

ESTUDIO DE LA ACCIÓN DE AGENTES REDUCTORES EN LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS QUERATINOLÍTICAS DE *TRICHOPHYTON AJELLOI*

Cavello I¹, Galarza B^{2,3}, Gortari MC^{1,2}, Hours R¹, Cantera C^{2,3}

1.- CINDEFI, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, CONICET. Calle 47 y 115. (1900) La Plata 2.- CICBA

3.- CITEC- CICBA. Camino Centenario e/ 505 y 508. (1897) Manuel B. Gonnet
ivanacavello@yahoo.com.ar; betinagal@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe una tendencia en aumento a utilizar enzimas en procesos biotecnológicos, constituyendo una alternativa más amigable con el medio ambiente y económicamente más beneficiosa. Las queratinasas son enzimas de interés en numerosos procesos industriales: industria textil, alimenticia, degradación de residuos y especialmente en la Industria del Cuero. En el proceso de depilado, durante la primera etapa de la obtención del cuero, se emplean preparados enzimáticos para asistir al sulfuro de sodio minimizando la concentración de sustancias tóxicas en el efluente.

El agregado de agentes reductores en la obtención de enzimas queratinolíticas potenciaría su producción por intervenir en la reacción de sulfitólisis (4).

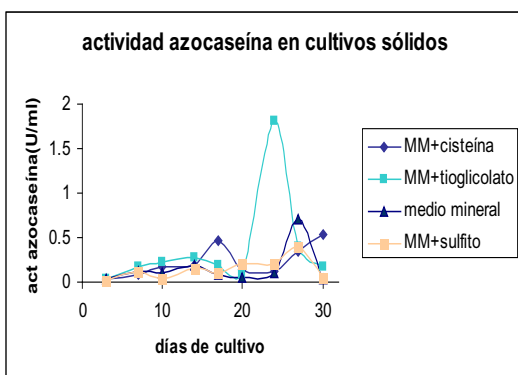
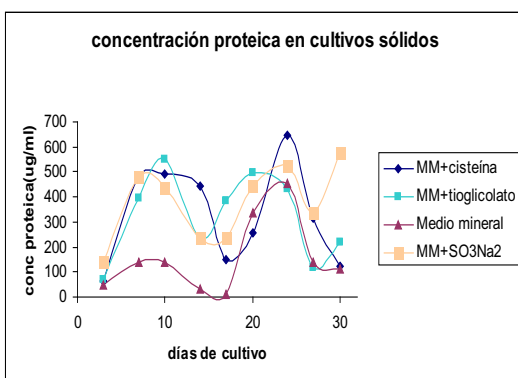
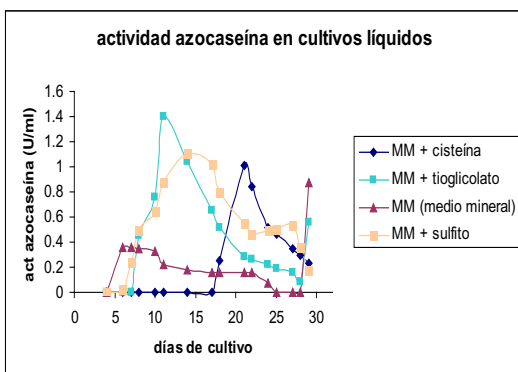
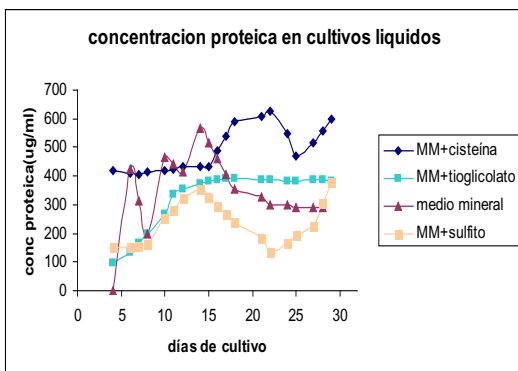
En el presente estudio se determinó el efecto de distintos agentes reductores en la producción de enzimas queratinolíticas de *Trichophyton ajelloi*.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Se realizaron cultivos de *Trichophyton ajelloi* en medio sólido (MS) y líquido (batch) (ML) utilizando como única fuente de C y N el "residuo pelo" (RP) proveniente de un depilado conservador del pelo en Tecnología del Cuero (Galarza et al, 2007). El medio mineral utilizado estaba compuesto por: buffer fosfato NaH_2PO_4 - K_2HPO_4 , cloranfenicol 0,5 g/l y cantidades traza de Cl_3Fe , Cl_2Zn y Cl_2Ca , pH 7 (Ruffin et al., 1987). El RP fue previamente lavado, secado a 45°C, molido y autoclavado. Los medios fueron inoculados con 10^5 ufc/ml. Luego se agregaron distintos agentes reductores en una concentración final de 5mM en cada sistema: 1) clorhidrato monohidrato de L-cisteína 2) tioglicolato de sodio 3) sulfito de sodio (4). Ambos medios se incubaron a 28°C, y en agitación en el caso del líquido. La extracción se realizó cada 3 días en el caso del MS agregando 30 ml de CINA 0,5 N al contenido de cada placa. En el ML se separó el extracto enzimático del micelio por centrifugación. Ambos fueron filtrados a través de filtro de 45 μ , previo a su análisis. Se determinó el contenido proteico en $\mu\text{g/ml}$ por el método de Bradford (1) y la actividad azocaseinolítica de los extractos (2). Se definió la unidad de actividad azocaseinolítica como la cantidad de enzima que genera un aumento de 0,1 unidades de absorbancia $_{440\text{ nm}}$ por minuto y por ml.

RESULTADOS

En los gráficos de concentración proteica vs días de cultivo se puede observar que tanto en medio sólido como líquido los mayores valores se obtienen con el agregado de cisteína. En cuanto a la actividad azocaseinolítica, el tioglicolato en el ML produce un pico de actividad en el día 11, que supera 7 veces el producido por el medio mineral no adicionado, para ese mismo día.



DISCUSIÓN

La reacción de sulfitólisis es la primera etapa en el mecanismo de degradación de la queratina por parte de las queratinasas, haciendo más susceptibles las cadenas polipeptídicas al ataque enzimático-proteolítico.

$Cys-SS-Cys + HSO_3^- \rightarrow Cys-SH + Cys-SSO_3^-$ reacción de sulfitólisis (6)

El agregado de agentes reductores aumenta la producción de enzimas queratinolíticas interviniendo en la ruptura de los puentes disulfuro entre restos de cisteína adyacentes de la doble hélice queratinica.

El tioglicolato es usado por *Trichophyton ajelloi* como agente reductor y fuente de C mientras que la cisteína es incorporada como fuente de C y N (5).

Podemos concluir que estos agentes reductores pueden potenciar la producción de estas enzimas, aumentando sus posibilidades de utilización en diversas tecnologías.

BIBLIOGRAFÍA

- Bradford, M. 1976. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Ann. Biochem.* 72, 248-254.
- Cantera, C., Goya L., Galarza B., Garro M.L, López M.L. 2003 "Hair saving unhairing process Parte 5. Characterization of enzymatic preparations applied in soaking and unhairing process". *JSTLC* 87 n°3, p.69; p.89-90, 2003.
- Galarza BC., Garro ML., Cavello I., Cazau, MC, Hours R., Cantera CS. 2007 "Fungal biotransformation of bovine hair: assessment of structural changes". *JSTLC* 91, n°6,. ISSN 0144-0322, 229-232.
- 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" Libro editado por la Revista Iberoamericana de Micología, Ed. RKS Kushwaha & Guarro J., cap 10. Bilbao. ISBN 84-607-0711-3, 77-85.
- Ruffin P., van Russel E., Biguet J., Biserte G., 1979. "Caractérisation partielle de deux aminopeptidases (arylamidases) extracellulaires du dermatophyte *Keratinomyces ajelloi*". *Biochimie*, 61, 495-500.
- Ruffin, P, Andrieu, Biguet, J. 1976 "Sulphitolysis in keratinolysis. Biochemical proof." *Sabouraudia*, 14, 181-184.