
- Bragulla, H. y Homberger, D. (2009). Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *Journal of Anatomy*, 214(4), 516-559.
- Brand, E., Harris, M. y Biloan, S. (1930). Cystinuria: the excretion of a cystine complex which decomposes in the urine with the liberation of free cysteine. *Journal of Biological Chemistry*, 86, 315-331.
- Buechler, P. y Lollar, R. (1950). Evidence for existence of a disulphide other than cystine in cattle epidermis. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 45, 503-512.
- Cantera, C. (2001). Hair-saving unhairing process: Part I: epidermis and the characteristics of bovine hair. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 85, 1-5.

- Devlin, T. (Ed.). (1997). Textbook of biochemistry with clinical correlations. New York, USA: Editorial Wiley- Liss.
- Ellman, G. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82, 70-79.
- English, M. (1968). The developmental morphology of the perforating organs and eroding mycelium of dermatophytes. *Sabouraudia*, 6, 218-227.
- Espinosa de los Monteros, A. & Zayas, A. (2004). Piel y anejos cutáneos. En: Gázquez Ortiz A., *Tratado de histología veterinaria* (pp. 410-412). Barcelona. España: Editorial Masson.
- Feairheller, S., Taylor, M., Windus, W., Filachione, E. y Naghski, J. (1972). Recovery and analyses of hair proteins from tannery unhairing wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 20(3), 668-670.
- Filipello Marchisio, V. (2000). Keratinophilic fungi: their role in nature and degradation of keratinic substrates. En R. Kushwaha, J. Guarro (Eds.), *Biology of Dermatophytes and other Keratinophilic Fungi* (pp. 86-92). Bilbao, España: Revista Iberoamericana de Micología.
- Fusconi, A. y Filipello-Marchisio, V. (1991). Ultrastructural aspects of the demolition of human hair *in vitro* by *Chrysosporium tropicum* Carmichael. *Mycoses*, 34 (3-4), 153-165.
- Galarza, B., Goya, L., Cantera, C., Garro, L., Reinoso, H. y López, L. (2004). Fungal biotransformation of bovine hair. Part 1: isolation of fungus with keratinolytic activity. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 88 (3), 93-98.
- Galarza, B., Goya, L., Garro, L., Mercerat, J., Hours, R. y Cantera, C. (2006). Fungal biotransformation of bovine hair part II: biomass and proteases produced as a function of incubation time. Assessment of hair waste digestion. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 90 (4), 169- 172.
- Galarza, B., Garro, L., Cavello, I., Cazau, M., Hours, R. y Cantera, C. (2007). Fungal biotransformation of bovine hair: assessment of structural changes. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 91 (6), 229-232.
- Galarza B., Garro L., Gortari C., Martegani J., Hours R. (2014). Tecnología limpia en la curtiembre; aplicación de enzimas fúngicas y su evaluación mediante Microscopio Electrónico de Barrido (MEB). En *Biotechnología Moderna Avances*. La Habana, Cuba: Elfos Scientae vol. 5, 2014.
- Garret, R. y Grishem, C. (2010). *Biochemistry*, Boston, USA: Brooks Cole, Cengage Learning.

- Gillespie, J., Haylett, T. y Lindley, H. (1968). Evidence of homology in a high-sulphur protein fraction (SCMK-B2) of wool and hair alpha-keratins. *Biochemical Journal*, 110 (2), 193-200.
- Hill P., Brantley H. y Van Dyke M. (2010). Some properties of keratin biomaterials: kerateines. *Biomaterials*, 31, 585-593.
- Hutton, R., Kerbs, S. y Yee, K. (1978). Scanning electron microscopy of experimental *Trichophyton mentagrophytes* infections in guinea pig skin. *Infection and immunity*, 21(1), 247-253.
- Inglis, A. y Liu, T. (1970). The stability of cysteine and cystine during acid hydrolysis of proteins and peptides. *The Journal of Biological Chemistry*, 254(1), 112-116.
- Irastorza, R. (2010). *Identificación de sistemas. Aplicación a la evaluación in vitro de la calidad ósea en tejido trabecular humano* (Tesis doctoral). Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.
- Jones, N. y Rivett, D. (1997). The role of 18-methyleicosanoic acid in the structure and formation of mammalian hair fibers. *Micron*, 28 (6), 469-485.
- Kanbe, T. y Tanaka, K. (1982). Ultraestructure of the invasion of human hair *in vitro* by the keratinophilic fungus *Microsporum gypseum*. *Infection and Immunity*, 38(2), 706-715.
- Kolthoff, I. y Stricks, W. (1950). Argentometric amperometric titration of cysteine and cysteine. *Journal of the American Chemical Society*, 72(5), 1952-1958. doi: 10.1021/ja01161a024.
- Kornilowicz-Kowalska, T. y Bohacz, J. (2011). Biodegradation of keratin waste: theory and practical aspects. *Waste management*, 31, 1689-1701.
- Kunert, J. y Krajčič, D. (1981). An electron microscopy microscopy study of keratin degradation by the fungus *Microsporum gypseum* in vitro. *Mykosen*, 24, 485-496.
- Kunert, J. (2000). Phisiology of keratinophilic fungi. En Kushwaha R. y Guarro J. (Ed.), *Revista Iberoamericana de Micología* (pp 77- 85). Bilbao, España: Asociación Española de Micología.
- Marzec, E. y Kubisz, L. (1997). Dielectric relaxation of air-dried horn keratin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 20, 161-165.
- Marzec, E. (1998). A comparison of dielectric relaxation of bone and keratin. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 46, 29-32.
- Mathews, C., Van Holde, K. y Ahern, K. (2002). *Biochemistry*. Boston, USA: Addison-Wesley.

- Mittola, G., Escalona, F., Salas, R., García, E. y Ledesma, A. (2002). Morphological characterization of in vitro human hair keratinolysis produced by identified wild strains of *Chrysosporium* species. *Mycopathologia*, 156, 163-169.
- Morioka, K. (2010). *Hair Follicle, differentiation under the Electron Microscope*. Tokyo, Japon: Springer-Verlag.
- Norma española (UNE 40209). (1973). Método de determinación colorimétrica del contenido de “cistina+cisteína” de los hidrolizados de lana. *Asociación Española de Normalización (AENOR)*.
- Pauling, L., Corey, R. y Branson, H. (1951). The structure of proteins: two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 37(4), 205-211. doi: 10.1073/pnas.37.4.205.
- Peckham, M. (2003). *Histology Guide*. Leeds, United Kingdom: University of Leeds. Recuperado de <https://www.histology.leeds.ac.uk/skin/hair.phpashid>.
- Rashid, A., Hodgins, M. y Richardson, M. (1996). An in vitro model of dermatophyte invasion of the human hair follicle. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 34 (1), 37-42.
- Rogers, G. (2019). Known and unknown features of hair cuticle structure: a brief review. *Cosmetics*, 6, 32, 2-8. doi:10.3390/cosmetics6020032.
- Salvay, A., Santos, J. y Howard, E. (2007). Electro-optical properties characterization of fish type III antifreeze protein. *Journal of Biological Physics*, 33, 389-397. doi 10.1007/s10867-008-9080-5.
- Sarmiento, P., Garro, L., Galarza, B. y Hours, R. (2017). Metodología para la observación de pelo bovino colonizado por deuteromycetes mediante microscopía electrónica de barrido. En C. Lariot Sánchez (Presidencia), *XIV Congreso del Comité Interamericano de Sociedades de Microscopía*. CIASEM, Varadero, Cuba.
- Schwan, H., Schwarz, H., Maczuk, J. y Pauly, H. (1962). On the low-frequency dielectric dispersion of colloidal particles in electrolyte solution. *The Journal of Physical Chemistry B*, 66(12):2626-2635.
- Smith, A. (1977). Evaluation of nitroprusside test for the diagnosis of cystinuria. *The Medical Journal of Australia*, 2(5), 153-155.
- Voet D. y Voet, J. (2011). *Biochemistry*. New Jersey, USA: John Wiley & Sons.
- Weary P., Canby C. y Cawley E. (1965). Keratinolytic activity of *Microsporum canis* and *Microsporum gypseum*. *The Journal of Investigative Dermatology*, 44 (5), 300-309.

- Wilson, A., Dodson, H., Janaway, R.C., Pollardà A.M. y Tobin, D. (2007). Selective biodegradation in hair shafts derived from archaeological, forensic and experimental contexts. *British Journal of Dermatology*, 157, 450-457.
- Zubay, G., Parson, W. y Vance, D. (1995). *Principles of Biochemistry*. Iowa, USA: Wm. C. Brown).

Capítulo 6

Aplicación de enzimas queratinolíticas a los procesos de ribera

6.1 Resumen

El pool enzimático de *Trichophyton ajelloi* fue aplicado en distintas etapas del proceso de ribera a escala laboratorio, principalmente como agente depilante. Los cambios a nivel histológico fueron analizados con microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido (Galarza *et al.*, 2014; Galarza *et al.*, 2016; Garro *et al.*, 2019).

6.2 Introducción

Aspectos generales del proceso de curtido

El proceso de curtido de la piel para transformarla en cuero consta de varias etapas de acuerdo al siguiente esquema (Figura 6.1).

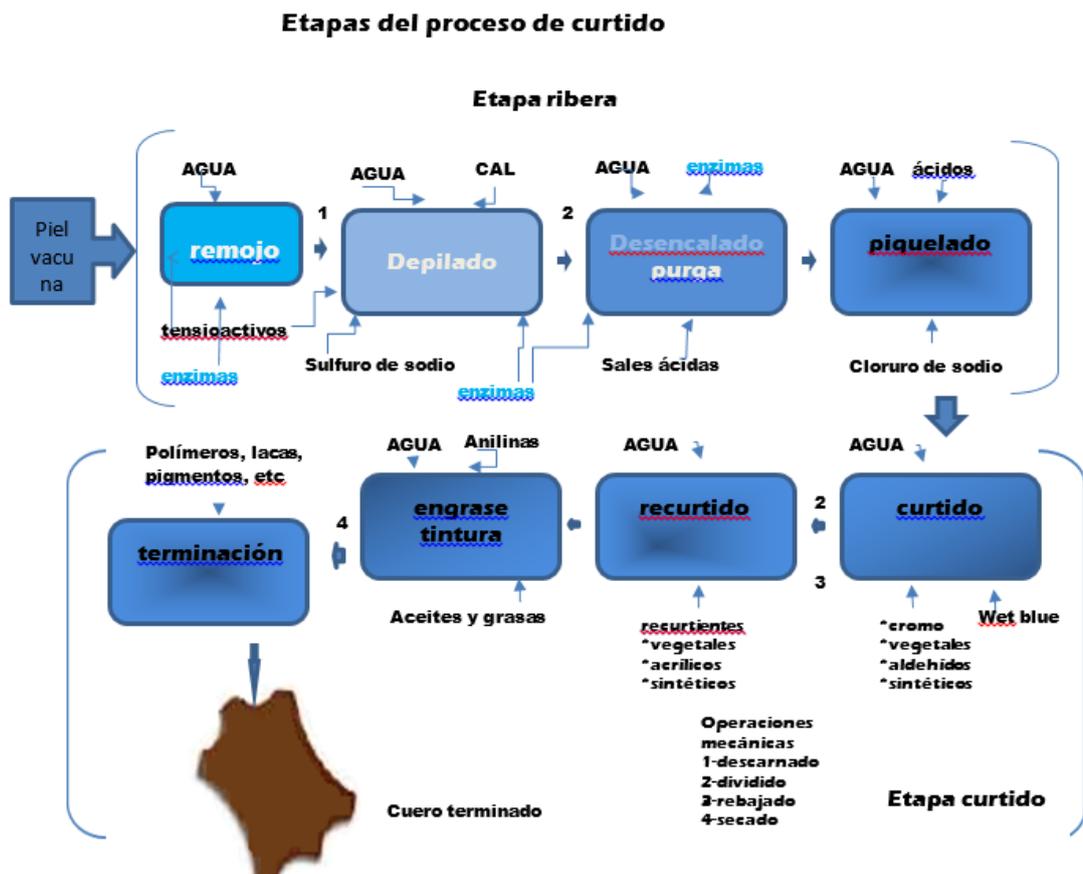


Figura 6.1 Etapas del proceso de curtido: parte superior: área ribera; parte inferior: área curtido (Angelinetti y Cantera, 1978)

6.2.1 Definición de “cuero”

Es un producto derivado de la piel animal en el cual el colágeno de la dermis de los vertebrados es estabilizado químicamente. Si bien cualquier piel de vertebrado puede convertirse en cuero, las más utilizadas para este fin son las de bovino, ovino y caprino. Se trata de un material de características distintas a las de la piel original (Garro, 2012; Thorstensen, 1976).

En la Figura 6.1 se pueden observar dos áreas del proceso: área ribera (planta húmeda) y área curtido (planta seca).

6.2.2 Procesos que ocurren en el área ribera

Remojo

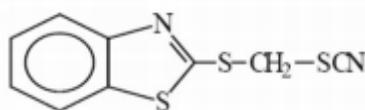
El estado en el que proviene la piel del frigorífico (fresca, salada, congelada, seca en el caso de manufactura artesanal) determina el tipo de tratamiento que se aplica en el remojo.

En esta etapa se busca:

- Devolver el estado de flaccidez e hidratación inicial de la piel.
- Lograr la disolución de las sales y proteínas globulares que causan “efectos cementantes” sobre las pieles y disminuir los daños físicos por las flexiones a las que son sometidas en los fulones.
- Favorecer o coadyuvar a la penetración de reactivos químicos.
- Ejercer una acción liotrópica sobre la fibra que asegure un mejor comportamiento de la piel en los procesos siguientes; esta etapa se realiza de pH neutro a ligeramente alcalino.

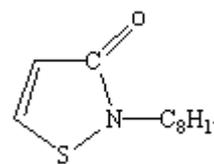
Reactivos utilizados:

- **Tensioactivos:** de distinta naturaleza, ejercen un efecto humectante e hidrotópico, reducen la tensión superficial, disuelven las grasas naturales y favorecen la hidratación. Se utilizan: ésteres sulfúricos aromáticos o alifáticos, compuestos hidroaromáticos, aminas alifáticas o aromáticas y sus sales, ésteres poliglicólicos y sus derivados polioxietilenados.
- **Enzimas proteolíticas,** que aflojan y abren la estructura, favoreciendo la limpieza de la piel por remoción de proteínas no fibrosas insolubilizadas. Pueden ser de origen pancreático, bacteriano, con actividad a pH alcalino, con o sin adición de sales amoniacales y bisulfito de sodio, en solución salina de NaCl (máximo 10 g/l, menor a 5%).
- **Bactericidas o biocidas** para evitar la descomposición de la piel por el desarrollo bacteriano como TCMTB (2-tiocianometil-tio-benzotiazol) (Fig. 6.2), OIT (2-n-Octyl-4-isotiazolin-3-ona) (Fig. 6.3) o glutaraldehído. Se emplean a dosis de 0,2% de piel húmeda.



TCMTB

Figura 6.2: estructura química del biocida 2-tiocianometil-tio-benzotiazol



OIT

Figura 6.3: estructura química del 2-n-Octyl-4-isotiazolin-3-ona

- Ácidos o bases que favorecen el hinchamiento y la hidratación. Si la humedad inicial de la piel no supera el 30%, se utilizan a pH 5-9. Los álcalis se emplean a pH 9-10: NaOH 1- 1,5 g/l o Na₂CO₃ 1-1,5 g/l para no producir la inmunización del pelo. En el caso de usar ácidos, se utilizan ácidos débiles como el ácido fórmico o sales ácidas de polifosfatos sódicos.
- Agentes liotrópicos que favorecen el hinchamiento como las sales ácidas de polifosfatos sódicos.

Variables del proceso:

- Tiempo y temperatura: están condicionados al desarrollo bacteriano y a los tiempos de producción manejados de acuerdo al grado de hidratación inicial de la piel. Si las pieles son frescas la duración varía entre 4-6 h (40-45% humedad inicial) a 2 días (10% de humedad inicial). La temperatura de elección es de 20-25°C, si es mayor debe existir un control estricto.
- Agitación: depende del mecanismo utilizado; se emplean aspas, fulones de rotación lenta (2-4 rpm), mixers o hagspiel.
- Relación piel/agua: una piel remojada adecuadamente debe tener 65% de agua, dependiendo del grado de hidratación inicial. Si está seca, la relación piel/agua es 1:5-1:8; si es salada y se utiliza el equipo de aspas, 1:3-1:5, en el caso del fulón, 1:1,3-1:2 (Angelinetti *et al.*, 1978).

Descarnado

El objetivo es la remoción de restos de grasa, carne y tegumento. Es una operación mecánica que se logra mediante distintos sistemas entre los que se pueden mencionar: descarnadora de rodillo, disco de descarnado, banco de descarnado. Opcionalmente puede realizarse luego del depilado.

Depilado-apelambrado

Este proceso tiene la finalidad de eliminar el pelo y la epidermis y lograr la saponificación de las grasas naturales con el objetivo de “purificar” el colágeno, para el acondicionamiento físico-químico de la piel para el curtido (hinchamiento). De esta manera se busca otorgar al producto “cuero” final los estándares de calidad apropiados

del mercado.

Para este proceso existen distintas alternativas tecnológicas de acuerdo a los agentes químicos empleados, sus concentraciones y su secuencia de acción:

➤ el depilado “tradicional destructor” del pelo a base de sulfuro de sodio y cal, que genera alta contaminación en términos de DQO, DBO, sólidos suspendidos sedimentables y de gas sulfhídrico.

➤ el depilado “conservador del pelo” en base a un proceso de inmunización alcalina (sección 1.4) que disminuye en un alto porcentaje los parámetros de contaminación del depilado tradicional.

Ambos se desarrollan a pH 12-14. A su vez en cada una de estas modalidades puede estar reemplazado total o parcialmente el sulfuro de sodio por enzimas queratinolítico- proteolíticas con actividad a pH alcalino (depilado asistido con enzimas), proceso que reduce la emisión del gas sulfhídrico. El depilado se desarrolla en forma más extensa en la sección 6.2.4.

Dividido

Se divide el espesor de la piel para obtener un lado “flor” y un lado “carne”, mediante una máquina de dividir. Esta operación también se puede realizar luego del curtido.

Desencalado y purga

Se quita la cal del medio mediante sales de amonio (sulfato y cloruros) o metabisufito de sodio, que bajan el pH a aproximadamente 8. Posteriormente se favorece la rehidratación de la piel luego del dividido mediante tensioactivos. En el proceso de purga o rendido se utilizan enzimas comerciales de diversos orígenes (pancreático, fúngico, bacteriano) con actividad proteolítica para realizar una limpieza de la flor (restos de epidermis y pelo) y aflojar la estructura de la piel.

Piquelado

Se prepara la piel para el curtido, regulando el pH de acuerdo al curtiente a utilizar (pH 1,8 a 3,5) y al mismo tiempo para conservarla. Se utiliza NaCl (en 5-8% del peso de la piel desencalada-rendida), ácidos débiles o fuertes, inorgánicos (formiato de sodio, ácido sulfúrico) u orgánicos que permiten liberar los restos de calcio unido al colágeno, aceites como pre-engrase y aldehídos modificados. En la práctica se realiza en forma simultánea en el mismo baño del curtido.

6.2.3 Procesos que ocurren en el área de curtido

Las etapas que continúan a los procesos del área ribera involucran el curtido, el recurtido, el engrase, la tintura y finalmente la terminación del cuero mediante la

aplicación de lacas, pigmentos, polímeros, según las aplicaciones posteriores en que va a ser utilizado.

Curtido

El colágeno es estabilizado mediante: sustancias orgánicas naturales (extractos vegetales, como taninos de acacia, mimosa, quebracho, castaño), sintéticos (aldehídos, quinonas, parafinas sulfocloradas, resinas), curtientes inorgánicos oleosos, sales inorgánicas que liberan metales en la piel formando compuestos de coordinación muy estables (sales de cromo, aluminio, zirconio, silicio, hierro, titanio) en presencia de aceites. El pH disminuye al principio del proceso y luego una vez que el curtiente ha penetrado en la piel, se eleva el pH mediante agentes basificantes para que los metales u otros se fijen al colágeno. Al término de este proceso, la piel convertida en tripa es conocida como “*wet blue*” y posee ciertas características tales como: estabilidad frente a la degradación enzimática, aumento de la resistencia frente a productos químicos, aumento de la temperatura de encogimiento y de la estabilidad en agua caliente, disminución o anulación de la capacidad de hinchamiento, aumento de las propiedades de resistencia, disminución de la densidad por el aislamiento de las fibras, disminución de la deformabilidad, disminución del encogimiento en volumen, superficie y grosor, aumento de la porosidad de las fibras de colágeno. La gran estabilidad térmica proporcionada por la curtición al cromo en la estructura del colágeno es debida a la formación de enlaces de coordinación de sus átomos con los grupos carboxílicos ionizados de las cadenas laterales de dos cadenas proteicas próximas. Cuando el pH aumenta durante la curtición mediante agentes basificantes como MgO, un mayor número de iones OH⁻ penetra en el complejo, la reactividad de la proteína se incrementa y tiene lugar la reacción de curtición. Al término de la basificación, la basicidad del complejo es alta y los iones SO₄²⁻ de la sal básica de cromo son parcialmente desplazados del complejo al igual que otros iones enmascarantes presentes, a medida que la proteína aumenta su afinidad por los complejos de cromo (Córdova *et al.*, 2013). Las moléculas de cromo al encontrarse en las capas interiores de la piel fijadas al colágeno se unen entre sí y dan estabilidad al cuero (Vargas Doria Medina y Amurrio Derpic, 2017).

6.2.4 Mecanismos en la depilación

La pérdida del folículo piloso y pelo de la piel está basado en la ruptura del puente disulfuro del aminoácido cistina de la queratina de la epidermis, folículo piloso y pelo. La descripción del fenómeno se ha abordado desde distintas disciplinas, entre ellas, la de la curtiembre (desplazamiento nucleofílico) y otra relacionada a la acción de los hongos queratinolíticos, en especial dermatofitos (sulfitolisis).

6.2.4.1 Desde el punto de vista de la curtiembre: mecanismo de desplazamiento nucleofílico

Desde el punto de vista de la curtiembre, el mecanismo propuesto por Windus y

Showell (1968) propone que el clivaje de los puentes disulfuro está producido por el desplazamiento nucleofílico en lugar de un mecanismo de óxido-reducción, constituyendo una etapa clave en el proceso. Esta reacción de desplazamiento es aplicable a los distintos agentes depilantes (mercaptanos, sulfuros, sulfitos, aminos).

Ejemplo del anión sulfito



En este caso el anión sulfito desplaza a un grupo sulfito unido. El desplazamiento nucleofílico de un tioanión a partir del S mediante un nucleófilo tiene mayor afinidad por el azufre que el tioanión desplazado.

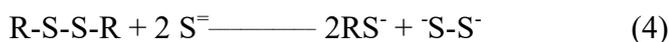
Sin embargo el caso del anión sulfito es un caso borderline ya que si se emplea sulfito de sodio, es difícil discriminar si el depilado se produce por el anión sulfito o por el incremento en la alcalinidad resultante de la reacción entre la sal de sodio con $Ca(OH)_2$ para dar NaOH.

Ejemplo del anión sulfuro

En este caso el desplazamiento nucleofílico se produce en dos etapas que para el caso del ión sulfuro se lo interpreta:



La suma de ambas da:



El agente depilante en este caso es el sulfuro, requiriendo una concentración crítica por debajo de la cual no depila. La relación SH^-/S^- depende del pH. Está demostrado que a $pH < 12$, no hay efecto depilante, razón por la cual no se puede depilar sólo con soluciones de sulfhidrato de sodio ($pH < 12$ en su solución acuosa). Al mismo tiempo la presencia de cal regula el pH dentro del rango 12,0-12,5, acondicionando la piel y asegurando el entorno alcalino.

Los iones alcalinos como Na^+ y Ca^{+2} solubilizan a los mercaptanos, por lo que es importante su presencia. En la formación de residuos cisteínicos, la solubilidad se ve incrementada por su conversión a mercaptanos de Na y Ca.

La solubilidad de la epidermis está incrementada por un alto contenido de cisteína en relación al contenido de cistina total que existe en el pelo.

El pelo es disuelto mediante Na_2S en ausencia de cal. Esto no es una contradicción ya que una solución de Na_2S tiene un pH elevado en contraste con una solución de

sulfhidrato que en ausencia de cal tiene un pH < 12.

El pelo se puede disolver también en concentraciones altas de NaOH. En el “depilado conservador del pelo” puede ser destruido o preservado, dependiendo de la concentración usada (sección 1.4).



Esta reacción ocurre en menor medida o no ocurre en el depilado comercial ya que el NaOH es un débil S-nucleófilo y la concentración del álcali es baja.

Ejemplo de la acción de tioles

Muchos tioles son activos aunque los tioles alifáticos simples tales como el butyltiol o el ácido tioglicólico son más activos.

A pesar del desagradable olor de los tioles, el tioglicolato de calcio desplazó el sulfuro de calcio como agente depilatorio axilar y es el ingrediente activo para el ondulado permanente del pelo.

En este mecanismo un tiol desplaza a otro tiol:



La suma sería:



La reacción se basa en el desplazamiento provocado por un anión tiol que es más básico o nucleofílico que el tiol que es desplazado.

Además el mercaptano o sulfhidrato de calcio incrementa la solubilidad de los fragmentos de epidermis sin aparente cambio del pelo en el proceso “conservador del pelo”.

Caso de la cisteína y el glutatión

Por otro lado la cisteína y el glutatión reducido aceleran el depilado. El anión cisteinyl ($\text{HOOC.CH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{S}^-$) es particularmente interesante ya que acelera el depilado por sí mismo. La unión disulfuro entre las cadenas polipeptídicas se rompe originando un residuo cisteinyl que termina en un grupo tiol. El catión Ca^{+2} incrementa la solubilidad del tiol y ayuda al depilado mediante la formación del sulfhidrato de Ca o mercaptano de Ca. Este clivaje no sorprende si se tiene en cuenta que el anión sulfito en el cual el S es un isótopo, desplaza el grupo sulfito en el tiosulfato (Windus *et al.*, 1968).

El hecho de que los tioles aromáticos no sean agentes depilantes está claro con este mecanismo de desplazamiento ya que cambios relativamente pequeños en la S-

nucleofilicidad pueden causar la diferencia entre el pelo no depilado y el depilado.

Ejemplo de la acción de las aminas

En el caso de la dimetilamina, una amina secundaria podría estar actuando como agente depilante mediante la siguiente reacción:



Fuerza de acción depilatoria

La actividad de agentes depilantes de acuerdo a Windus *et al.* (1968) se puede ordenar en orden decreciente de la siguiente manera: $S^- > RS^- \text{tiol} > CN^- > (CH_3)_2NH$ dimetilamina $> S_2O_4^{2-}$ (ditionato), $OH^- > SO_3^{2-} > S_2O_3^{2-}$.

Los tres primeros manifiestan mayor poder depilante y son capaces de disolver el pelo cuando son usados en cantidades moderadas con $Ca(OH)_2$; con la dimetilamina se puede lograr un depilado destructor del pelo en combinación con NaOH pero no con $Ca(OH)_2$, el ión ditionato no disuelve el pelo, el OH^- es débilmente nucleofílico y los aniones sulfito y tiosulfato no se emplean en la práctica como agentes depilantes (Angelinetti *et al.*, 1978).

Potencial de reducción

Según Windus *et al.* (1968), Vago en 1937 fue el primero en enfatizar la importancia del potencial de reducción (E) en el depilado. Postuló que un valor de E de -0,3 a -0,4 volt es el valor mínimo para que un componente sea un agente depilante. Por ejemplo en el caso de una solución de Na_2S este parámetro es de -0,56 volt mientras que otros casos como Na_2Se con un potencial de -0,75 volt y el Na_2Te con -0,91 volt también fueron usados como agentes depilantes. En el caso de la descomposición de la queratina existe un paralelismo con el mecanismo de la digestión de la lana en la *Tineola bisselliella* (polilla de la lana) donde las condiciones de su sistema digestivo son altamente alcalinos (pH 10) y fuertemente reductoras (E -0,25 volt) (Mathison, 1964). Waterhouse (1957) al estudiar el mismo mecanismo en la larva de *Tineola larvae* encontró que su sistema digestivo tenía cistina unida a NAD, que pasaba a cisteína y glutatión reductasa.

Goddard y Michaelis (1934) fueron unos de los primeros en demostrar que los agentes reductores tales como el ácido tioglicólico, cianuro de potasio, sulfuro de sodio y sulfito de sodio podían disolver la queratina en medio alcalino debido a la ruptura del enlace R-S-S-R. Postularon que la acción del sulfuro de sodio sobre la queratina no era idéntica a la que ejerce sobre los disulfuros simples, en cambio era análoga a la acción del sulfito sobre la cisteína formándose polisulfuro (H_2S_2). Ésta puede ser una de las causas por las que los agentes reductores favorecen la actividad enzimática de las queratinasas (Kunert, 1992).

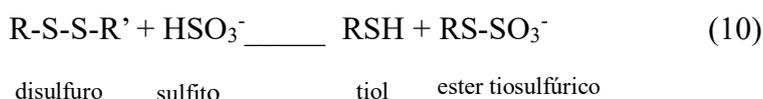
Acción en epidermis

En relación al depilado propiamente dicho (remoción del pelo y la epidermis) la mayor dificultad se presenta al atacar el puente disulfuro de la queratina del pelo, a diferencia de la que compone la epidermis y la raíz del pelo que además de contener el residuo de cistina posee un alto porcentaje de residuos cisteína (R-SH) más fácilmente hidrolizables en medio alcalino. Esto ocurre principalmente en las capas más internas en formación de la epidermis de “prequeratina” o queratina joven.

Es por esta razón que cuando se desea depilar en tiempos cortos (5-12 h) es imprescindible emplear agentes nucleofílicos para lograr un buen depilado. De otra manera el aflojamiento de la epidermis y el pelo por acción alcalina (cal, en ausencia de sulfuro) puede llevarse a cabo sólo en un tiempo considerablemente mayor de hasta una semana, modificándose las propiedades del cuero final.

6.2.4.2 Desde el punto de vista de la queratinólisis: mecanismo de sulfitólisis

En el mecanismo de sulfitólisis (sección 3.2.2.2) (Kunert, 1972; Kunert, 1989; Kunert, 1995; Ruffin y Biserte, 1976a; Ruffin, Andrieu, Biguet y Biserte, 1976b; Torchinsky 1981) el puente disulfuro de la cistina es escindido mediante la siguiente reacción:



Se puede interpretar que la sulfitólisis es un mecanismo particular de desplazamiento nucleofílico por medio del anión sulfito que se produce en el caso de los hongos dermatofitos en su ataque a la queratina. Esta teoría toma en cuenta la degradación de la queratina a partir de fuentes naturales (detritos de animales) debida fundamentalmente a microorganismos del suelo. Como se mencionó en la sección 3.2.2.2, las enzimas específicas implicadas en este mecanismo o proceso de “sulfitólisis” son las llamadas “queratinasas” descritas en las secciones 4.2.2 y 3.2.1.

Mecanismos posteriores al ataque del puente disulfuro de la cistina en el efecto depilatorio

Como se mencionó, una vez que la sulfitólisis ha vulnerado la estructura compacta de la queratina por medio de las queratinasas, las uniones peptídicas serían escindidas por proteasas. Dentro de éstas, se postula que las endopeptidasas principalmente ejercerían un efecto depilatorio que depende de la ruptura de uniones peptídicas, siendo la capa flor de la dermis de la piel la que impone el límite a una acción proteolítica más intensa (Yates, 1972). Por ejemplo, la pronasa, proteasa con especificidad de amplio rango expresada por *Streptomyces griseus* tiene alta actividad depilante mientras que la tripsina cuyo sitio de acción es a nivel de las uniones peptídicas entre residuos de arginina y lisina, tiene escasa actividad (Cantera *et al.*, 2004).

6.2.5 Composición y estructura de la piel

La piel, el órgano más extenso de los mamíferos, está compuesto por la epidermis, la lámina basal, la dermis y los anexos cutáneos (pelo, folículo piloso, músculo erector del pelo, glándulas sebáceas, sudoríparas, circumanales, mamaria, uñas, cuernos, cascos).

Entre sus funciones se pueden mencionar las siguientes: evitar la deshidratación, actuar en la termorregulación mediante mecanismos de disipación del calor como la sudoración y la vasodilatación o de aislamiento térmico mediante el panículo adiposo y el pelaje, la recepción de estímulos, sintetizar vitamina D, almacenar sustancias especialmente lípidos (Espinosa de los Monteros y Zayas, 2004), proteger contra la injuria mecánica, los agentes nocivos y la irradiación, permitir que ciertas sustancias atraviesen la barrera epidérmica. Además posee funciones inmunológicas a través de las células de Langerhans, células dendríticas dermales, macrófagos residentes, linfocitos residentes, queratinocitos, fibroblastos, unidades microvasculares dermales y ganglios linfáticos regionales e interviene en el metabolismo de sus componentes constitutivos como la queratina, el colágeno, la melanina, los lípidos y los carbohidratos (Monteiro-Rivière, 2006). Filogenéticamente está formada por células de diferentes orígenes: ectodérmicas: queratinocitos, de la cresta neural, como los melanocitos y mesodérmicas como las células de Langerhans y los elementos celulares dérmicos.

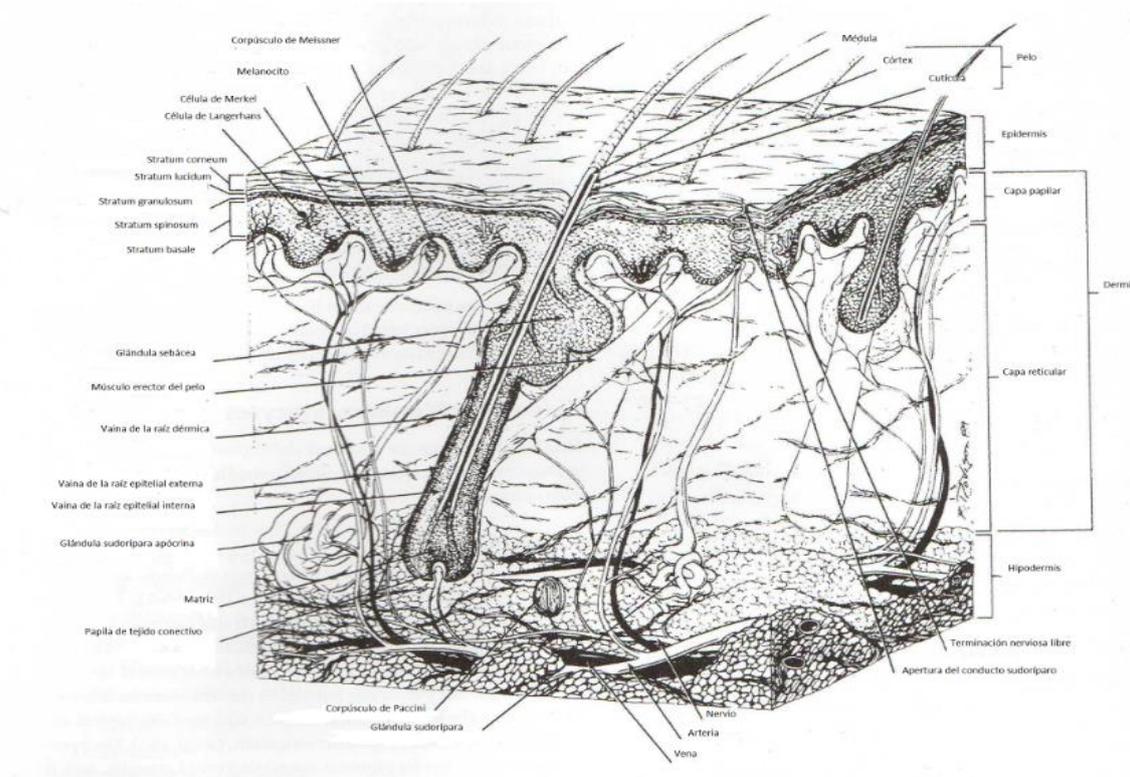


Figura 6.4 Representación típica de la estructura del integumento de la piel del mamífero (Monteiro-Rivière, 2006)

6.2.5.1 Capas de la piel

6.2.5.1.1 Epidermis

La capa externa de la piel es un epitelio estratificado plano queratinizado de origen ectodérmico. El 85-90% de las células de la epidermis se corresponden con los queratinocitos. Éstos se originan por la división continua de células madres situadas en la capa basal del epitelio, mitóticamente activas. Las células recién formadas se desplazan hacia la superficie a medida que continúa la generación de nuevas células en la capa basal. En su tránsito hacia la superficie los queratinocitos aumentan su tamaño y se diferencian al tiempo que acumulan en su citoplasma cantidades crecientes de queratina, con un rango de peso molecular de 40000-68000 Da. Los haces de queratina van ocupando por completo el citoplasma del queratinocito al tiempo que el núcleo y las organelas celulares han degenerado. Estas células muertas y con aspecto escamoso se desprenden y son descamadas de forma continua en la superficie de la epidermis. Estos procesos se denominan queratinización y cornificación (Espinosa de los Monteros *et al.*, 2004).

En la epidermis se distinguen distintas capas celulares desde el interior hacia el exterior: *stratum basale*, formado por células cúbicas unidas entre sí por desmosomas y unidas a la lámina basal por hemidesmosomas. Los desmosomas deben su capacidad de unión a moléculas de adhesión pertenecientes a la familia de las cadherinas: desmocolina y desmogleína en dominios citosólicos que interactúan con proteínas adaptadoras formando placas características (placofilina y placoglobina). A partir de los desmosomas parten tonofibrillas que constituyen parte de su citoesqueleto compuesto por queratinocitos expresando citoqueratina ácida 14 (tipo I) y citoqueratina básica (tipo II) (Alberts *et al.*, 2005).

A continuación, el *stratum spinosum* y el *stratum granulosum* están compuestos por queratinocitos, cuya actividad mitótica disminuye a medida que las capas se acercan a la periferia y por gránulos de secreción “laminados” que liberan por exocitosis proteínas como involucrina y lorícina. Estas proteínas se unen covalentemente a la membrana plasmática mediante enzimas transglutaminasas (E, K, C). En el proceso de queratinización, los queratinocitos del *stratum spinosum* secretan tetrámeros de queratina del tipo I y II que se unen mediante las proteínas tricohialina y la filagrina (producidas por los gránulos de queratohialina) y forman protofilamentos. Éstos a su vez se convierten en protofibrillas o tonofilamentos mediante la unión de un tetrámero. Finalmente en el *stratum granulosum* se forman las fibras de queratina a partir de la unión de 4 protofibrillas, originando tonofibrillas o citoqueratina (Honeyman, 2009) (Fig. 6.5).

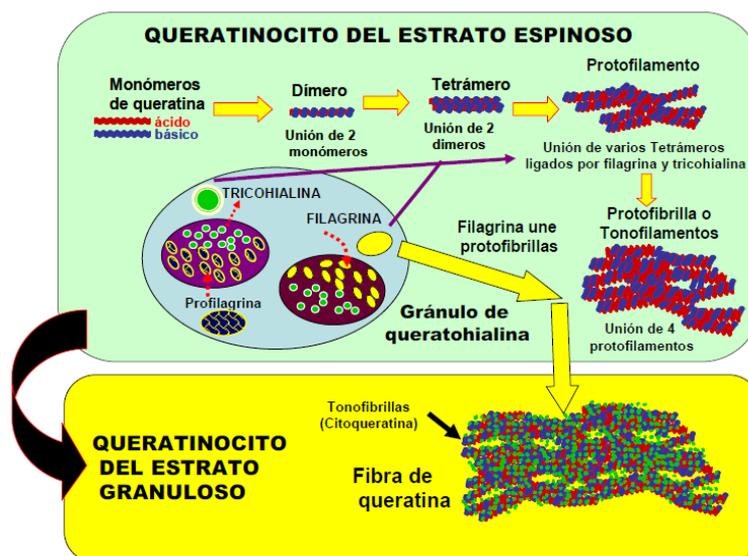


Figura 6.5 Esquema del proceso de queratinización (Honeyman, 2009).

El *stratum lucidum*, por debajo del *stratum corneum* se encuentra sólo en las regiones de la piel más gruesas como almohadillas plantares o plano nasal.

El *stratum corneum*, el estrato más externo, es el producto final de la diferenciación epidérmica y el proceso de queratinización el cual consiste en células ricas en queratina y queratohialina rodeada por una membrana plasmática cubierta por una matriz lipídica exterior. Estas células desvitalizadas, eosinófilas, anucleadas, sin orgánulos citoplasmáticos, sin membrana plasmática se disponen en 10 a 12 capas rodeadas de una masa insoluble hidrófoba, rica en lípidos, a la manera de ladrillos inmersos en un mortero, totalmente cornificadas que reciben el nombre de corneocitos (Frappier, 2006). Durante el proceso de cornificación, los queratinocitos pierden sus núcleos, se aplanan, descargan lípidos por exocitosis en el espacio intercelular formando láminas y llenándose de filamentos de queratina. Estos productos de secreción van a formar finalmente la envoltura córnea o *stratum corneum*. Desde el punto de vista del depilado enzimático, el *stratum corneum*, a través de su compleja estructura lipídica, constituye una barrera para la difusión de las enzimas vía la capa de epidermis (Garro, Barbeito, Mario, Galarza y Cantera, 2008).

6.2.5.1.2 Dermis

La dermis, de origen mesodérmico, designada también como “corium” se compone de un tejido conectivo con abundante vascularización e inervación que sirve de soporte a la epidermis y se continúa en profundidad con los tejidos subcutáneos. Descansa sobre un tejido subcutáneo o hipodermis que sujeta la dermis al músculo o al hueso subyacente y está compuesta por un entramado de fibras de colágeno, reticulares y elásticas que permiten la flexibilidad de la piel y el movimiento libre sobre las estructuras subyacentes. La sustancia fundamental amorfa que la constituye está formada por fibras

de colágeno, glucosaminoglicanos y proteoglicanos, células dendríticas dermales y células cebadas. En menor proporción, se encuentran linfocitos, células plasmáticas, eosinófilos y neutrófilos. En esta capa también existe tejido adiposo que forma pequeños racimos de células o grandes masas que crean un cojín o almohadilla de grasa llamada pániculo adiposo. Además se integran los anexos cutáneos que incluyen los complejos pilosebáceos, las glándulas sudoríparas, estructuras especiales como las glándulas circumanales y las mamas y estructuras de protección como las uñas, cuernos y cascos (Monteiro Rivière, 2006).

Está irrigada a partir de tres grandes plexos: superficial, medio y profundo.

La gran cantidad de colágeno confiere a la dermis una gran resistencia mecánica que constituye la base de su transformación en cuero. Se distinguen dos zonas: la dermis superficial y la dermis profunda, cuyos límites son poco precisos: la **capa papilar** superficial, que envía extensiones hacia la epidermis en forma de papilas, denominada flor, que define el aspecto del cuero y la **capa reticular**, más profunda, que limita con la hipodermis. En tecnología del cuero esta división se define a la altura del bulbo del folículo piloso (Thorstensen, 1976). Esta zona se amolda al estrato basal de la epidermis y en ella se encuentran los corpúsculos de Meissner que son receptores táctiles y terminaciones nerviosas libres sensibles a la temperatura.

En la zona de unión de ambas capas hay una transición en la disposición de las fibras de colágeno que pasan a formar haces o paquetes de fibras, alojándose las glándulas y vasos sanguíneos.

La capa reticular, gruesa y densa, está formada por haces de fibras y fibrillas de colágeno, en forma de paquetes, que se entrelazan entre sí de manera longitudinal y transversal otorgando características específicas de acuerdo a la zona del cuerpo del animal (crupón, cabeza o falda). Su ordenamiento da cuenta del daño producido en el colágeno en el proceso de curtido (Angelinetti *et al.*, 1978) y sus largos haces de fibras le otorgan las propiedades mecánicas al cuero terminado (Thorstensen, 1976).

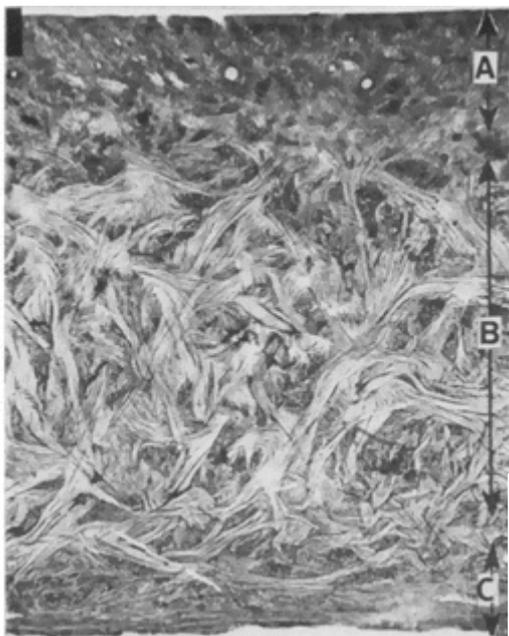


Figura 6.6 Sección transversal de un corte de piel vacuna curtida con curtientes vegetales: A: capa flor; B: corium; C: capa carne (Haines *et al.*, 1975).

El patrón de estructura y distribución de las fibras de colágeno es característico de cada especie, aunque es similar en vaca, cabra, oveja. También es propio de cada especie

el espesor total de la piel y el que ocupa la capa flor dentro de ella. En el bovino el espesor total de la piel es de 4 a 6 mm, las fibras del corium son relativamente grandes y la flor ocupa 1/6 del espesor total de la piel. La capa superficial de la dermis es más ancha en el caballo y el bovino que en la de los carnívoros y circunda los folículos pilosos y las glándulas sudoríparas adyacentes.

Además se observan en la dermis haces de fibras musculares lisas que forman el músculo erector del pelo que se inserta en la vaina del tejido conectivo del folículo y se extiende hacia la epidermis fijándose a su capa superficial (Espinosa de los Monteros *et al.*, 2004; Monteiro Rivière, 2006).

En relación a la terminología existe discrepancia en la que se emplea para describir el corium según la tecnología del cuero (Fig. 6.5) y la de la histología (Fig. 6.4). En la primera, el corium corresponde a la capa reticular o profunda de la dermis, en la segunda la totalidad de la dermis es llamada corium.

6.2.5.1.3 Lámina basal

Esta lámina cumple la función de separar la dermis de la epidermis. Tiene diversas funciones: determina la polaridad de esta última ya que permite el pasaje selectivo de sustancias entre ambas capas, ofrece una barrera contra la migración desde la epidermis hacia la dermis, permite los movimientos celulares epidérmicos en los procesos de reparación de heridas, influye en la diferenciación de la epidermis y mantiene el estado de proliferación de la capa basal.

Esta lámina se divide a su vez en lámina lúcida y lámina densa, constituídas por colágeno tipo IV, fibronectina, laminina, entactina y componentes que forman parte de los hemidesmosomas como la integrina $\alpha 6\beta 4$ y el antígeno bulloso penfigoide (Garro, 2012).

En el área de ribera de la curtiembre toda la lámina basal es removida y es sensible a la acción de las enzimas proteolíticas (Heidemann, 1993).

6.2.5.1.4 Colágeno

Su nombre proviene del griego “kolla”: pegamento. El colágeno es la principal proteína fibrosa extracelular de los mamíferos (30% de la masa proteica). Compose el tejido conectivo en animales incluyendo las matrices fibrosas de la piel, hueso, tendón, cartílago, ligamentos, dientes y vasos sanguíneos (Berg *et al.*, 2007; Garrett *et al.*, 2010). Su característica principal es la de otorgar alta resistencia a la tracción o fuerza tensil a los tejidos de los que forma parte.

Los vertebrados tienen 46 cadenas polipeptídicas distintas genéticamente que comprenden 28 tipos de colágeno y se encuentran en distintos componentes de los tejidos del mismo individuo (Voet *et al.*, 2011).

Tipos de colágeno

La unidad básica estructural del colágeno es el tropocolágeno, que tiene un PM de

285.000 y consiste de tres cadenas polipeptídicas entrelazadas, cada una de 100.000 aa, 300 nm de largo y 1,4 nm de diámetro. Existen distintos tipos de colágeno: tipo I, el más común, consiste de 2 cadenas peptídicas idénticas designadas $\alpha 1$ (I) y otra diferente designada $\alpha 2$ (I). Predomina en el 90 % del cuerpo y se encuentra en huesos, tendones, piel de mamíferos, dentina, córnea (Garret *et al.*, 2010). El tipo II, compuesto por 3 cadenas de $\alpha 1$ (II) se encuentra en cartílago, humor vítreo y discos intervertebrales. El tipo III, en vasos sanguíneos y piel fetal, consiste de tres cadenas polipeptídicas iguales [$\alpha 1$ (III)] (Voet *et al.*, 2011) y unido al tipo I es esencial para la formación de las fibras del tipo I. El tipo V, necesario para el ensamblaje de tejidos conectivos, está presente en tejidos fetales y placenta. El tipo XI forma parte del cartílago hialino y el tipo XXIV de la córnea y hueso. Existen otros tipos de colágeno: los del tipo FACIT (colágenos asociados a fibrillas con triple hélices interrumpidas) que sirven como puentes moleculares en la organización y estabilidad de matrices extracelulares; colágenos “sheet-forming” que forman una red de plegamientos en vez de fibras (lámina basal, lamina de la córnea); colágenos multiplexinas, dispuestos en dominios triple hélices múltiples con interrupciones, ubicados en la membrana basal; colágenos de anclaje y conexión, que unen la lámina basal a la epidermis; colágenos transmembranares que se asocian con hemidesmosomas de la piel y cuya mutación origina la epidermólisis bullosa (Eurell *et al.*, 2006).

Estructura

Cada cadena polipeptídica helicoidal está compuesta por una secuencia repetitiva de 3 residuos donde la Gly ocupa siempre la primera posición, la Pro en segunda posición, y la 4-Hyp (hidroxiprolina) o la 3-Hyp o 5-Hyl (hidroxilisina) (Garrett *et al.*, 2010) ocupan la tercera posición (Berg *et al.*, 2007). La secuencia de aminoácidos es tan compacta que sólo la Gly puede ocupar la posición central (Voet *et al.*, 2011) y existen otros aminoácidos unidos a esta cadena principal. Cada una de estas cadenas a su vez está compuesta por una triple hélice girada a la izquierda y el conjunto de las tres está girado a la derecha (Fig. 6.7) formando una fibrilla con una distancia de ascenso de 2,9 Å (en lugar de 1,5 Å de la α queratina) y 3,3 aminoácidos por vuelta (Garrett *et al.*, 2010). Esto se debe a que los grupos hidroxilos de los aminoácidos modificados son mucho más voluminosos. Los manojos de estas fibrillas forman fibras de colágeno visibles en microscopio óptico (Eurell *et al.*, 2006).

Figura 6.7. Poli (Gly-Pro-Pro) una triple hélice right-handed similar al colágeno compuesto de tres cadenas helicoidales left-handed (pdb id=1 KGF) (Garret *et al.*, 2010).

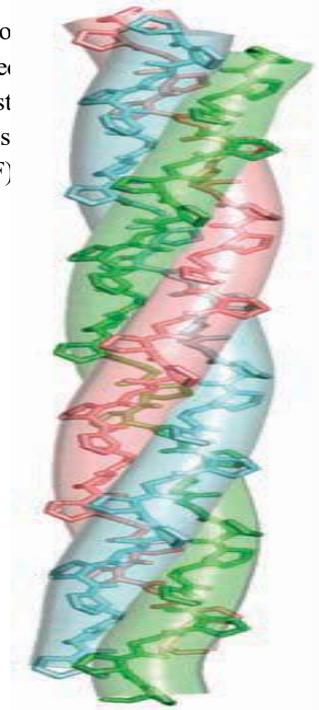
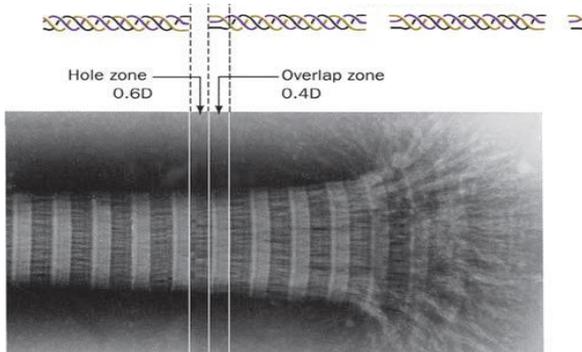


Figura 6.8. Apariencia de las bandas de las fibrillas de colágeno. La apariencia de las bandas en el microscopio electrónico se presenta a partir del arreglo escalonado representado esquemáticamente de la molécula de colágeno (top) que resulta en una superficie indentada periódica; D, la distancia entre las estriaciones transversales es de $\sim 670 \text{ \AA}$, por lo tanto el largo de la molécula de colágeno de 3000 \AA , es $4,4 D$ (Voet *et al.*, 2011).



La Hyp e Hyl se forman post-traduccionalmente mediante las enzimas prolyl-hidroxilasa y lisil-hidroxilasa respectivamente. Debido a su especificidad intervienen en la ubicación de la prolina o la lisina en la tercera posición. La primera requiere O_2

molecular, α -cetoglutarato y ácido ascórbico (vit C) y es activada por Fe^{+2} mientras que la segunda contiene Cu como factor. Estos aminoácidos son importantes ya que establecen puentes de H entre los grupos amino de la Gly y el carboxilo ($C=O$) de la Pro, estabilizando la molécula y aumentando su temperatura de desnaturalización (de $24^\circ C$ a $39^\circ C$).

La hélice está estabilizada por repulsión estérica de los anillos de pirrolidina de la prolina y la hyp que impiden cualquier otra disposición mientras que los puentes de H intercadenas estabilizan la superhélice (Berg *et al.*, 2007).

Características principales: fuerza tensil

La estructura helicoidal triple hélice perfectamente empaquetada del colágeno es la responsable de su fuerza tensil característica, transformando una fuerza tensional longitudinal en una fuerza de compresión lateral.

Las fuerzas de dirección para ensamblar las moléculas de colágeno en fibrillas son aparentemente provistas por interacciones hidrofóbicas adicionales dentro de las fibrillas de una manera análoga al empaquetamiento de los elementos estructurales secundarios para formar una proteína globular.

El arreglo periódico de la triple hélice “cabeza-cola” resulta en bandas patrones que se aprecian en micrografías electrónicas, cuya periodicidad es de 68 nm. La triple hélice presenta interrupciones de 40 nm (“hole” o agujeros) dispuestas en forma escalonada y paralela al eje de la fibra. Estas regiones intervienen en la formación de hueso como sitios de nucleación de cristales y en el ensamblaje fibrilar a través de azúcares (glucosa, galactosa, sus disacáridos) unidos a la 5-hidroxilisina (Fig. 6.8) (Voet *et al.*, 2011).

La insolubilidad de las fibrillas de colágeno en solventes que rompen puentes de hidrógeno e interacciones iónicas se debe al cross-linking de las uniones covalentes intra e intermoleculares de las cadenas laterales de Lys y Hys. El déficit de lisiloxidasasa para convertir la Lys en Hys causa anomalías de huesos, articulaciones y grandes vasos sanguíneos por fragilidad del colágeno.

Cuando se produce la carencia de prolilhidroxilasa o su cofactor, la vitamina C, se produce el escorbuto con lesiones de piel, fragilidad de vasos sanguíneos, mala curación de heridas.

En la osteogénesis imperfecta existe una mutación en el colágeno de tipo I donde es sustituida la gly por otro aminoácido que generalmente es ala.

Otra enfermedad es el Síndrome de Ehlers-Danlos que constituye un grupo de al menos 10 enfermedades diferentes caracterizado por la hiperextensibilidad de las articulaciones y la piel debido a que estos tejidos contienen una proporción mayor de elastina que lo normal.

Otro grupo de enfermedades degenerativas exhiben anomalías en ciertos tejidos, incluyendo cartílago en la osteoartritis y las placas ateroscleróticas en las arterias humanas (Garret *et al.*; Voet *et al.*, 2011).

La disposición de las fibras de colágeno en los distintos tejidos depende de la función que desempeñan. En la piel las láminas de fibrillas están dispuestas encapas a distintos ángulos.

6.2.6 Procesos que ocurren en la piel durante el depilado

Durante los procesos de la etapa ribera (remojo, encalado, depilado y purgado) hay un enriquecimiento de la piel en el componente colágeno. El porcentaje de colágeno en la piel fresca es de alrededor del 72%, alcanzando un 91,5% en la piel encalada y depilada con sulfuro. En la piel purgada y piquelada antes del curtido llega a un 94%.

Como se mencionó anteriormente (sección 6.2.2), en esta etapa no sólo se busca eliminar el pelo, la epidermis y saponificar las grasas naturales sino también acondicionar

la piel para el curtido mediante el “efecto de apelambrado” o de relajamiento de la piel y el hinchamiento (Angelinetti *et al.*, 1978).

Relajamiento de la piel: efecto de apelambrado

Durante el proceso de depilado en medio alcalino el colágeno sufre modificaciones. A nivel de los restos de glutamina y asparagina de sus cadenas laterales se produce la hidrólisis de sus grupos amino, liberando amoníaco. Se produce la ruptura de puentes de H de cadenas vecinas, disminuye su punto isoeléctrico de 7,5-8 a 5 y la temperatura de contracción desciende de 60°C a 40-45°C. Este fenómeno afloja la estructura reticular de la molécula en toda su extensión. Los paquetes se separan en fibras y fibrillas, afectando las propiedades finales del cuero, acción denominada “apertura de la piel” o “efecto de apelambrado” cuyo proceso es irreversible. A mayor acción liotrópica de la cal (calero) aplicada en un depilado convencional, se produce mayor apertura o rotura de los paquetes fibrosos del colágeno pudiendo llegar a su disolución a pH mayores de 12,9.

Se produce la separación de la dermis y la epidermis, se solubilizan distintas proteínas como: albúminas y globulinas que quedan en la piel después del remojo, las del estrato basal y espinoso de la epidermis y en menor medida el colágeno (Gratakos, Boleda, Portavella, Adzet y Lluch, 1962).

Hinchamiento de la piel

En este proceso se pueden producir distintos fenómenos:

- hinchamiento osmótico: el ingreso de agua en medio alcalino al entorno colagénico da por resultado un acortamiento de la fibra y un incremento de su diámetro en forma reversible, la piel queda turgente y elástica; se produce por medio de ácidos o bases minerales;
- estado de turgencia, en el que se produce una resistencia del tejido a toda presión externa;
- hinchamiento liotrópico, en el que disminuye la fuerza de cohesión entre las fibras por acción de la cal; se incrementa el diámetro de las fibras, sin alterar su longitud, se produce una mayor división de haces fibrosos de sus fibrillas siendo parcialmente reversible; el efecto aumenta a mayor apelambrado y el resultado es una piel flácida con degradación del colágeno;
- hinchamiento diferencial: se origina por tensiones internas entre la distinta disposición de las fibras expuestas al gradiente de pH transversal entre las distintas capas de la piel (en el remojo el pH 5 a 9 llega a pH 13 en el depilado).

Estos fenómenos tienen su impronta en el cuero como producto final. A menor efecto de apelambrado o de relajamiento de la piel, menor hinchamiento, mejor característica de la flor pero más duro el cuero final. Por el contrario, a mayor efecto de apelambrado, mayor efecto liotrópico, el cuero es más blando y flexible, mayor soltura de “flor”, mayor capacidad de absorción de agua y bajas propiedades de resistencia.

Según el álcali utilizado, el hinchamiento y turgencia disminuyen en el siguiente orden: KOH, NaOH, Ba(OH)₂, Ca(OH)₂. La capacidad de aflojamiento relacionada con su poder liotrópico aumenta en el mismo orden, debido a que los poros se cierran más si la piel está más hinchada (Angelinetti *et al.*, 1978; Gratakos *et al.*, 1962).

6.2.7 Distintos tipos de depilado

Como se mencionó en la sección 6.3.3, entre los distintos tipos de depilado, el tradicional es el que genera mayor polución ya sea en el efluente como en el ambiente laboral. A continuación se desarrolla el problema de la contaminación.

6.2.7.1 Depilado tradicional: problema del gas sulfhídrico

En el proceso de curtido, las primeras etapas del proceso involucradas en la etapa húmeda o “ribera” dejan su impronta en el producto final y al mismo tiempo generan la mayor contaminación en cuanto a su magnitud, en especial el proceso de depilado-desencalado tiene una gran influencia en estos requerimientos concurrentes (Galarza, Cavello, Greco, Hours, Schuldt y Cantera, 2010).

En el depilado “tradicional o destructor del pelo” se utiliza principalmente el sulfuro de sodio en medio alcalino de Ca(OH)₂ (cal) como agente depilante. En la práctica industrial, las cantidades mínimas para disolver el pelo para un depilado a base de sulfuro de sodio y cal es aproximadamente 1,5% Na₂S en escamas con un 200% del flote, correspondientes a 3,7 Kg S⁼/ton de piel salada. Normalmente se usa una dosis de entre 1,5-3% de Na₂S (equivalente a 3,7-7,4 kg S-/ton de piel salada) con un 2% de cal (Frendrup y Buljan, 2000).

El pH de este proceso es determinante en la generación del efluente gaseoso ya que el ión sulfuro, en equilibrio con el SH⁻, prepondera cuando el pH no es menor de 12. Por debajo de pH 10 el sulfuro se encuentra como H₂S desprendiéndose como gas por lo que es necesario concentraciones muy bajas en solución como para generar concentraciones superiores al valor umbral límite. Los efluentes líquidos generados mediante este procedimiento en el cual el pelo es disuelto contribuyen en un 50-60% a la contaminación total en términos de DBO, DQO y sólidos suspendidos sedimentables (Galarza, Cavello, Garro, Gortari, Hours y Cantera, 2012). El uso extensivo de sulfuro no sólo produce consecuencias desfavorables para el medio ambiente sino que disminuye la eficacia de las plantas de tratamiento de efluentes. Las exigencias legales que deben cumplir las curtiembres en sus efluentes han aumentado y en algunos casos se han visto obligadas a cerrar sus puertas tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo como China (Wang, Min, Haiming y Li, 2009).

La intoxicación con ácido sulfhídrico comienza con irritación de ojos y vías aéreas en concentraciones menores a 10 ppm y llega a producir desmayo, calambres y muerte a valores de 1000-1500 ppm. El umbral olfatorio es de 0,1 ppm (Skrabs, 1976; World Health Organization, 2000).

Los valores permitidos en ambientes laborales de gas SH₂ así como el de las descargas en los efluentes líquido, gaseoso y sólido están estipulados por diversos organismos tanto nacionales como internacionales y se detallan a continuación en la Tabla 6.1:

Tabla 6.1 Valores permitidos de gas SH₂ en efluentes y ambientes laborales

	Valores permitidos en efluentes	Valores permitidos en ambientes de trabajo			Depilado tradicional
		MAC	VLA-ED	VLA-EC	
Efluente líquido	1 mg/l de S ⁻² [1]				50-120 mg/l de S ⁻² [7,8]
Efluente gaseoso	0,008 ppm SH ₂ [2]				20-40 ppm SH ₂ [7,8] 2000 ppm SH ₂ [9]
Residuo sólido	500 mg SH ₂ /kg[3]	10 ppm [4]	5 ppm [5]	10 ppm [6]	500-1500 mg SH ₂ /kg [7,8]

[1]ACUMAR (2003)

[2]Ministerio de la Nación Argentina, Ley Nacional Argentina n°24.051, decreto n°831/1993, (1993) *Ley de Residuos Peligrosos*, Anexo II, tabla 10, Niveles guía de la calidad de aire; [3] Anexo V, 1-1.7, Parámetros físicos de los barros.

[4]MAC (concentración máxima admisible a la que un trabajador puede estar expuesto 8 horas al día, durante 5 días a la semana); [5] VLA-ED (Valor Límite Ambiental, para una exposición durante 40horas semanales)

[6] VLA-EC (Valor Límite Ambiental para una exposición de corta duración) (INSHT, 2015).

[7] Frendrup *et al.*, (2000)

[8] Galarza, Garro, Martegani y Hours (2016)

[9] Skrabs (1976)

Durante el proceso de depilado se pueden alcanzar valores máximos de 2000 ppm luego del agregado del descalcante (tanto a pH ácido como alcalino y con ácidos orgánicos o inorgánicos, sales de amonio o combinaciones), mientras que en la zona cercana al fulón se detectaron concentraciones de entre 10-40 ppm (Skrabs, 1976).

Como se puede observar en la Tabla 6.2, para una [Na₂S] de 13,7 mg/l, a pH 9 la concentración de H₂S gaseoso es de 33 ppm, superando los valores permitidos en ambientes de trabajo.

Tabla 6.2 Variación de la concentración de ácido sulfhídrico en la atmósfera en relación a la concentración de soluciones de sulfuro de sodio a distintos pH (Bailey y Humpreys, 1967)

SH ₂ atmosférico (ppm)	Solución de Na ₂ S(mg/l)				
	pH 6,0	pH 7,0	pH 8,0	pH 9,0	pH 10,0
33	0,14	0,27	1,54	13,7	123
100	0,42	0,83	4,70	41,5	374
1000	4,2	8,3	47,0	415	3740

Estos niveles elevados de SH₂ hacen necesario el acondicionamiento de sistemas de aireación (extractores de aire) para diluir el efecto en el medio ambiente de trabajo así como la instalación de sensores de gas y la utilización de mascarillas con filtros adecuados por parte de los operarios que hacen el control del desencalado. También se ha implementado la oxidación de sulfuro durante el proceso de desencalado – rendido, donde desciende el valor de pH por debajo de 10 mediante la adición de: I) 0.1%-1,5% H₂O₂ (35% v/v)- SO₄Mn, catalizador, (300g en 1000 kg de piel en tripa); II) 0,4%-0,8% de bisulfito de sodio; III) 0,2%-0,6% NaClO (20%). También se puede recuperar el gas sulfhídrico en algunos casos mediante torre lavadora (Sofía *et al.*, 2012).

6.2.7.2 Depilado enzimático: argumentos rectores

El proceso de depilado asistido con enzimas comparado con el método tradicional trae aparejado una disminución en el contenido de sulfuro en el efluente del 50 % así como de los sólidos suspendidos en un 40%, reduciendo la emisión de olores y permitiendo por simple oxidación convertir el sulfuro en sulfato en concentraciones que cumplen con las especificaciones establecidas y reduciendo el costo del tratamiento de efluentes (Crispim *et al.*, 2003). Sin embargo a pesar de que el empleo de enzimas trae ventajas para el medio ambiente, su empleo está limitado debido a las dificultades que aparecen cuando el depilado se basa sólo en extractos enzimáticos. Dichos inconvenientes se originan fundamentalmente en el mecanismo de proteólisis que no puede ser controlado totalmente debido a que perdura la acción enzimática sobre la estructura de la capa reticular colagénica, influyendo notablemente en las propiedades del cuero elaborado. El depilado enzimático ideal consiste en separar la vaina folicular externa del tejido conectivo que la rodea (Galarza, Garro, Cortizo, Greco y Hours, 2017) por lo tanto la actividad de la enzima debe estar dirigida hacia la epidermis, folículo piloso y lámina basal (Cantera, 2001; Cantera, Garro, Goya, Barbeito y Galarza, 2004; Garro *et al.*, 2008).

A pesar de estas dificultades se mantiene el interés en el desarrollo del depilado enzimático en el ámbito de actividades de investigación y desarrollo, con el fin de no confinar la utilización de preparados enzimáticos solamente a las etapas de remojo y purga potenciando su posible impacto económico y ambiental (Kanagaraj *et al.*, 2021; Riffel, Ortolan y Brandelli, 2003).

Como se mencionó en la sección 6.2.4 el mecanismo de depilado enzimático se compone de dos procesos simultáneos: la sulfitólisis mediada por enzimas queratinolíticas y la proteólisis mediada por proteasas en especial del tipo de las endopeptidasas.

Yates (1972) postuló que para poder predecir el efecto depilante de un extracto enzimático la caseína era el sustrato de elección para determinar la actividad “*in vitro*” (Cantera *et al.*, 2004).

Dentro de las proteasas, las queratinasas serían las enzimas específicas capaces de actuar como agentes depilantes proteolíticos y de degradar la queratina. Han sido purificadas, caracterizadas y aisladas a partir de páncreas y de diferentes microorganismos tales como hongos, actinomycetes y bacterias (Friedrich, Gradisar, Mandin y Chaumont, 1999) (secciones 3.2.2.3; 4.2.2).

Estas enzimas extracelulares son capaces de degradar diversas proteínas presentes en la piel vacuna: queratinas, albúminas, globulinas y proteoglicanos (Cantera, 2001), pero difieren de las proteasas no queratinolíticas en cuanto a su habilidad de degradar queratina insoluble (El-Refai, Abdel Naby, Gaballa, El-Araby y Abdel Fattah, 2005).

6.3 Materiales y métodos

6.3.1 Aplicación de preparados enzimáticos fúngicos de *Trichophyton ajelloi* a la etapa ribera

6.3.1.1 Reactivos y soluciones

Biocida (B), cuya composición fue: TCMTB (2-tiocianometil-tio-benzotiazol) 27%, N, N-Dimetilamino 10% (penetrante/emulsificante), cresol 63% (FUBA chem, FUBAC 1618 Dd'A- Dolores d'Avis). Tensioactivos: Isográs (Iso) al 0,1% v/v, alcohol etoxilado de naturaleza aniónica provisto por Pellital S.A.; Baymol (Bay) al 05% v/v, de naturaleza no iónica (Bayer AG Alemania).

Los trozos de piel vacuna fueron provistos por la curtiembre Toreda S.A, transportados a 4°C y conservados a -20°C.

El “residuo pelo” fue obtenido a partir de un depilado conservador del pelo, provisto por la curtiembre Gibaut S.A y preparado según la sección 3.3.1.1. Su composición inicial fue: sólidos totales: 25-30% (bs), grasas 2-4% (bs), nitrógeno total 11-15% (bs), Ca 2-3% (bs), Na 1-2% (bs), S 3-5% (bs), pH 9-11, sulfuros 80-100 mg H₂S/kg de pelo húmedo recuperado (filtrado y escurrido, humedad 75%); bs: porcentajes referidos al peso de pelo seco.

El pelo fue lavado con tensioactivos, filtrado, secado a 45°C, molido en procesadora de alimentos. Se utilizó la fracción retenida en tamiz de 850 µm.

Los buffers utilizados fueron Tris-HCl 0,1 M ajustado a pH 9 con HCl y PBS (buffer fosfato salino) pH 7,4 (Biopack, CABA).

El ácido tioglicólico y la azocaseína fueron obtenidas de Sigma-Aldrich Co (St. Louis, MO, USA).

6.3.1.2 Microorganismo e inóculo

La preparación del inóculo de *Trichophyton ajelloi* se detalló en la sección 3.3.2.2

6.3.1.3 Condiciones del cultivo

Los cultivos sumergidos y la obtención del EC se realizaron según la sección 3.3.3.2, donde al MMM se le adicionó ácido tioglicólico en una concentración final de 5mM (Galarza *et al*, 2007; Galarza *et al*, 2014).

6.3.1.4 Determinaciones analíticas

Determinación de la concentración proteica

La concentración proteica fue determinada según la sección 3.3.2.5.2.

Determinación de la actividad azocaseinolítica y queratinolítica

La actividad azocaseinolítica fue determinada según la sección 3.3.2.5.3.1. La actividad queratinolítica según la sección 3.3.2.5.3.2.II

6.3.1.5 Determinaciones previas: caracterización y comportamiento del EC frente a los reactivos auxiliares de los procesos

Se determinaron la actividad enzimática, la concentración proteica y el pH en el EC inicial. Antes de ser aplicado a la etapa de ribera, se evaluaron las condiciones óptimas de actividad del EC al aplicarlo junto a los siguientes auxiliares de ribera: biocida, distintos tensioactivos y Ca^{+2} (Matikevičienė *et al.*, 2011). Se determinó la actividad queratinolítica/azocaseinolítica remanente luego de su incubación durante 4 h 30 min a 37°C de acuerdo a las siguientes relaciones finales (Cantera, Goya, Galarza, Garro y López, 2003):

B/EC: 100/1 (p/p)

B/EC: 100/1 (p/p) + 1mg de Ca^{+2} /ml EC

Tensioactivos: Isográs (Iso) 0,1% (v/v); Baymol (Bay) 0,5% (v/v)

6.3.1.6. Ensayo a escala laboratorio de la aplicación del extrato enzimático sobre piel vacuna en la etapa ribera

Se aplicó el EC a trozos de piel bovina a escala laboratorio en las siguientes etapas del área ribera: remojo, depilado, desescalado y purga.

Se utilizaron piezas de piel bovina en fresco de 3 cm x 2,7 cm y aproximadamente 3 g de peso. Se realizaron 6 tratamientos distintos de acuerdo a testear el comportamiento del EC sobre la piel bovina. En cada tratamiento (T) los auxiliares de ribera actuaron con y sin el agregado del EC: en T1 se testeó la acción de la enzima con el agregado de tensioactivos, en el T2 la acción del tensioactivo sólo; en el T3 la acción del tensioactivo, el biocida y la enzima; en el T4 la acción del tensioactivo y el biocida; en los tratamientos 5 y 6 (T5 y T6) se aplicó el depilado tradicional con Na_2S y cal; en la etapa de purga del tratamiento 5 se aplicó la enzima.

La enzima liofilizada se disolvió en buffer Tris-HCl 0,1 M, pH 9 y se determinaron su actividad, queratinolítica, azocaseinolítica y concentración proteica.

Los controles o testigos se realizaron con: trozos de piel sin ningún tratamiento (C) procesada en baño de hielo para Microscopía Óptica y Electrónica. T2: Tris, Iso. T4: Tris, Iso, B; T5 y T6: trozos de piel sometidos al proceso convencional con sulfuro de sodio y cal.

Los trozos de piel se colocaron en sendos vasos de precipitado con 30 ml finales de las distintas soluciones de trabajo según la Tabla 6.3:

Tabla 6.3 Protocolo de trabajo

	Remojo (R)	Incubación	Depilado (D)	Incubación	Desencalado (Des)		Purga (P)	
Tratamiento 1 (T1)	EC Iso (T1R)	4h 37°C (40 rpm)	Bay (T1D)	24h-48h	—		—	
Tratamiento 2 (T2)	Tris Iso (T2R)		Bay (T2D)	37°C (40 rpm)	—		—	
Tratamiento 3 (T3)	EC Iso B (T3R)		Bay (T3D)		—		—	
Tratamiento 4 (T4)	Tris Iso B (T4R)		Bay (T4D)		—		—	
Tratamiento 5 (T5)	Tris Iso B (T5R)		Bay CaO 3% NaSH 1% Na ₂ S 2% (T5D)	30' 30' 12 h 37°C (40 rpm)	(NH ₄) ₂ SO ₄ 2% p/p Na ₂ S ₂ O ₅ 1% p/p	Control pH 60'- 120' 37°C (40 rpm)	EC (T5P)	Incubación 40' 37°C (40 rpm)
Tratamiento 6 (T6)	Tris Iso B (T6R)		(T6D)				Tris (T6P)	

EC: extracto crudo enzimático (en negrita); Iso: tensioactivo Isográs AN 0,1%; Bay: tensioactivo Baymol 0,5%; Tris: Buffer Tris-HCl 0,1 M pH 9; B: Biocida FUBA 0,2% (Chem); Tn°x: identifica el tipo de tratamiento

6.3.1.6.1 Ensayos en los baños de proceso

En los baños de proceso se determinaron la concentración proteica y la absorbancia a $\lambda_{280\text{ nm}}$ después de tomar este medio líquido como si fuera extracto crudo y darle las mismas condiciones de reacción utilizadas en la determinación de actividad queratinolítica. Esta medida dio cuenta de la queratinolisis producida en los trozos de piel.

6.3.1.6.2 Observación con lupa

Las muestras se observaron con lupa previamente sin raspar la superficie de la piel para evaluar la pérdida de pelo.

6.3.1.6.3 Técnicas histológicas para Microscopía Óptica

En cada etapa (remojo, depilado, desencalado y purga) se cortaron trozos de piel que se fijaron en formol al 10%, para su evaluación histológica mediante la tinción de hematoxilina eosina y posterior observación con Microscopio Óptico.

Tinción de Hematoxilina Eosina

Las muestras se deshidrataron en alcohol etílico (Soria Analitica) 70%, 96% y 100%. Se reemplazó el alcohol por dos baños de xileno (Dorwill, Química Analítica). Los trozos de piel se sumergieron en cassettes de inclusión de plástico en baño de parafina líquida en estufa a 56°C-58°C +/-2°C gradualmente en dos baños de 24 h cada uno. Los bloques de parafina se cortaron en secciones de aproximadamente 6 µm de espesor con micrótopo (Leitz Wetzlar 28236, Germany) y se montaron en portaobjetos. Luego se rehidrataron nuevamente debido a que los colorantes utilizados en las tinciones son hidrosolubles en soluciones alcohólicas de concentración decreciente hasta llegar a agua destilada. Se tiñeron con el método de Hematoxilina Eosina (HE) (Allen, 1992), se deshidrataron en soluciones de concentración creciente de alcoholes y se realizó un último pasaje por xilol. Finalmente los preparados se cubrieron con líquido de montar, se cubrieron con cubreobjetos y se observaron con microscopio óptico (MO) (Olympus Optical CH-2, Japan).

6.3.1.6.4 Metodología para la observación en Microscopio Electrónico de Barrido

Las muestras para MEB fueron fijadas con formol al 4% en H₂O bidestilada y en buffer PBS pH 7,4 durante 26 h, con cambio de la solución en las primeras 2 h. Seguidamente se deshidrataron en soluciones de concentración creciente de alcoholes (30%, 50%, 70% y 100%) con 3 cambios de 15 min en cada concentración. En los casos en que se utilizaron las muestras destinadas a tinción HE, conservadas en formol 10 %, el trozo de piel fue previamente lavado con H₂O destilada durante 24 h, deshidratado en soluciones de concentración creciente de alcoholes como se mencionó. Posteriormente las muestras fueron sometidas al secado por punto crítico (sección 5.4.1). Finalmente fueron metalizadas con baño de oro para asegurar la conductividad eléctrica y observadas con alto vacío mediante distintos MEB: JEOL 6360 del Museo de Ciencias Naturales de La Plata y ESEM FEI Quanta 200, del Laboratorio de Investigaciones de Metalurgia Física-LIMF-FI-UNLP (Galarza *et al.*, 2017).

6.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinaciones previas: caracterización y comportamiento del EC frente a los reactivos auxiliares de los procesos

Las actividades enzimáticas EC fueron las siguientes: 1,32 U_{quer}/ml; 0,42 U_{azo}/ml, y la concentración proteica 0,136 mg/ml de prot.

Los distintos auxiliares del área ribera en los distintos tratamientos produjeron una activación del EC, salvo para el caso de Iso (Tabla 6.4).

Tabla 6.4. Actividad enzimática remanente del EC incubado con los auxiliares de ribera

	% act. queratinolítica remanente
Biocida/EC: 100:1 (p/p)	3121±28 (Uquer)
Biocida/EC: 100:1 (p/p)+ 1mg Ca⁺²/ ml EC	1777±15(Uquer)
Isográs 0,1% (v/v)	no dosable
Baymol 0,5%(v/v)	331±10(Uquer)

Aplicación del extracto enzimático a la etapa de ribera sobre piel vacuna a escala laboratorio

1. Ensayos en los baños de proceso

En todos los baños de proceso se observó hidrólisis de la queratina, por lo tanto fueron detectables tanto la absorbancia a $\lambda_{280\text{ nm}}$ (absorción de aminoácidos libres y péptidos) como la concentración proteica aún en T2D y T4D, donde no hubo agregado de EC (Figura 6.9).

Cuando fue aplicado el depilado convencional (T5D y T6D) se produjo una gran destrucción de pelo y por consiguiente las medidas de absorbancia y concentración proteica fueron altas.

En la etapa de purga la utilización de extractos enzimáticos resultó en una limpieza de restos proteicos de la piel. En este caso se evaluó su acción sobre los restos de queratina del folículo piloso y sus vainas. En los tratamientos donde se usó el EC sólo se apreció depilación en T3D (D3), por lo que sólo en éste se evaluó la etapa de purga. En T5P (P5), donde se aplicó la enzima, los valores de $A_{280\text{ nm}}$ fueron menores que en T6P (P6). Esto pudo deberse a la precipitación con TCA de las proteínas nativas ya que en T5P (P5) la remoción de queratina fue mayor, mientras que en T6P (P6) existieron fragmentos peptídicos que no precipitaron. Esto se corroboró con la observación histológica de la sección 6.10.2.3 (Figuras 6.24; 6.25; 6.26; 6.27 respectivamente): en T5P (P5) se observó la ausencia de epidermis y vainas del folículo piloso mientras que en T6P (P6), además de la ausencia de epidermis, el colágeno se fue desorganizado; sin embargo existieron restos de pelos y vainas epiteliales del folículo piloso. En T3P (P3), no fue dosable la absorbancia a $\lambda_{280\text{ nm}}$, quizás porque no hubo fragmentos queratínicos a remover, como se pudo observar en los cortes histológicos (Figuras 6.19; 6.29; 6.30). La concentración de proteínas fue del mismo orden que en T5P (P5) y T6P (P6).

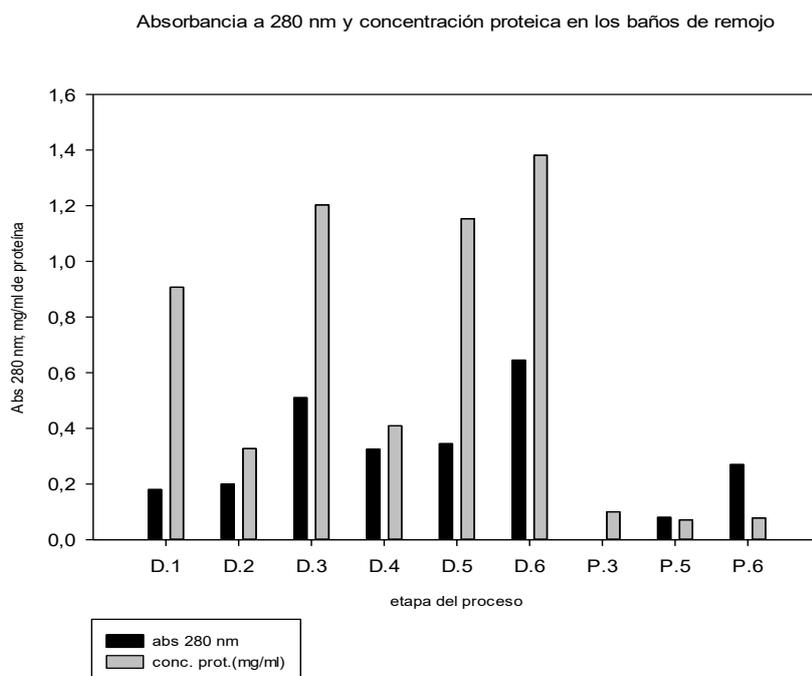


Figura 6.9. Concentración proteica y $A_{280\text{ nm}}$ de los distintos baños de los procesos de depilado y purga a partir de los distintos tratamientos a los que fueron sometidos los trozos de piel

2. Observación con lupa

En los cortes transversales en lupa se observó efecto depilante en el tratamiento 3 (T3D) donde se aplicó EC junto a los auxiliares (Figura 6.11), si bien la remoción del pelo no fue completa probablemente debido a que la agitación fue horizontal en vez de girar sobre sí misma como en el fulón. El resto del pelo se pudo eliminar por raspado superficial suave.

Cabe destacar que cuando el trozo de piel de T3D se preservó en formol al 10 % durante 1 año, presentó una depilación completa, con lo que se puede inferir que la enzima continuó actuando dentro del tejido. La actividad azocaseinolítica en la solución formolada del baño de conservación no fue dosable.

Cuando se aplicaron los auxiliares del remojo (tensioactivo junto al biocida) sin EC durante 48 h los folículos pilosos permanecieron llenos (T4D) (Fig.6.10).

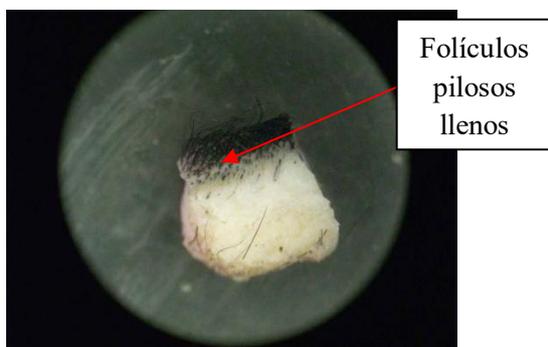


Figura 6.10: corte de piel bovina en lupa 4x luego del tratamiento T4D

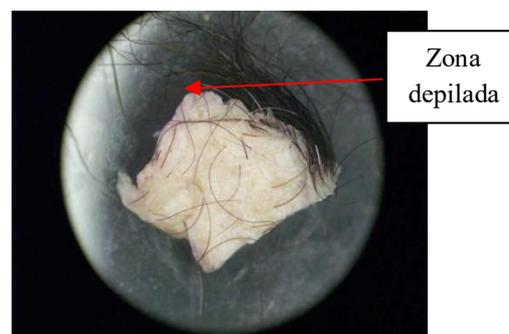


Figura 6.11: corte de piel bovina en lupa 4x luego del tratamiento T3D

3. Observación con Microscopio Óptico

Las figuras que corresponden a la tinción con HE se presentan de a pares donde se comparan las mismas estructuras en relación a los siguientes aspectos: folículos pilosos: vacíos o llenos; vainas epiteliales del folículo: presencia o ausencia; epidermis: ausencia o presencia; unión dermo-epidérmica: unión o separación; fibras colagénicas: preservadas o desordenadas. Estas características se ordenan en la Tabla 6.4.

En el control (C), donde la piel no fue sometida a ningún tratamiento (Figura 6.12) se observan las fibras colagénicas de la dermis con distribución típica: epidermis con estratos visibles, vainas epiteliales del folículo piloso sin cambios. Cuando la piel fue sometida a la acción del EC, tensioactivos y biocida durante 48 h (T3D) las fibras colagénicas de la dermis están desorganizadas y hay pérdida de las capas epidérmicas (Figura 6.13).

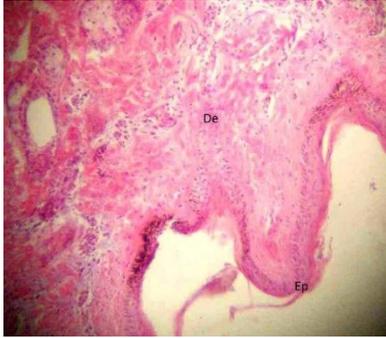


Figura 6.12: corte de piel bovina sin tratamiento: control (C) (10 x HE)



Figura 6.13: corte de piel bovina luego de T3D (EC-tensioactivos: Iso+Bay - B) (10 x HE)

Referencias: Ep: epidermis; De: dermis; FP: folículo piloso; Hematoxilina Eosina: HE

En el remojo de la piel en T4R (con iso, buffer y biocida) después de 4 h, se observaron los folículos pilosos llenos (Figura 6.14). Cuando en las mismas condiciones se agregó EC (T3R) algunos folículos pilosos se encontraron vacíos (Figura 6.15).



Figura 6.14: corte de piel bovina luego de T4R (buffer-tensioactivo Iso - B) (10 x HE)



Figura 6.15: corte de piel bovina luego de T3R (EC-tensioactivo Iso - B) (10 x HE)

Cuando se agregó Bay al tratamiento anterior (T4D) después de la incubación de 48 h se observaron los folículos pilosos llenos (Figura 6.16) mientras que en las mismas condiciones (T3D), con el agregado de EC algunos folículos pilosos se encontraron vacíos (Figura 6.17).



Figura 6.16: corte de piel bovina luego del T4D (buffer-tensioactivos Iso+Bay - B) (10 x HE).

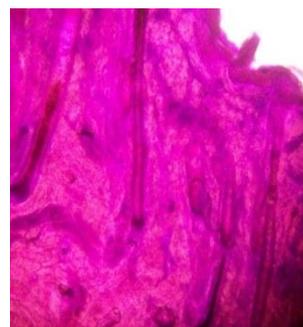


Figura 6.17: corte de piel bovina luego del T3D (EC-tensioactivos Iso+Bay - B) (10 x HE).

En el control sin tratamiento (C) se observó el folículo piloso con sus vainas epiteliales sin daño (Figura 6.18), mientras que en el tratamiento T3P, el más efectivo para observar el efecto de depilado y purga, los folículos pilosos se encontraron vacíos sin sus vainas epiteliales (Figura 6.19).

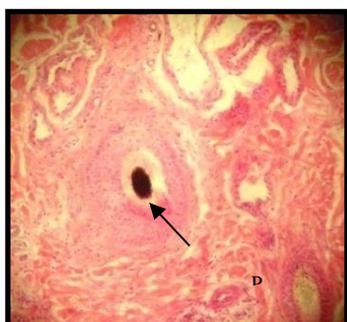


Figura 6.18: corte de piel bovina sin tratamiento, control C (10 x HE)



Figura 6.19: corte de piel bovina luego de T3P (EC-tensioactivos iso+bay-B, 48 h) (10 x HE)

Cuando se compara la acción de tensioactivos con y sin agregado de EC (T2D y T1D, respectivamente), los haces de colágeno compactos en la dermis superficial se encontraron sin daño para el primer tratamiento (Figura 6.20) mientras que para el segundo, el folículo piloso se presenta sin sus vainas epiteliales, hay desagregación del colágeno y la epidermis está separada de la dermis (Figura 6.21).

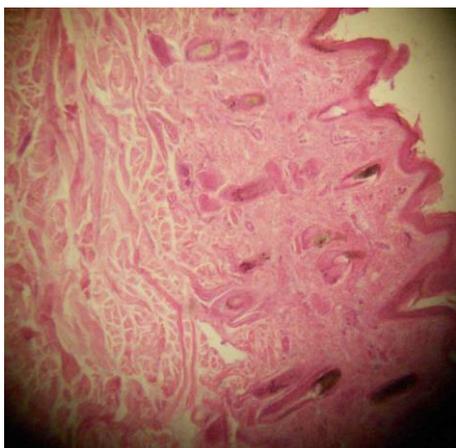


Figura 6.20: corte de piel bovina luego de T2D (buffer-tensioactivos iso+bay) (4 x HE).



Figura 6.21: corte de piel bovina luego de la acción de T1D (EC-tensioactivos iso+bay, 48 h) (10 x HE)

Cuando se aplicó el depilado convencional (T5D) se apreció el folículo piloso con la vaina separada del colágeno (Figura 6.22, 10x) y la ausencia de epidermis (Figura 6.23, 4x).

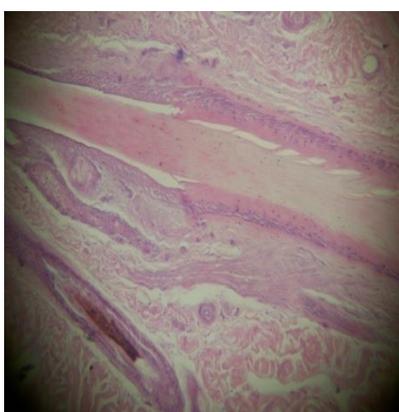


Figura 6.22: corte de piel bovina luego de T5D (depilado tradicional) (10 x HE)

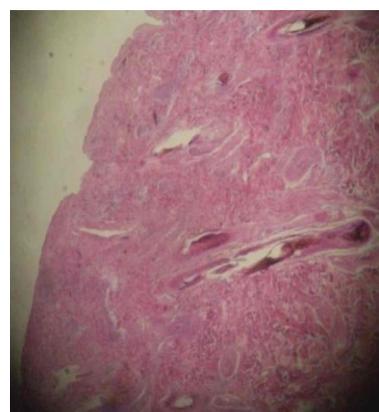


Figura 6.23: corte de piel bovina luego de T5D (depilado tradicional) (4 x HE).

Con el agregado de EC a la etapa purga (T5P) del proceso de depilado tradicional, se observó la ausencia de la epidermis, de las vainas del folículo piloso y del pelo, mientras que las fibras de colágeno se encontraron desorganizadas (Figura 6.24).

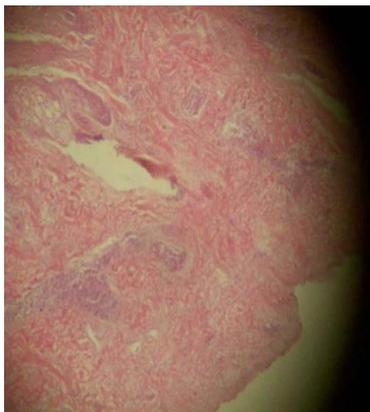


Figura 6.24: corte de piel bovina luego de T5P (depilado tradicional + purga con EC) (10 x HE)

En la etapa de purga de la piel sometida al depilado tradicional sin agregado de EC (T6P) se apreció la persistencia de la vaina de la raíz del folículo piloso (Fig. 6.25, 10x) y ausencia de epidermis (Fig. 6.26, 4x). En la Figura 6.27 se observó ausencia de epidermis, el colágeno desorganizado y restos de pelos y vainas epiteliales del folículo piloso.

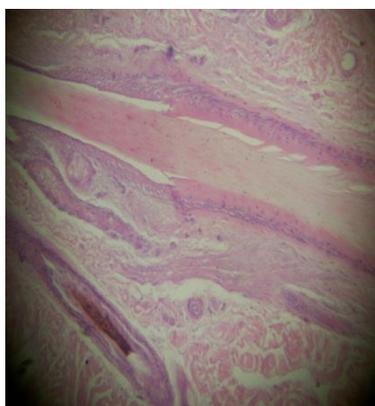


Figura 6.25: corte de piel bovina luego del T6P (depilado tradicional+purga con buffer) (10 x HE)

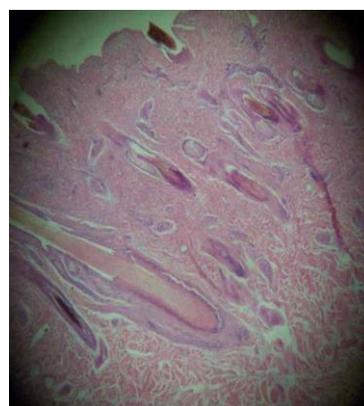


Figura 6.26: corte de piel bovina luego del T6P (depilado tradicional+purga con buffer) (4 x HE).

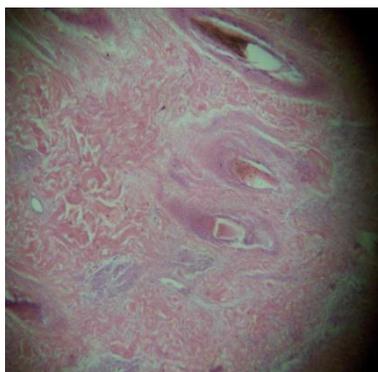


Figura 6.27: corte de piel bovina luego del T6P (depilado tradicional+purga con buffer) (10 x HE)

Los distintos parámetros evaluados en los cortes histológicos se resumen en la Tabla 6.5.

Tabla 6.5 Resultados de las observaciones en microscopía óptica (HE)

	Folículos pilosos	Folículos pilosos-vainas epiteliales	Epidermis	Unión dermo-epidérmica	Fibras colagénicas	Fotomicrografía
Control	(+)	(+)	(+) estratos visibles	(+)	(+)	Fig 6.12; Fig. 6.18
T ₁ R						
T ₁ D		(-)		(-)	(-)	Fig. 6.21
T ₂ R						
T ₂ D					(+)	Fig. 6.20
T ₃ R	(+)/(-)					Fig. 6.15
T ₃ D	(-)		(-)		(-)	Fig. 6.13; Fig. 6.21
T ₃ P		(-)				Fig. 6.19
T ₄ R	(+)					Fig. 6.14
T ₄ D	(+)					Fig. 6.16
T ₅ R						
T ₅ D	(+)/(-)	(+) (vaina separada del colágeno)	(-)			Fig. 6.22 Fig. 6.23
T ₅ P	(-)	(-)			(-)	Fig. 6.24
T ₆ R						
T ₆ D	Idem a T5D	Idem a T5D	Idem a T5D	Idem a T5D	Idem a T5D	Fig. 6.23
T ₆ P	(+)/(-)	(+)/(-)	(-)		(-)	Fig. 6.25 Fig. 6.26 Fig. 6.27

Referencias:

Folículo piloso: (+) lleno; (-) vacío

Vainas epiteliales del folículo piloso: (+) presencia; (-) ausencia

Epidermis: (+) presencia; (-) ausencia

Unión dermo-epidérmica: (+) unión; (-) separación

Fibras colagénicas: (+) ordenadas; (-) desordenadas

4. Observación con Microscopía Electrónica de Barrido

En los cortes de piel bovina sin tratamiento el colágeno presentó su distribución característica, se distinguieron los estratos de la epidermis y el pelo con sus tejuelas típicas (Figuras 6.28 y 6.29).

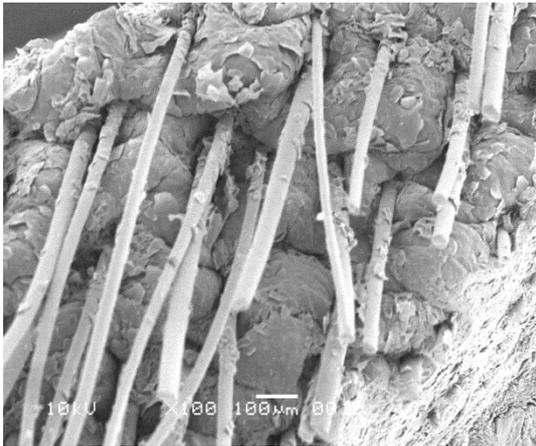


Figura 6.28: corte de piel bovina sin tratamiento, Control (C) (MEB 100 x)

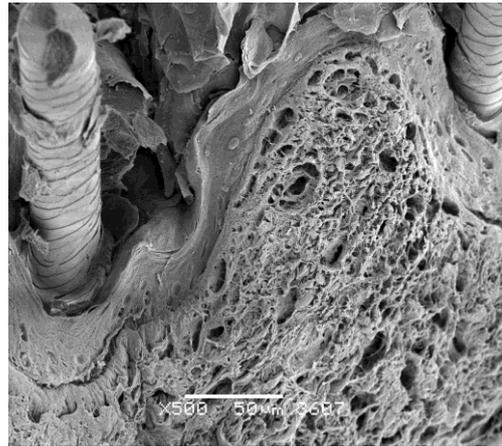


Figura 6.29: corte de piel bovina sin tratamiento, Control (C) (MEB 500 x)

En la piel bovina sometida al tratamiento T3D con EC, tensioactivos y biocida (48 h) se apreciaron los folículos pilosos vacíos, el colágeno desorganizado y la ausencia de epidermis (Figuras 6.30 y 6.31).

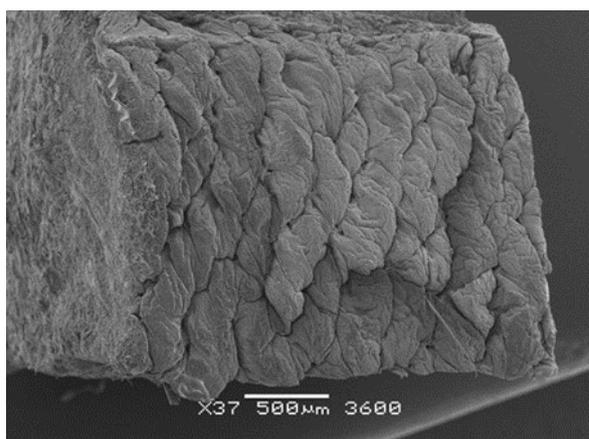


Figura 6.30: corte de piel bovina luego de T3D (EC-tensioactivos Iso+Bay – B) (MEB 37 x)

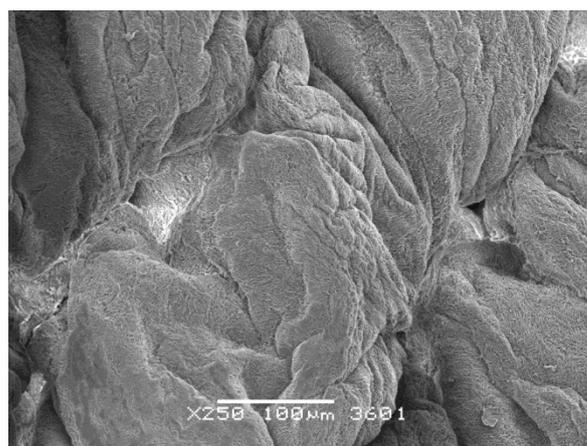


Figura 6.31: corte de piel bovina luego de T3D (EC-tensioactivos Iso+Bay – B) (MEB 250 x)

Los resultados fueron publicados en: Galarza *et al.*, 2014; Galarza *et al.*, 2016; Garro *et al.*, 2019.

6.5. Conclusiones

- Mediante protocolos de histología y de Microscopía Electrónica de Barrido adaptados para la piel bovina se observaron cambios a nivel de la dermis-epidermis y anexos en la piel sometida a distintos tratamientos con el extracto crudo enzimático de *Trichophyton ajelloi*, tensioactivos y biocida.
- El tratamiento en el que se observó mayor efecto en la piel fue el tratamiento 3 a las 48 h (T3D) donde se utilizaron los tensioactivos, el biocida y el extracto enzimático. Se observaron folículos pilosos vacíos, fibras de colágeno desorganizadas y los estratos de la epidermis no resultaron visibles (Figuras 6.11; 6.13; 6.15; 6.30; 6.31). Cuando el tratamiento se extendió a la etapa purga (T3P) los folículos perdieron sus vainas epiteliales (Figura 6.19). Cuando en las mismas condiciones no se agregó EC (T4D) se observaron los folículos pilosos llenos (Figuras 6.10 y 6.16) (Galarza *et al.*, 2014).
- La combinación de tensioactivos con enzima pero sin biocida, después de 48h (T1D) produjo daños en la piel a nivel del colágeno y de la separación dermis-epidermis debido a la acción del EC y de los microorganismos propios de la piel bovina que liberan enzimas al medio (Figura 6.21). Cuando se agregaron sólo tensioactivos al baño de proceso durante 48 h (T2D) no se apreciaron daños al colágeno de la dermis superficial ni efecto depilatorio (Figura 6.20) (Sivasubramanian, Murali, Manohar, Rajaram y Puvanakrishnan, 2008a; Sivasubramanian, Murali, Manohar y Puvanakrishnan, 2008b). Sin embargo diversos tensioactivos son capaces de combinarse con proteínas fibrosas y globulares como es el caso del SDS que produce desorganización de la estructura del colágeno (Cantera *et al.*, 2004).

- En el proceso de depilado tradicional (T5 y T6) se observó efecto depilante (Figuras 6.22 y 6.23). Cuando se agregó el EC en la etapa purga (T5P) se logró un mayor efecto de limpieza de los folículos pilosos, ausencia de la epidermis y de las vainas del folículo piloso (Figura 6.24) que cuando se agregó sólo buffer (T6P) (Figuras 6.25; 6.26; 6.27). En los baños de proceso se observó alta absorbancia a $\lambda_{280\text{ nm}}$ (Figura 6.9).
- El control sin tratamiento mostró que la piel conservaba intacta la dermis y la estructura de la epidermis. Las fibras de colágeno presentaron una distribución normal y los estratos epidérmicos no presentaron cambios visibles con las tinciones empleadas. Las vainas del folículo piloso se observaron claramente (Figuras 6.12; 6.14; 6.28; 6.29).

6.5.1. Conclusiones referidas a las aplicaciones en tecnología del cuero

- Tanto el tiempo de contacto entre las sustancias y la piel como la caracterización del EC y las condiciones óptimas de su aplicación son condiciones necesarias para su utilización en tecnología del cuero (Galarza *et al.*, 2016; Galarza *et al.*, 2021).
- Son interesantes las propiedades depilantes del extracto fúngico de *Trichophyton ajelloi* aplicables a la tecnología del cuero, en relación a la sustentabilidad de los procesos y las tecnologías limpias.
- Utilizando un residuo de la propia industria curtidora se pudo producir un extracto enzimático con efecto depilante que disminuye la contaminación ambiental al ser aplicado en reemplazo del sulfuro de sodio.

6.6. Conclusiones generales del presente trabajo de Tesis Doctoral

- ✓ Se aislaron, caracterizaron e identificaron hongos de suelo local con actividad queratinolítica sobre residuo pelo bovino a partir de un depilado conservador del pelo en tecnología del cuero.
- ✓ Se obtuvieron extractos fúngicos de la cepa seleccionada *Trichophyton ajelloi* mediante cultivos en medio sólido y líquido con residuo pelo como única fuente de C, N, S y energía, determinando las condiciones óptimas de producción de enzimas proteolítico-queratinolíticas.
- ✓ Se caracterizó el pool enzimático en relación a sus actividades proteolíticas, especialmente azocaseinolítica y queratinolítica, frente a distintas variables físico-químicas mediante la adaptación y puesta a punto de protocolos.
- ✓ En particular se estandarizó la actividad queratinolítica utilizando el residuo pelo como sustrato.
- ✓ Se aplicaron y pusieron a punto métodos para evidenciar la degradación fúngica del pelo utilizando técnicas de Microscopía Electrónica de Barrido y de Transmisión, Espectroscopía Dieléctrica y colorimétricas. En este sentido, se demostró que la acción enzimática y mecánica son procesos complementarios y simultáneos
- ✓ La aplicación del pool enzimático en Tecnología del Cuero demostró su capacidad depilatoria sobre la piel bovina.

- ✓ A través de los ensayos a escala piloto en la etapa ribera del proceso de curtido y la puesta a punto de un protocolo de actividad queratinolítica de económica implementación se puede predecir el comportamiento del pool enzimático para aplicarlo a gran escala. La posibilidad de implementar este paquete tecnológico sustentable para un buen uso del depilado enzimático en pos de producir cuero de calidad, la sustitución de importaciones constituyen un avance para la industria curtidora local.
- ✓ A partir de estas conclusiones podemos concluir que se corroboraron las hipótesis planteadas al inicio de la realización de este trabajo de Tesis Doctoral

6.7. Referencias bibliográficas

- ACUMAR (Autoridad Cuenca Matanza Riachuelo), (2003). *Resoluciones: 001/2007-336/2003*, Ente autárquico para el plan de saneamiento ambiental, Gobierno de la Nación, Argentina.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., (2011). *Introducción a Biología Celular*. Madrid, España: Médica Panamericana.
- Allen, T. (1992). Hematoxilina y eosina. En Prophet, E., Mills, B., Arrington, J., Sobin, L. (Ed.), *Laboratory Methods in Histotechnology* (pp 55-59). Washington DC, USA: Ed. *American Registry of Pathology*.
- Angelinetti, A., Cantera, C. (1978). *Remojo, depilado y sus aguas residuales. Problemas y soluciones*. Migueletes, Argentina: Ed. Instituto Nacional de Tecnología Industrial.
- Bailey, D., Humpreys, F. (1967). The removal of sulphide from limeyard wastes by aeration. *Journal of the Society of Leather Trade's Chemists*, 51, 154-172.
- Berg, J., Tymoczko, J., Stryer, L. (2007). *Biochemistry*. New York, USA: Ed. W.H. Freeman and Company.
- Cantera, C. (2001). Hair saving unhairing process. Part 4. Remarks on the evolution of the investigations on enzyme unhairing. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 85 (4), 125-132.
- Cantera, C., Goya, L., Galarza, B., Garro, M., López, L. (2003). Hair saving unhairing process. Part 5. Characterisation of enzymatic preparations applied in soaking and unhairing processes. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 87 (2), 69-77.
- Cantera, C., Garro, M., Goya, L., Barbeito, C., Galarza, B. (2004). Hair saving unhairing

- process. Part 6. Stratum corneum as a diffusion barrier: chemical-mechanical injury of epidermis. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 88 (3), 121-131.
- Córdova, H., Parker, R., Monzón, L., Coral, M., Becker, R., Visitación Figueroa, L. (2013). Influencia del uso de acoimplejantes en el baño de curtido sobre la calidad final del cuero. *Revista de la Sociedad Química de Perú*, 79 (4), 388-397.
- Crispim, A., Mota, M. (2003). Unhairing with enzymes. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 87 (5), 198-202.
- El-Refai, H., Abdel Naby, M., Gaballa, A., El-Araby, M., Abdel Fattah, A. (2005). Improvement of the newly isolated *Bacillus pumilis* FH9 keratinolytic activity, *Process Biochemistry*. 40, 2325-2332.
- Espinosa de los Monteros A., Zayas, A. (2004). Piel y anejos cutáneos. En: Gázquez Ortiz A., *Tratado de histología veterinaria* (pp. 410-412). Barcelona. España: Editorial Masson.
- Eurell J., Van Sickle D. (2006). Connective and supportive tissues. En Eurell J. & Frappier B. (Editores), *Dellmann's, Textbook of Veterinary Histology* (pp. 31-60). Iowa, USA: Blackwell Publishing.
- Frappier, B. (2006). Epithelium. En Eurell J., Frappier B. (Editores), *Dellmann's, Textbook of Veterinary Histology* (pp. 17-30). Iowa, USA: Blackwell Publishing.
- Frendrup, W., Buljan, J. (2000). Hair-save-unhairing methods in leather processing. *United Nations Industrial Development Organization (UNIDO)*, US/RAS/92/120, 1-37.
- Friedrich, J., Gradisar, H., Mandin, D., Chaumont, J. (1999). Screening fungi for synthesis of keratinolytic enzymes. *Letters of Applied Microbiology*, 28, 127-130.
- Galarza, B., Garro, M., Cavello, I., Cazau, M., Hours, R., Cantera, C. (2007). Fungal biotransformation of bovine hair: assessment of structural changes. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 91 (6), 229-232.
- Galarza, B., Cavello, I., Greco, C., Hours, R., Schuldt, M., Cantera, C. (2010). Alternative technologies for adding value to bovine hair waste. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 94 (1), 26-32.
- Galarza, B., Cavello, I., Garro M., Gortari C., Hours, R., Cantera, C. (2012). Evaluation of increase at the production of keratinolytic enzymes. *Journal of AQEIC*, 63 (3), 70-73.

- Galarza, B., Garro, M., Gortari, C., Bonfranceschi, A., Hours, R., Cantera, C. (2014). From a problem of solid waste to a useful product in beamhouse process. *Journal of AQEIC*, 65 (2), 49-55.
- Galarza, B., Garro, M., Martegani, J., Hours, R. (2016). Characterization and evaluation of fungal enzymatic pool with unhairing activity. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 100 (5), 257-262.
- Galarza, B., Garro, M., Cortizo L., Greco C., Hours R. (2017). Enzymatic unhairing: Permeability assay of bovine skin epidermis with fungal enzyme extracts. En CSIR-CLRI (Ed), *Proceedings of the XXXIV IULTCS Congress* (pp 59). Chennai, India: Universal Publishing.
- Galarza B., Garro L., Ferreri N., Eliades L., Hours R. (2021). Optimizing fungal unhairing in bovine skin with *Fusarium oxysporum*. En G. Ghebremedhin. (Ed.), *Proceedings book of abstracts, XXXVI IULTCS Congress* (pp 69). Etiopía, Sudáfrica: África Leather and Leather Products Institute (ALLPI).
- Garret, R., Crisham, C. (2010). *Biochemistry*, Boston, USA: Ed. Brooks/Cole, Cengage, Learning.
- Garro, M., Barbeito, C., Mario, R., Galarza, B., Cantera, C. (2008). Evaluación histológica del efecto de enzimas con actividad depilatoria sobre piel vacuna. Un estudio preliminar. *InVet, Investigación Veterinaria*, 10 (1), 103-110.
- Garro M. (2012). *Depilado enzimático conservador del pelo: Injuria química y mecánica de la epidermis para incrementar los procesos difusivos* (Tesis doctoral). Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. La Plata.
- Garro L., Galarza B., Greco C., Hours R, (2019). Unhairing of bovine skin with fungal enzymes, immersed and spread throughout epidermis. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 103(1), 28-34.
- Goddard, D., Michaelis, L. (1934). A study on keratin. *The Journal of Biological Chemistry*, 106, 605-613.
- Gratakos, E., Boleda, J., Portavella, M., Adzet, J, Lluch, G. (1962). *Tecnología química del cuero*. Barcelona, España: Editorial Emporium.
- Haines, B., Barlow J. (1975). The anatomy of leather. *Journal of Materials Science*, 10 (3), 525-538.
- Heidemann, E. (1993). *Fundamentals of Leather Manufacture*. Darmstadt, Germany: Ed.

Eduard Roether KG.

- Honeyman, J. (2009). Fisiología de la piel. En A. Rondón Lugo, J. Piquero Martín, R. Pérez Alfonzo, C. Antonio, N. Rondón Larez (Editores), *Dermatología Iberoamericana on line*. www.cilad.org.
- Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT). (2015). Límites de exposición profesional para Agentes Químicos en España 2015. www.insht.es/Inshtweb/contenidos/documentacion.
- Kanagaraj, J., Ranesh, P., Prasanna, R., Sugapriya, S., Marudhamuthu, V., Velappan, K. (2021). Dehairing process through combination of oxidarive and enzymatic approach: sustainable technology for leather industry. En L. Zugno, *Proceeding book of abstracts, XXXVI Congress Greening the Leather Value Chain*, (pp. 19), Etiopía, África. Recuperado de <https://iulacsAfrica2021.allpi.int>.
- Kunert, J. (1972). Thiosulphate esters in keratin attacked by dermatophytes *in vitro*. *Sabouraudia*, 10, 6-13.
- Kunert, J. (1989). Biochemical mechanism of keratin degradation by the actinomycete *Streptomyces fradiae* and the fungus *M. gypseum*; a comparison. *Journal of Basic Microbiology*. 29 (9), 597-604.
- Kunert, J. (1992). Effect of reducing agents on proteolytic and keratinolytic activity of enzymes of *Microsporium gypseum*. *Mycoses*, 35, 343-348.
- Kunert, J. (1995). Biochemical mechanism of keratin degradation by keratinolytic fungi. *Journal of the Indian Botanical Society*, 74, 89-98.
- Mathison, G. (1964). Themicrobiologicaldecomposition of keratin. *Annales de la SociétéBelge de Medicine Tropicale*, 44 (4/5), 767-792.
- Matikevičienė, V., Grigiškis, S., Levišauskas, D., Sirvydytė, K., Dižavičiene, O., Masiliūniene, D., Ančenko, O. (2011). Optimization of keratinase production by *Actinomycesfradiae* 119 and its application in degradation of keratin containing wastes. *Environment Technology Resources*, 1, 294-300.
- Ministerio de la Nación Argentina. (1993). Ley Nacional Argentina n° 24.051, decreto n°831/1993, (1993) *Ley de Residuos Peligrosos*, Anexo II, tabla 10; Anexo V, 1-1.7.
- Monteiro-Rivière N. (2006). Integument. En Eurell J., Frappier B. (Eds). *Dellmann's, Textbook of Veterinary Histology* (320-349). Iowa, USA: Blackwell Publishing.

- Riffel, A., Ortolan, S., Brandelli, A. (2003). Dehairing activity of extracellular proteases produced by keratinolytic bacteria, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 78, 855-859.
- Ruffin, P., Biserte, G. (1976a). Column Chromatography of cysteinesulfinic acid, cysteic acid and S-sulfocysteine. *Analytical Biochemistry*, 76, 233-238.
- Ruffin, P., Andrieu, Biguet, J., Biserte G. (1976b). Sulphitolysis in keratinolysis. Biochemical proof. *Sabouraudia*, 14, 181-184.
- Sivasubramanian, S., MuraliManohar, B., Rajaram, A., Puvanakrishnan, R. (2008a). Ecofriendly lime and sulfide free enzymatic dehairing of skins and hides using a bacterial alkaline protease. *Chemosphere*, 70 (6), 1015-1024.
- Sivasubramanian, S., MuraliManohar, B., Puvanakrishnan, R. (2008b). Mechanism of enzymatic dehairing of skins using a bacterial alkaline protease. *Chemosphere*. 70 (6), 1025-1034.
- Skrabs, R. (1976). Über die Gefahren des Schwefelwasserstoffs bei der Lederherstellung, *Das Leder*, 27, 153-157.
- Sofía, A., Cantera, C., Greco, A., Martegani, J., Di Tullio, L., Gudewort, A., Fernández, J. (2012). Industria del Cuero (pieles vacunas). En Instituto Nacional de Tecnología Industrial (Ed.), *Cuadernillo Técnico producción más limpia* (pp 32-33), Migueletes, Argentina: Editorial INTI.
- Thorstensen, T. (1976). *Practical Leather Technology*. New York, USA: Editorial Krieger Publishing Company.
- Torchinsky, Y. (1981). *Sulfur in proteins*, Oxford, England: Pergamon Press Ltd.
- Vargas Doria Medina, D., Amurrio Derpic D. (2017). Alternativa de proceso de curtido con alto agotamiento de Cromo para las curtiembres tradicionales de la ciudad de Cochabamba. *ACTA NOVA*, 8 (1), 3-30.
- Voet, D., Voet, J. (2011). *Biochemistry*. Hoboken, USA: Ed. John Wiley & Sons.
- Wang, R., Min, C., Haiming, C., Li, Z. (2009). Enzyme unhairing an eco-friendly biotechnological process. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 93, 51-55.
- Waterhouse, D. (1957). Digestion in insects. *Annual Review of Entomology*, 2, 1-18.
- Windus W., Showell J. (1968). An interpretation of the mechanism of unhairing as a

nucleophilic displacement. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 63, 258- 274.

World Health Organization. (2000). Inorganic Pollutants. *Air Quality Guidelines for Europe, Part II, Evaluation of risks to human health*, 6, 146-148.

Yates J. (1972). Studies in depilation. Part X. The mechanism of the enzyme depilation process. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 56, 158-175.