

SESIÓN PRÁCTICA DE LABORATORIO SOBRE LAS ENZIMAS COMO DETERGENTES ECOLÓGICOS Y SOSTENIBLES

OBÓN DE CASTRO, José María; CASTELLAR RODRIGUEZ, M^a Rosario, ALACID CÁRCELES, Mercedes, MARTINEZ GARCÍA, M^a José. Universidad de Politécnica de Cartagena, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental.

RESUMEN

La nueva metodología docente, tanto a nivel Universitario como en Educación Secundaria o Bachillerato, implica una mayor interacción entre docentes y alumnos. La propuesta de una sesión práctica de laboratorio, diferente a la clásica clase magistral, que sea motivadora para el alumnado es de un gran interés para el profesorado. Palabras como medioambiente, sostenibilidad o cambio climático despiertan un gran interés y motivan a los alumnos a participar en las clases. Así esta comunicación ofrece una alternativa a los docentes para abordar estos temas transversales, presentando una sencilla propuesta docente en la que se plantea y discute la posibilidad de sustituir los detergentes de ropa tradicionales, obtenidos a partir de fuentes fósiles como el petróleo, por enzimas y las ventajas medioambientales que ello supondría. Los detergentes tradicionales contaminan el medioambiente, mientras que el lavado de ropa está implicado en el efecto invernadero. También permite hablar sobre el consumo responsable, teniendo en cuenta que a la hora del comprar un detergente se debería contemplar aquel que sea más ecológico. En este sentido se fomenta que el alumno sea consciente de atender al etiquetado de los productos.

La práctica de laboratorio que se propone en relación a esta propuesta docente aborda una sesión en la que los alumnos aprenden a medir y comparar las actividades de las enzimas presentes en detergentes de lavado de ropa comerciales, que ellos mismos traen de casa. Además de las destrezas manipulativas que adquieren, permite introducir e implementar contenidos en asignaturas que abordan la naturaleza de las enzimas, las enzimas como catalizadores biológicos, o las aplicaciones de las enzimas. En este sentido la práctica se lleva realizando con satisfacción por parte de los alumnos en las asignaturas de Bioquímica de la ETSIA.

1. EL ENFOQUE DOCENTE

La nueva metodología docente, tanto a nivel Universitario como en Educación Secundaria o Bachillerato, implica una mayor interacción entre docentes y alumnos [1, 2]. La propuesta de una sesión práctica de laboratorio tiene como objetivos instructivos fundamentales que los alumnos adquieran las habilidades propias de los métodos de la investigación científica, amplíen, profundicen, consoliden, generalicen y comprueben los fundamentos teóricos de la disciplina mediante la experimentación empleando los medios de enseñanza necesarios.

Por todo esto, se plantea la práctica de laboratorio como estrategia de aprendizaje significativo en la que el alumno “aprende a pensar” resolviendo problemas reales. Esta visión rompe con el paradigma de la educación clásica centrada en el maestro y en métodos tradicionales de aprendizaje memorístico, y conciencia al alumno de su necesidad de aprender y, para que con la adecuada colaboración de un docente motivado [3] pueda lograr ser autónomo de su propio aprendizaje.

2. LA INDUSTRIA DE DETERGENTES

2.1. La industria de detergentes y la contaminación medioambiental

En general asociamos la industria de detergentes desde siempre con problemas medioambientales (Figura 1). Ya antes de que aparecieran los detergentes sintéticos, el jabón tenía el problema de que, en aguas muy duras, se combina con el calcio y deja una película insoluble en la superficie del agua. Desde la década de 1960 se han ido introduciendo leyes para limitar el efecto medioambiental de los detergentes.



Figura 1: Efecto de los detergentes en el medio ambiente

Los aspectos que se deben tener en cuenta desde un punto de vista medioambiental son los siguientes:

Biodegradabilidad

Según la legislación vigente, en un paquete de detergente se puede poner la palabra "biodegradable" si el tensioactivo deja de tener un 90% de su propiedad de disminuir la tensión superficial del agua 28 días después de ser vertido al agua (las sustancias tensioactivas causan perjuicios a la vida acuática). Según los fabricantes ecológicos, este grado de biodegradabilidad no es suficiente. Por otro lado, la ley no dice nada del resto de ingredientes, que pueden llegar a significar un 80% del detergente. A pesar de la proliferación de depuradoras, en las aguas marinas se hallan residuos tóxicos de detergentes.

Eutrofización

En España, muchos detergentes convencionales utilizan fosfatos, fosfonatos o percarboxilatos como potenciadores del lavado. Estas sustancias actúan como fertilizantes de las algas, haciendo que se reproduzcan muy deprisa. La gran cantidad de algas agota el oxígeno del agua, que deja de estar disponible para la fauna acuática (microbios y peces), y genera malos olores. Este fenómeno se llama eutrofización, y ha causado desequilibrios muy graves en lagos y ríos. En la mayoría de países europeos y en buena parte de Norteamérica ya está prohibido utilizar estos ingredientes (en algunos lugares desde 1970), pero en España aún no. El sustituto más utilizado son las zeolitas, unas sustancias minerales. Tienen el inconveniente de que no son solubles en el agua, por lo que se acumulan en el fondo de las plantas depuradoras.

Blanqueantes

Pueden estar basados en cloro o en oxígeno. Uno de los principales problemas de los productos basados en cloro es que generan sustancias organocloradas, como dioxinas y furanos, que

causan muchos problemas de salud (disfunciones hormonales, malformaciones en el feto, cáncer) y se acumulan en los tejidos de los seres vivos (no se pueden metabolizar). Actualmente casi no se usan blanqueadores de este tipo para detergentes.

Entre los basados en oxígeno, están el perborato y el percarbonato. El perborato tiene el inconveniente de que libera boro al medio (es tóxico para la vida acuática), y que se debe acompañar de una sustancia, el TAED, que se combina con los metales pesados que hay en los fondos fluviales o marinos y los introduce en la cadena trófica. Además, se debe lavar al menos a 60°C para que haga efecto. El percarbonato blanquea a cualquier temperatura y no libera ninguna sustancia tóxica.

La industria de detergentes también promueve la sostenibilidad entre los propios fabricantes [4] (Figura 2).



Figura 2: Los fabricantes de detergentes y la sostenibilidad

Como ciudadanos involucrados en el cuidado del medioambiente un criterio a tener en cuenta en la compra del detergente de lavado de ropa debería ser la ausencia de compuestos muy contaminantes (p.ej. fosfatos) y no solo la eficacia del lavado (Figura 3).

DETERGENTES EN POLVO Y LÍQUIDOS								
MARCA	A	B	C	D	E	F	G	H
Estado físico	Polvo	Polvo	Polvo	Polvo	Líquido (gel)	Líquido (gel)	Líquido	Líquido
Formato	5,886 Kg	5,886 Kg	5,940 Kg	5,905 Kg	4 litros	4 litros	4.5 4 litros	4 litros
Número de cacitos ¹	54	54	54	54	44	44	40	44
Dosis utilizada	110 gr	110 gr	110 gr	110 gr	90 ml	90 ml	112 ml	90 ml
Precio (euros/kilo o litro)	2.13	2.31	2.49	2.28	2.16	2.30	2.22	2.17
Precio (euros/cacito)	0.23	0.25	0.27	0.25	0.20	0.21	0.25	0.20
Etiquetado	Bien	Aceptable	Bien	Aceptable	Aceptable	Aceptable	Bien	Aceptable
Resultados analíticos								
Contenido en fosfatos (% tripolifosfatos)	Ausencia	Ausencia	Ausencia	24.4	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Contenido en zeolitas (% anhidra) ²	4.1	1.5	17.9	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Resultados del lavado								
Eficacia de lavado								
Poder de detergencia								
En algodón (%) ⁴	41,9	43	37,6	40,3	31,5	31,6	35,4	33,9
En sintético (%) ⁴	52,7	53,3	48,8	49,2	30,8	31,1	35,3	37
Valoración	Muy bien	Muy bien	Muy bien	Muy bien	Aceptable	Aceptable	Bien	Bien
Actividad enzimática (%) ⁴	42,7	46,4	45,4	42,4	43,1	40,5	50,1	33,3
Valoración	Aceptable	Bien	Bien	Aceptable	Aceptable	Aceptable	Bien	Insuficiente
Eficacia de blanqueo (%) ⁴	43,6	45,5	40,5	39,2	17,7	16,3	18,3	16,7
Valoración	Muy bien	Muy bien	Bien	Bien	Muy insuficiente	Muy insuficiente	Muy insuficiente	Muy insuficiente
Eficacia global de lavado	Muy bien	Muy bien	Bien	Bien	Insuficiente	Insuficiente	Aceptable	Insuficiente
Efecto sobre los colores								
Grado de blancura								
Desgradación del matiz	Bien	Bien	Bien	Bien	Bien	Bien	Aceptable	Muy bien
Destierdo global	Aceptable	Aceptable	Aceptable	Aceptable	Bien	Bien	Muy bien	Aceptable
Calidad global de lavado	Bien	Muy bien	Bien	Bien	Aceptable	Aceptable	Aceptable	Insuficiente

(1) Cacitos: Número de dosis, que equivalen al número de lavados que se puede realizar con ese detergente para una ropa medianamente sucia y con agua de dureza media. (2) Fosfatos: Agentes anticacitos muy contaminantes que neutralizan la cal del agua. (3) Zeolitas: Agentes anticacitos, aunque de menor eficacia que los fosfatos y menos contaminantes. (4) Resultados expresados en porcentaje medio de eliminación de manchas a 30°C.

Figura 3: Comparativa de la calidad global de lavado de detergentes de lavado de ropa

Un dato para pensar: ¿Cuántos Kg de detergente de lavado de ropa gasta España en un año? Si una familia de 5 miembros pone la lavadora 1 vez al día, usando 1 cacito de 100 g de detergente en polvo, al cabo de 1 año se gastan en España 343 millones de kilos (47.000.000 habitantes / 5

miembros por familia x 0'1 Kg x 365 días).

2.2. La industria de detergentes y el cambio climático

La empresa de detergentes Procter & Gamble en una investigación sobre la valoración del consumo de energía durante el ciclo de vida de diversos productos (desde la producción, al transporte, uso y eliminación del producto) (Figura 4). La mayor huella de CO₂ se produce en el calentamiento del agua en la fase de lavado, y que representa un 50 por ciento de la energía de todo el ciclo de vida. Según señala se calcula que se podrían evitar 60.000 toneladas de emisiones de CO₂ sólo con reducir la temperatura de lavado en España. Si, por ejemplo todos los ciudadanos de EE.UU. lavaran su ropa en agua fría, el ahorro de emisiones de gases de efecto invernadero correspondería a más de un 6% del compromiso original de Kioto de EE.UU.

Aun cuando en muchos países el mayor efecto al medio ambiente del lavado de ropa es el calentamiento del agua de lavado, muchos consumidores que querrían reducir la temperatura de lavado no lo hacen pensando que la ropa no quedaría limpia.

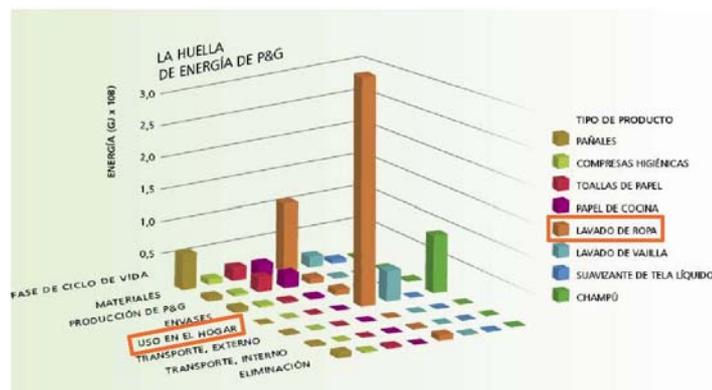


Figura 4: Valoración de la huella de la Energía de diversos productos

La huella energética es un indicador clave para la sostenibilidad. Las empresas de detergentes están de acuerdo en que el uso de detergentes compactos, el uso de ingredientes más biodegradables y ecoeficientes, mejores envases y otros cambios en el proceso de producción contribuyen a mejorar el perfil de sostenibilidad de los detergentes [4]. Aún así reconocen que es el consumidor el responsable de la mayor parte de la huella de CO₂.



Figura 5: El consumidor es clave para el cambio climático

3. USO DE ENZIMAS COMO DETERGENTES ECOLÓGICOS

La mayoría de las personas sabe que se usan enzimas en los detergentes, pero no sabe que las enzimas han revolucionado también la formulación de los detergentes así como las costumbres de lavado durante las últimas décadas [5].

Todo empezó porque las enzimas son capaces de eliminar las manchas más difíciles de proteína que antes sólo podían eliminarse frotando, hirviendo y usando productos químicos agresivos. La entrada en la formulación de detergentes de una proteasa detergente de gran eficiencia, marcó el inicio de una revolución del lavado. Esta enzima permitió atacar las manchas más difíciles sin dañar la tela. Hoy día, la ropa suele quedar limpia si se lava a temperaturas tan bajas como 30-40°C.

Desde el lanzamiento de esta proteasa, ha habido un flujo constante de avances tecnológicos en el lavado enzimático. Actualmente se usan en la formulación de detergentes nuevos tipos de enzimas diseñadas para eliminar distintos tipos de manchas y cuidar la tela. El uso de enzimas se ha extendido más allá de la eliminación de manchas, y enzimas especializadas pueden ayudar a mantener los colores, mejorar el blanqueo y suavizar la tela. Gracias a estas características únicas, las enzimas constituyen uno de los principales componentes que respaldan las promesas de los detergentes modernos. Conjuntamente, las enzimas han contribuido a que los detergentes sean más ecológicos porque reducen el consumo de agua y energía así como la cantidad de productos químicos necesarios para limpiar la ropa. Las enzimas más recientes permiten lavar la ropa con gran eficiencia en agua fría lo cual es cada vez más importante para los consumidores, además de ser resistentes a la oxidación [6]. Las enzimas de uso más corriente y sus aplicaciones en los detergentes se describen en la Tabla 1. Hoy día, la mayor parte de los detergentes en todo el mundo contienen enzimas. Algunas marcas incluso contienen hasta cinco tipos diferentes para conseguir un amplio espectro de beneficios de lavado y cuidado de la tela. La industria de detergentes confía en el desarrollo de nuevas enzimas.

Tabla 1: Enzimas que se usan en detergentes

Proteasas	Eliminan las manchas de proteína más difíciles como sangre, pasto, etc., y funcionan a temperaturas de lavado tan bajas como 5°C.
Amilasas	Eliminan los residuos de alimentos de almidón como puré de patatas, alimentos infantiles, platos preparados y salsas.
Celulasas	Ofrecen beneficios como cuidado de los colores, blanqueo, suavidad y cuidado de la tela. Las celulasas son capaces de eliminar pelusilla y bolitas de las telas de algodón, prolongando su aspecto de nuevas.
Lipasas	Eliminan las manchas como lápiz de labios, grasas de freír, mantequilla, aceite de ensalada, salsas y las manchas de sudor en los cuellos y puños.

El uso de enzimas solas para el lavado es un reto que se debería alcanzar en 10 o 20 años. Así, una disolución multienzimática diseñada a tal efecto podría sustituir un porcentaje de tensioactivos y reforzantes de la formulación total, sin pérdida de eficacia de lavado. Se ha demostrado que una fórmula optimizada con cuatro tipos de enzima, con un sistema de tensioactivo y un activador de blanqueo, permite conseguir un detergente con alta eficacia de lavado en agua fría.

Las enzimas representan una alternativa a los productos químicos derivados del petróleo y otros productos no respetuosos con el medio ambiente. Las enzimas proporcionan la misma eficacia y comodidad y son más respetuosas con el medio ambiente que estos productos químicos.

4. COMPOSICIÓN DE UN DETERGENTE DE LAVADO DE ROPA Y SU EFECTO EN EL MEDIOAMBIENTE

La primera práctica que se propone al alumno es estudiar la composición química de uno o varios detergentes comerciales, de manera que despierten el interés de conocer que contienen los detergentes que utilizamos diariamente.

Así, atendiendo al etiquetado de un detergente en polvo de lavadora el alumno conoce los ingredientes que contiene. A modo de ejemplo la composición de un detergente de lavadora es (Figura 6):

- 15 % - 30 % Zeolitas. Blanqueantes oxigenados
- 5 % - 15 % Tensioactivos aniónicos
- < 5% Tensioactivos no iónicos, Jabón, Blanqueantes ópticos
Fosfonatos, Enzimas, Perfumes, Hexyl cinnamal
Butylphely methylpropional, Citronellool



Figura 6: Composición de un detergente de lavadora

La información de componentes de detergentes sigue la normativa UE del Parlamento y el Consejo de Europa de 31 de marzo de 2004 sobre detergentes. Cada ingrediente se describe con su nombre INCI (Nomenclatura Internacional para Ingredientes Cosméticos). Cuando no hay un nombre INCI disponible, entonces el ingrediente se describe por su nombre común. Es posible además consultar on-line información general referente a las sustancias químicas en la WEB ESIS (Sistema Europeo de información de sustancia químicas) así como su clasificación y etiquetado de acuerdo con la Directiva 67/548/EC. CosIng es la base de datos de la comunidad europea sobre ingredientes cosméticos.

En la formulación de este detergente se usan por ejemplo fosfonatos que son compuestos orgánicos que contienen los grupos $C-PO(OH)_2$ o $C-PO(OR)_2$ (donde $R =$ alquilo, arilo). Los fosfonatos son conocidos como efectivos agentes quelantes. Algunos ejemplos de tales compuestos son el EDTMP (ácido etilendiamino tetrametilenfosfónico) y DTPMP (ácido dietilentriamino penta-metilenfosfónico). Estos fosfonatos comunes son los análogos estructurales de los bien conocidos aminopolicarboxilatos EDTA y DTPA. Los fosfonatos son altamente solubles en agua. La toxicidad de los fosfonatos a organismos acuáticos es baja, si bien su contenido en fósforo favorece la proliferación de las algas.

5. PRÁCTICA DE LABORATORIO

Medidas de actividad amilasa en detergentes de lavadora en polvo comerciales

Entre los componentes que se encuentran en una proporción inferior al 5% se encuentran las enzimas. Detectar la presencia de las enzimas en la formulación de detergentes de lavadora en polvo

va a ser el objeto de esta práctica. En particular se va a determinar la actividad amilasa siguiendo la reacción de hidrólisis del almidón.



Materiales

- Balanza
- Espectrofotómetro
- Agitador magnético termostatzado
- Baño termostático
- Tubos de ensayo y gradilla
- Pipetas y propipetas de 1 y 5 mL

Reactivos

- Disolución de almidón en agua: 10 g/L
Para conseguir disolver el almidón es necesario calentar la disolución.
- Disolución de detergentes de lavadora en agua: 10 g/L (1 g/ 100 mL)
Se pueden utilizar varios detergentes de lavado de ropa en polvo a modo comparativo, eligiendo aquellos en cuya composición aparezcan enzimas, y a ser posible que sean glicosidasas (amilasas). Es preferible que el detergente no contenga en grandes cantidades blanqueantes oxigenados, pues en ese caso seria necesario utilizar mayores cantidades de reactivo de yodo que dejen yodo libre en disolución.
- Disolución de povidona yodada diluida 10 veces (betadine: disolución de povidona y yodo molecular en un 10%).
- Reactivo DNS (dinitrosalicílico) Disolver 1 g. de ácido 3,5-dinitrosalicílico en 20 mL de NaOH 2 N, y 50 mL de agua. Añadir 30 g. de tartrato sódico-potásico 4 H₂O (sal de Rochelle) y llevar a 100 mL. Proteger de la luz y del dióxido de carbono.
- Disolución de maltosa 4 mM en agua.

Propuesta experimental: Medida de actividad α -amilasa

En esta práctica se plantean utilizar dos protocolos de medida de actividad amilasa. El primero es el método del DNS, que detecta la aparición del producto de reacción maltosa, y el segundo es el método del yodo que mide la desaparición de un complejo azul con el almidón con el transcurso de la reacción. El primero es el mas adecuado pues permite cuantificar de una manera sencilla la actividad enzimática, mientras que el segundo método puede ser mas cualitativo.

Los distintos ensayos que se proponen realizar son:

- Medidas de actividad amilasa con diferentes detergentes comerciales de lavado de ropa. ¿Qué detergente ha utilizado más enzima en su formulación?
- Medidas de actividad amilasa a distintas temperaturas (20, 40 y 60 °C) con un mismo detergente (efecto de la temperatura en la actividad). ¿A que temperatura muestra mayor actividad la enzima y se lava por tanto mejor?.
- Medidas de actividad amilasa a diferentes tiempos de incubación de la disolución de detergente (efecto de la temperatura en la estabilidad de la enzima, termoestabilidad). Se incubaba el detergente a 60 °C, y se mide la actividad sin incubación (tiempo 0), y tras incubación 15, 30 y 60 min. Estudio de cinéticas de desactivación. ¿Pierde actividad la enzima durante 1 hora de lavado a 60 °C?

El nivel de los alumnos y el tiempo disponible, se utilizará como criterio para seleccionar los experimentos a realizar.

Protocolo de medida α -amilasa en detergentes comerciales de lavado de ropa.

En primer lugar se deber preparar la disolución de detergente (1g / 100mL agua) (Figura 7).



Figura 7: Disolución del detergente

a) Método del DNS

El fundamento del método utilizado para medir la actividad amilasa se basa en determinar la concentración de los productos de reacción (maltosa fundamentalmente) con el tiempo. Para ello se utiliza un reactivo de color en el que los grupos reductores liberados del almidón son medidos por reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico [7].

La reacción tiene lugar en un tubo de ensayo con la temperatura controlada a 40 °C. Los resultados son mejores si se calienta la reacción a 30-40 °C, atendiendo a que el lavado de la ropa se realiza a esas temperaturas.

Para realizar la reacción enzimática se adiciona a un tubo de ensayo:

	Tubo de ensayo
Volumen de disolución de detergente (mL)	1,0
Volumen de disolución de almidón (mL)	4,0

En el momento que se pone en contacto la disolución de detergente (que contiene la enzima) y la disolución de almidón (el sustrato de la enzima) se inicia la reacción y se considera como tiempo cero. En ese instante se anota la hora mirando el reloj, se toma 1 mL de la mezcla y se pone en contacto con 1 mL del reactivo de color DNS. Esta operación se repite a los 15, 30 y 60 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo se calientan todos los tubos durante 15 minutos a 85-90 °C por inmersión en un baño termostático. Finalmente se adicionan 4 mL de agua, y se mide la absorbancia a 540 nm frente a la muestra de reacción a tiempo cero.

Mientras procede la reacción enzimática y se toman las muestras, se va a realizar la recta de calibrado del método DNS utilizando la disolución patrón de maltosa. Para ello rotulamos 5 tubos de ensayo, y adicionamos lo siguiente:

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4
Volumen de disolución de maltosa (mL)	0,0	0,3	0,6	1,0
Volumen de agua (mL)	1,0	0,7	0,4	0,0
Volumen de reactivo DNS (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0

Una vez mezclados los tubos se incuban en un baño a 90 °C durante 15 minutos. Al final de este tiempo los tubos toman el color que se observa en la Figura 8.

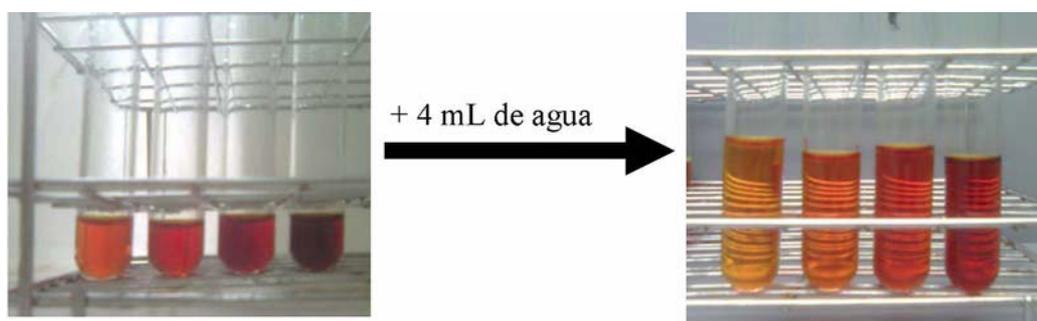


Figura 8: Dilución de los tubos de la recta de calibrado

Finalmente estos tubos se miden también en el espectrofotómetro a 540 nm. El resultado de la recta de calibrado se presenta en la Figura 9.

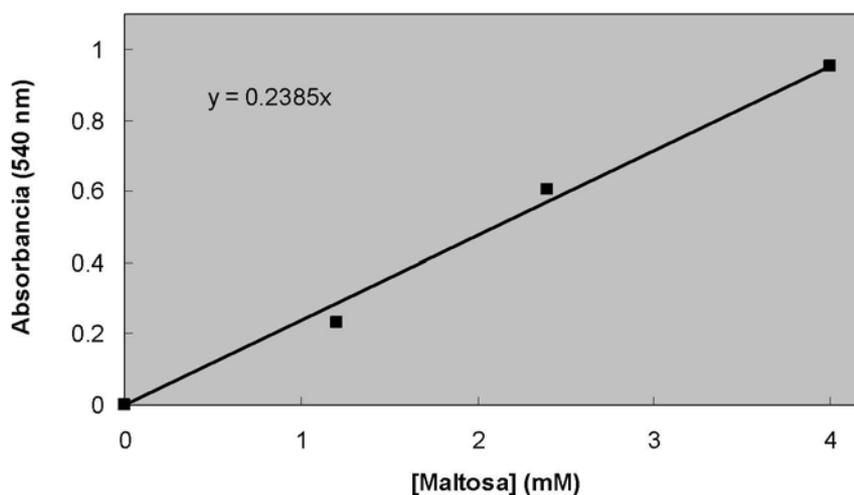


Figura 9: Recta de calibrado con maltosa

$$\text{Absorbancia (540 nm)} = 0,2385 [\text{Maltosa}] (\text{mM})$$

Esta recta de calibrado nos va a permitir relacionar los valores de absorbancia determinados con la concentración de maltosa de las muestras.

En el caso de la reacción enzimática el resultado se puede observar en la Figura 10.

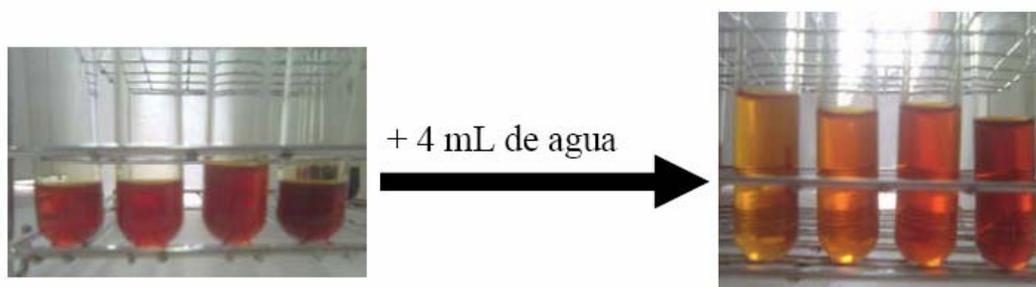


Figura 10: Medida de la actividad enzimática amilasa con el reactivo DNS

El valor máximo de absorbancia obtenido en la medida de los 60 minutos fue de 0,4.

Cálculo de actividades:

Se realiza una gráfica de absorbancia frente al tiempo de reacción, que da una recta de pendiente positiva que pasa por el origen de coordenadas y con un coeficiente de regresión superior a 0.999. Se define la actividad enzimática como la cantidad de enzima que se necesita para producir un μmol de maltosa por minuto, en las condiciones de ensayo especificadas anteriormente.

$$\text{Actividad} = \frac{\Delta \text{Absorbancia} / \text{min} \times 5 \text{ mL}}{0.2454} \quad (\mu\text{moles}/\text{min})$$

El valor de la medida de actividad obtenido de los ensayos con distintos detergentes comerciales de lavado de ropa nos va a permitir conocer si las empresas han adicionado la enzima amilasa en su formulación de lavado.

b) Método de medida con yodo

El fundamento del método se basa en que una disolución de yodo que con almidón produce un complejo de color azul intenso. El almidón está compuesto aproximadamente por un 25% de amilosa, y un 75% de amilopectina. La amilosa, el componente del almidón de cadena lineal, forma hélices donde se incluyen las moléculas de yodo, formando un color de azul oscuro a negro. La amilopectina, el componente del almidón de cadena ramificada, forma hélices mucho más cortas, y las moléculas de yodo son incapaces de incluirse, conduciendo a un color ámbar, entre naranja y amarillo. Al romperse o hidrolizarse el almidón en unidades más pequeñas de carbohidrato, el color azul-negro desaparece. En consecuencia, esta prueba puede determinar la hidrólisis de la amilosa por la enzima amilasa asociando la pérdida del color azul-negro con la actividad de la enzima.

Se procede como en el caso anterior realizando la reacción con la temperatura controlada a 40 °C, adicionando al tubo de ensayo 1 mL de disolución de detergente y 4 mL de disolución de almidón. En el momento que se pone en contacto la disolución de detergente (que contiene la enzima) y la disolución de almidón (el sustrato de la enzima) se inicia la reacción y se considera como tiempo cero. En ese instante se anota la hora mirando el reloj, se toma 1 mL de la mezcla y se pone en contacto con 4 mL de agua y 0,2 mL de reactivo de yodo (betadine diez veces diluido). Esta operación se repite a los 15, 30 y 60 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo se mide la absorbancia a 590 nm frente a un

blanco con agua.

Los valores obtenidos con el detergente ensayado fueron:

	Tiempo 0	Tiempo 15 min	Tiempo 30 min	Tiempo 60 min
Abs 590 nm	1,66	1,52	1,38	1,15



Figura 11: Medida de la actividad enzimática amilasa con el reactivo de yodo

En la figura 11 se ven los resultados obtenidos. Este ensayo es más sencillo que el anterior pues no implica calentamiento, se usan reactivos de fácil acceso y por tanto no se es necesario pedir reactivos especiales. Aún así hay que tener la precaución de probar la práctica antes de realizarla para ajustar la cantidad de betadine diluido que se debe usar, pues algunos detergentes contienen blanqueantes oxigenados y se debe adicionar más betadine diluido. Como ensayo previo se debe preparar una disolución con 4 mL de agua y 1 mL de disolución de detergente, tomar 1 mL y añadir disolución de betadine diluida hasta que quede un color ambar claro. Al hacer la reacción con almidón en vez de con agua, tal y como se hace en el ensayo de actividad enzimática, el color azul a tiempo cero tiene que poder medirse en el espectrofotómetro (absorbancia próxima a 1,5 unidades).

6. REFERENCIAS

- [1] BANET, E. *Innovación curricular y enseñanza de las ciencias en educación secundaria*. Editorial: Murcia: Universidad de Murcia, 2000.
- [2] GOÑI ZABALA, J.M. *El Espacio Europeo de Educación Superior: competencias, tareas y evaluación, los ejes del currículum universitario*. Editorial: Barcelona: Octaedro: Universitat de Barcelona, Institut de Ciències de l'Educació, 2005.
- [3] SILVERO MIRAMÓN, M. *Motivación y calidad docente en la universidad*. Editorial: Pamplona: EUNSA, 2006.
- [4] http://www.scienceinthebox.com/es_ES/main/index_es.html
- [5] <http://www.novozymes.com>
- [6] BORCHERT, T.V., LASSEN, S.F., SVENDSEN, A. y FRANTZEN, H.B. Oxidation stable amylases for detergents. *Progress in Biotechnology*, 10, 1995, pp. 175-179.
- [7] ARIKAN, B. Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from a thermophilic *Bacillus sp.* isolate A3-15. *Bioresource Technology*, 99, 2007, pp. 3071-3076.