

Efecto del tratamiento con enzimas proteolíticas sobre tejidos de lana nacional



Por Laboratorio Tecnológico del Uruguay: **M. De Giuda, D. Píppolo, A. Fernández, A. Martínez, T. Zinelli**

Por Facultad de Ingeniería: **L. Belobrajdic, A. Vázquez, C. Manancero, A. Berrutti, H. Varela**



1 Introducción

Los mercados asignan a la calidad de los productos una importancia cada vez más creciente. Por ello las empresas se ven en la necesidad de mejorar la competitividad para conseguir mercados más exigentes.

El sector textil uruguayo y en general toda la industria, tiene dificultades para alcanzar los mejores estándares de calidad requeridos por los mercados internacionales, así como para la adquisición de tecnología y equipamiento que permita competir con mayores posibilidades. Para algunos de estos problemas, sin embargo, existe capacidad local 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.

En este caso se está trabajando con productos y procesos nuevos, que efectivamente consigan mejorar la calidad de los artículos que la industria textil lanera uruguayana hoy ofrece al mundo y posibiliten obtener nuevos mercados, hasta ahora inaccesibles, así como productos y procesos que permitan optimizar las operaciones industriales y reducir costos e insumos.

Se está en condiciones de desarrollar biotecnologías que, con estas características, sean soluciones reales a problemas concretos: permitan tinturas a menor temperatura y por ende menos roturas en la hilandería, disminuyan la afieltrabilidad, aumenten el rendimiento tintóreo, etc.

En este trabajo se está desarrollando la producción de un extracto enzimático obtenido a partir de desechos agroindustriales, adecuado para su uso a nivel comercial. La aplicación de este extracto a telas o tejidos de lana sustituye procesos contaminantes como el clorado, o tratamiento con permanganato de potasio. Los procesos anteriores realizan un ataque muy agresivo a la lana, mucho más que el enzimático, siendo muy riesgosos desde el punto de vista de la mano de obra que controla los mismos. Se evitan también los altos niveles de contaminación producidos en los efluentes cuando se aplican los métodos antes mencionados.

El desafío del desarrollo de una tecnología limpia para la industria textil, fue acompañado por una empresa de gran importancia a nivel nacional como lo es HISUD S.A. Su contribución primordial al presente trabajo será en la etapa de experimentación a escala piloto e industrial.

1.1 Propiedades de los tejidos de lana tratados enzimáticamente

Con el uso de enzimas keratinásicas, se obtienen resultados de similares características al de los sistemas de oxidación (clorado, permanganato de potasio, peróxido de hidrógeno, etc.) para la obtención de productos inecogibles y de mayor rendimiento tintóreo ^{(1) (2) (3)}. La gran diferencia entre el proceso enzimático y los clásicos radica en la forma de acción de ambos procesos. El extracto keratinásico 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.

1.1.1 Encogimiento al lavado

Un tejido de punto o una tela plana de lana puede presentar dos tipos de encogimiento durante el lavado:

- encogimiento por relajamiento
- encogimiento por afieltramiento

El primero es el encogimiento resultante de la distensión de los esfuerzos impuestos en la fabricación de la estructura. Dicho encogimiento no es progresivo y no es exclusivo de los tejidos de lana.

El encogimiento por afieltramiento es progresivo. El afieltramiento es restringido a la fibra de lana y a aquellas fibras de características similares, se produce cuando los productos de lana son agitados en medios acuosos. El fenómeno está relacionado con el hecho que estas fibras son muy elásticas en estado húmedo y exhiben

un efecto de fricción direccional, cuya causa es que el coeficiente de fricción de la lana es mayor en la punta disminuyendo hacia la raíz. En consecuencia durante la agitación, las fibras de lana tienden a moverse sólo en el sentido de la raíz, lo que produce un enredamiento debido al efecto dentado de la fibra.

El mayor problema en la producción de lana lavable es eliminar el encogimiento por afieltramiento. Como se sabe, el proceso de clorado se usa actualmente con ese fin. Se han desarrollado diferentes tecnologías para sustituirlo, por ser un proceso de difícil control.

1.1.2 Rendimiento tintóreo y solidez al lavado

El tratamiento enzimático de la lana permite aumentar el rendimiento de tintura. Esto significa un ahorro para la empresa en el gasto de colorantes, ya que estos son los gastos 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. De esta forma también es posible abaratar el costo de las plantas de tratamientos de efluentes de las tintorerías industriales ⁽³⁾⁽⁴⁾.

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; ésta es otra propiedad distintiva del artículo.

1.1.3 Tintura a baja temperatura

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. También se logra un menor amarilleamiento de las fibras, siendo esta una característica relevante en las tinturas de colores claros.

1.2 Detalles del trabajo

Hay que tener en cuenta la interdisciplinariedad del presente trabajo:

*por un lado la generación a nivel nacional de una industria: la de producción de enzimas proteolíticas para lana y por otro,

*la optimización en la industria textil nacional de los procesos que emplean esas enzimas y de las etapas posteriores.

En base a lo anterior se puede dividir el trabajo en cuatro puntos fundamentales, según la etapa o la industria a la cual se realice la transferencia de tecnología:

- desarrollo, puesta a punto y optimización de una tecnología nacional para la producción de enzimas para la industria textil. Este punto involucra establecer una industria biotecnológica nacional, capaz de generar, en el futuro, fuentes de trabajo para el país, así como inversiones.
- desarrollo de técnicas analíticas para evaluación de la actividad enzimática del complejo producido, descrito en 2.4.
- para la industria textil nacional: optimización del tratamiento de la lana con el producto enzimático. Estudiar la modificación necesaria a realizar en las etapas posteriores, ya que debido al empleo de lana pretratada, los procesos de tintura se ven afectados. La cinética de la tintura se ve modificada pues disminuye la resistencia a la penetración del colorante a la fibra y por ende aumenta la afinidad. Este efecto puede provocar un manchado si no se regulan diferentes parámetros en el proceso de teñido.
- finalmente, contemplar al cliente de la industria textil nacional, es decir al confeccionista que en muchos casos se puede encontrar en el exterior del país. Para ello se ha visto la necesidad de asegurar la calidad de funcionamiento del producto tratado. Esta información, que no siempre es suministrada por el fabricante del producto comercial, es primordial para garantizar el comportamiento posterior de las prendas.

1.3 Producción del extracto enzimático a partir de desechos agroindustriales

En el marco de la política implementada por el Departamento de Bioingeniería en los últimos años, en cuanto al desarrollo de tecnologías limpias, se realizó una búsqueda de microorganismos autóctonos capaces de producir enzimas proteolíticas de aplicación industrial ⁽⁵⁾. En el programa de screening de cepas antes mencionado, los microorganismos del género *Bacillus* fueron especialmente considerados. Esto es debido a que dichos microorganismos se caracterizan por la producción de proteasas y amilasas de gran aplicación a nivel industrial. Además, este género de microorganismos es considerado seguro desde el punto de vista sanitario para su manejo en gran escala.

Se aisló un total de 130 microorganismos, de los cuales uno presentó características destacables en el

tratamiento de la lana ⁽⁶⁾. El extracto enzimático keratinásico obtenido a partir de esta cepa produjo la deseada ruptura de los enlaces disulfuros de la fibra, como ya se mencionó.

A partir de la cepa del género *Bacillus* seleccionada en el programa de screening, se sembraron medios de cultivo de diferente composición. Con los extractos enzimáticos obtenidos se estudió el desempeño de los mismos sobre la lana.

La viabilidad económica de estos extractos de origen microbiano, está directamente vinculada con el costo del medio de cultivo. Inicialmente, la producción del extracto enzimático fue realizada a partir de medios de cultivo provenientes de laboratorios comerciales (Britania, Difco, Merck, etc.). La utilización de estos medios hace que el proceso de producción sea económicamente no viable a nivel industrial. Con tal motivo se utilizaron desechos y sub-productos agro-industriales para la formulación de un medio de cultivo de uso industrial adecuado para la producción de proteasas para aplicación en la industria textil, como una alternativa atractiva desde el punto de vista económico y ecológico.

Los sub-productos y desechos agro-industriales son causa de alarma a nivel mundial. En particular los provenientes de la industria láctea representan un serio problema de difícil solución para nuestro país⁽⁷⁾. La utilización de suero y permeado lácteo ha sido objeto de una intensa investigación en los últimos años, debido a los grandes y crecientes volúmenes de este sub-producto de la industria lechera. El tratamiento de este tipo de efluentes es costoso debido a la alta DBO₅ (mayor a 50 kg/ton). Dada la composición del mismo (proteínas, lactosa, vitaminas, minerales, etc.), es muy factible su aplicación como medio de cultivo. Su uso principal en Uruguay, es como alimento animal de bajo costo.

Para el presente trabajo se detallan solamente los resultados obtenidos a nivel de matraces para dos de los medios ensayados. De los resultados desde el punto de vista textil se seleccionó el medio de cultivo a partir del cual se puede obtener el extracto más apropiado. Del análisis de los resultados obtenidos en la producción del extracto enzimático (composición del medio de cultivo, agitación, aireación, pH, temperatura, etc) se definieron los parámetros de escalado. Con estos parámetros se está realizando el escalado a nivel de fermentador piloto (3 y 10 litros).

1.4 Desarrollo de técnicas analíticas de actividad proteolítica

La industria textil uruguaya que está usando extractos enzimáticos comerciales carece habitualmente de la información necesaria por parte de los fabricantes de estos productos sobre la forma de medir la actividad proteolítica de los mismos. Esto implica no poder determinar la actividad del producto en stock ni la actividad de una nueva partida del producto. Se desarrollaron técnicas analíticas sencillas para la medida de la actividad proteolítica de productos enzimáticos de aplicación textil. Se tuvo en cuenta que estas técnicas iban luego a ser aplicadas en la industria, por lo que se trató que fueran lo más sencillas posibles y que el equipamiento necesario fuese el mínimo y más elemental, de forma de evitar a la empresa gastos en equipamiento sofisticado, con un uso muy restringido.

Estas técnicas son también fundamentales para el monitoreo de la actividad proteolítica durante los procesos fermentativos de obtención de los extractos enzimáticos.

Es decir que este punto es esencial para el control de calidad de la industria biotecnológica de producción de enzimas, pero también para su cliente, la industria textil nacional, que podrá controlar la partida recibida o su stock y la dosificación en el tratamiento de la lana, sin correr riesgos de daño a la producción y sin desperdicio del producto.

1.5 Transferencia a la industria textil

1.5.1 Tratamiento con extracto enzimático

En este punto del proyecto se estudió la optimización del tratamiento con los extractos enzimáticos producidos. Las variables de importancia fueron: pH, temperatura, tiempo y actividad enzimática inicial del tratamiento.

En estudios anteriores se determinó la relación entre el tiempo de tratamiento y la temperatura ⁽³⁾. Se estableció una temperatura óptima de trabajo de 60 °C para tiempos de tratamiento de 60 min. Temperaturas inferiores significaban tiempos de trabajo de 2, 4 o más horas, los cuales no eran factibles en la industria ⁽⁷⁾. Estos estudios se realizaron a nivel de equipo de tinte multiposición (250 mL).

En el presente trabajo se estudió a escala piloto (jigger de 1.0 L), la optimización del pH del tratamiento con los diferentes complejos enzimáticos. Las respuestas del proceso que se evaluaron fueron: rendimiento tintóreo (con colorantes reactivos), encogimiento y resistencia a la tracción. Las dos primeras respondían directamente a los objetivos del trabajo respecto al producto diferenciado que se ofrece. La tercera buscaba demostrar la influencia de estos tratamientos en la resistencia a la tracción por tira deshilada y evidenciar o no un deterioro de las propiedades mecánicas de la tela tratada.

Determinando estas variables, es que se está en condiciones de realizar la transferencia a nivel piloto industrial.

Los resultados y discusión de este tratamiento se muestran en los puntos 3.2, 3.3, 3.5 y 3.6.

1.5.2. Etapas Posteriores

La obtención de tinturas igualadas de lana es uno de los principales objetivos del tintorero. Se puede entender en sentido amplio que una tintura está igualada cuando dos muestras extraídas al azar de diferentes puntos de la pieza, o de la prenda tiene una diferencia de color en coordenadas Cielab de "trazas", o lo que el cliente acepte como límite ⁽⁸⁾. En las tinturas de lana se puede encontrar dos tipos de "desigualación": zonas teñidas de mayor o menor intensidad, distribuidas en diferentes partes del tejido, o diferencias en el tono de las fibras que constituyen los hilados a todo lo largo de la pieza (esta forma se denomina "skitteriness").

La primera forma de desigualación es debida esencialmente a la maquinaria, o a la distribución del material en la misma. La mala distribución del material, la circulación no uniforme del baño a través del sustrato textil, o una no homogénea distribución de temperaturas, aumentan las posibilidades de que la tintura resulte desigualada. Este efecto se ve incrementado si el colorante es de gran afinidad, o si la lana está pretratada química o enzimáticamente, como en el caso en estudio. Para solucionar este problema se debe trabajar con colorantes seleccionados con buenas propiedades de migración y emplear cinéticas de tintura más moderadas.

En función de lo descrito antes se seleccionó el empleo del método *optilan* para colorantes reactivos para lana. Este método es de los más adecuados para la obtención de tinturas igualadas para lana tratada por el método tradicional clorado/Hercosett. Por ello se decidió su empleo en las lanas pretratadas por el método enzimático. Con el método *optilan* se obtiene buena solidez al lavado y especialmente buena solidez al frote húmedo. Este método se basa en controlar la cinética de tintura por medio del control de la temperatura, haciendo que ésta suba lentamente. Se emplearon los colorantes reactivos *Drimalan F*.

1.6 Calidad de funcionamiento del producto tratado

Como se indica en la norma ISO 9000-1 "Normas para la gestión de la calidad y el aseguramiento de la calidad", pueden identificarse cuatro facetas que son clave para la calidad del producto:

- *calidad debida a la definición de las necesidades del producto
- *calidad debida al diseño
- *calidad debida a la conformidad con el diseño del producto
- *calidad debida a la asistencia al producto

La cuarta faceta es la calidad que resulta de proporcionar asistencia al producto a lo largo de su ciclo de vida, con el fin de asegurar a los clientes (confeccionistas) y a los otros involucrados (usuarios finales de las prendas) un producto con las características y valores diseñados. En este caso se puede entender que la seguridad de funcionamiento (es decir confiabilidad, mantenibilidad de las propiedades mecánicas) es asegurar esa cuarta faceta de calidad.

2 Materiales y Métodos

2.1 Microorganismo

Se trabajó con una cepa autóctona de *Bacillus* sp. proveniente del programa de screening antes mencionado, la que fue conservada a 4 °C en tubos inclinados de agar nutriente.

2.2 Extractos Enzimáticos

Se emplearon los extractos enzimáticos denominados PK4, PK3 y PC. Los dos primeros extractos enzimáticos provienen de la fermentación de los Medios 1 y 2 respectivamente (citados en 2.3), mientras que el último es el producto comercial enzimático usado como referencia.

2.3 Medios de cultivo

2.3.1 Medio de propagación (inóculo)

El Medio 2, se preparó en 600 mL de agua de acuerdo a la composición dada en la Tabla 1. En el caso del Medio 1, se tomaron 600 mL de suero de leche proveniente de la fabricación de queso. En los dos casos el pH se

ajustó a 7.0 con hidróxido de sodio 1 N o con ácido clorhídrico 1 N. Cada Medio se trasvasó a 6 matraces de 1 L agregando 100 mL a cada matraz. Los matraces correspondientes al Medio 2 se esterilizaron durante 15 min. a 121°C, mientras que los correspondientes al Medio 1 fueron pasteurizados a vapor fluyente, 100 °C, durante 30 min.

2.3.2 Desarrollo del inóculo e iniciación

Se sembraron 6 matraces de 1 L conteniendo cada uno 100 mL del correspondiente Medio, a partir de 6 cultivos de *Bacillus* sp. en agar nutriente inclinado, incubados durante 12 horas. El cultivo del microorganismo se suspendió agitándolo en una solución salina estéril (cloruro de sodio 0.89%) en el mismo tubo. Cada matraz se sembró con 10 mL, se mezcló y se incubó en un agitador orbital de matraces, New Brunswick R-25/KC, a 37°C, 300 r.p.m. durante 12 horas. Desarrollado el inóculo, la concentración de biomasa fue medida turbidimétricamente a 650 nm y a partir de ésta, se calculó el volumen a utilizar para obtener una concentración inicial de biomasa de 0.2 g/L en el medio de fermentación. Se centrifugó el inóculo en condiciones asépticas a 9500 r.p.m., 4°C durante 15 min. y se suspendió el centrifugado en suero fisiológico. Finalmente se inoculó cada uno de los medios de fermentación.

Tabla 1 Medios de propagación y fermentación

Medios de Cultivo	Composición	g/L
Medio 1	Lactosa contenido en suero de leche	70
Medio 2	W-pol	24
	Extracto de levadura	6

Suero de leche proveniente de la elaboración de queso.

W-pol es un desecho proteico proveniente de la industria frigorífica, con una relación C/N de 8.65

2.3.3- Medio de fermentación

De acuerdo a la composición dada en la Tabla 1, se inocularon 10 matraces de 2L conteniendo cada uno 200 mL del correspondiente Medio.

2.4 Desarrollo de técnicas de actividad proteolítica

2.4.1 Actividad Coagulante

2.4.1.1 Fundamento

La caseína es una fosfoproteína que contiene un grupo prostético formado por el ester fosfórico de la serina o de la treonina. Hay tres clases bien definidas de caseína: α_s , β y K.

La α_s -caseína es la fracción más abundante y a su vez la más rica en fósforo. Su propiedad más señalada es la de ser insoluble en presencia de pequeñas cantidades de calcio ionizado (0.03 M) tanto a baja temperatura (alrededor de 0°C), como a temperaturas medias (20 - 40°C). Debido a este hecho se dice que es sensible al calcio.

La β -caseína presenta analogías con la anterior aunque no es sensible al calcio más que por encima de los 20°C. A baja temperatura permanece en solución en las mismas condiciones en que precipita la α_s -caseína. Igualmente se considera sensible al calcio.

La K-caseína, es una fosfoglicoproteína de carácter ácido. Difiere mucho por su composición y propiedades de las otras caseínas. Sus características más sobresalientes son:

- gran solubilidad en presencia de calcio, aún a concentraciones relativamente elevadas (0.4 M). Debido a este hecho se dice que es insensible al calcio y
- poder estabilizante frente al calcio para las otras caseínas, a las que incluye en un complejo soluble.

Contiene una proporción elevada de hidroxiaminoácidos, existiendo una acumulación de grupos —OH hidrófilos, lo que indica su gran solubilidad.

Una de las propiedades más sobresalientes de las α_s , β , y K-caseínas es la de poderse asociar para formar polímeros (asociación de moléculas idénticas) o complejos (asociación de moléculas diferentes). En presencia de calcio iónico tales complejos se reúnen para formar agregados heterogéneos a los que se suele llamar micelas. En ausencia de K-caseína y en presencia de calcio iónico, no se forman micelas con las otras caseínas, por lo que la K-

caseína actúa como coloide protector frente a los otros componentes.

Durante la coagulación enzimática de la leche, se distinguen dos fases sucesivas:

- *una fase enzimática o primaria*, en el curso de la cual la enzima ataca la caseína y solubiliza una pequeña parte de la misma. Esta acción enzimática altera la K-caseína, la que perdería sus propiedades protectoras, por lo que el coloide protector desaparece.
- *fase de coagulación o secundaria*, en donde reaccionan la mayor parte de las sustancias procedentes de la reacción primaria. En esta fase, se forman puentes salinos entre las micelas de caseína sensibles al calcio, debido a la presencia de iones de este metal. La coagulación se produce rápidamente, no teniendo lugar la misma sin previa reacción enzimática ⁽⁹⁾.

2.4.1.2 Técnica

Se empleó la técnica de Arima modificada ⁽¹⁰⁾.

Se utiliza como sustrato una solución al 10% (p/v) de leche descremada en polvo en CaCl_2 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 adecuada de la enzima. 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 mide el tiempo de coagulación en segundos.

Se define como 400 U la cantidad de enzima que coagula el sustrato en 60 segundos.

En caso de obtener tiempos de coagulación inferiores a 90 segundos es necesario la dilución del extracto enzimático cuya actividad está siendo determinada.

2.4.2 Actividad proteolítica sobre azocaseína

2.4.2.1 Fundamento

El método de medida de la actividad proteolítica con azocaseína es un método espectrofotométrico aplicable aún en muestras con muy bajos valores de actividad proteolítica ⁽¹¹⁾.

Mientras la coagulación enzimática de la leche es consecuencia de una reacción proteolítica limitada, donde la caseína constituye el sustrato, en este método el sustrato utilizado es caseína modificada por nitración (azocaseína) la cual es hidrolizada por la enzima de la misma forma que la natural. La azocaseína no hidrolizada durante el proceso de digestión precipita con el agregado de ácido tricloroacético (TCA) y se separa de los productos de hidrólisis por centrifugación. Los péptidos no precipitables con TCA se determinan espectrofotométricamente luego de la alcalinización de la solución (revelado). La nitración de la caseína le confiere a ésta y a sus productos de hidrólisis un color naranja que posibilita la medida en la región visible.

2.4.2.2 Técnica

Para cada muestra de enzima a ensayar, colocar 1.25 mL de la solución de azocaseína en un tubo de ensayo y dejar un tubo vacío para usar como blanco. Termostatar durante 5 minutos en baño de agua a 35°C. Agitar la muestra de enzima a ensayar en vortex, tomar con micropipeta 250 μL y agregar a uno de los tubos conteniendo solución de 4 mg/mL de azocaseína en Buffer Trizma pH 8. En el momento de la adición marcar tiempo cero en el cronómetro, mezclar con vortex y mantener en el baño agitado a 35°C durante 30 minutos (tiempo de digestión). Pasado un minuto repetir el procedimiento para un tubo vacío (blanco). Proceder de igual forma para cada muestra de enzima manteniendo un minuto entre cada agregado. Al cumplirse exactamente el tiempo de digestión para cada tubo se detiene la reacción agregando 1.25 mL de la solución de TCA. Se agita y se vuelve a dejar en el baño de agua por media hora mas para favorecer la floculación. Una vez cumplidos los tiempos, centrifugar todas las muestras (incluido el blanco) a 27.000 g y 4°C durante 10 minutos. A 1.5 mL de sobrenadante se le agregan 1.5 mL de solución de Na_2CO_3 0.3 M.

La intensidad del color anaranjado obtenido se mide a 440 nm contra el blanco. En caso que la absorbancia medida no se encuentre en el rango 0.05 a 0.200 deberá realizarse una nueva dilución del extracto enzimático cuya actividad está siendo determinada.

Se define una unidad de azocaseína como la cantidad de enzima que hidroliza 1 μg de azocaseína en un minuto en las condiciones de ensayo ⁽¹²⁾.

2.5 Lana

Para los ensayos realizados se utilizó a nivel de top lana Corriedale de 25 μ peinada la cual es la raza más abundante en el Uruguay (71%).

La tela de lana tiene las siguientes características:

Hilos de cuerpo 3200; título 1/21; tpm 340 S; 100% lana; 23 μ

Pasadas en telas 1700; título 1/21; tpm 340 S; 100% lana; 23 μ
Orillo título 2/36, tpm 500 S (se evitó el empleo del orillo en todos los ensayos, dejando una zona de 10 cm de seguridad para cortar las probetas)
Peso/m²: 300 g/m²
Ancho final: 150 cm
Diseño: sarga 2/1

2.6 Colorantes

Se emplearon colorantes reactivos Drimalan F:
Rojo Brillante Drimalan FB
Azul Brillante Drimalan FB

2.7 Método de tintura

Como ya se indicó el método seleccionado fue *optilan* que se detalla a continuación:

a) temperatura del baño 40°C

adición: 1 g/L acetato de sodio

X% Drimalan F

1% de Lyogeno FN líquido

pH = 5 ácido acético

b) subir en 40 minutos a 85°C

c) dejar entre 30 - 60 minutos a 85 °C

RB = 1/100

2.8 Determinación del agotamiento

Se midió el agotamiento final de los baños de tintura, mediante el empleo de un espectrofotómetro Unicam UV2, de longitud de onda variable.

2.9 Determinación de color

Método empleado ITR TEX T023 Sector Textiles (LATU)

Equipo empleado : Elrepho 2000

Iluminante : luz D 65

Observador : 10 °

Spot : 12mm

Blanco : Rx Ry Rz
82.22 81.65 77.38

Se empleó un programa para determinar las diferencias de color en unidades Cielab. En todos los casos se calculó la diferencia de color (ΔE) con respecto al mismo teñido sobre un sustrato de lana de iguales características pero sin ningún tratamiento enzimático.

2.10 Resistencia a la tracción

Método empleado: Protocolo TEX 004 Sector Textiles (LATU) (basado: ASTM D 5035-95)

Probeta obtenida por deshilado

Velocidad de extensión: 200 mm / min.

Distancia entre mordazas: 75 mm

Largo de mordazas: 75 mm

Equipo empleado: JJ Lloyd M 5K (T43) de elongación constante.

Ancho de la probeta: 25 mm

Nº de Probetas utilizadas en el sentido de la Trama : 8

Nº de Probetas utilizadas en el sentido de la Urdimbre : 5

Condición de la muestra: acondicionada

El resultado se expresa como la carga al momento de rotura:

sentido del largo (Urdimbre): kg/25mm

sentido del ancho (Trama): kg/25mm

Incertidumbre expandida:

<i>PROBETA</i>	<i>Sentido</i>	<i>Incertidumbre Expandida</i>
<i>Tira deshilada</i>	Urdimbre	± 2.82 kg/25 mm
	Trama	± 2.46 kg/25 mm

2.11 Solidez al lavado

Método empleado: Protocolo TEX 005 Sector Textiles (LATU) (basado en AATCC 61 1996)

Multifibra: N° 10 Testfabric

Se analiza el sangrado sobre:

lana, acrílico, poliéster, nylon, algodón, acetato.

Se realiza la comparación con Escala de Grises para evaluación de la transferencia de color ISO R105/1 Parte 3.

Incertidumbre: un punto para toda la escala, tipo B determinada por interlaboratorio.

Evaluación (en plataforma de evaluación con un ángulo de 45°):

- Clase 5 _ manchado inexistente o despreciable.
- Clase 4 _ valor 4 en la de Grises, el blanco está ligeramente manchado.
- Clase 3 _ valor 3 en la de Grises, el blanco está visiblemente manchado.
- Clase 2 _ valor 2 en la de Grises, el blanco está considerablemente manchado.
- Clase 1 _ valor 1 en la de Grises, el blanco está muy manchado.

2.12 Encogimiento al lavado en lavarropa

Método Empleado: ITR TEX E0 29 Sector Textiles (LATU): AATCC 135

Equipo empleado : lavadora automática Electrolux

Temperatura del lavado : 40° C

Ciclo de lavado : 3 (lavado común, no ciclo de lana)

Secado: al aire

Planchado: a vapor

2.13 Identificación de fibra

Método empleado: Protocolo Tex 406 a Sector Textiles (LATU) (basado en AATCC 20 A -1995)

Equipo empleado: Microscopio de luz polarizada Leitz Laborlux 12 Pol (T13) con equipo fotográfico incorporado.

2.14 Tratamiento enzimático

El tratamiento enzimático con los diferentes complejos ensayados (PK3, PK4, PC) se realizó en jigger piloto (John Jeffreys), tratando 8 m de tela en baño 1.0 L (RB = 1/3). Se trabajó a 60 °C durante 60 minutos. Cada complejo enzimático se ensayó a dos niveles de pH: 9.0 y 7.7.

Se realizó un tratamiento de lavado posterior, durante 10 minutos a 80 °C.

Se verificó luego de cada tratamiento que la actividad coagulante en el baño final fuese despreciable.

Los ensayos con PC se realizaron en las condiciones de concentración indicadas por el proveedor. Los niveles de actividad coagulante empleados para PK3 y PK4 corresponden a los habitualmente obtenidos a nivel de matraces y fermentador piloto (3 y 10 L)

3 Resultados y Discusión

3.1 Niveles de actividad proteolítica alcanzados por los extractos producidos

Con el grado de avance alcanzado actualmente en la producción de los extractos enzimáticos a nivel de matraces y fermentador, los niveles habituales de actividad coagulante logrados fueron:

para PK4 entre 600 y 900 U/mL

para PK3 entre 3000 y 4500 U/mL

3.2 Resistencia a la tracción

Se evaluó la resistencia a la tracción por tira deshilada para todos los complejos enzimáticos a los dos niveles de pH ensayados. En las Figuras 1 a 3 se pueden observar los resultados obtenidos.

Se puede observar que ninguno de los tratamientos afecta la resistencia a la tracción, aunque en todos los casos se aprecia una disminución respecto a la tela sin tratar en urdimbre. Esta disminución de hasta 4.5 kg/25mm no implica que el tratamiento sea riesgoso ya que la incertidumbre del método es ± 2.82 kg/25 mm.

3.3 Encogimiento al lavado en lavarropa

En las Figuras 4, 5 y 6 se pueden ver los resultados obtenidos para los distintos complejos enzimáticos. Se observa que todos los tratamientos disminuyen el encogimiento al lavado en lavarropa doméstica en aproximadamente un 64 %, no encontrándose diferencias entre el producto comercial y los extractos enzimáticos ensayados. Independientemente de la actividad proteolítica de los extractos ensayados (para PK3 entre 480 y 4267 U/mL, para PK4 entre 59 y 893 U/mL y para PC entre 0.8% y 6%), el encogimiento obtenido fue similar.

3.4 Solidez al lavado comercial

Los resultados obtenidos tanto para la tintura en color rojo como azul, fueron de transferencia o sangrado 5 o 4-5 en todas las fibras de la multifibra N° 10, para todos los tratamientos.

3.5 Diferencia de color coordenadas Cielab

Se ensayaron dos teñidos, de color azul (2% Azul Bte. Drimalan FB) y de color rojo (2% Rojo Bte. Drimalan FB).

Los resultados de la tintura con Azul se muestran en las Figuras 7, 8 y 9.

Para PK4 y PC al aumentar la actividad proteolítica se observa una mayor diferencia de color (ΔE). Este efecto no se evidencia para PK3, ya que la diferencia de color es prácticamente constante a todos los niveles de actividad ensayados.

En los tratamientos con el complejo PK3 no se observa influencia del pH. Las diferencias de color ΔE para los ensayos realizados en los cuatro niveles de actividad no son significativas. Con el extracto PK4 se observa que a pH 9.0 y 800 U/mL de actividad coagulante se logra una mejora de ΔE en 1.5 unidades respecto al tratamiento a pH 7.7. En PC se observa un comportamiento similar a PK3 respecto al pH de tratamiento.

Los resultados obtenidos en la tintura con azul para PK4 y PC son similares, con un ΔE de cuatro unidades. Para PK3, ΔE fue de tres unidades.

En las Figuras 10, 11 y 12 se muestran los resultados obtenidos para la tintura con Rojo.

Se puede observar que al aumentar la actividad proteolítica de PK3, aumenta la diferencia de color, para los dos niveles de pH de trabajo. La mayor diferencia de color a pH 7.7 es de 9 unidades, mientras que a pH 9.0, el mayor ΔE es de 6.

Para el extracto PK4 a pH 9.0 se evidencia una mejora en las diferencias obtenidas con el aumento de la actividad en el tratamiento, mientras que a pH 7.7 la diferencia de color obtenida en los tres niveles superiores de actividad proteolítica ensayados, es prácticamente constante. La mayor diferencia de color a pH 7.7 es de 12 unidades, mientras que a pH 9.0, el mayor ΔE es de 13.

Para PC se puede observar el mismo comportamiento a pH 7.7 y pH 9.0 al aumentar la concentración de producto, presentando un máximo de ΔE para la concentración de 1.5%.

En particular, para el estudio de PK4 a pH 9.0, los resultados obtenidos se pueden observar en la Tabla 2:

Tabla 2 Diferencias de color para la tintura con rojo usando PK4 a pH 9.0.

A.C., U/mL	δL	δc	δh	ΔE	Observaciones
800	8.81	-9.33	-2.06	13	muy grande, más oscuro, más saturado, más rojo
361	6.35	-6.52	-0.98	9	muy grande, más oscuro, más saturado, más rojo
208	5.49	-7.62	-1.49	10	muy grande, más oscuro, más saturado, más rojo
78	5.59	-7.37	-1.00	9	muy grande, más oscuro, más saturado, más rojo

Se empleó un programa para determinar las diferencias de color en unidades Cielab

3.6 Agotamiento de los baños de tintura

Se observó un mayor agotamiento de los baños de tintura en los casos de telas tratadas. Estos resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3 Agotamiento de los baños de tintura para el teñido con azul

	<i>Absorbancia 620 nm</i>	<i>Agotamiento(%)</i>
<i>Sol. madre (*)</i>	2.213	
	2.213	
	2.213	
	2.273	
<i>Sin tratar</i>	0.624	71.8
	0.584	73.6
	0.740	66.6
	0.578	74.6
<i>PK3, pH 7.7</i>		
4267	0.368	83.4
1979	0.661	70.1
1073	0.530	76.1
490	0.446	80.4
<i>PK3, pH 9.0</i>		
3822	0.392	82.3
1901	0.565	74.5
1085	0.597	73.0
480	0.433	81.0
<i>PK4, pH 7.7</i>		
893	0.311	85.9
425	0.376	83.0
200	0.520	76.5
59	0.281	87.6
<i>PK4, pH 9.0</i>		
800	0.674	69.5
361	0.369	83.3
208	0.506	77.1
78	0.341	85.0
<i>PC, pH 7.7</i>		
6.0%	0.459	79.2
3.0%	0.471	78.7
1.5%	0.611	72.4
0.8%	0.375	83.5
<i>PC, pH 9.0</i>		
6.0%	0.299	86.5
3.0%	0.401	81.9
1.5%	0.540	75.6
0.8%	0.355	84.4

(*) La solución madre es el baño de tintura a tiempo cero.

Se observa un comportamiento similar para la tintura con rojo.

3.7 Calidad de funcionamiento del producto tratado

Se verificó la calidad de funcionamiento de la tela tratada. Los resultados de resistencia a la tracción en

función del tiempo se muestran en la Tabla 4. Se observó que no hay modificación de la resistencia a la tracción ni con el tiempo ni con la condición de almacenamiento.

Tabla 4 Estudio en el tiempo de la resistencia a la tracción (kg/25mm) de tela plana tratada con PC y almacenada en diferentes condiciones

	<i>tiempo (días)</i>				
	0	7	14	21	28
<i>trama</i>					
<i>Tela sin tratar</i>	16.7	16.4	16.7	16.8	16.9
<i>Tela tratada con PC¹</i>	15.4	15.8	16.2	15.5	15.4
<i>Tela tratada con PC²</i>	15.4	15.6	15.6	15.5	15.3
<i>urdimbre</i>					
<i>Tela sin tratar</i>	18.6	18.2	17.9	18.5	18.3
<i>Tela tratada con PC¹</i>	16.2	15.6	16.1	16.3	16.5
<i>Tela tratada con PC²</i>	16.2	16.2	15.4	15.8	16.6

PC¹: Tratamiento de tela plana con producto comercial al 3%, calentamiento a 50°C a pH 9.0 durante 60 min, enjuague en frío 10 min, enjuague en frío con ácido fórmico a pH 3.5 durante 10 min. Se almacenó en bolsas de polietileno a humedad ambiente.

PC²: Tratamiento idéntico al anterior. Se almacenó en cámara a 65% de humedad relativa.

3.8 Identificación de la fibra

En las Figuras 13, 14, 15 y 16 se puede observar distintos niveles de la acción proteolítica, en particular keratinásica, de los extractos empleados sobre la fibra.

4 Conclusiones

- ◆ En el estudio de la resistencia a la tracción con el tiempo para lanas tratadas con PC, en las condiciones descritas en 3.7, se observó un mantenimiento en el comportamiento de la tela de lana.
- ◆ Ninguno de los tratamientos afecta a la resistencia a la tracción, ya que todos los valores obtenidos están comprendidos en la incertidumbre del método.
- ◆ Se disminuyó en un 64% el encogimiento para lavados en lavarropas domésticos, en ciclo no correspondiente a lana.
- ◆ De la observación visual de los tops teñidos se evidenció una mejora de los rendimientos tintóreos de hasta 30%.
- ◆ Los agotamientos de los baños de tintura fueron 15% superiores respecto a los agotamientos obtenidos para las tinturas de telas sin tratar.
- ◆ Las solideces al lavado fueron las deseadas: nivel 5, manchado inexistente.
- ◆ De los dos extractos estudiados se puede concluir que el complejo PK4 a pH 9.0 posee un comportamiento ligeramente superior:

Las respuestas encogimiento y resistencia a la tracción, para toda la tela tratada con los complejos enzimáticos fueron similares.

Para la tintura en azul las diferencias de color para el extracto enzimático PK4 a pH 9.0 y 800 U/mL fueron ligeramente superiores con respecto a los demás extractos y condiciones.

Para la tintura con rojo el extracto PK4 en el tratamiento a pH 7.7 y actividad coagulante mayor o igual a 200 U/mL y en particular a pH 9.0 y 800 U/mL, presentó diferencias de color superiores a los otros extractos y condiciones.

- ◆ Los extractos enzimáticos PK3 y PK4 pueden ser aplicados a nivel industrial como sustitutos del producto comercial utilizado en este trabajo como referencia y de actual empleo en la industria textil uruguaya.

Bibliografía

- ¹ Nolte, H., *et al.*, Effects of proteolytics and lipolytic enzymes on untreated and shrink-resist-treated wool, *J. Text. Inst.*, **87**, part 1, N° 1, 212-227, 1996.
- ² Riva, A., *et al.*, Acción de una keratinasa en la reducción de la enfieltrabilidad de la lana, *Técnica Textil Internacional*, **2**, 35-41, 1994.
- ³ De Giuda, M., *et al.*, Mejoramiento de la cualidades de la lana por tratamiento enzimático, *Revista de Química Textil*, N°133, 62-72, 1997.
- ⁴ Riva, A., *et al.*, Influencia de Tratamientos Enzimáticos en la Tintura de la Lana, *Bol. Intexter*, N° 100, 25-43, 1991.
- ⁵ Varela, H., *et al.*, Isolation, Identification, and Selection of Bacteria with Extracellular Unhairing Activity, *XII SINAFERM*, **2**, 756-761, 1996.
- ⁶ De Giuda, M., *et al.*, Tratamiento de Lanasy con Keratinasas, trabajo presentado en el 4° Congreso de Tecnología Textil, Bs. As., Argentina, 1996.
- ⁷ Zajed, G. y Winter, J., Batch and continuous production of lactic acid from salt whey using free and immobilized cultures of *lactobacilli*, *Appl. Microbiol. Biotech.*, **44**, 362-366, 1995.
- ⁸ Cegarra, *et al.*, Fundamentos científicos y aplicados de la tintura de materiales textiles, Universidad Politécnica de Barcelona, 1980.
- ⁹ Alais, C., Ciencia de la Leche, CECOSA, México, 1986.
- ¹⁰ Arima *et al.*, Milk Clotting Enzyme from *Mucor pusillus* var. Lindt, *Proteolytic Enzymes Meths. Enzimol.*, **19**, 446-460, 1970.
- ¹¹ Brock, F., *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, N° 3, 562, 1982.
- ¹² Longo, M., *et al.*, *Enz. Microb. Tech.*, **14**, 586, 1992.