

# Optimización de la producción de un extracto enzimático keratinásico a ser utilizado en la industria textil

*D. Pippolo, L. Belobrajdic; A. Vázquez; P. Pelliquin, A. Berrutti; C. Aguerre*

## RESUMEN

El Sector Textil Uruguayo tiene dificultades para alcanzar los mejores estándares de calidad requeridos por los mercados internacionales que le permitan competir con mayores posibilidades. Para esto, un procedimiento promisorio, y amigable con el medioambiente, es el tratamiento enzimático de la lana con el que se obtienen resultados de similares características al de los sistemas de oxidación, mayores rendimientos tintóreos con un menor daño de las fibras, además de obtenerse efluentes sensiblemente menos contaminantes.

Este trabajo optimizó la producción de enzimas keratinásicas a partir de un *Bacillus* sp., obtenido de un screening de cepas realizado por el Departamento de Bioingeniería de la Facultad de Ingeniería y estudió el comportamiento tintóreo de tops de lana tratada con los extractos enzimáticos obtenidos, respecto a la lana sin tratar. El estudio se llevó a cabo empleando la Metodología de Superficie de Respuesta.

Se determinaron las condiciones de operación óptimas del fermentador de laboratorio de 3L, correspondientes a una agitación de 600 rpm y una aireación de 2,5 L/min, que se correlaciona con un coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno del sistema de  $k_La$  de  $140 \text{ h}^{-1}$ , que optimizaron la producción de enzimas keratinásicas ( $773 \pm 77 \text{ U/mL}$ ). Para la medida de la actividad keratinásica se desarrolló una técnica que utiliza keratin-azure como sustrato.

El estudio del comportamiento tintóreo de la lana tratada con los extractos enzimáticos keratinásicos, respecto a la lana sin tratar, confirmó que las diferencias de color obtenidas con las lanas tratadas son superiores cuanto mayor es el valor de actividad keratinásica del extracto. Los tops fueron teñidos con el colorante Rojo LANASOL CE. El valor máximo de la diferencia de color total medida en coordenadas Cielab, fue de 5,88. Se observó, que en todos los casos los colores obtenidos en los tops después de ser tratados enzimáticamente fueron más

oscuros, más saturados y más rojos que los teñidos sin tratamiento enzimático previo. Esto muestra el potencial que tiene este extracto enzimático queratinásico para ser usado en la industria textil.

## **1. Introducción**

El Sector Textil Uruguayo, tiene dificultades para alcanzar los mejores estándares de calidad requeridos por los mercados internacionales, así como para la adquisición de tecnología y equipamiento que le permita competir con mayores posibilidades. Para algunos de estos problemas, sin embargo, existe capacidad nacional para generar soluciones específicas y apropiadas a nuestra realidad. Vista esta situación el Departamento de Bioingeniería de la Facultad de Ingeniería y el Sector Textiles del LATU se abocaron al desarrollo de una tecnología limpia nacional capaz de solucionar algunos de los problemas antes mencionados, con la obtención de un producto de lana diferenciado tratado enzimáticamente que cumpla con las expectativas de los mercados actuales (De Giuda, M, *et al.*, 1997) (De Giuda, M., *et al.*, 2001).

Con el uso de enzimas queratinásicas, se obtienen resultados de similares características al de los sistemas de oxidación (cloro, permanganato de potasio, peróxido de hidrógeno, etc.) para la obtención de productos inecogibles y de mayor rendimiento tintóreo (Mossotti, R., *et al.*, 2001)(Riva, A., *et al.*, 1991)( De Giuda, M., *et al.*, 1996)( Cegarra, J., *et al.*, 1998). La gran diferencia entre el proceso enzimático y los anteriores radica en la forma de acción. El extracto queratinásico produce la ruptura de los enlaces disulfuro de la fibra en forma específica, por lo que el daño a la lana se disminuye y a su vez el proceso baja el grado de contaminación de los efluentes.

El tratamiento enzimático de la lana con nuestro producto, permite aumentar el rendimiento de tintura (De Giuda, M., *et al.*, 1998). Esto significa un ahorro para la empresa en el gasto de colorantes, ya que éstos son los de mayor incidencia en el costo de materia prima en las tintorerías de lana. Además al trabajar a menores concentraciones de colorante, se disminuye la carga de sustancia coloreada en las aguas de lavado y las de tintura ya que el agotamiento obtenido en las tinturas es mayor. Es necesario menor volumen de agua y menos tiempo de lavado para la

eliminación de colorante no adherido a la fibra de lana. De esta forma también es posible abaratar el costo de las plantas de tratamientos de efluentes de las tintorerías industriales.

El producto final del tratamiento con enzimas, es un producto diferenciado, por lo que puede comercializarse a un mayor precio de venta. Esto significa que es posible el empleo de colorantes más costosos como los colorantes reactivos, que confieren en general propiedades de buena solidez al lavado, colores brillantes, siendo éstas otras propiedades distintivas del artículo. Además, con el tratamiento enzimático de la lana se logran tinturas a baja temperatura. De esta forma se mejora la calidad de la lana, por una menor pérdida de las propiedades extensométricas, disminuyendo las roturas en la hilandería y en el tisaje.

Este trabajo pretende optimizar la producción de enzimas queratinásicas, a nivel de fermentador de laboratorio de 3 litros, variando los parámetros agitación y aireación. Además, se pretende optimizar la respuesta textil obtenida con el tratamiento enzimático de la lana, lo cual se valorará en función de la diferencia de color obtenida.

Para llevar a cabo dicha optimización se empleará para el diseño experimental la metodología de superficie de respuesta (Box, *et al.*, 1978), la cual consiste en un grupo de técnicas matemáticas y estadísticas útiles para el modelado y análisis en aplicaciones donde la respuesta de interés está influenciada por varias variables. El objetivo de la metodología de superficie de respuesta es determinar las condiciones de operación óptimas para el sistema o determinar una región del espacio de factores en la que se satisfacen las especificaciones de operación. Es poco probable que un modelo polinomial sea una aproximación razonable de la verdadera relación funcional sobre todo el espacio de variables independientes, pero para una región relativamente pequeña, éstas trabajan bien. Se emplea el método de mínimos cuadrados para estimar los parámetros de las aproximaciones polinómicas.

Sean las variables  $X_1$  y  $X_2$  a estudiar para optimizar la respuesta y de un sistema. La forma general de la superficie de respuesta de segundo orden o cuadrática para estos dos factores será:

$$y = b_0 + b_1 \cdot X_1 + b_2 \cdot X_2 + b_{11} \cdot X_1^2 + b_{22} \cdot X_2^2 + b_{12} \cdot X_1 \cdot X_2$$

En donde  $y$  es la respuesta y los índices  $b_i$  son los coeficientes de la ecuación cuadrática.

Para estimar los coeficientes  $b_i$  se utiliza el Diseño Compuesto Central (DCC) que consiste en:

1. Un diseño factorial completo de  $2^k$ , en el cual los niveles de los factores o variables independientes están en la forma codificada usual, -1, +1 (puntos cubo).

$n_0$  puntos centrales ( $n_0 \geq 1$ ), codificados como (0,0) (puntos centrales).

2. Dos puntos axiales en el eje de cada variable de diseño, a una distancia  $a = \sqrt{2}$  del punto central de diseño (puntos estrella).
3. El número total de puntos del diseño será  $N = 2^k + 2.k + n_0$  siendo  $k$  el número de variables en estudio.

Los puntos centrales suelen repetirse de manera de obtener una buena estimación del error experimental. Estos puntos centrales serán usados para testear el apartamiento de la superficie de respuesta de una superficie plana, y en las réplicas, testear la falta de ajuste.

Para obtener las estimaciones de los parámetros  $b_i$  de la superficie de respuesta así como la significancia de cada coeficiente y otros parámetros estadísticos de interés se contará con la ayuda del software "Statistica", versión 4.5, Ease Stat Co.

La significancia de cada coeficiente  $b_i$  obtenido se determinará usando el  $t$ -test y el  $p$ -value. Se tomará  $p = 0.05$  como valor máximo de  $p$  para decir que el coeficiente es significativo (nivel de significación al 95%). El valor de  $t$  también indicará el aporte o efecto al modelo que tiene el coeficiente. Cuanto más grande el valor de  $t$  y más pequeño el valor de  $p$ , más significativo será el correspondiente coeficiente en el modelo.

## **2. Materiales y Métodos**

### **2.2 Microorganismo**

*Bacillus* sp., obtenido por el Departamento de Bioingeniería a partir de un screening de cepas autóctonas, conservado en tubos de agar nutriente inclinado a 4°C.

### 2.3 Desarrollo de inóculo a nivel de matraces

Un cultivo stock del microorganismo se incubaba durante 10 horas a 37°C en tubos inclinados de agar nutriente con glucosa. La biomasa presente en la superficie de los tubos inclinados, se suspende agitándola con 10 mL de una solución salina estéril de NaCl 0.89%, en el mismo tubo. Se siembra en matraces de 1000 mL con 100 mL de medio de propagación, cuya composición se indica en la Tabla 1. Luego de adicionados los 10 mL de suspensión de biomasa a cada Erlenmeyer, éstos se incuban en un agitador orbital a 37°C y 300 rpm durante 10 horas.

**Tabla 1.** Composición del medio de propagación.

| Componente                            | Concentración (g/L) |
|---------------------------------------|---------------------|
| Caldo Nutriente                       | 8,0                 |
| Extracto de Levadura                  | 3,0                 |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>       | 0,700               |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>       | 0,300               |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O  | 0,300               |
| Mg SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 0,004               |
| Glucosa                               | 5,0                 |

### 2.4 Fermentación

Desarrollado el inóculo, a partir de la medida espectrofotométrica de la biomasa del cultivo, se calcula el volumen a utilizar para obtener una concentración inicial de 0,50g/L en el fermentador de laboratorio de 3L, modelo Bioflo III, New Brunswick Scientific, USA Se centrifuga ese volumen en condiciones asépticas a 9500 rpm, 4°C durante 15 min. Se descarta el sobrenadante y se suspende el centrifugado en 100 mL de medio de fermentación anteriormente separado para ese fin, y cuya

composición, Tabla 2, fue previamente optimizada por el Departamento de Bioingeniería.

Las condiciones experimentales comunes a todas las experiencias son: concentración inicial de biomasa, 0.5g/L; pH libre; tiempo de fermentación, 12h; volumen de medio de fermentación, 2500mL; temperatura de operación, 37°C; operación batch.

**Tabla 2.** Composición del medio de fermentación

| <b>Componente</b>                     | <b>Concentración (g/L)</b> |
|---------------------------------------|----------------------------|
| Caldo Nutriente                       | 8,0                        |
| Extracto de Levadura                  | 3,0                        |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>       | 0,700                      |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>       | 0,300                      |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O  | 0,300                      |
| Mg SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 0,004                      |
| Glucosa                               | 5,0                        |
| MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O  | 0,100                      |

## 2.5 Diseño de experiencias

Se utilizó un DCC siendo las variables independientes la velocidad de agitación y el flujo de aire, y como variables dependientes se utilizaron la actividad queratinásica a las doce horas de fermentación, y la diferencia de color que presentaron los tops de lanas tratados con los extractos keratinásicos de las distintas experiencias, respecto a la lana sin tratar.

**Los valores de las variables independientes para cada nivel del diseño se muestran en la**

Tabla 3.

**Tabla 3.** Codificación de las variables independientes en el DCC

| Variable                      | Nivel codificado |      |      |      |            |
|-------------------------------|------------------|------|------|------|------------|
|                               | $-\sqrt{2}$      | -1   | 0    | 1    | $\sqrt{2}$ |
| Agitación (rpm)               | 100              | 173  | 350  | 527  | 600        |
| Aireación (vvm <sup>#</sup> ) | 0,50             | 0,65 | 1,00 | 1,35 | 1,50       |

(<sup>#</sup>) v.v.m, volumen de aire, por volumen de medio de fermentación por minuto

**Los valores máximos y mínimos de las variables agitación y aireación que aparecen en la**

Tabla 3, surgen de experiencias previas realizadas por el Departamento de Bioingeniería.

Las condiciones ensayadas en cada experiencia particular se detallan en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Condiciones experimentales para cada experiencia.

| Experiencia | Agitación*  | Aireación*  |
|-------------|-------------|-------------|
| 1           | -1          | -1          |
| 2           | +1          | -1          |
| 3           | -1          | +1          |
| 4           | +1          | +1          |
| 5           | 0           | 0           |
| 6           | 0           | 0           |
| 7           | $-\sqrt{2}$ | 0           |
| 8           | $+\sqrt{2}$ | 0           |
| 9           | 0           | $-\sqrt{2}$ |
| 10          | 0           | $+\sqrt{2}$ |
| 11          | 0           | 0           |
| 12          | 0           | 0           |

(\*) variables codificadas

## **2.6 Medida de la actividad queratinásica**

Para cada muestra de enzima a ensayar, se preparan 4 tubos de vidrio roscado, y se pesa para cada uno de ellos 16,0 mg del sustrato Keratin Azure. Agregar seguidamente 4 mL de solución buffer Trizma 0,05 M (pH 8,7) a cada uno de los tubos anteriores. Posteriormente, agregar 1 mL de la muestra de enzima a tres de ellos, y el cuarto tubo, a utilizar como medida de blanco, se le agrega 1 mL de agua. Se colocan los tubos en un agitador rotatorio a 300rpm, termostatzado a 45°C. Los tubos se incuban durante 24 horas. Una vez cumplido el tiempo de reacción, los tubos se sumergen en agua con hielo durante 10 minutos para detener la reacción. Se agrega al tubo de medida de blanco 1 mL de muestra y se agita en el vórtex. Se centrifugan las muestras (incluido el blanco) durante 15 minutos a 9500 rpm y 4°C. Finalmente se mide la absorbancia de las muestras frente al blanco a una longitud de onda de 595 nm.

## **2.7 Medida de la actividad proteolítica**

La medida de la actividad proteolítica de los extractos enzimáticos se determinó por el método de Arima modificado (Arima, *et al.*, 1970). Se utiliza como sustrato una solución al 10% (p/v) de leche descremada en polvo en CaCl<sub>2</sub> 0.01 M. Esta solución es agitada durante 15 minutos en agitador magnético y luego se filtra a través de algodón. A 5.0 ml de la solución previamente incubada a 35°C durante 30 minutos en baño de agua, se adiciona 500 µl de una dilución conveniente de la enzima cuyo pH fue ajustado previamente a 7.0. Se tapa con tapón de goma y el tubo de ensayo se rota manualmente en el baño de agua hasta visualizar la formación de pequeños coágulos sobre la pared del tubo. Se definen como 400 U la cantidad de enzima que coagula el sustrato en 60 segundos.

## **2.8 Tratamiento enzimático de los tops de lana**

Para los ensayos se emplearon tops de lana peinada 100% de 24,5 µm. Se pesaron 4 g de top y se mezclaron con 200 mL de extracto enzimático (relación de baño 1:50), cuya actividad se correspondía con la alcanzada a las 12 horas de fermentación para cada una de las condiciones estudiadas. El pH se ajustó a 9 con



la adición de ácido acético. Se trabajó a 50°C durante 60 minutos a agitación constante. Para este fin se utilizó un baño termostatzado con temperatura programable y con velocidad de agitación constante, marca ROACHES, WASHWHEEL, T11.

## 2.9 Tintura

Es esencial la selección del colorante adecuado (Riva, A.,!993), en este caso se decidió el empleo de colorantes reactivos, dado que están recomendados para lanas tratadas con métodos oxidativos, cuyo efecto es similar al producido por el tratamiento enzimático.

Se utilizó el colorante Rojo LANASOL CE (Daxilan S.A.), cuyo grupo reactivo es el  $\alpha$ -bromo-acrilamida.

El método empleado para la tinción fue una modificación del método "LANASOL/LANASOL CE, Dyeing procedure for chlorinated and Hercosett-trated wool. Lab dyeing procedure, CTS W0, CO 4,7" (Abril, 1998). Se parte de un baño a 30°C durante 10 minutos, y posteriormente se aumenta la temperatura en 30 minutos hasta 60°C, donde se le mantiene durante 20 minutos. Se sube, entonces , la temperatura en forma gradual durante 20 minutos hasta 80°C y se mantiene a esta temperatura durante 30 minutos. Esta adaptación permite que las diferencias de color sean mayores. La Figura 1 representa la cinética de tinción empleada en el laboratorio.

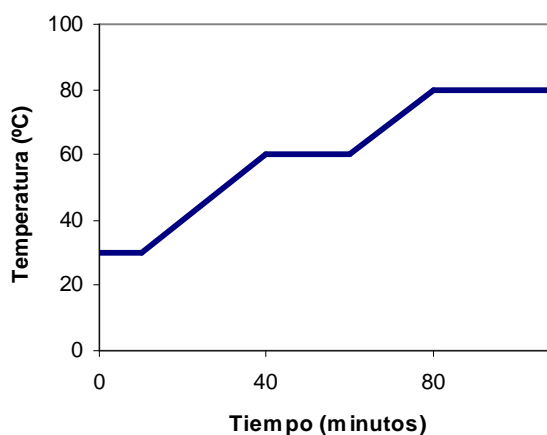


Figura 1. Cinética de tintura

La composición del baño de tintura fue la siguiente: 0,5 % de colorante; 0,5 % ALBEGAL, agente humectante; 10 % Sulfato de sodio, para mejorar la velocidad de migración; 3 g/L acetato de sodio, para eliminar la acidez libre, y ácido acético para ajustar el pH a 6,5. Se utilizó 1g de lana por cada 30mL de baño de tintura. Se empleó un baño termostatzado con temperatura programable, velocidad de agitación constante y con resistencia variable, para el control de la subida de temperatura marca ROACHES, T29. 1500W.

### **2.10 Medida de la diferencia de color en coordenadas Cielab**

La medida de la diferencia de color entre el blanco (top teñido en las mismas condiciones que la muestra pero sin el tratamiento enzimático) y la muestra tratada enzimáticamente, se llevó a cabo en el Sector Textiles del LATU por el método ITR TEX T023, y fueron expresadas como diferencia total,  $\Delta E^0$  (CIE, 1976). Se empleó el equipo Elrepho 2000 con luz D65, estando el observador a  $10^\circ$  y con un spot de 12 mm.

## **3. Resultados y Discusión**

Uno de los objetivos de este estudio es la optimización de la producción de enzimas queratinásicas variando los parámetros de operación agitación y aireación, lo que se correlaciona con el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $k_L a$ ). En la Tabla 5 se hace una comparación general de todas las experiencias, detallando para las mismas los valores de producción de enzimas queratinásicas a las 12 horas de fermentación y el valor del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno.

Si se observa la Tabla 5, se puede comprobar que, para valores del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno inferiores a  $46,9 \text{ h}^{-1}$  la actividad queratinásica no es detectada por el método empleado.

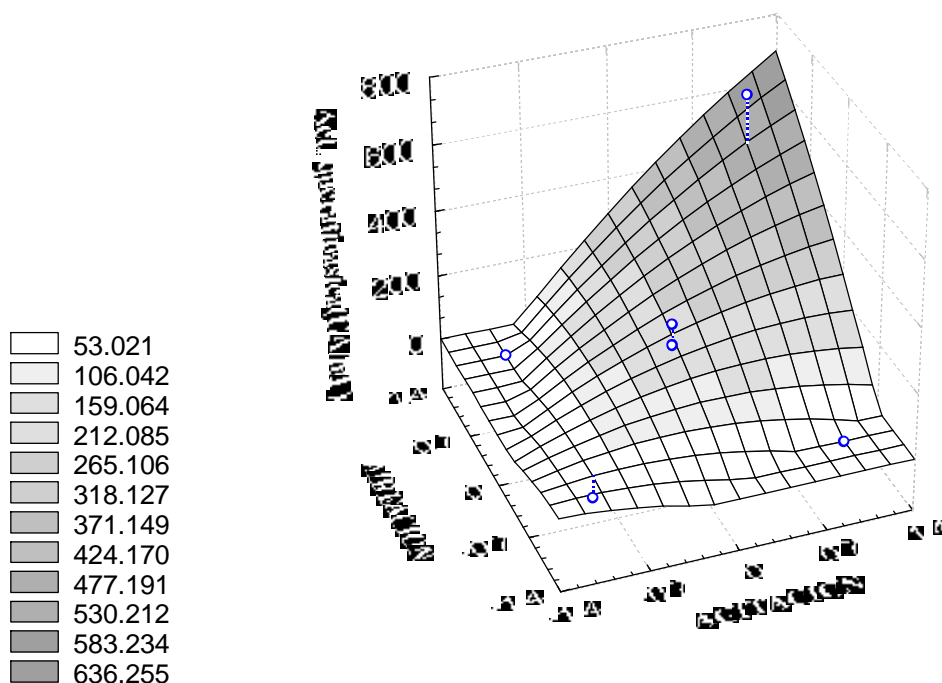
**Tabla 5.** Valores de actividad queratinásica, experimentales y predichos por el modelo, obtenidos a las doce horas de fermentación.

| Experiencia | $X_1^*$     | $X_2^{**}$  | $k_L a^{***} (h^{-1})$ | Actividad queratinásica (UA/mL) experimental | Actividad queratinásica (UA/mL) predicha | Residual |
|-------------|-------------|-------------|------------------------|--|--|----------|
| 1           | -1          | -1          | 10,5                   | 0 <sup>#</sup>                               | -20,73                                   | 20,73    |
| 2           | +1          | -1          | 100,7                  | 251± 25                                      | 276,31                                   | -25,31   |
| 3           | -1          | +1          | 11,8                   | 0 <sup>#</sup>                               | 93,19                                    | -93,19   |
| 4           | +1          | +1          | 114,4                  | 658± 66                                      | 797,23                                   | -139,23  |
| 5           | 0           | 0           | 46,9                   | 355± 36                                      | 353,50                                   | 1,50     |
| 6           | 0           | 0           | 46,9                   | 352± 35                                      | 353,50                                   | -1,50    |
| 7           | $-\sqrt{2}$ | 0           | 3,7                    | 0 <sup>#</sup>                               | -26,69                                   | 26,69    |
| 8           | $+\sqrt{2}$ | 0           | 139,9                  | 773± 77                                      | 681,19                                   | 91,81    |
| 9           | 0           | $-\sqrt{2}$ | 42,2                   | 0 <sup>#</sup>                               | 21,30                                    | -21,30   |
| 10          | 0           | $+\sqrt{2}$ | 49,9                   | 610± 61                                      | 470,20                                   | 139,80   |
| 11          | 0           | 0           | 46,9                   | 360± 36                                      | 353,50                                   | 1,50     |
| 12          | 0           | 0           | 46,9                   | 350± 35                                      | 353,50                                   | -1,50    |

(\*) variable codificada,  $X_1$ , agitación; (\*\*) variable codificada,  $X_2$ , aireación; (\*\*\*) coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, determinado por medio de una correlación deducida para el reactor Bioflo III según el Método del Sulfito, utilizando la misma configuración del reactor que en las corridas realizadas. (#) Valores de actividad queratinásica no detectados por el método empleado

El máximo valor de actividad queratinásica (773±77 U/mL) se obtiene para la Experiencia 8, en la cual el coeficiente volumétrico de oxígeno también es máximo. Si se compara el valor máximo de actividad queratinásica con el obtenido en las demás corridas, se observa que éste es mucho mayor, de hecho, el valor más próximo a este supone una caída en el rendimiento próxima al 40%. Por tanto, teniendo en cuenta lo anterior, las condiciones más favorables para la producción del extracto queratinásico, serían 600 rpm y 1,00 vvm (2.5L aire/min). En la Figura 2 se observa, que la máxima producción de enzimas queratinásicas se encuentra un poco desplazada de la región experimental, hacia una zona en donde los valores de

$k_{La}$  se hacen mayores, al aumentar la agitación. En la práctica, trabajar a valores de agitación mayores de 600 rpm no sería posible, ya que comienza a evidenciarse la pérdida de actividad del extracto enzimático por la acción del esfuerzo de corte del sistema de agitación.



**Figura 2.** Superficie de respuesta de la actividad queratinásica en función de las variables de operación agitación y aireación

El ajuste de los datos para la obtención de la superficie de respuesta se realizó mediante una función polinomial de segundo orden y los coeficientes de la ecuación característica se determinaron mediante análisis de regresión. La ecuación característica obtenida fue:

$$\text{Act. queratinásica (UA/mL)} = 353,5 + 250,3 \cdot X_1 + 158,7 \cdot X_2 - 13,1 \cdot X_1^2 - 53,9 \cdot X_2^2 + 101,8 \cdot X_1 \cdot X_2$$

donde: Act. Queratinásica (UA/mL), es el valor predicho por el modelo, a las doce horas de fermentación, y  $X_1$ ,  $X_2$  son las variables codificadas agitación y aireación, respectivamente.

El coeficiente de determinación obtenido  $R^2$  fue 0,929, lo cual implica que el modelo explica aproximadamente el 93% de los datos obtenidos de forma experimental, lo cual indica que el ajuste es bueno. Por otra parte, el valor de  $R$ , 0,964, es próximo a la unidad, lo que indica que existe correlación entre los valores experimentales y los predichos por el modelo.

Si se observan los valores residuales que aparecen en la Tabla 5 se comprueba que, como ya se había deducido por el valor del coeficiente de determinación, las diferencias entre el valor predicho por el modelo y el experimental no son elevadas. De hecho, la máxima diferencia es de un 23%.

La evaluación estadística del modelo se efectuó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) el cual permite determinar de forma objetiva si el conjunto de resultados obtenidos de los ensayos realizados en distintas situaciones y sujetos a errores, es válido. Mediante este análisis se podrá evaluar la significación y la adecuación del modelo propuesto. En la Tabla 6 se representan los datos obtenidos del análisis.

**Tabla 6.** Análisis de la varianza para el modelo de regresión de actividad queratinásica a las doce horas de fermentación

|                 | <b>SC</b> | <b>GI</b> | <b>CM</b> | <b>F</b> | <b>p</b> |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|
| <i>Cubo vs.</i> |           |           |           |          |          |
| <i>Estrella</i> | 18723,00  | 1         | 18723,00  | 2,3661   | 0,1846   |
| $X_1$           | 501094,13 | 1         | 501094,13 | 63,3246  | 0,0005   |
| $X_2$           | 201507,83 | 1         | 201507,83 | 25,4651  | 0,0039   |
| $X_1^2$         | 1102,50   | 1         | 1102,50   | 0,1393   | 0,7243   |
| $X_2^2$         | 18576,10  | 1         | 18576,10  | 2,3475   | 0,1861   |
| $X_1 \cdot X_2$ | 41412,25  | 1         | 41412,25  | 5,2334   | 0,0709   |
| <i>Residual</i> | 39565,54  | 5         | 7913,11   |          |          |

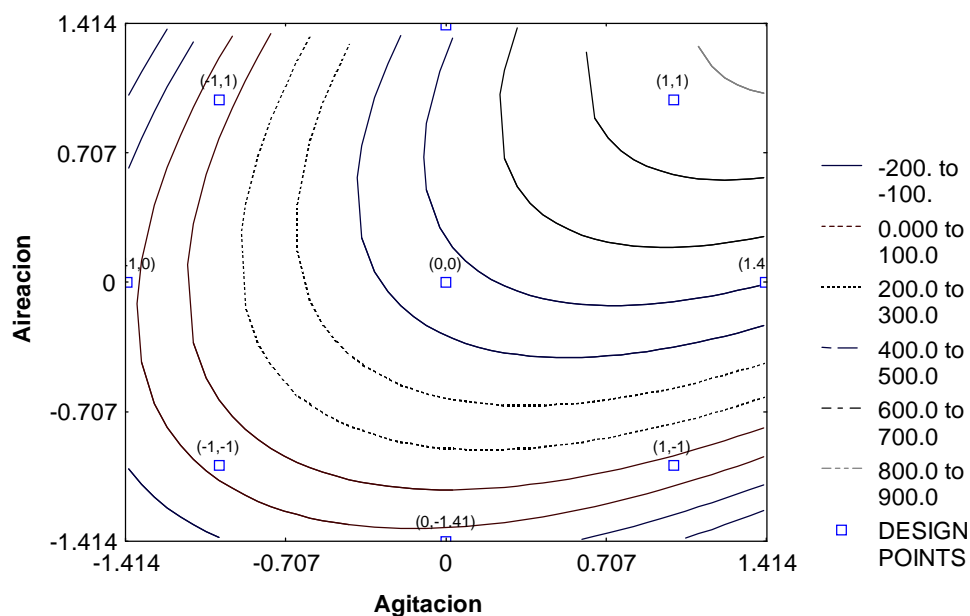
**SC**, suma de cuadrado; **GI**, grados de libertad; **CM**, cuadrados medios; **F**, estadístico de la distribución de Fisher; **p**, nivel de significación (probabilidad);  $X_1$  y  $X_2$  variables codificadas, agitación y aireación respectivamente.

El dato *Cubo vs. Estrella* indica el efecto de curvatura, es decir, mide cuánta influencia tiene el hecho de introducir los puntos estrella en el diseño. En este caso

no es significativo, lo cual se evidencia en un valor de  $p$  de 0,1846. En la Tabla 6 se puede observar que para la respuesta estudiada y en el rango experimental considerado, sólo son significativos dentro de la ecuación del modelo propuesto los parámetros de primer orden de agitación y aireación, dado que son los únicos que presentan un valor de  $p$  menor a 0,05 (95%).

Si se observa la Figura 2 se comprueba que la superficie tiene una forma bastante plana, lo cual verifica el resultado obtenido por medio del análisis de la varianza en el cual los términos cuadráticos no son significativos. Sin embargo se aprecia un aumento de la actividad queratinásica hacia valores altos de agitación y aireación.

Las curvas de nivel, representadas en la Figura 3, indican los puntos donde la función tiene un valor dado. El gradiente de la función en cada punto tiene una dirección perpendicular a la curva que pasa por ese punto. En el máximo, el gradiente es nulo y a partir de él la función no aumenta en ninguna dirección, por tanto, la curva de nivel degenera en un solo punto. Este punto máximo debería encontrarse en el centro de las curvas de nivel, y por tanto en el centro de la región experimental. En la Figura 3 se observa que el máximo se encuentra fuera de la región experimental.



**Figura 3.** Curvas de nivel para la actividad queratinásica en función de las variables codificadas agitación y aireación

En la **Tabla 7** se representan las actividades proteolíticas, junto a la diferencia de color en coordenadas Cielab, para cada una de las condiciones de experimentación estudiadas.

**Tabla 7.** Actividad proteolítica y queratinásica, a las doce horas de fermentación, y diferencia de color en coordenadas Cielab de los tops tratados con los extractos enzimáticos obtenidos en las condiciones de operación estudiadas.

| Experiencia | Agitación (rpm) | Aireación (vvm) | Actividad queratinásica (U/mL) | Actividad proteolítica (U/mL) | Diferencia de color, Cielab |
|-------------|-----------------|-----------------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| 1           | 173             | 0,65            | (*)                            | 1324                          | 2,52                        |
| 2           | 527             | 0,65            | 251                            | 80                            | 2,89                        |
| 3           | 173             | 1,35            | (*)                            | 1939                          | 5,72                        |
| 4           | 527             | 1,35            | 658                            | 457                           | 5,74                        |
| 5           | 350             | 1               | 355                            | 361                           | 4,99                        |
| 6           | 350             | 1               | 352                            | 2252                          | 5,57                        |
| 7           | 100             | 1               | (*)                            | 337                           | 3,86                        |
| 8           | 600             | 1               | 773                            | 414                           | 5,88                        |
| 9           | 350             | 0,5             | (*)                            | 2553                          | 4,43                        |
| 10          | 350             | 1,5             | 610                            | (*)                           | 4,64                        |
| 11          | 350             | 1               | 360                            | 361                           | 4,99                        |
| 12          | 350             | 1               | 350                            | 2252                          | 5,57                        |

(\*) Valores de actividad proteolítica no detectados por el método empleado.

A partir de los resultados obtenidos en la **Tabla 7** se comprueba que el tratamiento enzimático previo de la lana, provoca visibles mejoras en el proceso de tintura posterior. Los valores de la diferencia de color total, van desde 2,89 (valor no apreciable a nivel de rendimientos tintóreos) hasta 5,88, que ya daría lugar a resultados comparables con los obtenidos por medio de un tratamiento oxidante.

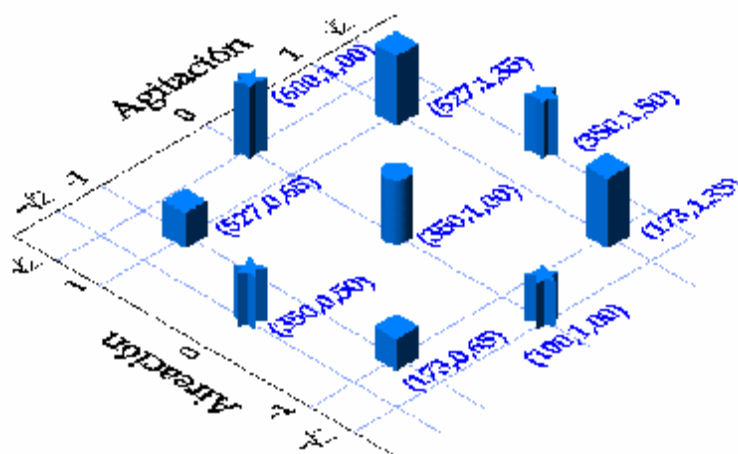
Además, se observa que en todos los casos los colores obtenidos en los tops teñidos después de ser tratados enzimáticamente son más oscuros, más saturados y más rojos que los teñidos sin tratamiento (datos no mostrados).

Si bien no se pudo encontrar un modelo matemático que representara el comportamiento de la diferencia de color dentro de la región experimental, lo que sí

se pudo ver es que a mayor actividad queratinásica, son mayores las diferencias de color presentadas en lanas tratadas con esos extractos enzimáticos.

En la **Tabla 7** se puede observar, además, que los buenos rendimientos tintóreos no dependen únicamente de la actividad queratinásica del extracto, dado que hay casos en los cuales la actividad es baja, o incluso no detectable por el método empleado, y sin embargo la diferencia de color total da lugar a resultados similares a los obtenidos por tratamiento oxidante. Esto significa que no sólo las enzimas queratinásicas actúan sobre la lana, sino que es importante la presencia de otras enzimas en el medio de fermentación, que también mejoran las propiedades textiles de la lana.

En la Figura 4 se observa, de forma cualitativa, que la máxima diferencia de color medida se encontraría hacia la zona de mayor agitación y aireación de la región experimental.



**Figura 4.** Representación de la región de estudio añadiendo los valores de diferencia de color obtenidos entre tops de lana tratados con extracto enzimático extraído a las doce horas de fermentación y tops sin tratar

Se puede observar que la región experimental de altos valores de actividad queratinásica se corresponden con altos valores de diferencia de color.



#### 4. Conclusiones

Mediante la Metodología de Superficies de Respuesta fue posible encontrar un modelo capaz de explicar los valores experimentales dentro de la región de experimentación para la actividad queratinásica medida a las doce horas de fermentación. Los valores más altos de actividad queratinásica se obtienen para valores elevados del coeficiente de transferencia de oxígeno, que se corresponden con valores altos de agitación y aireación, como se pudo ver en la Figura 2. El valor óptimo de actividad queratinásica ( $773\pm 77\text{U/mL}$ ) se obtuvo para un valor de  $kLa$  de  $140\text{ h}^{-1}$ , que se correspondió con una agitación de  $600\text{ rpm}$  y una aireación de  $2,5\text{ L/min}$ . No se pudo encontrar un modelo que representase el comportamiento de las diferencias de color presentadas por los tops de lana tratados enzimáticamente con la actividad queratinásica de los mismos. Sin embargo, es de destacar que altos valores de actividad queratinásica se corresponden con altos valores de diferencia de color, lo cual está de acuerdo con la información bibliográfica manejada. Además, se observa que en todos los casos los colores obtenidos en los tops teñidos después de ser tratados enzimáticamente son más oscuros, más saturados y más rojos que los teñidos sin tratamiento.

Es importante destacar el hecho de que la mejora de las propiedades de la lana se obtiene no solamente cuando el extracto enzimático tiene una alta actividad queratinásica, sino también en aquellos casos en los que actividad queratinásica es baja, pero hay en el extracto una alta actividad proteolítica. De modo que no sólo las enzimas queratinásicas actúan sobre las propiedades de la lana sino que la presencia de otras proteasas u otro tipo de enzimas presentes en el extracto enzimático, también mejora el proceso de tintura.

Del estudio realizado, se puede concluir que los resultados textiles obtenidos por medio del tratamiento enzimático son comparables, en la mayoría de los casos, con los resultados obtenidos por medio de tratamientos oxidantes, lo cual indica el potencial que tiene este tratamiento y este extracto enzimático queratinásico para mejorar las características de la lana, y poder ser utilizado en la industria textil para el mejoramiento de la calidad de los tejidos nacionales.

## Agradecimientos

El presente trabajo fue financiado por el BID-Programa de Desarrollo Tecnológico(PDT), Proyecto LATU S/C/OP/07/13.

## Referencias

- Arima, *et al.*, Milk Clotting Enzyme from *Mucor pusillus* var. Lindt, *Proteolytic Enzymes Meths. Enzimol.*, 19, 446-460, 1970.
- Box, G.E.P, Hunter,W, Hunte, J. *Statistics for Experimenters*. Wiley, 1978
- Cegarra, J., *et al.*, Parámetros químicos y físicos de la lana tratada enzimáticamente con una queratinasa, *Boletín Intexter*, N°104, 35-41, 1993.
- De Giuda, M., *et al.*, Tratamiento de Lanas con Keratinasas, trabajo presentado en el 4º Congreso de Tecnología Textil, Bs. As., Argentina, 1996.
- De Giuda, M, *et al.*, Mejoramiento de las cualidades de la lana por tratamiento enzimático, *Revista de Química Textil*, N° 133, 62-72, 1997.
- De Giuda, M., *et al.*, Efecto del tratamiento con enzimas proteolíticas sobre tejidos de lana nacional, trabajo presentado en el XV Congreso Latinoamericano de Química Textil, Montevideo, Uruguay, 1998.
- De Giuda, M., *et al.*, Desarrollo del proceso de aplicación de un extracto enzimático, obtenido a partir de *Bacillus* sp, para el mejoramiento de la calidad de tejidos de lana, Seminario Internacional - Aplicação da Biotecnologia na Indústria Têxtil, Blumenau, Santa Catarina, Brasil, 2001.
- Mossotti, R., *et al.*, Studies and Properties of Wool treated with proteases, *Seminario Internacional - Aplicação da Biotecnologia na Indústria Têxtil*, Blumenau, Santa Catarina, Brasil, 2001.
- Riva, A., *et al.*, Influencia de Tratamientos Enzimáticos en la Tintura de la Lana, *Bol. Intexter*, N° 100, 25-43, 1991.
- Riva, A., *et al.*, Acción de una keratinasa en la reducción de la enfieltrabilidad de la lana, *Técnica Textil Internacional*, 2, 35-41, 1994.