

**EVALUACIÓN DEL PROCESO ENZIMÁTICO PARA LA PRODUCCIÓN DE
HIDROLIZADO DE COLAGENO A PARTIR DE LAS VIRUTAS DE CUERO “WET-
BLUE”**

**EVALUATION OF THE ENZYMATICAL PROCESS FOR THE PRODUCTION OF
COLLAGEN HYDROLYSATE FROM CHROME SHAVINGS**

**ANDREA CAROLINA NIETO CORTÉS
ANDREY CAMILO PEDRAZA GROSSO**



**UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ JORGE TADEO LOZANO
FACULTAD DE INGENIERÍA
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ D.C.
2017**

**EVALUACIÓN DEL PROCESO ENZIMÁTICO PARA LA PRODUCCIÓN DE
HIDROLIZADO DE COLAGENO A PARTIR DE LAS VIRUTAS DE CUERO “WET-
BLUE”**

**EVALUATION OF THE ENZYMATICAL PROCESS FOR THE PRODUCTION OF
COLLAGEN HYDROLYSATE FROM CHROME SHAVINGS**

**ANDREA CAROLINA NIETO CORTÉS
ANDREY CAMILO PEDRAZA GROSSO**

**TRABAJO DE GRADO COMO REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO
QUÍMICO**

**Directora:
Yineth Piñeros Castro
Ingeniera Química., MSc PhD
Directora Programas de Ingeniería**

**UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ JORGE TADEO LOZANO
FACULTAD DE INGENIERÍA
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ D.C.
2017**

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	5
METODOLOGÍA	7
Obtención y caracterización de la muestra.....	7
Desnaturalización.....	8
Hidrólisis enzimática.....	8
Descurtición.....	9
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	9
Desnaturalización.....	9
Efecto de la carga de sólidos	11
Efecto de la relación enzima-sustrato	12
Descurtición.....	14
CONCLUSIONES	15
AGRADECIMIENTOS	16
REFERENCIAS	17

RESUMEN

Las virutas de cuero wet-blue son uno de los residuos sólidos más contaminantes generado en la etapa de rebajado de la industria de curtiembres, actualmente en el barrio San Benito se producen gran cantidad de virutas las cuales no se les da la mejor disposición, estas virutas se caracterizan por tener alto contenido de proteína (colágeno) y cromo. Este proyecto se enfocó en la obtención de hidrolizado de colágeno evaluando la carga de sustrato y la relación enzima sustrato sobre el grado hidrólisis. Inicialmente se realizó la desnaturalización con NaOH y MgO, obteniendo mejores resultados con el NaOH nn. A partir de las virutas desnaturalizadas se realizó una hidrólisis enzimática con ayuda de la enzima Alcalase[®] 2.5L de Novozymes durante 6 horas a 60°C y pH 9. En el efecto sobre la carga de sustrato se encontró el mejor grado de hidrólisis con una carga de 20 g/L. Para el efecto de la relación enzima sustrato se encontró que a medida que aumenta la relación, aumenta el grado de hidrólisis. El mejor grado de hidrólisis fue de 4.811% con una carga de sustrato de 20 g/L y una relación enzima sustrato de 123 µL de Alcalase[®] / g de proteína con un rendimiento del 4.51%. Por último, se recuperó el cromo de la torta obtenida después de la hidrólisis para disminuir su carga contaminante (Cr⁺³) y darle una mejor disposición final, y el cromo recuperado pueda ser usado nuevamente en la operación de curtido.

Palabras Clave:

Virutas de Cromo, Grado de Hidrólisis, Alcalasa, Colágeno Hidrolizado, hidrólisis enzimática.

ABSTRACT

The shavings leather wet-blue are one of the most pollutant solid waste generated in the stage of shaving of the industry of tanneries, nowadays in San Benito they produce a lot of shavings which the best disposition is not given them, these shavings are characterized for having high contained of protein (collagen) and chrome. This project focused in the obtaining of collagen hydrolysate evaluating the substrate load and the enzyme- substrate ratio on degree hydrolysis. Initially the denaturalization was realized by NaOH and MgO, obtaining better results with the NaOH. From the denature shavings an enzymatical hydrolysis was realized by the use of the Alcalase[®] 2.5L of Novozymes for 6 hours to 60°C, pH 9 and 150rpm. The best degree of hydrolysis was found on the substrate load with a load of 20 g / L. For the effect of the enzyme/sustrate ratio it was found that as the ratio increases, the degree of hydrolysis increases. The best degree of hydrolysis was 4.811 % with a substrate load of 20 g/L and enzyme- sustrate ratio of 123 µL Alcalase[®] / g protein with a yield of 4.51%. Finally, the chromium was recovered from the cake obtained after the hydrolysis to reduce its pollutant load (Cr⁺³) and give it a better final disposal, and the recovered chrome could be used again in the tanning operation.

Keywords:

Chrome Shavings, Degree of Hydrolysis, Alcalase, Collagen Hydrolysate, Enzymatic Hydrolysis.

1. INTRODUCCIÓN

Las curtiembres en Bogotá representan una parte fundamental en la economía y la generación de empleo con más de mil familias dependientes de esta actividad económica. Según la Muestra Mensual Manufacturera - MMM del DANE, la producción de cuero en Colombia registró un crecimiento de 4.5% para el periodo de enero a mayo de 2015. Respecto a las ventas se observa una variación positiva de 2.8% y la generación de empleo en este sector muestra un incremento de 6.3% en los primeros cinco meses de 2015, en el primer semestre del 2015 las exportaciones de Wet-Blue fueron de US\$ 49.9 millones de los cuales Bogotá y Cundinamarca representan el 24% (Secretaría Distrital de Ambiente, 2015).

Los residuos sólidos como recortes y virutas representan un residuo contaminante difícil de eliminar. Este problema se hace más complejo debido al cromo, en Colombia se están empezando a controlar estos desechos lo cual motiva a planteamientos de aprovechamiento de estos residuos. Las curtiembres en Bogotá están enfrentando un problema de sellamientos de sus empresas debido a que muchas no cumplen con lo que exige la norma.

La operación de curtido se basa en la transformación de la piel en un producto resistente a la putrefacción, estabilizando el colágeno de la piel mediante una reacción con el agente curtiente, como las sales de cromo trivalente (Cr^{+3}).

En general, todo curtido a cromo es iniciado en pH bajo, a esta condición la afinidad de las sales de cromo por la proteína es mínima, ideal para la penetración del curtiente. Después de la adecuada penetración y adsorción, el pH es gradualmente elevado a 3.8 o 4 mediante agentes basificantes produciendo una reacción entre las sales de cromo y la proteína (Frankel, 1989).

En la operación de rebajado, las pieles entran a una operación mecánica de rebajado, para dar un espesor uniforme al cuero, produciendo unas virutas que contiene Cr^{+3} (Peréz, 2004).

Las virutas desechadas en la operación de rebajado, son un residuo recuperado para su posterior aprovechamiento en la industria del calzado y la marroquinería, pero estas industrias no suplen la oferta de virutas, por lo que el resto se compostea.

Según la secretaria distrital del ambiente de Bogotá para procesar 77.000 pieles por mes, se generan aproximadamente 1.157 toneladas/mes de residuos sólidos donde 434 toneladas son de virutas de cuero (Gomez, 2014).

El principal problema de las virutas de Wet-Blue es que tienen altas concentraciones de sales de cromo trivalente, el Cr^{+3} tiene un bajo impacto en los suelos, esto debido a la elevada capacidad de adsorción en los suelos arcillosos y/o con altos contenidos de materia orgánica, a diferencia del Cr^{+6} que es muy inestable. El Cr^{+3} puede pasar a Cr^{+6} dependiendo del potencial de oxidación y el pH del suelo. También el Cr^{+3} en bajas concentraciones constituye un micro elemento esencial en los animales, a diferencia del Cr^{+6} que es tóxico en bajas concentraciones (Chávez, 2010).

Este proyecto busca opciones para esta problemática utilizando las virutas desechadas de la rebajadora, dándoles un valor agregado al convertirlas en colágeno hidrolizado, éste hidrolizado es la mezcla de polipéptidos con una distribución de pesos moleculares que es función del grado de hidrólisis alcanzado. Esta sustancia tal y como se obtiene en la reacción de hidrólisis tiene aplicaciones limitadas debido al alto contenido de humedad y la presencia de cromo en el producto, por lo cual es necesario realizar un tratamiento adicional (Díaz et al., 2006).

Algunos de los usos del hidrolizado obtenido son: síntesis de polímeros, industria del plástico, del cuero, de la madera, de la construcción, en cosmética, en la fabricación de detergentes, en tecnología agropecuaria, y en la formulación de adhesivos (Cantera & Bértola, 1999).

Al hidrolizar las virutas en medio alcalino sirven como adhesivo, para fabricar tableros aglomerados, sustituyendo los adhesivos sintéticos ureicos que liberan componentes orgánicos volátiles (Flores et al., 2007). También son utilizados para elaborar aglomerados, utilizados como aislantes térmicos, al emplear como carga las virutas y como aglomerante el producto de hidrolizado de las mismas (Schneider et al., 2008).

Para obtener el hidrolizado se debe realizar inicialmente una desnaturalización, que se refiere a la ruptura de los enlaces que mantenían sus estructuras cuaternaria, terciaria y secundaria, conservándose solamente la primaria. En estos casos las proteínas se transforman en filamentos lineales y delgados que se entrelazan hasta formar compuestos fibrosos e insolubles en agua. Los agentes que pueden desnaturalizar a una proteína pueden ser: calor excesivo; sustancias que modifican el pH; alteraciones en la concentración; alta salinidad; agitación molecular; etc. El efecto más visible de este fenómeno es que las proteínas se hacen menos solubles o insolubles y que pierden su actividad biológica (Serrano, 2011).

La hidrólisis de las proteínas se realiza por medio de proteasas, estas enzimas hidrolizan las cadenas poli peptídicas de los sustratos proteicos, se realiza normalmente en un reactor, donde se debe controlar la agitación, pH, temperatura y tiempo de proceso.

En este caso, se utilizó Alcalase[®] 2.5L, fabricada por Novozymes (EC **3.4.21.62**) enzima de tipo hidrolasa que actúa sobre los enlaces peptídicos, sus condiciones óptimas son 30-65°C y un rango de pH de 7-10, la enzima está en estado líquido (Novozymes, 2017).

El grado de hidrólisis (GH) es la propiedad fundamental de un hidrolizado y va a determinar sus características y así mismo su posible uso (Benítez et al., 2008). Se expresa como la relación entre el número de enlaces peptídicos hidrolizados y el número de enlaces peptídicos totales en la proteína por unidad de peso (Adler-Nissen, 1986).

La reacción de hidrólisis se realizó a pH alcalino para determinar el GH, para determinarlo se utilizó el método pH-stat, el cual consiste en mantener constante el pH del medio reaccionante con adición de una solución básica, en este caso el hidróxido de sodio 0.1N, ya que a medida que transcurre la hidrólisis el grupo carboxilo terminal se disocia por completo y los protones formados se reparten de acuerdo con el equilibrio de protonación de los grupos α -amino liberados (Baez-Suarez et al., 2016).

Para minimizar el efecto en los suelos de los residuos con cromo (torta de cromo), se debe retirar el cromo de la torta, para esto se utiliza ácido sulfúrico (H_2SO_4) con el fin de precipitar las sales de cromo y reducir su impacto al realizar su disposición final (Reyes, 2016). Estos residuos, que por su elevado contenido proteico pueden ser utilizados como abono en suelos para agricultura, alimentación de animales, usos industriales diversos, etc. (Jordán, 2011). El cromo precipitado puede mezclarse con sulfato básico de cromo comercial en proporción 40:60 respectivamente, para curtir pieles para calzado colegial y confección (Ortiz & Carmona, 2015).

Este proyecto tuvo como objetivo estudiar el efecto de carga de sólidos y el efecto de la relación enzima-sustrato, estos dos sobre el grado de hidrólisis del colágeno.

En este proyecto se planteó aprovechar el volumen de estos residuos desechados con el fin de minimizar el impacto ambiental y aprovecharlo como materia prima, dándole un valor agregado, como se describió anteriormente.

2. METODOLOGÍA

2.1 Obtención y caracterización de la muestra

La muestra de virutas se obtuvo en Karismma Pelli SAS, una curtiembre del barrio San Benito en la ciudad de Bogotá, éstas se recolectaron después de realizar la operación de rebajado en bolsas herméticas. Las muestras se almacenaron a temperatura ambiente.

La humedad se determinó según lo establece la norma para cueros INEN 0565, utilizando una balanza de humedad Mettler Toledo HB43-S Halogen Classic Plus a $105^\circ C$. El nitrógeno total se determinó bajo el procedimiento de Kjeldahl obtenido por el método AOAC, la viruta estaba libre de humedad. El contenido de cromo se determinó bajo el método EPA 7190 espectrofotómetros de absorción atómica (AAS).

Estos dos últimos parámetros fueron analizados en el Centro de Biosistemas de la Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano.



Figura 1. Obtención de las virutas de la etapa de rebajado.

2.2 Desnaturalización

Para la desnaturalización se realizaron dos ensayos, en el primero se tomaron 40g de virutas, se agregó agua en una relación 1:7 y 4mL de NaOH 3M, con el fin de ajustar el pH a un valor de 9 aproximadamente. En el segundo ensayo se tomaron 40g de virutas, se agregó agua en una relación 1:7 y 1g de MgO para ajustar el pH. Posteriormente las muestras se agitaron en un agitador orbital a 250rpm y 60°C durante 90 minutos. Luego se recuperó la fracción sólida, se lavó hasta pH neutro, para su posterior caracterización e hidrólisis enzimática de la proteína. Estos procedimientos se realizaron con base en lo reportado previamente (Cabeza et al., 1998; Cantera & Bértola, 1999; Jordán, 2011; Reyes, 2016). El material desnaturalizado fue hidrolizado posteriormente.

2.3 Hidrólisis enzimática

La hidrólisis se realizó a partir de las virutas desnaturalizadas. Inicialmente se evaluó el efecto carga de sólidos sobre el grado de hidrólisis. Los ensayos se realizaron con cargas de 20, 30, 40 y 50 g/L, en unidades de 50 mL, pH 9 (ajuste con NaOH 0.1N), con la adición de 100µL de proteasa Alcalase® (Novozymes, 2017). Cada ensayo se realizó por triplicado. La hidrólisis se realizó a 150rpm y 60°C durante 6 horas, controlando el pH cada hora mediante la adición de NaOH 0.1N. Se registró el volumen adicionado para determinar el grado de hidrólisis. Finalmente, las fracciones se separaron por filtración a vacío, obteniendo en el filtrado el colágeno hidrolizado y en la torta, las virutas hidrolizadas listas para la descurtición.

Posteriormente, para evaluar el efecto de la relación enzima-sustrato sobre el grado de hidrólisis del colágeno, se realizó con una carga de 1 g de sólidos secos de las virutas desnaturalizadas con NaOH 3M para todos los ensayos, variando la relación enzima/sustrato en µL de enzima proteasa Alcalase®/g de proteína en el sustrato: 62 µL/g, 123µL/g, 185 µL/g y 247 µL/g, cada ensayo se realizó por triplicado. La hidrólisis se realizó a 150rpm y 60°C durante 6 horas, controlando el pH cada hora mediante la adición de NaOH 0.1N. Se registró el volumen adicionado para determinar el grado de hidrólisis. Finalmente, las fracciones se separaron por filtración a vacío, obteniendo en el filtrado el colágeno hidrolizado y en la torta, las virutas hidrolizadas listas para la descurtición.

El grado de hidrólisis (GH) se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación (Adler-Nissen, 1986):

$$GH = \frac{V_B * N_B}{M_P * \alpha * h_{tot}} * 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde:

- V_B es el volumen de base consumida en mL
- N_B es la normalidad de la base
- M_P es la masa de proteína (g de proteína en cada "batch")
- h_{tot} es el número total de enlaces peptídicos (eq/g proteína)
- α es el grado de disociación de los grupos amino liberados durante la hidrólisis

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK}}{1 + 10^{pH-pK}} \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$pK = 7,8 + \frac{298 - T(K)}{298 + T(K)} * 2400 \quad (\text{Ecuación 3})$$

El hidrolizado se secó a 60°C por 18 horas para obtener el contenido de sólidos. Éstos se caracterizaron mediante Cary 630 FTIR de Agilent Technologies.

2.4 Descurtición

Este procedimiento se realizó con 3.5 g de virutas hidrolizadas en base seca, se agregó agua en una relación 7:1 y la cantidad de H₂SO₄ necesaria para un pH entre 1-2. La reacción se realizó en el agitador orbital shaker a 150rpm y 60°C durante 8 horas, transcurrido este tiempo se dejaron las muestras en reposo por 16 horas, finalmente se filtraron las fracciones al vacío, obteniendo en el filtrado sulfato de cromo líquido y en la torta las virutas libres de cromo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Desnaturalización

En la figura 2, se realiza la comparación del grado de hidrólisis del material desnaturalizado, utilizando NaOH 3M y MgO 14 g/L con una carga de sólidos de 20 g/L. Se evidenció que el grado de hidrólisis es mayor en la desnaturalización con NaOH 3M, con diferencias estadísticamente significativas (p<0.05). La desnaturalización de una proteína se da cuando se rompen los enlaces que mantenían sus estructuras cuaternaria, terciarias y secundaria, conservando la primaria. Se desnaturalizó mediante factores como la temperatura, agitación y pH. En este caso, el colágeno pasa de ser un compuesto fibroso e insoluble a filamentos lineales y delgados (Serrano, 2011), por lo que la enzima proteasa pudo realizar la reacción de hidrólisis más fácilmente.

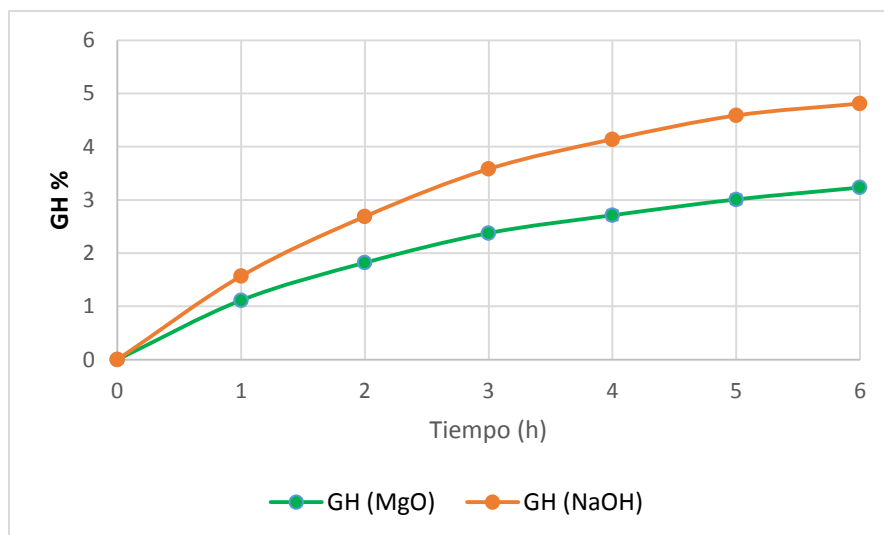


Figura 2. Comparación del GH en el tiempo de la desnaturalización con NaOH y MgO con una carga de sólidos de 20g/L.

Relacionado con las condiciones de desnaturalización, se han reportado múltiples condiciones, por ejemplo, Cabeza et al. en 1998 realizaron el procedimiento con MgO a escala piloto a 72°C y 16 rpm durante 6 horas (Cabeza et al., 1998), la desnaturalización con MgO también fue realizada por Kolomaznik y Viswanathan en 2001 a 70°C durante 3 a 5 horas, estos autores mezclaron el MgO con aminas, como isopropilamina y n-butilamina, para un mejor rendimiento (Kolomaznik & Viswanathan, 2001). Por otro lado, la desnaturalización con NaOH ha sido más común en la última década, Reyes en 2016 realizó el procedimiento a 60°C durante 4 horas y Jordán en el 2011 mantuvo la reacción en un rango de temperatura de 40-70°C (Jordán, 2011).

En este trabajo, se encontró mejor grado de hidrólisis con NaOH, esto se debe a que es una base fuerte frente al MgO que en presencia de agua forma $Mg(OH)_2$, siendo ésta una base débil (Burriel et al., 2008). La acción alcalina que ejerce el hidróxido de sodio da una mejor desnaturalización (Jordán, 2011) y por tanto un mayor grado de hidrólisis.

En la tabla 1, se encuentran los datos de caracterización de las virutas iniciales en comparación con lo reportado en la literatura y luego de la comparación de las virutas desnaturalizadas.

Tabla 1. Caracterización de virutas originales y desnaturalizadas.

	Nitrógeno %	Cromo %	Humedad %	Referencia
Virutas iniciales	16.58	2.57	28.4	(Jordán, 2011)
	17.33	3.99	57.4	(Reyes, 2016)
	16.8	4.75	55.77	Este trabajo
Virutas desnaturalizadas	14.65	6.33	78	(Cabeza et al., 1998)
	14.64	4.49	75.84	Este trabajo

Datos en base seca.

Los valores obtenidos de nitrógeno total, concentración de cromo y porcentaje de humedad de las virutas iniciales, se comparó con los estudios de Jordán en 2011 y Reyes en 2016 ya que éstos involucraron procesos y condiciones de estudio similares a este trabajo. Según la Tabla 1, se puede observar la similitud de los parámetros obtenidos de las virutas iniciales de las 3 investigaciones. Por otro lado, se presenta los datos reportados por Cabeza et al. en 1998 para las virutas desnaturalizadas con MgO y las virutas desnaturalizadas con NaOH en este trabajo.

En este procedimiento se obtuvo un subproducto llamado proteína gelatinizable, en la tabla 2 se observan las características físico-químico reportadas por Cabeza et al. en 1998. Este subproducto presenta buenas propiedades para estabilizar emulsiones y como inhibidores de corrosión (Cantera & Bértola, 1999). Además tiene usos potenciales como cosméticos, adhesivos, impresión fotografía, micro encapsulación y aditivo en productos de la industria del cuero (Cabeza et al., 1998).

Tabla 2. Características físico-químicas de la gelatina (Cabeza et al., 1998).

Propiedad	Gelatina
pH	9.1
Sólidos totales (%)	3.54
Nitrógeno (%)	17.35
Cromo (ppm)	12.5
Viscosidad (cP)	2.212

3.2 Efecto de la carga de sólidos

Se encontró un efecto estadísticamente significativo de la carga sólidos sobre el grado de hidrólisis ($p < 0.05$), datos que se pueden confirmar con los datos del ANOVA (tabla 3). En la figura 3 se observa que a medida que se aumenta la carga, el grado de hidrólisis va disminuyendo en el tiempo, ocasionado por la saturación de la enzima al aumentar el sustrato. El máximo grado de hidrólisis enzimática alcanzado fue de 4.8% con una carga de sólidos de 20 g/L. Con mayores cargas de sustrato posiblemente, todos los centros catalíticos, están ocupados por el sustrato, provocando que la enzima se sature (Berg et al., 2008) disminuyendo su reacción de hidrólisis.

Tabla 3. Análisis ANOVA del efecto de la carga de sólidos sobre el GH

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: tiempo	177.541	6	29.5902	142972.25	0.0000
B: carga de sólidos	2.51622	3	0.83874	4052.57	0.0000
INTERACCIONES					
AB	1.84197	18	0.102331	494.44	0.0000
RESIDUOS	0.01159	56	0.000206965		
TOTAL (CORREGIDO)	181.911	83			

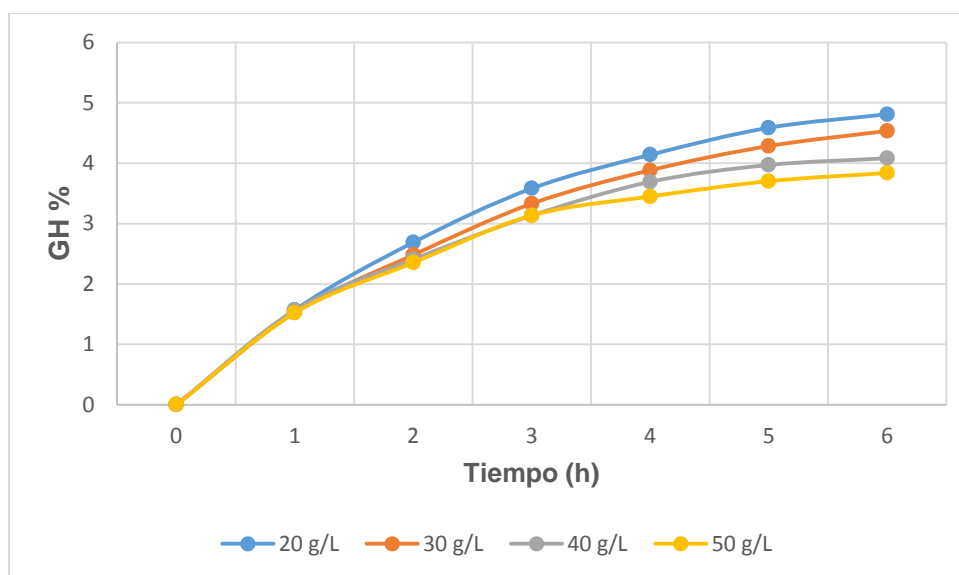


Figura 3. Comparación del GH en el tiempo a diferentes cargas de sólidos.

Teniendo en cuenta que se obtuvo un mayor grado de hidrólisis con la menor carga de sólidos (20 g/L) se fijó esta concentración para evaluar el efecto de la concentración de la enzima sobre el grado de hidrólisis.

3.3 Efecto de la concentración de enzima

En la figura 4, se puede observar la comparación de los grados de hidrólisis obtenidos a diferentes concentraciones de enzima, 62, 123, 185 y 247 $\mu\text{L/g}$, observando un incremento del grado de hidrólisis a mayor carga de enzima, se obtuvo un mayor grado de hidrólisis de 5.8% con 247 $\mu\text{L/g}$. Se encontró un efecto estadísticamente significativo de la carga de enzima sobre el grado de hidrólisis ($p < 0.05$) (Tabla 4).

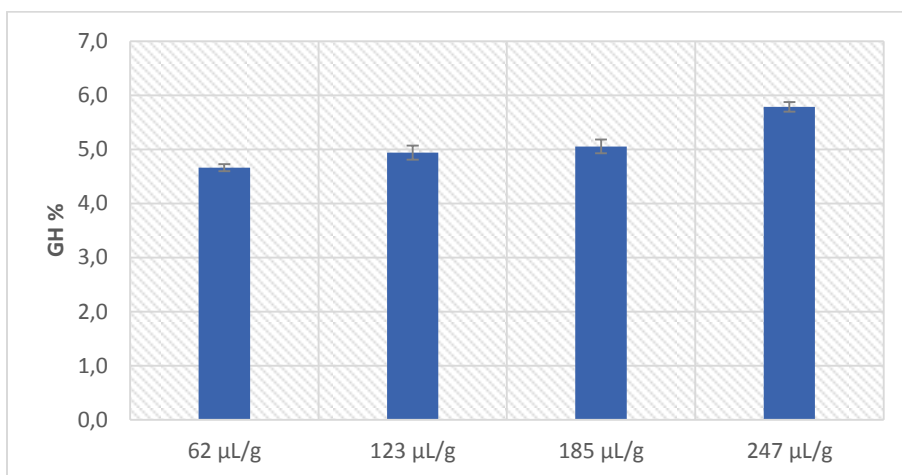


Figura 4. Comparación del GH variando la concentración de enzima.

Tabla 4. Análisis ANOVA del efecto de la carga de enzima sobre el GH

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Tiempo	236.095	6	39.3492	1297.63	0.0000
Concentración de enzima	4.55015	3	1.51672	50.02	0.0000
Residuo	2.24397	74	0.0303239		
Total (corregido)	242.889	83			
R-Cuadrada = 99.0761 por ciento					
R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 98.9638 por ciento					

A mayor cantidad de enzima se puede lograr un mayor grado de hidrólisis, en este caso de proteína a péptidos o aminoácidos libres, sin embargo se debe tener en cuenta que en procesos de hidrólisis éste es uno de los factores a controlar y optimizar, debido a que el uso excesivo de enzima es proporcional al costo del proceso (Gaviria-Acosta et al., 2015).

Se encontró el máximo GH con la mayor carga de enzimas, pasando de 4.941% a un

5.788% con una carga de 123 $\mu\text{L/g}$, a una de 247 $\mu\text{L/g}$, lo que significa un aumento del grado de hidrólisis del 17%. Al realizar el test de múltiples rangos, se observó en la tabla 5 que en el intervalo de concentración de enzima 123 $\mu\text{L/g}$ – 185 $\mu\text{L/g}$ no existe una diferencia estadísticamente significativa, es decir, se encuentran en el mismo rango.

Tabla 5. Test de múltiples rangos para el grado de hidrólisis variando la concentración de la enzima

Enzima ($\mu\text{L/g}$)	Recuento	Media MC	Sigma MC	Grupos Homogéneos
67	21	3.16362	0.0379999	X
123	21	3.4061	0.0379999	X
185	21	3.44741	0.0379999	X
247	21	3.81467	0.0379999	X

En la Tabla 6 se encuentra la información de la composición del hidrolizado de colágeno y la torta desnaturalizada obtenida en este trabajo y lo reportado en la literatura. Según esta tabla se puede observar que el contenido de cromo del hidrolizado de colágeno es inferior frente a los otros estudios, teniendo un mayor campo de aplicación en la industria.

Tabla 6. Composición del hidrolizado de colágeno y la torta desnaturalizada.

	Nitrógeno %	Cromo	Referencia
Hidrolizado de colágeno	14-16	<2 – 100 ppm	(Cantera & Bértola, 1999)
	19	7.1 ppm	(Cabeza et al., 1998)
	14.3	0.59 ppm	Este trabajo
Torta hidrolizada	6.5-8.5	14-16%	(Cantera & Bértola, 1999)
	10.88	7.95%	(Cabeza et al., 1998)
	9.4	4.40%	Este trabajo

Datos en base seca.

En la Tabla 7, se encuentra un antecedente del grado de hidrólisis alcanzado, la diferencia observada se debe a la enzima utilizada en cada procedimiento, teniendo en cuenta que Purzym 50 es una enzima comercial utilizada en la operación de purga y no se encuentra tan concentrada como la Alcalase[®] 2.5L utilizada en este trabajo. Las condiciones de hidrólisis fueron iguales en cuanto a la temperatura (60°C) y pH básico, en cuanto al tiempo Reyes en 2016 llevó a cabo la reacción durante 8 horas y 6% de enzima, mientras que en este trabajo fueron 6 horas. Ambas hidrólisis se realizaron a partir de las virutas desnaturalizadas con NaOH.

Tabla 7. Antecedente GH

Enzima	Grado de hidrólisis	Desviación estándar	Fuente
Purzym 50	2.456%	0.809	(Reyes, 2016)
Alcalase [®] 2.5L	4.9%	0.0009	Este trabajo

El tratamiento del hidrolizado de colágeno permite obtener una proteína con potenciales aplicaciones en la industria alimentaria, para esto es necesario una implementación de una resina de intercambio aniónica-catiónica para adecuar las propiedades según lo exige esta industria, este hidrolizado puede emplearse también como fertilizante, como comida para animales y adhesivos (Cantera & Bértola, 1999).

El hidrolizado líquido tiene un contenido de sólidos del 8.2%, en la figura 5, se encuentra el espectro FTIR de éstos sólidos, las bandas de absorbancia obtenidas fueron comparadas con las bandas características para el colágeno Tipo I (González, 2007), donde se puede observar una gran similitud entre éstas, los números de onda encontrados fueron: 1320-1340 cm^{-1} para el grupo COO^- , 1405-1410 cm^{-1} el CH_2 que son las vibraciones por deformación del grupo CH_2 de la Glicina, en el 1450 cm^{-1} se encuentra el anillo pirrol, de 1530-1590 se encuentra el enlace N-H, es decir, una amida II y en 2925 cm^{-1} la vibración por estiramiento simétrico del grupo CH_2 .

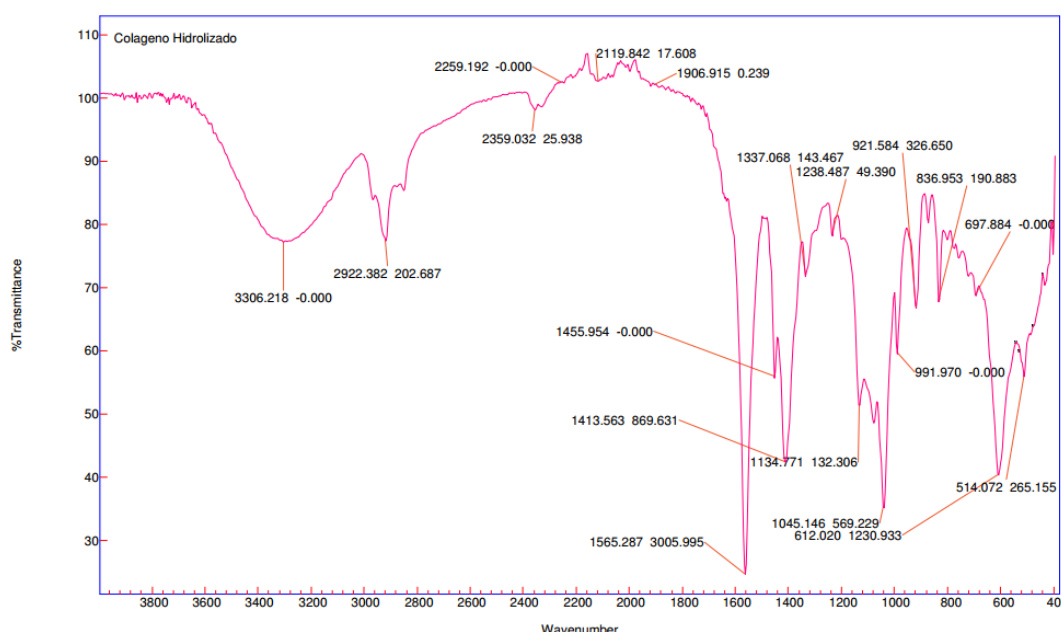


Figura 5. Caracterización en el FTIR del colágeno hidrolizado en estado sólido.

3.4 Descurtición

Este procedimiento se realizó para evaluar de forma general la recuperación del cromo de la torta resultante de la hidrólisis enzimática, por lo tanto se realizó bajo condiciones reportadas previamente por Reyes en 2016. Al realizar la descurtición a las condiciones propuestas se removió el 56% del cromo presente en la torta hidrolizada, como se observa en la tabla 8.

Tabla 8. Comparación del contenido de cromo entre la torta desnaturalizada y la torta descurtida.

Parámetro	Torta Hidrolizada	Torta Descurtida
Cr (%)	4.40	1.93

La importancia de la descurtición es aprovechar el cromo contenido en la torta, dándole un uso en la industria de cueros principalmente en la etapa de curtido, el cromo precipitado puede mezclarse con sulfato de cromo básico comercial en una proporción de 40:60 respectivamente, para curtir pieles para calzado colegial y confección (Ortiz & Carmona, 2015), reduciendo el consumo de sulfato de cromo en las curtiembres. Estos residuos sin cromo tienen alto contenido de proteína que pueden ser utilizados como abono en suelos para agricultura, alimentación de animales y otros usos industriales diversos (Jordán, 2011). Se debe tener en cuenta que se debe realizar un tratamiento previo para las aplicaciones de la torta descurtida.

Además al reducir la cantidad de Cr^{+3} , se va a minimizar la posibilidad de que se oxide pasando a Cr^{+6} , siendo éste un residuo potencialmente tóxico y peligroso para el ambiente, por lo tanto se disminuye el impacto ambiental producido en las curtiembres.

4. CONCLUSIONES

Se concluyó que en la hidrólisis enzimática existen factores que optimizan la obtención de colágeno hidrolizado, esto se puede determinar mediante el grado de hidrólisis. En este trabajo, la desnaturalización con NaOH 3M presentó un mayor grado de hidrólisis frente a la desnaturalización con MgO 14g/L, debido al carácter alcalino fuerte del hidróxido de sodio. Por otro lado, según las variables de estudio, la carga de sólidos que presentó un mayor grado de hidrólisis, fue la de 20 g/L con un grado de hidrólisis del 4.81%, en cuanto a la relación enzima- sustrato el mayor grado de hidrólisis fue de 5.8%, con la relación de enzima-sustrato de 247 $\mu\text{L/g}$, pero teniendo en cuenta que con esta relación enzima-sustrato solo aumenta un 17% frente a la de 125 $\mu\text{L/g}$, se concluye que se obtiene un mejor grado de hidrólisis con 125 $\mu\text{L/g}$, con un rendimiento de 4.15%. Finalmente, se puede concluir que la carga de sólidos y la concentración de enzima tienen un efecto significativo en el grado de hidrólisis. El hidrolizado de colágeno obtenido tuvo un contenido de nitrógeno de 14.3 % y 0.59 ppm de Cromo, teniendo características llamativas para el mercado debido a su bajo contenido de cromo y por contenido proteico. Su uso industrial puede ser en la cosmética, industria alimentaria con su respectivo tratamiento, adhesivos y su uso más común en la industria del cuero.

Se considera prioritario el desarrollo de tecnologías de tratamiento de residuos para la valorización de los mismos, además se debería evaluar este proyecto a escala piloto con el fin de establecer las variables óptimas para operar en una planta real, y también las condiciones óptimas en las cuales se realice la máxima remoción de cromo en la operación de descurtición.

Esta investigación puede seguir evaluando y desarrollando las aplicaciones de los subproductos obtenidos como, la gelatina, el hidrolizado de colágeno y la torta de cromo.

5. AGRADECIMIENTOS

Agradecemos sinceramente:

A Yineth Piñeros, nuestra directora, por su interés y apoyo en este proyecto, por guiarnos en este proceso de investigación, brindándonos sus conocimientos y su valioso tiempo. A Cecilia Bacca, por aportarnos su conocimiento, interés y amor por la bioquímica. Al Centro de Biosistemas por la ayuda brindada.

Agradezco a mis papás y a Pipe, por todo el apoyo y amor durante toda la carrera, por ser mi guía y lo más importante en mi vida. ¡Este logro es de ustedes! A mi familia por siempre estar pendiente de este proceso. A Andrey Pedraza por ser mi compañero y cómplice en todo. A mis amigos por hacer de esta etapa una de las mejores (Andrea Nieto).

Quiero agradecerle a Dios por darme fuerzas para siempre salir adelante, a mi papá por el apoyo y sus aportes en todo lo relacionado a los cueros, a mi mamá por darme ánimo en toda mi carrera universitaria, a mis hermanos Daniela y Sebastian, a todas las personas de las curtiembres en San Benito que me aportaron sus conocimientos, a mis compañeros de la universidad y en especial a Andrea Nieto por brindarme su amistad y ayudarme a lo largo de mi carrera universitaria. (Andrey Pedraza)

6. REFERENCIAS

- Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymatic hydrolysis of food proteins*. London: Elsevier Applied Science Publisher.
- Baez-Suarez, A., Ospina-de-Barreneche, N., & Zapata-Montoya, J. (2016). Efecto de Temperatura, pH, Concentración de Sustrato y Tipo de Enzima en la Hidrólisis Enzimática de Vísceras de Tilapia Roja (*Oreochromis spp.*). *Informacion Tecnologica*, 27(6), 63–76.
- Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína : procesos y aplicaciones. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 42(2), 227–237.
- Berg, J., Tymoczko, J., & Stryer, L. (2008). *Bioquímica*. Barcelona: Ed. Reverté.
- Burriel, F., Lucena, F., Arriba, S., & Hernández, J. (2008). *Química analítica cualitativa*. Madrid: Ed. Thompson.
- Cabeza, L. F., Taylor, M. M., Dimaio, G. L., Brown, E. M., Marmer, W. N., Carrió, R., ... Cot, J. (1998). Processing of leather waste: Pilot scale studies on chrome shavings. Isolation of potentially valuable protein products and chromium. *Waste Management*, 18(3), 211–218.
- Cantera, C. S., & Bértola, C. E. (1999). Valorización de residuos sólidos en la industria del cuero. *Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria Y Ciencias Del Ambiente*, (n° 20), CIC-ISBN 03251233.

- Chávez, Á. (2010, October). Descripción de La nocividad del cromo proveniente de la industria curtiembre y de las posibles formas de removerlo. *Revista Ingenierías Universidad de Medellín*, 9(17), 41–49.
- Díaz, A., Jiménez, J., Pérez, M., & Narváez, P. C. (2006). Planteamiento y evaluación de las aplicaciones de los productos obtenidos en la hidrólisis alcalina productos obtenidos en la hidrólisis alcalina de las virutas de cromo generadas durante el procesamiento del cuero. *Ingeniería E Investigación*, 26(3), 50–57.
- Flores, H., Retamar, J. C., Orué, S., Lacoste, A., & Prez, L. (2007). Virutas de cuero - Obtención De Un Adhesivo Como Sustituto De Materiales Ureicos. *Universidad Nacional Del Litoral*, XI, 1–11.
- Frankel, A. (1989). *Tecnología del cuero*. Buenos Aires: Ed. Albatros.
- Gaviria-Acosta, E., Benítez-benítez, R., Lenis, L., & Hoyos-concha, J. L. (2015). Optimización de la hidrólisis enzimática de proteínas presentes en semillas de Guandul (*Cajanus cajan*). *Biotecnología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial*, 13(2), 114–122.
- Gomez, A. J. (2014). Evaluación de la gestión integral de residuos sólidos en las curtiembres de san benito. *Censo Curtiembre Salud Pública Hospital Tunjuelito*, 18.
- González, R. (2007). *Caracterización de la interacción entre colágeno-hidroxiapatita y de una muestra PEAD-Colagéno*. Universidad Simón Bolívar.
- Jordán, M. F. (2011). *Obtención de colágeno por hidrólisis alcalina-enzimática del residuo de "wet blue" en el proceso de curtición*. Escuela superior politécnica de Chimborazo.
- Kolomaznik, K., & Viswanathan, M. (2001). Enzymatic digestion of chrome shavings. *United Nations Industrial Development Organization*, (September), 1–26.
- Novozymes. (2017). Alcalase, Novozymes. Retrieved from <http://www.novozymes.com/en/solutions/pharmaceuticals/biocatalysis/protease-enzymes>
- Ortiz, N. E., & Carmona, J. C. (2015). Aprovechamiento De Cromo Eliminado En Aguas Residuales De Curtiembres (San Benito, Bogotá), Mediante Tratamiento Con Sulfato De Sodio. *Luna Azul*, 9(40), 117–126.
- Peréz, C. A. (2004). Guía ambiental para el sector curtiembres. Retrieved February 5, 2017, from <http://www.ambientebogota.gov.co>
- Reyes, C. M. (2016). *Recuperación de colágeno libre de cromo de los residuos sólidos postcurtición en la industria del cuero*.
- Schneider, A., Flores, H., Gunst, E., & Rodi, E. (2008). Aglomerado de virutas de cuero - Propiedades térmicas y mecánicas. *Revista AIDIS de Ingeniería Y Ciencias Ambientales*, 1, 36–48.

Secretaría Distrital de Ambiente. (2015). *Guía de producción más limpia para el sector curtiembres de Bogotá. Enfoque en vertimientos y residuos*. Retrieved from <http://www.ambientebogota.gov.co/documents/24732/3987253/Guía+de+producción+más+limpia+para+el+sector+curtiembres+de+Bogotá.+Enfoque+en+vertimientos+y+residuos.pdf>

Serrano, J. C. (2011). *Estandarización de un proceso de extracción de colágeno a partir de los residuos de fileteo de tilapia (*Oreochromis sp*) y cachama (*Piaractus brachypomus*)*. Universidad Nacional de Colombia.